ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการหมักที่เหมาะสม ในการผลิตเอทานอลจากมันเทศ

Optimization of Medium Components and Fermentation Conditions for Ethanol Production from Sweet Potato

นายอำนวย อรรถลังรอง[๑/] ผศ. ดร. เชาวรีย์ อรรถลังรอง[๒/] กนกวรรณ แสงสุวรรณ[๒/]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ใช้มันเทศเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล โดยมันเทศมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญ และยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่หาได้ง่าย เจริญได้ดีในสภาพอากาศของประเทศไทย อีกทั้งยังเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดทั้งปี จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้พัฒนากระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเทศที่ผ่านการย่อยแล้ว โดยใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูง คือ *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ หมักในอาหารที่มีองค์ประกอบของยีสต์เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ ซึ่งพบว่าภาวะการหมักที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เขย่าที่ ๑๗๐ รอบต่อนาที มีค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้น ๕.๕ หมักเป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง และศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยศึกษา ๓ ปัจจัยคือ ยีสต์เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟตด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ใช้แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD) จากผลการทดลองในระดับขวดเขย่าพบว่าได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด ๑๕.๒๕% (v/v) จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นประมาณ ๒๕๐ กรัมต่อลิตร เมื่อมีองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ยีสต์เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ ๓๐ กรัมต่อลิตร เปปโทน ๑๕ กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต ๑.๐ กรัมต่อลิตร หมักเป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง และค่าเอทานอลที่ได้จากการทำนายเป็น ๑๕.๒๗% (v/v) จากการทวนสอบมีค่าเอทานอลใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย สำหรับการทดลองในถังหมักขนาด ๕ ลิตร โดยใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อภาวะเดียวกับระดับขวดเขย่า พบว่าในชั่วโมงที่ ๗๒ และ ๘๔ ได้ค่าเอทานอล ๑๔.๓๙% (v/v) และ ๑๕.๖๑% (v/v) ตามลำดับ และมีค่าผลผลิตเอทานอลเป็น ๐.๔๗๘ และ ๐.๔๘๓ ตามลำดับ

[๑/]สถาบันวิจัยพืชสวน

[๒/]มหาวิทยาลัยศิลปากร * * วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

๑. คำนำ

ในอดีตแหล่งพลังงานหลักของโลก คือแหล่งน้ำมันปิโตรเลียมที่เกิดจากการทับถมของซากฟอสซิลใต้ทะเล ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด และมีการใช้หมดไปอย่างรวดเร็ว อีกทั้งการเผาไหม้น้ำมันปิโตรเลียมยังส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมให้มีสภาพที่เสื่อมโทรมลง รวมไปถึงราคาน้ำมันดิบที่มีราคาพุ่งสูงขึ้น และปริมาณการสะสมน้ำมันดิบในโลกลดน้อยลง ส่งผลให้เกิดสภาวะวิกฤตทางน้ำมัน (สำนักวิจัยค้นคว้าพลังงาน กรมพัฒนาพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, ๒๕๕๓) ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเชื้อเพลิงทางเลือกใหม่ขึ้นมาทดแทนน้ำมันดิบโดยเฉพาะประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา เยอรมนี อังกฤษ และญี่ปุ่น โดยการนำวัตถุดิบจากธรรมชาติมาใช้ในกระบวนการผลิต โดยเชื้อเพลิงทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจมากคือเอทานอล ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสะอาดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงได้ จากข้อมูลของสถาบันวิจัยพืชไร่ รายงานว่า เอทานอลจัดเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ที่เกิดจากการหมักของพืช เศษซากพืช เช่น อ้อย น้ำตาล กากน้ำตาล กากอ้อย บีทรูท แป้งมันสำปะหลัง มันเทศ และธัญพืชต่าง ๆ โดยผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล และเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลโดยอาศัยจุลินทรีย์ (สถาบันวิจัยพืชไร่ และพืชทดแทนพลังงาน, ๒๕๕๕)

เอทานอลมีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน จุดหลอมเหลว -๑๑๔.๑ องศาเซลเซียส จุดเดือด ๗๘.๕ องศาเซลเซียส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย อาทิ ใช้ผลิตอาหาร และเครื่องดื่ม ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิง เป็นต้น (วิโรจน์ พุทธวิถี, ๒๕๕๓)

กระบวนการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม มีกระบวนการผลิต ๒ แบบ คือ

๑. การสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้เอทิลีนเป็นวัตถุดิบซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากปฏิกิริยาสังเคราะห์เมทานอล

๒. การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมัก โดยใช้วัสดุทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบประเภทแป้ง น้ำตาลหรือเซลลูโลส ผ่านกระบวนการทางชีวเคมีได้เป็นไบโอเอทานอล (Bio-ethanol) โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบที่ไม่ใช่น้ำตาล เช่น แป้งหรือเซลลูโลส ต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ก่อนโดยอาศัยเอนไซม์หรือย่อยด้วยกรด จากนั้นจึงหมักให้ได้เอทานอลโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ (พูนศุข อัตถะสัมปุณณะ และคณะ, ๒๕๔๐) ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มยีสต์

เอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลมี ๒ ชนิด คือ

๑. แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase; E.C.๓.๒.๑.๑) ทำหน้าที่ย่อยสลายแป้งโดยตัดแบบสุ่ม ทำให้เกิดน้ำตาลสายสั้นลงคือ เด็กซ์ตรินและ oligosaccharides เรียกขั้นตอนนี้ว่า Liquefaction เมื่อใช้แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสารละลายแป้งจะทำให้มีความหนืดลดลง และย้อมติดสีไอโอดีนได้ลดลง (Aehle, ๒๐๐๔)

๒. อะไมโลกลูโคไซเดส (Amyloglucosidase; E.C.๓.๒.๑.๓) มักถูกเรียกว่า กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) หรือชื่อทางอุตสาหกรรมว่า AMG เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเด็กซ์ตรินให้ได้น้ำตาลกลูโคส เรียกกระบวนการนี้ว่า Saccharification (Oh et al., ๒๐๐๕)

มันเทศ (*Ipomoea batatas* L) เป็นพืชที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง และจัดเป็นพืชเถาเลื้อยที่อยู่ในตระกูลเดียวกับผักบุ้ง เป็นพืชที่ปลูกง่ายเจริญได้ดีในอากาศค่อนข้างร้อน ทนความแห้งแล้งได้ดี (ไสว พงษ์เก่า และโสภณ สินธุประมา, ๒๕๕๒) ดินที่เหมาะแก่การปลูกมันเทศมากที่สุดคือ ดินร่วนปนทราย ซึ่งมีการระบายน้ำได้ดี ในประเทศไทยสามารถปลูกมันเทศได้ทั่วทุกภาค ในปัจจุบันการนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมยังไม่มากเท่าที่ควร ทั้งนี้มันเทศมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ใช้ระยะเวลาในการปลูกที่สั้นกว่ามันสำปะหลัง และให้ผลผลิตที่สูงใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังสามารถปลูกได้ในทุกฤดู ซึ่งเป็นการช่วยแก้ไขปัญหาในกรณีที่มันสำปะหลังไม่เพียงพอต่อการป้อนโรงงานผลิตเอทานอล การนำมันเทศมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ นอกจากจะช่วยแก้ปัญหาในกรณีการขาดแคลนมันสำปะหลัง ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของมันเทศให้สูงขึ้นด้วย (สิริวุทธ์ เสียมภักดี, ๒๕๕๒) เอทานอลที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ อุตสาหกรรมยา เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและชีวเคมี เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในเชื้อเพลิงเบนซิน ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม เป็นต้น (คณะกรรมาธิการการพลังงาน, ๒๕๔๕)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาและพัฒนาการหมักเอทานอลโดยใช้มันเทศเป็นวัตถุดิบ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาต่อยอดในระดับอุตสาหกรรม โดยศึกษาถึงปัจจัยและภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักเอทานอล เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ความเร็วรอบในการเขย่า ระยะเวลาในการหมัก และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการนำยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของอาหารหมักโดยใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งนอกจากจะเป็นการช่วยกำจัดของเหลือทิ้งแล้ว ยังเป็นการช่วยลดต้นทุนทดแทนการใช้องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาแพงในการผลิตเอทานอลได้

๒. วิธีดำเนินการ

- วัสดุและอุปกรณ์

๑. มันเทศพันธุ์ไต้หวัน

๒. ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์

๓. แอลฟา-อะไมเลสชนิดทนความร้อน (thermostable **α**-amylase) ที่ใช้คือ BAN™ ๒๔๐L (Novozymes A/S, Denmark) ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* โดยมีกิจกรรม ≥ ๒๕๐ หน่วยต่อกรัม ซึ่งทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ ๗๐-๙๐ องศาเซลเซียส

๔. กลูโคอะไมเลส (Amyloglucosidase, บริษัท SIGMA-ALDRICH, Novozymes A/S, Denmark ผลิตจาก *Aspergillus niger* มีกิจกรรมเอนไซม์ ๓๐๐ units/ml

๕. สารเคมีอื่นๆ

๖. อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องทดลอง

- วิธีการ

๑. ปลูกมันเทศพันธุ์ไต้หวันและเก็บเกี่ยวหัวมันเทศเมื่ออายุ ๑๒๐ วัน คัดเลือกหัวมันเทศที่มีคุณภาพดี น้ำหนักไม่น้อยกว่า ๓๐๐ กรัม นำมาล้างและนึ่งให้สุก ปอกเปลือกและบดผสมเนื้อมันเทศที่นึ่งสุกให้เป็นเนื้อเดียว เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองต่อไป

๒. การเตรียมสารละลายน้ำตาลจากมันเทศ ย่อยมันเทศในข้อ ๑ ด้วยเอนไซม์ตามวิธีการของ Adthalungrong (๒๐๑๒) โดยนำมันเทศมาล้างและนึ่งให้สุกเป็นเวลา ๓๐ นาที ปอกเปลือกและบดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปใช้ในขั้นตอนการย่อยมันเทศให้ได้น้ำตาลกลูโคส โดยใช้มันเทศต่อน้ำกลั่น ๕๐:๕๐ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ ๖.๐ นำมาย่อยด้วยแอลฟา-อะไมเลสโดยเติมเอนไซม์ ๐.๑๐% ของน้ำหนักมันเทศ ควบคุมอุณหภูมิที่ ๗๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๒๐ นาที จากนั้น ปรับลดอุณหภูมิลงมาที่ ๖๕ องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง ๔.๕ เติมกลูโคอะไมเลส ๐.๑๐% ของน้ำหนักมันเทศ และย่อยต่อไปอีก ๔๘ ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย่อยมันเทศแล้ว จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ ๙๕-๙๘ กรัมต่อลิตร และ ๑๐๕-๑๑๒ กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำสารละลายน้ำตาลที่ได้ไปต้มที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียสนาน ๕ นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ แยกตะกอนทิ้งโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ รอบต่อนาที อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที เมื่อได้สารละลายน้ำตาลที่ใสแล้วทำให้เข้มข้นขึ้น โดยนำไปต้มหรือระเหยน้ำออกด้วยวิธี evaporation ซึ่งจะได้สารละลายน้ำตาลที่พร้อมสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอน หรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

๓. เตรียมหัวเชื้อสำหรับการหมักเอทานอล โดยเลี้ยงบนหลอดอาหารแข็ง YM ซึ่งใน ๑ ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส ๒๐ กรัม สารสกัดจากยีสต์ ๓ กรัม โพลีเปปโทน ๕ กรัม สารสกัดจากมอลต์ ๓ กรัม วุ้นผง ๒๐ กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ ๑ ลิตร (Pereira *et al*., ๒๐๑๐) บ่มให้เจริญดีที่ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง

จากนั้นเตรียมอาหารเหลว YPD ซึ่งใน ๑ ลิตรประกอบด้วย กลูโคส ๒๐ กรัม สารสกัดจากยีสต์ ๑๐ กรัม เปปโทน ๒๐ กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ ๑ ลิตร (Pereira *et al*., ๒๐๑๐) เตรียมในขวดรูปชมพู่ขนาด ๒๕๐ มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร ๑๐๐ มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเป็น ๕.๕ และฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ความดัน ๑.๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา ๑๕ นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและถ่ายหัวเชื้อที่ต้องการทดสอบจากหลอดอาหารแข็ง YM ๑-๒ ลูป ลงในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง โดยเขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที

เมื่อครบเวลาในการบ่ม นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ ๔ องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ ๗๕๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๕ นาที (ทิ้งส่วนใส) ล้างตะกอนด้วย ๐.๑% peptone สองครั้ง จากนั้นปรับค่า $OD_{๖๖๐}$ ให้ได้ประมาณ ๑.๐ ด้วย ๐.๑% peptone ซึ่งจะได้หัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ $๑๐^{๗}$ CFU/ml ที่พร้อมใช้ในการหมักเอทานอล โดยใช้หัวเชื้อ ๑๐% ของอาหารที่ใช้หมัก เพื่อให้มีเชื้อเริ่มต้นในอาหารหมักประมาณ $๑๐^{๖}$ CFU/ml

๔. การเก็บรักษาหัวเชื้อ โดยวิธีแช่แข็งในอาหารเหลวที่เติม ๑๕% (v/v) glycerol โดยเลี้ยงหัวเชื้อให้เจริญเต็มจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้ cotton swab ป้ายเชื้อมาให้มากพอสมควรนำมาใส่หลอด cryotube ที่มีอาหาร YM broth ผสมกับ ๑๕% (v/v) glycerol ทำให้เชื้อกระจายในอาหารอย่างดี แล้วเก็บที่ตู้แช่แข็ง -๘๐ องศาเซลเซียส และในถังไนโตรเจนเหลว และเก็บแบบชั่วคราวเพื่อใช้งานบนอาหารแข็ง YM ที่ ๔ องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อทุกเดือน

๕. การผลิตเอทานอลจากมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ดำเนินการดังนี้

นำสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ ซึ่งได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จังหวัดปทุมธานี มาหมักเอทานอล โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการย่อยแป้งในมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการหมัก

อาหารสำหรับการหมักเอทานอลที่ใช้ในงานวิจัยนี้เลือกใช้อาหารเหลวสูตร ๒YP อ้างอิงจากงานวิจัยของ Pereira และคณะ (๒๐๑๐) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสสูงถึง ๒๙๐-๓๓๐ กรัมต่อลิตร โดยยีสต์สามารถเจริญเติบโตและหมักเอทานอลได้ดี (ใน ๑ ลิตรของอาหารเหลวสูตร ๒YP ประกอบด้วย กลูโคส ๓๐๐ กรัม สารสกัดจากยีสต์ ๒๐ กรัม เปปโทน ๔๐ กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ ๑ ลิตร)

การเตรียมอาหารหมักจะใช้สารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้จากการย่อยมันเทศ นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในสารละลาย และปรับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสให้ได้ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร ตามสูตรอาหารหมักข้างต้น เติมอาหารหมักที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น ๕.๕ ปริมาตร ๕๔ มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด ๑๐๐ มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมปริมาตร ๖ มิลลิลิตร ลงในอาหารหมักดังกล่าวผสมเชื้อและอาหารให้เข้ากัน ปิดปากขวดรูปชมพู่ให้แน่นด้วยจุกยางที่มี air lock และบ่มในสภาวะที่ระบุของแต่ละการทดลอง

๖. การวิเคราะห์ตัวอย่าง ปั่นเก็บตัวอย่างน้ำหมักแยกระหว่างส่วนของน้ำหมักและตะกอนออกจากกัน โดยนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ดังนี้

- วิเคราะห์ %เอทานอล โดยใช้ Ebulliometer ซึ่งอาศัยความแตกต่างของจุดเดือดระหว่างน้ำบริสุทธิ์กับสารสะลายตัวอย่าง โดยเทียบค่าแอลกอฮอล์ที่ได้จากแถบวัดแอลกอฮอล์ จะได้ค่า %เอทานอล (v/v)
- วัดค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้เครื่อง pH-meter
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS method (Miller, ๑๙๕๙)
- วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้ พีจีโอเอนไซม์ (SIGMA-ALDRICH)
- หาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น ๒ ครั้งเพื่อล้างเอาส่วนอาหารออกจากเซลล์ จากนั้นหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้ชุดกรองเซลล์ รุ่น FAVORIT® FILTRATION APPARATUS ซึ่งกรองเอาเฉพาะส่วนของตัวเซลล์ยีสต์ไว้บนกระดาษกรอง GF/C แล้วนำกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ ๖๐-๗๐ องศาเซลเซียส ข้ามคืนเป็นเวลา ๑๕ ชั่วโมง แล้วใส่ในโถดูดความชื้น (desicater) ๑ ชั่วโมง ก่อนนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง

จากนั้นนำค่า %เอทานอล (w/v) [คำนวณจากค่า %เอทานอล (v/v) คูณกับค่าความหนาแน่นของเอทานอล (๐.๗๘๙ g/cm^3)] ค่าน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ได้ ไปคำนวณหาค่าผลผลิตเอทานอลต่อหน่วยน้ำตาลที่ใช้ ($Y_{p/s}$; กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้) และผลผลิตเอทานอลต่อชั่วโมง (Productivity ; กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) หลังเสร็จสิ้นการหมักคำนวณหาผลผลิตที่ได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ดังสมการ

ผลผลิตที่ได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี (%) = $[(P_f - P_i) / (S_i - S_f)] \times ๑๐๐/๐.๕๑๑$ สมการที่ ๑

เมื่อ P_f = เอทานอลสุดท้าย (g/L)
P_i = เอทานอลเริ่มต้น (g/L)
S_i = น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น (g/L)
S_f = น้ำตาลกลูโคสสุดท้าย (g/L) และ
ค่าทางทฤษฎีของเอทานอล = ๐.๕๑๑ กรัมต่อ ๑ กรัมกลูโคส

หมายเหตุ : ค่าทางทฤษฎีของผลผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส สามารถคำนวณได้จากสมการการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส ๑ โมเลกุล (๑๘๐ กรัม) ไปเป็นเอทานอล ๒ โมเลกุล (๒×๔๖ กรัม) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ๒ โมเลกุล จากสมการน้ำตาลกลูโคส ๑๘๐ กรัม เมื่อเกิดการหมักจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ ๙๖ กรัม ดังนั้นถ้ามีน้ำตาลกลูโคส ๑ กรัม จะเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ ๐.๕๑๑ กรัม ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow ๒C_2H_5OH + ๒CO_2$$ สมการที่ ๒

๗. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทางกายภาพต่อการผลิตเอทานอลจากมันเทศที่ผ่านการย่อยแล้วในระดับขวดเขย่า ทุกการทดลองในหัวข้อนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และทำซ้ำ ๓ ซ้ำ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอล

นำหัวเชื้อยีสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ๒YP โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น ๕.๕ บ่มที่อุณหภูมิต่างกันคือ ๒๕, ๒๗, ๓๐ และ ๓๒ องศาเซลเซียส เขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ ๐, ๗๒ และ ๑๖๘ ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ผลดังหัวข้อที่ ๕.๕ จากนั้นนำอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตเอทานอล

นำหัวเชื้อยีสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ๒YP โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น ๔.๕, ๕.๐, ๕.๕, ๖.๐, ๖.๕ และ ๗.๐ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองที่ ๕.๕.๑ เขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ ๐, ๗๒ และ ๑๖๘ ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ผลดังหัวข้อที่ ๕.๕ และใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอล

นำหัวเชื้อยีสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ๒YP โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากการทดลองที่ ๕.๖.๒ และบ่มที่อุณหภูมิจากการทดลองที่ ๕.๖.๑ เปรียบเทียบการบ่มที่ภาวะนิ่ง (ไม่มีการเขย่า) และการเขย่าที่ ๑๐๐, ๑๕๐, ๑๗๐ และ ๒๐๐ รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ ๐, ๒๔, ๔๘, ๗๒, ๙๖ และ ๑๒๐ ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ผลดังหัวข้อที่ ๕.๕ จากนั้นเลือกความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

๘. **การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในระดับขวดเขย่า โดยใช้ Response surface methodology**

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอทานอล ๓ ปัจจัยคือ ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ (Winery yeast disposal) ซึ่งนำมาใช้ทดแทนสารสกัดจากยีสต์ในสูตรอาหาร เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟต นำมาหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย โดยใช้แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) แต่ละปัจจัยจะศึกษาที่ ๕ ระดับ ตามตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ ปัจจัยที่ศึกษาและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ใน CCD

ปัจจัยและสัญลักษณ์	ระดับของปัจจัยและความเข้มข้นในแต่ละระดับ				
	-๒	-๑	๐	๑	๒
ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ (ก./ล.)*, x_1	๒๐.๐	๒๕.๐	๓๐.๐	๓๕.๐	๔๐.๐
เปปโทน (ก./ล.), x_2	๕.๐	๑๐.๐	๑๕.๐	๒๐.๐	๒๕.๐
แมงกานีสซัลเฟต (ก./ล.), x_3	๑.๐๐	๑.๒๕	๑.๕๐	๑.๗๕	๒.๐๐

หมายเหตุ * Winery yeast disposal มีน้ำหนักแห้ง ๑๔%

จากตารางที่ ๑ ค่าของปัจจัยในแต่ละระดับสามารถคำนวณได้จากค่าจริงของปัจจัย ดังสมการ

$$x_i = (X_i - X_{cp}) / \Delta X_i \qquad \text{สมการที่ ๓}$$

เมื่อ x_i คือ รหัสของตัวแปรอิสระ
X_i คือ ค่าจริงของตัวแปรอิสระ
X_{cp} คือ ค่าจริงของตัวแปรอิสระที่มีค่าอยู่กึ่งกลาง และ
ΔX_i คือ ผลต่างจากค่าการเปลี่ยนระดับตัวแปร

จากนั้นใช้โปรแกรมทางสถิติ คำนวณเพื่อออกแบบการทดลองโดยมี ๓ ตัวแปร แต่ละตัวแปรมี ๕ ระดับ จะได้ผลการออกแบบการทดลอง คือ ๒๐ การทดลองดังตารางที่ ๒

เตรียมอาหารตามสูตรที่ออกแบบดังตารางที่ ๒ โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นประมาณ ๒๕๐ กรัมต่อลิตร หมักเอทานอลโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ ๕.๕ เก็บตัวอย่างที่ ๗๒ ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์ผลดังหัวข้อที่ ๕.๔ และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อสร้างสมการกำลังสอง (quadratic equation) เป็นสมการสำหรับทำนายผลตอบรับที่จะเกิดขึ้นหรือค่าตอบสนอง (response : Y) ซึ่งจะขึ้นกับตัวแปรอิสระต่างๆเป็นความสัมพันธ์ที่อธิบายได้โดยสมการ

$$Y = b_o + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \qquad \text{สมการที่ ๔}$$

โดยที่ Y คือ ค่าที่ได้จากการทำนายผลตอบรับที่จะเกิดขึ้น
b_o คือ ค่า offset term (ค่าคงที่)
b_i คือ ค่า linear effect
b_{ii} ค่า squared effect
b_{ij} คือ interaction effect
x_i และ x_j คือ ตัวแปรอิสระ

ตารางที่ ๒ การวางแผนการทดลองแบบ Central composite design ชนิด ๓ ปัจจัย

การทดลองที่	ปัจจัย		
	$X_{๑}$	$X_{๒}$	$X_{๓}$
๑	-๑	-๑	-๑
๒	๑	-๑	-๑
๓	-๑	๑	-๑
๔	๑	๑	-๑
๕	-๑	-๑	๑
๖	๑	-๑	๑
๗	-๑	๑	๑
๘	๑	๑	๑
๙	-๒	๐	๐
๑๐	๒	๐	๐
๑๑	๐	-๒	๐
๑๒	๐	๒	๐
๑๓	๐	๐	-๒
๑๔	๐	๐	๒
๑๕	๐	๐	๐
๑๖	๐	๐	๐
๑๗	๐	๐	๐
๑๘	๐	๐	๐
๑๙	๐	๐	๐
๒๐	๐	๐	๐

หมายเหตุ : $X_{๑}$, $X_{๒}$ และ $X_{๓}$ หมายถึง ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟต ตามลำดับ โดยรายละเอียดของแต่ละปัจจัยแสดงดังตารางที่ ๑ สัญลักษณ์ -๒, -๑, ๐, ๑, ๒ หมายถึง การใช้ค่าของระดับตัวแปรในการวางแผนการทดลองแบบ CCD ของแต่ละปัจจัย

จากแผนการทดลองแบบ CCD จำนวน ๒๐ การทดลอง นำค่าเอทานอลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติเพื่อสร้างสมการกำลังสอง (Quadratic equation) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา คือ ยีสต์เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟตต่อเอทานอลที่เกิดขึ้น ตรวจสอบผลการทดลองที่ทำนายได้ (Verification) ในระดับขวดเขย่าอีกครั้งโดยเลือกสูตรที่ให้เอทานอลสูงที่สุดมาทำการทดสอบ ๓ ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

๙. **การหมักเอทานอลในถังหมักขนาด ๕ ลิตร**

จากการทดลองในข้อ ๘ การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในระดับขวดเขย่า นำสูตรและค่าที่เหมาะสมของปริมาณองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดลองหมักในถังหมักขนาด ๕ ลิตร โดยเตรียมอาหารหมัก ๓.๖ ลิตร และหัวเชื้อสำหรับหมัก ๐.๔ ลิตร เพื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการหมักในระดับขวดเขย่า เก็บตัวอย่างทุก ๑๒ ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ ๘๔ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผล

- เวลาและสถานที่

เวลา ต.ค. ๒๕๕๔ - ก.ย. ๒๕๕๖ สถานที่ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ จ.นครปฐม

๓. ผลการทดลองและวิจารณ์

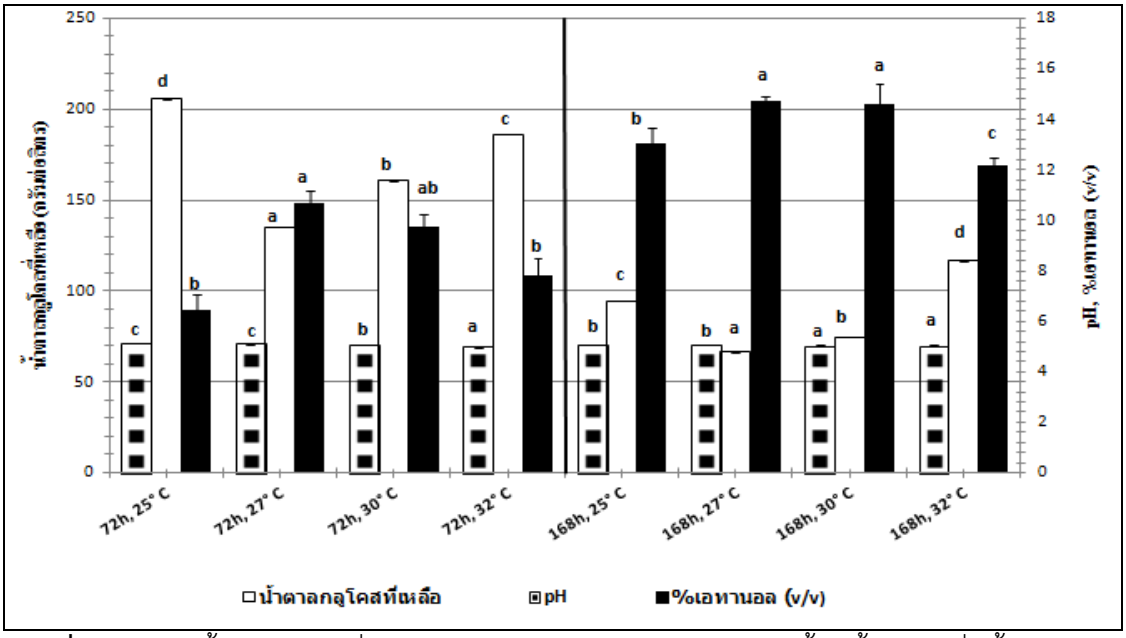
การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทางกายภาพต่อการผลิตเอทานอลจากมันเทศที่ผ่านการย่อยแล้วในระดับขวดเขย่า

ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอล

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีความสำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งในการทดลองทั้งในระดับห้องทดลอง และในระดับอุตสาหกรรม ยีสต์ที่ใช้โดยทั่วไปจะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ ๒๐-๓๐ องศาเซลเซียส (Walker, ๑๙๙๘) ทั้งนี้การเลือกช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงสายพันธุ์ยีสต์ซึ่งบางสายพันธุ์อาจจะไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง หรือบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่สูงที่สุดประมาณ ๓๕-๔๓ องศาเซลเซียส ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ *S. carlsbergensis* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า ๓๕ องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเจริญอยู่ที่ประมาณ ๒๐ องศาเซลเซียส การเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะช่วยทำให้ยีสต์สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดี หากเลือกอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลให้เกิดภาวะเครียดต่อเซลล์ (Bamforth, ๒๐๐๕)

ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ยีสต์ *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ หมักในสูตรอาหารพื้นฐาน ๒YP ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากมันเทศที่ผ่านการย่อยแล้วประมาณ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร แทนกลูโคสในสูตรอาหาร โดยมีค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นเป็น ๕.๕ ทำการบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ ๒๕, ๒๗, ๓๐ และ ๓๒ องศาเซลเซียส และเขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๐, ๗๒ และ ๑๖๘ ชั่วโมง แสดงผลการทดลองดังภาพที่ ๑

จากผลการหมักเอทานอลโดย *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ ที่ ๗๒ ชั่วโมง ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นโดยเฉลี่ยประมาณ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร พบว่าการหมักที่อุณหภูมิต่างกันมีผลทำให้เชื้อผลิตเอทานอลได้แตกต่างกัน ซึ่งที่อุณหภูมิ ๒๗ และ ๓๐ องศาเซลเซียส มีค่าเอทานอลที่ได้สูงใกล้เคียงกัน แต่อุณหภูมิที่ให้ค่าเอทานอลสูงที่สุดคือ ๒๗ องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถผลิเอทานอลได้ ๑๐.๖๙ % (v/v) มีค่า productivity ๑.๑๗๑ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีผลผลิตเอทานอลต่อน้ำตาลกลูโคส ๑ กรัม คิดเป็น ๐.๔๙๘ และผลผลิตเอทานอลคิดเป็น ๙๗.๓๘% ของค่าทางทฤษฎี และเมื่อจัดกลุ่มทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๕% (P>๐.๐๕) พบว่าที่อุณหภูมิ ๒๗ และ ๓๐ องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ ๓๐ องศาเซลเซียสได้เอทานอลเป็น ๙.๗๓ % (v/v) มีค่า productivity ๑.๐๖๖ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ ๒๕ และ ๓๒ องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตที่ต่ำกว่าที่ ๒๗ และ ๓๐ องศาเซลเซียส สำหรับค่าน้ำหนักแห้งที่อุณหภูมิ ๒๗ และ ๓๐ องศาเซลเซียส พบว่ามีค่า ๔.๘๑ และ ๓.๕๙ กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อหมักต่อไปจนถึง ๑๖๘ ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ ๒๗ และ ๓๐ องศาเซลเซียส ยีสต์มีน้ำหนักแห้ง ๕.๕๖ และ ๔.๙๖ กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การหมักเอทานอลของยีสต์มีค่าใกล้เคียงกัน คือ ๑๔.๗๔% (v/v) และ ๑๔.๖๒% (v/v) ตามลำดับเมื่อจัดกลุ่มทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๕% (P>๐.๐๕) พบว่าทั้งสองอุณหภูมิจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันจึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ ๑ ค่า pH น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และ %เอทานอล (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ๒YP ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นประมาณ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร หมักโดยยีสต์ *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ บ่มที่อุณหภูมิ ๒๕, ๒๗, ๓๐ และ๓๒ องศาเซลเซียส เขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๗๒ และ๑๖๘ ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง และสามารถผลิตเอทานอลได้ดีในช่วงอุณหภูมิ ๒๗-๓๐ องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Walker ที่ว่ายีสต์ที่ใช้โดยทั่วไปจะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง ๒๐-๓๐ องศาเซลเซียส (Walker, ๑๙๙๘) และจากข้อมูลของ Nagodawithana กล่าวว่ายีสต์สายพันธุ์ *S. carlsbergensis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ ๒๕-๓๐ องศาเซลเซียสและเป็นเชื้อที่ไม่ทนต่ออุณหูมิสูง (Nagodawithana, ๑๙๙๑)

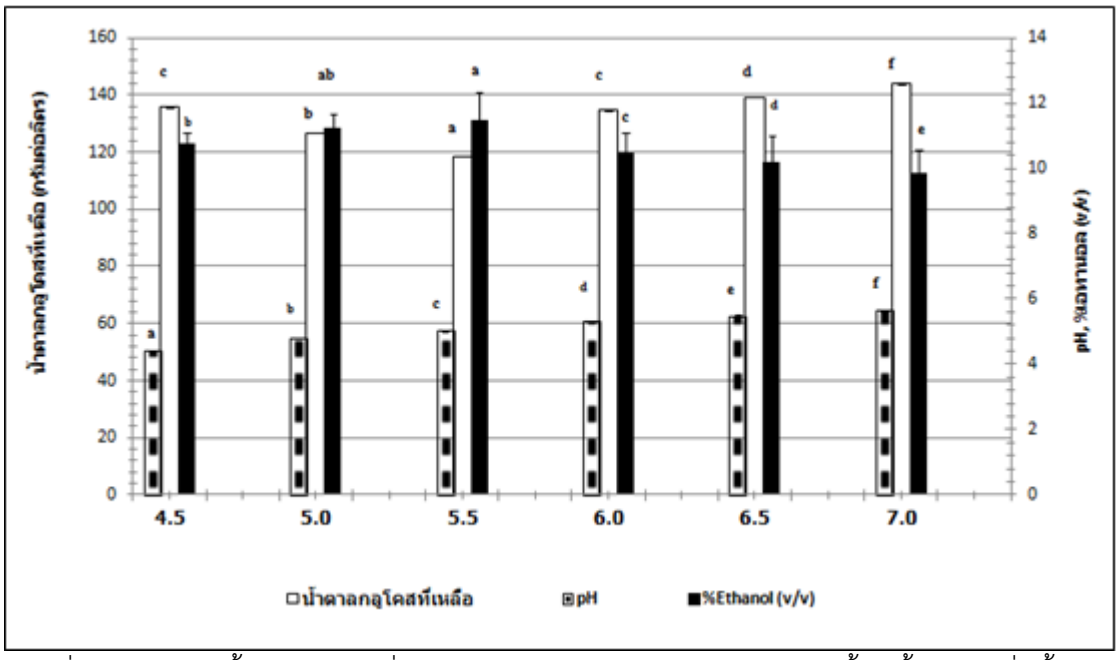
ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิ ๒๗ และ ๓๐ องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิที่ให้ค่าเอทานอลสูงสุดใกล้เคียงกัน และในหลายงานวิจัยนิยมหมักเอทานอลโดยใช้ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิในระดับกลาง ๆ ที่เหมาะแก่การนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม แต่ในการทดลองนี้พบว่าที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส มีค่าเอทานอล และ ค่าผลผลิตเอทานอลต่อชั่วโมงสูงที่สุด เมื่อหมักที่เวลาเดียวกัน อีกทั้งผู้วิจัยคาดหวังว่าที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส จะเหมาะสมต่อการเจริญและทำงานของยีสต์ ดังนั้นจึงเลือกที่จะใช้อุณหภูมิที่ ๒๗ องศาเซลเซียส ในการศึกษาทดลองต่อไป

ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตเอทานอล

ค่าความเป็นกรดด่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ เนื่องจากยีสต์สามารถเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดด่างประมาณ ๔.๕-๖.๕ ซึ่งหากอาหารมีสภาพความเป็นกรดสูงหรือประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก และกรดแลคติก อาจจะส่งผลกระทบให้เกิดการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ (Walker, ๑๙๙๘)

ในการทดลองนี้ใช้สูตรอาหารพื้นฐาน ๒YP ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสจากมันเทศที่ผ่านการย่อยแล้วประมาณ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร แทนกลูโคสในสูตรอาหารหมักโดย *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ เปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นที่ ๔.๕, ๕.๐, ๕.๕, ๖.๐, ๖.๕ และ

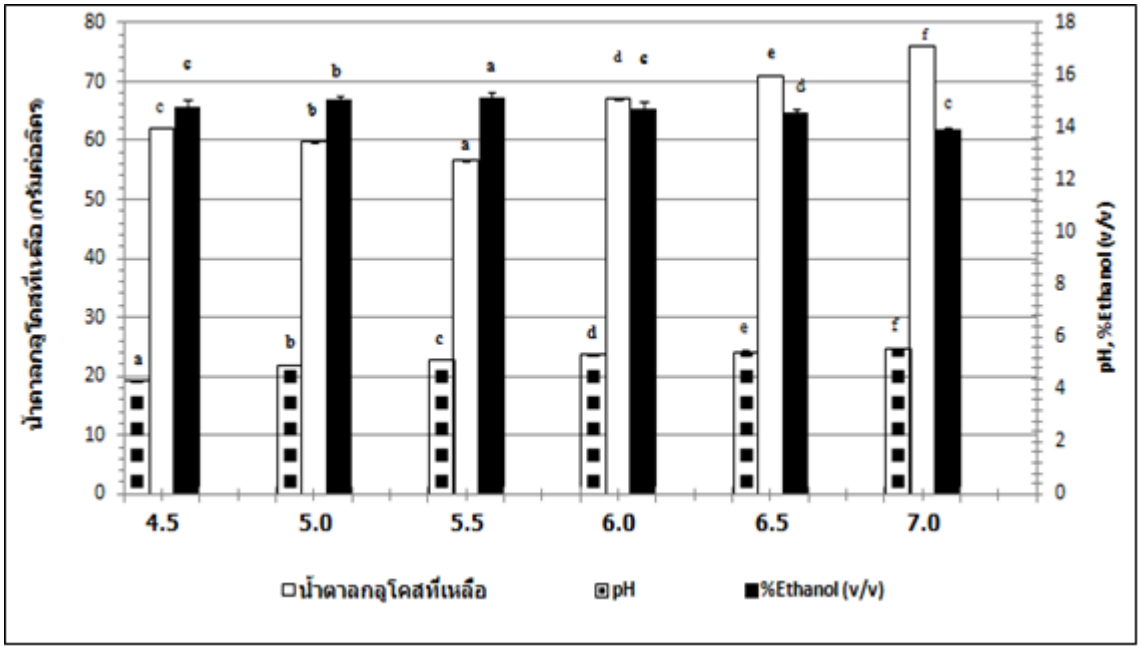
๗.๐ บ่มที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส และเขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๗๒ และ ๑๖๘ ชั่วโมง แสดงผลการทดลองดังภาพที่ ๒ และ ๓



ภาพที่ ๒ ค่า pH น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และ%เอทานอล (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ๒YP ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นประมาณ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น ๔.๕, ๕.๐, ๕.๕, ๖.๐, ๖.๕ และ ๗.๐ หมักโดยยีสต์ *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ บ่มที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส เขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง

จากการทดลองพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง ๕.๕ ให้เอทานอลได้สูงที่สุดทั้งที่ ๗๒ และ ๑๖๘ ชั่วโมง โดยให้เอทานอล ๑๑.๔๗ และ ๑๕.๑๕% (v/v) ตามลำดับ มีค่า productivity ๑.๒๕๗ และ ๐.๗๑๒ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งผลผลิตเอทานอลคิดเป็น ๙๘.๙๓% และ ๙๗.๐๑% ของค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ เมื่อจัดกลุ่มทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๕% (P>๐.๐๕) พบว่าในทุกค่าความเป็นกรดด่างที่ทดสอบจัดอยู่คนละกลุ่มซึ่งแสดงว่าทุกค่าระดับที่ศึกษามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลายบทความวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces sp.* รายงานว่าช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์อยู่ระหว่าง ๔.๕-๖.๒ (Yan et al., ๒๐๑๒; Bamforth, ๒๐๐๕; Highina et al., ๒๐๑๑) โดยพบว่าการปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารหมักในช่วง ๕.๐-๕.๕ เป็นช่วงที่ทำให้เกิดผลผลิตเอทานอลสูงสุด (Nadya et al., ๒๐๑๒; Mohamed et al., ๒๐๑๓; Manikandan and Viruthagiri, ๒๐๑๐) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้



ภาพที่ ๓ ค่า pH น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และ %เอทานอล (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ๒YP ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นประมาณ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น ๔.๕, ๕.๐, ๕.๕, ๖.๐, ๖.๕ และ ๗.๐ หมักโดยยีสต์ S. carlsbergensis TISTR ๕๐๑๘ บ่มที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส เขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๖๘ ชั่วโมง

ผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอล

ในงานวิจัยนี้ใช้กระบวนการหมักเอทานอลแบบ Batch fementation มีการเติมอาหารเพียงครั้งเดียว โดยปกติการหมักจะอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างจำกัด (anaerobic fermentation) แต่สำหรับการหมักที่มีความเข้มข้นน้ำตาลตั้งต้นสูง การให้อากาศโดยการกวนหรือเขย่าจะเป็นการเพิ่มออกซิเจนในอาหารหมัก ซึ่งออกซิเจนมีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์ยีสต์เริ่มต้น และช่วยในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว และสเตอรอล ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ แต่การให้อากาศแก่อาหารหมักต้องมีระดับที่เหมาะสม หากมีปริมาณออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้เอทานอลถูกออกซิไดซ์กลายเป็นกรดอะซิติกได้ ดังนั้นการหาระดับการเขย่าจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ นอกจากนี้การศึกษาเรื่องของระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมจะช่วยลดต้นทุน เวลา และทรัพยากรในการหมักทั้งในระดับห้องทดลองและในระดับอุตสาหกรรม หากกระบวนการหมักเกิดขึ้นได้เร็วก็จะส่งผลต่อการลดต้นทุนและพลังงานได้ (Nagodawithana, ๑๙๙๑)

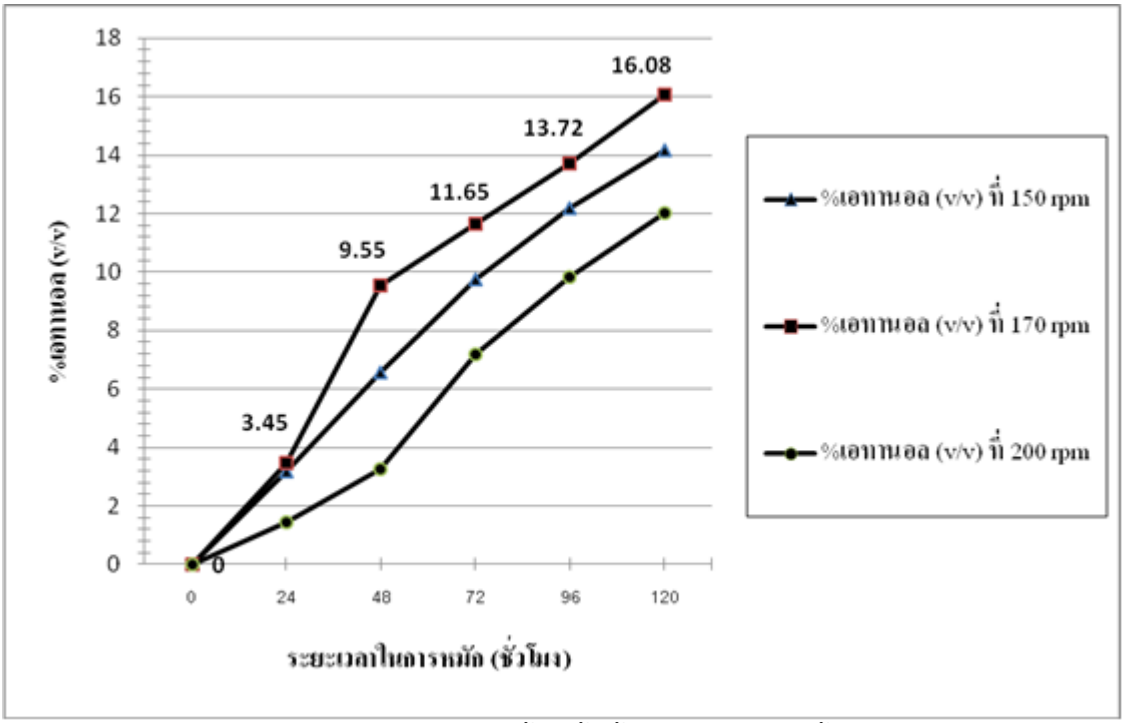
ในการทดลองนี้เบื้องต้นได้ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเขย่าโดยการบ่มที่ภาวะนิ่ง (ไม่มีการเขย่า) และการเขย่าที่ ๑๐๐ และ ๑๕๐ รอบต่อนาที ใช้สูตรอาหารพื้นฐาน ๒YP ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสจากมันเทศที่ผ่านการย่อยแล้วประมาณ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น ๕.๕ หมักโดย *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ บ่มที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียสหมักเป็นระยะเวลา ๐, ๒๔, ๔๘, ๗๒, ๙๖ และ ๑๒๐ ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าการหมักเอทานอลโดยไม่มีการเขย่า และเขย่าที่ ๑๐๐ รอบต่อนาที ยีสต์มีการผลิตเอทานอลได้น้อย และอัตราการผลิตเกิดขึ้นได้ช้าเมื่อเทียบกับการเขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที ซึ่งพบว่าได้ค่าเอทานอลสูงสุด ๘.๙๓% (v/v) ที่ ๑๒๐ ชั่วโมง และการทดลองนี้สังเกตพบว่ายีสต์หมักเอทานอลได้น้อยลงมากเมื่อเทียบกับการ

ทดลองก่อนๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะยีสต์ไม่สามารถทนต่อภาวะที่มีแรงดันและความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ๆ ได้

ดังนั้น จึงทดสอบเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในอาหารหมัก ที่ความเข้มข้น ๒๕๐ และ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร หมักด้วยสภาวะเดียวกัน พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลมีผลต่อการผลิตเอทานอลของ *S. carlbergensis* TISTR ๕๐๑๘ จริง ซึ่งที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสประมาณ ๒๕๐ กรัมต่อลิตร ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดถึง ๑๖.๕๕% (v/v) เมื่อหมักเป็นระยะเวลา ๑๒๐ ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสประมาณ ๓๐๐ กรัมต่อลิตร ยีสต์ผลิตเอทานอลได้เพียง ๙.๒๕% (v/v) ดังนั้น จึงเลือกใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น ๒๕๐ กรัมต่อลิตรในการทดลองต่อไป

หลังจากทดสอบแล้วว่าความเข้มข้นน้ำตาลส่งผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ จากนั้นทำการทดสอบผลของการเขย่าซ้ำโดยเปรียบเทียบที่ความเร็วรอบ ๑๕๐, ๑๗๐ และ ๒๐๐ รอบต่อนาที หมักในสูตรอาหารพื้นฐาน ๒YP ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น ๕.๕ บ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๐, ๒๔, ๔๘, ๗๒, ๙๖ และ ๑๒๐ ชั่วโมง แสดงผลการทดลองดังภาพที่ ๔

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของเอทานอลที่สูงขึ้นเมื่อมีระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการเขย่าที่ ๑๗๐ รอบต่อนาที ให้ค่าเอทานอลสูงสุด ๑๖.๐๘% (v/v) มีค่า productivity ๑.๐๖ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตเอทานอลคิดเป็น ๙๘.๗๙% ของค่าทางทฤษฎี เมื่อหมักเป็นระยะเวลา ๑๒๐ ชั่วโมง ในขณะที่การเขย่า ๑๕๐ และ๒๐๐ รอบต่อนาที ให้ค่า เอทานอลที่ต่ำกว่า คือ ๑๔.๑๗% (v/v) และ ๑๒.๐๓% (v/v) ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกอัตราเขย่าที่ ๑๗๐ รอบต่อนาที ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ ๔ ค่า %เอทานอล (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน ๒YP ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น ๒๕๐ กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น ๕.๕ หมักโดย S. carlsbergensis TISTR ๕๐๑๘ ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เปรียบเทียบความเร็วรอบการเขย่าที่ ๑๕๐, ๑๗๐ และ ๒๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๐, ๒๔, ๔๘, ๗๒, ๙๖ และ ๑๒๐ ชั่วโมง

จากการศึกษาในหลายบทความวิจัยพบว่า การให้อากาศมีความสำคัญต่อการหมัก เอทานอล แต่ต้องให้ในปริมาณที่เหมาะสมหากมีปริมาณออกซิเจนที่มากเกินยีสต์จะนำไปใช้สำหรับการเจริญมากกว่าการหมัก ซึ่งมีการรายงานอัตราการเขย่าของการหมักเอทานอลอยู่ในช่วง ๑๐๐-๒๐๐ รอบต่อนาที (Deuringer and Fleischer, ๒๐๑๐; Curry, ๒๐๐๙)

การหาค่าที่เหมาะสมของปริมาณองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้ Response surface methodology

Response surface methodology เป็นวิธีการออกแบบการทดลองเพื่อใช้วิเคราะห์หลายปัจจัยร่วมกัน สามารถแสดงความสัมพันธ์ของแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยในเชิงปริมาณได้ อีกทั้งยังใช้หาจุดที่เหมาะสมของค่าตอบสนองได้ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอทานอล ๓ ปัจจัยคือ ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ (นำมาใช้ทดแทนสารสกัดจากยีสต์ในสูตรอาหารเพื่อลดต้นทุน) เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟต โดยในแต่ละตัวแปรจะศึกษาที่ ๕ ระดับ ตามตารางที่ ๘ วางแผนการทดลอง CCD ชนิด ๓ ปัจจัย ซึ่งวางแผนการทดลองได้ ๒๐ การทดลองดังแสดงในตารางที่ ๙ ในการหมักจะใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นประมาณ ๒๕๐ กรัมต่อลิตร หมักด้วยเชื้อ *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ บ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ๕.๕ เขย่าที่ความเร็วรอบ ๑๗๐ รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา ๗๒ ชั่วโมง ค่าเอทานอลที่ได้จากการทดลอง และจากสมการทำนาย แสดงผลดังตารางที่ ๓

การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติที่แสดงผลในตารางที่ ๔ ซึ่งองค์ประกอบอาหารที่แสดงค่า P-value น้อยกว่า ๐.๐๕ คือ เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟต แสดงว่าเป็นองค์ประกอบอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลในเชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาค่า square effect ($X^{๒}_{i}$) ของทั้งสามปัจจัยพบว่ามีค่า P-value ที่น้อยกว่า ๐.๐๕ ทุกปัจจัย ในขณะที่ค่า interaction effect (X_{ij}) หรือ ค่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยมีเพียงยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์และเปปโทน ที่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันในการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ๓ เปอร์เซ็นต์เอทานอล (v/v) จากการทดลอง และจากการทำนาย

สูตรที่	รหัสของปัจจัยที่ศึกษา			%เอทานอลที่ได้ (v/v)	
	$X_{๑}$	$X_{๒}$	$X_{๓}$	การทดลอง	การทำนาย
๑	-๑	-๑	-๑	๑๔.๒๔	๑๔.๓๒
๒	๑	-๑	-๑	๑๔.๗๕	๑๔.๖๘
๓	-๑	๑	-๑	๑๔.๘๔	๑๔.๘๔
๔	๑	๑	-๑	๑๔.๗๐	๑๔.๖๓
๕	-๑	-๑	๑	๑๓.๘๕	๑๓.๙๑
๖	๑	-๑	๑	๑๔.๓๐	๑๔.๒๙
๗	-๑	๑	๑	๑๔.๕๕	๑๔.๖๐
๘	๑	๑	๑	๑๔.๕๐	๑๔.๔๑
๙	-๒	๐	๐	๑๔.๑๕	๑๔.๐๕
๑๐	๒	๐	๐	๑๔.๑๐	๑๔.๒๒
๑๑	๐	-๒	๐	๑๓.๘๐	๑๓.๗๗

๑๒	๐	๒	๐	๑๔.๓๖	๑๔.๔๑
๑๓	๐	๐	-๒	๑๕.๒๕	๑๕.๒๗
๑๔	๐	๐	๒	๑๔.๖๕	๑๔.๖๔
๑๕	๐	๐	๐	๑๔.๗๐	๑๔.๖๖
๑๖	๐	๐	๐	๑๔.๖๕	๑๔.๖๖
๑๗	๐	๐	๐	๑๔.๖๒	๑๔.๖๖
๑๘	๐	๐	๐	๑๔.๗๐	๑๔.๖๖
๑๙	๐	๐	๐	๑๔.๗๐	๑๔.๖๖
๒๐	๐	๐	๐	๑๔.๕๘	๑๔.๖๖

หมายเหตุ : $x_{๑}$, $x_{๒}$ และ $x_{๓}$ หมายถึง ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟต ตามลำดับ โดยรายละเอียดของแต่ละปัจจัยแสดงดังตารางที่ ๒ สัญลักษณ์ -๒, -๑, ๐, ๑, ๒ หมายถึง การใช้ค่าของระดับตัวแปรในการวางแผนการทดลองแบบ CCD ของแต่ละปัจจัย

ตารางที่ ๔ ผลการวิเคราะห์โดย Multiple regression analysis

Term	Coefficient	SE Coefficient	T-value	P-value
Constant	๑๔.๖๖๐๗	๐.๐๓๓๗๕	๔๓๔.๔๐๘	๐.๐๐๐
Winery yeast disposal ($X_{๑}$)	๐.๐๔๑๙	๐.๐๒๑๑๕	๑.๙๘๐	๐.๐๗๖
Peptone ($X_{๒}$)	๐.๑๖๐๖	๐.๐๒๑๑๕	๗.๕๙๓	๐.๐๐๐*
$MgSO_{๔}.๗H_{๒}O$ ($X_{๓}$)	-๐.๑๕๘๑	๐.๐๒๑๑๕	-๗.๔๗๕	๐.๐๐๐*
$X_{๑}^{๒}$	-๐.๑๓๒๒	๐.๐๑๖๘๗	-๗.๘๓๒	๐.๐๐๐*
$X_{๒}^{๒}$	-๐.๑๔๓๔	๐.๐๑๖๘๗	-๘.๔๙๙	๐.๐๐๐*
$X_{๓}^{๒}$	๐.๐๗๔๑	๐.๐๑๖๘๗	๔.๓๙๑	๐.๐๐๑*
$X_{๑}X_{๒}$	-๐.๑๔๓๘	๐.๐๒๙๙๒	-๔.๘๐๕	๐.๐๐๑*
$X_{๑}X_{๓}$	๐.๐๐๓๘	๐.๐๒๙๙๒	๐.๑๒๕	๐.๙๐๓
$X_{๒}X_{๓}$	๐.๐๔๓๘	๐.๐๒๙๙๒	๑.๔๖๒	๐.๑๗๔

S = ๐.๐๘๔๖๑ R-Sq = ๙๖.๙% R-Sq (adj) = ๙๔.๑%

หมายเหตุ * แสดงค่านัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ (P<๐.๐๕)

จากผลการวิเคราะห์ในตารางที่ ๔ สามารถนำมาเขียนเป็นสมการความสัมพันธ์ของแบบจำลองค่าการผลิตเอทานอลได้ดังสมการที่ ๕ ที่แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่สนใจศึกษาและค่าการตอบสนอง (เอทานอล) ในรูปแบบสมการกำลังสอง

$$Y = ๑๔.๖๖๐๗ + ๐.๐๔๑๙X_{๑} + ๐.๑๖๐๖X_{๒} - ๐.๑๕๘๑X_{๓} - ๐.๑๓๒๒X_{๑}^{๒} - ๐.๑๔๓๔X_{๒}^{๒} + ๐.๐๗๔๑X_{๓}^{๒} - ๐.๑๔๓๘X_{๑}X_{๒} + ๐.๐๐๓๘X_{๑}X_{๓} + ๐.๐๔๓๘X_{๒}X_{๓}$$

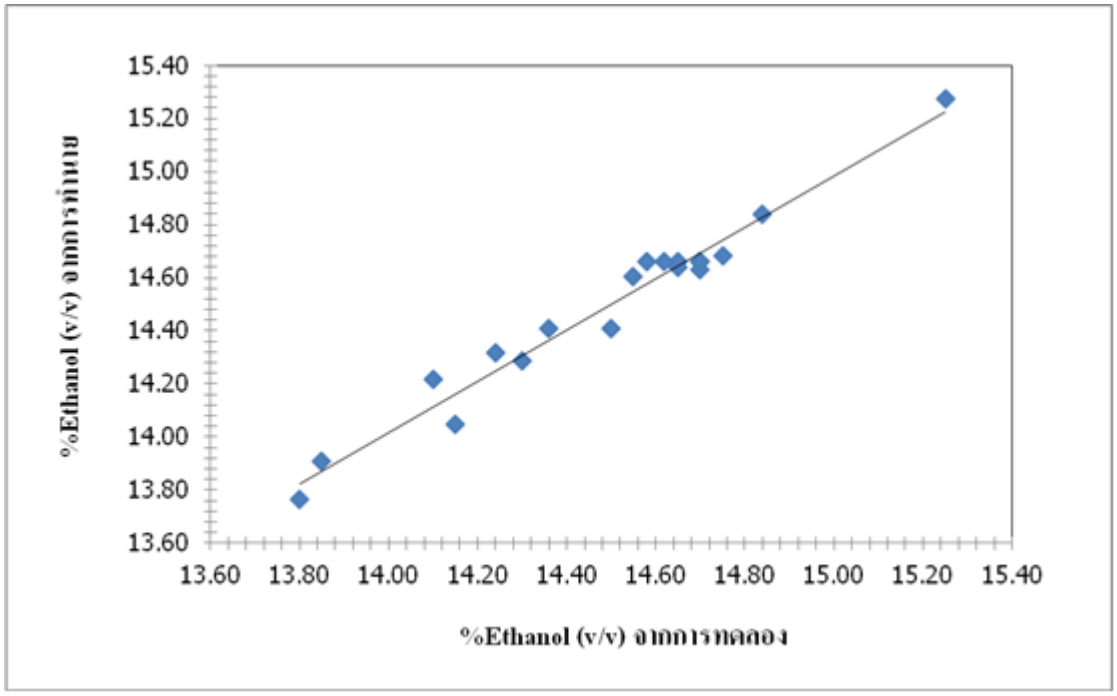
สมการที่ ๕

เมื่อ Y คือค่าเอทานอลที่ได้จากการทำนาย และ X๑, X๒ และX๓ คือ ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟต ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของสมการแสดง

ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษา และค่าเอทานอล ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ มีค่า R๒ เท่ากับ ๙๖.๙%

เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าเอทานอลจากการทำนายและจากการทดลอง พบว่าอยู่ในแนวเส้นตรง ซึ่งแสดงความสอดคล้องกันและบ่งบอกว่าสมการที่ใช้ในการทำนายนั้น มีประสิทธิภาพสูงในการใช้ทำนายผล

จากผลการทดลองในตารางที่ ๓ พบว่าสูตรอาหารที่ ๑๓ ให้ค่าเอทานอลสูงที่สุดคือ ๑๕.๒๕% (v/v) มีค่า productivity ๑.๖๗๑ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตเอทานอลคิดเป็น ๙๙.๓๐% ของค่าทางทฤษฎี ซึ่งมีปริมาณ และค่าระดับปัจจัยศึกษาคือ ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟต ๓๐.๐, ๑๕.๐ และ ๑.๐ กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

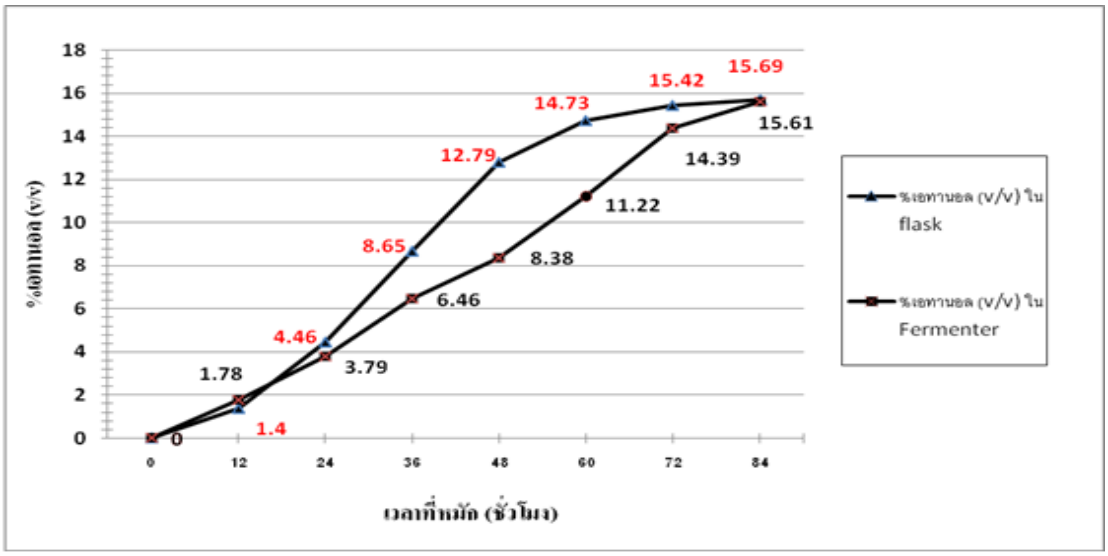


ภาพที่ ๕ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการทดลอง และจากการทำนายในรูปเส้นตรง

จากนั้น จึงเลือกปริมาณองค์ประกอบของอาหารหมักตามองค์ประกอบสูตรที่ ๑๓ ไปทวนสอบยืนยันผลที่ทำนายได้ (Verification) ซึ่งหมักโดยเชื้อ *S. carlsbergensis* TISTR ๕๐๑๘ ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เขย่า ๑๗๐ รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ๕.๕ เป็นระยะเวลา ๗๒ ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลกลูโคสจากการย่อยแป้งมันเทศประมาณ ๒๕๐ กรัมต่อลิตร จากผลการทวนสอบ ๓ ซ้ำ พบว่าค่าเฉลี่ยของผลผลิตเอทานอลที่ได้คือ ๑๕.๔๐% (v/v) มีค่า productivity ๑.๖๘๗ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากผลการทวนสอบที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการทำนายในการทดลองหาปริมาณองค์ประกอบที่เหมาะสมด้วยการออกแบบการทดลองโดยวิธี CCD ที่มีค่าเอทานอลคือ ๑๕.๒๗% (v/v) มีค่า productivity ๑.๖๗๓ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ผลการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด ๕ ลิตร

จากการหาค่าที่เหมาะสมของปริมาณองค์ประกอบอาหารลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอทานอลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง พบว่า ได้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล (สูตรที่ ๑๓) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำมาทดลองหมักในระดับถังหมักขนาด ๕ ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ได้จากการย่อยแป้งในมันเทศประมาณ ๒๕๐ กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก ๑๒ ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ ๘๔ ได้ผลดังภาพที่ ๖



ภาพที่ ๖ เปอร์เซ็นต์เอทานอล (v/v) ในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด ๕ ลิตร

จากภาพที่ ๖ พบว่า ค่าเอทานอลที่ได้มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นทั้งในระดับขวดเขย่า และในระดับถังหมัก ซึ่งจะเห็นว่าค่าเอทานอลในระดับขวดเขย่ามีค่าสูงกว่าในระดับถังหมัก ทุก ๆ ชั่วโมงของการหมัก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มระดับของการหมักที่ใหญ่ขึ้น ทำให้เชื้อต้องใช้เวลาในการปรับตัวที่นานขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อหมักจนถึงชั่วโมงที่ ๘๔ จะพบว่าค่าเอทานอลในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักมีค่าใกล้เคียงกันมาก

๔. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

มันเทศเป็นพืชพลังงานอีกชนิดหนึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยอาศัยสายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูง และมีความเหมาะสมต่อการใช้แป้งในมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์คือ *S. carlbergensis* TISTR ๕๐๑๘ ซึ่งภาวะการหมักที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เขย่าที่ ๑๗๐ รอบต่อนาที มีค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้น ๕.๕ หมักเป็นระยะเวลา ๗๒ ชั่วโมง นอกจากนี้การนำของเหลือทิ้งมาใช้ในการหมักเอทานอลนอกจากจะช่วยลดต้นทุนการผลิตยังเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้ง และเป็นการกำจัดของเสียได้อีกทางหนึ่งด้วย การหาค่าที่เหมาะสมของปริมาณองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอทานอล โดยวิธีพื้นผิวตอบสนองซึ่งใช้แผนการทดลอง CCD ที่มีค่าน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นประมาณ ๒๕๐ กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เขย่าที่ ๑๗๐ รอบต่อนาที พบว่าปริมาณองค์ประกอบที่เหมาะสม

ของปัจจัยที่คัดเลือก คือ ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักไวน์ เปปโทน และแมกนีเซียมซัลเฟต ๓๐.๐, ๑๕.๐ และ ๑.๐ กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการขยายระดับของการหมักโดยหมักในถังหมักขนาด ๕ ลิตร พบว่า การหมักเอทานอลในระดับขวดเขย่าสามารถเกิดขึ้นได้เร็วกว่าในระดับถังหมักเล็กน้อย

๕. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

พัฒนาต่อโดยสกัดให้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์เพื่อใช้ทดแทนพลังงานหรืออื่นๆ และเผยแพร่ในการประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้อง

๖. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากกรมวิชาการเกษตร และได้รับการสนับสนุนสถานที่ทดลองและครุภัณฑ์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

๗. เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. (๒๕๔๕). พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร กรุงเทพฯ: สภา.

พูนศุข อัตถาสัมปุณณะ, ประไพศรี ส มใจ, อำพล เอื้ออารี, สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์, ดำรง คามีศักดิ์, ธีรภัทร ศรีนรคุตร และชัชชัย ชัยสัตตปกรณ์. (๒๕๔๐). การผลิตเอทานอล จากวัสดุเกษตรเพื่อเป็นพลังงานทดแทน. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.

วิโรจน์ พุทธวิถี. (๒๕๕๓). รู้จักเอทานอล, [ออนไลน์] แหล่งที่มาสืบค้นจาก: http:// http://nakornnayok.excise.go.th/data/gm/Ethanol.pdf

สถาบันวิจัยพืชไร่ และพืชทดแทนพลังงาน (๒๕๕๕). มันสำปะหลัง, [ออนไลน์] แหล่งที่มาสืบค้นจาก: http://www.doa.go.th/fcri/index.php?option=com_content&view=article&id=๕ &Itemid=๒๓

สำนักงานวิจัยค้นคว้าพลังงาน กรมพัฒนาพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. (๒๕๕๓). พลังงานทางเลือก, [ออนไลน์] แหล่งที่มาสืบค้นจาก: http://energy.go.th.

สิริวุทธ์ เสียมภัคดี. (๒๕๕๒). อุตสาหกรรมเอทานอลไทย ปัญหา อุปสรรค และแนวทางการส่งเสริมพัฒนา. สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย.

ไสว พงษ์เก่า และโสภณ สินธุประมา. (๒๕๕๒). สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ ๕, [ออนไลน์] แหล่งที่มาสืบค้นจาก: http://www.doae.go.th.

Adthalungrong, A., Adthalungrong, C., Sangsuwan, K., and Ruenchon, M. ๒๐๑๒. Production of glucose syrup from sweet potato by enzymatic processes. The ๒๔th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (Proceedings). Ubon Ratchathani University, Thailand.

Aehle, W. (๒๐๐๔). “Enzymes in Industry”. ๒nd ed. Weinheim : WILEY-VCH Verlay GmbH & Co.KGaA, Inc.

Bamforth, C.W. (๒๐๐๕). “Food fermentation and microorganisms.” Blackwell Science Ltd. Oxford. USA p. ๑ – ๓๘.

Highina, B. K., Hashima, I and Bugaje, I. M. (๒๐๑๑). “Optimization of Ethanol Producction from sugar molasses in nigeria”. Jounal of Applied technology in Environmental Sanitation. ๑ (๓) : ๒๓๓-๒๓๗.

Manikandan, K., Viruthagiri, T. (๒๐๑๐). “Optimization of C/N ratio of the medium and Fermentation Conditions of Ethanol Production from Tapioca Starch using Co-Culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*”. International Journal of Chem Tech Research.

Miller G.L. (๑๙๕๙). “Use of Dimitrosalicylic Acid Reagent for Determination of reducing sugar.” Analytical Chemistry. ๓๑(๓): ๔๒๖-๔๒๘.

Mohamed, H., Abdel, N. A. Z and Maysa M. A. All (๒๐๑๓). “Optimization of the fermentation conditions for ethanol production by new thermotolerant yeast strains of *Kluyveromyces sp*.” African journal of Microbiology Research. Vol ๗ (๓๗), pp. ๔๔๕๐-๔๕๖๑

Nadya, H., Zainal, S., Atikah, O and Tengku Elli da, T.Z.M. (๒๐๑๒). “Optimization of Ethanol Fermentation from Pineapple Peel Extract Using Response Surface Methodology (RSM)”. World Academy of Science, Engineering and Technology.

Nagodawithana, T. (๑๙๙๒). “Yeast-derived flavor enhancer and their probable mode of action.” Food Technology. ๔๖(๑๑): ๑๓๘ – ๑๔๓.

Oh, H., Y-J. Wee, J.-S. Yun, S.H. Han, S.Jung and H.-W. Ryu. (๒๐๐๕). “Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials.” Biores Technol. ๙๖: ๑๔๙๒-๑๔๙๘

Pereira, F.B., M.R., Jose A.T., Domingues, L. (๒๐๑๐). “Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by Saccharomyces cerevisiae using statistical experimental Designs.” Bioresour.Technol.

Walker, G.M. ๑๙๙๘. Yeast Physiology and Biotechnology. Chichester: John Wiley & Sons.

Yan, L., Wei, Z., Chunjie, L., Kei, S., Shuzo, T. and Hainan, K. (๒๐๑๒). “Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY ๔๗๔๒”. Biomass and Bioenergy. p. ๑-๗