

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

พลังงานเชื้อเพลิงถือเป็นปัจจัยที่สำคัญในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจของโลก เนื่องจากมีความต้องการใช้พลังงานในทุกภาคส่วนทั้งในภาคอุตสาหกรรมการผลิตและการคมนาคมขนส่ง โดยเฉพาะน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งมีความต้องการใช้เป็นปริมาณมากและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี และจากการที่ประเทศไทยมีการใช้พลังงานในภาคขนส่งที่เพิ่มมากขึ้นปัจจุบันพบว่าประเทศไทยต้องพึ่งพาการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตปิโตรเลียมภายในประเทศได้ตามความต้องการใช้งาน และเพื่อการพัฒนาไปสู่สังคมคาร์บอนต่ำ (low carbon society) (Silalertruksa *et al.*, 2009) รัฐบาลจึงได้มอบหมายให้กระทรวงพลังงานจัดทำแผนการพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือก (Alternative Energy Development Plan, AEDP) ให้มีปริมาณการใช้เป็นร้อยละ 25 ภายในระยะเวลา 10 ปี (ตั้งแต่ปี พ.ศ.2555-2564) โดยระบุกรอบและทิศทางการพัฒนาพลังงานทดแทนของประเทศไทยเพื่อสร้างความมั่นคงด้านพลังงานภายในประเทศ ซึ่งกรอบการดำเนินงานที่สำคัญ คือ การตั้งเป้าหมายของการนำพลังงานเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในภาคการขนส่งเพื่อทดแทนการใช้เชื้อเพลิงจากน้ำมัน โดยกำหนดเป้าหมายการผลิตเอทานอลในปี พ.ศ.2560 อยู่ที่ 4 ล้านลิตรต่อวัน และในปี พ.ศ.2565 อยู่ที่ 9 ล้านลิตรต่อวัน โดยในปี พ.ศ. 2562 มีกำลังการผลิตอยู่ที่ 4.43 ล้านลิตรต่อวัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2563)

ปัจจุบันโรงงานผลิตเอทานอลภายในประเทศส่วนมากใช้มันสำปะหลัง (Cassava) และกากน้ำตาล (Molasses) เป็นวัตถุดิบ (Nguyen *et al.*, 2008 และ Papong *et al.*, 2010) ซึ่งในปัจจุบันได้มีภาคเอกชนขออนุญาตก่อตั้งโรงงานผลิตเอทานอลแล้วรวม 27 โรงงาน กำลังการผลิตรวมวันละ 6.125 ล้านลิตร แบ่งเป็นโรงงานเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบจำนวน 12 โรงงาน กำลังการผลิตรวมวันละ 3.01 ล้านลิตร โรงงานเอทานอลที่ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ 9 โรงงาน กำลังการผลิตรวมวันละ 2.19 ล้านลิตร และโรงงานเอทานอลที่ใช้ทั้งกากน้ำตาลและมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบจำนวน 6 โรงงานกำลังการผลิต 9.25 แสนลิตร และมี 1 โรงงานที่อยู่ระหว่างดำเนินการก่อสร้าง (ขยายโรงงาน) ซึ่งใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ กำลังการผลิตที่จดทะเบียนวันละ 6.80 แสนลิตร (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2563) ซึ่งจากการตั้งเป้าหมายในการผลิตเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นนั้น ทำให้ปริมาณความต้องการวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลมีเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากมันสำปะหลังจัดว่าเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สามารถนำมาแปรรูปเพื่อเป็นอาหารของสิ่งมีชีวิตได้ จึงทำให้ไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตพลังงาน

ทดแทน ดังนั้นการพัฒนาอุตสาหกรรมเอทานอลจึงมุ่งเน้นการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลัก ซึ่งอุตสาหกรรมเอทานอลที่ผลิตจากกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบมีกำลังการผลิตสูงถึงร้อยละ 98.81 ของกำลังการผลิตเอทานอลจากอุตสาหกรรมเอทานอลทั้งหมดในประเทศไทย (สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย, 2562) แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่ากากน้ำตาลที่นำมาหมักเอทานอลจะมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครส, กลูโคสและฟรุกโทสแล้วนั้นยังมีองค์ประกอบอื่นๆ เช่น แร่ธาตุต่างๆ (โพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม ทองแดง เหล็ก แมงกานีส สังกะสี คลอไรด์ และซัลเฟอร์) และวิตามิน (ไบโอติน, กรดโฟลิก, ไบโอฟลาวัน, ไทอามีน, และไนอะซิน) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะมีปริมาณเล็กน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์อ้อย และกรรมวิธีการผลิต โดยสารอาหารจำพวกแร่ธาตุโดยทั่วไปยีสต์ต้องการในระดับมิลลิโมลาร์และ ไมโครโมลาร์เท่านั้น เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม และมีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์และการเจริญเติบโตของยีสต์ (Jones and Greenfield, 1987) แต่ในปัจจุบันพบว่าในกระบวนการหมักเอทานอลได้เพิ่มข้อระมัดระวังเกี่ยวกับผลกระทบของแร่ธาตุมากขึ้น เนื่องจากแร่ธาตุอาหารบางชนิดส่งผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ และยับยั้งการทำงานของยีสต์ ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลลดลง (Aleksander *et al.*, 2009; Bose *et al.*, 2011)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของโลหะไอออนที่ปนเปื้อนที่มีผลต่อประสิทธิภาพการหมักเอทานอล โดยเฉพาะแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ซึ่งเป็นโลหะไอออนที่พบในปริมาณที่มากในกากน้ำตาล โดยจะทำการศึกษาทั้งการใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลกระทบของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนที่มีผลต่อเอนไซม์อินเวอร์เทสในการย่อยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลในระดับฟลาสก์

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนต่อกระบวนการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสโดยเปรียบเทียบเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในระดับฟลาสก์

1.2.3 เพื่อศึกษาผลกระทบต่อการหมักเอทานอลด้วยกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในระดับฟลาสก์

1.2.4 การขยายกำลังการผลิตเพื่อศึกษาผลกระทบต่อการหมักเอทานอลด้วยกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในระดับถังหมัก 5 และ 50 ลิตร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ศึกษาผลของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เตสในการย่อยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอล

1.3.2 คัดเลือกเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน

1.3.3 ศึกษาองค์ประกอบและปริมาณของโลหะหนักในกากน้ำตาลที่นำมาใช้ในการวิจัย

1.3.4 ศึกษาผลการหมักเอทานอลภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบองค์ประกอบและปริมาณของโลหะหนักที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาล

1.4.2 ทราบถึงผลกระทบของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่มีผลต่อเอนไซม์อินเวอร์เตสในการย่อยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอล

1.4.3 ทำให้ทราบถึงผลของโลหะไอออนที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยยีสต์

บทที่ 2

ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กากน้ำตาล

กากน้ำตาลหรือโมลาส (Molasses) เป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งไม่สามารถตกผลึกเป็นน้ำตาลได้อีกซึ่งวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยนั้นเริ่มจากการนำอ้อยเข้าสู่กระบวนการหีบสกัดเพื่อเอาน้ำอ้อย จากนั้นน้ำอ้อยจะผ่านกระบวนการกรองและทำใสแล้วเคี่ยวต่อให้ได้ผลึกของน้ำตาลทราย หลังจากนั้นตกตะกอนออกมาแยกผลึกน้ำตาลทรายด้วยหม้อปั่น (centrifuge) ซึ่งผลพลอยได้ที่สำคัญจากกระบวนการปั่นแยกผลึกน้ำตาลทรายจะได้กากน้ำตาล (final molasses) ประมาณร้อยละ 4-5 ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิตน้ำตาล โดยองค์ประกอบของกากน้ำตาลจะไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับพันธุ์อ้อย และกรรมวิธีการผลิต แต่พบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลอินเวิร์ท (invert sugar) นอกจากนี้ยังพบมีองค์ประกอบของแร่ธาตุต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของแร่ธาตุในกากน้ำตาล

องค์ประกอบแร่ธาตุ	ปริมาณ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
แมกนีเซีย	0.23
ทองแดง	0.61
สังกะสี	7.14
ฟอสฟอรัส	15.57
เหล็ก	15.81
โพแทสเซียม	20.12
แมกนีเซียม	28.00
โซเดียม	148.15
แคลเซียม	280.30

ที่มา: Yilmaz *et al.* (2007)

กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้ 3 ชนิดตามกรรมวิธีในการผลิตน้ำตาล ได้ดังนี้

1. Black strap molasses หรือ Final molasses เป็นส่วนที่เหลือหลังจากตกผลึกซูโครส มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้นสีน้ำตาลดำเข้ม มีองค์ประกอบของกากน้ำตาลจะแตกต่างกันไปตามแหล่งผลิต โดยทั่วไปจะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 50-60 การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้กากน้ำตาลประเภทนี้เป็นวัตถุดิบ

2. Refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการตกผลึกครั้งที่สองหลังจากการผลิตเป็นน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 48

3. Highest molasses หรือ Invert molasses คือ กากน้ำตาลที่ไม่ได้จากระบวนการผลิตน้ำตาล แต่ได้จากการนำบางส่วนของน้ำอ้อยไปแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 78 (ปริญญาค, 2547)



ภาพที่ 1 กากน้ำตาล

การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล

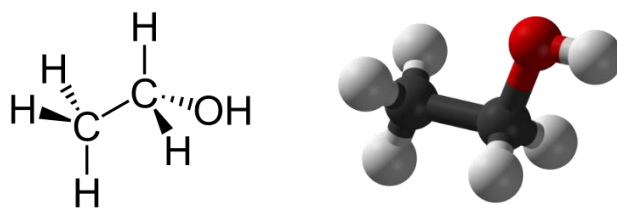
1. การใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงจุลินทรีย์
2. การใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งใช้ในการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ บิวทิล-แอลกอฮอล์ อาซิโตน กรดซิตริก กลีเซอรอล และจุลินทรีย์ ซึ่งเอทิลแอลกอฮอล์ใช้ทำกรดอะซิติก เอทิล-อีเทอร์ เป็นต้น
3. การใช้กากน้ำตาลในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมทำสุรา, อุตสาหกรรมการทำผงชูรส, อุตสาหกรรมการทำยีสต์, อุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรคบางอย่าง, อุตสาหกรรมการทำน้ำปลา และซีอิ๊ว เป็นต้น
4. การใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งวิตามิน บี จำนวนมากมาใช้หรือผลิตเป็นอาหารสัตว์
5. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาพลาเทนซิส ซีเอ็มยู 2 ด้วยน้ำกากส่าเหล้า (กากน้ำตาล) ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงน้ำวน (ปาวลี, 2550)

2.2 เอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) หรือแอลกอฮอล์ เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ต่ออยู่กับสายโซ่ของไฮโดรคาร์บอน (ดังแสดงในภาพที่ 2) มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย จุดติดไฟ ละลายในน้ำ และในสารอินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี พีเอชเป็นกลาง มีจุดเดือดที่ 78 องศาเซลเซียส แต่สามารถระเหยได้แม้ที่อุณหภูมิต่ำ และให้พลังงานความร้อนประมาณ 12,800 บีทียูต่อปอนด์

ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลของประเทศไทยมีกำลังการผลิตเอทานอลทั้งหมด 4.40 ล้านลิตรต่อวัน แบ่งเป็นการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล 1.90 ล้านลิตรต่อวัน จากอ้อย 0.23 ล้านลิตรต่อวัน จากมันสำปะหลัง 1.40 ล้านลิตรต่อวัน และจากมันสำปะหลังรวมกากน้ำตาล 0.85 ล้านลิตรต่อวัน จากทั้งหมด 20 โรงงาน และกำลังก่อสร้างอีก 3 โรงงาน ซึ่งมีกำลังการผลิตอีก 1.37 ล้านลิตรต่อวันจากมันสำปะหลัง โดยความต้องการเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยดูจากนโยบายภาครัฐที่ผลักดันการใช้เอทานอลเพิ่มสูงขึ้นทุกปี โดยให้กระทรวงพลังงานได้จัดทำแผนการพัฒนาพลังงานทดแทน และพลังงานทางเลือก (Alternative Energy Development Plan, AEDP) ให้มีปริมาณการใช้เป็นร้อยละ 25 ภายในระยะเวลา 10 ปี (ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 – 2564) โดยระบุกรอบ และทิศทางการพัฒนาพลังงานทดแทนของประเทศไทยเพื่อสร้างความมั่นคงด้านพลังงานภายในประเทศ ซึ่งกรอบการดำเนินงานที่สำคัญ คือ การตั้งเป้าหมายของการนำพลังงานเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในภาคการขนส่งเพื่อทดแทนการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงจากน้ำมัน โดยกำหนดเป้าหมายการผลิตเอทานอลภายในปี พ.ศ. 2564 คือ 9 ล้านลิตรต่อวัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2560)

ด้านการใช้ประโยชน์จากเอทานอลซึ่งในปัจจุบันมีด้วยกันหลากหลาย เช่น ใช้ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และผลิตน้ำหอม ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อโรค เช่น น้ำยาฆ่าเชื้อ หรือล้างแผล (แอลกอฮอล์ 75%) และใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อขับเคลื่อนเครื่องยนต์ เช่น น้ำมันแก๊สโซฮอล์ โดยนำเอทานอลกับน้ำมันเบนซิลออกเทน 91 ในอัตราส่วนเอทานอล 1 ส่วน กับน้ำมันเบนซิล 9 ส่วน ในปัจจุบันได้มีการพัฒนารถยนต์ให้สามารถใช้น้ำมันที่มีส่วนผสมของเอทานอลร้อยละ 20 เรียกว่า E20 สำหรับรถบางรุ่นสามารถใช้น้ำมันเบนซิลที่มีส่วนผสมของเอทานอลถึงร้อยละ 85 เรียกว่า E85

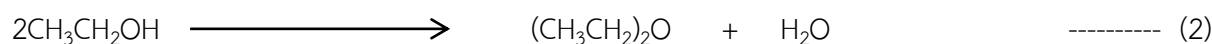
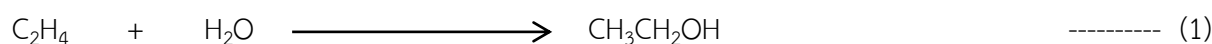


ภาพที่ 2 Ethanol straight-chain ประกอบด้วยโมเลกุลของ Hydroxyl (-OH) ที่ยึดเหนี่ยวกับอะตอมของคาร์บอน (C)

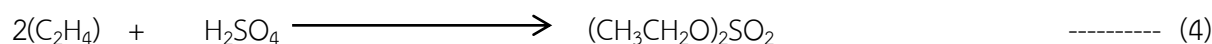
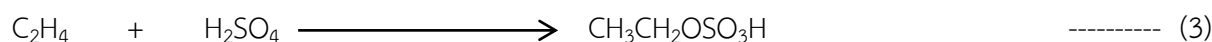
2.3 การผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปมีอยู่ 2 วิธีคือ 1. วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี โดยการสังเคราะห์เอทานอลที่ได้จากสารเอทิลีน (Ethylene, C_2H_4) ซึ่งแบ่งได้ 2 วิธี ได้แก่

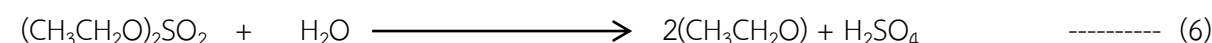
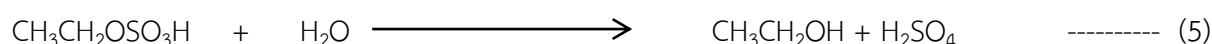
1.1 ไดเรค ไฮเดรชันเอทิลีน (Direct – Hydration Ethylene) เป็นการทำปฏิกิริยาของเอทิลีนกับไอน้ำที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ที่ความดัน 5 - 8 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 250 – 300 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ กรดฟอสฟอริก – ซิลิกาเจล และทังสเตนออกไซด์ – ซิลิกาเจล ทำให้ได้แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 10 – 25 ดังสมการ (1) และ (2)



1.2 อินไดเรค ไฮเดรชันเอทิลีน (Indirect – Hydration Ethylene) เป็นปฏิกิริยาที่มี 2 ขั้นตอน ซึ่งในขั้นตอนแรกทำปฏิกิริยาโดยใช้เอทิลีนที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 35 – 95 ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริก ทำให้ได้เอทานอลเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 35 ดังสมการ (3) และ (4)

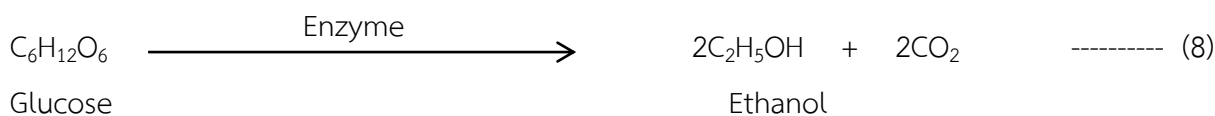
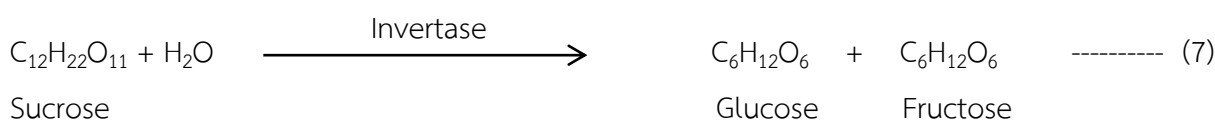


ขั้นตอนที่ 2 การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเอทิลซัลเฟตใน 2 แบบ จนได้เอทานอล ดังสมการ (5) และ (6)

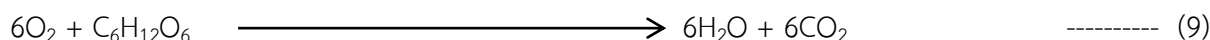


การสังเคราะห์วิธีนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลได้ร้อยละ 50 - 60 ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก ทั้งนี้วิธีการผลิตเอทานอลด้วยการสังเคราะห์นี้ปัจจุบันไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากมีต้นทุนสูง และไม่คุ้มค่ากับการลงทุน

2. วิธีการหมัก ซึ่งเป็นวิธีการดั้งเดิม และนิยมใช้ในการผลิตเอทานอลในปัจจุบัน เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ กระบวนการไม่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถหาวัตถุดิบในการผลิตได้ง่าย การผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เป็นตัวช่วยที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาในการเปลี่ยนสารตั้งต้น เช่น เมื่อเติมยีสต์ลงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบอาหารจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโทส โดยเอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase) ที่ผลิตจากยีสต์ (สมการ (7)) จากนั้นกลูโคส จึงถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ดังสมการ (8) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ และผ่านกระบวนการกลั่นเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ นอกจากนี้ในการผลิตเอทานอลยังมีสารอื่นที่ถูกผลิตจากการหมักโดยยีสต์ดังตารางที่ 2



จากสมการ (8) จะใช้กลูโคส 100 กรัม สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 51.1 กรัม คาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม ทั้งนี้ในสภาวะความเป็นจริงจะเกิดแอลกอฮอล์น้อยกว่า 51.1 กรัม เนื่องจากน้ำตาลเพียงร้อยละ 95 เท่านั้นที่จะเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลบางส่วนมาใช้ในการเจริญเติบโต และเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่น ๆ เช่น ได้แก่ อะซีตัลดีไฮด์ร้อยละ 0 - 0.03 กรดน้ำส้มร้อยละ 0.05 - 0.25 กลีเซอรินร้อยละ 2.5 - 3.6 กรดแลคติกร้อยละ 0 - 0.2 กรดซัคซินิกร้อยละ 0.5 - 0.77 น้ำมันฟิวเซลหรือฟิวเซลอยล์ร้อยละ 0.25 - 0.5 และฟิวเฟอรอลจำนวนเล็กน้อย แสดงตามตารางที่ 2 หากมีออกซิเจน ยีสต์จะใช้น้ำตาลสำหรับการสังเคราะห์เซลล์ทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำตามสมการ (9)



ตารางที่ 2 สารที่ได้จากการผลิตเอทานอลโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์

สารที่ได้จากการผลิตเอทานอลโดยจุลินทรีย์	ร้อยละ
เอทานอล	48.40
คาร์บอนไดออกไซด์	46.50
แอสिटัลดีไฮด์	0.00 – 0.03
กรดอะซิติก	0.05 – 0.25
กลีเซอรอล	2.50 – 3.60
กรดแลคติก	0.00 – 0.20
กรดซัคซิเนต	0.50 – 0.77
ฟูเซลอยล์	0.25 – 0.50
เฟอร์ฟูรัล	Trace (เล็กน้อย)

ที่มา: ชูติมา, 2548

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลโดยการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิตแตกต่างกันไป รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก ยีสต์ที่ได้รับความสนใจ และถูกเลือกใช้ในการหมัก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvaum (carlsbergensis)*, *Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces species* สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Zymomonas mobilis* ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae* ต่างมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม เช่นกรณีเลือกใช้ *Z. mobilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงแต่มีชีวมวลต่ำ และมีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์ จึงจำเป็นต้องมีความระมัดระวังในเรื่องของการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงแง่เศรษฐศาสตร์ โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจึงให้ความสนใจ *S. cerevisiae* มากกว่า (ชูติมา, 2548)

คุณสมบัติของยีสต์ และตัวอย่างยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งมีชื่อทางการค้าที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอล ควรมีลักษณะดังนี้ (นฤมล, 2549) ได้แก่

1. สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย เช่น Ethanol red, Bio-Ferm® CF, Bio-Ferm® XR, C6 FUEL™ และ Bio-Ferm® XP เป็นต้น
2. ให้ผลผลิตสูง และมีอัตราการหมักเอทานอลเร็ว ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง เช่น 46 EDV, Bio-Ferm® XP, Ethanol red และ Ethanol Red® เป็นต้น

3. ทนต่อเอทานอล เนื่องจากระหว่างการหมักจะมีเอทานอลบางส่วนสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ยีสต์แตกได้ ยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงจึงส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น เช่น Angel yeast, Thermosacc® Dry, Ethanol Red®, C6 FUEL™, Bio-Ferm® XR และ Bio-Ferm® XP เป็นต้น

4. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance) ทำให้สามารถใช้อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูง ๆ และช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทนต่อแรงดันออสโมซิส จึงมีผลการผลิตเอทานอลมากขึ้น เช่น Thermosacc® Dry, Angel yeast, Ethanol Red®, 46 EDV, Bio-Ferm® XP, C6 FUEL™, Bio-Ferm® XR และ Bio-Ferm® CF เป็นต้น

5. ทนต่ออุณหภูมิสูง (thermotolerance) เพราะในกระบวนการผลิตเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้นมีผลต่อการอยู่รอด และกิจกรรมการทำงานของยีสต์ ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น เช่น Thermosacc® Dry, Angel yeast, Ethanol Red®, Bio-Ferm® XP, C6 FUEL™ และ Bio-Ferm® XR เป็นต้น

6. ทนพีเอชต่ำ หรือทนกรด (acid tolerance) ในกระบวนการผลิตจะเกิดกรดทำให้พีเอชของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทนพีเอชต่ำได้จะช่วยให้มีผลการผลิตเอทานอลสูงขึ้นด้วย เช่น Angel yeast และ Thermosacc® Dry เป็นต้น

7. ทนต่อการเปลี่ยนแปลงในสภาวะต่าง ๆ ของการหมัก และมีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้ประสิทธิภาพ และคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ เช่น Ethanol red, Bio-Ferm® CF และ Bio-Ferm® XR เป็นต้น

8. มีความสามารถในการตกตะกอน (flocculation) ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และสามารถนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่ได้

2.5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอล (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

2.5.1 ความเข้มข้นของเอทานอล

เอทานอลมีผลต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งการมีเอทานอลสะสม (มากกว่าร้อยละ 10 โดยปริมาตร) อยู่ในถังหมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Roehr, 2001) ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 1 - 2 โดยปริมาตร ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตช้าลง และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ทำให้การเจริญของเชื้อช้าลง หรือหยุดการเจริญ ในปี 1981 Brown และคณะได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าผลของการยับยั้งนั้นมีความซับซ้อนมาก ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง และเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง จะช่วยเพิ่มความเป็นพิษของเอทานอลมากขึ้น ส่งผลให้การผลิตเอทานอลลดลง เอทานอลมีผลต่อการยับยั้งแบบไม่แข่งขันในการขนส่งกลูโคส มอลโทส แอมโมเนีย และกรดอะมิโนต่าง ๆ โดยยีสต์สายพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณมาก จะสามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ

เอทานอลสูง ๆ โดยผลของเอทานอลไปส่งเสริมให้ไฮโดรเจนไอออน (Hydrogen ion) ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น ซึ่งการไหลผ่านของไฮโดรเจนไอออนนี้ไม่ได้ผ่านทาง ATPase ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง จึงทำให้เกิดความต่างระดับของโปรตอนกระจายไปทั่วเยื่อหุ้มเซลล์ จึงไปมีผลต่อการยับยั้งการขนส่งสารละลายต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์

2.5.2 ความเข้มข้นของน้ำตาล

ความเข้มข้นของน้ำตาลจะเกี่ยวข้องกับเรื่องแรงดันออสโมซิสของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากถ้าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในการหมักที่สูงกว่าร้อยละ 15 จะทำให้การหมักเอทานอลของยีสต์หยุดลง ดังนั้นการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* มาหมักในสถานะเช่นนี้ จึงมีผลให้การหมักเป็นไปได้ช้า ๆ และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส เช่น *S. rouxii* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ (Panchal และ Stewart, 1980) และความเข้มข้นน้ำตาลที่ใช้ในการหมักส่วนใหญ่อยู่ในช่วงร้อยละ 10 – 15 โดยน้ำหนัก

2.5.3 สารอาหาร และโคแฟกเตอร์

สารอาหารบางอย่างอาจมีไม่เพียงพอสำหรับกระบวนการหมัก ซึ่งรวมถึงแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion) วิตามิน หรือ แร่ธาตุต่าง ๆ เช่น สังกะสี ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แมกนีเซียม และแคลเซียม การเติมสารอาหารให้กับยีสต์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 16 (Rose และ Harrison, 1993) สารอาหารที่มีความจำเป็นมีดังนี้

2.5.3.1 ไนโตรเจน เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น นับว่าเป็นส่วนสำคัญที่กระตุ้นการหมักหรือการผลิตเอทานอล โดยในตัวของยีสต์จะมีปริมาณไนโตรเจน ประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง โดยส่วนใหญ่ยีสต์จะสามารถใช้ไนโตรเจนในรูป แอมโมเนียมไอออนได้ ซึ่งอาจเติมในรูปของโคแอมโมเนียมฟอสเฟต หรือแอมโมเนียมซัลเฟต ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งให้ธาตุไนโตรเจนและให้ซัลเฟอร์ไปพร้อมกัน สำหรับยีสต์บางชนิดอาจใช้ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน (Rose and Harrison, 1993)

2.5.3.2 ฟอสฟอรัส ปกติใส่ในรูปของฟอสเฟต ซึ่งเป็น ไอออนิกแฟกเตอร์ (สาวิตรี, 2540) จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ แต่ความเข้มข้นไม่ควรเกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักแห้ง (Rose and Harrison, 1993)

2.5.3.3 ซัลเฟอร์ ปกติในอุตสาหกรรมหมักใช้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งจัดเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส และความเข้มข้นโดยทั่วไปไม่ควรเกินร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง (Rose and Harrison, 1993)

2.5.3.4 แร่ธาตุที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยน้อยกว่า 100 ส่วนในล้านส่วนของส่วนผสมทั้งหมดสำหรับบริวเวอรี่สต์ ความต้องการแร่ธาตุค่อนข้างหลากหลาย โดยเฉพาะพวกที่เป็นประจุบวก ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง โพแทสเซียม และเหล็กโดยที่สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ทองแดง และแมกนีเซียม ทำหน้าที่เป็น โคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแคทาไลติกเซ็นเตอร์ (Catalytic centre) ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา หรืออยู่ในสถานะที่เสถียร ส่วนโพแทสเซียมเป็นส่วนประกอบของระบบการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ (Smart, 2000) สำหรับแมกนีเซียม และแคลเซียมเป็นธาตุที่จำเป็นมากในอาหาร ถ้าขาดจะมีผลทำให้อัตราการหมักช้า กรณีของแมกนีเซียมช่วยให้อัตราในการผลิตเอทานอลเหมาะสม (Rose และ Harrison, 1993) ขณะที่แคลเซียมกระตุ้นการเจริญ และมีบทบาทต่อการตกตะกอนของเซลล์ยีสต์ (Smart, 2000) โดยในปี 1988 Nabais และคณะ พบว่าปริมาณแคลเซียมไอออนในช่วง 0.75 – 2.0 มิลลิโมลาร์ ช่วยส่งเสริมอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส และอัตราการผลิตเอทานอลให้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ได้เอทานอลในความเข้มข้นที่สูงขึ้น

2.5.3.5 วิตามิน ความต้องการวิตามินในการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ส่วนมากบริวเวอรี่สต์ (Brewer's Yeast) มีความต้องการไบโอติน โดยไบโอตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์คาร์บอกซีเลส (Carboxylase) เพื่อใช้สำหรับสังเคราะห์ไขมันที่จำเป็น มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ต้องการแพนโททีนเป็นปัจจัยการเจริญ ซึ่งแพนโททีนนี้เป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ เอ (Coenzyme A) และมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต และไขมัน นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ซัลเฟอร์เพื่อเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน สำหรับอินอซิทอล (Inositol) มีความต้องการเป็นบางครั้งเพราะใช้เป็นองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิดขณะที่ไพริดอกซิน (Pyridoxine) และไทอะมิน (Thiamine) นั้นมีความจำเป็นต่อ brewer's top yeasts หรือเอลยีสต์ ซึ่งวิตามินต่าง ๆ เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต และเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน (Smart, 2000)

2.5.4 สภาพแวดล้อม

2.5.4.1 พีเอช เมื่อเซลล์ยีสต์อยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน ค่าพีเอชของโปรโตพลาสซึมภายในเซลล์นั้นไม่เหมือนกัน ยีสต์สามารถรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ได้ค่อนข้างดี เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชต่างกัน และยีสต์สามารถเจริญได้ค่อนข้างดีที่พีเอชระหว่าง 3.6 - 6.0 แต่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 4.5 - 5.0 สำหรับอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำ พีเอชเริ่มต้นสำหรับการหมักที่เหมาะสมควรมีค่าประมาณ 5.5 แต่อาหารที่มีบัฟเฟอร์สูงพีเอชที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5 - 4.7 (สาวิตรี, 2540)

2.5.4.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ในการหมักจะสูงกว่าการเจริญ 5 - 10 องศาเซลเซียส (สาวิตรี, 2540) ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับกระบวนการทางชีวเคมีรวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ยีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง

กว่า 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเซลล์ยีสต์ในระยะที่มีการเจริญเกิดการตายได้ เมื่อนำไปไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 - 60 องศาเซลเซียส ในเวลาน้อยกว่า 30 นาที (Rose and Harrison, 1971) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักอยู่ในช่วง 25 – 35 องศาเซลเซียส

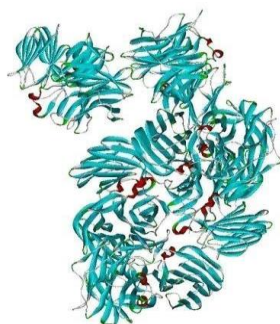
2.5.4.3 ออกซิเจน ในกระบวนการหมักยีสต์ต้องการออกซิเจน สำหรับสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้โครงสร้างที่เป็นไขมันมีเสถียรภาพ และเพื่อรักษาสภาพของกระบวนการต่าง ๆ ที่มีอยู่ทั่วไปในเซลล์ อย่างไรก็ตาม การให้ออกซิเจนในการหมักนั้นส่งผลให้การผลิตเอทานอลลดลง เนื่องจากในสภาวะที่มีออกซิเจนยีสต์จะมีการเจริญเติบโตมากกว่าผลิต เอทานอล ในกรณีที่ใช้แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์สำหรับการหมัก มีแบคทีเรียหลายชนิดที่ต้องอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจึงจะมีการผลิตเอทานอลในปริมาณที่สูง และมีการผลิตชีวมวลของเซลล์ต่ำ

2.5.4.4 คาร์บอนไดออกไซด์ จะยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน เช่นเดียวกับสภาวะที่อาหารมีพีเอชต่ำ และมีความเข้มข้นของเอทานอลสูง (สาวิตรี, 2540)

2.6 เอนไซม์อินเวอร์เทส

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ *S. cerevisiae* โดยในเซลล์ยีสต์จะมีเอนไซม์ที่ชื่อว่า เอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลอินเวิร์ท (น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโตส) เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล

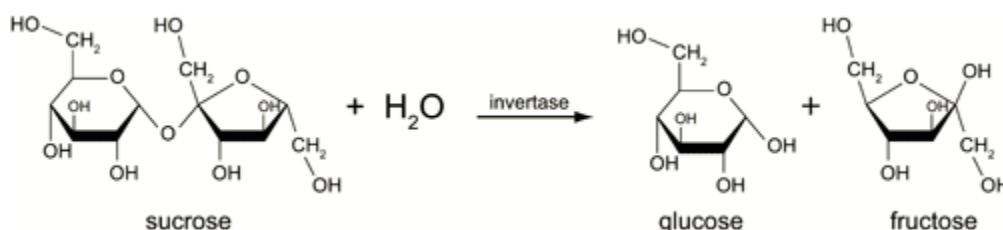
เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) หรือซูเครส (sucrase) หรือ แซคคาเรส (saccharase) มีชื่อสามัญคือ เบต้า-ฟรุคโตฟูราโนไซด์ส (β -fructofuranosidase) ซึ่งแบ่งตาม IUBMB คือ EC 3.2.1.26 การศึกษาเอนไซม์อินเวอร์เทสได้เริ่มในปี ค.ศ. 1860 Berthelot โดยพบว่า อินเวอร์เทสสามารถสกัดได้จากยีสต์และสามารถย่อยซูโครสได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1909 Sorensen ได้รายงานการศึกษาอินเวอร์เทสด้านผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และในปี ค.ศ. 1913 Michaelis-Menten ได้นำอินเวอร์เทสมาใช้ในการศึกษาด้านจลนพลศาสตร์ และสามารถนำไปสู่สมการคณิตศาสตร์ซึ่งมีชื่อว่า Michaelis-Menten equation. (Brenda, 2014)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเอนไซม์อินเวอร์เทส

2.6.1 ความจำเพาะของเอนไซม์อินเวอร์เทส

เอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการสลายตัวของสารตั้งต้น เช่น ซูโครส (sucrose) ราฟฟิโนส (raffinose) และสตาซิโอส (stacheose) ซึ่งเป็นสารที่เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ โดยโครงสร้างของสารตั้งต้นเหล่านี้มีพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic linkage) เชื่อมระหว่างแอลฟา-ดี-กลูโคส และเบต้า-ดี-ฟรุกโทสเหมือนกัน การเรียกชื่อเอนไซม์อินเวอร์เทสนั้น เนื่องมาจากการย่อยสลายซูโครสแล้วน้ำตาลซูโครสเปลี่ยนค่าการบิดเฟลนของแสงในเครื่องโพลาไรมิเตอร์ไปในลักษณะตรงข้ามคือ จาก +(dextrorotatory) เป็น - (levorotatory) โดยได้ผลิตภัณฑ์ คือ กลูโคส และฟรุกโทส อย่างละ 1 โมล เนื่องจากซูโครสเป็นไดแซคคาไรด์ (disaccharide) ที่มีพันธะไกลโคไซด์ 2 ลักษณะคือ C(1)-o โดยที่ C(1) นั้นมาจาก D-glucose อีกลักษณะคือ C(2)-o โดยที่ C(2) มาจาก D-fructose



ภาพที่ 4 การเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทส

2.6.2 แหล่ง และสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทส

เอนไซม์อินเวอร์เทส พบได้ทั่วไปทั้งในจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ สำหรับในจุลินทรีย์ เช่นพบได้ในยีสต์ ซึ่งพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* และ *S. carlsbergensis* เป็นแหล่งของเอนไซม์ และเป็นแหล่งเอนไซม์แหล่งแรกที่น่าไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Reed, 1982) ซึ่งในงานวิจัยของ Unger และคณะ ทำการแยก และศึกษาลักษณะของ β -fructofuranosidase จาก *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่พบในการหมักเบียร์ ส่วนในเชื้อรา พบว่ามีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้แก่ *Aspergillus niger*, *A. Oryzae*, *A. Japonicas*, *A. phoenicis*, *Aureobasidium pullulans* และ *Furasium onysporium* ส่วนใหญ่เอนไซม์อินเวอร์เทสที่พบมีหลายรูปแบบอาจแบ่งตามที่อยู่ และแบ่งตามพีเอชที่พบ ในกรณีนี้แบ่ง

ตามที่อยู่จะมี 2 แบบ คือ 1. เอนไซม์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยพบบริเวณผนังเซลล์ และ 2. เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) พบในไซโตพลาสซึม หรือถ้าแบ่งตามพีเอช สามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะคือ เอนไซม์อินเวอร์เทสในรูปที่เป็นกรด และในรูปที่เป็นกลาง

การศึกษาเอนไซม์อินเวอร์เทสในพืช และธัญพืชนั้นส่วนใหญ่เอนไซม์จะทำงานได้ดีต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมซึ่งมีอิทธิพลมาจากพีเอช และอุณหภูมิ โดยพีเอชที่เหมาะสม คือ 4.0 - 5.0 หรืออาจอยู่ในช่วง 3.5 - 5.5 (ทั้งนี้แล้วแต่แหล่งที่พบเอนไซม์อินเวอร์เทส) ซึ่งการทำงาน และการถูกยับยั้งจะแตกต่างกันไปตามแหล่ง และสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน โดยเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้ผลิตทางการค้า เมื่อทำการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด แต่เมื่อทำการผลิตที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส และใช้ความเข้มข้นของซูโครสต่ำเอนไซม์จะเกิดการสูญเสียกิจกรรม และเมื่อเปลี่ยนมาใช้ความเข้มข้นของซูโครสสูง พบว่าที่อุณหภูมิ 65 - 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงทำงานได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิที่ไม่คงที่将有ผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส

2.6.3 ประโยชน์ของเอนไซม์อินเวอร์เทส และการประยุกต์ใช้

กระบวนการย่อยน้ำตาลซูโครสด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส ทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโตส ในทางการค่าน้ำตาลกลูโคสจะหมายถึง เดกซ์โทรส (dextrose) ส่วนน้ำตาลฟรุคโตสหมายถึง เลวูโลส (levulose) และเรียกส่วนผสมที่เป็นเดกซ์โทรส และเลวูโลสที่ได้จากการย่อยนี้ว่า น้ำตาลอินเวิร์ท (invert sugar) โดยน้ำตาลอินเวิร์ทสามารถใช้ป้องกัน หรือช่วยควบคุมการเกิดผลึกของน้ำตาลซูโครสได้ คุณสมบัติของน้ำตาลอินเวิร์ท ไม่ได้จำกัดอยู่แค่การควบคุมการเกิดผลึกของน้ำตาลซูโครสเท่านั้น แต่ยังมีส่วนช่วยในการสร้างผลึกขนาดเล็ก และมีผิวสัมผัสเรียบ ในผลิตภัณฑ์จำพวกครีม ลูกอมรสมินท์ นอกจากนี้ความชื้นในน้ำตาลอินเวิร์ทยังมีส่วนช่วยให้หอมฟุ้งไม่ร่วน หรือเปราะ เนื่องจากน้ำตาลจะเหวี่ยงออกไป ในแง่ของความหวาน พบว่าองค์ประกอบของน้ำตาลอินเวิร์ทมีความหวานต่างจากน้ำตาลซูโครส โดยเดกซ์โทรสจะหวานน้อยกว่าน้ำตาลซูโครส แต่เลวูโลสจะหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส และส่วนผสมที่เกิดจากน้ำตาลอินเวิร์ท และน้ำตาลซูโครสนี้จะมีความหวานมากกว่า ซึ่งการใช้น้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทสให้รสหวานใกล้เคียงกับธรรมชาติไปใช้ในผลิตภัณฑ์หลายประเภท อาทิเช่น แยม ไอศกรีม โยเกิร์ต ขนมหวาน รวมทั้งเป็นสารให้ความหวานแทนที่การใช้น้ำตาลซูโครสในผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือผู้ต้องการหลีกเลี่ยงน้ำตาล

2.7 กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักโดยทั่วไปประกอบไปด้วยขั้นตอนสำคัญ 6 ขั้นตอนดังนี้ (สมใจ, 2537)

1. การเตรียมกล้าเชื้อ
2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ถังหมัก อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง ให้ปราศจากเชื้อ
3. การผลิตเชื้อเริ่มต้นที่บริสุทธิ์ และกระตุ้น (active) ให้อยู่ในปริมาณที่มากพอสำหรับใช้ในกระบวนการหมัก
4. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมัก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่ต้องการ
5. การสกัดผลผลิตและการทำให้บริสุทธิ์
6. การกำจัดของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทั้งหมด

กระบวนการหมักแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

1. การหมักแบบครั้งคราว (Batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ถังหมักแบบปิด มีการเติมอาหารลงในถังหมักเพียงครั้งเดียวและมีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัด

ข้อดีของการหมักแบบครั้งคราว

- เหมาะกับการผลิตที่มีปริมาตรไม่มากนัก
- ในการหมักแต่ละครั้ง ยีสต์ที่ใช้จะต้องมีความแข็งแรงและว่องไวดี ทั้งนี้เพราะต้องเตรียมยีสต์ขึ้นใหม่เสมอทำให้การผ่าเหล่า (mutation) เกิดขึ้นยาก
- การควบคุมให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดช่วงการหมักทำได้ง่าย
- การควบคุมระบบทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน

ข้อเสียของการหมักแบบครั้งคราว

- ต้องเตรียมยีสต์เริ่มต้น และวัตถุดิบทุกครั้งของการหมักแต่ละชุด ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมากขึ้น
- ต้องเสียเวลาเพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง

2. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยที่มีการเติมสารอาหารเข้าสู่ถังหมักในขณะเดียวกันมีการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ออกจากถังหมักในปริมาณและอัตราที่เท่ากัน ระบบการหมักแบบต่อเนื่องแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ Chemostat และ Turbidostat ซึ่งในส่วนของการหมักแบบ Chemostat อัตราการป้อนจะถูกตั้งไว้ที่ค่าหนึ่งอัตราการเจริญของการเพาะเลี้ยงปรับตามอัตราการไหล ส่วนการหมักแบบ Turbidostat ค่าความขุ่น

ของเซลล์จะถูกตั้งไว้ที่ระดับคงที่โดยการปรับอัตราการไหล ในทางปฏิบัติการหมักแบบ Chemostat ง่ายกว่าการหมักแบบ Turbidostat เพราะสามารถทำได้โดยการตั้งการสูบที่อัตราการไหลคงที่ ส่วน Turbidostat ต้องใช้ optical sensing และเครื่องควบคุม

ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง

- สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้
- สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและการก่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่
- สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่โดยการแปรค่าอัตราเจือจาง (dilution rate)

ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่อง

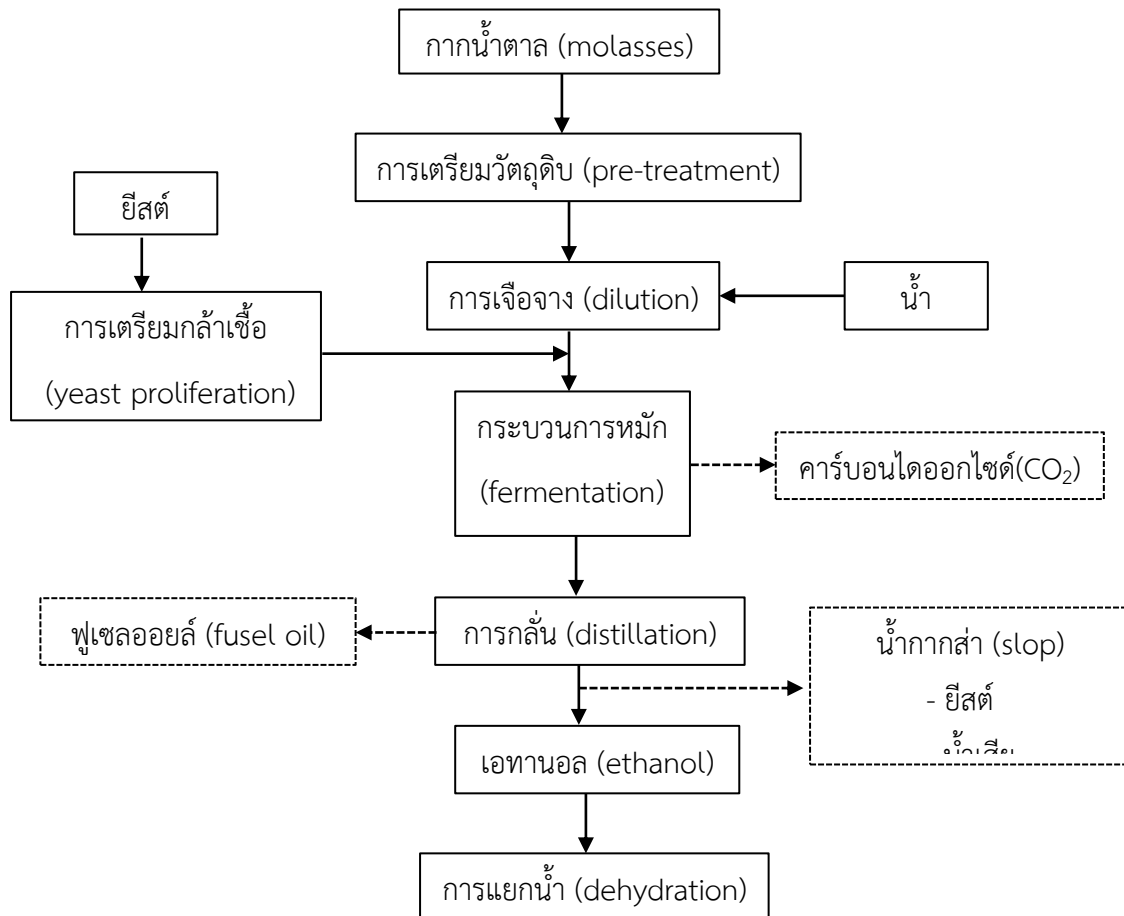
- ไม่เหมาะสมกับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ
- การเจริญแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์เกิดจากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้เร็วกว่า
- การเจริญในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อนได้

3. การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบแบทช์ มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องหรือให้อาหารเป็นลำดับ โดยที่ไม่มีการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ออกจากถังหมัก เทคนิคการหมักแบบกึ่งกะมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบครั้งคราวหลายอย่าง เช่น

- ช่วยลดผลการยับยั้งจุลินทรีย์จากอาหาร (substrate inhibition) สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กรดน้ำส้ม แอลกอฮอล์ เมทานอล และสารประกอบอะโรมาติก สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้แม้ในความเข้มข้นน้อยๆ ก็ตาม การเติมอาหารเหล่านี้ในปริมาณที่เหมาะสมอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการยับยั้งของสารอาหาร
- สามารถผลิตเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก (high cell concentration) การเลี้ยงเซลล์แบบธรรมดาจะได้ปริมาณเซลล์ไม่มากเท่ากับการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch ซึ่งสามารถผลิตเซลล์ได้สูงมาก
- ป้องกันการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น กรณีการหมักเอทานอลด้วยยีสต์แบบครั้งคราวอาจพบปัญหาเรื่องการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น ทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลงหากใช้เทคนิคการหมักแบบกึ่งกะจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนได้ (สาวิตรี, 2549)

2.8 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลในระดับอุตสาหกรรม

ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ ขั้นตอนการกำจัดสิ่งปนเปื้อน (pre-treatment) ขั้นตอนการเจือจาง (dilution) ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อและการหมัก (fermentation) ขั้นตอนการกลั่น (distillation) และขั้นตอนการแยกน้ำ (dehydration) โดยแสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

ที่มา: สิริวุทธิ (2545)

ขั้นตอนการกำจัดสิ่งปนเปื้อน (pre-treatment) ในขั้นตอนนี้กากน้ำตาลที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบจะมีองค์ประกอบที่เป็นตะกอน เช่น แคลเซียม ซึ่งถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลลดลง โดยทั่วไปกากน้ำตาลจะประกอบไปด้วยปริมาณแคลเซียมที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของกากน้ำตาล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องแยกแคลเซียมออกก่อน การแยกแคลเซียมนั้นทำได้โดยการใช้กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) โดยกรดซัลฟิวริกจะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมเกิดเป็นตะกอนของแคลเซียมซัลเฟต (CaSO_4) จากนั้นจึงทำการแยกตะกอนออกแล้วนำส่วนใสเข้าสู่ขั้นตอนการเจือจางต่อไป

ขั้นตอนการเจือจาง (dilution) กากน้ำตาลที่ผ่านขั้นตอนการกำจัดสิ่งปนเปื้อนจะถูกนำมาทำการเจือจางด้วยน้ำร้อนเพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของยีสต์ จากนั้นกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก็จะเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ (yeast proliferation) สายพันธุ์ของยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล คือ *S. cerevisiae* ยีสต์ในสายพันธุ์นี้มีหลากหลาย บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติสามารถทนต่อเอทานอลเข้มข้นสูง ให้อัตราการผลิตเอทานอลสูง (Wilkie et al., 2000) สำหรับขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื่อนั้นจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ที่ใช้ ได้แก่ เชื้อยีสต์สด (fresh yeast) และเชื้อแห้ง (active dry yeast) โดยถ้าใช้เชื้อสดการเก็บรักษาอยู่ในอาหารแข็ง การนำมาใช้ต้องทำการเลี้ยงเชื้อก่อน (refresh) โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวก่อน จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ที่ได้ไปเลี้ยงเพื่อขยายปริมาณต่อจนได้ปริมาณกล้าเชื้อที่ต้องการ ส่วนการใช้ยีสต์แห้งหรือยีสต์ผงนั้น การเตรียมกล้าเชื้อจะทำได้ง่ายกว่าโดยใช้ปริมาณเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมแล้วนำมาเลี้ยงเชื้อโดยใช้เวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าเชื้อสด

ขั้นตอนการหมัก (fermentation) สำหรับกระบวนการหมักเอทานอลนั้น สามารถทำได้หลายแบบทั้งการหมักแบบครั้งคราว (batch) แบบต่อเนื่อง (continues) และการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch) ส่วนใหญ่การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลนั้นจะใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Roehr, 2001)

ขั้นตอนการกลั่น (distillation) เป็นขั้นตอนทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 สำหรับการกลั่นนั้นจะได้ฟูเซลอลอยล์เป็นผลพลอยได้ และมีน้ำกากส่าเป็นน้ำเสียด้วย

ขั้นตอนการแยกน้ำ (dehydration) เอทานอลที่ผ่านขั้นตอนการกลั่นจะได้เอทานอลมีความเข้มข้นร้อยละ 95 เท่านั้น แต่เอทานอลที่นำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์นั้นต้องมีความเข้มข้นอย่างน้อยร้อยละ 99.5 ดังนั้นจะต้องมีการกำจัดแยกน้ำออกไป ซึ่งเทคโนโลยีการแยกน้ำนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมหรือความสะดวกของแต่ละโรงงาน

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1995 มีการศึกษาองค์ประกอบของกากน้ำตาล พบว่า มีการปนเปื้อนไอออนต่าง ๆ มากมาย เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ และ Na^+ เป็นต้น ในปริมาณเล็กน้อยแตกต่างกันตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณไอออนของโลหะในกากน้ำตาล

โลหะไอออน	มิลลิกรัมต่อลิตร
นิกเกิล (Ni)	3.9
ซิลิกอน (Si)	9.09
คอปเปอร์ (Cu)	11.9
ดีบุก (Sn)	18.6
บิสมัท (Bi)	33.4
แมงกานีส (Mn)	57.2
วาเนเดียม (V)	86.8
เหล็ก (Fe)	231.0
ซิงค์ (Zn)	401.0
อะลูมิเนียม (Al)	462.0
โซเดียม (Na)	841.0
แมกนีเซียม (Mg)	2,920.0
แคลเซียม (Ca)	5,470.0
โพแทสเซียม (K)	26,300.0

ที่มา: Takeshige และ Ouchi, 1995

และในปีเดียวกัน Takeshige และ Ouchi (1995) พบว่า ถ้ามีการปนเปื้อนของไอออน หรือเติมไอออนต่าง ๆ เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมงกานีส ซิงค์ คอปเปอร์ และแมกนีเซียมลงในกากน้ำตาล พบว่า ไอออนที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม โดยผลของโพแทสเซียม แคลเซียม และคอปเปอร์ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 48, 53 และ 26 ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง

Chotineeranat *et al.* (2010) ศึกษาผลของแคลเซียมไอออนที่มีผลต่อการหมักเอทานอลโดยยีสต์พบว่า แคลเซียมไอออนมีผลต่อประสิทธิภาพการหมักของยีสต์ส่งผลทำให้อัตราการหมักลดลง และปริมาณผลผลิตเอทานอลลดลงอย่างเห็นได้ชัดจนที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนร้อยละ 0.72 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (โดยปริมาณผลผลิตเอทานอลลดลงร้อยละ 14–25 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการเติมแคลเซียม) และยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนที่ร้อยละ 2.16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่งผลทำให้การหมักของยีสต์ถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์ เนื่องจากแคลเซียมมีผลไปยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์อินเวอร์เทส ในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และฟรุคโทส ทำให้ไม่ได้ออกผลผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักน้ำตาลซูโครสด้วยยีสต์ ดังนั้นการกำจัดแคลเซียมด้วยกรดอ่อนในกากน้ำตาลก่อนการหมักจะเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมัก

Limtong *et al.* (2007) ศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อย โดยทำการศึกษาโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันได้แก่ ร้อยละ 0.025, 0.05 และ 0.1 พบว่า โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ยีสต์สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดและยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1 ประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลของยีสต์ลดลง

Walker (1994) พบว่า แมกนีเซียมมีผลต่อการทำงานของเซลล์ยีสต์ ในกรณีที่ได้รับแมกนีเซียมในปริมาณที่เกินความต้องการของยีสต์จะส่งผลทำให้เซลล์ยีสต์สูญเสียโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์

Jones and Greenfield (1987) และ Walker *et al.* (2006) ได้ศึกษาพบว่า เซลล์ยีสต์ต้องการแร่ธาตุอาหารต่างๆ ที่ความเข้มข้นในระดับมิลลิโมลาร์และไมโครโมลาร์ ซึ่งจำแนกเป็น ‘bulk’ และ ‘trace’ elements ตามลำดับ แร่ธาตุชนิด bulk elements ได้แก่ โพแทสเซียมและแมกนีเซียม ส่วนแร่ธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย (trace elements) ได้แก่ สังกะสี แคลเซียม และแมงกานีส ธาตุอาหารที่เซลล์ต้องการปริมาณน้อยอยู่ในระดับไมโครโมลาร์ ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์

Shankar *et al.* (2014) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อ *S. cerevisiae* MTCC 170 โดยทำการศึกษา สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส พบว่า ช่วงพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส คือ ที่ pH 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และยังทำการศึกษาผลของโลหะไอออนต่อกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทส พบว่า โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. ศึกษาผลกระทบของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่มีผลต่อเอนไซม์อินเวอร์เทสในการย่อยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลในระดับฟลาสก์

3.1.1 การเตรียมเอนไซม์อินเวอร์เทส (ทางการค้า)

เตรียมเอนไซม์อินเวอร์เทส (กิจกรรมเอนไซม์ 2,000 U/mL) ในความเข้มข้นที่ต้องการในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียม อะซิเตท (sodium acetate) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5 (ซิงโซเดียม อะซิเตท ไตรไฮเดรต (sodium acetate trihydrate) 13.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอช 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 โมลาร์ และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร)

3.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนทั้ง 3 ชนิด

เตรียมสารละลายไอออนทั้ง 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) โพแทสเซียมไอออน (K^+) ในรูปของโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ในรูปของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการในสารละลายบัฟเฟอร์

3.1.3 การทดลอง

เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งมีส่วนผสมของโลหะไอออนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังตารางที่ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 เป็นเวลา 15 นาที และเติมเอนไซม์อินเวอร์เทส บ่มต่อเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการนำสารละลายตัวอย่างไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และนำตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, น้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส

ตารางที่ 4 ชนิด และระดับของโลหะไอออนทั้ง 3 ชนิด

โลหะไอออน (%w/v)	ระดับ*		
	ค่ากลาง		
	ค่าต่ำสุด	(ความเข้มข้นที่ใช้โรงงาน)	ค่าสูงสุด
แคลเซียม; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.07	0.20	0.60
โพแทสเซียม; KCl	0.07	0.20	0.60
แมกนีเซียม; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.07	0.20	0.60

หมายเหตุ * ความเข้มข้นสุดท้ายของโลหะไอออนแต่ละชนิด

3.1.4 การวิเคราะห์

3.1.4.1 น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi – Nelson method

เจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำละลาย Alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที (ปิดด้วยลูกแก้ว) และนำไปทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง และเติม Nelson Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด และอุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนสีที่ 520 นาโนเมตรทันที สร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส เพื่อวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นและคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

$$\text{Reducing sugar } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{OD}_{520 \text{ nm}} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{ความเข้มข้น}}$$

3.1.4.2 น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโทส ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ VertiSep™ Sugar CMP, 7.8 x 300 mm, 8 μm (Vertical Chromatography Co.,Ltd.), refractive index detector (RI-150, Japan),

สารละลายที่ใช้ คือ น้ำ deionized water (DI) ด้วยอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ 35 นาทีต่อตัวอย่าง

3.2 ศึกษาผลของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ต่อกระบวนการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสโดยเปรียบเทียบเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆในระดับฟลาสก์

3.2.1 การเตรียมเชื้อยีสต์

เตรียมเชื้อยีสต์แห้ง (Dry yeast) ที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae*^[1], *S. cerevisiae*^[2], *S. cerevisiae*^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 โดยทำการกระตุ้นเชื้อยีสต์แห้ง ด้วยการละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (คุณสมบัติของ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงคุณสมบัติดังตารางภาคผนวกที่ 1)

3.2.2 การเตรียมสารละลายโลหะไอออน

เตรียมสารละลายโลหะไอออน ได้แก่ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) โพแทสเซียมไอออน (K^+) ในรูปของโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ในรูปของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิด และระดับความเข้มข้นของโลหะไอออนที่ใช้ในการทดลอง

โลหะไอออน	ระดับความเข้มข้น* (ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	
	ค่ากลาง (ความเข้มข้นที่ใช้โรงงาน)	ค่าสูงสุด
แคลเซียมไอออน ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.20	0.60
โพแทสเซียมไอออน; KCl	0.20	0.60
แมกนีเซียมไอออน; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.20	0.60

หมายเหตุ * ความเข้มข้นสุดท้ายของโลหะไอออนแต่ละชนิด

3.2.3 การเตรียมอาหารหมัก

เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งน้ำตาลทรายขาว 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้น

เติมแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) โพแทสเซียมไอออน (K^+) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ที่ระดับความเข้มข้นดังตารางที่ 5 และเติมสารสกัดยีสต์ (yeast extract) 1 กรัม แล้วปรับพีเอชอาหารหมักให้ได้เท่ากับ 4.5 ด้วย 1 M NaOH ปิดจุกด้วยสำลีแล้วนำไปนำไปหมักเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.4 การหมัก

ทำการหมักเอทานอลในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเตรียมอาหารหมักจากข้อ 3.2.3 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลองจากข้อ 3.2.1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตร จากนั้นปิดจุกด้วยสำลีแล้วบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุกโทส และปริมาณเอทานอล พร้อมทั้งวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาณและประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

3.2.5 การวิเคราะห์

3.2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุกโทส
วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4.2

3.2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากทดลองด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), refractive index detector (RI-150, Japan), สารละลายคือ H_2SO_4 เข้มข้น 0.50 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ 25 นาทีต่อตัวอย่าง

3.2.5.3 การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

ทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ (Haemocytometer)

3.2.5.4 ผลได้ของเอทานอล

$$Yield = \left[\frac{\Delta Ethanol(g)}{\Delta Sugar(g)} \right]$$

3.2.5.5 อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร (Productivity, Q_P)

$$Q_P = \frac{\Delta Ethanol(\frac{g}{l})}{\Delta Time(h)}$$

3.2.5.6 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล (E_f)

$$E_f(\%) = \left[\frac{\Delta Ethanol}{\Delta Sugar} \right] \times \left[\frac{10000}{51.11} \right]$$

3.3 ศึกษาผลกระทบร่วมของโลหะไอออน 3 ชนิด (Ca^{2+} , K^+ และ Mg^{2+}) ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae*^[1]

เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เติมน้ำหนักด่างยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน และส่วนผสมของโลหะไอออนทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างกันในอัตราส่วน ดังตารางที่ 6 (ได้มาจากปริมาณที่มีอยู่จริงในกากน้ำตาลและนำมากำหนดเป็นอัตราส่วนอย่างต่ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำยีสต์ (วิธีการเตรียมดังข้อ 3.2.1) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุคโทส, เอทานอล, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร, และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 6 ชนิด และระดับของโลหะไอออนทั้ง 3 ชนิด

โลหะไอออน	อัตราส่วน* (% w/v : % w/v)
แคลเซียม : โพแทสเซียม	1:5 (0.20:0.60)
แคลเซียม : แมกนีเซียม	1:0.5 (0.20:0.07)
โพแทสเซียม : แมกนีเซียม	5:0.5 (0.60:0.07)
แคลเซียม : โพแทสเซียม : แมกนีเซียม	1:5:0.5 (0.20:0.60:0.07)

หมายเหตุ * ความเข้มข้นสุดท้ายของโลหะไอออนแต่ละชนิด

3.3.1 การวิเคราะห์

ปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส เอทานอล จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4.2 และ 3.2.5.2 - 3.2.5.6 ตามลำดับ

3.4 ศึกษาผลกระทบต่อการหมักเอทานอลด้วยกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โปแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับฟลasks

3.4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

นำกากน้ำตาลที่ใช้ในการทดลองมาวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาล ดังนี้

3.4.1.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุกโทส โดยใช้เครื่อง HPLC วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4.2

3.4.1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของโลหะไอออนต่าง ๆ โดยวิธี ICUMSA method (1994) และ AOAC (2000)

3.4.2 วิธีการกำจัดสิ่งปนเปื้อน (Pre - treatment)

ปรับพีเอชของสารละลายกากน้ำตาลให้เท่ากับ 4.0 ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็น และนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (high speed centrifuge) เพื่อแยกตะกอน และนำส่วนของเหลวไปใช้ต่อไป

3.4.3 การเตรียมกากน้ำตาล

นำกากน้ำตาลเข้มข้นเริ่มต้นซึ่งมีปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด (total solid) ประมาณร้อยละ 80 - 90 โดยน้ำหนัก (ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 40 - 45 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปเจือจางกับน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดร้อยละ 40 - 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 20 - 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน น้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.4 การหมัก

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองมีด้วยกันทั้งหมด 3 แบบ คือ

3.4.4.1 กากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment

3.4.4.2 กากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment

3.4.4.3 กากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment และมีการเติมไอออนลงไป

เตรียมสารละลายกากน้ำตาลทั้ง 3 แบบให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 20 -25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเติมยูเรีย 2.25 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอช 4.5 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมเชื้อยีสต์ (เตรียมตามข้อ 3.2.1) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุกโทส, เอทานอล, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

3.4.5 การวิเคราะห์

ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุกโทส, เอทานอล, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4.2 และ 3.2.5.2 - 3.2.5.6 ตามลำดับ

3.5 ศึกษาการขยายกำลังการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 50 ลิตร

เตรียมสารละลายกากน้ำตาลตามข้อ 3.4.2-3.4.3 ปริมาตร 3 ลิตร สำหรับการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 30 ลิตร สำหรับถังหมักขนาด 50 ลิตร เติมยูเรีย 2.25 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมเชื้อยีสต์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุกโทส, เอทานอล, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

3.5.1 การวิเคราะห์

ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุกโทส, เอทานอล, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4.2 และ 3.2.5.2 - 3.2.5.6 ตามลำดับ

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

4.1. ผลกระทบของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่มีผลต่อ เอนไซม์อินเวอร์เทส ในการย่อยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลในระดับฟลาสก์

ผลการย่อยน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้า ในสภาวะที่มีการเติมแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}), โพแทสเซียมไอออน (K^+) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 – 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แสดงผลกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เหลือในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะไอออน ดังตารางที่ 7 และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือและปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อย ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ร้อยละกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เหลือ ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 – 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ความเข้มข้นไอออน (% w/v)	กิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือ (%)		
	แคลเซียมไอออน	โพแทสเซียมไอออน	แมกนีเซียมไอออน
0	$100 \pm 0.05^{a,A}$	$100 \pm 0.06^{a,A}$	$100 \pm 0.05^{a,A}$
0.07	$94.56 \pm 0.41^{c,B}$	$100 \pm 0.78^{a,A}$	$96.06 \pm 0.73^{b,B}$
0.20	$92.82 \pm 0.15^{c,C}$	$94.41 \pm 0.63^{b,B}$	$97.40 \pm 0.91^{a,B}$
0.60	$91.34 \pm 0.11^{c,D}$	$94.31 \pm 1.36^{a,B}$	$92.40 \pm 0.88^{b,C}$

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a-c) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยเปรียบเทียบเข้มข้นเดียวกันของไอออนแต่ละชนิด (เปรียบเทียบภายในแถวเดียวกัน)
ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-D) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยเปรียบเทียบไอออนชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นต่างกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือและปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วย เอนไซม์อินเวอร์เทส (ทางการค้า)

ความเข้มข้นไอออน	ปริมาณน้ำตาล (% w/v)								
	แคลเซียมไอออน			โพแทสเซียมไอออน			แมกนีเซียมไอออน		
% (w/v)	น้ำตาลซูโครส*	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุกโทส	น้ำตาลซูโครส*	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุกโทส	น้ำตาลซูโครส*	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุกโทส
0.00	0.00 ± 0.00 ^{b,D}	9.85 ± 0.06 ^{a,A}	9.76 ± 0.12 ^{a,A}	0.00 ± 0.00 ^{b,B}	9.85 ± 0.06 ^{a,B}	9.76 ± 0.12 ^{a,B}	0.00 ± 0.00 ^{b,D}	9.85 ± 0.06 ^{a,A}	9.76 ± 0.12 ^{a,A}
0.07	1.82 ± 0.08 ^{d,C}	8.95 ± 0.24 ^{c,B}	8.84 ± 0.12 ^{c,B}	0.00 ± 0.18 ^{e,B}	10.11 ± 0.15 ^{a,A}	10.00 ± 0.17 ^{a,A}	1.24 ± 0.18 ^{d,B}	9.27 ± 0.17 ^{b,A}	9.10 ± 0.09 ^{b,A}
0.20	2.49 ± 0.08 ^{c,B}	8.64 ± 0.08 ^{b,B}	8.48 ± 0.09 ^{b,B}	1.87 ± 0.31 ^{d,A}	8.94 ± 0.12 ^{b,C}	8.80 ± 0.10 ^{b,C}	0.72 ± 0.33 ^{e,C}	9.51 ± 0.21 ^{a,A}	9.38 ± 0.18 ^{a,A}
0.60	3.06 ± 0.07 ^{b,A}	8.29 ± 0.07 ^{a,B}	8.26 ± 0.13 ^{a,B}	1.91 ± 0.46 ^{d,A}	8.92 ± 0.29 ^{a,C}	8.78 ± 0.20 ^{a,C}	2.65 ± 0.25 ^{c,A}	8.57 ± 0.20 ^{a,B}	8.39 ± 0.12 ^{a,B}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a-c) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นเดียวกันของไอออนแต่ละชนิด (เปรียบเทียบภายในแถวเดียวกัน)

ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-D) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยเปรียบเทียบไอออนชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นต่างกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

* น้ำตาลซูโครส = น้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่ (Residual sucrose)

การทดลองนี้ถึงแม้จะใช้เอนไซม์ทางการค้าซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงมาก แต่พบว่ายังมีน้ำตาลซูโครสเหลือในระบบหลังจากการย่อยในสถานะที่มีการปนเปื้อนของโลหะไอออน ดังนั้นการปนเปื้อนของโลหะไอออนในสารละลายมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสซึ่งจะทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง (ดังตารางที่ 7) และเมื่อความเข้มข้นของโลหะไอออนเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยจะสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงถึงโลหะไอออนมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์น้อยลง โดยในสถานะที่มีการเติมแคลเซียมไอออนในสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.07, 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสลดลงเหลือร้อยละ 94.56, 92.82 และ 91.34 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และมีปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่ร้อยละ 1.82, 2.49 และ 3.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) ในขณะเดียวกันน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ย่อยได้ก็จะมีปริมาณน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของไอออนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8)

ขณะที่การทดลองที่มีการเติมโพแทสเซียมไอออนนั้น โลหะไอออนจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไอออนมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 94.41 และ 94.31 (ตารางที่ 7) และมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่ร้อยละ 1.87 และ 1.91 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 ตามลำดับ แต่ก็ถือว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่ในสารละลายน้อยกว่าการปนเปื้อนด้วยแคลเซียมไอออน แต่มากกว่าการปนเปื้อนด้วยแมกนีเซียมไอออน (ดังตารางที่ 8)

ผลการทดลองของแมกนีเซียมไอออนก็มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสเช่นเดียวกัน แต่อาจจะมีผลน้อยกว่าการปนเปื้อนด้วยแคลเซียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 96.06 และ 97.40 (ตารางที่ 7) และมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่ร้อยละ 1.24 และ 0.72 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ความเข้มข้นแคลเซียมไอออนร้อยละ 0.07 และ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนเป็นร้อยละ 0.60 ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 92.40 และมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่ร้อยละ 2.65 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ อาจจะทำให้เกิดลักษณะการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยตัวผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเอง หรือที่เรียกว่า Product inhibition

4.2 ผลของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ต่อกระบวนการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสโดยเปรียบเทียบเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในระดับฟลasks

ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีการเติมแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่พีเอช 4.5 โดยใช้เชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae*^[1], *S. cerevisiae*^[2], *S. cerevisiae*^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะ (μ), ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุคโทสที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักเอทานอล และปริมาณเอทานอลที่ได้เปรียบเทียบกับในสถานะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน ซึ่งแสดงผลดังนี้

อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate; μ)

ผลของอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน แสดงผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 อัตราการเจริญจำเพาะ(μ) ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน, และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

เชื้อยีสต์	ชุดควบคุม	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (h^{-1})					
		แคลเซียมไอออน		โพแทสเซียมไอออน		แมกนีเซียมไอออน	
		(% w/v)		(% w/v)		(% w/v)	
		0.20	0.60	0.20	0.60	0.20	0.60
<i>S. cerevisiae</i> ^[1]	0.21 ^{a,A}	0.11 ^{d,A}	0.08 ^{d,AB}	0.17 ^{bc,A}	0.16 ^{c,A}	0.19 ^{ab,A}	0.17 ^{bc,A}
<i>S. cerevisiae</i> ^[2]	0.17 ^{ab,A}	0.14 ^{ab,A}	0.11 ^{b,A}	0.16 ^{ab,A}	0.16 ^{ab,AB}	0.21 ^{a,A}	0.16 ^{ab,A}
<i>S. cerevisiae</i> ^[3]	0.15 ^{ab,A}	0.12 ^{bc,A}	0.05 ^{c,BC}	0.09 ^{bc,B}	0.08 ^{bc,B}	0.22 ^{a,A}	0.20 ^{a,A}
<i>C. tropicalis</i> TISTR 5306	0.22 ^{a,A}	0.09 ^{de,A}	0.04 ^{e,C}	0.18 ^{abc,A}	0.14 ^{bcd,AB}	0.20 ^{ab,A}	0.13 ^{cd,A}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a-e) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของโลหะไอออนที่แตกต่างกันในเชื้อยีสต์สายพันธุ์เดียวกัน (เปรียบเทียบภายในแถวเดียวกัน)

ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-C) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนโลหะไอออนชนิดและความเข้มข้นเดียวกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

^{[1],[2],[3]} คือ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ต่างสายพันธุ์กัน (ตารางภาคผนวกที่ 1)

โดยจากการทดลองพบว่า อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในการทดลองชุดควบคุม (การทดลองที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน) มีอัตราการเจริญจำเพาะที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อมีการเติมโลหะไอออนลงไป มีผลทำให้อัตราการเจริญจำเพาะมีแนวโน้มลดลง ยกเว้นแมกนีเซียมไอออนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากการทดลองที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน

ผลของการเติมแคลเซียมไอออนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* ^[1] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนที่ ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่าลดลงโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งยีสต์ *S. cerevisiae* ^[1] และ *S. cerevisiae* ^[2] มีอัตราการเจริญจำเพาะที่ไม่แตกต่างกันและมีอัตราการเจริญจำเพาะที่ต่ำกว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* ^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 ตามลำดับ จากผลการทดลองจะพบว่าในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออนทั้งสองระดับ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ^[1] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 จะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

การทดลองที่มีการเติมโพแทสเซียมไอออน ก็ให้ผลเช่นเดียวกับการเติมแคลเซียมไอออน คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะไอออน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีแนวโน้มลดลง โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นโพแทสเซียมไอออนที่ร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ^[3] มีอัตราการเจริญจำเพาะน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีสต์ *S. cerevisiae* ^[1], *S. cerevisiae* ^[2] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 ตามลำดับ

การทดลองที่มีการเติมแมกนีเซียมไอออนระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญจำเพาะไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนร้อยละ 0.20 อัตราการเติบโตจำเพาะของ *S. cerevisiae* ^[2] และ *S. cerevisiae* ^[3] มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ *S. cerevisiae* ^[1] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตาม ค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียม

ไอออนเป็นร้อยละ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราการเจริญจำเพาะจะมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ซึ่ง *S. cerevisiae*^[1] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 มีค่าลดลงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

จากผลการทดลองการปนเปื้อนของโลหะไอออนมีผลทำให้อัตราการเจริญจำเพาะมีแนวโน้มลดลง โดยเฉพาะเชื้อ *S. cerevisiae*^[1] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 และพบว่าในสภาวะที่มีการปนเปื้อนแคลเซียมไอออนโดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีผลทำให้ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่มีการเติมโพแทสเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Costa *et al.*, (2018) พบว่า ภายใต้สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแคลเซียมไอออนที่ความเข้มข้นที่สูง ส่งผลทำให้จำนวนเซลล์ของยีสต์ลดลงในระหว่างการกระบวนการหมักเอทานอล

สำหรับผลของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในระหว่างการหมักเอทานอล ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แสดงผลดังตารางภาคผนวกที่ 2

อัตราการใช้สารตั้งต้น (Substrate consumption; Q_s)

อัตราการใช้สารตั้งต้นหรือการใช้น้ำตาลซูโครส หรือความสามารถของเชื้อที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทส) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่เชื้อจะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและใช้เพื่อผลิตเอทานอลต่อไป โดยผลของอัตราการใช้สารตั้งต้นของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนหรือชุดควบคุมแสดงผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 อัตราการใช้สารตั้งต้นของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

		อัตราการใช้สารตั้งต้น (g/L/h)					
เชื้อยีสต์	ชุดควบคุม	แคลเซียมไอออน		โพแทสเซียมไอออน		แมกนีเซียมไอออน	
		(% , w/v)		(% , w/v)		(% , w/v)	
		0.20	0.60	0.20	0.60	0.20	0.60

<i>S. cerevisiae</i> ^[1]	4.63 ^{a,A}	3.70 ^{c,A}	1.76 ^{d,B}	4.11 ^{b,A}	3.66 ^{c,A}	4.80 ^{a,A}	4.33 ^{b,AB}
<i>S. cerevisiae</i> ^[2]	4.56 ^{a,A}	3.38 ^{c,B}	2.38 ^{d,A}	4.24 ^{ab,A}	3.78 ^{bc,A}	4.41 ^{ab,C}	4.06 ^{ab,B}
<i>S. cerevisiae</i> ^[3]	2.62 ^{c,B}	2.02 ^{d,C}	0.72 ^{e,C}	2.07 ^{d,B}	2.36 ^{cd,B}	5.28 ^{a,AB}	4.61 ^{b,A}
<i>C. tropicalis</i>	0.95 ^{a,C}	0.68 ^{a,D}	0.12 ^{b,D}	0.86 ^{a,C}	0.70 ^{a,C}	0.99 ^{a,C}	0.98 ^{a,C}
TISTR 5306							

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a-e) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของโลหะไอออนที่แตกต่างกันในเชื้อยีสต์สายพันธุ์เดียวกัน (เปรียบเทียบภายในแถวเดียวกัน)

ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-C) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนโลหะไอออนชนิดและความเข้มข้นเดียวกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

^{[1],[2],[3]} เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ต่างสายพันธุ์กัน (ตารางภาคผนวกที่ 1)

พบว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน หรือชุดควบคุม เชื้อ *S. cerevisiae* ^[1] มีอัตราการใช้สารตั้งต้นสูงสุด (4.63 g/L/h) จึงเป็นผลทำให้อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลในตารางที่ 9 นอกจากนี้อัตราการใช้สารตั้งต้นของเชื้อ *S. cerevisiae* ^[2] มีค่า 4.56 g/L/h ซึ่งไม่แตกต่างกับเชื้อ *S. cerevisiae* ^[1] อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนอัตราการใช้สารตั้งต้นของ *S. cerevisiae* ^[3] มีอัตราการใช้สารตั้งต้นและอัตราการเจริญจำเพาะที่น้อยลงตามลำดับ (ดังตารางที่ 9 และ 10) ในขณะที่เชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5306 มีอัตราการใช้สารตั้งต้นหรือการใช้น้ำตาลซูโครสต่ำมาก (0.95 g/L/h) เมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ *S. cerevisiae*

และจากการทดลองที่มีการเติมแคลเซียมไอออน และโพแทสเซียมไอออนลงไป พบว่าจะทำให้เชื้อมีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้น้อยลงซึ่งเห็นได้จากอัตราการใช้สารตั้งต้นที่น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งการมีแคลเซียมไอออนปนเปื้อนในอาหารหมักจะมีผลทำให้ความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้น้อยกว่าหรือมีอัตราการใช้สารตั้งต้นได้น้อยกว่าในสภาวะที่มีโพแทสเซียมไอออนปนเปื้อนน้อย แต่จากผลการทดลองตารางที่ 10 พบว่าการเติมแมกนีเซียมไอออนลงไป เชื้อสามารถใช้ น้ำตาลซูโครสหรือมีอัตราการใช้สารตั้งต้นได้สูงขึ้น โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* ^[3] ซึ่งมีอัตราการใช้สารตั้งต้นที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนลงไป

กิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสในระหว่างการหมักเอทานอลด้วยน้ำตาลซูโครสโดยเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการเติมแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน, และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

จากตารางที่ 10 พบว่าการปนเปื้อนของโลหะไอออนมีผลต่อการใช้สารตั้งต้นหรือการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลซูโครส ซึ่งในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสนั้น เชื้อยีสต์จะมีการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสออกมาเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสซึ่งน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสซึ่งเป็นน้ำตาลที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ทั้งการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ซึ่งจากการทดลองที่ได้ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสในช่วงเวลาที่ 10 ของการหมักเอทานอลของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการเติมแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน เปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนแสดงผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 กิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสในช่วงเวลาที่ 10 ของการหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะไอออน

เชื้อยีสต์	ชุดควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทส (U/L)					
		แคลเซียมไอออน		โพแทสเซียมไอออน		แมกนีเซียมไอออน	
		(% , w/v)		(% , w/v)		(% , w/v)	
		0.20	0.60	0.20	0.60	0.20	0.60
<i>S. cerevisiae</i> ^[1]	1580.46	1257.18	972.22	1436.78	1293.10	1472.70	1436.78
<i>S. cerevisiae</i> ^[2]	1458.34	1250.00	969.83	1354.17	1180.55	1406.25	1371.53
<i>S. cerevisiae</i> ^[3]	1060.61	681.82	303.03	909.09	606.06	1136.36	984.85
<i>C. tropicalis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TISTR 5306							

หมายเหตุ: ^{[1],[2],[3]} เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ต่างสายพันธุ์ (ตารางภาคผนวกที่ 1)

จากตารางที่ 11 พบว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนหรือชุดควบคุม เชื้อ *S. cerevisiae*^[1] มีการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้สูงสุด คือ 1,580.46 U/L รองลงมาคือ เชื้อ *S. cerevisiae*^[2] และ *S. cerevisiae*^[3] ตามลำดับ และไม่พบกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทส ในเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5306

เมื่อมีการเติมโลหะไอออนลงไป พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสลดลง ยกเว้นการเติมแมกนีเซียมไอออน

โดยการทดลองที่ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในการหมักเอทานอลในสภาวะมีการเติมแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีผลทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสลดลงร้อยละ 20.45, 9.09 และ 6.82 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของโลหะไอออนร้อยละ 0.60 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสลดลงร้อยละ 38.64, 18.18 และ 9.09 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การทดลองที่ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae*^[2] ในการหมักเอทานอลในสภาวะมีการเติมแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีผลทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสลดลงร้อยละ 14.29, 7.14 และ 3.57 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของโลหะไอออนร้อยละ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสลดลงร้อยละ 33.3, 19.05 และ 5.95 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ในขณะที่การทดลองที่ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae*^[3] ในการหมักเอทานอล โดยการเติมแคลเซียมไอออน และโพแทสเซียมไอออนก็มีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเช่นเดียวกัน โดยที่ความเข้มข้นของโลหะไอออนร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงร้อยละ 35.71 และ 14.29 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงร้อยละ 71.43 และ 42.86 ตามลำดับ ซึ่งการเติมแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ก็ยังให้ผลเช่นเดียวกันคือกิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเล็กน้อยร้อยละ 7.14 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่การเติมแมกนีเซียมไอออนในปริมาณร้อยละ 0.20 มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นร้อยละ 7.14 โดยแมกนีเซียมไอออนจะเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์อินเวอร์เทสในการย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลซึ่งสอดคล้องกับผลการอัตราใช้สารตั้งต้นที่มีค่าเพิ่มสูงขึ้น

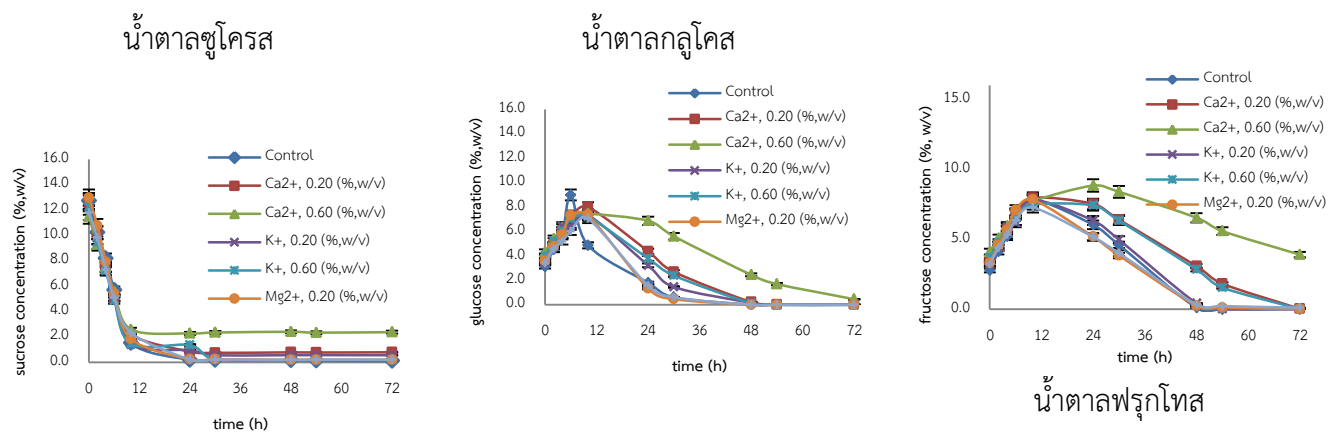
ดังนั้น โลหะไอออนที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส คือ แคลเซียมไอออน > โพแทสเซียมไอออน > แมกนีเซียมไอออน

นอกจากนี้จากผลการทดลอง ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสในอาหารหมักที่เลี้ยงด้วยเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5306 ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการใช้สารตั้งต้นที่มีค่าต่ำมาก (ตารางที่ 10) นั้นหมายถึง เชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ จึงทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสได้หรือเปลี่ยนได้น้อยมาก โดยเชื้ออาจจะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เกิดขึ้นก่อนการหมักที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำตาลซูโครสโดยเกิดจากการให้ความร้อนในขั้นตอนของการฆ่าเชื้อของสารตั้งต้นก่อนที่จะเริ่มการหมัก (Autoclave) มาใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตเป็นเอทานอล

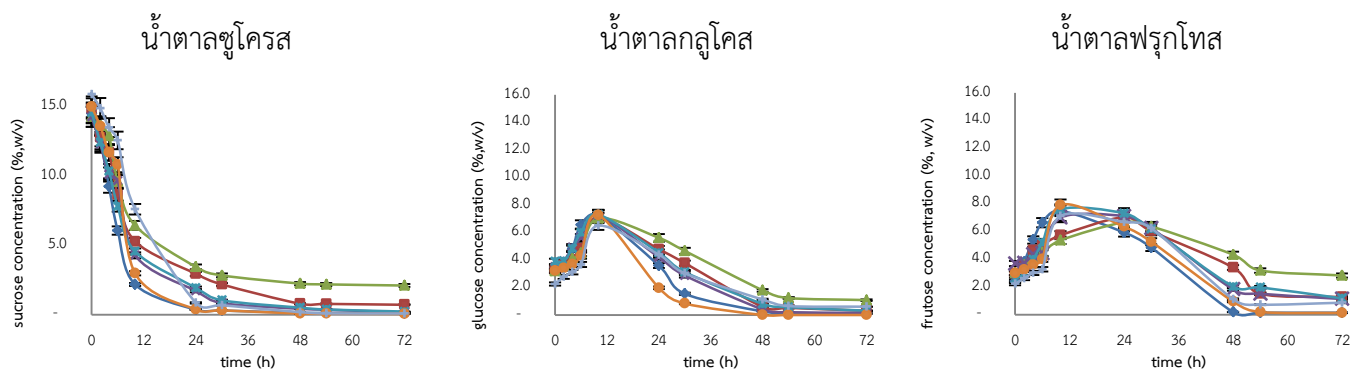
การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลด้วยน้ำตาลซูโครสโดยเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะไอออน

จากภาพที่ 6 และ ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงถึงช่วงเวลาของการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการเติมแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมโลหะไอออน โดยในขณะที่ปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงนั้นจะพบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อยีสต์มีการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสออกมาเพื่อทำการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทส เพื่อจะใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะเห็นชัดเจนในเชื้อ *S. cerevisiae*

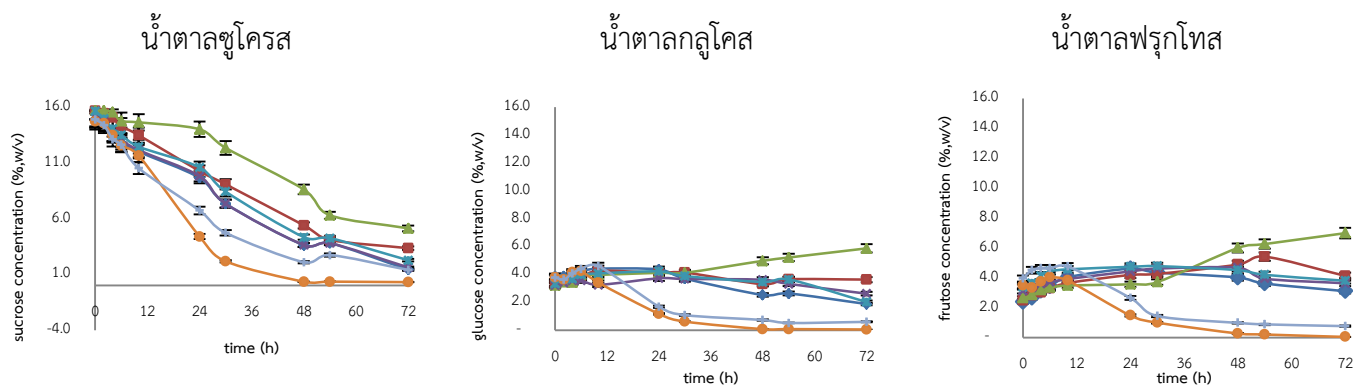
(a) *S. cerevisiae* ^[1]



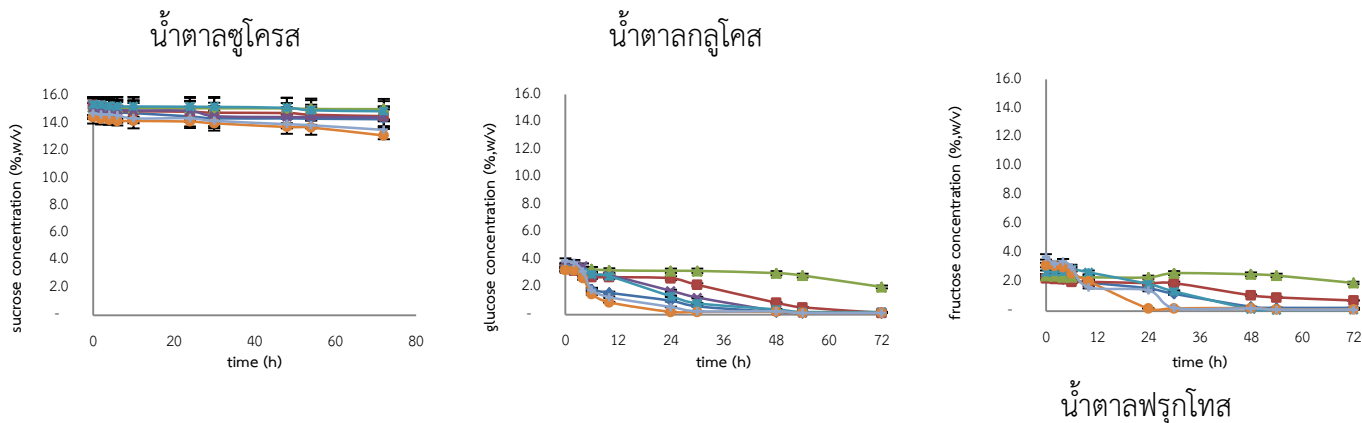
(b) *S. cerevisiae* ^[2]



(c) *S. cerevisiae* ^[3]



(d) *C. tropicalis* TISTR 5306



ภาพที่ 6 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ (a) *S. cerevisiae*^[1], (b) *S. cerevisiae*^[2], (c) *S. cerevisiae*^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] และยีสต์ *S. cerevisiae*^[2] จะให้ผลการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทส ที่มีลักษณะคล้ายกันโดยพบว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน ช่วงเวลาที่ปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงอย่างรวดเร็วคือช่วงเวลาที่ 0 - 10 หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลซูโครสก็จะเริ่มลดลงอย่างช้า ๆ จนถูกใช้หมด ในขณะที่เดียวกันปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสก็จะเพิ่มขึ้นและหลังจากช่วงเวลาที่ 10 พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มลดลงและลดลงเร็วกว่าน้ำตาลฟรุคโทส ซึ่งแสดงถึงเชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ก่อนที่จะใช้น้ำตาลฟรุคโทสในการระหว่างกระบวนการหมักเอทานอล โดยในช่วงเวลาที่ 10 - 24 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว และหลังจากช่วงเวลาที่ 24 จะค่อย ๆ คงที่และหมดในช่วงเวลาที่ 48 ในขณะที่น้ำตาลฟรุคโทสถูกใช้อย่างรวดเร็วหลังจากช่วงเวลาที่ 24 หรือหลังจากที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือน้อยมากและจะถูกใช้หมดเช่นเดียวกันในช่วงเวลาที่ 48 ของการหมักเอทานอล ดังภาพที่ 6 (a), (b)

แต่เมื่อมีการเติมโลหะไอออนซึ่งมีผลต่อการยับยั้งทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส (ดังตารางที่ 11) ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนหรือการใช้น้ำตาลซูโครสนั้น จึงทำให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่ในระหว่างการหมัก นอกจากนี้ยังมีผลต่อการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสของเชื้อ ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อมีการเติมโลหะไอออนลงไป อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสจะช้าลงและมีปริมาณกลูโคสเหลืออยู่ในระบบเช่นเดียวกับน้ำตาลฟรุคโทส โดยเฉพาะในสภาวะที่มีการเติมแคลเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ส่งผลอย่างมากต่อการใช้น้ำตาลทั้งสามชนิดของเชื้อ (ตารางภาคผนวกที่ 3.1 - 3.6)

ในขณะที่การหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[3] ในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนหรือชุดควบคุม พบว่าปริมาณของน้ำตาลซูโครสมีปริมาณลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วง 10 ชั่วโมงแรก ส่งผลทำให้ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสมีปริมาณเพิ่มเล็กน้อยที่เวลา 0 - 10 ชั่วโมงเช่นกัน และหลังจากช่วงเวลาที่ 10 พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงอย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการหมักในช่วงเวลาที่ 72 ก็ยังพบว่ายังเหลือปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโทสอยู่ในระบบ (ดังภาพที่ 6 (c) และ ตารางภาคผนวกที่ 3.7 - 3.9) ซึ่งเมื่อเติมโลหะไอออนลงไป จะให้ผลเช่นเดียวกับลักษณะการใช้น้ำตาลของ *S. cerevisiae*^[1] และยีสต์ *S. cerevisiae*^[2] คืออัตราการใช้น้ำตาลทั้งสามชนิดจะช้าลงและเหลือปริมาณน้ำตาลในระบบมากขึ้น แต่ต่างกับการเติมแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 โดย

น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงเร็วกว่าในสถานะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนหรือชุดควบคุม และสามารถใช้น้ำตาลทั้งสามชนิดได้เกือบหมดในระหว่างการหมักเอทานอล 72 ชั่วโมง (ดังภาพที่ 6 (c) และ ตารางภาคผนวกที่ 3.7 - 3.9)

ส่วนการทดลองที่ใช้เชื้อยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5306 ในการหมักเอทานอลโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นนั้น จากภาพที่ 6 (d) และตารางภาคผนวก ที่ 3.10 - 3.12 พบว่าทั้งในสถานะที่เติมและไม่เติมโลหะไอออน ปริมาณน้ำตาลซูโครสไม่มีการลดลงหรือลดลงน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งสอดคล้องกับผลจากตารางที่ 11 ที่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสในเชื้อชนิดนี้ จึงไม่สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้หรืออาจกล่าวได้ว่าเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสในการหมักเอทานอลได้นั่นเอง ส่วนน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลซูโครสในระหว่างการให้ความร้อนในระหว่างการฆ่าเชื้อ (autoclave) ซึ่งได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อน แคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน, และแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1], *S. cerevisiae*^[2], *S. cerevisiae*^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อน แคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ใน ชั่วโมงที่ 48

เชื้อยีสต์	ปริมาณเอทานอล (% w/v)					
	ควบคุม	แคลเซียมไอออน		โพแทสเซียมไอออน		แมกนีเซียมไอออน
		(% , w/v)		(% , w/v)		(% , w/v)
		0.20	0.60	0.20	0.60	0.20 0.60
<i>S. cerevisiae</i> ^[1]	9.37 ^{a,A}	7.18 ^{b,A}	2.95 ^{c,A}	8.96 ^{a,A}	6.80 ^{b,A}	9.35 ^{a,A} 6.81 ^{b,B}

<i>S. cerevisiae</i> ^[2]	8.94 ^{a,A}	7.27 ^{c,A}	2.85 ^{e,A}	8.26 ^{b,B}	6.82 ^{d,A}	8.94 ^{a,A}	7.23 ^{c,A}
<i>S. cerevisiae</i> ^[3]	3.33 ^{c,B}	2.45 ^{d,B}	1.30 ^{e,B}	3.37 ^{c,C}	2.49 ^{d,B}	6.20 ^{a,B}	4.48 ^{b,C}
<i>C. tropicalis</i>	3.19 ^{b,B}	2.06 ^{c,C}	0.32 ^{d,C}	2.85 ^{b,D}	2.16 ^{c,B}	3.71 ^{a,C}	3.23 ^{b,D}
TISTR 5306							

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a-e) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของโลหะไอออนที่แตกต่างกันในเชื้อยีสต์สายพันธุ์เดียวกัน (เปรียบเทียบภายในแถวเดียวกัน)

ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-C) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนโลหะไอออนชนิดและความเข้มข้นเดียวกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

^{[1],[2],[3]} เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ต่างสายพันธุ์ (ตารางภาคผนวกที่ 1)

พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีการปนเปื้อนของโลหะไอออนหรือชุดควบคุม การหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ^[1] และยีสต์ *S. cerevisiae* ^[2] จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 9.37 และ 8.94 ตามลำดับ ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 3.33 และ 3.19 ตามลำดับ

โดยเมื่อมีการเติมโลหะไอออนพบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้มีปริมาณลดลง โดยเฉพาะสภาวะที่มีการเติมแคลเซียมไอออน จะเห็นผลชัดเจนต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ซึ่งมีค่าที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยที่ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนร้อยละ 0.2 เชื้อ *S. cerevisiae* ^[1], *S. cerevisiae* ^[2], *S. cerevisiae* ^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 7.18, 7.27, 2.45 และ 2.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.60 ผลิตเอทานอลได้เพียงร้อยละ 2.95, 2.85, 1.30 และ 0.32 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับการทดลองที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน

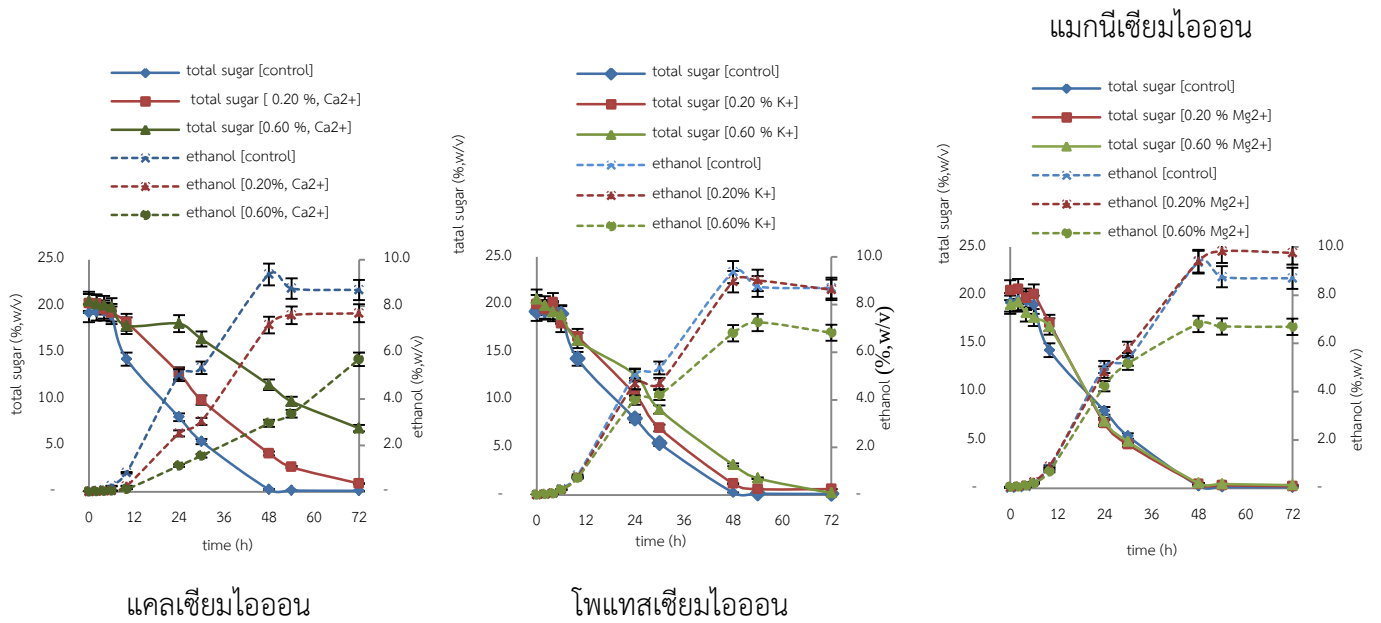
ส่วนการทดลองที่มีการเติมโพแทสเซียมไอออนก็ให้ผลเช่นเดียวกับการเติมแคลเซียมไอออน คือมีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีแนวโน้มที่ลดลง โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 เชื้อ *S. cerevisiae* ^[1], *S. cerevisiae* ^[2], *S. cerevisiae* ^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 8.96, 8.26, 3.37 และ 2.85 ตามลำดับ ซึ่งลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นร้อยละ 0.60 ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าร้อยละ 6.80, 6.82, 2.49 และ 2.16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ตามลำดับ ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะ *S. cerevisiae*^[1] และยีสต์ *S. cerevisiae*^[2] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเอทานอลที่ได้มีปริมาณสูงกว่าในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออนที่ความเข้มข้นเดียวกัน

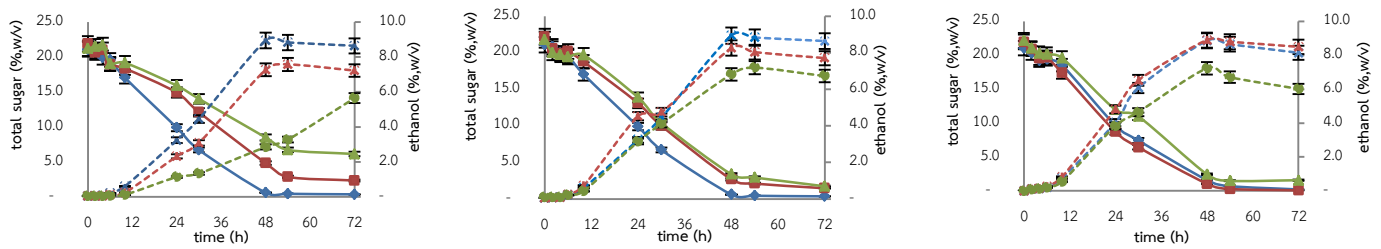
ในขณะทำการเติมแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหารหมักพบว่า จะทำให้ประสิทธิภาพการหมักดีขึ้นเมื่อเทียบกับการเติมโลหะไอออนชนิดอื่นที่ความเข้มข้นเดียวกันและชุดควบคุม ซึ่งดูได้จากค่าปริมาณเอทานอลที่ได้ของทุกสายพันธุ์ของยีสต์มีปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ *S. cerevisiae*^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 แต่อาจจะมีปริมาณเอทานอลลดลงเล็กน้อยเมื่อมีการเติมแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.60 โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae*^[1] และ *S. cerevisiae*^[2] จากตารางที่ 12 การเติมแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเชื้อ *S. cerevisiae*^[1], *S. cerevisiae*^[2], *S. cerevisiae*^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 9.35, 8.94, 6.20 และ 3.71 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 6.81, 7.25, 4.48 และ 3.23 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองความสามารถของการใช้น้ำตาลทั้งหมดและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ของเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการหมัก แสดงผลดังภาพที่ 7

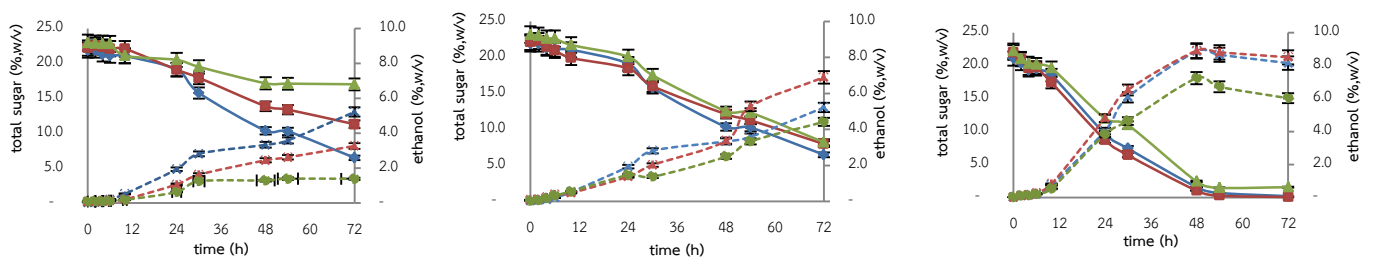
(a) *S. cerevisiae* ^[1]



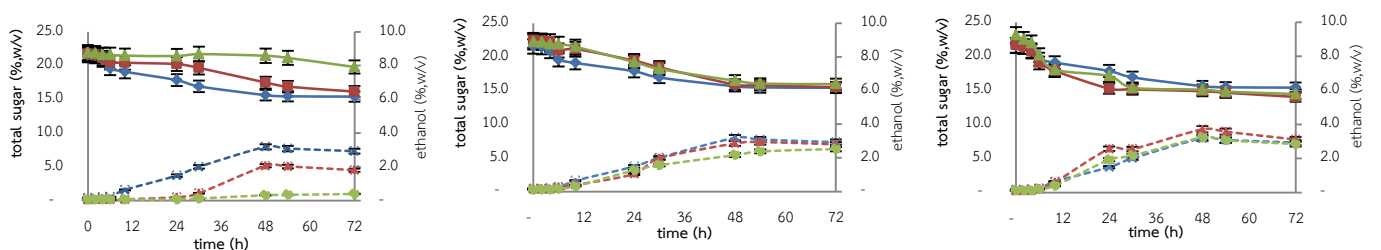
(b) *S. cerevisiae* ^[2]



(c) *S. cerevisiae* ^[3]



(d) *C. tropicalis* TISTR 5306



ภาพที่ 7 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (เส้นทึบ) และเอทานอล (เส้นประ) ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ (a) *S. cerevisiae* ^[1], (b)

S. cerevisiae ^[2], (c) *S. cerevisiae* ^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306 ภายใต้สภาวะที่มีการเปลี่ยนแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออน, และแมกนีเซียมไอออนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

4.3 ศึกษาผลกระทบร่วมของโลหะไอออน 3 ชนิด (Ca^{2+} , K^+ และ Mg^{2+}) ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae*^[1]

ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีการเติมโลหะไอออนแต่ละชนิดในอัตราส่วนต่าง ๆ ตามตารางที่ 6 ซึ่งได้กำหนดจากการทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (review) พบว่าอัตราส่วนเฉลี่ยที่พบของแคลเซียมไอออนต่อโพแทสเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออนเป็น 1:5:0.5 จึงได้ทำการกำหนดอัตราส่วนดังกล่าวนี้ในการศึกษา โดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการหมักเอทานอลที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 4.2 โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในสภาวะพีเอช 4.5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะ, ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุคโทสที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักเอทานอล และค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณเอทานอลที่ได้, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร และอัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร เปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนหรือชุดควบคุม (Control) ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 อัตราการเจริญจำเพาะ, ปริมาณเอทานอล, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร และอัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร ในการหมักน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* ^[1] ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะไอออนต่าง ๆ ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันที่เวลา 48 ชั่วโมงของการหมัก

การทดลอง	อัตราส่วน (%w/v : %w/v)	อัตราการเจริญ จำเพาะ (μ , h ⁻¹)	ปริมาณ เอทานอล (%, w/v)	ผลได้ของ เอทานอล (g ethanol/g invert)	อัตราการผลิต เอทานอลเชิง ปริมาตร (Q _p , g/L/h)	อัตราการใช้สับสเตรท เชิงปริมาตร (Q _s , g/L/h)
ชุดควบคุม		0.15 ± 0.00 ^A	8.47 ± 0.01 ^A	0.38 ± 0.00 ^A	1.73 ± 0.00 ^A	74.06 ± 0.69 ^A
แคลเซียม : โพแทสเซียม	1:5 (0.20:0.60)	0.01 ± 0.00 ^B	1.51 ± 0.08 ^C	0.06 ± 0.02 ^C	0.31 ± 0.02 ^C	12.70 ± 1.70 ^C
แคลเซียม : แมกนีเซียม	1:0.5 (0.20:0.07)	0.12 ± 0.06 ^A	6.87 ± 0.60 ^B	0.30 ± 0.03 ^B	1.43 ± 0.13 ^B	57.90 ± 1.05 ^B
โพแทสเซียม : แมกนีเซียม	5:0.5 (0.60:0.07)	0.14 ± 0.03 ^A	6.78 ± 0.20 ^B	0.29 ± 0.01 ^B	1.41 ± 0.04 ^B	56.30 ± 0.70 ^B
แคลเซียม : โพแทสเซียม : แมกนีเซียม	1:5:0.5 (0.20:0.60:0.07)	0.12 ± 0.02 ^A	6.06 ± 0.31 ^B	0.26 ± 0.03 ^B	1.26 ± 0.06 ^B	50.34 ± 1.24 ^B

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-C) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) โดยเปรียบเทียบไอออนในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

จากตารางที่ 13 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีการเติมโลหะไอออนในอัตราส่วนที่แตกต่างกันพบว่า อัตราการเจริญจำเพาะ ของแต่ละการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมหรือในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน ยกเว้นการทดลองที่มีอัตราส่วนของแคลเซียมไอออนต่อโพแทสเซียมไอออนเท่ากับ 1:5 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ ซึ่งให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.01 ต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของชุดควบคุม, แคลเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (1:0.5), โพแทสเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (5:0.5), และแคลเซียมไอออนต่อโพแทสเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (1:5:0.5) เท่ากับ 0.15, 0.12, 0.14, และ 0.12 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ผลของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักในชั่วโมงที่ 48 พบว่าในสภาวะที่มีการเติมโลหะไอออนทุกการทดลองจะให้ปริมาณเอทานอลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเฉพาะในการทดลองที่มีการเติมเฉพาะไอออนของแคลเซียมและโพแทสเซียมในอัตราส่วนแคลเซียมไอออนต่อโพแทสเซียมไอออนเท่ากับ 1:5 จะให้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 1.51 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งต่ำมากและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับการทดลองอื่น ๆ ที่มีการเติมโลหะไอออนในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ซึ่งการทดลองที่มีการเติมแคลเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (1:0.5), โพแทสเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (5:0.5), และแคลเซียมไอออนต่อโพแทสเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (1:5:0.5) จะให้ค่าปริมาณเอทานอลร้อยละ 6.87, 6.78, และ 6.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าในสภาวะที่มีการเติมโลหะไอออนในอัตราส่วนต่าง ๆ ให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 48 น้อยกว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนหรือชุดควบคุมซึ่งได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 8.47 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ดังตารางที่ 13)

สำหรับค่าพารามิเตอร์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเอทานอล เช่น ผลได้ของเอทานอล ซึ่งเป็นการคำนวณจากกรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลอินเวิร์ท, อัตราการผลิตเชิงปริมาตร, และประสิทธิภาพของการหมักเอทานอล พบว่าได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับผลของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (ตารางที่ 13) โดยพบว่าการทดลองที่มีการเติมแคลเซียมไอออนต่อโพแทสเซียมไอออนที่อัตราส่วน 1:5 จะให้ค่าผลได้ของเอทานอล 0.06 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลอินเวิร์ท, อัตราการผลิตเชิงปริมาตร 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, และประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลร้อยละ 12.7 ซึ่งให้ค่าที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการทดลองอื่น ๆ ที่มีการเติมโลหะไอออนและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ในขณะที่ยังการทดลองที่มีการเติมแคลเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (1:0.5), โพแทสเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (5:0.5) และแคลเซียมไอออนต่อโพแทสเซียมไอออนต่อแมกนีเซียมไอออน (1:5:0.5) ให้ผลได้ของเอทานอล เท่ากับ 0.30, 0.29, และ 0.26

กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลอินเวิร์ท ตามลำดับ ผลของอัตราการผลิตเชิงปริมาตร เท่ากับ 1.43, 1.41, และ 1.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และผลของประสิทธิภาพการหมักเอทานอลร้อยละ 57.90, 56.30, และ 50.34 ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน ที่มีค่าผลได้ของเอทานอล เท่ากับ 0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลอินเวิร์ท, อัตราการผลิตเชิงปริมาตร 1.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, และประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลร้อยละ 74.06

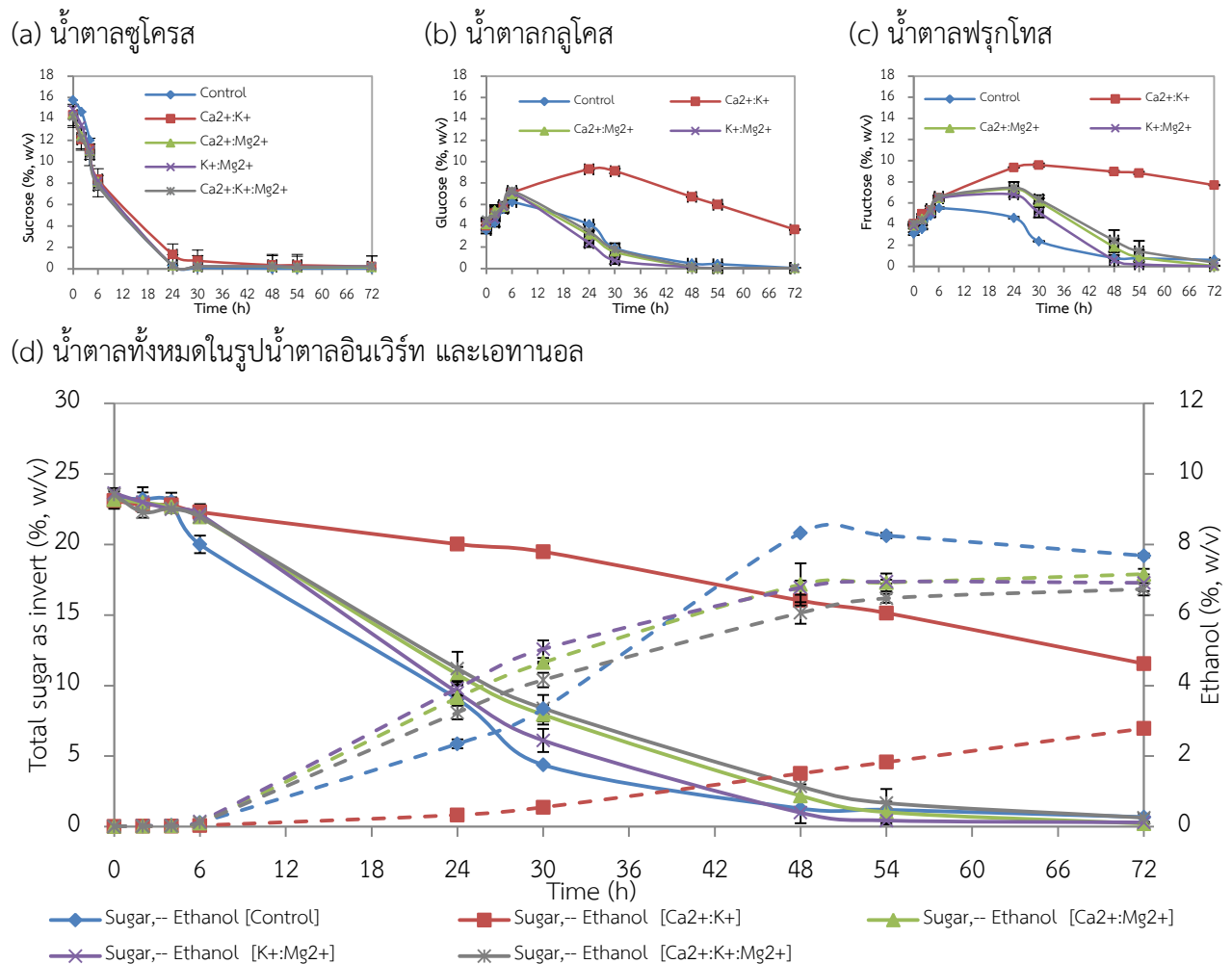
ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าในสภาวะการหมักเอทานอลที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนที่มีเพียง 2 ไอออนเท่านั้นในอาหารหมัก จะส่งผลกระทบต่อ การหมักเอทานอล ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลต่ำมาก แต่ในสภาวะการหมักที่มีโลหะไอออนของแมกนีเซียมผสมอยู่ เช่นการทดลองที่มีการผสมของแคลเซียมไอออนกับแมกนีเซียมไอออน หรือโพแทสเซียมไอออนกับแมกนีเซียมไอออน จะพบว่าประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงขึ้นกว่าในสภาวะที่มีการผสมแคลเซียมไอออนกับโพแทสเซียมไอออน เพียง 2 ไอออนเท่านั้น และเมื่อทำการทดลองที่มีการเติมโลหะไอออนทั้ง 3 ชนิดในการหมัก พบว่าจะให้ค่าประสิทธิภาพต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะของแคลเซียมไอออนกับแมกนีเซียมไอออน หรือโพแทสเซียมไอออนกับแมกนีเซียมไอออน แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลก็ยังต่ำกว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนหรือชุดควบคุม

และจากภาพที่ 8 และตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงถึงช่วงเวลาของการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโทส และเอทานอล ในระหว่างการหมักภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะไอออน ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมโลหะไอออน โดยภาพที่ 8(a) ถึง 8(c) เป็นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโทส ในระหว่างการหมักเอทานอล โดยพบว่าในช่วงเวลา 0 - 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลซูโครสมีการลดลงอย่างรวดเร็วและหลังจากชั่วโมงที่ 24 น้ำตาลซูโครสค่อยๆลดลงจนหมดในชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก แต่อัตราการลดลงของน้ำตาลซูโครสในการเติมแคลเซียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนจะมีอัตราการลดลงที่ช้ากว่าการทดลองอื่นๆ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสมีการเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงที่ 0 - 6 ของการหมัก โดยน้ำตาลกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็วอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 30 และหลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 48 และจะถูกใช้หมดและสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง ส่วนน้ำตาลฟรุคโทสชั่วโมงที่ 6 - 24 มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เนื่องจากเชื้อยีสต์มีการใช้น้ำตาลกลูโคสก่อน ซึ่งเมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดเชื้อยีสต์จึงใช้น้ำตาลฟรุคโทสแทน ดังนั้นหลังชั่วโมงที่ 24 น้ำตาลฟรุคโทสมีการลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 48 และหลังจากนั้นจะค่อยๆลดลงและสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง ยกเว้นในการทดลองที่มีการเติมแคลเซียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนเท่านั้นที่พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทสจะเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24

ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลซูโครสมีการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสช้ากว่าการทดลองอื่นๆ และหลังจากชั่วโมงที่ 24 น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสเริ่มลดลงแต่มีอัตราการลดลงที่ช้ามาก ซึ่งดูเหมือนไอออนทั้งสองชนิดจะเป็นตัวยับยั้งการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสค่อนข้างสูงในระหว่างการหมัก จึงทำให้เหลือปริมาณน้ำตาลทั้งสองชนิดอยู่ในปริมาณที่สูงมากในน้ำหมัก (ภาพที่ 8 (b) และ (c)) ซึ่งสอดคล้องกับภาพที่ 8 (d) ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ทและปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมัก จะเห็นได้ชัดว่า การทดลองที่ไม่มีการปนเปื้อนของแมกนีเซียมไอออนหรือการทดลองที่มีการเติมเฉพาะแคลเซียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนนั้น ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ททั้งหมดมีการลดลงอย่างช้า ๆ และเหลือปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ททั้งหมดค่อนข้างสูงจึงเป็นผลทำให้การผลิตเอทานอลที่ได้มีปริมาณที่ต่ำมาก ส่วนการทดลองอื่น ๆ ที่มีการเติมแมกนีเซียมไอออนหรือชุดควบคุม จะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ททั้งหมดมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 48 และจะสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 72 ในส่วนของปริมาณเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นค่อนข้างรวดเร็วเช่นกัน (ดังภาพที่ 8 (d)) ซึ่งจากผลการทดลองมีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นทุกการทดลองประมาณร้อยละ 23 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 8.47 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในผลการทดลองที่ไม่มีการเติมโลหะไอออนหรือชุดควบคุม ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้จะน้อยลงเมื่อมีการปนเปื้อนของโลหะไอออนในระหว่างการหมักโดยเฉพาะการทดลองที่มีการเติมเฉพาะแคลเซียมไอออนกับโพแทสเซียมไอออน ในอัตราส่วน 1:5 ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 1.51 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ททั้งหมดเหลืออยู่ในน้ำหมักร้อยละ 11.56 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือน้ำตาลถูกใช้ไปประมาณร้อยละ 50 เท่านั้น ในขณะที่การทดลองที่มีการเติมแมกนีเซียมไอออนเข้าไปผสมด้วยเช่น แคลเซียมไอออนกับแมกนีเซียมไอออน (1:0.5), โพแทสเซียมไอออนกับแมกนีเซียมไอออน (5:0.5) และ แคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออน (1:5:0.5) จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 6.87, 6.78, และ 6.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ททั้งหมดเหลืออยู่ในน้ำหมักประมาณร้อยละ 0.22-0.68 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรหรือน้ำตาลอินเวิร์ทถูกใช้ไปประมาณร้อยละ 97 - 99 (ตารางภาคผนวกที่ 4)

เมื่อพิจารณาในเรื่องการเจริญของเชื้อยีสต์ในระหว่างการหมักพบว่าแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์โดยดูจากปริมาณของเซลล์ยีสต์ดังตารางภาคผนวกที่ 4 พบว่า การทดลองที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมไอออนหรือการทดลองที่มีการเติมเฉพาะแคลเซียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนนั้นเซลล์ยีสต์มีการเจริญหรือการเพิ่มจำนวนของปริมาณเซลล์ช้ากว่าการทดลองอื่นๆ โดยการทดลองที่มีการเติมแมกนีเซียมไอออนลงไปเซลล์ยีสต์จะเพิ่มจำนวนจาก 10^6 เป็น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในช่วง 6 - 24 ชั่วโมงของการหมัก แต่การทดลองที่ไม่มีการปนเปื้อนของแมกนีเซียมไอออนหรือเป็นการทดลองที่มีการเติมเฉพาะแคลเซียม

ไอออนและโพแทสเซียมไอออนนั้น เซลล์ยีสต์จะเพิ่มจำนวนจาก 10^6 เป็น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 30 ของการหมัก ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณต่ำกว่า ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแมกนีเซียมมีความจำเป็นในต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ซึ่งเกี่ยวข้องกับโครงสร้าง และเมทาบอลิซึม เช่นการทำงานของเอนไซม์สำหรับการเคลื่อนย้ายฟอสเฟต (transphosphorylation) ซึ่งต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน เป็นต้น (สาวิตรี, 2549) ดังนั้นเมื่อมีแมกนีเซียมอยู่ในน้ำหมักจะทำให้ยีสต์มีการเจริญได้เร็วขึ้นแต่ต้องในปริมาณที่เหมาะสม



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลซูโครส (a), น้ำตาลกลูโคส (b), น้ำตาลฟรุกโทส (c) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปน้ำตาลอินเวิร์ท (เส้นทึบ) และเอทานอล (เส้นประ) (d) ในการระหว่างการหมักเอทานอลในน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae*^[1] ที่มีการปนเปื้อนของโลหะไอออนในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (control, Ca²⁺:K⁺, Ca²⁺:Mg²⁺, K⁺:Mg²⁺, Ca²⁺:K⁺:Mg²⁺)

4.4 ผลกระทบต่อการหมักเอทานอลด้วยกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับฟลasks

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.3 เป็นผลการทดลองการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ซึ่งเป็นลักษณะ Basic substrate ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นทำให้เข้าใจผลกระทบของการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออนที่มีต่อการหมักเอทานอลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae*^[1] ในลักษณะการหมักที่เป็นแบบ Pure system ของการหมักเอทานอล สำหรับในการทดลองนี้เป็นผลการทดลองการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล (molasses) ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการหมักเอทานอลในปัจจุบัน โดยองค์ประกอบของกากน้ำตาลมีองค์ประกอบหลายชนิดที่นอกเหนือจากน้ำตาลซูโครสหรือกล่าวได้ว่ามีสิ่งปนเปื้อนอื่นๆอยู่ด้วย

องค์ประกอบของกากน้ำตาลที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล

ซึ่งก่อนการทดลองได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆที่สำคัญในกากน้ำตาลที่จะนำมาใช้ในการศึกษา รวมทั้งผลของปริมาณของแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออน ดังตารางที่ 14 โดยพบว่ากากน้ำตาลมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เท่ากับ 78.4 องศาบริกซ์ ในส่วนของปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโทส ประกอบด้วย 363,900, 51,300 และ 45,700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือร้อยละ 36.39, 5.13 และ 4.57 ตามลำดับ สำหรับโลหะไอออนที่อยู่ในกากน้ำตาลมากที่สุด คือ โพแทสเซียมไอออน มีปริมาณ 19,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ร้อยละ 1.90) รองลงมาคือ แคลเซียมไอออน 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ร้อยละ 1.00) และแมกนีเซียมไอออน มีปริมาณน้อยที่สุดคือ 3,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ร้อยละ 0.38) โดยองค์ประกอบโลหะไอออนที่เกิดขึ้นในกากน้ำตาลเหล่านี้ อาจเกิดจากการตกค้างในอ้อยหรืออาจมาจากขั้นตอนของการผลิตน้ำตาลเป็นต้น โดยจากการรายงานของ Chotineeranat *et al.*, (2010) พบว่าในกระบวนการผลิตน้ำตาล แคลเซียมถูกเติมเข้าไปในกระบวนการผลิตน้ำตาลในรูปของปูนขาว (CaO) ในระหว่างกระบวนการทำใส (Clarification) ซึ่งต้องมีการเติมปูนขาวลงไปเพราะในขั้นตอนการปลูกอ้อยมีการใส่ปุ๋ย N-P-K (ไนโตรเจน-ฟอสฟอรัส-โพแทสเซียม) และถ้ามีปริมาณฟอสฟอรัสตกค้างในอ้อยมาก จะทำให้อ้อยมีความขุ่น จึงจำเป็นต้องทำการเติมปูนขาวอย่างที่กล่าวข้างต้น ซึ่งบางครั้งมีการเติมปูนขาวในปริมาณที่มากเกินไปก็จะส่งผลทำให้แคลเซียมตกค้างและปนอยู่ในกากน้ำตาลได้ ส่วนโพแทสเซียมและแมกนีเซียมไอออนก็เช่นกัน อาจเกิดจากการปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบหรืออ้อย ซึ่งโดยปกติมักจะมีการให้

ปุ๋ยที่มีองค์ประกอบของโพแทสเซียมและแมกนีเซียม เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของอ้อย แต่หากให้ในปริมาณที่มากก็อาจจะตกค้างในอ้อยและเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลและทำให้เกิดการปนเปื้อนในกากน้ำตาลได้

ตารางที่ 14 องค์ประกอบในกากน้ำตาลที่ใช้ในการหมักเอทานอล

องค์ประกอบ	ปริมาณ
ของแข็งทั้งหมดที่ละลาย (Total soluble solid)	78.4 องศาบริกซ์
น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)	460,900 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
น้ำตาลซูโครส (Sucrose)	363,900 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	51,300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose)	45,700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
เถ้าซัลเฟต (Sulphate Ash)	101,600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
โพแทสเซียมไอออน (K^+)	19,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
แคลเซียมไอออน (Ca^{2+})	10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+})	3,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การหมักเอทานอลในกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านและผ่านการทำ pre-treatment

ซึ่งการหมักเอทานอลด้วยกากน้ำตาลนั้นจะมีขั้นตอนการเจือจางกากน้ำตาลก่อนการหมักเพื่อให้ได้ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 40 - 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 20 - 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ตามข้อ 3.4.3 และ 3.4.4 แล้วจึงสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักได้ โดยกากน้ำตาลในการทดลองนี้ได้ทำการเจือจาง โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดประมาณร้อยละ 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

หลังจากนั้นทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ผ่านการทำ pre-treatment เพื่อกำจัดโลหะไอออนออกจากกากน้ำตาล และหมักกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการทำ pre-treatment โดยวิธีการ pre-treatment นั้น จะใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปรับพีเอช

ของสารละลายกากน้ำตาลให้เท่ากับ 4.0 และนำไปต้มเดือดเป็นเวลา 30 นาที (ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับโรงงานผลิตเอทานอลโดยทั่วไปที่ใช้ในการทำ pre-treatment กากน้ำตาลก่อนการหมักเอทานอล) หลังจากนั้นทำการเหวี่ยงเอาตะกอนออกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยส่วนใสที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอลต่อไป ซึ่งก่อนการหมักได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบโลหะไอออนทั้ง 3 ชนิดอีกครั้งในกากน้ำตาลที่ทำการเจือจางแล้วทั้งที่ไม่ผ่านการทำ pre-treatment และกากน้ำตาลที่ผ่านการทำ pre-treatment เพื่อดูปริมาณโลหะไอออนที่เหลืออยู่ในกากน้ำตาลก่อนทำการหมัก โดยแสดงผลดังตารางที่ 15 พบว่า เมื่อทำการ pre-treatment กากน้ำตาลที่เจือจางแล้ว จะทำให้ปริมาณของโลหะไอออนลดลงดังนี้ โดยปริมาณแคลเซียมไอออนลดลงร้อยละ 56.97 โพแทสเซียมไอออนลดลงร้อยละ 3.27 และแมกนีเซียมไอออนลดลงเพียงร้อยละ 2.82

ตารางที่ 15 ปริมาณของแคลเซียมไอออน, โพแทสเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออน ก่อนและหลังจากการทำ pre-treatment ในกากน้ำตาลเจือจาง (40 องศาบริกซ์) ที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล

โลหะไอออน	ปริมาณโลหะไอออน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	ไม่ผ่านการ pre-treatment	ผ่านการ pre-treatment
โพแทสเซียมไอออน (K^+)	8,560	8,280
แคลเซียมไอออน (Ca^{2+})	4,160	1,790
แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+})	1,420	1,380

เมื่อนำสารละลายกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านและผ่านการ pre-treatment ไปทำการหมักเอทานอล ซึ่งได้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆของการหมัก ดังตารางที่ 16 พบว่า กากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 8.70 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งมีปริมาณมากกว่าการหมักในกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 8.18 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ นอกจากนี้อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร (Q_s) ซึ่งหมายถึงความสามารถของยีสต์ในการใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอล รวมถึงประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลในกากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment ก็มีค่าที่

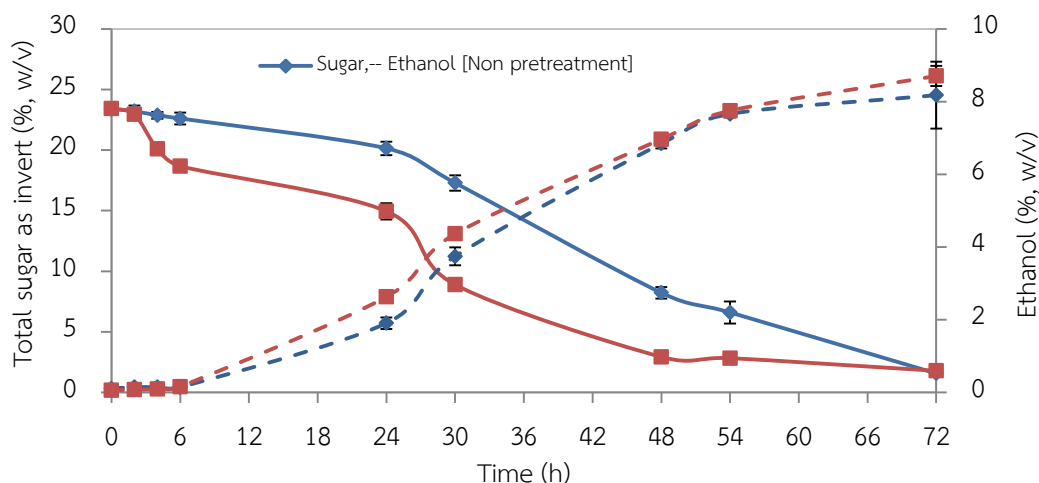
สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ เช่นเดียวกัน โดยในกากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment จะมีค่าอัตราการใช้สับสเตรทเท่ากับ 3.87 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลร้อยละ 78.19 ในขณะที่ผลของอัตราการใช้สับสเตรทในกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment มีค่า 3.45 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลร้อยละ 72.32 ส่วนค่าพารามิเตอร์อื่น ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$

ตารางที่ 16 อัตราการเจริญจำเพาะ, ปริมาณเอทานอล, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร, อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตรและประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลเจือจาง 40 ปริกซ์ ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำ pre-treatment

การทดลอง	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1})	ปริมาณเอทานอล (%, w/v)	ผลได้ของเอทานอล (g/g)	อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร ($Q_p, g/L/h$)	อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร ($Q_s, g/L/h$)	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล (%)
ไม่ผ่านการ Pre-treatment	0.16 ± 0.03^A	8.18 ± 0.11^B	0.37 ± 0.03^A	1.12 ± 0.09^A	3.45 ± 0.10^B	72.32 ± 0.15^B
ผ่านการ Pre-treatment	0.16 ± 0.05^A	8.70 ± 0.13^A	0.40 ± 0.07^A	1.20 ± 0.01^A	3.87 ± 0.09^A	78.19 ± 0.18^A

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-B) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยเปรียบเทียบการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่แตกต่างกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

จากการทดลองข้างต้นและผลการทดลองดังตารางภาคผนวกที่ 5 สามารถนำข้อมูลปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ท มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ดังภาพที่ 9 ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ทในระหว่างการหมักจากสารละลายกากน้ำตาลที่ผ่านการทำ pre-treatment มีการลดลงมากกว่าและเร็วกว่าการหมักกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment นั้นหมายถึงเชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ดีกว่าซึ่งเป็นผลทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่มีปริมาณสูงกว่า



ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ท (เส้นทึบ) และปริมาณเอทานอล (เส้นประ) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักจากกากน้ำตาลที่ไม่ผ่าน (◆) และผ่านการทำ pre-treatment (■) ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* ^[1]

การหมักเอทานอลในกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre - treatment และมีการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ให้มากเกินไป

การทดลองนี้เป็นการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงในกากน้ำตาลเจือจาง 40 องศาบริกซ์ ที่ไม่ผ่านการทำ pre-treatment ทั้งนี้เพื่อดูผลของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มากเกินไปในการหมักเอทานอล พบว่าเมื่อเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ไปในสารละลายกากน้ำตาลมากกว่าร้อยละ 1.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีผลให้ทุกพารามิเตอร์การหมักลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ เทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ไปในกากน้ำตาลเจือจาง (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 อัตราการเจริญจำเพาะ, ปริมาณเอทานอล, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร, อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลเจือจาง (40 องศาบริกซ์) ที่ไม่ผ่านการ pre-treatment และมีการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในกากน้ำตาล

ปริมาณ แคลเซียม ไฮดรอกไซด์ที่เติม* (%, w/v)	อัตราการ เจริญจำเพาะ (h ⁻¹)	ปริมาณ เอทานอล (%, w/v)	ผลได้ของ เอทานอล (g/g)	อัตราการผลิต เอทานอลเชิง ปริมาตร (Q _p , g/L/h)	อัตราการใช้ สับสเตรทเชิง ปริมาตร (Q _s , g/L/h)	ประสิทธิภาพ การผลิต เอทานอล (%)
ชุดควบคุม**	0.16 ± 0.03 ^A	8.18 ± 0.11 ^A	0.37 ± 0.03 ^A	1.12 ± 0.09 ^A	3.45 ± 0.10 ^A	72.32 ± 0.15 ^A

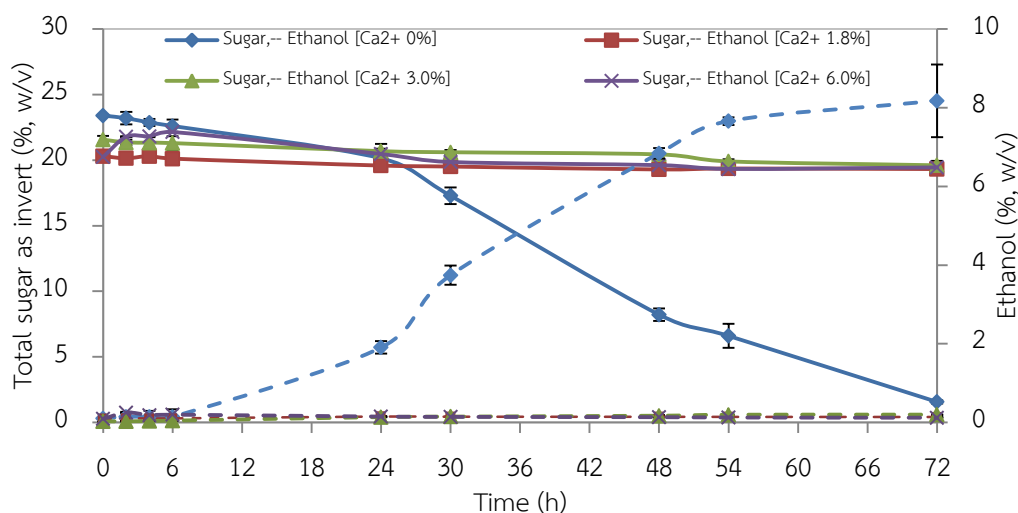
1.8	0.06 ± 0.00^B	0.14 ± 0.03^B	0.05 ± 0.00^B	0.02 ± 0.00^B	0.21 ± 0.07^B	9.54 ± 0.10^B
3.0	0.07 ± 0.01^B	0.20 ± 0.01^B	0.05 ± 0.01^B	0.02 ± 0.00^B	0.17 ± 0.05^B	10.01 ± 0.18^B
6.0	0.05 ± 0.00^B	0.12 ± 0.00^B	0.04 ± 0.01^B	0.00 ± 0.00^B	0.19 ± 0.01^B	8.98 ± 0.09^B

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-B) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยเปรียบเทียบการเติมแคลเซียมไอออนที่แตกต่างกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

* ความเข้มข้นสุดท้ายของแคลเซียมไอออนในแต่ละการทดลอง

** ชุดควบคุม หมายถึง กากน้ำตาลเจือจาง (40 บริกซ์) ที่ไม่ผ่านการ pre-treatment และไม่มีการเติมแคลเซียมไอออนเพิ่ม

ซึ่งภาพที่ 10 จะเห็นได้ชัดว่า เมื่อมีการเติมแคลเซียมไอออนในแต่ละความเข้มข้นลงในสารละลายกากน้ำตาลที่ใช้ในการหมักเอทานอล พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่อยู่ในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ทมีการลดลงน้อยมากหรือแทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับผลของปริมาณเอทานอลที่ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้เลย และเมื่อดูจากผลการเจริญของยีสต์พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของเซลล์น้อยมากหรืออาจจะกล่าวได้ว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าว เมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมแคลเซียมไอออนลงไป (ตารางภาคผนวกที่ 5)



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ท (เส้นทึบ) และปริมาณเอทานอล (เส้นประ) ในการหมักกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการทำ pre-treatment (◆) และมีการเติมแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ลงไปร้อยละ 1.8 (■), 3.0 (▲) และ 6.0 (×) โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.5 ผลการศึกษาการขยายกำลังการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 50 ลิตร

จากผลการทดลองข้อ 4.4 ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับฟลาสก์ ซึ่งจะเห็นว่าควรต้องมีการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของโลหะไอออน ซึ่งหากมีปริมาณมากควรต้องมีการกำจัดออกก่อนหรือควรต้องมีการทำ pre-treatment โดยเฉพาะโลหะไอออนที่มีผลกระทบต่อกระบวนการหมักอย่างเช่น แคลเซียมไอออน ซึ่งหากไม่สามารถกำจัดออกได้หมดก็ควรอยู่ในระดับที่ทำให้เกิดผลกระทบน้อยที่สุด

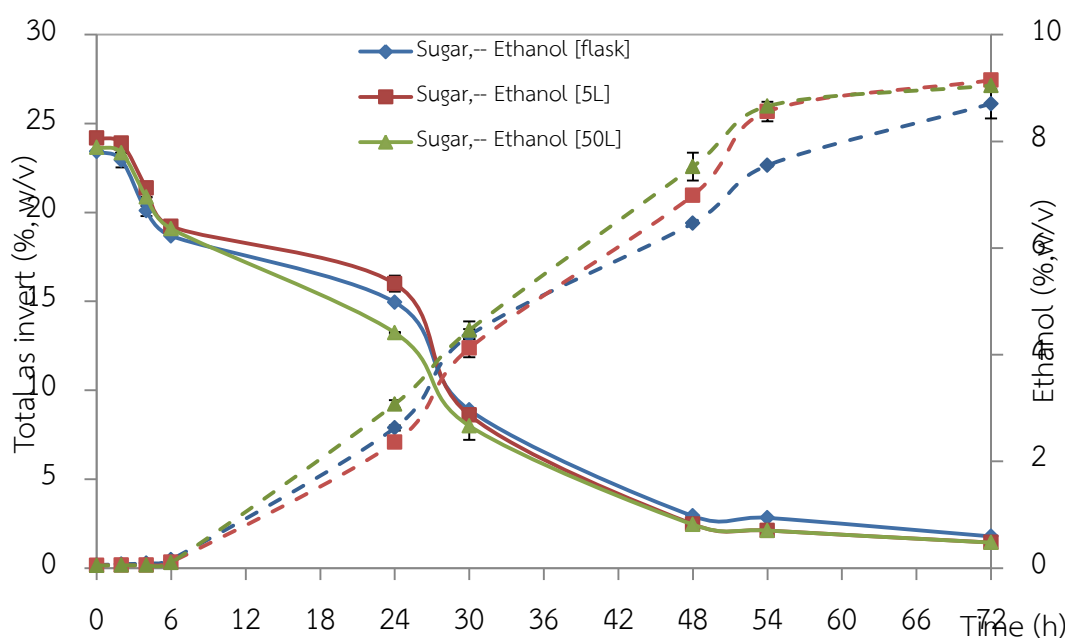
การทดลองนี้เป็นการขยายกำลังการผลิตจากการหมักในระดับฟลาสก์ (การทดลองจากหัวข้อ 4.4) โดยทำการขยายขนาดการหมักในระดับถังหมัก 5 ลิตร และ 50 ลิตร ซึ่งกำหนดให้มีปริมาตรการทำงาน (working volume) เท่ากับ 3 และ 30 ลิตร ตามลำดับ โดยในขั้นแรกก็จะมีการเจือจางกากน้ำตาลเช่นเดียวกันเพื่อให้มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ประมาณ 40 งามาปริกซ์ และทำการ pre-treatment เช่นเดียวกับการทำในระดับฟลาสก์ โดยผลการทดลองพบว่า ผลของอัตราการเจริญจำเพาะ, ปริมาณเอทานอล, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร, อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของการหมักขนาด 5 ลิตร และ 50 ลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ โดยการหมักเอทานอลขนาด 5 ลิตร นั้นผลของอัตราการเจริญจำเพาะ มีค่า 0.17 ต่อชั่วโมง ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 9.15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, ผลได้ของเอทานอล 0.40 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลอินเวิร์ท, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร 1.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร 4.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลร้อยละ 78.24 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่ผลของการหมักเอทานอลขนาด 50 ลิตรนั้นผลของอัตราการเจริญจำเพาะ มีค่า 0.18 ต่อชั่วโมง ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 9.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, ผลได้ของเอทานอล 0.40 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลอินเวิร์ท, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร 1.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร 4.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลร้อยละ 79.24 (ดังตารางที่ 18) แต่การหมักในระดับ 5 ลิตรและ 50 ลิตร จะมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ กับการหมักระดับฟลาสก์โดยเฉพาะค่าของปริมาณเอทานอลที่ได้และอัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร ซึ่ง 2 ค่าดังกล่าวในระดับฟลาสก์จะให้ค่าที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ คือ ได้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพียงร้อยละ 8.70 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร 3.87 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลถึงแม้จะไม่มีค่าแตกต่างกัน แต่มีค่าประสิทธิภาพการผลิตเพียงร้อยละ 78.19 ในระดับฟลาสก์ แต่เมื่อเพิ่มกำลังการผลิตเป็น 5 ลิตร และ 50 ลิตร ค่าประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 78.24 และ 79.24 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 เอทานอล ผลได้ของเอทานอล อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment ที่ 72 ชั่วโมง

การทดลอง	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ , h^{-1})	ปริมาณเอทานอล (% w/v)	ผลได้ของเอทานอล (g/g)	อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร (Q_p , g/L/h)	อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร (Q_s , g/L/h)	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล (%)
ฟลask	0.16 ^A	8.70 ^A	0.40 ^A	1.20 ^A	3.87 ^A	78.19 ^A
ถังหมัก 5 L	0.17 ^A	9.15 ^B	0.40 ^A	1.26 ^A	4.02 ^B	78.24 ^A
ถังหมัก 50 L	0.18 ^A	9.05 ^B	0.40 ^A	1.25 ^A	4.15 ^B	79.24 ^A

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A-B) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยเปรียบเทียบโอออนในสัดส่วนที่แตกต่างกัน (เปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน)

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการหมักเอทานอลทั้ง 3 ระดับ (จากผลตารางภาคผนวกที่ 7) สามารถนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ท และปริมาณเอทานอล ได้ดังภาพที่ 11 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการหมักเอทานอลจากสารละลายกากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment ทั้งในระดับฟลask และระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 50 ลิตร มีแนวโน้มในลักษณะเดียวกัน



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ท (เส้นทึบ) และปริมาณเอทานอล (เส้นประ) ในการระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับฟลาสก์ (◆) และถังหมักขนาด 5 ลิตร (■) และ 50 ลิตร (▲)

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

1. แคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งจะทำให้อัตราการเจริญของเอนไซม์ลดลง ส่งผลทำให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลือหลังจากการย่อยและการเกิดเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้น้อยลง และเมื่อความเข้มข้นของโลหะไอออนมากขึ้น ผลกระทบก็จะมากขึ้นเช่นเดียวกันโดยเฉพาะแคลเซียมไอออน

2. การปนเปื้อนของแคลเซียมไอออนและโพแทสเซียมไอออน มีผลทำให้อัตราการเจริญจำเพาะ, อัตราการใช้สารตั้งต้นหรือการใช้น้ำตาลซูโครสของเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีแนวโน้มลดลง ซึ่งส่งผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักมีปริมาณลดลง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจะเห็นผลชัดเจน

3. ในขณะที่การปนเปื้อนของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อพารามิเตอร์ของการหมักลดลงเล็กน้อยซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโลหะไอออน โดยจะมีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะและการใช้น้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* ^[3]

4. การปนเปื้อนของโลหะไอออน ทั้ง 3 ชนิด ในระหว่างการหมัก จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เชื้อสร้างขึ้นทำให้อัตราการเจริญของเอนไซม์ลดลง ซึ่งมีผลต่อการย่อยหรือการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสได้น้อยลง ส่งผลให้ค่าอัตราการใช้สารตั้งต้นลดลง นอกจากนี้ อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทสของเชื้อจะช้าลงด้วย ส่งผลให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทสเหลือในระบบหรือในอาหารหมักมากขึ้น

5. ความรุนแรงของโลหะไอออนที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์, ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส, ยับยั้งการใช้สารตั้งต้นและเป็นผลทำให้ได้ปริมาณเอทานอลลดลง คือ แคลเซียมไอออน > โพแทสเซียมไอออน > แมกนีเซียมไอออน

6. การหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสในสภาวะที่มีการปนเปื้อนไอออนโลหะทั้ง 3 ชนิด (แคลเซียม ไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน) เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*^[1] มีอัตราการเจริญ จำเพาะ, อัตราการใช้สารตั้งต้นและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*^[2], *S. cerevisiae*^[3] และ *C. tropicalis* TISTR 5306

7. เชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5306 เป็นเชื้อที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ เนื่องจากไม่มีการผลิต เอนไซม์อินเวิร์เทส ดังนั้นจึงเป็นเชื้อที่ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการหมักเอทานอล ในวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบ ของน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก

8. ผลกระทบร่วมของโลหะไอออนที่มีผลต่อการหมักเอทานอลมากที่สุดคือ การหมักเอทานอลใน สารละลายน้ำตาลซูโครสที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมและโพแทสเซียมไอออน ($\text{Ca}^{2+}:\text{K}^+; 1:5$) ซึ่งทำให้ ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลงร้อยละ 82.85 แต่หากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแมกนีเซียมไอออนผสมอยู่ จะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลดีขึ้น

9. การวิเคราะห์องค์ประกอบโลหะไอออนในกากน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษานี้ พบว่า โพแทสเซียมมี ปริมาณสูงสุดร้อยละ 1.90 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (19,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) รองลงมาคือ แคลเซียมมี ปริมาณร้อยละ 1.00 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และแมกนีเซียมมีปริมาณน้อย ที่สุด คือร้อยละ 0.38 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (3,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

10. การ pre-treatment กากน้ำตาลสามารถลดปริมาณโลหะไอออนลงได้โดยปริมาณแคลเซียม ไอออนลดลงร้อยละ 56.97 ปริมาณโพแทสเซียมไอออนลดลงร้อยละ 3.27 และปริมาณแมกนีเซียมไอออน ลดลงร้อยละ 2.82

11. การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment จะทำให้ได้ประสิทธิภาพการผลิต เอทานอลสูงกว่าการหมักจากกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment รวมทั้งทำให้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆของ การหมัก ได้แก่ ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้, ผลได้ของเอทานอล, อัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตร และ อัตราการใช้สับสเตรทเชิงปริมาตร มีค่าสูงขึ้นเช่นเดียวกัน

12. การหมักเอทานอลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* ^[1] จากกากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment จะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละ 8 เมื่อเทียบกับการหมักในกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment

13. การขยายกำลังการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรและ 50 ลิตร มีผลของค่าพารามิเตอร์ต่างๆของการหมักใกล้เคียงกันกับการหมักในระดับฟลาสก์ แต่ปริมาณเอทานอลและประสิทธิภาพการผลิตสูงกว่าในระดับฟลาสก์เล็กน้อย

14. จากผลการทดลองของโครงการวิจัยจะได้ผลผลิต (output) ดังนี้

14.1 องค์ความรู้ของโลหะไอออนต่างๆ: แคลเซียม, โพแทสเซียมและแมกนีเซียมไอออน ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

14.2 แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากการนำตาล ด้วยการใช้วิธีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนหรือการ Pre - treatment ในกากน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก โดยมีข้อเสนอแนะเพิ่มเติมซึ่งได้จากการทดลองเพื่อเป็นข้อมูลให้กับทางโรงงาน โดยพบว่าโลหะไอออนที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตเอทานอลมากที่สุดคือ แคลเซียมไอออน ซึ่งจากการทดลองพบว่าควรมีปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.07 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้นก่อนทำการหมักควรวิเคราะห์คุณภาพกากน้ำตาลก่อนใช้ และทำการเจือจางให้อยู่ในระดับที่ไม่มีผลกระทบ หากทำการเจือจางกากน้ำตาลแล้วพบว่ายังมีปริมาณแคลเซียมที่สูงอยู่อาจจะต้องทำการเจือจางมากขึ้น แต่การเจือจางอาจส่งผลให้น้ำตาลในระบบมีปริมาณที่ต่ำกว่าที่ต้องการ จึงอาจต้องมีการเติมน้ำตาลทรายดิบ หรือน้ำเชื่อมดิบลงไปเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการหมักของยีสต์

ซึ่งในปัจจุบันกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลของโรงงานโดยทั่วไปจะใช้วิธีการดังต่อไปนี้

กระบวนการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลของโรงงานในปัจจุบัน จะมีขั้นตอนดังต่อไปนี้:

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมวัตถุดิบ (Material Preparation Process) ตรวจวิเคราะห์ (ค่าบrix ความเป็นกรด-ด่าง) และเตรียมวัตถุดิบซึ่งได้แก่ กากน้ำตาล (Molasses) ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน, น้ำปุ๋ย (Ammonium Sulfate) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำร้อน (Condensate water) ใช้ในการเจือจางกากน้ำตาลให้ได้ตามปริมาณที่คำนวณไว้ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด

ขั้นตอนที่ 2 การเพาะกล้าเชื้อ (Yeast Propagation Process) แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อย คือ 2.1 การเพาะเชื้อในถังสตาร์ทเตอร์ (Starter Tank) เพื่อเป็นการกระตุ้นเชื้อ และ 2.2 การเพิ่มปริมาณในถังเพาะเชื้อ (Propagation Tank) โดยทั้ง 2 ขั้นตอนจะเริ่มด้วยการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ กากน้ำตาล (Molasses) ที่มีการเจือจางด้วยน้ำร้อน (Condensate water) และเติมน้ำปุ๋ย (Ammonium Sulfate) สุดท้ายแล้ว กากน้ำตาลจะมีความเข้มข้นประมาณ 40 องศาบริกซ์ จากนั้นจึงเติมกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการ เข้าถังสตาร์ทเตอร์และถังเพาะเชื้อเมื่อเลี้ยงได้ปริมาณยีสต์ตามที่ต้องการ จึงถ่ายยีสต์ไปสู่ถังหมักเอทานอลต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 การหมัก (Fermentation Process) การหมักกากน้ำตาล เริ่มจากถ่ายยีสต์จากถังเพาะเชื้อ (Propagation Tank) เข้าสู่ถังหมัก(Fermentation Tank) ที่มีอาหารเหมือนในขั้นตอนที่ 2 และในขบวนการหมักนี้จะใช้เครื่องแลกเปลี่ยนความร้อน(Heat Exchanger) เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิ เมื่อหมักได้ปริมาณแอลกอฮอล์ตามต้องการ (เอทานอลที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8 - 9 ขึ้นอยู่กับคุณภาพของกากน้ำตาล) ยีสต์จะจับตัวเป็นก้อนและตกตะกอนลงไปที่ก้นถัง ซึ่งจะทำให้สามารถแยกส่วนของน้ำหมักซึ่งส่วนใหญ่ใสออกจากตะกอนยีสต์ได้ เพื่อไปเก็บไว้ในถังพัก (Storage Tank) เพื่อนำส่งเข้าขบวนการกลั่นต่อไป

จากข้อมูลในส่วนของโรงงานเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าโรงงานผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จะไม่มีกระบวนการ pre-treatment สารละลายกากน้ำตาลก่อนเข้าสู่การผลิตเอทานอล

15. เปรียบเทียบต้นทุนในการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วัตถุดิบ	หน่วย	ปริมาณที่ใช้		ราคา (บาท)	
				ไม่ผ่านการ pre-treatment	ผ่านการ pre-treatment
กากน้ำตาล	กรัม	1,510		10.50	10.50
ยูเรีย	กรัม	6.75		8.31	8.31
กรดซัลฟิวริก 0.5 โมลาร์	มล.	11	54.5	0.048	0.24
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์	มล.	-	2	0	0.225
ค่าไฟฟ้า + ภาษี 7%	Unit	48.24		59.21	59.21
รวม				78.07	78.49

จากตารางข้างต้นจะเห็นได้ว่า ต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ผ่านการ pre-treatment เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตจากกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการ pre-treatment มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นเพียงร้อยละ 0.54 ในขณะที่การ pre-treatment กากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลทำให้เอทานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 (ตารางภาคผนวกที่ 6)

บรรณานุกรม

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2563. ข้อมูลโรงงานผลิตเอทานอล ปี 2559. แหล่งที่มา: http://www.dede.go.th/dede/index.php?option=com_content&view=article&id=902%3A, 18 มกราคม 2560.
- ชุติมา ศรีจิว. 2548. การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ทนอุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปริญญาศ์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปาวลี ศรีสุขสมวงศ์. 2550. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา พลาเทนซิส ซีเอ็มยู2 ด้วยน้ำกากส่าเหล้าในระบบบ่อเพาะเลี้ยงน้ำวน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุทธศักดิ์ คณาวิสัย. 2549. การพัฒนาเทคโนโลยีด้านเอทานอล. ว.ส่งเสริมการลงทุน. 17(5): 34-38.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อสารกรุงเทพ. กรุงเทพฯ.
- สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. การปรับสภาพวัตถุดิบพวกกลีโคเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22: 641-649.
- สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย. 2560. โรงงานผลิตเอทานอล. แหล่งที่มา: <http://www.thaiethanol.com>, 18 มกราคม พ.ศ. 2560.
- สิริวุทธิ์ เสียมภักดี. 2545. การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล. แหล่งที่มา: <http://www.vcharkarn.com/varticle/38199>, 18 มกราคม พ.ศ. 2560.
- สาวตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

- Anonymous. 1994. **Methods Book (1994) with First Supplement (1998)**. International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. ICUMSA, Norwich, England.
- . 2000. **Official methods of analysis of AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International (17th ed.)**. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Aguilera, F., R.A. Peinado, C. Millán, J.M. Ortega and J.C. Mauricio. 2006. Relationship between Ethanol Tolerance, H⁺-Atpase Activity and the Lipid Composition of the Plasma Membrane in Different Wine Yeast Strains. **International Journal of Food Microbiology**. 110 (1): 34-42.
- Alexandre, H., V. Ansanay-Galeote, S. Dequin and B. Blondin. 2001. Global Gene Expression During Short-Term Ethanol Stress in *Saccharomyces Cerevisiae*. **FEBS Letters**. 498 (1): 98-103.
- Bely, M., A. Rinaldi and D. Dubourdieu. 2003. Influence of Assimilable Nitrogen on Volatile Acidity Production by *Saccharomyces Cerevisiae* During High Sugar Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 96 (6): 507-512.
- Bose, J., O. Babourina and Z. Rengel. 2011. Role of Magnesium in Alleviation of Aluminium Toxicity in Plants. **Journal of Experimental Botany**. 62 (7): 2251-2264.
- Breisha, G.Z. 2010. Production of 16% Ethanol from 35% Sucrose. **Biomass and Bioenergy**. 34 (8): 1243-1249.
- Chotineeranat, S., R. Wansuksri, K. Piyachomkwan, P. Chatakanonda, P. Weerathaworn and K. Sriroth. 2010. Effect of Calcium Ions on Ethanol Production from Molasses by *Saccharomyces Cerevisiae*. **Sugar Tech**. 12 (2): 120-124.
- Cot, M., M.-O. Loret, J. François and L. Benbadis. 2006. Physiological Behaviour of *Saccharomyces Cerevisiae* in Aerated Fed-Batch Fermentation for High Level Production of Bioethanol. **FEMS Yeast Research**. 7 (1): 22-32.

- Gnansounou, E. and A Dauriat. 2005. Ethanol fuel from biomass: A review. **J. Sci. Ind. Res.** 64: 822-831.
- Horton, H. R., L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn and K. G. Scrimgeour. 2002. **Principle of Biochemistry**. 3rd ed. Prentice-Hall, Inc., USA.
- Jones RP, Greenfield PF. 1987. **Ethanol toxicity and response**. In: Brewing Science and Practice Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA and Stevens R, Woodhead Cambridge, UK.
- Kotarska, K., B. Czuprynski and G. Kłosowski. 2006. Effect of Various Activators on the Course of Alcoholic Fermentation. **Journal of Food Engineering**. 77 (4): 965-971.
- Kumar, S., N. Singh and R. Prasad. 2010. Anhydrous Ethanol: A Renewable Source of Energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 14 (7): 1830-1844.
- Kurtzman, C.P. and J.W. Fell. 2006. **Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology**, pp. 11-30. In G. Péter and C. Rosa. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Limtong, S., C. Sringiew and W. Yongmanitchai. 2007. Production of Fuel Ethanol at High Temperature from Sugar Cane Juice by a Newly Isolated *Kluyveromyces Marxianus*. **Bioresource Technology**. 98 (17): 3367-3374.
- Manginot, C., J.L. Roustan and J.M. Sablayrolles. 1998. Nitrogen Demand of Different Yeast Strains During Alcoholic Fermentation. Importance of the Stationary Phase. **Enzyme and Microbial Technology**. 23 (7-8): 511-517.
- Murphy, J.D. and K. McCarthy. 2005. The Optimal Production of Biogas for Use as a Transport Fuel in Ireland. **Renewable Energy**. 30 (14): 2111-2127.
- Nguyen, T.L.T. and S.H. Gheewala. 2008. Fuel Ethanol from Cane Molasses in Thailand: Environmental and Cost Performance. **Energy Policy**. 36 (5): 1589-1599.

- Osho, A. 2005. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. **Afr. J. Biotechnol.** 4: 660-662.
- Papong, S. and P. Malakul. 2010. Life-Cycle Energy and Environmental Analysis of Bioethanol Production from Cassava in Thailand. **Bioresource Technology.** 101 (1, Supplement): S112-S118.
- Patrascu, E., G. Rapeanu and T. Hopulele. 2009. Current Approaches to Efficient Biotechnological Production of Ethanol. **Innovative Romanian Food Biotechnology.** 4 1-11.
- Pramanik, K. 2003. Parametric Studies on Batch Alcohol Fermentation Using *Saccharomyces* Yeast Extracted from Toddy. **J. Chin Inst. of Cheml Engrs.** 34: 487-492.
- Roehr, M. 2001. **The biotechnology of ethanol: Classical and Future Application.** Wiley-Vch: Weinheim-New York-Chichester-Brisbane-Singapore-Toronto.
- Rose, A. H. 1993. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **J. Appl. Bact. Symposium Supplement.** 74: 110-118.
- Santos, J., M.J. Sousa, H. Cardoso, J. Inácio, S. Silva, I. Spencer-Martins and C. Leão. 2008. Ethanol Tolerance of Sugar Transport, and the Rectification of Stuck Wine Fermentations. **Microbiology.** 154 (2): 422-430.
- Smart, K. 2000. **Brewing Yeast Fermentation Performance.** 2nd ed. Oxford: Oxford Bookes University.
- Silalertruksa, T. and S.H. Gheewala. 2009. Environmental Sustainability Assessment of Bio-Ethanol Production in Thailand. **Energy.** 34 (11): 1933-1946.

- Shang, F., S. Wen, X. Wang and T. Tan. 2006. High-Cell-Density Fermentation for Ergosterol Production by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101 (1): 38-41.
- Shankar, T. P. Thangamathi, R. Rama and T. Sivakumar. 2014. Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 170. **African Journal of Microbiology Research**. 8(13): 1385-1393.
- Thatipamala, R, S. Rohani and G. A. Hill. 1992. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentations. **Biotechnol. Bioeng.** 40: 289-297.
- Walker, G.M. 1994. The Roles of Magnesium in Biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**. 14 (4): 311-354.
- , De Nicola R, Anthony S, Learmonth R. 2006. Yeast-metal interactions: impact on brewing and distilling fermentations. **J. Inst. Brew Dist.** 19-24.
- Wilkie, A.C., K.J. Riedesel and J.M. Owens. 2000. Stillage Characterization and Anaerobic Treatment of Ethanol Stillage from Conventional and Cellulosic Feedstocks. **Biomass and Bioenergy**. 19 (2): 63-102.
- Yilmaz, Y., C. Ilyas and I. Fatma. 2007. Mineral Composition and Total Phenolic Content of Pomegranate Molasses. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. 5 (4): 102-104.
- You, K. M., C. L. Rosenfield and D. C. Knipple. 2003. Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 1499-1503.
- Zhao, X.Q., C. Xue, X.M. Ge, W.J. Yuan, J.Y. Wang and F.W. Bai. 2009. Impact of Zinc Supplementation on the Improvement of Ethanol Tolerance and Yield of Self-

Flocculating Yeast in Continuous Ethanol Fermentation. **Journal of Biotechnology.**
139 (1): 55-60.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 คุณสมบัติของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาทำการทดลอง

เชื้อยีสต์	คุณสมบัติ
<i>S. cerevisiae</i> ^[1]	1. ทนต่อสภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลสูง และแอลกอฮอล์ที่สูงได้ (ทนต่อแอลกอฮอล์ได้สูงมากกว่า 23% โดยปริมาตร) 2. ทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 28-42 องศาเซลเซียส 3. ทนต่อสภาวะ กรด-ด่าง ได้ 3.5-5.5 4. ทนต่อสภาวะแรงดันออสโมติกที่สูงได้
<i>S. cerevisiae</i> ^[2]	1. ทนต่อสภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลสูง และแอลกอฮอล์ที่สูงได้ (ทนต่อแอลกอฮอล์ได้สูงมากกว่า 20% โดยปริมาตร) 2. ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 37 องศาเซลเซียส 3. ทนต่อสภาวะที่มีกรดอินทรีย์ที่สูงได้ดี
<i>S. cerevisiae</i> ^[3]	ยีสต์ทำขนมปัง (Baker yeast)

ตารางภาคผนวกที่ 2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในระหว่างการหมักเอทานอลภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 72 ชั่วโมง

ตารางภาคผนวกที่ 2.1 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอล ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)					
		แคลเซียมไอออน (%,w/v)		โพแทสเซียมไอออน (%,w/v)		แมกนีเซียมไอออน (%,w/v)	
		0.20	0.60	0.20	0.60	0.20	0.60
0	4.20×10^6	4.20×10^6	3.00×10^6	4.20×10^6	3.30×10^6	2.28×10^6	3.00×10^6
2	6.50×10^6	4.50×10^6	3.40×10^6	5.60×10^6	4.10×10^6	2.30×10^6	3.90×10^6
4	7.40×10^6	5.15×10^6	3.80×10^6	6.00×10^6	5.00×10^6	6.05×10^6	4.40×10^6
6	1.47×10^7	7.75×10^6	3.85×10^6	1.03×10^7	7.80×10^6	8.75×10^6	7.60×10^6

10	3.30×10^7	1.22×10^7	7.00×10^6	2.18×10^7	1.55×10^7	1.73×10^7	1.68×10^7
24	4.15×10^7	1.52×10^7	1.07×10^7	2.20×10^7	1.60×10^7	2.30×10^7	2.92×10^7
30	4.47×10^7	1.95×10^7	1.37×10^7	2.55×10^7	1.85×10^7	1.60×10^7	1.90×10^7
48	5.17×10^7	1.67×10^7	1.05×10^7	2.15×10^7	1.65×10^7	1.50×10^7	1.30×10^7
54	4.32×10^7	1.55×10^7	1.00×10^7	2.10×10^7	1.42×10^7	2.43×10^7	1.48×10^7
72	2.97×10^7	1.45×10^7	8.00×10^6	1.57×10^7	1.37×10^7	1.68×10^7	1.30×10^7

ตารางภาคผนวกที่ 2.2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[2] ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอล ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)						
	ชุดควบคุม	แคลเซียมไอออน (%,w/v)		โพแทสเซียมไอออน (%,w/v)		แมกนีเซียมไอออน (%,w/v)	
		0.20	0.60	0.20	0.60	0.20	0.60
0	2.90×10^6	2.85×10^6	3.00×10^6	2.85×10^6	2.80×10^6	2.55×10^6	2.45×10^6
2	3.60×10^6	3.00×10^6	3.40×10^6	3.10×10^6	3.05×10^6	2.65×10^6	3.00×10^6
4	5.90×10^6	4.25×10^6	3.80×10^6	4.50×10^6	4.35×10^6	4.55×10^6	5.15×10^6
6	7.10×10^7	6.00×10^6	3.85×10^6	6.85×10^6	7.50×10^6	8.00×10^6	7.75×10^6
10	1.45×10^7	1.10×10^7	8.75×10^6	1.43×10^7	1.23×10^7	1.90×10^7	1.20×10^7
24	2.38×10^7	2.10×10^7	1.07×10^7	2.10×10^7	1.25×10^7	2.58×10^7	1.53×10^7
30	3.28×10^7	2.98×10^7	1.37×10^7	3.08×10^7	1.38×10^7	2.98×10^7	2.53×10^7
48	2.98×10^7	2.73×10^7	1.05×10^7	2.78×10^7	1.50×10^7	3.13×10^7	2.80×10^7
54	2.78×10^7	2.53×10^7	1.00×10^7	2.63×10^7	1.28×10^7	2.20×10^7	2.10×10^7
72	2.30×10^7	1.83×10^7	8.00×10^6	2.18×10^7	1.83×10^7	2.05×10^7	1.83×10^7

ตารางภาคผนวกที่ 2.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[3] ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอล ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อน แคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)			
	ชุดควบคุม	แคลเซียมไอออน	โพแทสเซียมไอออน	แมกนีเซียมไอออน

	(%w/v)			(%w/v)		(%w/v)	
		0.20	0.60	0.20	0.60	0.20	0.60
0	2.15×10^6	2.05×10^6	2.10×10^6	2.25×10^6	2.55×10^6	2.45×10^6	2.05×10^6
2	3.30×10^6	3.10×10^6	2.75×10^6	2.85×10^6	2.65×10^6	3.05×10^6	2.60×10^6
4	4.75×10^6	3.90×10^6	2.80×10^6	4.35×10^6	4.65×10^6	7.20×10^6	4.30×10^6
6	5.20×10^6	4.00×10^6	3.00×10^6	4.80×10^6	4.75×10^6	1.38×10^7	5.55×10^6
10	1.08×10^7	4.75×10^6	3.50×10^6	5.25×10^6	5.25×10^6	1.93×10^7	1.45×10^7
24	1.25×10^7	8.75×10^6	8.25×10^6	1.00×10^7	1.25×10^7	4.18×10^7	2.43×10^7
30	2.40×10^7	1.23×10^7	8.25×10^6	1.75×10^7	1.53×10^7	4.23×10^7	2.60×10^7
48	3.10×10^7	1.10×10^7	6.50×10^6	1.53×10^7	1.78×10^7	4.55×10^7	2.80×10^7
54	2.58×10^7	1.00×10^7	6.25×10^6	1.50×10^7	1.45×10^7	2.83×10^7	2.68×10^7
72	2.13×10^7	9.75×10^6	6.00×10^6	1.28×10^7	1.05×10^7	2.78×10^7	2.08×10^7

ตารางภาคผนวกที่ 2.4 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5306 ในระหว่างกระบวนการหมัก เอทานอล ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)						
	ชุดควบคุม	แคลเซียมไอออน (%w/v)		โพแทสเซียมไอออน (%w/v)		แมกนีเซียมไอออน (%w/v)	
		0.20	0.60	0.20	0.60	0.20	0.60
0	1.10×10^6	1.00×10^6	1.00×10^6	1.00×10^6	1.00×10^6	1.05×10^6	1.00×10^6
2	1.10×10^6	1.00×10^6	1.00×10^6	1.00×10^6	1.00×10^6	1.15×10^6	1.05×10^6
4	1.65×10^6	1.05×10^6	1.00×10^6	1.60×10^6	1.30×10^6	1.65×10^6	1.15×10^6
6	3.65×10^6	1.75×10^6	1.05×10^6	2.75×10^6	2.35×10^6	3.65×10^6	2.15×10^6
10	8.75×10^6	2.85×10^6	1.50×10^6	7.25×10^6	5.50×10^6	1.18×10^7	8.75×10^6
24	1.55×10^7	4.80×10^6	1.80×10^6	1.23×10^7	1.15×10^7	1.48×10^7	1.43×10^7
30	2.05×10^7	7.80×10^6	1.80×10^6	1.58×10^7	1.15×10^7	1.73×10^7	2.08×10^7
48	2.40×10^7	8.25×10^6	2.15×10^6	2.13×10^7	1.18×10^7	2.25×10^7	2.10×10^7
54	2.43×10^7	8.00×10^6	1.30×10^6	1.68×10^7	1.10×10^7	3.13×10^7	2.18×10^7
72	2.23×10^7	4.25×10^6	1.20×10^6	1.38×10^7	1.08×10^7	2.83×10^7	2.18×10^7

ตารางภาคผนวกที่ 3 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทส ในการระหว่างหมักเอทานอลโดยเชื้อสายพันธุ์ต่าง ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ตารางภาคผนวกที่ 3.1 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมัก เอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	ชุด ควบคุม	แคลเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	แคลเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	แคลเซียมไอออน	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	12.7	12.5	11.5	3.1	3.7	4.3	2.8	3.5	4.1
2	10.2	10.2	9.3	4.5	4.9	5.4	4.1	4.6	5.1
4	8.2	7.5	7.5	5.6	6.0	6.3	5.2	5.7	5.9
6	5.7	5.0	5.5	9.0	7.2	7.2	6.3	6.8	6.9
10	1.5	2.2	2.6	4.9	8.0	7.4	7.8	8.0	7.7
24	0.2	0.8	2.3	1.8	4.4	6.9	6.0	7.5	8.8
30	0.2	0.7	2.3	0.6	2.7	5.6	4.6	6.4	8.4
48	0.2	0.8	2.4	0.0	0.2	2.4	0.1	3.1	6.5
54	0.1	0.8	2.3	0.0	0.0	1.7	0.0	1.8	5.6
72	0.1	0.8	2.4	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	3.9

ตารางภาคผนวกที่ 3.2 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของโพแทสเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	จุด ควบคุม	โพแทสเซียมไอออน		จุด ควบคุม	โพแทสเซียมไอออน		จุด ควบคุม	โพแทสเซียมไอออน	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	12.7	12.7	12.2	3.1	3.5	4.0	2.8	3.2	3.7
2	10.2	9.8	9.4	4.5	4.8	5.2	4.1	4.4	4.8
4	8.2	7.5	7.2	5.6	6.4	6.1	5.2	5.9	5.6
6	5.7	5.1	4.9	9.0	6.5	7.0	6.3	6.2	6.8
10	1.5	1.4	1.4	4.9	7.3	7.2	7.8	7.8	7.5
24	0.2	0.9	1.4	1.8	3.2	3.8	6.0	6.4	7.4
30	0.2	0.6	0.2	0.6	1.5	2.4	4.6	5.0	6.3
48	0.2	0.6	0.2	0.0	0.2	0.1	0.1	0.4	2.9
54	0.1	0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6
72	0.1	0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

ตารางภาคผนวกที่ 3.3 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	จุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน		จุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน		จุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	12.7	13.0	11.8	3.1	3.6	3.4	2.8	3.3	3.2
2	10.2	10.8	9.8	4.5	4.8	4.6	4.1	4.6	4.4
4	8.2	7.9	7.3	5.6	5.7	5.2	5.2	5.7	5.3
6	5.7	5.4	5.1	9.0	7.3	6.0	6.3	7.1	6.3
10	1.5	1.8	2.3	4.9	7.4	7.0	7.8	7.8	7.3
24	0.2	0.2	0.2	1.8	1.3	1.6	6.0	5.2	5.2

30	0.2	0.2	0.2	0.6	0.5	0.6	4.6	3.8	4.0
48	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3	0.3
54	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2
72	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1

ตารางภาคผนวกที่ 3.4 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[2] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อน แคลเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	ชุด ควบคุม	แคลเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	แคลเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	แคลเซียมไอออน	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	14.5	14.9	14.3	3.4	3.3	3.2	2.4	3.0	3.0
2	12.6	12.8	13.6	3.8	3.6	3.6	3.8	3.5	3.6
4	9.3	11.7	12.9	4.8	4.0	4.1	5.4	4.7	4.1
6	6.1	8.7	9.6	6.6	4.8	4.5	6.6	5.0	4.5
10	2.2	5.3	6.4	7.3	7.1	7.0	7.5	5.7	5.4
24	0.4	2.9	3.4	3.6	4.8	5.6	5.9	7.0	6.7
30	0.3	2.2	2.8	1.5	3.8	4.7	4.8	6.0	6.4
48	0.1	0.8	2.2	0.3	0.6	1.8	0.2	3.4	4.3
54	0.1	0.8	2.2	0.1	0.5	1.2	0.1	1.5	3.2
72	0.1	0.7	2.1	0.1	0.3	1.1	0.1	1.3	2.8

ตารางภาคผนวกที่ 3.5 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[2] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของโพแทสเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	ชุด ควบคุม	โพแทสเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	โพแทสเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	โพแทสเซียมไอออน	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)

		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	14.5	14.3	14.6	3.4	3.5	3.9	2.4	3.7	2.6
2	12.6	12.3	12.4	3.8	3.9	3.9	3.8	3.7	3.0
4	9.3	10.1	10.4	4.8	4.9	4.8	5.4	4.4	4.0
6	6.1	9.7	7.8	6.6	5.6	6.0	6.6	4.4	5.2
10	2.2	4.3	4.6	7.3	7.2	7.3	7.5	7.0	7.6
24	0.4	1.7	1.9	3.6	4.2	4.5	5.9	7.1	7.3
30	0.3	0.8	1.0	1.5	2.9	3.1	4.8	6.2	6.2
48	0.1	0.4	0.5	0.3	0.4	0.8	0.2	1.8	2.0
54	0.1	0.4	0.4	0.1	0.2	0.6	0.1	1.5	2.0
72	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	1.1	1.2

ตารางภาคผนวกที่ 3.6 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[2] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุคโทส (%,w/v)		
	จุด ควบคู่	แมกนีเซียมไอออน		จุด ควบคู่	แมกนีเซียมไอออน		จุด ควบคู่	แมกนีเซียมไอออน	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	14.5	15.0	15.9	3.4	3.2	2.2	2.4	3.0	2.2
2	12.6	13.6	14.9	3.8	3.4	2.8	3.8	3.2	2.6
4	9.3	11.7	13.5	4.8	3.7	3.1	5.4	3.6	3.0
6	6.1	10.8	12.6	6.6	4.3	3.7	6.6	4.0	3.3
10	2.2	3.0	7.6	7.3	7.3	6.5	7.5	7.9	7.1
24	0.4	0.4	0.9	3.6	2.0	4.4	5.9	6.4	6.7
30	0.3	0.3	0.7	1.5	0.8	3.0	4.8	5.3	6.2
48	0.1	0.1	0.2	0.3	0.0	1.1	0.2	1.0	1.1
54	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.7	0.1	0.2	0.7
72	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.6	0.1	0.1	0.9

ตารางภาคผนวกที่ 3.7 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[3] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	ชุด ควบคุม	แคลเซียมไฮดรอกไซด์		ชุด ควบคุม	แคลเซียมไฮดรอกไซด์		ชุด ควบคุม	แคลเซียมไฮดรอกไซด์	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	14.9	15.7	15.7	3.9	3.3	3.2	2.4	2.5	2.6
2	14.6	15.4	15.7	3.9	3.5	3.4	2.7	2.8	2.9
4	13.6	15.1	15.6	3.9	3.5	3.4	3.1	3.0	3.2
6	12.8	14.3	14.8	4.2	3.8	4.0	3.4	3.3	3.4
10	12.0	13.5	14.6	4.4	4.3	4.0	4.0	3.7	3.5
24	9.7	10.3	14.0	4.4	4.1	4.1	4.6	4.2	3.6
30	7.3	9.1	12.3	3.7	4.1	4.1	4.4	4.3	3.7
48	3.6	5.4	8.6	2.5	3.3	5.0	4.0	4.9	6.0
54	3.8	4.1	6.3	2.6	3.7	5.2	3.6	5.4	6.3
72	1.4	3.4	5.1	1.9	3.6	5.9	3.1	4.1	7.0

ตารางภาคผนวกที่ 3.8 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[3] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	ชุด ควบคุม	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์		ชุด ควบคุม	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์		ชุด ควบคุม	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	14.9	15.0	15.6	3.9	3.2	3.3	2.4	3.1	3.4
2	14.6	14.8	15.0	3.9	3.4	3.7	2.7	3.3	3.6
4	13.6	13.6	14.1	3.9	3.6	3.7	3.1	3.6	4.1
6	12.8	13.0	13.5	4.2	3.6	4.0	3.4	3.7	4.5

10	12.0	12.1	12.4	4.4	3.3	4.1	4.0	3.9	4.6
24	9.7	9.8	10.6	4.4	3.7	4.2	4.6	4.4	4.7
30	7.3	7.3	8.4	3.7	3.7	3.9	4.4	4.6	4.8
48	3.6	3.6	4.3	2.5	3.6	3.5	4.0	4.7	4.5
54	3.8	3.8	4.3	2.6	3.3	3.6	3.6	4.0	4.2
72	1.4	1.6	2.3	1.9	2.6	2.0	3.1	3.6	3.8

ตารางภาคผนวกที่ 3.9 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[3] ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	ชุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	14.9	14.7	14.9	3.9	3.8	3.8	2.4	3.5	4.0
2	14.6	14.6	14.4	3.9	3.6	3.6	2.7	3.3	4.5
4	13.6	13.5	13.1	3.9	4.2	4.1	3.1	3.7	4.6
6	12.8	12.6	12.6	4.2	4.3	4.4	3.4	4.0	4.6
10	12.0	11.7	10.5	4.4	3.4	4.6	4.0	3.8	4.8
24	9.7	4.4	6.7	4.4	1.2	1.7	4.6	1.5	2.7
30	7.3	2.2	4.7	3.7	0.6	1.1	4.4	1.0	1.5
48	3.6	0.3	2.1	2.5	0.1	0.7	4.0	0.3	1.0
54	3.8	0.4	2.7	2.6	0.1	0.5	3.6	0.2	0.9
72	1.4	0.3	1.4	1.9	0.1	0.6	3.1	0.1	0.8

ตารางภาคผนวกที่ 3.10 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5306 ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)		น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)		น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)	
	ชุด	แคลเซียมไอออน	ชุด	แคลเซียมไอออน	ชุด	แคลเซียมไอออน

	ควบคุม	0.20	0.60	ควบคุม	0.20	0.60	ควบคุม	0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	15.1	15.4	15.2	3.3	3.3	3.5	2.3	2.3	2.4
2	15.1	15.3	15.2	3.2	3.2	3.4	2.4	2.2	2.4
4	15.0	15.2	15.2	2.9	3.0	3.3	2.2	2.2	2.4
6	14.8	15.0	15.2	1.8	2.7	3.3	2.1	2.0	2.3
10	14.8	14.9	15.2	1.6	2.7	3.2	2.0	2.0	2.3
24	14.5	14.9	15.1	1.0	2.6	3.2	1.6	1.9	2.3
30	14.4	14.8	15.1	0.6	2.2	3.2	1.2	1.9	2.6
48	14.4	14.8	15.1	0.2	0.9	3.0	0.3	1.1	2.5
54	14.4	14.7	15.1	0.1	0.5	2.8	0.2	0.9	2.5
72	14.3	14.6	15.1	0.1	0.1	2.0	0.2	0.7	1.9

ตารางภาคผนวกที่ 3.11 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5306 ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนโพแทสเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุกโทส (%,w/v)		
	โพแทสเซียมไอออน			โพแทสเซียมไอออน			โพแทสเซียมไอออน		
	จุด ควบคุม	0.20	0.60	จุด ควบคุม	0.20	0.60	จุด ควบคุม	0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	15.1	15.2	15.4	3.3	3.6	3.3	2.3	2.9	2.7
2	15.1	15.1	15.4	3.2	3.6	3.2	2.4	2.9	2.7
4	15.0	15.1	15.3	2.9	3.5	3.1	2.2	2.9	2.7
6	14.8	15.0	15.3	1.8	2.8	2.9	2.1	2.3	2.9
10	14.8	15.0	15.3	1.6	2.8	2.8	2.0	2.6	2.7
24	14.5	15.0	15.3	1.0	1.7	1.3	1.6	2.0	1.9
30	14.4	14.6	15.2	0.6	1.2	0.8	1.2	1.9	1.4
48	14.4	14.5	15.2	0.2	0.3	0.4	0.3	0.4	0.1
54	14.4	14.5	15.0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1
72	14.3	14.5	14.9	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1

ตารางภาคผนวกที่ 3.12 ปริมาณน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโทส ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5306 ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 และ 0.60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	น้ำตาลซูโครส (%,w/v)			น้ำตาลกลูโคส (%,w/v)			น้ำตาลฟรุคโทส (%,w/v)		
	ชุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน		ชุด ควบคุม	แมกนีเซียมไอออน	
		0.20	0.60		0.20	0.60		0.20	0.60
		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)		(%,w/v)	(%,w/v)
0	15.1	14.5	14.8	3.3	3.2	3.9	2.3	3.2	3.7
2	15.1	14.4	14.7	3.2	3.2	3.8	2.4	3.1	3.3
4	15.0	14.3	14.7	2.9	2.7	3.1	2.2	3.0	3.4
6	14.8	14.2	14.6	1.8	1.5	1.8	2.1	2.6	3.0
10	14.8	14.2	14.4	1.6	0.9	1.3	2.0	2.1	1.7
24	14.5	14.2	14.4	1.0	0.2	0.6	1.6	0.2	1.4
30	14.4	14.0	14.2	0.6	0.2	0.2	1.2	0.2	0.2
48	14.4	13.8	14.0	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
54	14.4	13.7	13.9	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
72	14.3	13.2	13.6	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส และเอทานอล ในระหว่างการผลิตเอทานอลที่มีการปนเปื้อนโอออนในสัดส่วนที่แตกต่างกันโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับฟลasks

การทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ ที่มีชีวิต (เซลล์/มล.)	น้ำตาลซูโครส	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุกโทส	น้ำตาลทั้งหมดใน รูปน้ำตาลอินเวิร์ท	เอทานอล
			%, w/v				
ชุดควบคุม	0	3.70×10^6	15.77 ± 0.03	3.59 ± 0.07	3.10 ± 0.14	23.26 ± 0.25	0.01 ± 0.00
	2	4.30×10^6	14.67 ± 0.51	4.28 ± 0.36	3.54 ± 0.05	23.21 ± 0.85	0.02 ± 0.00
	4	5.60×10^6	12.03 ± 0.14	5.58 ± 0.35	4.84 ± 0.14	23.04 ± 0.64	0.04 ± 0.01
	6	9.00×10^7	7.88 ± 0.39	6.21 ± 0.14	5.52 ± 0.07	20.01 ± 0.62	0.12 ± 0.00
	24	3.15×10^7	0.30 ± 0.00	4.12 ± 0.02	4.60 ± 0.10	9.04 ± 0.08	2.35 ± 0.12
	30	3.00×10^7	0.10 ± 0.00	1.91 ± 0.03	2.37 ± 0.01	4.38 ± 0.04	3.34 ± 0.02
	48	3.10×10^7	0.02 ± 0.00	0.47 ± 0.01	0.80 ± 0.00	1.29 ± 0.02	8.47 ± 0.01
	54	3.30×10^7	0.02 ± 0.00	0.40 ± 0.02	0.77 ± 0.01	1.20 ± 0.03	8.25 ± 0.08
	72	4.40×10^7	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.61 ± 0.01	0.68 ± 0.01	8.34 ± 0.06
แคลเซียม: โพแทสเซียม (0.20:0.60)	0	3.80×10^6	14.37 ± 0.15	3.98 ± 0.72	4.04 ± 0.06	23.11 ± 0.50	0.01 ± 0.00
	2	3.90×10^6	12.07 ± 0.24	5.17 ± 0.75	4.97 ± 0.00	22.81 ± 0.50	0.01 ± 0.00
	4	3.70×10^6	11.20 ± 0.07	5.71 ± 0.51	5.33 ± 0.10	22.80 ± 0.54	0.02 ± 0.00
	6	4.05×10^6	8.35 ± 0.05	7.06 ± 0.42	6.47 ± 0.09	22.30 ± 0.57	0.03 ± 0.00
	24	4.55×10^6	1.33 ± 0.01	9.28 ± 0.00	9.35 ± 0.04	20.03 ± 0.05	0.33 ± 0.00
	30	1.18×10^7	0.76 ± 0.02	9.11 ± 0.22	9.58 ± 0.16	19.49 ± 0.36	0.55 ± 0.02
	48	1.45×10^7	0.35 ± 0.02	6.69 ± 0.00	8.96 ± 0.06	16.03 ± 0.08	1.51 ± 0.08
	54	1.85×10^7	0.34 ± 0.01	5.96 ± 0.05	8.83 ± 0.12	15.15 ± 0.18	1.83 ± 0.13
	72	1.88×10^7	0.22 ± 0.01	3.64 ± 0.00	7.69 ± 0.03	11.56 ± 0.04	2.78 ± 0.14
แคลเซียม: แมกนีเซียม (0.20:0.07)	0	3.60×10^6	14.46 ± 0.12	4.13 ± 0.45	3.87 ± 0.07	23.18 ± 0.65	0.01 ± 0.00
	2	3.60×10^6	12.43 ± 0.01	5.41 ± 0.38	4.51 ± 0.04	22.97 ± 0.40	0.02 ± 0.00
	4	3.15×10^6	11.04 ± 0.04	5.73 ± 0.42	5.35 ± 0.04	22.67 ± 0.33	0.02 ± 0.00
	6	7.70×10^6	8.14 ± 0.24	6.96 ± 0.09	6.44 ± 0.19	21.96 ± 0.15	0.10 ± 0.00
	24	3.33×10^7	0.30 ± 0.02	3.15 ± 0.38	7.33 ± 0.13	10.79 ± 0.53	3.66 ± 0.09
	30	4.40×10^7	0.23 ± 0.02	1.56 ± 0.39	6.14 ± 0.29	7.94 ± 0.70	4.65 ± 0.03
	48	4.15×10^7	0.21 ± 0.04	0.13 ± 0.01	1.84 ± 0.77	2.19 ± 0.82	6.87 ± 0.60
	54	3.90×10^7	0.13 ± 0.06	0.02 ± 0.01	0.87 ± 0.67	1.03 ± 0.74	7.12 ± 0.25
	72	4.10×10^7	0.15 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.03	0.22 ± 0.02	7.20 ± 0.15

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส และเอทานอล ในระหว่างการผลิตเอทานอลที่มีการปนเปื้อนโอออนในสัดส่วนที่ต่างกัน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับฟลาสก์ (ต่อ)

การทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ ที่มีชีวิต (เซลล์/มล.)	น้ำตาลซูโครส	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุกโทส	น้ำตาลทั้งหมดใน รูปน้ำตาลอินเวิร์ท	เอทานอล
			%, w/v				
โพแทสเซียม: แมกนีเซียม (0.60:0.07)	0	3.65×10^6	14.88 ± 0.01	4.24 ± 0.17	3.77 ± 0.18	23.64 ± 0.36	0.01 ± 0.00
	2	3.85×10^6	13.41 ± 0.13	4.60 ± 0.16	4.32 ± 0.40	23.00 ± 0.69	0.02 ± 0.00
	4	3.95×10^6	11.08 ± 0.20	5.77 ± 0.10	5.10 ± 0.13	22.50 ± 0.02	0.03 ± 0.00
	6	9.45×10^6	8.20 ± 0.27	7.09 ± 0.24	6.45 ± 0.29	22.14 ± 0.25	0.14 ± 0.00
	24	3.40×10^7	0.32 ± 0.01	2.37 ± 0.36	6.80 ± 0.23	9.51 ± 0.60	3.92 ± 0.21
	30	4.45×10^7	0.23 ± 0.01	0.75 ± 0.32	5.12 ± 0.48	6.11 ± 0.82	5.03 ± 0.25
	48	4.50×10^7	0.25 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.99 ± 0.07	6.78 ± 0.20
	54	4.55×10^7	0.19 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.20 ± 0.05	0.44 ± 0.07	6.95 ± 0.05
72	4.45×10^7	0.23 ± 0.01	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.30 ± 0.02	6.91 ± 0.24	
แคลเซียม: โพแทสเซียม: แมกนีเซียม (0.20:0.60:0.07)	0	3.55×10^6	14.20 ± 0.08	4.57 ± 0.15	4.05 ± 0.17	23.53 ± 0.23	0.01 ± 0.00
	2	3.75×10^6	12.23 ± 0.31	5.06 ± 0.14	4.40 ± 0.20	22.29 ± 0.39	0.02 ± 0.00
	4	4.10×10^6	10.65 ± 0.01	5.95 ± 0.04	5.42 ± 0.30	22.55 ± 0.33	0.03 ± 0.00
	6	7.90×10^6	7.73 ± 0.52	7.26 ± 0.04	6.58 ± 0.13	21.96 ± 0.38	0.12 ± 0.00
	24	4.10×10^7	0.31 ± 0.02	3.43 ± 0.64	7.44 ± 0.53	11.21 ± 0.18	3.23 ± 0.19
	30	3.20×10^7	0.22 ± 0.01	1.80 ± 0.55	6.35 ± 0.38	8.39 ± 0.94	4.16 ± 0.20
	48	3.50×10^7	0.23 ± 0.02	0.16 ± 0.06	2.44 ± 0.51	2.85 ± 0.09	6.06 ± 0.31
	54	3.70×10^7	0.18 ± 0.00	0.04 ± 0.03	1.44 ± 0.98	1.68 ± 0.50	6.47 ± 0.13
72	4.20×10^7	0.21 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.37 ± 0.28	0.64 ± 0.28	6.73 ± 0.18	

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส และเอทานอล ในระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับพลาสติก

การทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/มล.)	น้ำตาลซูโครส	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุกโทส	น้ำตาลทั้งหมดในรูปน้ำตาลอินเวิร์ท	เอทานอล
			%, w/v				
No pretreatment	0	3.70×10^6	9.26 ± 1.48	7.77 ± 1.50	5.91 ± 0.01	23.40 ± 0.06	0.10 ± 0.00
	2	3.90×10^6	9.29 ± 0.36	7.01 ± 0.20	6.44 ± 0.10	23.20 ± 0.48	0.14 ± 0.00
	4	4.65×10^6	8.62 ± 0.24	6.69 ± 0.03	7.13 ± 0.04	22.87 ± 0.27	0.14 ± 0.00
	6	1.00×10^7	8.32 ± 0.03	6.89 ± 0.23	6.98 ± 0.29	22.61 ± 0.48	0.14 ± 0.00
	24	3.35×10^7	3.87 ± 0.43	6.66 ± 0.04	9.43 ± 0.14	20.14 ± 0.56	1.90 ± 0.16
	30	6.48×10^7	2.36 ± 0.19	5.38 ± 0.12	9.43 ± 0.71	17.29 ± 0.64	3.74 ± 0.24
	48	6.45×10^7	0.76 ± 0.05	1.57 ± 0.23	5.85 ± 0.31	8.22 ± 0.48	6.84 ± 0.13
	54	7.50×10^7	0.70 ± 0.01	1.12 ± 0.22	4.74 ± 0.71	6.60 ± 0.92	7.66 ± 0.10
	72	6.55×10^7	0.64 ± 0.01	0.65 ± 0.13	0.25 ± 0.01	1.56 ± 0.13	8.18 ± 0.92
Pretreatment pH 4.0	0	3.65×10^6	8.14 ± 0.02	6.32 ± 0.00	8.55 ± 0.00	23.42 ± 0.03	0.06 ± 0.00
	2	4.90×10^6	7.68 ± 0.01	6.21 ± 0.35	8.66 ± 0.07	22.94 ± 0.41	0.07 ± 0.03
	4	5.35×10^6	4.32 ± 0.02	6.76 ± 0.00	8.79 ± 0.27	20.09 ± 0.29	0.09 ± 0.00
	6	1.04×10^7	2.71 ± 0.02	6.82 ± 0.00	9.01 ± 0.01	18.68 ± 0.02	0.16 ± 0.00
	24	2.70×10^7	0.97 ± 0.01	6.00 ± 0.11	7.93 ± 0.18	14.95 ± 0.06	2.63 ± 0.05
	30	2.73×10^7	0.89 ± 0.02	3.10 ± 0.09	4.86 ± 0.04	8.89 ± 0.02	4.36 ± 0.12
	48	4.50×10^7	0.22 ± 0.01	0.84 ± 0.02	1.85 ± 0.02	2.93 ± 0.02	6.97 ± 0.01
	54	5.80×10^7	0.22 ± 0.02	0.77 ± 0.02	1.82 ± 0.01	2.82 ± 0.00	7.75 ± 0.02
	72	7.18×10^7	0.01 ± 0.00	0.30 ± 0.00	1.47 ± 0.00	1.78 ± 0.00	8.70 ± 0.28

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส และเอทานอล ในระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับพลาสติก (ต่อ)

การทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ ที่มีชีวิต (เซลล์/มล.)	น้ำตาลซูโครส	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุกโทส	น้ำตาลทั้งหมดใน รูปน้ำตาลอินเวิร์ท	เอทานอล
			%, w/v				
Add Ca 1.8% (w/v)	0	3.50×10^6	7.63 ± 0.04	6.73 ± 0.02	6.83 ± 0.32	21.57 ± 0.29	0.03 ± 0.00
	2	4.20×10^6	7.43 ± 0.11	6.72 ± 0.16	6.83 ± 0.07	21.35 ± 0.20	0.03 ± 0.00
	4	4.45×10^6	7.24 ± 0.04	6.79 ± 0.25	6.94 ± 0.21	21.34 ± 0.41	0.03 ± 0.00
	6	4.50×10^6	7.06 ± 0.02	6.87 ± 0.19	7.02 ± 0.35	21.30 ± 0.52	0.05 ± 0.00
	24	5.00×10^6	6.48 ± 0.03	6.40 ± 0.06	7.48 ± 0.27	20.69 ± 0.18	0.14 ± 0.00
	30	5.10×10^6	6.37 ± 0.06	6.29 ± 0.04	7.62 ± 0.27	20.60 ± 0.16	0.15 ± 0.00
	48	4.50×10^6	6.01 ± 0.02	5.99 ± 0.19	8.13 ± 0.14	20.44 ± 0.03	0.17 ± 0.02
	54	5.50×10^6	5.94 ± 0.14	5.31 ± 0.13	8.36 ± 0.20	19.91 ± 0.17	0.20 ± 0.01
	72	5.70×10^6	5.48 ± 0.02	5.21 ± 0.05	8.64 ± 0.26	19.61 ± 0.33	0.20 ± 0.01
Add Ca 3% (w/v)	0	3.55×10^6	5.07 ± 0.05	7.29 ± 0.50	7.07 ± 0.50	20.31 ± 0.06	0.09 ± 0.00
	2	4.20×10^6	4.93 ± 0.17	7.06 ± 0.02	7.91 ± 0.10	20.14 ± 0.06	0.11 ± 0.00
	4	4.40×10^6	4.64 ± 0.15	7.40 ± 0.05	8.04 ± 0.24	20.31 ± 0.03	0.10 ± 0.01
	6	4.80×10^6	4.05 ± 0.03	7.48 ± 0.00	8.38 ± 0.00	20.12 ± 0.03	0.10 ± 0.00
	24	4.90×10^6	3.35 ± 0.19	8.41 ± 0.06	7.66 ± 0.06	19.59 ± 0.19	0.15 ± 0.00
	30	5.30×10^6	2.89 ± 0.07	7.45 ± 0.12	9.03 ± 0.44	19.51 ± 0.17	0.14 ± 0.00
	48	5.20×10^6	3.79 ± 0.07	5.70 ± 0.25	9.62 ± 0.25	19.29 ± 0.08	0.14 ± 0.01
	54	5.20×10^6	2.50 ± 0.00	6.89 ± 0.09	9.85 ± 0.13	19.37 ± 0.04	0.14 ± 0.01
	72	5.20×10^6	2.52 ± 0.02	6.28 ± 0.14	10.40 ± 0.10	19.32 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Add Ca 6% (w/v)	0	3.60×10^6	4.66 ± 0.00	7.28 ± 0.00	8.07 ± 0.00	20.24 ± 0.00	0.09 ± 0.00
	2	4.70×10^6	4.74 ± 0.02	8.47 ± 0.01	8.34 ± 0.01	21.79 ± 0.04	0.25 ± 0.02
	4	6.50×10^6	4.61 ± 0.00	8.58 ± 0.01	8.40 ± 0.00	21.83 ± 0.01	0.19 ± 0.08
	6	4.90×10^6	4.61 ± 0.00	8.64 ± 0.01	8.67 ± 0.01	22.15 ± 0.02	0.20 ± 0.04
	24	5.00×10^6	3.55 ± 0.05	8.09 ± 0.00	8.65 ± 0.02	20.47 ± 0.08	0.15 ± 0.00
	30	5.00×10^6	3.55 ± 0.02	7.01 ± 0.00	9.13 ± 0.00	19.86 ± 0.01	0.14 ± 0.00
	48	4.30×10^6	3.11 ± 0.01	6.93 ± 0.01	9.43 ± 0.01	19.62 ± 0.01	0.13 ± 0.00
	54	5.30×10^6	2.94 ± 0.01	6.90 ± 0.00	9.35 ± 0.00	19.33 ± 0.01	0.12 ± 0.00
	72	5.10×10^6	2.65 ± 0.02	6.84 ± 0.02	9.82 ± 0.01	19.45 ± 0.00	0.12 ± 0.00

ตารางภาคผนวกที่ 6 การเปลี่ยนแปลงเอทานอล ในระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ไม่ผ่าน และผ่านการ pre-treatment โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับถึงหมัก

เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (% , w/v)	
	Non- pretreatment	Pre-treatment
0	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00
2	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
4	0.07 ± 0.00	0.05 ± 0.00
6	0.13 ± 0.01	0.10 ± 0.00
24	1.56 ± 0.02	2.36 ± 0.01
30	4.45 ± 0.08	4.12 ± 0.12
48	6.04 ± 0.17	6.99 ± 0.09
54	8.11 ± 0.12	8.56 ± 0.18
72	8.10 ± 0.05	9.15 ± 0.14

ตารางภาคผนวกที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส และเอทานอล ในระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแคลเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*^[1] ในระดับถึงหมัก

การทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ ที่มีชีวิต (เซลล์/มล.)	น้ำตาลซูโครส	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุกโทส	น้ำตาลทั้งหมดใน รูปน้ำตาลอินเวิร์ท	เอทานอล
			%, w/v				
5 L	0	3.55×10^6	8.24 ± 0.08	6.81 ± 0.17	8.72 ± 0.02	24.18 ± 0.28	0.06 ± 0.00
	2	4.80×10^6	7.74 ± 0.09	6.90 ± 0.15	8.86 ± 0.01	23.89 ± 0.02	0.05 ± 0.00
	4	5.05×10^6	5.13 ± 0.02	7.01 ± 0.00	8.98 ± 0.00	21.38 ± 0.05	0.05 ± 0.00
	6	1.15×10^7	2.34 ± 0.03	7.41 ± 0.04	9.34 ± 0.09	19.21 ± 0.11	0.10 ± 0.00
	24	2.20×10^7	1.06 ± 0.04	6.64 ± 0.66	8.24 ± 0.21	15.99 ± 0.21	2.36 ± 0.01
	30	2.53×10^7	0.89 ± 0.02	2.76 ± 0.49	4.91 ± 0.16	8.60 ± 0.14	4.12 ± 0.12
	48	4.80×10^7	0.01 ± 0.02	0.65 ± 0.00	1.81 ± 0.06	2.47 ± 0.01	6.99 ± 0.09
	54	5.50×10^7	0.01 ± 0.01	0.48 ± 0.05	1.62 ± 0.12	2.11 ± 0.00	8.56 ± 0.18
	72	7.05×10^7	0.01 ± 0.01	0.23 ± 0.00	1.20 ± 0.03	1.44 ± 0.04	9.15 ± 0.14
50 L	0	3.20×10^6	7.74 ± 0.09	6.80 ± 0.10	8.71 ± 0.06	23.65 ± 0.21	0.06 ± 0.00
	2	4.45×10^6	7.24 ± 0.09	6.92 ± 0.10	8.85 ± 0.09	23.36 ± 0.17	0.05 ± 0.00
	4	5.15×10^6	5.12 ± 0.02	7.00 ± 0.00	8.46 ± 0.13	20.86 ± 0.02	0.05 ± 0.00
	6	1.00×10^7	2.30 ± 0.03	7.41 ± 0.13	9.21 ± 0.18	19.08 ± 0.24	0.11 ± 0.00
	24	2.05×10^7	1.04 ± 0.00	5.40 ± 0.09	6.75 ± 0.12	13.24 ± 0.11	3.07 ± 0.07
	30	2.40×10^7	1.00 ± 0.10	2.98 ± 0.05	3.96 ± 0.22	8.00 ± 0.03	4.46 ± 0.11
	48	4.60×10^7	0.01 ± 0.00	0.62 ± 0.00	1.80 ± 0.01	2.47 ± 0.06	7.53 ± 0.21
	54	5.20×10^7	0.01 ± 0.00	0.48 ± 0.03	1.61 ± 0.00	2.11 ± 0.04	8.66 ± 0.10
	72	7.35×10^7	0.01 ± 0.00	0.22 ± 0.01	1.19 ± 0.05	1.43 ± 0.00	9.05 ± 0.07