การคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

คุณากร เชื้อสุวรรณ์

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤศจิกายน 2549
ISBN 974-5029-54-8
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ คุณากร เชื้อสุวรรณ์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

.....กรรมการ
(ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

.....กรรมการ
(ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

.....กรรมการ
(ดร. ศิววรรณ พูลพันธุ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมถวิล จริตควร)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประทุม ม่วงมี)
วันที่ 14 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2549

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา
จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2548

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางทั้งทางด้านวิชาการ และปฏิบัติที่ถูกต้อง แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดีเสมอมา ตลอดจนให้ความช่วยเหลือสนับสนุนทางด้านต่าง ๆ ทำให้การวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวภา ไหวพริบ และ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ที่ทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ คุณอภิลักษณ์ ลอยล่อง คุณวรนาฎ จงโยธา คุณจิราพันธ์ แป้นดี ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา คุณภุมรี กัณฑ์ราย และบัณฑิตวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดี

ท้ายที่สุดขอขอบคุณทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ให้คำปรึกษา ข้อแนะนำ และกำลังใจในการทำการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ความดีของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบแด่ครอบครัวเชื้อสุวรรณ์ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษามาโดยตลอด รวมทั้งคณาจารย์ทุกคนที่ได้อบรมสั่งสอนมา

คุณากร เชื้อสุวรรณ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

45911837:สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วทม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
คำสำคัญ: เอทานอล/ กระบวนการหมักโดยมีการเติมอาหารลงไปเพียงครั้งเดียว/
กระบวนการหมักโดยมีการเติมอาหารลงไปเป็นระยะ/ สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

คุณากร เชื้อสุวรรณ์: การคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (SELECTION OF YEAST STRAIN FOR ETHANOL PRODUCTION FROM SACCHARIFIED CASSAVA STARCH) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์: ศิริโฉม ทุ่งเก้า, Ph.D., เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, Ph.D., เยาวภา ไหวพริบ, Ph.D., กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, Ph.D. 118 หน้า. ปี พ.ศ. 2548. ISBN 974-5029-54-8

งานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ 5 สายพันธุ์ ในการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และได้คัดเลือกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (TC6) นำมาศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ แป้งถั่วเหลือง และน้ำแป้งถั่วเหลือง ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 4 และ 8 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเติมน้ำแป้งถั่วเหลืองที่ระดับเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด จากนั้นจึงทำการศึกษาการผลิตเอทานอลแบบแบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีการแปรผันการกวนด้วยความเร็ว 50 100 200 และ 400 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อทำการกวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จะให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตร สูงอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเทียบกับสภาวะอื่น ๆ โดยมีค่าเท่ากับ 10.11 % (v/v) จากนั้นจึงทำการศึกษาการผลิตเอทานอลแบบเฟดแบตช์ โดยใช้น้ำแป้งถั่วเหลืองเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และแปรผันอัตราการเติมอาหารที่ $\mu = \mu_{max}$ $\mu = 2/3\mu_{max}$ และ $\mu = 1/3\mu_{max}$ พบว่าการเติมอาหารโดยที่อัตรา $\mu = \mu_{max}$ และ $\mu = 2/3\mu_{max}$ จะให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตร สูงเท่ากันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเทียบกับสภาวะอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 8.81 และ 8.83 % (v/v) ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลแบบแบตช์ และเฟดแบตช์ พบว่าการหมักแบบแบตช์ โดยมีการเติมน้ำแป้งถั่วเหลืองเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จะมีค่าการผลิตเอทานอลสูงอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเทียบกับสภาวะอื่น

45911837: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)
KEYWORDS: ETHANOL/ BATCH FERMENTATION/ FED BATCH FERMENTATION/ SACCHARIFICATION CASSAVA STARCH

KUNAGON CHEUSUWON: SELECTION OF YEST STRAIN FOR ETHANOL PRODUCTION FROM SACCHARIFICED CASSAVA STARCH. THESIS ADVISORS; SIRICHOM THUNGKAO, Ph.D., SAETAWAT CHAMSAT, Ph.D., YAOWAPA WAIPRIB, Ph.D., KRONGJAN RATTANAPRADIT, Ph.D. 118 P. 2006. ISBN 974-5029-54-8

In this research,a *Saccharomyces cerevisiae* TC6 strain was selected from 5 *Saccharomyces* yeasts for ethanol production from saccharified cassava starch (SCS) as a carbon source. The influence of the following nitrogen sources: $(NH_4)_2SO_4$, urea, yeast extract, soy liquor and soy liqour, in ethanol production of this yeast strain was investigated.The results revealed that soy flour at 1 g/l concentration was the most preferable in ethanol production. The effect of agitation rate (50, 100, 200 and 400 rpm.) in ethanol production in batch process was then conducted in 5 l fermenter. It was found that agitation at 200 rpm. significantly ($p<0.05$) increased the ethanol production of yeast to 10.11 % (v/v). Moreover, the fed batch prodcution of ethanol in 5 l fermenter was also conducted using feed rates of $\mu=\mu_{max}$ $\mu=2/3\mu_{max}$ and $\mu=1/3\mu_{max}$. The results showed that feeding at $\mu=\mu_{max}$ and $\mu=2/3\mu_{max}$ gave significantly higher ethanol concentration at 8.81 and 8.83 % (v/v), respectively. When batch and fed batch processes were compared, the data revealed that the use of batch process with agitation rate of 200 rpm. was significantly higher ($p<0.05$) in ethanol production was obtained from SCS containing 1 g/l soy liquor.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมติฐานของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
เอทานอล	4
คุณสมบัติของเอทานอล	4
ประโยชน์ของเอทานอล	6
การผลิตเอทนอล	7
จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอล	8
จุลชีววิทยาและชีวเคมีของการหมักเอทานอล	8
กระบวนการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม	13
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอล	16
วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลโดยการหมัก	19
สถานการณ์การผลิตเอทานอลในต่างประเทศ	20
ความเป็นมาเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลในประเทศไทย	21

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	มันสำปะหลัง	22
	กระบวนการผลิตมันเส้นและมันอัดเม็ด	23
	กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังแบบสลัดแห้ง	25
	สถานการณ์การผลิตและส่งออกมันสำปะหลังของไทย	27
	การหมักเอทานอลโดยใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ	30
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	35
3	วิธีการดำเนินการวิจัย	39
	จุลินทรีย์	39
	สารเคมี	39
	อาหารเลี้ยงเชื้อ	39
	เครื่องมือทดลอง	39
	วิธีการทดลอง	40
	การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง	40
	การศึกษาปัจจัยของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้	42
	การหมักเอทานอลแบบแบตช์ (Batch Fermentation) โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร	42
	การหมักเอทานอลแบบเฟดแบตช์ (Fed-Batch Fermentation) โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร	43
	การจัดจำแนกยีสต์ที่คัดเลือกได้	44
	การวิเคราะห์ทางสถิติ	44
4	ผลการวิจัย	45
	การคัดเลือกยีสต์สำหรับผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง	45
	ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้	47

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
	การหมักเอทานอลแบบแบตช์ โดยขนายขนาดเป็น 3 ลิตร	53
	การหมักเอทานอลแบบเฟดแบตช์ โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร	55
5	อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	58
	การคัดเลือกยีสต์สำหรับผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง	58
	ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้	59
	การผลิตเอทานอลแบบแบตช์โดยขนายขนาดเป็น 3 ลิตร	62
	การผลิตเอทานอลแบบเฟดแบตช์โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร	65
	สรุปผลการวิจัย	68
	ข้อเสนอแนะ	69
	บรรณานุกรม	70
	ภาคผนวก	75
	ภาคผนวก ก	76
	ภาคผนวก ข	80
	ภาคผนวก ค	85
	ภาคผนวก ง	94
	ภาคผนวก จ	96
	ประวัติย่อของผู้วิจัย	118

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 สารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับยีสต์..... 17

2-2 ความเข้มข้นของแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์..... 18

2-3 ความสามารถของยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* และ *Kluyveromyces* ในการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ..... 19

2-4 องค์กระกอบของหัวมันสำปะหลัง..... 24

4-1 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการหมักแบบแบตช์ของเชื้อยีสต์ 5 ชนิด โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 170.28 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่เขย่า เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 46

4-2 ค่าความเข้มข้นของเอทานอลโดยปริมาตร เมื่อทำการหมักเอทานอล โดยใช้สารละลาย SCS เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป 5 ชนิด เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน..... 47

4-3 ค่าความเข้มข้นของเอทานอลโดยน้ำหนัก เมื่อทำการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลาย SCS เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป 5 ชนิด เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน..... 48

4-4 ค่าปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการหมัก เมื่อทำการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลาย SCS เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป 5 ชนิด เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งนโตรเจน..... 49

4-5 ค่าผลผลิตเอทานอล เมื่อทำการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลาย SCS เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป 5 ชนิด เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน..... 50

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-6 ค่าผลผลิตมวลเซลล์ เมื่อทำการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลาย SCS เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป 5 ชนิด เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน..... 51

4-7 ค่าปริมาณเอทานอลที่ได้เทียบกับทฤษฎี เมื่อทำการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลาย SCS เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป 5 ชนิดเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน..... 52

4-8 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการหมักแบบแบตช์ ที่มีการแปรผันความเร็วในการกวนเป็น 50, 100, 200 และ 400 รอบต่อนาที (RPM.) โดยใช้การทดลองควบคุม (C) เป็นการเติมแหล่งไนโตรเจน แต่ไม่มีการกวน..... 54

4-9 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการหมักแบบเฟดแบตช์โดยมีการแปรผันอัตราในการเติมอาหารเท่ากับ $\mu = \mu_{max}$, $\mu = 2/3\mu_{max}$ และ $\mu = 1/3\mu_{max}$ ตามลำดับ โดยมีการทดลองควบคุม (C) เป็นการเติมแหล่งไนโตรเจน แต่ไม่มีการกวน..... 56

6-1 ผลการผลิตเอทานอลแบบแบตช์และแบบเฟดแบตช์เมื่อขยายขนาดการผลิตเป็น 3 ลิตร..... 76

6-2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา..... 86

6-3 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR..... 88

6-4 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ของยีน 18S rRNA..... 88

6-5 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อ TC6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank..... 93

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	กระบวนการ Embden-Meyerhof-Pathway หรือ วิถี Glycolysis	9
2-2	กระบวนการหมักแอลกอฮอล์	10
2-3	โคเอนไซม์ไทอะมีนไพโรฟอสเฟต	11
2-4	การทำงานของไทอะมีนไพโรฟอสเฟต	11
2-5	แผนภูมิกระบวนการผลิตมันเส้นและมันอัดเม็ด	25
2-6	กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังแบบสลัดแห้ง	27
2-7	ภาพรวมสัดส่วนการใช้และการส่งออกมันสำปะหลังของไทย ปีพ.ศ. 2547/48	29
2-8	ภาพรวมอุตสาหกรรมจากมันสำปะหลังปี 2543	30
2-9	สมการเคมีของการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล และเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์	32
2-10	กรรมวิธีผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง แสดงกรณีตัวอย่างในโรงงานต้นแบบผลิตแอลกอฮอล์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่มีขนาดกำลังผลิตเอทานอลไร้น้ำ 1,500 ลิตรต่อวัน	34
6-1	การหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) จากค่าความชัน (Slope) ของกราฟ	84
6-2	ยีน 18S rRNA ของยีสต์ไอโซเลท TC6 ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR เลนส์ M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน Hyperladder Marker, เลนส์ 1: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีสต์ไอโซเลท TC6	91
6-3	การสร้าง Contiq จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อ TC6 ซึ่งวิเคราะห์ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ NS1, NS8 และ NS5	92
6-4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อ TC6	93
6-5	ผลจากการทดลองแยกชนิดของน้ำตาลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง	95

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University