

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โครงการนี้เป็นการร่วมมือกันระหว่าง กลุ่มวิจัย solid state fermentation and bioprocess engineering มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และ ห้องปฏิบัติการ genetic ของ ดร. ชูลี ยมภักดี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในงานวิจัยเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ ยีสต์และศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์

ปัจจุบันราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกขยับขึ้นเรื่อย ๆ ชนิดจุดไม่อยู่ ที่คาดการณ์ว่าจะขึ้นทะลุ 100 ดอลลาร์/บาร์เรลในไม่ช้า ส่วนหนึ่งเป็นเรื่องของ การเก็งกำไร หรือปั่นราคาน้ำมัน ดังนั้น ถ้าวันหนึ่งมีการเก็งกำไรน้ำมันไปที่ 100 ดอลลาร์ได้ ทำไมวันนี้น้ำมันจะถูกปั่นราคาให้สูงกว่านี้ไม่ได้ ประเทศผู้นำเข้าน้ำมันรวมทั้งประเทศไทยด้วยได้รับผลกระทบเต็ม ๆ รัฐบาลทุกชุดมีภารกิจสำคัญคือ ทำอย่างไรจะให้ประชาชนได้รับผลกระทบน้อยที่สุด เพราะการขึ้นลงของราคาน้ำมันส่งผลกระทบต่อชีวิตความเป็นอยู่ประจำวันของประชาชนอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ นอกเหนือจากการหาพลังงานอื่น เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน พลังน้ำ มาชดเชยแล้ว การกลับมาเน้นในเรื่องการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรอีกครั้ง แม้แต่สหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นผู้บริโภคน้ำมันรายใหญ่ที่สุดของโลกยังให้ความสำคัญต่อการค้นคว้า วิจัย และผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่ส่วนใหญ่ผลิตจากอ้อยซึ่งปลูกกันมากในสหรัฐ อย่างไรก็ตาม พอราคาอ้อยสูงขึ้น การผลิตเอทานอลในสหรัฐก็ลดลง แต่หันมานำเข้าเอทานอลจากบราซิลมากขึ้นเพราะราคาอ้อยยังถูกอยู่ สะท้อนให้เห็นว่า แม้ประเทศยักษ์ใหญ่เช่นสหรัฐยังให้ความสำคัญต่อการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง

จากการวิเคราะห์หาสาเหตุที่มาของปัญหาดังกล่าวอาจกล่าวได้ว่า “การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอล” เป็นหัวใจสำคัญที่จะช่วยเพิ่มกำลังการผลิต เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตได้เป็นอย่างดี ซึ่งปัจจัยสำคัญประการหนึ่งก็คือ การเลือกใช้ “จุลินทรีย์” ที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเอทานอล อย่างไรก็ตามในอดีตการผลิตแอลกอฮอล์จะใช้ยีสต์ขนมปังซึ่งการผลิตโดยวิธีนี้มีมานานกว่าพันปี แต่การนำยีสต์ขนมปังมาผลิตพลังงานทางเลือกอย่างเอทานอลเพียงจะมีการนำมาใช้ไม่กี่ปีเท่านั้น โดยปัญหาและอุปสรรคของการผลิตเอทานอลในอดีต ได้แก่

1. ปัญหาจากต้นทุนการย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนกระบวนการหมักที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส
2. ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโรส และน้ำตาลเพนโตสของยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักยังไม่ดีเท่าที่ควร

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการหมักมักจะไม่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ จากข้อจำกัดดังกล่าวทำให้ทีมวิจัยมีความประสงค์ที่จะหาจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาวะการย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลใหญ่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไปเป็นเอทานอล เพื่อลดต้นทุนการผลิตเอทานอลจากการปรับเปลี่ยนสภาวะการผลิตก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก หนึ่งในหลักการสำคัญของการย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ก็คือการย่อย Lignocelluloses ที่ต้องอาศัยประสิทธิภาพในการย่อยน้ำตาลไซโรสเนื่องจากน้ำตาลไซโรสเป็นส่วนประกอบหลักของเซลลูโลสกว่า 30% (Jelries, T.W. และคณะ) จากการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในอดีตจะพบว่ามีการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็น

จุลินทรีย์หลักในการหมักให้ได้เอทานอล แต่ยีสต์ชนิดนี้มีความสามารถใช้น้ำตาลไซโรสต่ำ โดยมีแนวโน้มที่จะมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลเฮกโซสในรูปแบบอื่นๆ ได้ดีกว่า (Bao, X. และคณะ) จึงทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย Lignocelluloses ในอุณหภูมิสูงไม่ดีเท่าที่ควร

ในงานวิจัยนี้จะนำยีสต์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้คัดเลือกยีสต์จากโรงงานน้ำตาลทราย จำนวน 94 ไอโซเลต จนได้ยีสต์ที่มีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง และสามารถผลิตเอทานอลได้สูง จำนวน 8-20 ไอโซเลต มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในระดับโรงงานต้นแบบต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. คัดเลือกยีสต์ที่สามารถทนทานต่ออุณหภูมิสูง ในระหว่างกระบวนการผลิต และผลิตเอทานอลได้สูง
2. ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ที่คัดเลือกได้
3. ศึกษากระบวนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ที่คัดเลือกได้ ในแง่ของการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักให้ได้ผลผลิตที่มากกว่ากระบวนการผลิตด้วยยีสต์สายพันธุ์อื่น
4. ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำยีสต์ที่คัดเลือกได้ มาใช้ในการหมักเอทานอลในระดับโรงงานต้นแบบ

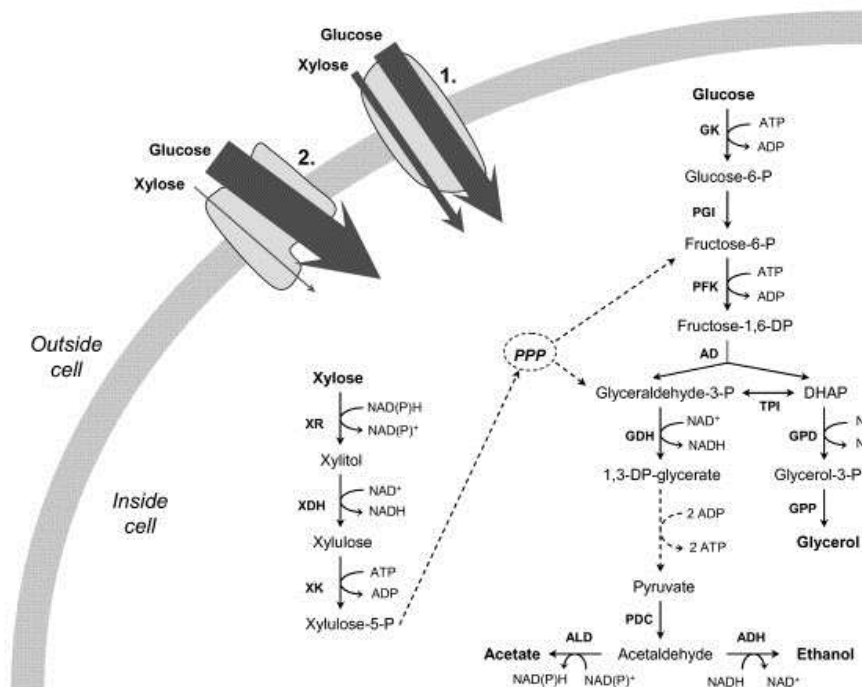
ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์จากของเสียโรงงานน้ำตาลที่สามารถทนอุณหภูมิสูง และผลิตเอทานอลได้สูง แล้วนำมาทดลองเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ ในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการหมัก

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) ในทางเคมีเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นไฮดรอกซิล ดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 จุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใสไม่มีสี ติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงินไม่มีควัน ประเทศที่ผลิตเอทานอลมากที่สุดในโลกในลำดับต้นๆ ได้แก่ บราซิล และประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งแนวโน้มการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ของโลกยังคงเติบโตอย่างต่อเนื่อง ส่วนในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดีย ก็ให้ความสนใจมากในการใช้พลังงานทดแทนโดยเฉพาะเอทานอล และปัจจุบันอินเดียได้มีการส่งเสริมและพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ เพื่อใช้ภายในประเทศ อีกทั้งยังสามารถส่งออกเทคโนโลยีไปยังประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย การศึกษาของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่า การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ ในโรงงานต้นแบบพบว่า ต้นทุนที่ใช้ผลิตเอทานอล หัวมันสำปะหลังสด 8.94 บาท/ลิตร มันสำปะหลังเส้น 9.41 บาท/ลิตร แป้งมันสำปะหลัง

13.50 บาท/ลิตร อ้อย 10.54 บาท/ลิตร และข้าวโพด 10.65 บาท/ลิตร จากวัตถุดิบนี้พบว่า หัวมันสำปะหลังสดมีต้นทุนถูกที่สุด อย่างไรก็ตามการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร จะทำการหมักยีสต์โดยใช้สารอาหารที่จำลองส่วนประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการภายในเซลล์ยีสต์ แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 Simplified scheme of sugar transport and metabolism in *S. cerevisiae*.

1. Low- and intermediate-affinity hexose transporters.
2. High-affinity hexose transporters. (Abbreviations: PPP, pentose phosphate pathway; XR, xylose reductase; XDH, xylitol dehydrogenase; XK, xylulokinase; GK, glucokinase; PGI, phosphoglucose isomerase; PFK, phosphofructokinase; AD, aldolase; TPI, triose phosphate isomerase; GDH, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase; GPD, glycerol-3-P dehydrogenase; GPP, glycerol-3-phosphatase; PDC, pyruvate decarboxylase; ALD, acetaldehyde dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase)

อย่างไรก็ตามยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้ เป็นยีสต์ที่ได้จากการคัดเลือกให้มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูง และทนแอลกอฮอล์สูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมัก โดยคาดหวังว่าจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้ใช้ยีสต์ที่ถูกพัฒนาสายพันธุ์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีคุณสมบัติในการสะสมเอทานอล และทนแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าสายพันธุ์ทั่วไป

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

มีปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งปฏิกิริยาการผลิตเอทานอล ทำให้ผลิตเอทานอลได้น้อย โดยปัจจัยหลักๆ ได้แก่

1. ความเข้มข้นของเอทานอล

การมีเอทานอลสะสมอยู่ในถังหมักจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์เจริญช้าลง จนเกือบหยุดการเจริญ เอทานอลไปมีผลต่อการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) ในการขนส่งกลูโคส มอลโทส แอมโมเนีย และกรดอะมิโนต่างๆ ยีสต์สายพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ปริมาณมาก สามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงๆ เทียบกับยีสต์สายพันธุ์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่น้อย นอกจากนี้ยังพบว่าฟอสโฟลิปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการทนเอทานอลของยีสต์อีกด้วย (Hong M.E. *et al.*, 2010)

2. ความเข้มข้นของน้ำตาล

อาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาลสูงกว่า 150 กรัมต่อลิตร จะทำให้การหมักเอทานอลของยีสต์หยุดลง (Nagodawithana *et al.*, 1976) ดังนั้นการใช้ยีสต์หมักในสภาวะเช่นนี้ จึงมีผลทำให้การหมักเป็นไปได้ช้า และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerant yeast) พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ (D' Amore *et al.*, 1988)

3. สารอาหารและโคแฟกเตอร์ (cofactor) ที่จำเป็นสำหรับการหมัก ได้แก่

3.1 ไนโตรเจน โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไอออน (ammonium ion) ได้ ซึ่งจัดเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ที่ยีสต์สามารถใช้ได้

3.2 ฟอสฟอรัส ปกติในรูปของฟอสเฟต ซึ่งเป็น ionic factor จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2540)

3.3 ซัลเฟอร์ ปกติในอุตสาหกรรมใช้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส โดยอยู่ในรูปของ methionine แต่เนื่องจากมีราคาแพงมาก จึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน

3.4 แร่ธาตุต่างๆ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

3.4.1 Macroelements ได้แก่ โพแทสเซียม, แมกนีเซียม, แคลเซียม, สังกะสี, เหล็ก, แมงกานีส

3.4.2 Microelements ได้แก่ โคบอล, โบรอน, โครเมียม, ไอโอดีน, โมลิบดีนัม, แคดเมียม, นิกเกิล, ทองแดง, โซเดียม

3.4.3 Inhibitors ได้แก่ เงิน, สารหนู, พรอท, ลิเทียม, เซลิเนียม

3.5 วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ ควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากวิตามินเป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่จะทำใหเอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่

การที่จะเติมสารอาหารใดลงไปนั้น ควรคำนึงถึงผลต่อต้นทุนการผลิต โดยปริมาณที่ใส่นั้นจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ

4. สภาวะแวดล้อมในการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของยีสต์ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ คาร์บอนไดออกไซด์

จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับโรงงานอุตสาหกรรมนั้น ต้องมีลักษณะเหมาะสมกับกระบวนการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต โดยจุลินทรีย์ที่ดีและมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอล ควรมีลักษณะดังนี้ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2540)

1. ให้ผลผลิตสูง
2. ทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
3. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)
4. มีความคงตัวภายใต้สภาวะต่างๆ ของการหมัก
5. ทนต่อภาวะความเป็นกรด (acid tolerance)
6. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
7. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
8. เพิ่มจำนวน (propagation) ได้ง่าย
9. ให้ความร้อนในระหว่างการหมักต่ำ
10. นอกเหนือจากการใช้กลูโคส มีความสามารถในการใช้ไดแซ็กคาไรด์ หรือ โพลีแซ็กคาไรด์
11. มีความทนทานต่อสารพิษต่างๆ

การผลิตเอทานอลด้วยยีสต์สายพันธุ์ใหม่

ยีสต์ทำขนมปังสายพันธุ์ใหม่ *Saccharomyces cerevisiae* ถูกพัฒนาขึ้นโดยสามารถใช้หมักทำน้ำตาลเพนโทสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและไม้เนื้อแข็ง

กลุ่มนักวิจัยได้เขียนผลงานนี้ลงใน BioMed Central ในหมวดวารสาร Biotechnology for Biofuels อธิบายถึงการสร้าง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ใหม่ TMB3130 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของอัตราการเกิดเชื้อและความเข้มข้นของชีวมวลในตัวอย่างน้ำตาลที่ประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทส 2 ตัว, ไชโลส และ อราบินอส

Marie Gorwa-Grauslund แห่งมหาวิทยาลัย Lund ประเทศสวีเดน ทำงานร่วมกับทีมนักวิจัยนานาชาติเพื่อสร้างจุลินทรีย์ชนิดใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ทำขนมปังทั่วไปไม่สามารถใช้หมักน้ำตาลเพนโทสได้ทั้งหมด โดยการใส่ยีนส์ที่จำเป็นที่ได้มาจากเชื้อราหรือแบคทีเรียชนิดอื่น มันก็เป็นไปได้ที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนพันธุ์กรรมของสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้หมักน้ำตาลเพนโทสได้ Gorwa-Grauslund และเพื่อนร่วมงานของเธอได้นำหนึ่งในสายพันธุ์ที่ถูกดัดแปลง TMB3061 และเพาะเลี้ยงมันในของผสมระหว่างน้ำตาลไซโลสและอราบินอสเพื่อที่จะเลือกกลุ่มสายพันธุ์ที่มีความคงตัวซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำตาลเพนโทสได้มากที่สุด

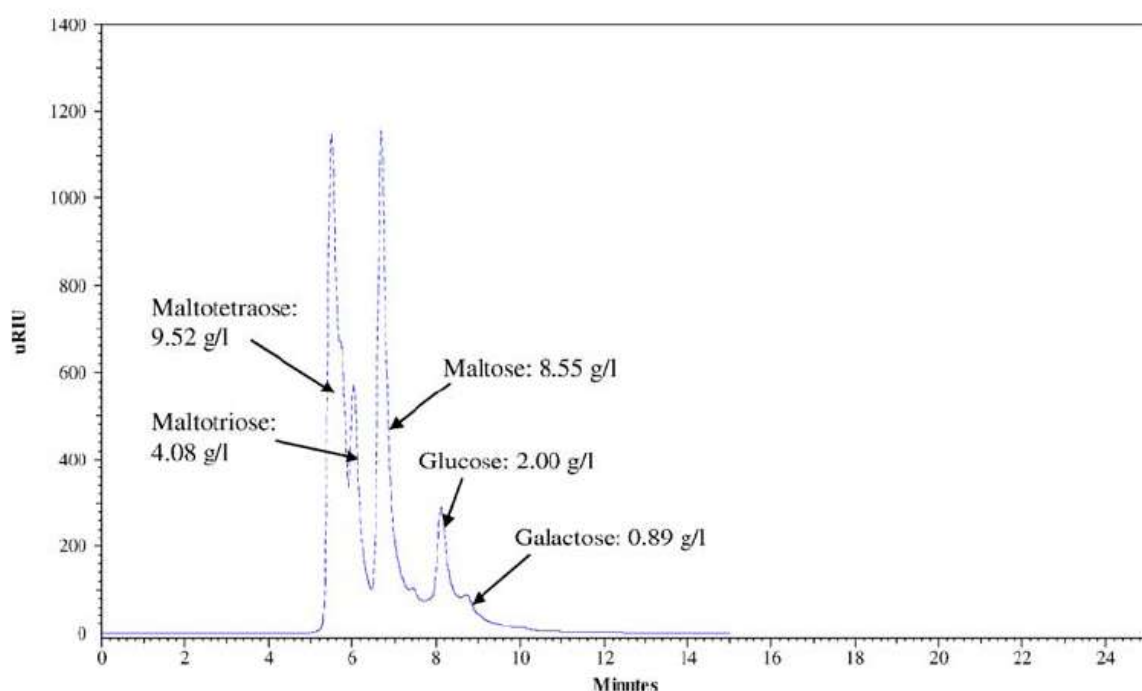
การนำน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ในการหมักเอทานอล

น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการหมักมีส่วนประกอบของน้ำตาลที่ได้จากการผลิตบางส่วน และธาตุอาหารคาร์บอนที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ จากการศึกษาของ Kripa, R. และคณะ ได้นำน้ำเสียจากการผลิตเบียร์ เติม Trace mineral solutions สามารถผลิตเอทานอลได้ 8.42 – 15.52 g/L น้ำเสียจาก

โรงงานผลิตเบียร์ซึ่งใช้ยีสต์หมักอยู่แล้วก็พบว่ามีความเป็นไปได้ในการนำมาผลิตเอทานอลเช่นกัน ใน การศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานเบียร์โดยใช้แบคทีเรีย *E.coli* K011 และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าจุลินทรีย์สองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในผลิตเอทานอลจากน้ำเสีย โรงงานเบียร์ และจะได้ผลิตภัณฑ์คือเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำน้ำเสียมาทำการเติมเอนไซม์ α -amylase pectinase และเอนไซม์ผสมของทั้งสองชนิดโดยทำให้ได้เอทานอลเพิ่มขึ้นถึง 61-84% เปรียบเทียบกับ กรณีที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ และการเติมเอนไซม์ผสมให้ผลผลิตสูงสุดสำหรับการหมักไม่ว่าเป็นแบคทีเรีย หรือยีสต์ (Kripa, R. และคณะ)

การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้งจากการผลิตเบียร์ (อุตสาหกรรมการหมัก)

จากการศึกษาของ Kripa, R. และคณะได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำทิ้งจากการผลิต เบียร์ แสดงดังรูปที่ 3 จากตัวอย่างที่วิเคราะห์ตัวอย่างหนึ่งพบว่า น้ำทิ้งจากการผลิตเบียร์มีปริมาณน้ำตาล Maltotetraose 9.52 g/L น้ำตาล Maltotriose 4.08 g/L น้ำตาล Maltose 8.55 g/L น้ำตาลกลูโคส 2.00 g/L และน้ำตาล Galactose 0.89 g/L ตามลำดับ



รูปที่ 2 ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในน้ำทิ้งจากการผลิตเบียร์ (Kripa, R. และคณะ)

สำหรับขั้นตอนการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานเบียร์มีขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. น้ำทิ้งจากโรงเบียร์จะถูกส่งเข้าไปยัง Equalization Tank ซึ่งจะกวนน้ำอยู่ตลอดเวลาเพื่อป้องกันการตกตะกอน
2. น้ำทิ้งจะถูกส่งไปยังถังหมักแอนแอโรบิก ซึ่งเรียกว่า ถังปฏิกิริยา UASB เพื่อให้แบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจนย่อยสลาย สารอินทรีย์แล้วเปลี่ยนให้เป็น "ก๊าซชีวภาพ"

3. น้ำทิ้งจะถูกส่งไปบำบัดต่อยัง ถังเติมอากาศ (Aeration Tank) ซึ่งออกซิเจนจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อาศัยอากาศในการเจริญเติบโต เพื่อให้แบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์ ที่ยังเหลืออยู่ให้หมดไป ก่อนจะถ่ายเทไปยังถังตกตะกอน
4. น้ำใสจากบ่อตกตะกอนจะถูกแยกและปั๊มออกมายังบ่อฟลัก หลังจากมีการตรวจสอบคุณสมบัติ น้ำว่าตรง ตามระเบียบ ของทางรัฐบาลแล้ว จึงจะปล่อยน้ำลงยังแม่น้ำเจ้าพระยา นอกจากจะปล่อยน้ำลงในแม่น้ำ แล้ว ยังมีการใช้น้ำที่ได้รับการบำบัดแล้วในการรดน้ำต้นไม้และล้างทำความสะอาด บริเวณโรงเบียร์ อีกด้วย
5. สิ่งที่เหลืออยู่ในถังตกตะกอนจะถูกส่งไปยัง sludge thickener ซึ่งจะแยกน้ำที่เหลือออก
6. ตะกอนที่เหลือจะนำไปผ่านเครื่องแยกน้ำจากตะกอน ซึ่งจะแยกน้ำออกจากตะกอนเป็นครั้งสุดท้าย ส่วนตะกอนที่เหลือในขั้นตอนนี้จะถูกนำไปใช้เป็นปุ๋ย หรือผลิตภัณฑ์อื่น ส่วนน้ำที่ได้จากขั้นตอนนี้ จะถูกปั๊มเข้าไปยังระบบบำบัดน้ำทิ้งอีกครั้งเพื่อให้มั่นใจได้ว่าคุณภาพ น้ำจะอยู่ในระดับที่สามารถ ปล่อยออกจากระบบได้
7. ในขั้นตอนการบำบัดน้ำทิ้งจะได้ก๊าซชีวภาพด้วย ซึ่งก๊าซจะถูกนำไปใช้ในการต้มเบียร์ ทำให้สามารถ ประหยัดพลังงานได้อย่างมาก

การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานเบียร์โดย *Saccharomyces cerevisiae* No. 75

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ

1. นำตัวอย่างปริมาณ 1 loop ใส่ลงในอาหาร YMB 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนการผลิตเอทานอลการทดลองที่ 1-3

2. นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ใส่ลงในตัวอย่างน้ำเสีย บ่มที่อุณหภูมิ 30° c ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำตัวอย่างละ 2 ขั้ว

ขั้นตอนการตรวจสอบ

3. นำตัวอย่างที่ผ่านการบ่มแล้วมาตรวจสอบด้วยเครื่อง HPLC
4. ทำสารมาตรฐานโดยใช้ absolute ethanol เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 %(V/V)
5. ทำการตรวจสอบการเจริญของยีสต์ด้วยวิธี spread plate โดยใช้อาหาร YMA ทำตัวอย่างละ 2 ขั้ว

การทดลองที่ 1 การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานเบียร์โดย *Saccharomyces cerevisiae* No. 75 โดยไม่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ดั้งเดิมในน้ำเสีย

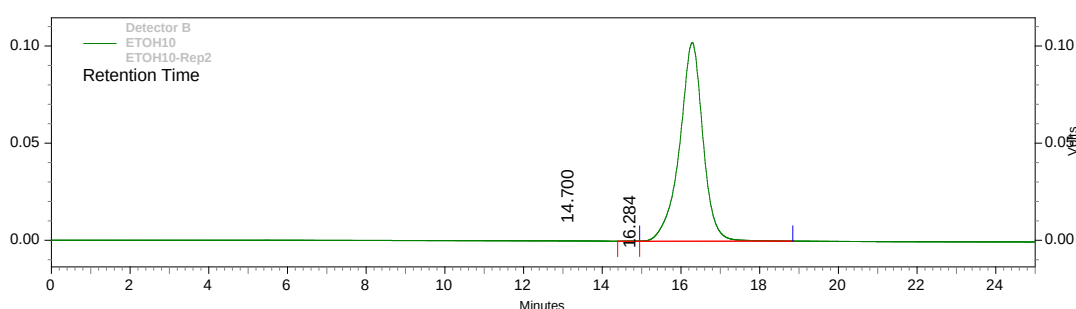
ขั้นตอนการเตรียมน้ำเสีย

- นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ใน flask 250 มิลลิลิตร ไม่ต้องทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสีย ทำตัวอย่างละ 2 ขั้ว
- เติมเชื้อจาก 1 ลงไป 10 มิลลิลิตร

ผลการทดลอง

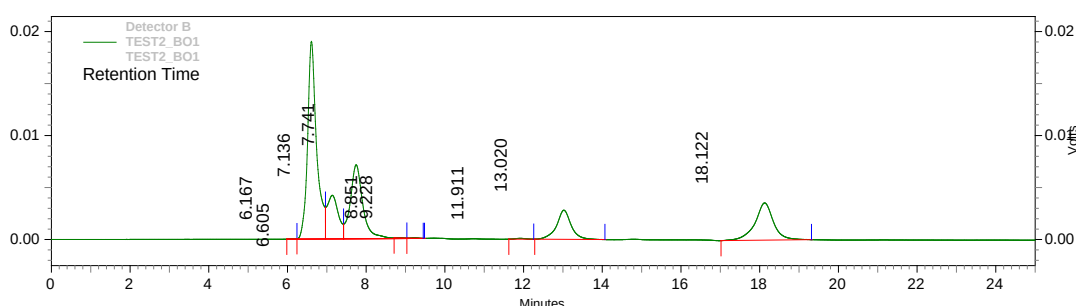
1. การผลิตเอทานอล

จากการทดลองการหมักโดยไม่ทำลายจุลินทรีย์ดั้งเดิมในน้ำเสีย จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟระหว่างตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม กับสารมาตรฐานเอทานอลนั้น พบว่าสารมาตรฐานมีการผลิตเอทานอล ออกมาที่เวลา 16.273 นาที แต่ทั้งตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม ไม่พบการผลิตเอทานอล ของกราฟในเวลาดังกล่าว (รูปที่ 2 และ 3) แสดงว่าไม่มีเอทานอลผลิตขึ้นในการทดลองนี้



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	14.7	1420	0.034	55	0.054
2	16.284	4215113	99.966	102198	99.946
Totals		4216533	100	102253	100

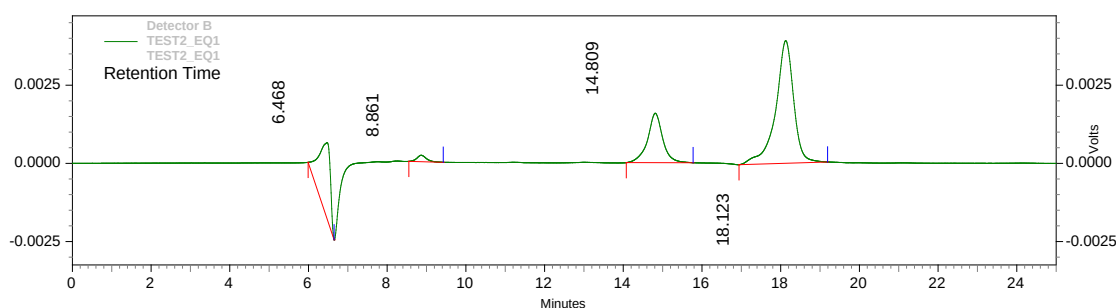
รูปที่ 3 ผล HPLC ของเอทานอลมาตรฐาน 1%



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.167	421	0.057	44	0.12

2	6.605	305769	41.288	19012	51.506
3	7.136	82954	11.201	4196	11.368
4	7.741	159667	21.56	7112	19.267
5	8.851	381	0.051	39	0.105
6	9.228	568	0.077	50	0.135
7	11.911	1449	0.196	79	0.214
8	13.02	72601	9.803	2802	7.591
9	18.122	116758	15.766	3578	9.693
Totals		740569	100	36912	100

รูปที่ 4 ผล HPLC ของน้ำเสียห้องต้ม หลังการต้ม



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.468	47353	21.807	2425	29.825
2	8.861	3500	1.612	206	2.53
3	14.809	42084	19.38	1579	19.42
4	18.123	124211	57.201	3920	48.225
Totals		217148	100	8129	100

รูปที่ 5 ผล HPLC ของน้ำเสียห้องรวม หลังการต้ม

2. การเจริญของจุลินทรีย์ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำตัวอย่างหลังการต้มทั้งสองตัวอย่างมา spread plate เพื่อตรวจสอบการเจริญของยีสต์ นั้นพบว่ายีสต์เจริญได้ไม่ดึนในตัวอย่างห้องต้ม และห้องรวม แต่ตัวอย่างจากห้องต้ม สามารถเจริญได้ดีกว่าตัวอย่างจากห้องรวม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ระหว่างตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม

ตัวอย่าง	จานเลี้ยงเชื้อที่ 1	จานเลี้ยงเชื้อที่ 2
ห้อง ต้ม	+	+
ห้องรวม	+	-

หมายเหตุ +++ เจริญดีมาก, ++ เจริญดี, + เจริญ, - ไม่เจริญ

การทดลองที่ 2 การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานเบียร์ที่ทำลายจุลินทรีย์ดั้งเดิมแล้ว โดย *Saccharomyces cerevisiae* No. 75

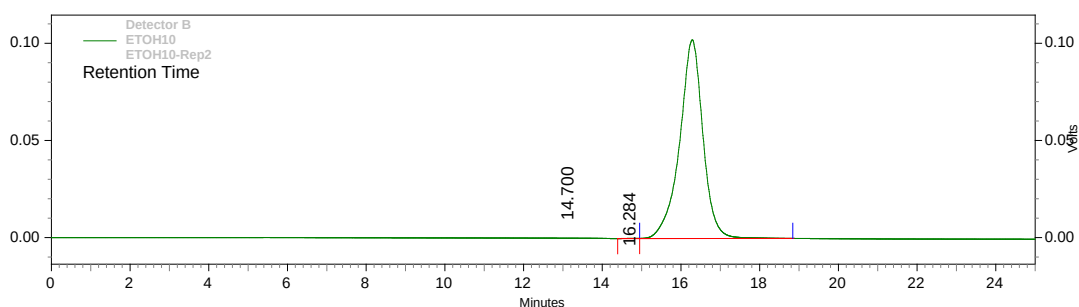
ขั้นตอนการเตรียมน้ำเสีย

- เติมตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อ ทำตัวอย่างละ 2 ข้ำ
- เติมเชื้อจาก 1 ลงไป 10 มิลลิลิตร

ผลการทดลอง

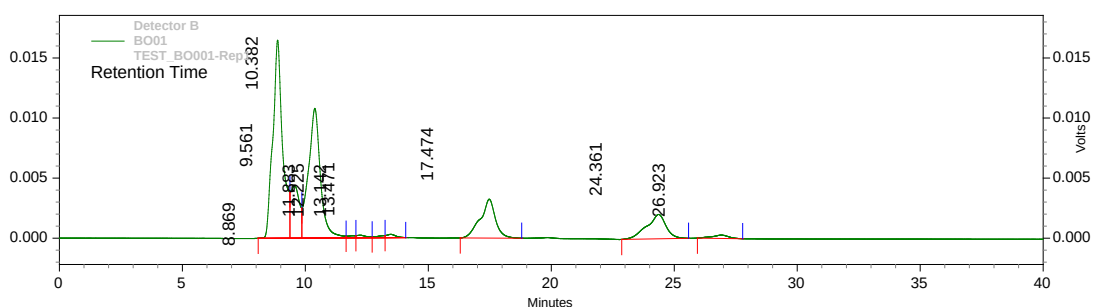
1. การผลิตเอทานอล

จากการทดลองการหมักโดยทำลายจุลินทรีย์ดั้งเดิมในน้ำเสีย จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟระหว่างตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม กับสารมาตรฐานเอทานอลนั้น พบว่าสารมาตรฐานมีกราฟออกมาที่เวลา 16.273 นาที แต่ทั้งตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม ไม่พบการผลิตเอทานอลของกราฟในเวลานี้แต่อย่างใด (รูปที่ 5 และ 6) แสดงว่าไม่มีเอทานอลผลิตขึ้นในการทดลองนี้



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	14.7	1420	0.034	55	0.054
2	16.284	4215113	99.966	102198	99.946
Totals		4216533	100	102253	100

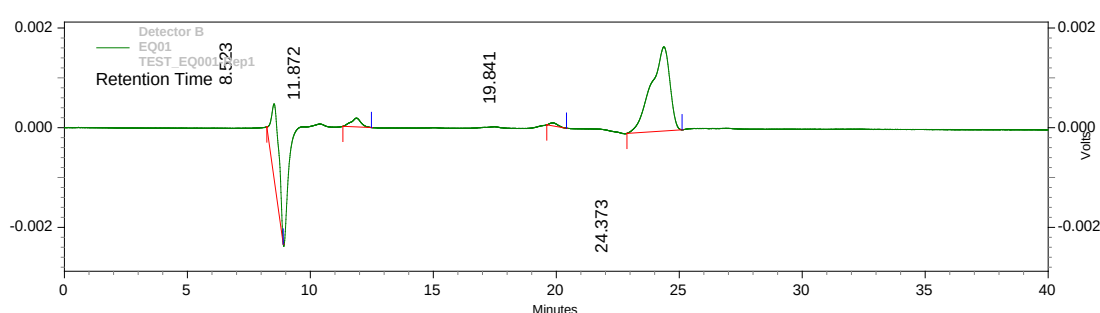
รูปที่ 6 ผล HPLC ของเอทานอลมาตรฐาน 1%



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	8.869	456502	37.633	16482	43.382

2	9.561	106911	8.814	4361	11.478
3	10.382	367245	30.275	10786	28.391
4	11.883	3894	0.321	176	0.463
5	12.225	5650	0.466	212	0.559
6	13.142	3794	0.313	165	0.435
7	13.471	6774	0.558	272	0.715
8	17.474	138659	11.431	3236	8.517
9	24.361	110752	9.13	2027	5.336
10	26.923	12848	1.059	275	0.724
Totals		1213028	100	37992	100

รูปที่ 7 ผล HPLC ของน้ำเสียห้องต้ม หลังการต้ม



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	8.523	34894	26.729	1481	43.525
2	11.872	4970	3.807	176	5.175
3	19.841	1326	1.016	59	1.73
4	24.373	89356	68.448	1687	49.571
Totals		130546	100	3403	100

รูปที่ 8 ผล HPLC ของน้ำเสียห้องรวม หลังการต้ม

2. การเจริญของจุลินทรีย์ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำตัวอย่างหลังการต้มทั้งสองตัวอย่างมา spread plate เพื่อตรวจสอบการเจริญของยีสต์ นั้นพบว่ายีสต์เจริญได้ไม่ดึ้นกทั้งในตัวอย่างห้องต้ม และห้องรวม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ระหว่างตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม

ตัวอย่าง	จานเลี้ยงเชื้อที่ 1	จานเลี้ยงเชื้อที่ 2
ห้อง ต้ม	++	+
ห้องรวม	+	+

หมายเหตุ +++ เจริญดีมาก, ++ เจริญดี, + เจริญ, - ไม่เจริญ

การทดลองที่ 3 การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานเบียร์ที่ทำลายจุลินทรีย์ดั้งเดิมแล้ว โดย *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ที่คัดเลือกได้ในสภาพไร้อากาศ

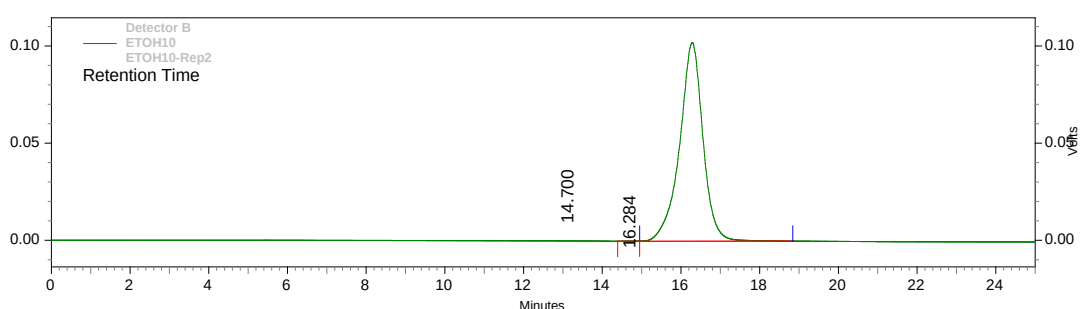
ขั้นตอนการเตรียมน้ำเสีย

- เติมตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตรนำไปฆ่าเชื้อ โดยทำตัวอย่างละ 2 ข้ำ
- เติมเชื้อจาก 1 ลงไป 10 มิลลิลิตร

ผลการทดลอง

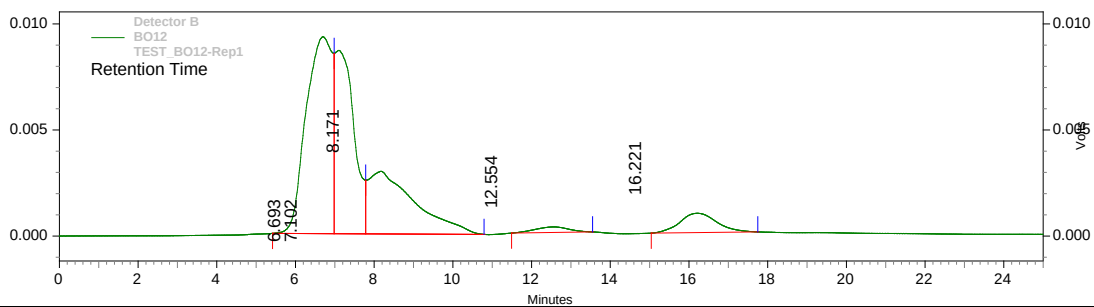
1. การผลิตเอทานอล

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าในสภาวะไร้อากาศ เมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง ตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม กับสารมาตรฐานเอทานอลนั้น พบว่าสารมาตรฐานมีการผลิตเอทานอล ออกมาที่เวลา 16.273 นาที (รูปที่ 7) และมีเพียงตัวอย่างห้องต้ม เท่านั้นที่มีการผลิตเอทานอล ขึ้นมา ในช่วงเวลานี้ (รูปที่ 8) และเมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณเอทานอลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอลนั้น จะพบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 0.009502 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) ในขณะที่ตัวอย่างห้องรวมนั้นไม่พบการผลิตเอทานอล (รูปที่ 9)



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	14.7	1420	0.034	55	0.054
2	16.284	4215113	99.966	102198	99.946
Totals		4216533	100	102253	100

รูปที่ 9 ผล HPLC ของเอทานอลมาตรฐาน 1%

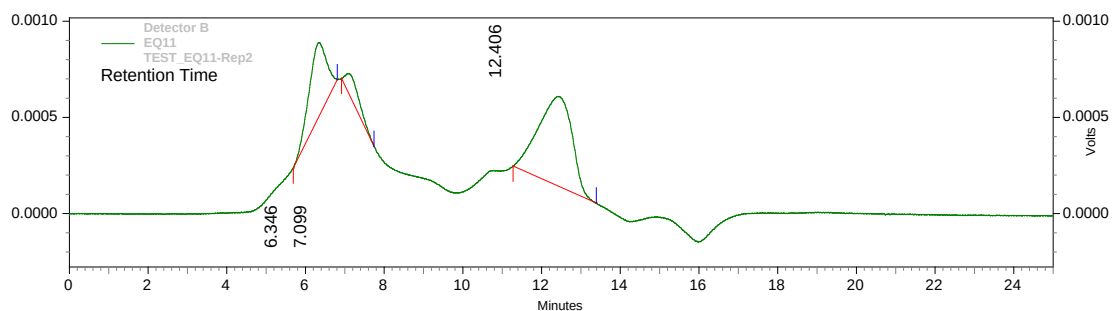


Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.693	427649	41.254	9279	42.108
2	7.102	290982	28.07	8638	39.199
3	8.171	242910	23.433	2948	13.375
4	12.554	15635	1.508	263	1.192
5	16.221	59457	5.736	909	4.126
Totals		1036632	100	22038	100

รูปที่ 10 ผล HPLC ของน้ำเสียห้องต้ม หลังการต้ม

ตารางที่ 3 ปริมาณเอทานอลจากตัวอย่างห้องต้ม

ตัวอย่าง	พื้นที่ใต้กราฟที่ 16 นาที			ปริมาณเอทานอล (g/l)
	1	2	เฉลี่ย	
Flask 1	36854	34457	35655.5	0.005691
Flask 2	59457	59614	59535.5	0.009502



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.346	12155	28.581	382	40.147
2	7.099	2826	6.644	104	10.912
3	12.406	27547	64.774	465	48.941
Totals		42527	100	951	100

รูปที่ 11 HPLC ของน้ำเสียห้องรวม หลังการบ่ม

2. การเจริญของจุลินทรีย์ใน จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำทั้ง 2 ตัวอย่างมาตรวจสอบการเจริญของยีสต์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าตัวอย่างห้องต้ม สามารถเจริญได้ดีกว่าตัวอย่างห้องรวม (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ระหว่างตัวอย่างห้อง ต้ม และตัวอย่างห้องรวม

ตัวอย่าง	จานเลี้ยงเชื้อที่ 1	จานเลี้ยงเชื้อที่ 2
ห้องต้ม	+++	+++
ห้องรวม	+++	++

หมายเหตุ +++ เจริญดีมาก, ++ เจริญดี, + เจริญ, - ไม่เจริญ

การทดลองที่ 4 การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานเบียร์ที่ทำลายจุลินทรีย์ดั้งเดิมแล้ว โดย *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ที่คัดเลือกได้ ในสภาพมีอากาศในช่วงแรก และสภาพไร้อากาศในช่วงหลัง

ขั้นตอนการเตรียมน้ำเสีย

- เติมตัวอย่างน้ำเสียที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงใน flask 250 มิลลิลิตรนำไปฆ่าเชื้อ ทำตัวอย่างละ 2 ขี้

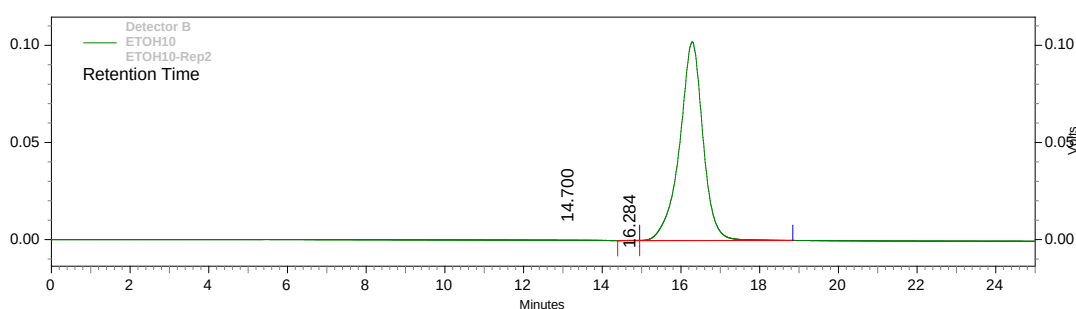
ขั้นตอนการผลิตเอทานอล

- นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จาก 1 ใส่ลงในตัวอย่างน้ำเสียที่ฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° C ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 2 ขี้
- จากนั้นปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30° C ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

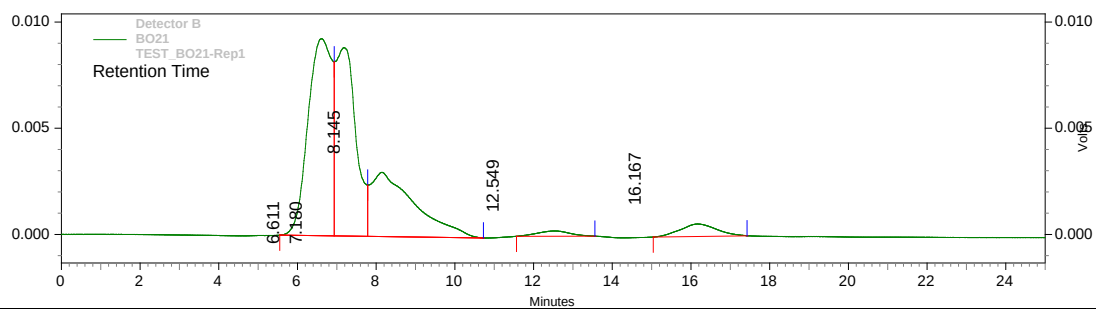
1. การผลิตเอทานอล

จากการทดลองการหมักโดยไม่ทำลายจุลินทรีย์ดั้งเดิมในน้ำเสีย จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ ระหว่างตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม กับสารมาตรฐานเอทานอลนั้น พบว่าสารมาตรฐานมี การผลิตเอทานอล ออกมาที่เวลา 16.273 นาที (รูปที่ 10) และมีเพียงตัวอย่างห้องต้ม เท่านั้น มีการผลิตเอทานอล ขึ้นมาในช่วงเวลานี้ (รูปที่ 11) และเมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณเอทานอล เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอลนั้นจะพบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 0.006036 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) ในขณะที่ตัวอย่างห้องรวมนั้นไม่พบการผลิตเอทานอล (รูปที่ 12)



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	14.7	1420	0.034	55	0.054
2	16.284	4215113	99.966	102198	99.946
Totals		4216533	100	102253	100

รูปที่ 12 ผล HPLC ของเอทานอลมาตรฐาน 1%

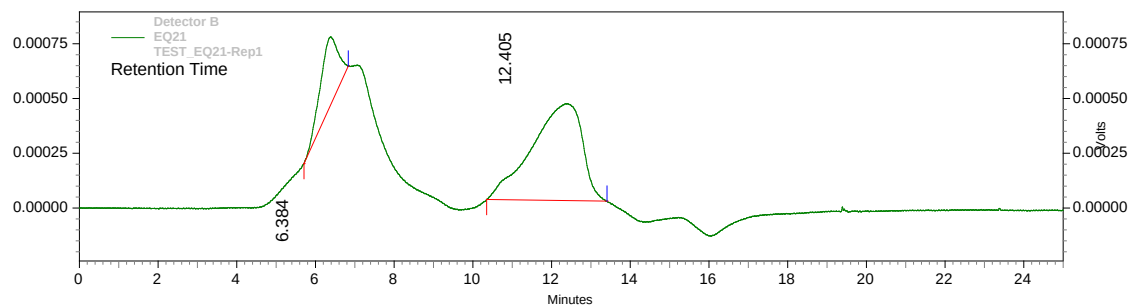


Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.611	392073	39.315	9275	42.158
2	7.18	317096	31.797	8868	40.308
3	8.145	235895	23.655	3021	13.73
4	12.549	14223	1.426	248	1.127
5	16.167	37966	3.807	589	2.676
Totals		997253	100	22001	100

รูปที่ 13 ผล HPLC ของน้ำเสียห้อง ต้ม หลังการต้ม

ตารางที่ 5 ปริมาณเอทานอลจากตัวอย่างห้องต้ม

ตัวอย่าง	พื้นที่ใต้กราฟที่ 16 นาที			ปริมาณเอทานอล (g/l)
	1	2	เฉลี่ย	
Flask 1	37966	37678	37822	0.006036
Flask 2	15345	11709	13527	0.002159



Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.384	10108	20.348	312	41.315
2	12.405	39570	79.652	443	58.685
Totals		49679	100	754	100

รูปที่ 14 ผล HPLC ของน้ำเสียห้องรวม หลังการบ่ม

2. การเจริญของจุลินทรีย์ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำทั้ง 2 ตัวอย่างมาตรวจสอบการเจริญของยีสต์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าตัวอย่างห้องต้ม สามารถเจริญได้ดีกว่าตัวอย่างห้องรวม (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ระหว่างตัวอย่างห้องต้ม และตัวอย่างห้องรวม

ตัวอย่าง	จานเลี้ยงเชื้อที่ 1	จานเลี้ยงเชื้อที่ 2
ห้อง ต้ม	+++	+++
ห้องรวม	+++	++

หมายเหตุ +++ เจริญดีมาก, ++ เจริญดี, + เจริญ, - ไม่เจริญ

ตารางที่ 7 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้นได้ในแต่ละการทดลอง

	การทดลองที่ 1 (g/L)	การทดลองที่ 2 (g/L)	การทดลองที่ 3 (g/L)	การทดลองที่ 4 (g/L)
flaskA	0	0	0.0056910	0.006036
flaskB	0	0	0.0095020	0.002159
เฉลี่ย	0	0	0.0075965	0.0040975

ผลการทดลองการทดลองที่ 1-4

จากการทดลองการหมักเอทานอลด้วยยีสต์โดยใช้น้ำเสีย จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเปปเปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ น้ำเสียห้องต้ม และ น้ำเสียห้องรวมนั้น เมื่อแบ่งตามชนิดของตัวอย่างแล้วจะเห็นว่า ตัวอย่างห้องต้ม จากการทดลองที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นการหมักแบบไร้อากาศ เท่านั้นที่มีการผลิตเอทานอล (รูปที่ 8

และ 11) ในขณะที่การหมักแบบมีอากาศในการทดลองที่ 1 และ 2 ไม่มีการผลิตเอทานอลผลิตขึ้น (รูปที่ 2 และ 5) และตัวอย่างทั้งสองนั้น ไม่พบว่าการผลิตเอทานอลทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (รูปที่ 3, 6, 9 และ 12) แสดงให้เห็นว่ามีเพียงตัวอย่างห้องต้ม ที่เลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศเท่านั้นที่ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ และในการเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ (การทดลองที่ 3) กับการเลี้ยงในสภาวะมีอากาศในช่วงแรก (การทดลองที่ 4) พบว่าการทดลองที่ 3 นั้นดีกว่าการทดลองที่ 4 สังเกตได้จากปริมาณเอทานอลที่ผลิตออกมาได้ในการทดลองที่ 3 นั้นสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.008 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) ในขณะที่การทดลองที่ 4 นั้นสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.004 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4)

จากการเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบความเจริญของยีสต์นั้นจะเห็นได้ชัดว่าตัวอย่างจากห้องต้ม ได้ผลการทดลองที่ดีกว่าตัวอย่างจากห้องรวม ในทุกๆ การทดลอง (ตารางที่ 1, 2, 4 และ 6) โดยเมื่อเปรียบเทียบในแต่ละการทดลองแล้วจะพบว่าผลการทดลองที่ 3 ซึ่งเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศนั้นให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด (ตารางที่ 4)

จากการทดสอบทั้งหมดนั้นทำให้ทราบได้ว่ามีเพียงตัวอย่างห้องต้ม เท่านั้นที่สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ และจะต้องเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศเพื่อผลการทดลองที่ดีที่สุด

การปรับปรุงแผนการดำเนินงานทดลอง

หลังจากได้ตัวอย่างและสภาวะที่เหมาะสมที่สุดแล้ว หลังจากนั้นจะทำการปรับปรุงสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตเอทานอล และทำการเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 เพื่อทดสอบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้นั้นมีความสามารถที่ดีหรือด้อยกว่าจุลินทรีย์ทางการค้า

หลังจากที่ทราบสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตเอทานอลแล้วการทดลองต่อจากนี้ จะเป็นการเติมน้ำตาลลงในน้ำเสีย เพื่อเป็นการเพิ่มสารอาหารและจะทำการทดสอบเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 โดยการทดลองจะแบ่งเป็น การใช้กากน้ำตาลเข้มข้น 17.5, 20 และ 25 %

การทดลองที่ 5 การเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียจากห้องต้มที่เติมน้ำตาลและน้ำกลั่นที่เติมน้ำตาลและเปรียบเทียบกับ *Saccharomyces cerevisiae* ระหว่างสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ กับสายพันธุ์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 โดยให้ความเข้มข้นกากน้ำตาลที่ 17.5% (V/V)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

- นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ข้ำ จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ
- นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 82.5 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำตาล 17.5 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ข้ำ จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

- นำน้ำกลั่นปริมาตร 82.5 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 17.5 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ขี้ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ขั้นตอนการผลิตเอทานอล

- นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จาก 1 ใส่ลงในตัวอย่างน้ำเสียที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° c ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 2 ขี้

ขั้นตอนการตรวจสอบ

- ตรวจสอบปริมาณกลูโคส และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC
- ทำสารมาตรฐานกลูโคส โดยใช้กลูโคสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 % (V/V)

ผลการทดลอง

1. การผลิตเอทานอลจากน้ำเสีย

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าน้ำเสียก่อนการบ่มนั้น มีปริมาณกลูโคสเริ่มต้นน้อยมากเพียง 0.00548 กรัมต่อลิตร และเมื่อผ่านการบ่มแล้วปริมาณกลูโคสได้หมดลง และไม่พบเอทานอลจากการทดลอง

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลต่อการเพิ่มของเอทานอลในน้ำเสีย

น้ำเสีย	Ethanol				Glucose			
	พื้นที่ใต้กราฟ			Total (g/l)	พื้นที่ใต้กราฟ			Total (g/l)
	1	2	ค่าเฉลี่ย		1	2	ค่าเฉลี่ย	
ก่อนการบ่ม	14822	14790	14806	0	1548	1655	1601.5	0.00584
หลังการบ่ม FlaskA	25892	25783	25837.5	0	1278	0	0	0
หลังการบ่ม FlaskB	28642	28643	28642.5	0	1253	0	0	0

จากตารางจะเห็นได้ว่ามีปริมาณของน้ำตาลอยู่ในน้ำเสียน้อยมาก และเมื่อนำมาตรวจสอบปริมาณเอทานอลหลังการบ่มพบว่าไม่มีเอทานอลเกิดขึ้น

2. การผลิตเอทานอลจากน้ำกลั่นผสมกากน้ำตาล 17.5 % (V/V)

จากผลการทดลอง เห็นได้ว่าก่อนการบ่มนั้นมีปริมาณกลูโคสสูงถึง 8.67 กรัมต่อลิตร และหลังการบ่ม 48 ชั่วโมง กลูโคสถูกใช้ไปจนหมด และมีการผลิตเอทานอลปริมาณเฉลี่ย 8.3 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลต่อการเพิ่มของเอทานอลในน้ำกลั่นเติมกากน้ำตาลเข้มข้น 17.5% (V/V)

น้ำกลั่น + กากน้ำตาล 17.5 % (V/V)	Ethanol				Glucose			
	พื้นที่ใต้กราฟ			Total (g/l)	พื้นที่ใต้กราฟ			Total (g/l)
	1	2	ค่าเฉลี่ย		1	2	ค่าเฉลี่ย	
ก่อนการบ่ม	16212	16212	16212	0	2377378	2377378	2377378	8.6690
หลังการบ่ม FlaskA	1645172	1599424	1622298	8.0201	0	0	0	0
หลังการบ่ม FlaskB	1734838	1728270	1731554	8.5932	0	0	0	0

จากตารางจะเห็นว่าน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาลนั้นมีปริมาณของกลูโคสที่สูงถึง 8.7 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตเอทานอลได้มากถึง 8.6 กรัมต่อลิตร

3. การผลิตเอทานอลจากน้ำเสียผสมกากน้ำตาล 17.5 % (V/V)

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าก่อนการบ่มนั้นมีปริมาณกลูโคสสูงถึง 9.15 กรัมต่อลิตรและหลังการบ่ม 48 ชั่วโมง กลูโคสถูกใช้ไปจนหมด และมีการผลิตเอทานอลปริมาณเฉลี่ย 8.1 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลต่อการเพิ่มของเอทานอลในน้ำเสียเดิมกากน้ำตาลเข้มข้น 17.5% (V/V)

น้ำเสีย + กากน้ำตาล 17.5% (V/V)	Ethanol				Glucose			
	พื้นที่ใต้กราฟ			Total (g/l)	พื้นที่ใต้กราฟ			Total (g/l)
	1	2	ค่าเฉลี่ย		1	2	ค่าเฉลี่ย	
ก่อนการบ่ม	48721	48443	48582	0	2509546	2509967	2509757	9.1517
หลังการบ่ม FlaskA	1519765	1514307	1517036	7.4679	0	0	0	0
หลังการบ่ม FlaskB	1771856	1761218	1766537	8.7767	0	0	0	0

จากตารางจะเห็นว่าน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาลนั้นมีปริมาณของกลูโคสที่สูงถึง 9.1 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตเอทานอลได้มากถึง 8.8 กรัมต่อลิตร

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างตัวอย่างที่เติมและไม่เติมกากน้ำตาล จะเห็นได้ชัดเจนว่าตัวอย่างเติมกากน้ำตาลนั้นเมื่อนำมาทดสอบด้วยเครื่อง HPLC จะมีปริมาณน้ำตาลมากกว่าอย่างเห็นได้ชัด และหลังจากการบ่มพบว่าปริมาณของกลูโคสได้ลดลงจนหมดทั้งในตัวอย่างที่เติมและไม่เติมกากน้ำตาล แต่มีเพียงตัวอย่างที่เติมกากน้ำตาลเท่านั้นที่มีปริมาณของเอทานอลออกมาถึงระดับที่สามารถวัดได้

จากการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างตัวอย่างน้ำเสียและน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาล พบว่าตัวอย่างน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลนั้นมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมากกว่า คือน้ำกลั่นเติมกากน้ำตาลมีความเข้มข้น 8.67 กรัมต่อลิตร และน้ำเสียเติมกากน้ำตาลมีความเข้มข้น 9.15 กรัมต่อลิตรและหลังจากการบ่มพบว่าปริมาณน้ำตาลได้หมดไปทั้ง 2 ตัวอย่าง แต่เมื่อตรวจสอบปริมาณเอทานอลนั้นพบว่าน้ำกลั่นเติมกากน้ำตาลมีมากกว่าคือมีถึง 8.3 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ตัวอย่างน้ำเสียเติมกากน้ำตาลนั้นมี 8.1 กรัมต่อลิตร

จากการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลตั้งต้นและปริมาณของเอทานอลที่ผลิตขึ้นนั้น จะเห็นได้ว่าน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลนั้นมีปริมาณกลูโคสตั้งต้นมากกว่า แต่ผลการทดลองกลับแสดงว่าน้ำกลั่นเติมกากน้ำตาลนั้นมีปริมาณเอทานอลมากกว่าซึ่งไม่ตรงตามทฤษฎีที่ควรจะเป็น ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะต้องทำการเก็บผลให้บ่อยขึ้น ทุก 3 ชม. และเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลเป็น 20 และ 25%

การทดลองที่ 6 การเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียห้องต้มที่เติมกากน้ำตาลและน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาลและเปรียบเทียบ *Saccharomyces cerevisiae* ระหว่างสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้กับสายพันธุ์ทางการค้าโดยให้ความเข้มข้นกากน้ำตาลที่ 17.5 % (V/V) และทดสอบน้ำเสียเติมกากน้ำตาลที่ 20 % (V/V) และ 25 % (V/V)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

- นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 82.5 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 17.5 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ข้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

- นำตัวอย่างน้ำกลั่นปริมาตร 82.5 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 17.5 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ขั้ว จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
- นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 20 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ขั้ว จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
- นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 25 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ขั้ว จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ขั้นตอนการผลิตเอทานอล

- นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ใส่ลงในตัวอย่างน้ำเสียที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° c ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 2 ขั้ว

ขั้นตอนการตรวจสอบ

- ทำสารมาตรฐานกลูโคสโดยใช้กลูโคสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 %

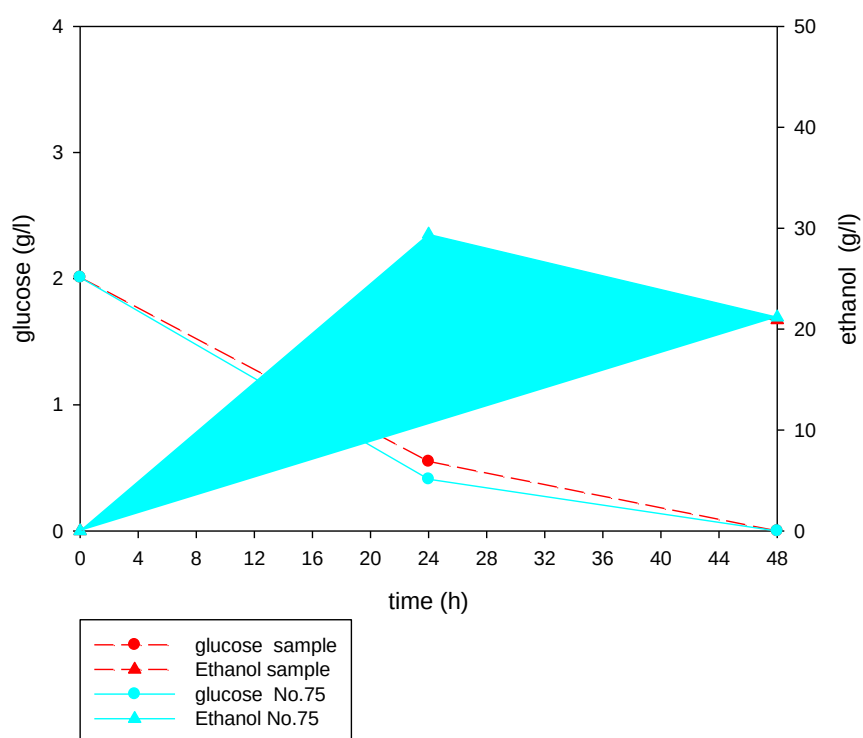
ผลการทดลอง

1. การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลและเอทานอลที่ผลิตขึ้นระหว่างน้ำกลั่นเติมกากน้ำตาลและน้ำเสียเติมกากน้ำตาล

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 17.5%(V/V) นั้นจะมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมากกว่าน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาล และเมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะพบว่าน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลจะได้ปริมาณเอทานอลมากกว่าทั้ง 2 ชนิดของเชื้อ โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 นั้นจะได้มากกว่าอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงแล้ว จะพบว่าปริมาณของเอทานอลได้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยทั้งน้ำเสียและน้ำกลั่นจากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 นั้นจะลดมากกว่าทั้ง 2 ตัวอย่าง

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลต่อการเพิ่มของเอทานอลในน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาลเข้มข้น 17.5% (V/V)

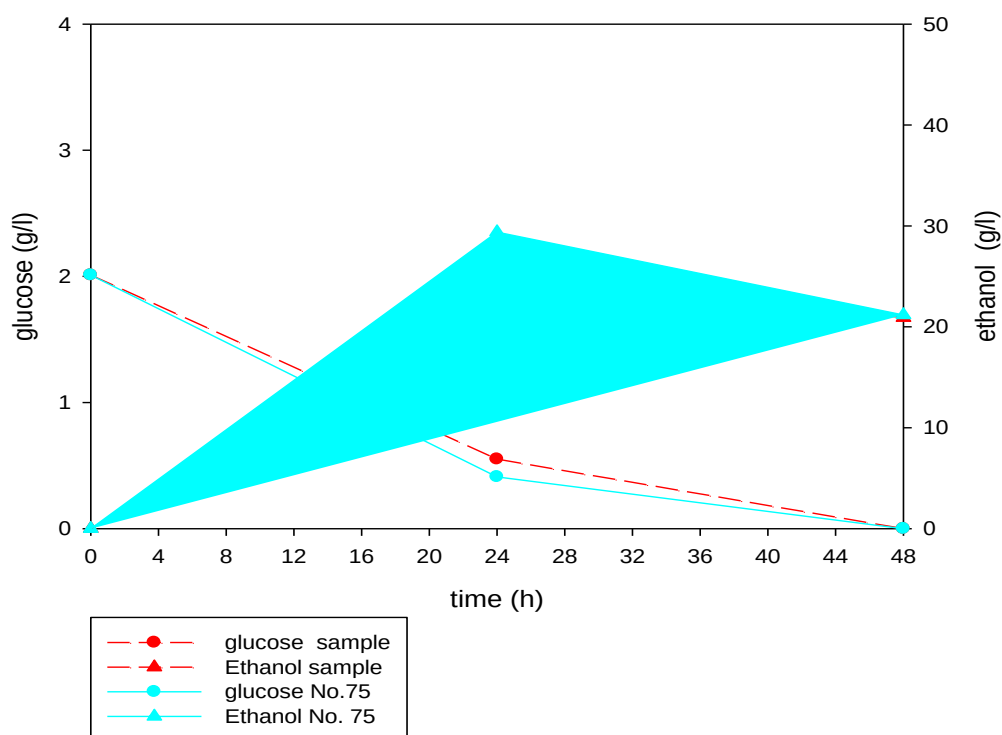
น้ำกลั่น + กากน้ำตาล 17.5 %(V/V)	0 ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	ตัวอย่างจุลินทรีย์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5339	เชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่คัดเลือกได้ No. 75
		เอทานอล (g/l)	1.89	1.89
	24 ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	0.81	0.50
		เอทานอล (g/l)	21.96	23.89
	48 ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	0.00	0.00
		เอทานอล (g/l)	21.17	20.91



รูปที่ 15 ผลของปริมาณน้ำตาลและเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No.75 และเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้าด้วยน้ำเสียและน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 17.5 %(V/V)

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลต่อการเพิ่มของเอทานอลในน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลเข้มข้น 17.5% (V/V)

น้ำเสีย + กากน้ำตาล 17.5 %(V/V)	ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	ตัวอย่างจุลินทรีย์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5339	เชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่คัดเลือกได้ No. 75
			2.01	2.01
	0	เอทานอล (g/l)	0.00	0.00
	24	น้ำตาล (g/l)	0.55	0.41
		เอทานอล (g/l)	24.79	29.39
	48	น้ำตาล (g/l)	0.00	0.00
		เอทานอล (g/l)	20.91	21.17



รูปที่ 16 ผลของปริมาณน้ำตาลและเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 และเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้าด้วยน้ำเสียที่มีความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 17.5%(V/V)

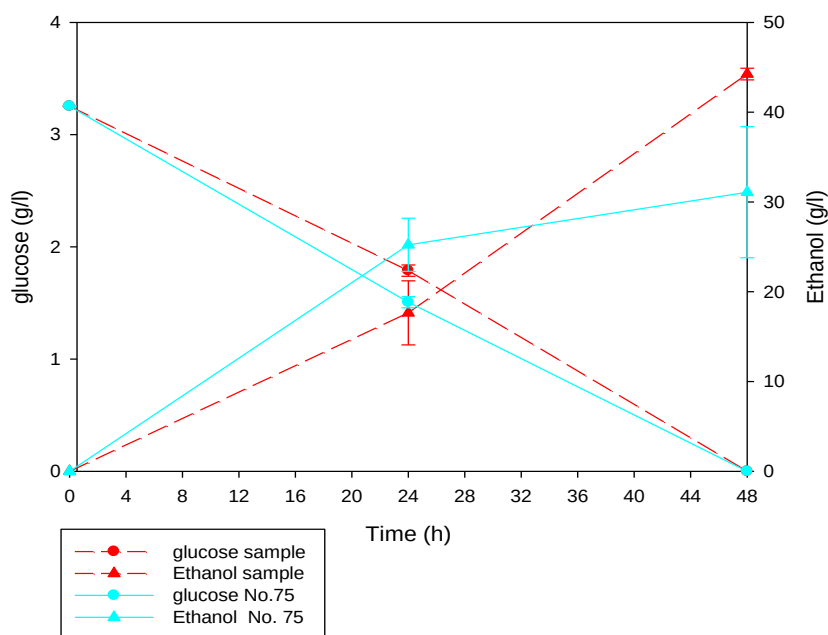
จากการทดลองนี้จะเห็นได้ชัดเจนว่าน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลนั้น มีปริมาณของเอทานอลที่ได้จากการหมักมากกว่าน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาลทั้งในเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 และเชื้อทางการค้า โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 จากการหมักน้ำกลั่นเติมกากน้ำตาลได้สูงสุด 23.89 กรัมต่อลิตร น้ำเสียเติมกากน้ำตาลได้สูงสุด 29.39 กรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างเชื้อทางการค้าจากการหมักน้ำกลั่นเติมกากน้ำตาลได้เอทานอลสูงสุด 21.96 กรัมต่อลิตร และน้ำเสียเติมกากน้ำตาลได้ 24.79 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 13 และ 14) (ตารางที่ 11 และ 12)

2. การผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำเสียที่เติมกากน้ำตาล 20 %(V/V)

จากรูปที่เห็นได้ชัดว่าที่ความเข้มข้น 20 % (V/V) นั้น *Saccharomyces cerevisiae* No.75 มีการใช้น้ำตาลที่รวดเร็วกว่าและมีปริมาณการผลิตเอทานอลมากกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงแล้วจะเห็นได้ว่าน้ำตาลได้หมดลงทั้ง 2 ตัวอย่างและในตัวอย่างที่ใช้ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 นั้นจะมีปริมาณเอทานอลน้อยกว่าจุลินทรีย์ทางการค้าอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลต่อการเพิ่มขึ้นของเอทานอลในน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลเข้มข้น 20 % (V/V)

น้ำเสีย + กากน้ำตาล 20 %(V/V)			ตัวอย่างจุลินทรีย์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5339	เชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่คัดเลือกได้ No. 75
	0 ชั่วโมง	น้ำตาล g/l	3.25	3.25
		เอทานอล g/l	0	0
	24 ชั่วโมง	น้ำตาล g/l	1.79 ± 0.05	1.51 ± 0.05
		เอทานอล g/l	17.65 ± 3.57	25.23 ± 2.96
	48 ชั่วโมง	น้ำตาล g/l	0	0
		เอทานอล g/l	44.25 ± 0.66	31.09 ± 7.3



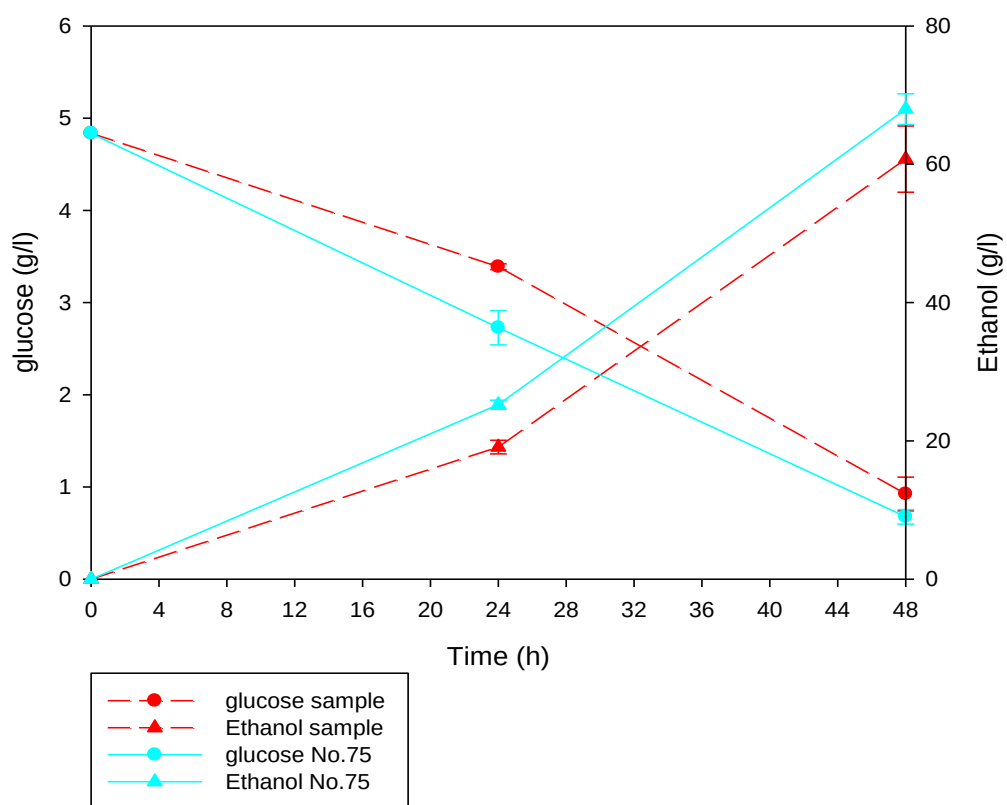
รูปที่ 17 ผลของปริมาณน้ำตาลและเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 และเชื้อตัวอย่างด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (V/V)

3. การผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำเสียที่เติมน้ำตาล 25 % (V/V)

จากรูปที่ 14 จะเห็นว่าตัวอย่าง No.75 นั้นมีการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลมากกว่าอย่างเห็นได้ชัดทั้งในช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ในการทดลองนี้จะเห็นว่าน้ำตาลไม่ได้หมดไปภายในเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลต่อการเพิ่มของเอทานอลในน้ำเสียที่เติมน้ำตาลเข้มข้น 25 % (V/V)

น้ำเสีย + กากน้ำตาล 25% (V/V)			ตัวอย่างจุลินทรีย์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5339	เชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่คัดเลือกได้ No. 75
	0 ชั่วโมง	น้ำตาล g/l	4.84	4.84
		เอทานอล g/l	0.00	0.00
	24 ชั่วโมง	น้ำตาล g/l	3.39 ±0.03	2.73 ±0.19
		เอทานอล g/l	16.71 ±0.85	25.23 ±0.65
	48 ชั่วโมง	น้ำตาล g/l	0.92 ±0.18	0.68 ±0.08
		เอทานอล g/l	53.16 ±4.19	67.97 ±2.21



รูปที่ 18 ผลของปริมาณน้ำตาลและเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 และเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้าด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 25% (V/V)

สรุปผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบระหว่างน้ำกลั่นและน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 17.5 % (V/V) นั้น จะเห็นได้ชัดเจนว่าปริมาณน้ำตาลของน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลมากกว่าน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาลอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าในน้ำเสียนั้นมีปริมาณน้ำตาลอยู่เล็กน้อยและเมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลมีปริมาณเอทานอลมากกว่าน้ำกลั่นที่เติมกากน้ำตาลทั้ง 2 ช่วงเวลาดังนั้นจึงทดลองหาปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการใช้ผสมกับน้ำเสียเพิ่มเติม ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 17.5 และ 20 %

จากการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบปริมาณของเอทานอลที่ผลิตได้ที่ 17.5 % (V/V) และ 20 % (v/v) จะเห็นได้ว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงนั้นเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 จะมีปริมาณเอทานอลมากกว่าและมีการใช้น้ำตาลมากกว่าอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 นั้นมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้รวดเร็วกว่าเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้า แต่เมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลได้ถูกใช้ไปจนหมดทั้ง 2 ชนิดของเชื้อแต่ปริมาณเอทานอลกลับลดลงจากเวลา 24 ชั่วโมงอย่างเห็นได้ชัด โดยผลจากเชื้อตัวอย่างมีปริมาณมากกว่าและเมื่อเทียบการลดลงของเอทานอลนั้นพบว่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 มีการลดลงของเอทานอลมากกว่า

จากการทดสอบที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 25 % (V/V) นั้นจะพบว่าเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมงผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับ 2 การทดลองที่ผ่านมาคือเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 มีการใช้น้ำตาลที่มากกว่าและการผลิตเอทานอลได้ดีกว่า และเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลยังถูกใช้ไม่หมดและไม่มีการลดลงของเอทานอลเหมือน 2 การทดลองที่ผ่านมาและเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 นั้นยังคงมีปริมาณเอทานอลที่มากกว่าอย่างเห็นได้ชัด

จากการทดลองทั้ง 3 ทำให้คาดได้ว่าเมื่อเชื้อใช้น้ำตาลจนหมดแล้วจะใช้เอทานอลในการเจริญเติบโตแทน ดังจะเห็นได้จากการทดลองที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 17.5 และ 20 % (V/V) ที่มีการลดลงของเอทานอลที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งใช้น้ำตาลหมดไปแล้วแต่ใน 25 % (V/V) ที่น้ำตาลยังไม่หมดนั้นยังไม่มีมีการลดลงของเอทานอลที่ผลิตขึ้น ดังนั้นในการทดลองครั้งหน้าจะทำการเก็บตัวอย่างให้บ่อยขึ้นเพื่อหาว่าเวลาใดที่เชื้อใช้น้ำตาลจนหมด และจะมีการเก็บผลการเจริญของเชื้อเพื่อตรวจสอบว่ามีความแตกต่างของการเจริญโดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้นเท่าเดิม คือ 17.5 และ 20%

จากผลการทดลองที่ 5 และ 6 นี้จะเห็นได้ชัดเจนว่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 นั้นมีความสามารถในการผลิตเอทานอลมากกว่าจุลินทรีย์ทางการค้าอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นการทดลองต่อจากนี้จึงจะใช้เพียงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ No. 75 เท่านั้น

การทดลองที่ 7 การเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* No. 75 และความเข้มข้นกากน้ำตาลที่ 17.5% (V/V) และ 20% (V/V)

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ

1. นำ *Saccharomyces cerevisiae* No. 75 มาบ่มในอาหาร YMB 2 flask บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. นำตัวอย่างที่ได้มานับปริมาณเชื้อได้กล้องและปรับปริมาณเชื้อให้เท่ากับ 4×10^3 CFU/ml โดยอาหาร YMB

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

3. นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 82.5 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล 17.5 มิลลิลิตร ทำ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ
4. นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงใน flask 250 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล 20 มิลลิลิตร ทำ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

ขั้นตอนการผลิตเอทานอล

5. นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ใส่ลงในตัวอย่างน้ำเสียจากนั้นปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° c ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาทีและเก็บผลที่เวลา 0, 24, 27, 30, 33, 36, 39 และ 42 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ขั้นตอนการตรวจสอบ

6. นำตัวอย่างที่ผ่านการบ่มแล้วมาตรวจสอบด้วยเครื่อง HPLC
7. ทำสารมาตรฐานเอทานอลโดยใช้ absolute ethanol เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 %
8. ทำสารมาตรฐานกลูโคสโดยใช้ กลูโคสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 %
8. ตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยโดยเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 10^5 , 10^6 และ 10^7 CFU/ml ก่อนนำมา spread plate โดยใช้อาหาร YMA ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ผลการทดลอง

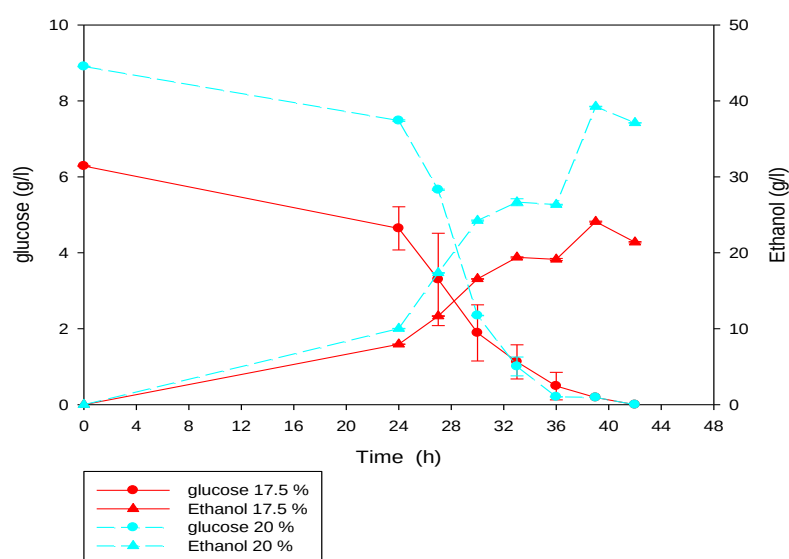
ตารางที่ 15 ผลของปริมาณน้ำตาล และผลของปริมาณเอทานอลที่เชื้อผลิตขึ้นที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 17.5%

ความเข้มข้นกากน้ำตาล 17.5% (V/V)		
ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	เอทานอล (g/l)
0	6.28 ± 0.01	0
24	4.64 ± 0.57	7.96 ± 0.01
27	3.30 ± 1.22	11.66 ± 0.04
30	1.89 ± 0.74	16.56 ± 0.03

33	1.13 ± 0.45	19.39 ± 0.07
36	0.49 ± 0.36	19.12 ± 0.14
39	0.19	24.10 ± 0.07
42	0	21.39 ± 0.08

ตารางที่ 16 ผลของปริมาณน้ำตาลที่ และผลของปริมาณเอทานอลที่เชื้อผลิตขึ้นที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

ความเข้มข้นกากน้ำตาล 20.00 % (V/V)		
ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	เอทานอล (g/l)
0	8.91 ± 0.01	0.00
24	7.48 ± 0.02	10.01 ± 0.03
27	5.66 ± 0.02	17.35 ± 0.04
30	2.35 ± 0.01	24.24 ± 0.07
33	1.01 ± 0.25	26.66 ± 0.46
36	0.21	26.33 ± 0.04
39	0.19	39.26 ± 0.03
42	0.00	37.11 ± 0.01



รูปที่ 19 ผลของปริมาณน้ำตาลที่เวลาต่างๆ และ ผลของปริมาณเอทานอลที่เชื้อผลิตขึ้นที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 17.5 และ 20 % (v/v)

ตารางที่ 17 ปริมาณของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ที่เวลาต่างๆ ของความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 17.5 % (v/v)

ความเข้มข้น กากน้ำตาล 17.5 % (V/V)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
	0	0
	24	3.95×10^6
	27	7.25×10^6
	30	8.75×10^6
	33	1.16×10^7
	36	Contaminate
	39	1.41×10^7
	42	1.34×10^7

ตารางที่ 18 ปริมาณของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ที่เวลาต่างๆ ของความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

ความเข้มข้น กากน้ำตาล 20 % (V/V)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
	0	0
	24	8.9×10^6
	27	1.2×10^7
	30	1.62×10^7
	33	1.86×10^7
	36	2.15×10^7
	39	2.07×10^7
	42	2.37×10^7

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณกากน้ำตาลเข้มข้น 20 % นั้นจะมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลรวดเร็วกว่ากากน้ำตาลเข้มข้น 17.5 % จนกระทั่งถึงช่วงเวลา 36 ชั่วโมงที่มีปริมาณใกล้เคียงกันและหมดพร้อมกันที่ 39 ชั่วโมง (รูปที่ 18) และในการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้นจะเห็นได้ชัดเจนว่าที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 20 % นั้นจะมีปริมาณเอทานอลมากกว่าความเข้มข้นกากน้ำตาล 17.5 % ในทุกๆ ช่วงเวลาและทั้ง 2 ความเข้มข้นมีการเพิ่มขึ้นช้าลงที่ 33-36 ชั่วโมงก่อนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ช่วงเวลา 36 – 39 ชั่วโมงและมีปริมาณเอทานอลมากที่สุดที่ 39 ชั่วโมงโดยมีปริมาณ 39.26 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเอทานอลลดลงที่ 42 ชั่วโมง

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้นต่อปริมาณน้ำตาลที่ลดลงจะเห็นได้ชัดเจนว่ามีปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 39 ชั่วโมง เป็นปริมาณ 39.26 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่น้ำตาลถูกใช้จนหมดพอดี และจากนั้นจะมีปริมาณเอทานอลลดลงหลังจากน้ำตาลถูกใช้จนหมดไปเนื่องจากเชื้อยีสต์จะใช้เอทานอลในการเจริญแทนน้ำตาล

จากผลการทดลองการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์จะพบว่าที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 20 % นั้นมีปริมาณของเชื้อมากกว่า 17.5 % ในทุกๆ ช่วงเวลา แต่ทั้ง 2 ความเข้มข้นนั้นมีการเจริญไปในแนวทางเดียวกันคือมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 -33 ชั่วโมงแต่หลังจาก 36 ชั่วโมงเป็นต้นไปมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ หรือไม่เพิ่มขึ้นเลย

จากการทดลองที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 20% นั้นจะได้ปริมาณของเอทานอลมากกว่าที่ 17.5% แต่ใช้เวลาเท่ากันดังนั้นการทดลองหลังจากนี้จะใช้เพียงกากน้ำตาลความเข้มข้น 20%

การทดลองที่ 8 การเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียที่เดิมกากน้ำตาลโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* No. 75 และความเข้มข้นกากน้ำตาลที่ 20% (V/V) โดยไม่ทำลายจุลินทรีย์เริ่มต้น

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

-นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 80 มิลลิลิตร เติมลงใน flask 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 20 มิลลิลิตร ทำ 2 ซ้ำ

ขั้นตอนการผลิตเอทานอล

- นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ใส่ลงในตัวอย่างน้ำเสีย จากนั้นปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° c ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที และเก็บผลที่เวลา 0, 24, 36, 39 และ 42 ชั่วโมง ตามลำดับ ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ทั้งที่เติมและไม่เติมจุลินทรีย์

ขั้นตอนการตรวจสอบ

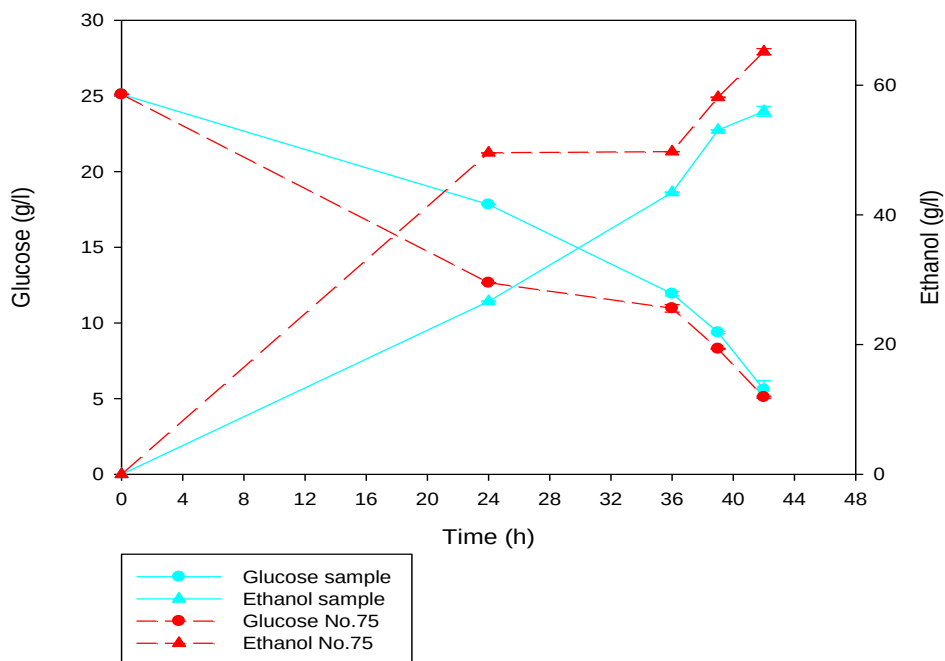
- ทำสารมาตรฐานกลูโคสโดยใช้ กลูโคสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 %
- ตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยโดยเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 10^5 , 10^6 และ 10^7 ก่อนนำมา spread plate โดยใช้อาหาร YMA ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ
- ตรวจสอบค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัด pH

ผลการทดลอง

ตารางที่ 19 ผลของปริมาณน้ำตาล และผลของปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้น ณ เวลาต่างๆ ด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

ไม่เติมเชื้อ		
ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	เอทานอล (g/l)
0	25.10 ± 0.01	0.00
24	17.82 ± 0.03	26.66 ± 0.08
36	11.93 ± 0.14	43.46 ± 0.07
39	9.37 ± 0.08	53.08 ± 0.01
42	5.60 ± 0.58	55.96 ± 0.76

เติมเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> No.75		
ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	เอทานอล (g/l)
0	25.10 ± 0.01	0.00
24	12.65 ± 0.02	49.56 ± 0.01
36	10.97 ± 0.25	49.74 ± 0.00
39	8.29 ± 0.03	58.12 ± 0.04
42	5.10 ± 0.07	65.16 ± 0.46



รูปที่ 20 ผลของปริมาณน้ำตาลที่เวลาต่างๆ และ ผลของปริมาณเอทานอลที่เชื้อผลิตขึ้นที่เวลาต่างๆ ของ การเลี้ยงเชื้อที่เต็มและไม่เต็มเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาล 20 % (v/v)

ตารางที่ 20 ปริมาณของเชื้อที่เวลาต่างๆที่ไม่เต็มเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ของความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
0	6.95×10^4
24	6.30×10^6
36	9.20×10^7
39	8.50×10^8
42	3.95×10^7

ตารางที่ 21 ปริมาณของเชื้อที่เวลาต่างๆที่เต็มเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ของความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
0	ไม่สามารถนับได้
24	4.35×10^7
36	9.90×10^7
39	1.35×10^9
42	3.90×10^7

ตารางที่ 22 ค่า pH ที่เวลาต่างๆ-ซึ่งไม่เต็มเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ของความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

เวลา (ชั่วโมง)	ค่า pH
0	5.069

24	5.016
36	4.974
39	4.965
42	4.963

ตารางที่ 23 ค่า pH ที่เวลาต่างๆที่เวลาต่างๆ ซึ่งเติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ของความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

เวลา (ชั่วโมง)	ค่า pH
0	5.08
24	5.01
36	4.96
39	4.95
42	4.948

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการผลิตเอทานอลทั้งที่เติมจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 และไม่ได้เติม แสดงว่าในน้ำเสียนั้นมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลอยู่แล้ว แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างที่เติมและไม่เติมเชื้อ จะเห็นได้ว่าที่เติมเชื้อลงไปนั้นมีการเจริญของเชื้อและปริมาณการผลิตเอทานอลมากกว่าอย่างเห็นได้ชัดและมีการลดลงของน้ำตาลมากกว่า

ในการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลนั้นเมื่อดูจากรูปที่ 19 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่เติมเชื้อลงไปนั้นมีการลดลงของน้ำตาลและการผลิตเอทานอลมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเชื้อ และเมื่อผ่านไป 42 ชั่วโมง จะเห็นได้ชัดเจนว่าตัวอย่างที่เติมเชื้อลงไปมีปริมาณการผลิตเอทานอลมากกว่าอย่างเห็นได้ชัด

จากการตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะเห็นได้ว่าลักษณะการเจริญของเชื้อนั้นจะคล้ายกัน คือเพิ่มอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0 – 39 ชั่วโมง แต่ที่ 48 ชั่วโมงนั้นมีการลดลงของเชื้ออย่างเห็นได้ชัดเจน และตัวอย่างที่เติมเชื้อลงไปนั้นมีปริมาณเชื้อที่เจริญมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมทำให้คาดได้ว่าเชื้อที่เติมลงไปนั้นมีความสามารถที่จะทนทานและเจริญเติบโตได้ดีกว่าเชื้อที่มีอยู่เดิม

และจากการทดลองหลังจากนี้จะทดลองโดยไม่ทำลายเชื้อดั้งเดิมของน้ำเสีย เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการใช้งานหากมีการนำวิธีการนี้มาใช้จริงในโรงงาน

การทดลองที่ 9 การเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* No. 75 และความเข้มข้นกากน้ำตาลที่ 20% (V/V) โดยไม่ทำลายจุลินทรีย์เริ่มต้นและเก็บผลเพิ่มเติมที่ 42, 45 และ 48 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ

- นำตัวอย่างยีสต์สายพันธุ์ที่ 75 มาบ่มในอาหาร YMB 2 flask บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. นำตัวอย่างที่ได้มานับปริมาณเชื้อได้กล้องและปรับปริมาณเชื้อให้เท่ากับ 4×10^3 CFU/ml โดยอาหาร YMB

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

3. นำตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 80 มิลลิลิตรลงใน flask 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 20 มิลลิลิตร 2 flask

ขั้นตอนการผลิตเอทานอล

4. นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ใส่ลงในตัวอย่างน้ำเสีย จากนั้นปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที และเก็บผลที่เวลา 0, 24, 42, 45 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ทั้งที่เติมและไม่เติมจุลินทรีย์

ขั้นตอนการตรวจสอบ

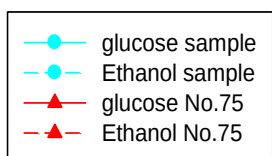
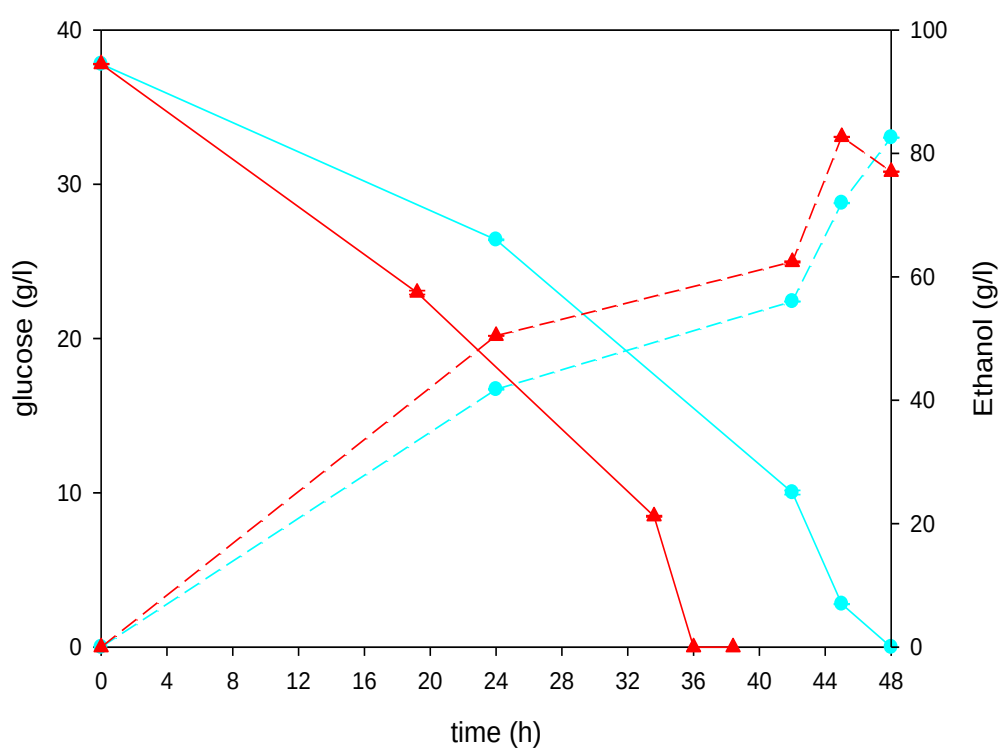
- นำตัวอย่างที่ผ่านการบ่มแล้วมาตรวจสอบด้วยเครื่อง HPLC
- ทำสารมาตรฐานเอทานอลโดยใช้ absolute ethanol เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 %
- ทำสารมาตรฐานกลูโคสโดยใช้ กลูโคสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 %
- ตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยโดยเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 10^5 , 10^6 และ 10^7 ก่อนนำมา spread plate โดยใช้อาหาร YMA ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ
- ตรวจสอบค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัด pH

ผลการทดลอง

ตารางที่ 18 ปริมาณน้ำตาล และเอทานอล ณ เวลาต่างๆ ด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

ไม่เติมเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> No.75		
ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	เอทานอล (g/l)
0	37.79 ± 0.01	0.00
24	26.40 ± 0.03	41.77 ± 0.08
42	10.02 ± 0.14	56.00 ± 0.01
45	2.79 ± 0.02	71.96 ± 0.06
48	0	82.56 ± 0.05

เติมเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> No.75		
ชั่วโมง	น้ำตาล (g/l)	เอทานอล (g/l)
0	37.79 ± 0.02	0.00
24	22.98 ± 0.12	50.45 ± 0.01
42	8.48 ± 0.04	62.41 ± 0.11
45	0	82.68 ± 0.04
48	0	77.03 ± 0.06



รูปที่ 21 ปริมาณน้ำตาลที่เวลาต่างๆ และ ปริมาณเอทานอลที่เชื้อผลิตขึ้นที่เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาล 20 %(V/V)

ตารางที่ 20 ปริมาณของเชื้อที่เวลาต่างๆ ที่ไม่เติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

ไม่เติม จุลินทรีย์	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
	0	7×10^4
	24	5.9×10^6
	42	9.2×10^8
	45	8.5×10^8
	48	3.95×10^8

ตารางที่ 21 ปริมาณของเชื้อที่เวลาต่างๆ ที่เติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

เติม จุลินทรีย์	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)
	0	6.12×10^4
	24	4.28×10^7
	42	9.9×10^8
	45	1.35×10^9
	48	3.9×10^8

ตารางที่ 22 ค่า pH ที่เวลาต่างๆ ที่ไม่เติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

เวลา (ชั่วโมง)	ค่า pH
0	5.075
24	5.013
42	4.956
45	4.915
48	4.882

ตารางที่ 23 ปริมาณของเชื้อที่เวลาต่างๆ ที่เติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* No.75 ความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 % (v/v)

เวลา (ชั่วโมง)	ค่า pH
0	5.077
24	5.012
42	4.952
45	4.904

48	4.871
----	-------

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองนี้จะพบว่า ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อลงไปนั้นจะใช้น้ำตาลหมดภายในเวลา 45 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเชื้อลงไปจะใช้น้ำตาลหมดภายในเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อดูปริมาณของเอทานอลที่ผลิตขึ้นนั้นจะพบว่า ที่เวลา 45 ชั่วโมงของตัวอย่างที่มีการเติมจุลินทรีย์นั้นจะมีปริมาณของเอทานอลที่มากกว่าคือประมาณ 82.68 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์นั้นจะมีปริมาณเอทานอล ออกมา 82.56 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าปริมาณเอทานอลสุดท้ายของตัวอย่างทั้ง 2 นั้นมีความใกล้เคียงกัน แต่ตัวอย่างที่มีการเติมจุลินทรีย์นั้นจะใช้เวลาน้อยกว่าในการผลิต

ในการทดลองนี้เมื่อตรวจสอบค่าความเป็นกรด - เบส (pH) ของตัวอย่างแล้วพบว่าค่า pH มีการลดลงอย่างสม่ำเสมอในชั่วโมงที่ 0 ตัวอย่างที่ไม่ได้เติม และตัวอย่างที่มีการเติมจุลินทรีย์นั้นมีค่า pH ที่ 5.075 และ 5.077 ตามลำดับ และเมื่อเสร็จสิ้นการทดลองที่ 48 ชั่วโมงนั้นมีค่า pH ที่ 4.882 และ 4.871 ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปรวมผลการทดลอง

จากการทดลองทั้ง 8 ทำให้ทราบได้ว่าการที่จะผลิตเอทานอลจากน้ำเสียให้คุ้มค่าทั้งเวลาและปริมาณสารที่ใช้นั้นจะต้องใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 20%(v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการบ่ม 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งจากข้อมูลนี้จะนำไปใช้ในการทดลองในส่วนที่ 2 คือการขยายขนาดลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

อชนี ภาสุรปัญญา. 2554. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ เรื่อง การคัดแยกและจำแนกทางชีววิทยาโมเลกุลของยีสต์ที่มีความสามารถในการทนต่อสภาวะความเครียดต่างๆ จากโรงงานน้ำตาลทราย. อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร.ชูลี ยมภักดี. หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาวิตรี ลิ้มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

D' Amore T., C.J. Panchal, I. Russell and G.G. Stewart. 1988. Osmotic Pressure Effects and Intracellular Accumulation of Ethanol in Yeast during Fermentation. Industrial Microbiology. 2: 365.

Bao, X., Gao, D., Qu, Y., Wang, Z., Walfridson, M. and Hahn-Hagerdal, B. (1997) Effect on product formation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing different levels of xylose metabolic genes. Chin. J. Biotechnol. 13, 225-231.

J. N. Nigam (2000) Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*, Biochemistry Division, Regional Research Laboratory, Jorhat 785 006, Assam, India, Journal of Biotechnology Volume 87, Issue 1, 27 April 2001, Pages 17-27

Jerjes, T.W. and Jin, Y.-S. (2000) Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. Adv. Appl. Microbiol. 47, 221-268.

Jerjes, T.W. and Shi, N.-Q. (1999) Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 65, 117-161.

Kripa, R., Vaibhav, C., Sasidhar, V. and Dong-Shik, Kim. 2007. Enhanced ethanol fermentation of brewery wastewater using the genetically modified strain *E. coli* KO11. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(1): 50-60.

Min-Eui Hong, Ki-Sung Lee, Byung Jo Yu, Young-Je Sung, Sung Min Park, Hyun Min Koo, Dae-Hyuk Kweon, Jae Chan Park, Yong-Su Jin. 2010. Journal of Biotechnology, 149: 52-59.

Ryabova, O.B., Gonchar, M.V., Zaczek, A., Grabek, D., Sibirny, V.A., Kotylak, Z. and Sibirny, A.A. (2002) Xylose and glucose fermentation to ethanol and acetaldehyde by the

thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. In: Abstracts second *Hansenula polymorpha* Worldwide Network Conference, Tenerife, Spain, 2002, p.13.

ภาคผนวก

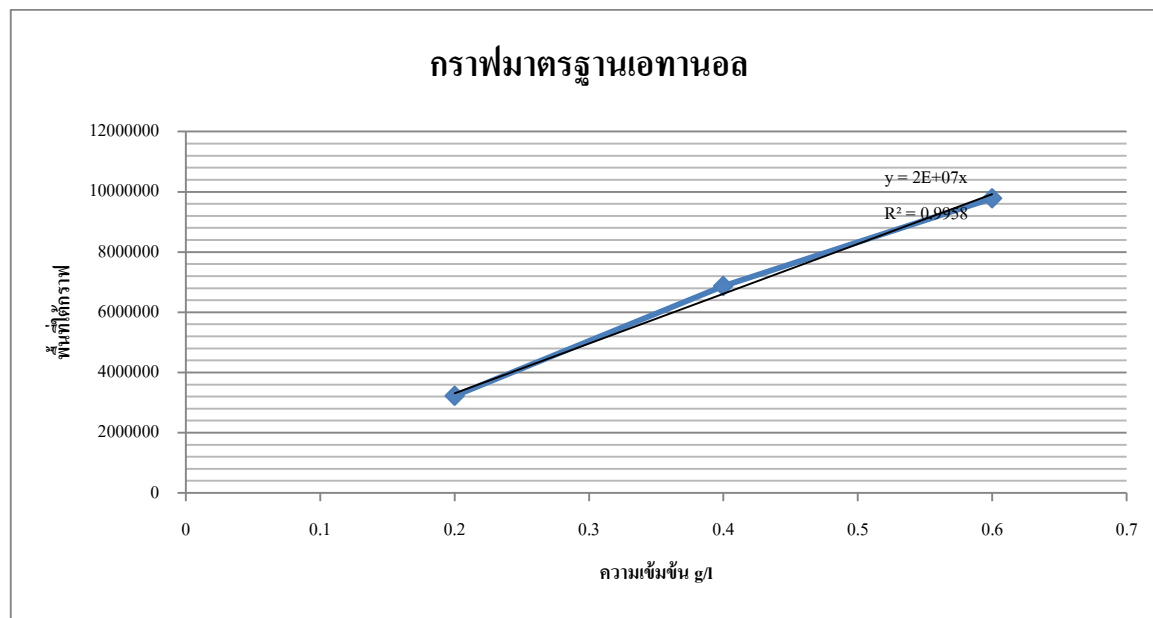
สูตรอาหาร Yeast Malt Agar (YMA)

Peptone	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Malt extract	3 กรัม
D-glucose	20 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ทำการฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121° C ความดัน 15 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ในน้ำหมัก

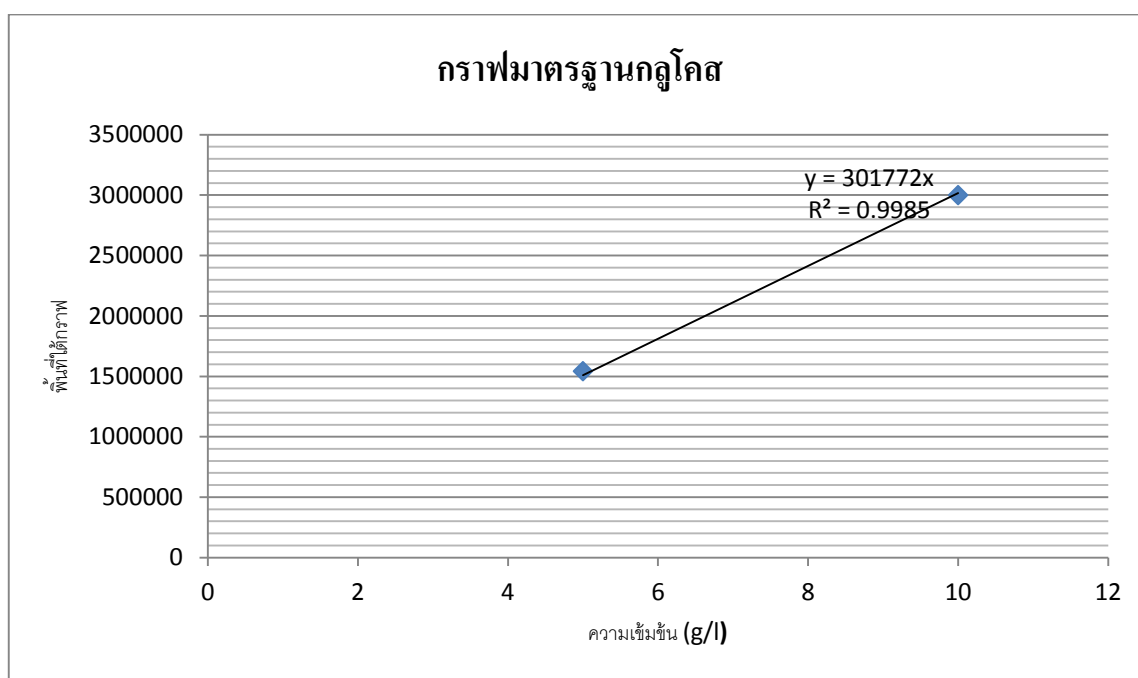
ตรวจวิเคราะห์เอทานอลด้วยวิธี โครมาโทกราฟี ของเหลว สมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้ Aminex hpx-87 H column (Bio Rad) และ 0.3 mM sulfuric acid (H₂SO₄) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และค่าอัตราการไหล (Flow rate) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการวิเคราะห์ที่ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานเอทานอล

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ในน้ำหมัก

ตรวจวิเคราะห์กลูโคสด้วยวิธี โครมาโทกราฟี ของเหลว สมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้ Aminex hpx-87 H column (Bio Rad) และ 0.3 mM sulfuric acid (H₂SO₄) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และค่าอัตราการไหล (Flow rate) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการวิเคราะห์ที่ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานกลูโคส