

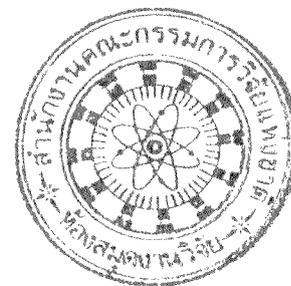
บทที่ 4  
ผลการทดลอง

4.1 การหองค์ประกอบหลักที่สำคัญในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานและเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการหมัก

องค์ประกอบหลักในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์ KKU 40 แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่า น้ำตาลส่วนมากที่ตรวจพบในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน คือ น้ำตาลซูโครส ซึ่ง *S. cerevisiae* สามารถใช้เพื่อผลิตเป็นเอทานอลได้โดยตรง

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์ KKU 40

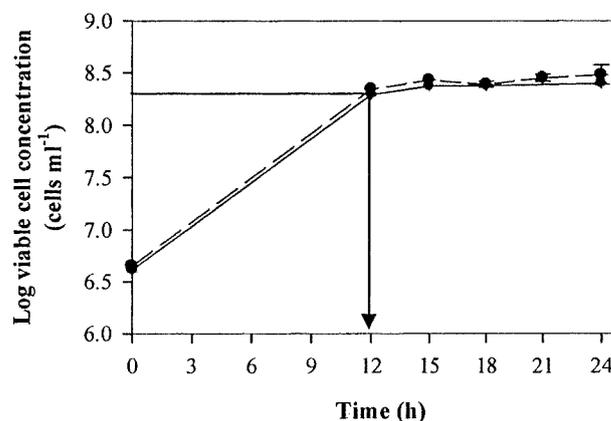
Compositions of sweet sorghum stem juice	
pH	4.9
Total soluble solid (°Bx)	18
Reducing sugar (g l <sup>-1</sup> )	37.65
Total sugar (g l <sup>-1</sup> )	173.02
Fructose (g l <sup>-1</sup> )	11.46
Glucose (g l <sup>-1</sup> )	14.22
Sucrose (g l <sup>-1</sup> )	124.05
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (ppm)	21.4
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (ppm)	4.4
Total P (ppm)	20
Total K (ppm)	1790
Total Na (ppm)	170
Total S (ppm)	120
Total Ca (ppm)	166
Total Mg (ppm)	194
Total Fe (ppm)	2
Total Mn (ppm)	3
Total Cu (ppm)	0.3
Total Zn (ppm)	1.4



4.2 เตรียมเมล็ดเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP01 เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเตรียมเมล็ดเชื้อโดยใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานแทนอาหารสังเคราะห์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับขยายขนาดหรือระดับอุตสาหกรรมต่อไป ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนของอาหารสังเคราะห์ที่มีราคาแพงได้ น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ใช้มีน้ำตาลเริ่มต้น 150

กรัมต่อลิตร (17.2 องศาบริกซ์) ซึ่งใช้เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้น *S. cerevisiae* NP01 ถูกถ่ายลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 ลิตร ประกอบด้วยยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ 3.0 กรัม มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์ 3.0 กรัม เปปโทน 5.0 กรัม และกลูโคส 10.0 กรัม บ่มฟลอส์บน rotating shaker ที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 17.2 องศาบริกซ์ (ความเข้มข้นน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร) สภาวะการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 สภาวะ คือ ไม่มีการเติมและมีการเติมองค์ประกอบ YM โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 360 มิลลิลิตร และให้มีกล้าเชื้อเริ่มต้นเฉลี่ย  $3.0 - 4.25 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 5 โดยปริมาตร) จากนั้นนำพลาสติกไปบ่มในสภาวะดังที่กล่าวข้างต้น ผลการทดลองพบว่า ในช่วงเวลาดังกล่าว ภายใต้สภาวะทั้งสองให้ปริมาณกล้าเชื้อยีสต์ใกล้เคียงกัน และมีกล้าเชื้อยีสต์เฉลี่ย  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้น การทดลองต่อไปจะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเติมองค์ประกอบ YM (รูปที่ 4.1)



**รูปที่ 4.1** การเจริญของ *S. cerevisiae* NP01 ในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 150 กรัมต่อลิตร และมีการเติม (---) และไม่มีการเติม (—) ด้วย ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ (3 กรัมต่อลิตร) มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์ (3 กรัมต่อลิตร) และเปปโทน (5 กรัมต่อลิตร)

#### 4.3 การผลิตเอทานอลแบบกะโดยการแปรผันอัตราการให้อากาศ การกวนและเวลาในการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ Orthogonal

การผลิตเอทานอลแบบกะมีการแปรผันอัตราการให้อากาศที่ 0, 0.5, 1.5 และ 2.5 vvm แปรผันอัตราการกวนที่ 100, 150 และ 200 rpm และแปรผันเวลาในการให้อากาศเป็น 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง เพื่อหาอัตราการกวน การให้อากาศ และระยะเวลาในการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ และการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ Orthogonal

ก่อนการทดลองการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ Orthogonal หรือ RSM นั้นจะต้องศึกษาค่าปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมเบื้องต้นก่อน เพื่อนำไปออกแบบค่าปัจจัยในการทดลอง การศึกษาเบื้องต้น (preliminary study) ในการผลิตเอทานอลที่มีการแปรผันปัจจัยดังที่กล่าว จะต้องมีการศึกษาความแตกต่างของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา นั่นคือ ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในระดับของปัจจัยที่มีค่าต่ำสุด สูงสุด และชุดควบคุม ซึ่งประกอบด้วย

สภาวะที่ 1 (ชุดควบคุม) ที่มีอัตราการกวน 100 rpm ไม่มีการให้อากาศ

สภาวะที่ 2 (ระดับต่ำสุด) ที่มีอัตราการกวน 100 rpm มีการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

สภาวะที่ 3 (ชุดควบคุม) ที่มีอัตราการกวน 200 rpm ไม่มีการให้อากาศ

สภาวะที่ 4 (ระดับสูงสุด) ที่มีอัตราการกวน 200 rpm มีการให้อากาศ 2.5 vvm เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

การทดลองการผลิตเอทานอลทั้ง 4 สภาวะ จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะ VHG (very high gravity) (Jones และคณะ, 1994; Jones และ Ingledew, 1994a,b; Thomas และคณะ, 1990, 1996; Bafrcová และคณะ, 1999; Bayrock และ Ingledew, 2001; Bai และคณะ, 2004a; Reddy และ Reddy, 2006) และ ไม่มีการเติมสารอาหารใดๆ โดยใช้กล้าเชื้อ *S. cerevisiae* NP 01 ที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $1 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.2(A) ถึง 4.2(D)

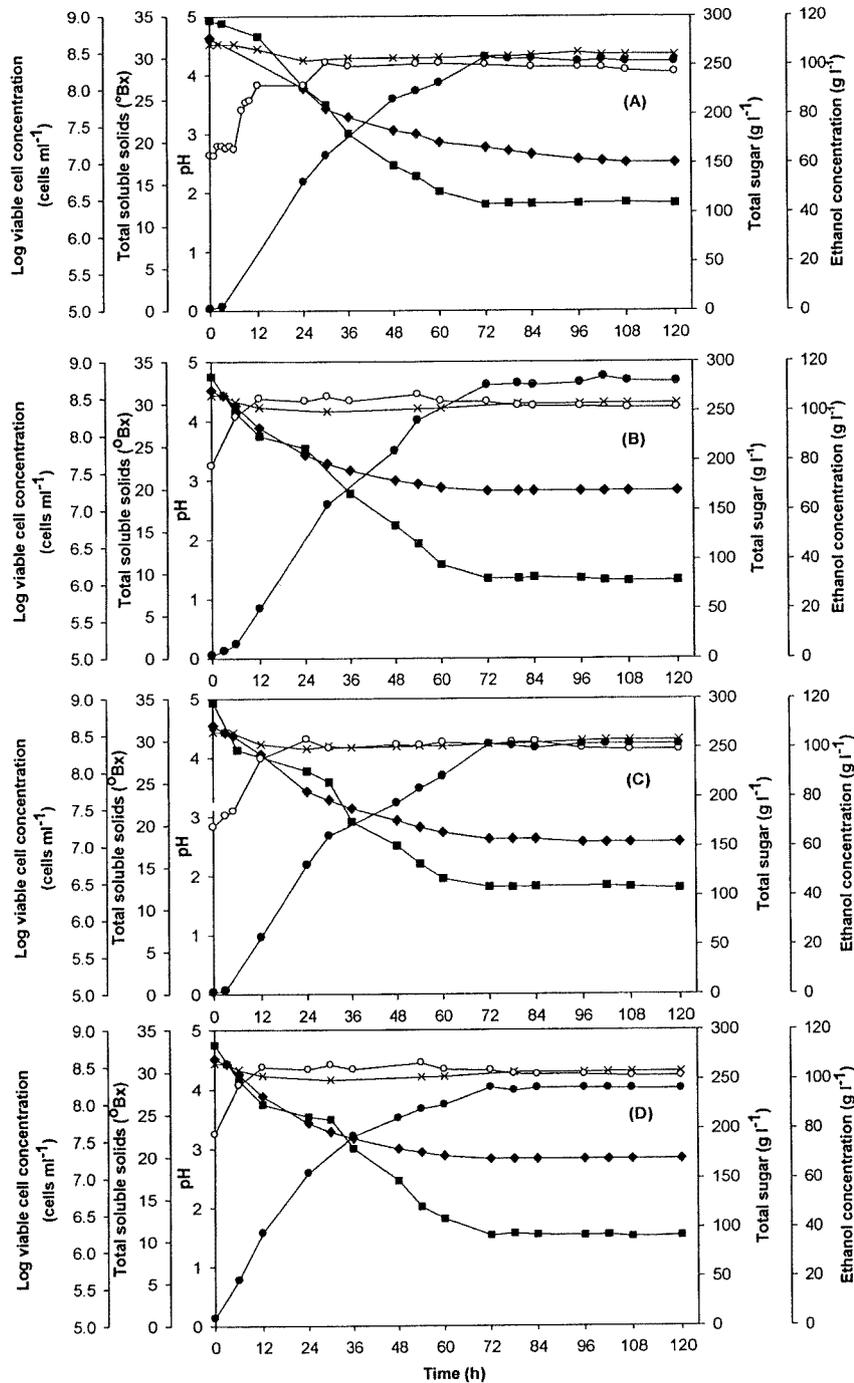
รูปที่ 4.2 (A) แสดงจลนพลศาสตร์ (kinetics) ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 1 (ชุดควบคุม) ซึ่งระบบการหมักมีอัตราการกวน 100 rpm และไม่มีการให้อากาศ เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 295.70 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 187.61 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 32.4 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $1.25 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง และคงที่ที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยมีค่า 108.30 กรัมต่อลิตร 41.52 กรัมต่อลิตร และ 19.4 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 103.24 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆ ลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.25 - 4.52

รูปที่ 4.2 (B) แสดงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 2 (ระดับต่ำสุด) ซึ่งระบบการหมักมีอัตราการกวน 100 rpm และมีการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเริ่มต้นระบบที่มีการให้อากาศที่สภาวะนี้ พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 298.34 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 179.25 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 32 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $1.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก (ณ เวลาที่หยุดให้อากาศ) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 286.24 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 206.43 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.6 องศาบริกซ์ และ

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $1.40 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง และคงที่ที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยมีค่า 81.00 กรัมต่อลิตร และ 19.8 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 110.56 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆ ลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.16 - 4.43

รูปที่ 4.2(C) แสดงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 3 (ชุดควบคุม) ซึ่งระบบการหมักมีอัตราการกวน 200 rpm และไม่มีการให้อากาศ เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 296.34 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.8 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $1.85 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง และคงที่ที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยมีค่า 109.93 กรัมต่อลิตร และ 18.4 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 101.54 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆ ลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.15 - 4.43

รูปที่ 4.2(D) แสดงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 4 (ระดับสูงสุด) ซึ่งระบบการหมักมีอัตราการกวน 200 rpm และมีการให้อากาศ 2.5 vvm เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อเริ่มต้นระบบที่มีการให้อากาศที่สภาวะนี้ พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 290.49 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.6 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $1.10 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก (ณ เวลาที่หยุดให้อากาศ) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 285.00 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.6 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $1.40 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง และคงที่ที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยมีค่า 92.31 กรัมต่อลิตร และ 19.8 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 96.88 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆ ลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.16 - 4.43



**รูปที่ 4.2** การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร สภาวะที่ 1 (A) มีอัตราการกวน 100 rpm ไม่มีการให้อากาศ 2 (B) มีอัตราการกวน 100 rpm มีการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง 3 (C) มีอัตราการกวน 200 rpm ไม่มีการให้อากาศและ 4 (D) มีอัตราการกวน 200 rpm มีการให้อากาศ 2.5 vvm เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* NP01 เริ่มต้น  $1.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (○ = ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร), ◆ = ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์), ● = ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร), ■ = ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) และ × = พีเอช)

ตารางที่ 4.2 สรุปค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ที่สำคัญของการหมักเอทานอลภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันทั้ง 4 สภาวะ ที่ชั่วโมงที่ 72 - 78 จากผลการทดลองพบว่า ทั้ง 4 สภาวะ *S. cerevisiae* NP 01 สามารถใช้น้ำตาล ผลิตเอทานอล ได้ค่าผลได้เอทานอล และอัตราผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 198.00 – 217.69 กรัมต่อลิตร 96.88-110.56 กรัมต่อลิตร 0.45-0.52 กรัมเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ไป และ 1.28 - 1.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ที่ได้จากสภาวะดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่าปัจจัยที่แปรผันในสภาวะต่างๆ ให้ผลยังไม่ชัดเจนต่อการหมักเอทานอลโดยเฉพาะความเข้มข้นเอทานอล ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสภาวะดังกล่าวมีความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงอยู่ในระดับ VHG โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นตั้งแต่ 250 กรัมต่อลิตร ขึ้นไป (Bai และคณะ, 2004) จึงอาจมีผลต่อความสามารถในการใช้น้ำตาลของ *S. cerevisiae* NP 01 เนื่องมาจากน้ำหมักในสภาวะที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงๆ จะมีแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ในการซึมผ่านของสารอาหารเข้าสู่เซลล์ (Ozmichi และ Kergi, 2007) นอกจากนี้ในการหมักเอทานอลทั้ง 4 สภาวะดังกล่าว พบว่าเหลือความเข้มข้นของน้ำตาลในปริมาณสูง ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้น 81-109.35 กรัมต่อลิตร จากการทดลองของ Laopaiboon และคณะ (2009) พบว่า เมื่อเติมความเข้มข้นยีสต์เอกซ์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร ลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ยีสต์เอกซ์แทรกต์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลของยีสต์ในสภาวะการหมักที่เป็น VHG ได้ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเติมยีสต์เอกซ์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร และเพิ่มปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้นเป็น  $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 4 สภาวะเดิม เพื่อดูความแตกต่างของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานอีกครั้ง

ตารางที่ 4.2 ค่าพารามิเตอร์ของกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร โดย *S. cerevisiae* NP 01 ภายใต้สภาวะต่างๆ กัน

ค่าพารามิเตอร์	สภาวะที่ 1	สภาวะที่ 2	สภาวะที่ 3	สภาวะที่ 4
ปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	$1.25 \times 10^7$	$1.40 \times 10^7$	$1.85 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$
ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	291.70	291.24	292.34	290.00
ความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	198.00	211.64	201.62	217.69
ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	103.24	110.56	101.54	96.88
ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ไป)	0.52	0.52	0.52	0.45
อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	1.43	1.54	1.41	1.28
ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	72	74	72	78

การผลิตเอทานอลภายใต้ 4 สภาวะ ดังกล่าวจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร และมีการเติมยีสต์เอกซ์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร และใช้ปริมาณ

กล้าเชื้อ *S. cerevisiae* NP 01 เริ่มต้น  $2 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงดังภาพที่ 4.3(A) ถึง 4.3(D)

รูปที่ 4.3(A) แสดงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 1 (ชุดควบคุม) ซึ่งระบบการหมักมีอัตราการกวน 100 rpm และไม่มีการให้อากาศ เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 294.39 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.4 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $2.1 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง และคงที่ที่ชั่วโมงที่ 54 โดยมีค่า 56.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่คงที่ที่ 54 ชั่วโมง โดยมีค่า 16.6 องศาบริกซ์ ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 54 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 123.19 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆ ลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.37 - 4.64

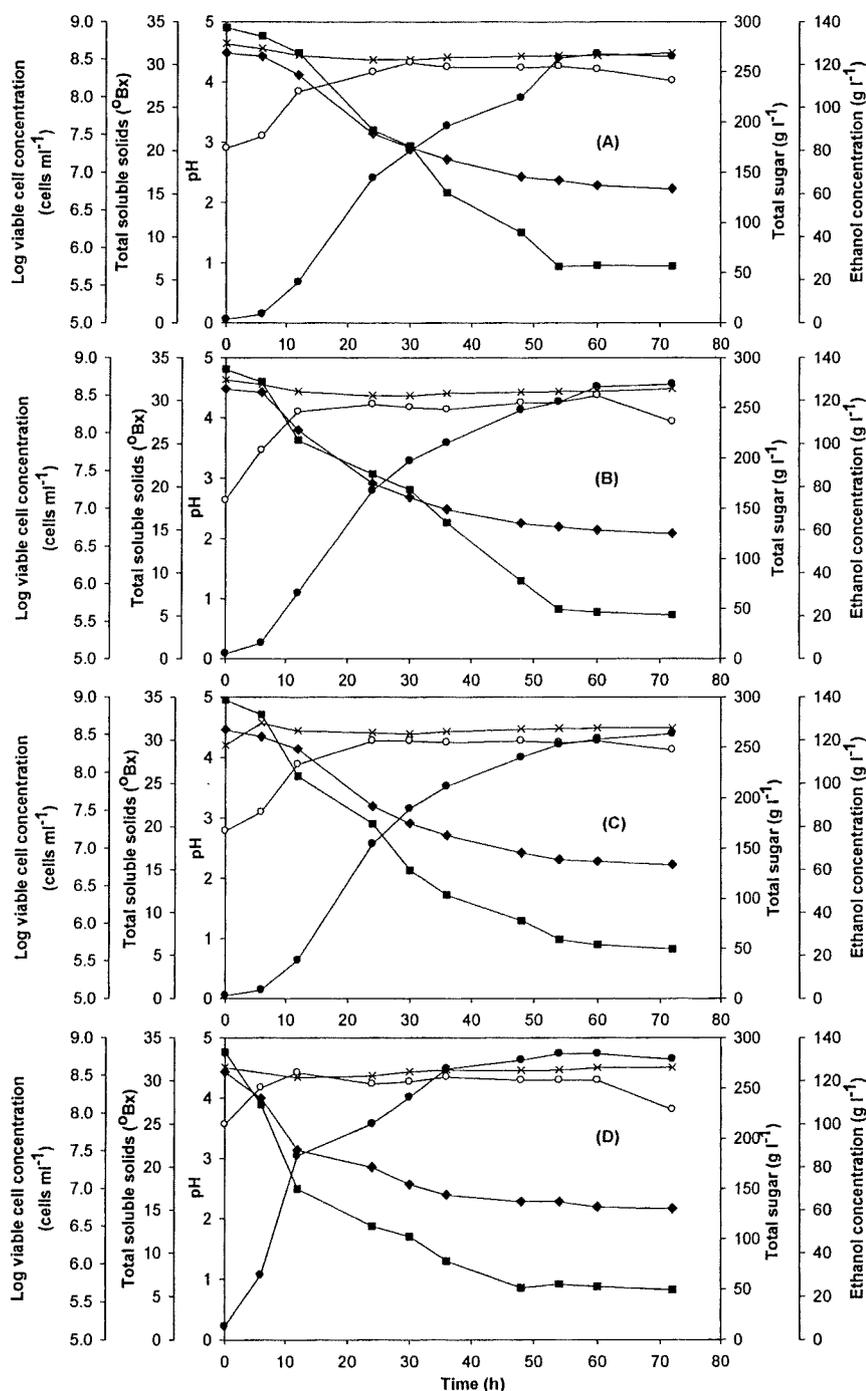
รูปที่ 4.3(B) แสดงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 2 (ระดับต่ำสุด) ซึ่งระบบการหมักมีอัตราการกวน 100 rpm และมีการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเริ่มต้นระบบที่มีการให้อากาศ ที่สภาวะนี้พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 292.72 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.4 องศาบริกซ์ และมีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $1.95 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก (ณ เวลาที่หยุดให้อากาศ) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 288.87 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.2 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $2.5 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง และคงที่ที่ชั่วโมงที่ 54 โดยมีค่า 49.70 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่คงที่ที่ชั่วโมงที่ 54 โดยมีค่า 15.4 องศาบริกซ์ ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 54 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 119.44 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆ ลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.37 - 4.64

รูปที่ 4.3(C) แสดงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 3 (ชุดควบคุม) ซึ่งระบบการหมักมีอัตราการกวน 200 rpm และไม่มีการให้อากาศ เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 297.05 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.2 องศาบริกซ์ และมีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น  $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง และคงที่ที่ชั่วโมงที่ 54 โดยมีค่า 59.17 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดพบว่าที่ชั่วโมงดังกล่าวมีค่าคงที่ โดยมีค่า 16.2 องศาบริกซ์ ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 54 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 118.02 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆ ลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดการหมัก โดยมีค่าพีเอชประมาณ 4.20 - 4.57

รูปที่ 4.3(D) แสดงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 4 (ระดับสูงสุด) ซึ่งระบบการหมักมีอัตราการกวน 200 rpm และมีการให้อากาศ 2.5 vvm เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อเริ่มต้นระบบที่มีการให้อากาศ ที่สภาวะนี้พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 291.03

กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.0 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้น  $2.3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก (ณ เวลาที่หยุดให้อากาศ) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 285.71 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 31.0 องศาบริกซ์ และปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้น  $7.15 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อการหมักดำเนินไป ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ ลดลง และคงที่ที่ชั่วโมงที่ 48 โดยมีค่า 51.53 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 16.0 องศาบริกซ์ ที่ชั่วโมงดังกล่าว สำหรับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 129.73 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆ ลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.34 - 4.51

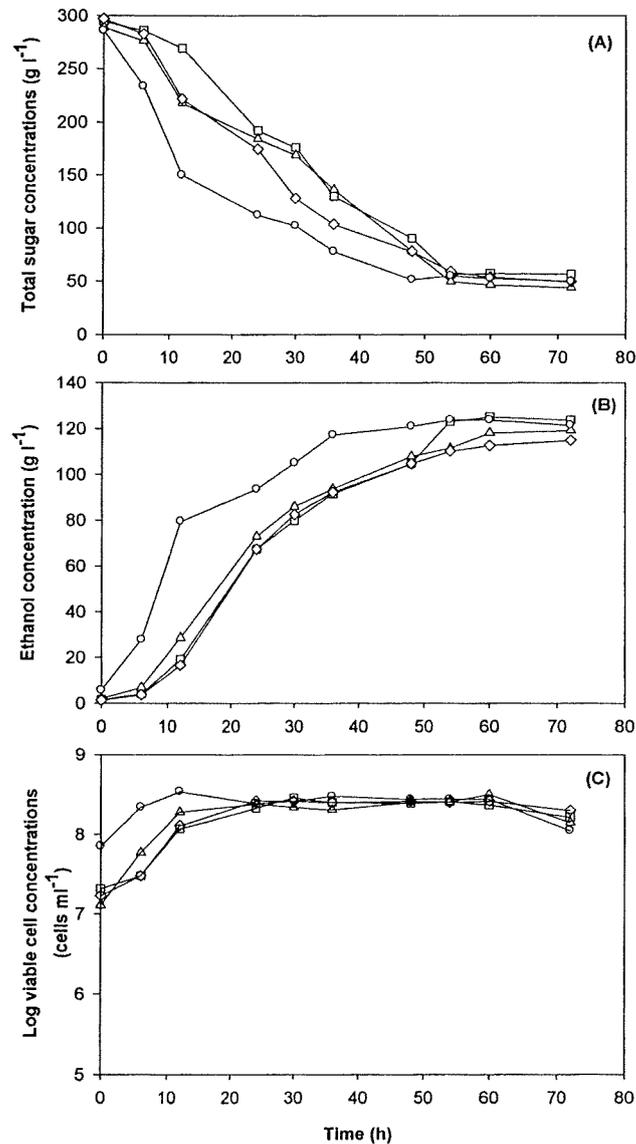
ภายใต้สภาวะทั้ง 4 สภาวะ ซึ่งมีการเติมยีสต์เอ็กซ์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร นี้ พบว่าระยะเวลาในการหมักสั้นกว่าการหมักภายใต้สภาวะทั้ง 4 สภาวะ ที่ไม่มีการเติมยีสต์เอ็กซ์แทรกต์ประมาณ 1.4 - 1.6 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารอาหารที่มีในยีสต์เอ็กซ์แทรกต์สามารถลดระยะเวลาในการหมัก เพิ่มอัตราผลผลิต และความเข้มข้นของเอทานอลโดย *S. cerevisiae* NP 01 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Díaz-Montaño และคณะ (2010)



รูปที่ 4.3 การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร สภาวะที่ 1 (A) มีอัตราการกวน 100 rpm ไม่มีการให้อากาศ 2 (B) มีอัตราการกวน 100 rpm มีการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง 3 (C) มีอัตราการกวน 200 rpm ไม่มีการให้อากาศและ 4 (D) มีอัตราการกวน 200 rpm มีการให้อากาศ 2.5 vvm เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และมีการเติมยีสต์เอคส์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณ *S. cerevisiae* NP 01 เริ่มต้น  $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร: (○ = ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร), ◆ = ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์), ● = ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร), ■ = ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) และ × = พีเอช )

จากรูปที่ 4.3(A) ถึง 4.3(D) เมื่อนำความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นเอทานอล และความเข้มข้นเซลล์ที่มีชีวิต ภายใต้สภาวะการหมักที่แตกต่างกันโดยใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร และเติมยีสต์เอ็กส์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* NP 01 เริ่มต้น  $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาเปรียบเทียบจะ ได้ผลแสดงดังในภาพที่ 4 ผลการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะที่ 4 นั้น *S. cerevisiae* NP 01 สามารถใช้น้ำตาลทั้งหมดได้เร็วกว่าภายใต้สภาวะที่ 3, 2 และ 1 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.4(A) และ ภายใต้สภาวะที่ 4 *S. cerevisiae* NP 01 สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วกว่าภายใต้สภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 4.4(B) โดยปริมาณเอทานอลเริ่มคงที่ในช่วงที่ 48 ในขณะที่ภายใต้สภาวะที่ 1, 2 และ 3 ปริมาณเอทานอลเริ่มคงที่ที่ช่วงที่ 54 อย่างไรก็ตาม รูปแบบการหมักภายใต้ทั้ง 4 สภาวะนี้มี ลักษณะคล้ายคลึงกัน ภายใต้สภาวะทั้ง 4 นี้ *S. cerevisiae* NP 01 สามารถใช้น้ำตาลได้มากกว่า การทดลองการหมักเอทานอลในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ไม่มีการเติมยีสต์เอ็กส์แทรกต์ และ เหลือความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำหมักประมาณ 49.70 - 56.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าใน ยีสต์เอ็กส์แทรกต์มีสารอาหารที่จำเป็นสำหรับ *S. cerevisiae* NP 01 ในการผลิตเอทานอล (Seo และคณะ, 2009; Laopaiboon และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตาม ในการหมักเอทานอลภายใต้ สภาวะที่ 4 ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ระดับสูงสุดในแต่ละปัจจัยที่จะนำมาศึกษา พบว่า ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทั้งในแง่ความเข้มข้น ผลได้ และอัตราผลผลิตเอทานอล (ตารางที่ 4.3) อาจเป็นเพราะการกวนและการให้อากาศที่มากขึ้นทำให้ค่าการละลายของ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์ในวิถีที่ใช้อากาศ (aerobic condition) (Hewitt และคณะ, 2000; Nebo-von-Caron และคณะ, 2000; Boswell และ คณะ, 2003) ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกสูงขึ้น ทำให้ยีสต์เพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าสภาวะอื่นๆ ดังแสดง ในรูปที่ 4.4 (C) และอาจทำให้ความสามารถของยีสต์ต่อประสิทธิภาพการหมักเอทานอลใน สภาวะที่ไร้อากาศ (anaerobic condition) เมื่อระบบหยุดการให้อากาศมีค่ามากขึ้น Thomas และคณะ (1996) พบว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมและสารอาหารที่เหมาะสม *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลและทนเอทานอลได้สูงขึ้น การทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ ผลได้ของ เซลล์ และความมีชีวิตรอดของเซลล์เพิ่มขึ้น อาจทำโดยเพิ่มการให้อากาศให้กับยีสต์ภายใต้ สภาวะทั้ง microaerobic และ aerobic conditions นอกจากนี้ Alfenore และคณะ (2004) พบว่า การเจริญของเซลล์ยีสต์ถูกยับยั้งโดยเอทานอลและการยับยั้งมีค่าลดลงในสภาวะที่มีการให้อากาศเพียงเล็กน้อย (microaerobic conditions) และพบว่าอัตราผลผลิตเอทานอลจำเพาะ เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณออกซิเจนในอาหารเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาการทดลองในสภาวะที่ 1 และ สภาวะที่ 3 ซึ่งระบบมีอัตราการกวน 100 rpm และ 200 rpm ไม่มีการให้อากาศ ตามลำดับ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางจลนพลศาสตร์เพียงเล็กน้อยทั้งในแง่ของน้ำตาลที่ถูกใช้ ความเข้มข้นเอทานอล ผลได้ และอัตราผลผลิตเอทานอล (ตารางที่ 4.3) ดังนั้นการออกแบบการ ทดลองในระดับของปัจจัยซึ่งเป็นอัตราการกวนจาก 100, 150 และ 200 rpm อาจทำให้สังเกตเห็น ความแตกต่างของระดับในปัจจัยที่มีอัตราการกวนไม่ชัดเจน การทดลองต่อไปเพื่อที่จะให้เห็น

ความชัดเจนยิ่งขึ้นในแต่ละระดับของปัจจัย อัตราการกวนจึงเปลี่ยนระดับการกวนเป็น 100, 200 และ 300 rpm ส่วนระดับของค่าปัจจัยอื่นๆ ยังให้ค่าคงเดิม



**รูปที่ 4.4** การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (A) ความเข้มข้นเอทานอล (B) และความเข้มข้นเซลล์ที่มีชีวิต (C) ในการผลิตเอทานอล (เมื่อระบบหยุดให้อากาศ) จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร และมีการเติมยีสต์เอ็กซ์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* NP01 เริ่มต้น  $2.0 \times 10^7$  เซลล์: (□ = สภาวะที่ 1 มีอัตราการกวน 100 rpm ไม่มีการให้อากาศ, Δ = สภาวะที่ 2 มีอัตราการกวน 100 rpm มีการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง, ◇ = สภาวะที่ 3 มีอัตราการกวน 200 rpm ไม่มีการให้อากาศและ ○ = สภาวะที่ 4 มีอัตราการกวน 200 rpm มีการให้อากาศ 2.5 vvm เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง)

**ตารางที่ 4.3** ค่าพารามิเตอร์ของกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร และมีการเติมยีสต์เอ็กส์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร โดย *S. cerevisiae* NP 01 ภายใต้สภาวะต่างๆ กัน

ค่าพารามิเตอร์	สภาวะที่ 1	สภาวะที่ 2	สภาวะที่ 3	สภาวะที่ 4
ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	$2.1 \times 10^7$	$1.95 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7$
ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	294.39	292.72	297.05	291.03
ความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	237.98	239.17	237.88	244.18
ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	119.44	121.33	118.02	123.51
ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ไป)	0.50	0.51	0.50	0.51
อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	2.21	2.17	2.19	2.29
ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	54	56	54	54

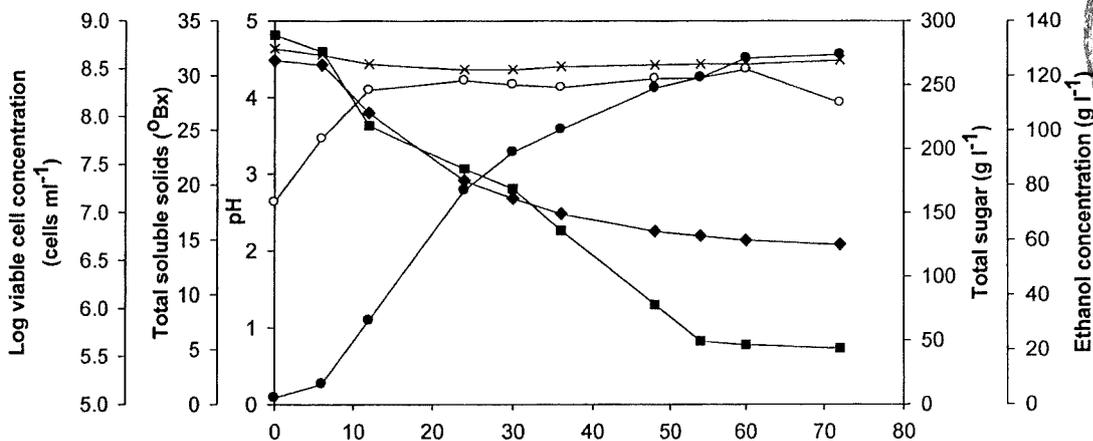
เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการหมักเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร และมีการเติมยีสต์เอ็กส์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร ที่มีการแปรผันอัตราการกวน (100, 200 และ 300 rpm) อัตราการให้อากาศ (0.5, 1.5 และ 2.5 vvm) และระยะเวลาในการให้อากาศ (2, 4 และ 6 ชั่วโมง) โดยอาศัยเทคนิคทางสถิติ เพื่อที่จะลดจำนวนการทดลองและหาความสัมพันธ์ของตัวแปรที่สนใจศึกษา นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของปัจจัยเหล่านั้นพร้อมกันจะได้สภาวะที่เหมาะสม การศึกษาจะออกแบบการทดลองที่มีการแปรผันปัจจัยต่างดังกล่าวข้างต้น โดยใช้วิธี  $L_9 (3^4)$  Orthogonal ดังแสดงในตารางที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** การออกแบบการทดลองโดยใช้  $L_9 (3^4)$  Orthogonal

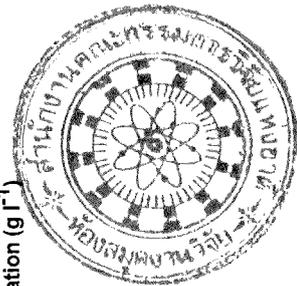
สภาวะที่	A: อัตราการกวน (rpm)	B: อัตราการให้อากาศ (vvm)	C: ระยะเวลาในการให้อากาศ (h)
1	100	0.5	2
2	100	2.5	6
3	200	0.5	6
4	300	1.5	6
5	300	0.5	4
6	200	1.5	2
7	200	2.5	4
8	300	2.5	2
9	100	1.5	4

รูปที่ 4.5 แสดงจนผลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ 1 (อัตราการกวน 100 rpm อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และระยะเวลาในการให้อากาศ 2 ชั่วโมง) เมื่อเริ่มต้น

กระบวนการหมักพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด พีเอช และ ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 292.70 กรัมต่อลิตร 31.2 องศาบริกซ์ 4.58 และ  $1.95 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในช่วงเริ่มต้นการหมักมีการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์เพิ่มจำนวน แข็งแรง และว่องไว (active) และเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศโดยหมักต่อเนื่องจากการเจริญของยีสต์ Hammond (2000) รายงานว่า ออกซิเจนที่มีในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมักจะถูกใช้อย่างรวดเร็ว เพื่อนำไปสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ที่มีประโยชน์ต่อการเจริญ เซลล์ยีสต์เพิ่มจำนวนใน 12 ชั่วโมงแรก ของการหมักมีค่าประมาณ  $2.0 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย และมีค่า  $3.14 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 60 สำหรับพีเอชของน้ำหมักจะค่อยๆลดลงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.5 ผลการทดลองพบว่าไม่เกิด lag phase ภายหลังจากถ่ายกล้าเชื้อลง (inoculation) แสดงให้เห็นว่า *S. cerevisiae* NP 01 เจริญได้ดีภายใต้สภาวะดังกล่าว ภายใต้สภาวะนี้ปริมาณน้ำตาลถูกใช้ไม่หมดและยังคงเหลือในน้ำหมัก 39.83 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 15 องศาบริกซ์ ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และคงที่ในชั่วโมงที่ 60 โดยมีค่า 121.33 กรัมต่อลิตร อัตราผลผลิต 1.96 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ 0.48 สำหรับการหมัก ภายใต้สภาวะอื่นๆ ที่เหลือ การเปลี่ยนแปลงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจะคล้ายคลึงกับสภาวะที่ 1 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยตารางที่ 4.5 ได้สรุปค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ที่สำคัญของการหมักเอทานอลภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันทั้ง 9 สภาวะได้ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มี 2 การทดลอง ได้แก่ สภาวะที่ 7 และ 8 ที่ให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงที่สุดในแง่ความเข้มข้นและอัตราผลผลิต



**รูปที่ 4.5** การผลิตเอทานอลแบบกะภายใต้สภาวะที่ 1 โดยใช้ น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มี น้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร และมีการเติมยีสต์เอ็กซ์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร โดย *S. cerevisiae* NP 01 (○ = ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต, ▲ = ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด, × = พีเอช, ■ = ปริมาณน้ำตาล และ ● = ความเข้มข้นเอทานอล)



**ตารางที่ 4.5** พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดย *S. cerevisiae* NP 01 ภายใต้การออกแบบ Orthogonal

สภาวะที่	ค่าพารามิเตอร์	
	$P$ (กรัมต่อลิตร)	$Q_p$ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
1	121.33 ± 0.60	1.96 ± 0.01
2	117.30 ± 1.85	2.17 ± 0.03
3	126.64 ± 2.21	2.35 ± 0.04
4	121.36 ± 1.32	2.25 ± 0.02
5	129.22 ± 1.94	2.23 ± 0.03
6	127.03 ± 0.61	2.27 ± 0.01
7	131.02 ± 0.93	2.52 ± 0.02
8	129.27 ± 0.39	2.59 ± 0.01
9	121.28 ± 0.58	2.33 ± 0.01

หมายเหตุ  $P$  = ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร);  $Q_p$  = อัตราผลผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

การวิเคราะห์ลำดับ (range analysis) ของปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบ Orthogonal เพื่อจัดเรียงลำดับความสำคัญของอัตราการกวน (ปัจจัย A) อัตราการให้อากาศ (ปัจจัย B) และเวลาในการให้อากาศ (ปัจจัย C) ที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล (ตารางที่ 4.6 และ 4.7) ค่าลำดับ ( $R$ ) ที่มีค่ามากแสดงถึงอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการหมักเอทานอล เมื่อพิจารณาค่าลำดับโดยใช้ค่าของความเข้มข้นเอทานอลเป็นพารามิเตอร์ในการพิจารณา (ตารางที่ 4.6) พบว่า ค่าลำดับสูงสุดและต่ำสุด คือ ปัจจัย A (8.26) และปัจจัย B (2.64) ตามลำดับ และพบว่าลำดับของการมีอิทธิพล (order of influence) คือ อัตราการกวน > เวลาในการให้อากาศ > อัตราการให้อากาศ ในขณะที่ลำดับของการมีอิทธิพลโดยใช้ค่าของอัตราผลผลิตเอทานอลเป็นพารามิเตอร์ในการพิจารณา (ตารางที่ 4.7) พบว่า ค่าลำดับสูงสุดและต่ำสุด คือ ปัจจัย B (0.26) และปัจจัย C (0.09) ตามลำดับ ซึ่งการจัดเรียงลำดับของการมีอิทธิพล คือ อัตราการให้อากาศ > อัตราการกวน > เวลาในการให้อากาศ อย่างไรก็ตาม สภาวะที่เหมาะสมในการให้อากาศสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงในแง่ของค่าความเข้มข้นเอทานอลและอัตราผลผลิตเอทานอลคล้ายกัน ไม่ว่าจะใช้ค่าของความเข้มข้นเอทานอลหรืออัตราผลผลิตเอทานอลเป็นพารามิเตอร์ นั่นคือ  $A_2B_3C_2$  (มีอัตราการกวน 200 rpm อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm และเวลาในการให้อากาศ 4 ชั่วโมง) ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งคือสภาวะที่ 7 ของการทดลอง (ตารางที่ 4.5) โดยได้ความเข้มข้นเอทานอล 131.02 กรัมต่อลิตร อัตราผลผลิตเอทานอล 2.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.50

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ลำดับของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลใน  $L_9 (3^4)$  Orthogonal โดยใช้ความเข้มข้นเอทานอล

	อัตราการกลวน A	อัตราการให้อากาศ B	เวลาในการให้อากาศ C
$K_1$	129535.2	142272.3	142604.4
$K_2$	147986.4	136655.9	145557.5
$K_3$	144286	142574.2	133444.1
$k_1$	119.97	125.73	125.88
$k_2$	128.23	123.22	127.17
$k_3$	126.62	125.86	121.77
R	8.26	2.64	5.4
Q	$A_2$	$B_3$	$C_2$

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ลำดับของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลใน  $L_9 (3^4)$  Orthogonal โดยใช้อัตราผลผลิตเอทานอล

	อัตราการกลวน A	อัตราการให้อากาศ B	เวลาในการให้อากาศ C
$K_1$	41.73	42.25	46.51
$K_2$	50.98	46.92	49.56
$K_3$	49	53	45.83
$k_1$	2.15	2.17	2.27
$k_2$	2.38	2.28	2.35
$k_3$	2.33	2.43	2.26
R	0.23	0.26	0.09
Q	$A_2$	$B_3$	$C_2$

ตารางที่ 4.8 สภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยอิสระและระดับของแต่ละปัจจัยจากการออกแบบโดย  $L_9 (3^4)$  Orthogonal

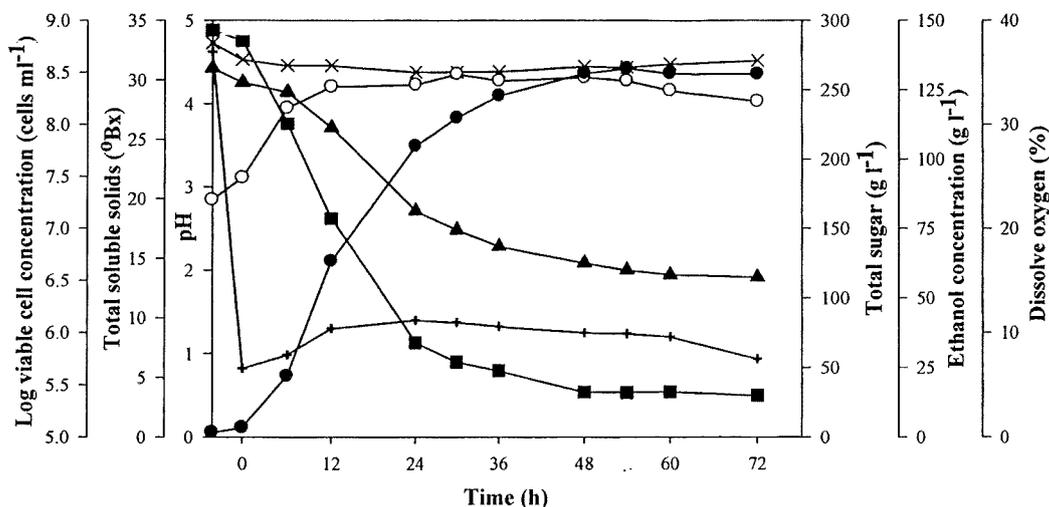
ปัจจัย	สภาวะที่เหมาะสม
อัตราการกลวน	$A_2$ 200 rpm
อัตราการให้อากาศ	$B_3$ 2.5 vvm
เวลาในการให้อากาศ	$C_2$ 4 h

#### 4.4 การทวนสอบผลการทดลอง (verification experiment) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในรูปของความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ ผลได้ และอัตราผลผลิต ของเอทานอลที่สภาวะการให้อากาศต่าง ๆ

การทวนสอบผลการทดลองเป็นการทดลองเพื่อที่จะยืนยันว่าสภาวะที่ได้จากการทำนาย โดย  $L_9 (3^4)$  Orthogonal เป็นสภาวะที่เหมาะสม (ข้อ 4.3) ในแง่ของค่าความเข้มข้นเอทานอล และอัตราผลผลิตเอทานอล การหมักเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้สภาวะตามข้อ 4.3 ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 290 กรัมต่อลิตร ความคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP 01 เริ่มต้น  $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มต้นระบบการผลิตเอทานอลจะมีการควบคุมอัตราการกวน 200 rpm อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm และเวลาในการให้อากาศ 4 ชั่วโมง

รูปที่ 4.6 แสดงจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีอัตราการกวน 200 rpm อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm และระยะเวลาในการให้อากาศ 4 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าที่ชั่วโมง 48 หลังจากหยุดให้อากาศพบ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 32.51 กรัมต่อลิตร 14.8 องศาบริกซ์ และ  $2.85 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นเอทานอล อัตราผลผลิตเอทานอล และค่าผลได้มีค่า 132.82 กรัมต่อลิตร 2.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.50 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาในการหมัก 52 ชั่วโมง (รวม 4 ชั่วโมงที่มีการให้อากาศ) ในขณะที่การหมักเอทานอลที่สภาวะควบคุม (สภาวะที่ 3 คือ มีอัตราการกวน 200 rpm ไม่มีการให้อากาศ) แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าความเข้มข้นเอทานอล อัตราผลผลิตเอทานอล และค่าผลได้มีค่า 118.02 กรัมต่อลิตร 2.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.50 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาในการหมัก 54 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าสภาวะเหมาะสม  $A_2B_3C_2$  มีความเหมาะสมและใช้ได้จริงในกระบวนการหมักเอทานอลโดยยีสต์ อย่างไรก็ตาม ภายใต้การหมักแบบ VHG น้ำตาลยังถูกใช้ได้อย่างไม่สมบูรณ์โดย *S. cerevisiae* NP 01 ซึ่งอาจเป็นเพราะแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ที่มีภายใต้สภาวะนี้ (Ozmichi และ Kargi, 2007) นอกจากนี้ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าการให้อากาศเพื่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ในช่วงเริ่มต้นมีความสำคัญอย่างมากในการเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์และการหมัก

Liu และ Shen (2008) รายงานว่า ความเข้มข้นของสารอาหารที่ซึมผ่านจากน้ำหมักเข้าสู่ภายในเซลล์และการส่งผ่านเอทานอลจากภายในเซลล์สู่น้ำหมักสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ด้วยการเพิ่มอัตราการกวน อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้อัตราการกวนที่สูงเกินไป (มากกว่า 200 rpm) ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลได้มากขึ้น ซึ่งอาจเนื่องจากอัตราที่จำกัด (rate of limitation) ของความสามารถในการเมแทบอลิซึม (metabolism ability) ของเซลล์ยีสต์ (Liu และ Shen, 2008)



**รูปที่ 4.6** การผลิตเอทานอลแบบกะภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (อัตราการกวน 200 rpm อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm และเวลาในการให้อากาศ 4 ชั่วโมง) จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร และมีการเติมยีสต์เอคส์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร โดย *S. cerevisiae* NP 01 (○ = ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต, ▲ = ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด, × = พีเอช, ■ = ปริมาณน้ำตาล, ● = ความเข้มข้นเอทานอล, + = ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย)

**ตารางที่ 4.9** ค่าพารามิเตอร์ของกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 290 กรัมต่อลิตร และมีการเติมยีสต์เอคส์แทรกต์ 9 กรัมต่อลิตร โดย *S. cerevisiae* NP 01 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและสภาวะควบคุม

ค่าพารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม*	สภาวะควบคุม**
ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	132.82	118.02
อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	2.55	2.19
ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัม น้ำตาลที่ถูกใช้ไป)	0.50	0.50

\*สภาวะที่เหมาะสม อัตราการกวน 200 rpm อัตราการให้อากาศ 2.5 vvm ระยะเวลาในการให้อากาศ 4 ชั่วโมง

\*\*สภาวะควบคุม อัตราการกวน 200 rpm ไม่มีการให้อากาศ