

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน

ข้าวฟ่างหวานที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ คือข้าวฟ่างหวานพันธุ์ มข.40 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยของรองศาสตราจารย์ประสิทธิ์ ใจคิด ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หลังจากเก็บเกี่ยวต้นข้าวฟ่างหวานที่มีอายุประมาณ 120 วัน นำลำต้นข้าวฟ่างหวานไปหีบสกัดเอาเฉพาะส่วนน้ำหวานในลำต้นไปใช้ในการศึกษาวิจัย โดยนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี อาทิเช่น ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส รวมทั้งแร่ธาตุชนิดต่างๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากข้อมูลจะเห็นได้ว่าน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง ในขณะเดียวกันยังมีแร่ธาตุต่างๆ ที่มีความจำเป็นสำหรับการเจริญ และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ รวมทั้งค่าความเป็นกรด-ด่างยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์ นั่นคือมีค่าอยู่ในช่วง 3.8 – 5.5 (วรารุณศิริสง, 2529)

หากจะเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานและน้ำอ้อย พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำอ้อยมีค่าสูงกว่าน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่พบในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกับที่พบในน้ำอ้อย จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมีศักยภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเช่นเดียวกับน้ำอ้อย

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานและน้ำอ้อย

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ	
	น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน	น้ำอ้อย*
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	4.98 – 5.10	5.45

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) (องศาบริกซ์)	21.5	20 – 24
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	194.04	180 – 240
น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	175.97	ND
น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	12.32	ND
น้ำตาลฟรุกโตส (กรัมต่อลิตร)	5.75	ND
ปริมาณของธาตุไนโตรเจน (N) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	30.82	ND
ปริมาณของธาตุแมกนีเซียม (Mg) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	231.72	ND
ปริมาณของธาตุเหล็ก (Fe) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	2.39	4.2 – 7.1
ปริมาณของธาตุสังกะสี (Zn) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1.67	ND
ปริมาณของธาตุทองแดง (Cu) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.36	ND
ปริมาณของธาตุแมงกานีส (Mn) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	3.58	ND

หมายเหตุ ND หมายถึงไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูล

ที่มา: Chauhan et al. (2002)

4.2 การศึกษารูปแบบการเจริญและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ *S. cerevisiae* DBKKU-53

ในอาหารสูตรสมบูรณ์ (YM medium) และอาหารสูตรผลิตเอทานอล (EP medium)

จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 ในอาหารสูตร YM และในสูตรอาหารผลิตเอทานอล (EP) ที่ใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน (ความหวานเริ่มต้น 23 องศาบริกซ์) ที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ กัน และติดตามการเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่ระยะเวลาต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YM ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YM (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YM และในอาหารสูตรผลิตเอทานอล (EP medium) ที่ใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน

Temperature (°C)	Specific growth rate (h ⁻¹)	
	YM	EP
30	0.409	0.330
37	0.408	0.320
40	0.401	0.320
45	0.072	0.102

การที่ยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 สามารถเจริญและมีอัตราการเจริญจำเพาะในอาหารเหลวสูตร YM สูงกว่าในอาหารสูตรผลิตเอทานอล อาจเป็นเพราะในอาหารเหลวสูตร YM มีองค์ประกอบและปริมาณของสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน รวมทั้งแร่ธาตุและสารเสริมการเจริญของยีสต์ เช่น วิตามิน ที่สมบูรณ์กว่าในอาหารสูตรผลิตเอทานอล ทั้งนี้มีรายงานว่ายีสต์สปีดนอกเหนือจากเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้ว ยังมีวิตามิน เช่น ไทอะมีน ในปริมาณสูงเช่นกัน

4.3 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKU-53

4.3.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKU-53

จากการคัดเลือกปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 โดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 12 runs (ตารางที่ 4.3) และวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนด้วยโปรแกรมทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ค่าความเข้มข้นของเอทานอล และอัตราการผลิตเอทานอลเป็นเกณฑ์ในการพิจารณา พบว่าค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้และค่าอัตราการผลิตเอทานอลที่ได้จากการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลที่ได้จากการทำนายโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman มีประสิทธิภาพที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองได้

ตารางที่ 4.3 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการคัดเลือกด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

codes	Factors	units	Low level (-1)	High level (+1)
A	Sugar concentration	g L ⁻¹	180	250
B	pH		4.5	5.5
C	Cell concentration	Cells mL ⁻¹	1×10 ⁶	1×10 ⁸
D	NH ₄ NO ₃	g L ⁻¹	0.00	1.5
E	urea	g L ⁻¹	0.00	1.5
F	Yeast extract	g L ⁻¹	0.00	9.0
G	DAP	g L ⁻¹	0.00	1.5
H	MgSO ₄ ·7H ₂ O	g L ⁻¹	0.5	3.0

ตารางที่ 4.4 ชุดการทดลองเพื่อทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 และค่าตอบสนอง ภายหลังจากการออกแบบการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

Runs	Experiment values								Ethanol (g/l)		Productivity (g/l.h)	
	A	B	C	D	E	F	G	H	Model	Exp.	Model	Exp.
1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	75.07	75.12±2.01	3.17	3.10±0.04
2	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	64.41	65.54±1.68	1.26	1.35±0.02
3	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	71.93	70.81±2.01	1.55	1.46±0.02
4	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	85.37	87.64±0.62	2.44	2.43±0.01
5	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	80.31	82.55±8.32	1.66	1.66±0.09
6	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	84.83	82.57±0.42	1.70	1.72±0.00
7	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	73.33	72.22±0.98	2.11	2.02±0.01
8	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	80.03	79.98±1.48	3.23	3.31±0.03
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	60.75	59.56±3.21	1.04	1.22±0.03
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	92.15	90.96±2.40	3.57	3.75±0.05
11	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	85.81	85.88±0.33	2.46	2.38±0.00
12	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	72.05	73.26±0.39	2.21	2.03±0.01

Exp.: experimental value.

Mod.: model-predicted value.

เมื่อนำข้อมูลผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติเพื่อตรวจสอบว่าปัจจัยใดบ้างที่ให้ผลต่อค่าตอบสนองแตกต่างกันทางสถิติโดยใช้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลเป็นค่าตอบสนอง ผลการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์หน่อ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 เมื่อใช้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลเป็นค่าตอบสนอง คือ ความเข้มข้นของเอทานอล ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น และยีสต์สกัด ส่วนปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลเมื่อใช้ค่าอัตราการผลิตเอทานอลเป็นค่าตอบสนอง คือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น และยีสต์สกัด (ตารางที่ 4.5) ดังนั้นในขั้นตอนของการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้แผนการทดลองแบบ central composite design จะนำปัจจัยทั้งสามปัจจัยข้างต้นไปใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเพื่อตรวจสอบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยยีสต์หน่อ *S. cerevisiae* DBKKUY-53

Factors	Standardized effects (E_{xi})	coefficients estimated	Sum of square	df	Mean Square	F value	P value	
For P								
A	12.46	6.23	465.39	1	465.39	59.78	0.0045	significant
B	1.9	0.95	10.78	1	10.78	1.38	0.3241	
C	9.59	4.79	275.72	1	275.72	35.42	0.0095	significant
D	3.05	1.52	27.88	1	27.88	3.58	0.1548	
E	0.46	-0.23	0.64	1	0.64	0.082	0.7935	
F	7.13	3.57	152.57	1	152.57	19.6	0.0214	significant
G	1.13	0.56	3.82	1	3.82	0.49	0.5339	
H	1.95	-0.97	11.4	1	11.4	1.46	0.3129	
For Q_p								
A	0.062	0.031	0.012	1	0.012	0.25	0.653	
B	0.26	-0.13	0.2	1	0.2	4.3	0.1298	

C	1.26	0.63	4.76	1	4.76	101.44	0.0021	significant
D	0.028	0.014	2.43E-03	1	2.43E-03	0.052	0.8347	
E	0.052	0.026	8.05E-03	1	8.05E-03	0.17	0.7065	
F	0.79	0.39	1.85	1	1.85	39.52	0.0081	significant
G	0.36	0.18	0.39	1	0.39	8.25	0.0639	
H	0.043	0.021	5.46E-03	1	5.46E-03	0.12	0.7555	

P ; ethanol concentration (g L^{-1})

Q_p ; productivity ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

4.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae*

DBKKUY-53

ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและอิทธิพลของปัจจัยร่วมต่างๆ ในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 อาศัยแผนการทดลองแบบ central composite design โดยปัจจัยที่นำมาทำการศึกษประกอบด้วยความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น และยีสต์สกัด โดยระดับของแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ระดับและรหัสของแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แผนการทดลองแบบ central composite design

codes	Factors	units	Levels				
			-1.68	-1	0	+1	+1.68
A	Cell concentration	cells mL^{-1}	5.00×10^6	2.43×10^7	5.25×10^7	8.07×10^7	1.00×10^8
B	Sugar concentration	g L^{-1}	180	204	240	276	300
C	Yeast extract	g L^{-1}	3	4.8	7.5	10.2	12

จากการออกแบบด้วยแผนการทดลองแบบ CCD สามารถกำหนดจำนวนชุดการทดลองได้ทั้งสิ้น 19 ชุดการทดลอง (run) ซึ่งสภาวะการทดลองในแต่ละชุด รวมทั้งค่าตอบสนองคือค่าความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลที่คาดคะเนได้จากโมเดล สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.7

เมื่อนำสภาวะดังกล่าวไปทดสอบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในระดับฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะหนึ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลที่ได้จากการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่คาดคะเนได้จากโมเดลทางคณิตศาสตร์ ทั้งนี้พบว่าชุดการทดลองที่ 17 ให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอล และอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด นั่นคือ 102.14 กรัมต่อลิตร และ 2.84 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำค่าผลการทดลองที่ได้คือค่าความเข้มข้นของเอทานอลไปคำนวณหาสมการแบบ three-factor quadratic polynomial เพื่อใช้ในการทำนายผลการทดลอง สมการที่ได้เป็นดังนี้

$$Y (\text{g L}^{-1}) = 94.69 + 3.6A + 2.54C - 4.53B^2$$

ในที่นี้ A , B และ C คือความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น ความเข้มข้นของน้ำตาล และยีสต์สกัดตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองโดยใช้ Fisher's F-test ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.8 จากข้อมูลในตารางจะเห็นว่าค่าความน่าจะเป็นของโมเดล (probability) มีค่า 0.0044 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าความน่าจะเป็นที่กำหนดคือ 0.05 นั่นคือโมเดลที่ใช้ให้ผลที่แตกต่างทางสถิติ ในขณะที่เดียวกันก็พบว่าค่าความน่าจะเป็นของ lack of fit มีค่ามากกว่าค่าความน่าจะเป็นที่กำหนดคือ 0.05 แสดงให้เห็นว่าค่า lack of fit ไม่แตกต่างทางสถิติ จากข้อมูลนี้พอที่จะสรุปผลได้ว่าโมเดลที่ใช้มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายผลการทดลองหมักเอทานอลโดยยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 สำหรับ coefficient ของโมเดล (R^2) ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 0.85 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเดลที่ใช้มีความเหมาะสม (Niladeyi et al., 2009) ค่า R^2 0.85 หมายความว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการทดลองสามารถอธิบายได้ด้วยโมเดลนี้ หากพิจารณาถึงปัจจัยที่ทำการทดสอบ พบว่าค่าความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ และยีสต์สกัด ให้ผลแตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็น 0.5 ($p < 0.05$) ในขณะเดียวกันค่า quadratic term ของปัจจัย B^2 หรือความเข้มข้นของน้ำตาลก็ให้ผลแตกต่างทางสถิติเช่นกัน

ตารางที่ 4.7 ชุดการทดลองการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ภายใต้แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

Run	A	B	C	Ethanol concentration		productivity	
				Exp.	Model	Exp.	Model
1	8.07E+07	204	4.8	84.12	85.84	2.34	2.38
2	5.25E+07	240	7.5	92.33	94.07	2.56	2.61
3	8.07E+07	276	10.2	94.53	98.09	2.63	2.72
4	5.25E+07	240	7.5	90.47	94.07	2.51	2.61
5	8.07E+07	204	10.2	90.80	92.93	2.52	2.58
6	5.25E+07	240	7.5	97.75	94.07	2.72	2.61
7	2.43E+07	276	10.2	85.61	85.35	2.38	2.37
8	2.43E+07	204	10.2	88.69	89.35	2.46	2.48
9	8.07E+07	276	4.8	92.42	93.26	2.57	2.59
10	5.00E+06	240	7.5	82.40	84.47	2.29	2.35
11	5.25E+07	180	7.5	81.42	80.60	2.26	2.24
12	5.25E+07	240	7.5	97.41	94.07	2.71	2.61
13	2.43E+07	276	4.8	82.99	82.29	2.31	2.28
14	5.25E+07	240	3.0	89.91	90.72	2.50	2.52
15	1.00E+08	240	7.5	101.03	96.82	2.81	2.68
16	5.25E+07	240	7.5	92.08	94.07	2.56	2.61
17	5.25E+07	240	12.0	102.14	99.23	2.84	2.75
18	5.25E+07	300	7.5	84.39	83.09	2.34	2.30
19	2.43E+07	204	4.8	86.01	84.02	2.39	2.33

Exp.: experimental value.

Mod.: model-predicted value.

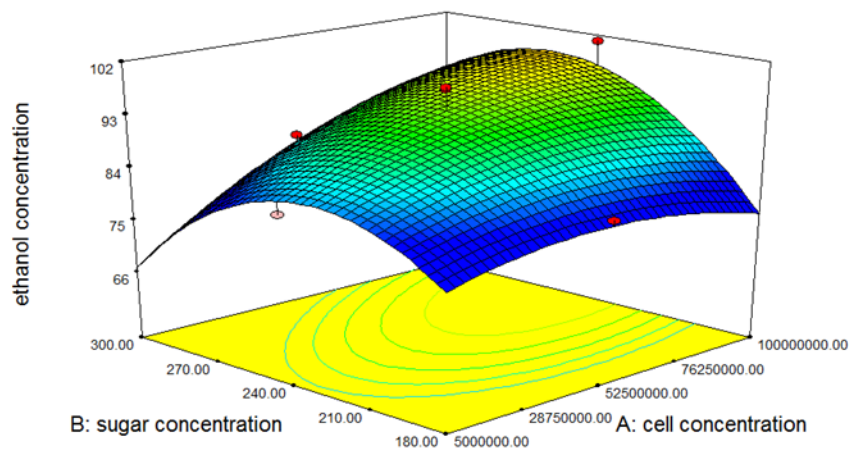
ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ภายใต้แผนการทดลองแบบ central composite design

Sources	Sum of Square	df	Mean Square	F value	P value Prob>F	
Model	638.91	9	70.99	6.16	0.0044	significant
A	182.28	1	182.28	15.82	0.0026	
B	8.73	1	8.73	0.76	0.4046	
C	87.85	1	87.85	7.62	0.0201	
AB	41.10	1	41.10	3.57	0.0883	
AC	1.52	1	1.52	0.13	0.7243	
BC	2.69	1	2.69	0.23	0.6391	
A ²	28.69	1	28.69	2.49	0.1456	
B ²	295.11	1	295.11	25.61	0.0005	
C ²	0.18	1	0.18	0.016	0.9022	
Residual	115.22	10	11.52			
Lack of Fit	58.88	5	11.78	1.05	0.4813	not significant
Pure Error	56.34	5	11.27			
Cor Total	754.13	19				
R ²	0.85					

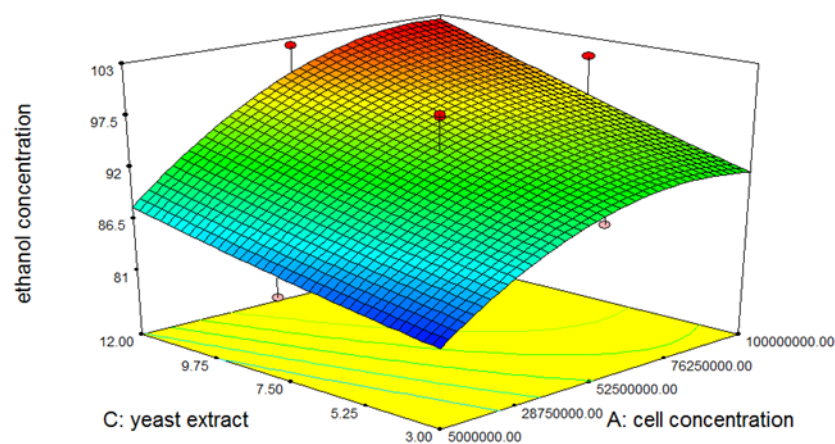
รูปที่ 4.1 แสดงภาพสามมิติและพื้นผิวตอบสนอง (contour plot) ของอิทธิพลของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาล และยีสต์สกัดต่อค่าความเข้มข้นของเอทานอล โดยที่รูปที่ 4.1a แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลและความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ต่อความเข้มข้นของเอทานอลเมื่อกำหนดให้ยีสต์สกัดเป็นปัจจัยคงที่ จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 240 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น รูปที่ 4.1b แสดงผลของอิทธิพลของยีสต์สกัดและความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล โดยกำหนดให้ปัจจัยความเข้มข้นของน้ำตาลคงที่ที่ระดับความเข้มข้น 240 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นและยีสต์สกัด รูปที่ 4.1c แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการผลิตเอทานอล โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์คงที่ที่ระดับความเข้มข้น 5.25×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 240 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดเพิ่มขึ้น จากผลการสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติ สามารถที่จะสรุปได้ว่าความ

เข้มข้นของน้ำตาลเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลสำคัญต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลที่ระดับสูงกว่า 240 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลมีแนวโน้มลดลง ผลการทดลองที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Limtong et al. (2007) ซึ่งรายงานว่าความเข้มข้นของเอทานอลจะลดลงหากความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆ มีผลทำให้เกิด osmotic stress ทำให้ยีสต์ชะงักการเจริญเติบโต และอาจตายได้ นอกจาก osmotic stress และการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในระหว่างการหมักก็มีส่วนทำให้การผลิตเอทานอลมีแนวโน้มลดลงด้วยเช่นกัน (Grubb and Mawson, 1993).

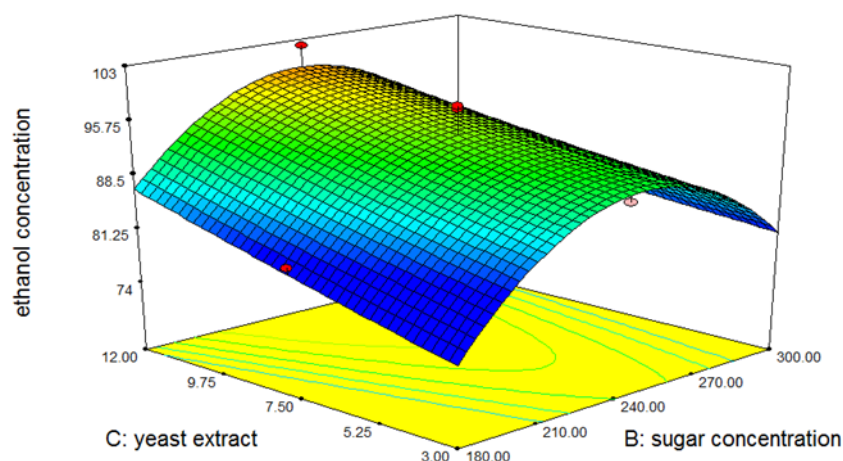
a)



b)



c)



รูปที่ 4.1 แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติแสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาล และยีสต์สกัดต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53

หากพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ คือความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาล และยีสต์สกัดต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 โดยใช้ค่าอัตราการผลิตเอทานอลเป็นค่าตอบสนอง พบว่าอัตราการผลิตเอทานอลที่ได้จากการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 2.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ถึง 2.84 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.7) จากข้อมูลผลการทดลองที่ได้เมื่อนำไปคำนวณหาสมการเพื่อใช้ในการทำนายอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ได้สมการ three-factor quadratic polynomial ดังนี้

$$Y \text{ (g L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = 2.63 + 0.10A + 0.07C - 0.13B^2 \quad (7)$$

ในที่นี้ A, B และ C แทนความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของยีสต์สกัด ตามลำดับ

เมื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ ผลการศึกษาพบว่าโมเดลที่ใช้ในการทดลองให้แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่า lack of fit ของโมเดลไม่แสดงผลที่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่า coefficient ของโมเดลมีค่าเท่ากับ 0.85 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองมีความน่าเชื่อถือและมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายได้จาก

เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของยีสต์สกัด และค่าอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลในเทอมของ quadratic (B^2) ให้ผลแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.9) แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเหล่านี้มีอิทธิพลต่อค่าอัตราการผลิตเอทานอล

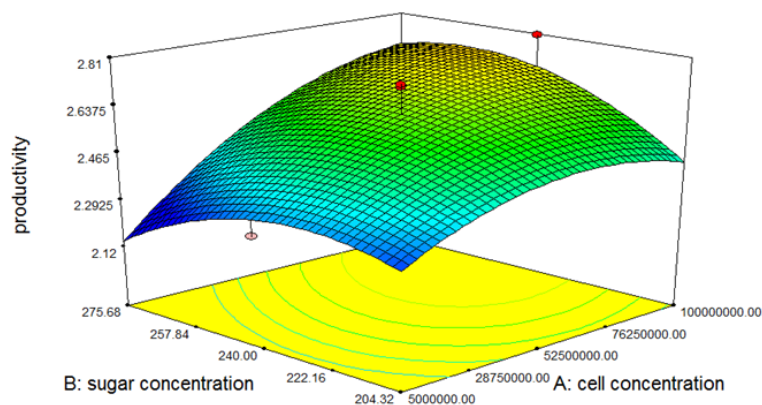
ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่เกิดจากอิทธิพลของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่อค่าอัตราการผลิตเอทานอล ภายใต้แผนการทดลองแบบ central composite design

Sources	Sum of Square	df	Mean Square	F value	P value	
					Prob>F	
Model	0.49	9	0.055	6.16	0.0044	significant
A	0.140	1	0.14	15.81	0.0026	
B	6.773e-3	1	6.733e-3	0.76	0.4046	
C	0.068	1	0.068	7.62	0.0201	
AB	0.032	1	0.032	3.57	0.0882	
AC	1.175E-003	1	1.175E-003	0.13	0.7238	
BC	2.079E-003	1	2.079E-003	0.23	0.6391	
A ²	0.022	1	0.022	2.49	0.1457	
B ²	0.23	1	0.23	25.61	0.0005	
C ²	1.411E-004	1	1.411E-004	0.016	0.9023	
Residual	0.089	10	8.892E-003			
Lack of Fit	0.045	5	9.090E-003	1.05	0.4811	not significant
Pure Error	0.043	5	8.695E-003			
Cor Total	0.58	19				
R ²	0.85					

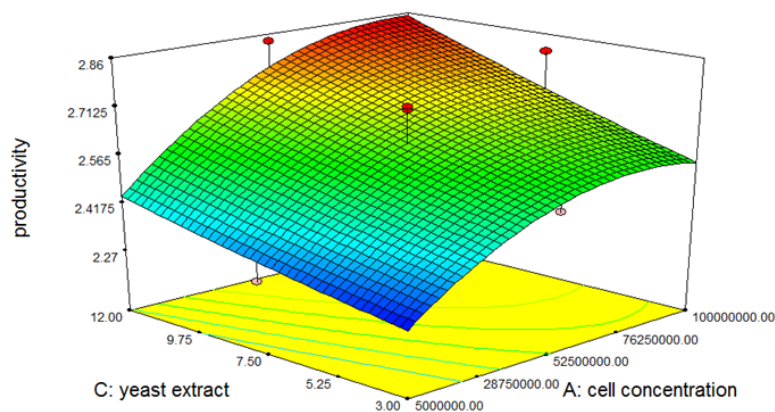
รูปที่ 4.2 แสดงแผนภาพพื้นผิวตอบสนองสามมิติและ contour plots เพื่อแสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของยีสต์สกัด ต่ออัตราการผลิตเอทานอล รูปที่ 4.2a แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาล และเซลล์ยีสต์ต่ออัตราการผลิตเอทานอล โดยกำหนดให้ระดับของปัจจัยความเข้มข้นของยีสต์สกัดคงที่ ผลการศึกษาพบว่าอัตราการผลิตเอทานอลมีค่าสูงสุดเมื่อระดับความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์และความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ 5.25×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 240 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลหรือความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้น อัตราการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มลดลง รูปที่ 4.2b แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดและความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ต่ออัตราการผลิตเอทานอล โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำตาลคงที่ที่ระดับ 240 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าอัตราการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นและยีสต์สกัดเพิ่มขึ้น รูปที่ 4.2c แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่ออัตราการผลิตเอทานอล โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นคงที่ที่ 5.25×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าอัตราการผลิตเอทานอลมีค่าสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 240 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัด

เมื่อพิจารณาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยยีสต์หนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 โดยใช้สมการข้างต้น พบว่าสภาวะดังกล่าวคือ ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น 7.85×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 247 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของยีสต์สกัด 9.99 กรัมต่อลิตร โดยให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 97.12 กรัมต่อลิตร และ 2.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ Nuanpeng et al. (2010) รายงานผลการศึกษาคการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ภายใต้สภาวะ Very High Gravity (VHG) โดยพบว่าการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าสูงสุด Laopaiboon et al. (2007) รายงานสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยพบว่าสภาวะดังกล่าวคือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น และค่าของแข็งที่ละลายได้ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 24 องศาบริกซ์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นจาก 240 กรัมต่อลิตร เป็น 280 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Laopaiboon et al., 2008).

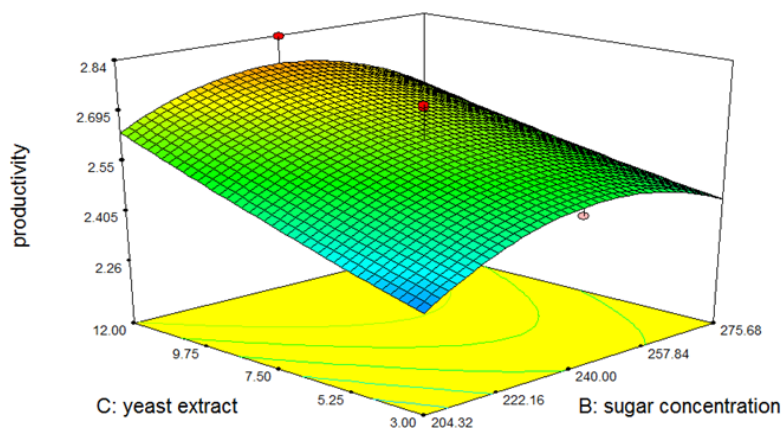
a)



b)



c)



รูปที่ 4.2 แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติเพื่อแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น ความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน เมื่อใช้แผนการทดลองแบบ CCD.

4.3.3 การทดสอบความแม่นยำของโมเดล (Verification experiments)

เพื่อเป็นการทดสอบความแม่นยำของโมเดลและสมการที่คำนวณได้จากผลการทดลองในครั้ง จึงได้ทำการทดลองหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 4.10 โดยนอกเหนือจากการทดสอบโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ยังได้นำสภาวะที่แต่ละปัจจัยอยู่ในระดับต่ำมาทำการทดสอบด้วย ผลการทดลองพบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 สามารถผลิตเอทานอลให้ค่าความเข้มข้นสูงสุดและค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 99.75 ± 3.93 กรัมต่อลิตร และ 2.77 ± 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้นี้ใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายได้จากสมการ นั่นคือ 97.12 กรัมต่อลิตร และ 2.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลที่ผลิตได้ภายใต้สภาวะต่ำ พบว่ามีค่าเท่ากับ 86.75 ± 4.72 กรัมต่อลิตร และ 2.50 ± 0.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นและอัตราการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

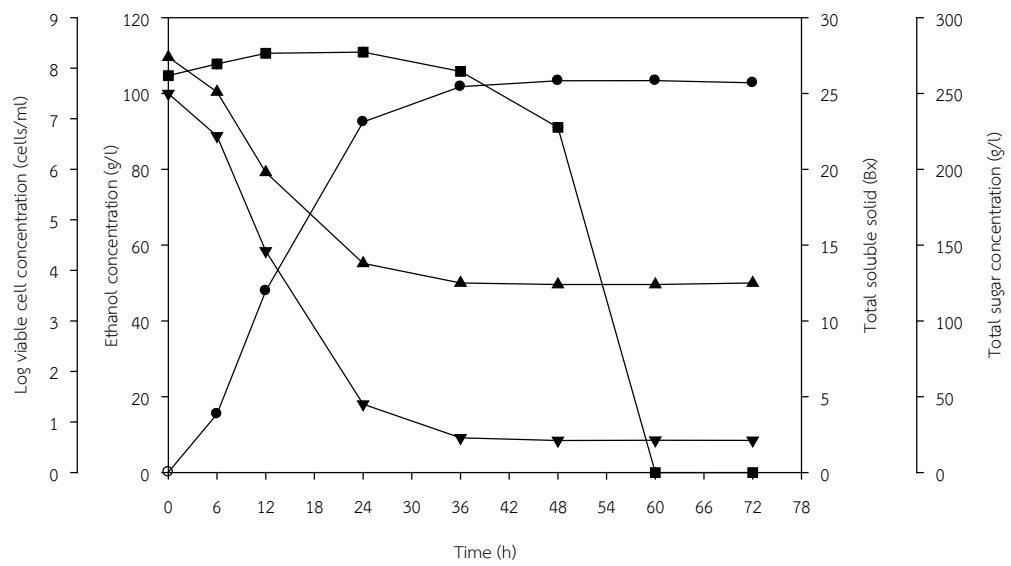
Conditions	Cell concentration	Sugar concentration	Yeast extract	experiment		model	
				P	Q_p	P	Q_p
Optimum	7.85×10^7	247	9.99	99.75 ± 3.93	2.77 ± 0.11	97.12	2.70
Minimum	2.42×10^7	275	4.82	86.75 ± 4.72	2.50 ± 0.13	87.33	2.42
Fermenter	7.85×10^7	247	9.99	101.81 ± 2.72	2.83 ± 0.08	97.12	2.70

P ; ethanol concentration (g L^{-1})

Q_p ; productivity ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

4.3.4 การทดสอบผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

นอกเหนือจากการทดสอบผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในระดับพลาสติกหมักแล้ว ยังได้ทำการทดลองผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในถังหมักขนาด 2 ลิตร ด้วยโดยใช้ปริมาตรในการหมัก 1.5 ลิตร ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดและอัตราการผลิตเอทานอลที่ได้มีค่าเท่ากับ 101.81 ± 2.72 กรัมต่อลิตร และ 2.83 ± 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ รูปที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร จากข้อมูลจะเห็นว่าความเข้มข้นของเซลล์ (เซลล์ที่มีชีวิต) มีค่าเพิ่มขึ้นในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก จากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก และมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง ในทำนองเดียวกันพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือในน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 22.96 ± 2.96 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าผลได้ของเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.45 ± 0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ หรือคิดเป็นร้อยละ 88.24 ของค่าในทางทฤษฎี



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ■; log viable cell, ●; ethanol, ▲; total soluble solids, ▼; total residual sugar.