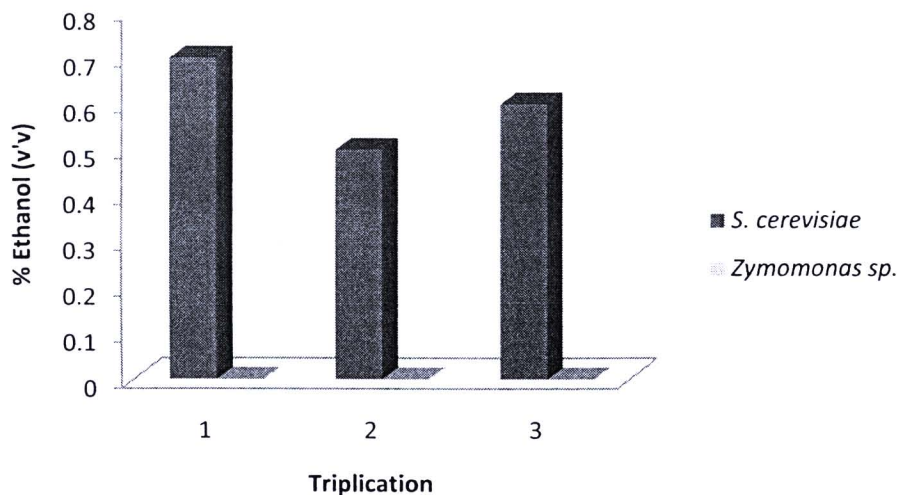


บทที่ 4

ผลการทดลอง

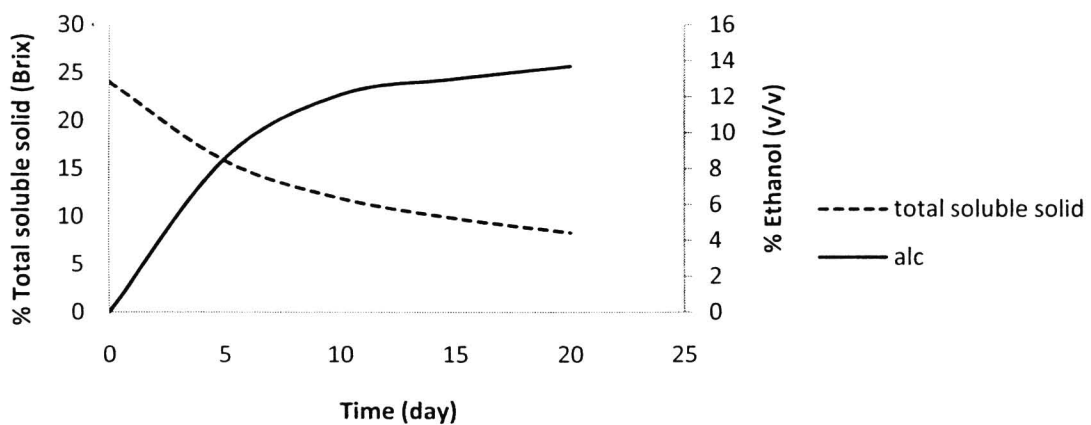
1. การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้ 100% ที่ไม่ได้เติมน้ำตาลซูโครส และเติมน้ำตาลซูโครส 24% (w/v) โดย *Saccharomyces cerevisiae* V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR 1102

จากการทดสอบการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 100% ที่ไม่ได้เติมน้ำตาลซูโครส โดย *S. cerevisiae* V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 พบว่าเมื่อผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้ 100% ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส หมักที่อุณหภูมิ $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ วัดเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ค่า pH ทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 20 วัน พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* V1116 ให้เปอร์เซ็นต์เอทานอลสูงสุด 0.7% (v/v) (5.523 g/l) แต่ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ (ภาพ 9)

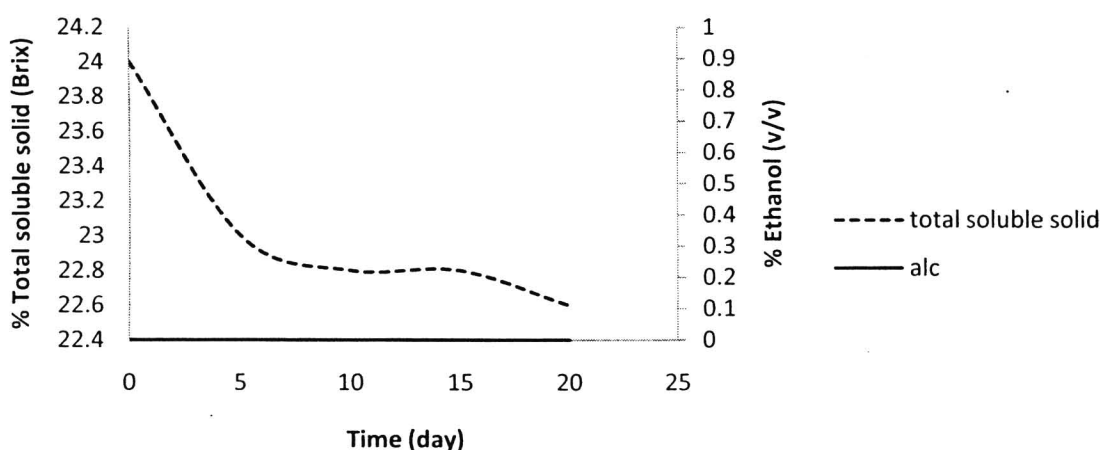


ภาพ 9 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากน้ำเวย์เต้าหู้ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสจาก *Saccharomyces cerevisiae* V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR 1102

จากนั้นเมื่อทำการทดสอบการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้ 100% ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) โดย *S. cerevisiae* V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 พบว่า *S. cerevisiae* V1116 สามารถผลิตเอทานอลได้เฉลี่ย $13.7 \pm 0.08\%$ (v/v) (108.10 g/l) และมีค่า total soluble solid ลดลง จากเริ่มต้น 24 %Brix เมื่อวันที่ 0 เป็น 8.6 %Brix (w/v) ในวันที่ 20 ของการหมัก (ภาพ 10) เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้โดย *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ที่ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้และมีค่าการละลายของของแข็งลดลงเพียงเล็กน้อย (ภาพ 11)



ภาพ 10 ค่า total soluble solid จากน้ำเวย์เต้าหู้ที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) และปริมาณเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* V1116

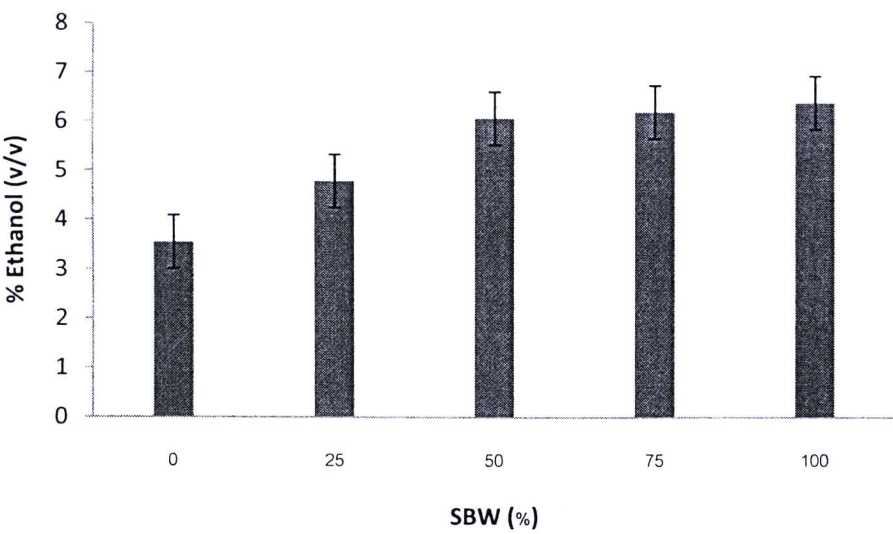


ภาพ 11 ค่า total soluble solid จากน้ำเวย์เต้าหู้ที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) และปริมาณเอทานอลโดย *Zymomonas* sp. TISTR 1102

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจาก *S. cerevisiae* V1116

S. cerevisiae V1116 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ทั้งในน้ำเวย์เต้าหู้ 100% ที่ไม่เติมน้ำตาลและเติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) ซึ่ง *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ จึงคัดเลือก *S. cerevisiae* V1116 นำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้ โดยออกแบบการทดลองแบบ full factorial experimental design โดยมี 4 ปัจจัยในการศึกษา คือ ความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ ชนิดของน้ำตาล ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และระยะเวลาการหมัก มีจำนวนการทดลองทางสถิติทั้งหมด 440 การทดลอง ทำการทดลองเป็นจำนวน 2 ซ้ำ (880 combinations) ผลการทดลองทั้งหมดจะนำมาคำนวณทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวกตาราง 2)

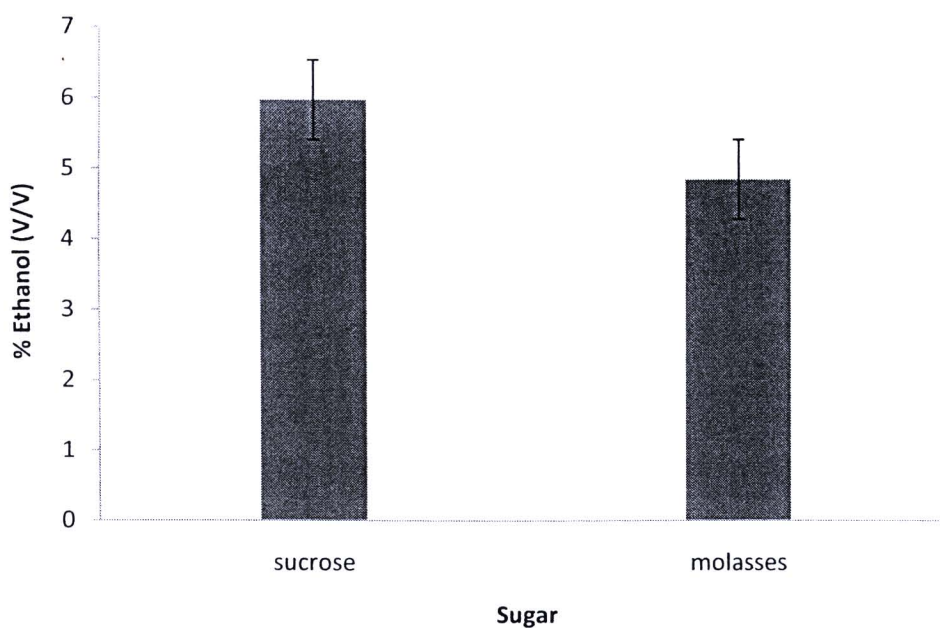
ผลของความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ที่ระดับ 0, 25, 50, 75 และ 100% (v/v) ที่เติมน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลาการหมัก พบว่าความเข้มข้นน้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) มีปริมาณเอทานอลสูงสุดเฉลี่ย $6.18 \pm 2.93\%$ (v/v) (48.76 g/l) และที่ระดับความเข้มข้นที่ของน้ำเวย์เต้าหู้ลดลงการผลิตเอทานอลจะลดลงตาม (ภาพ 12 และภาคผนวกตาราง 3)



ภาพ 12 ความเข้มข้น SBW ที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลโดย

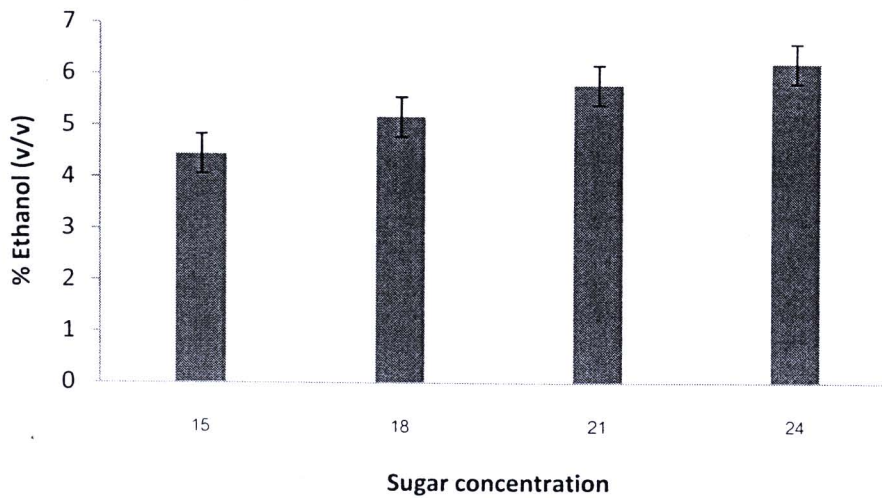
Saccharomyces cerevisiae V1116

ผลของชนิดน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลในการหมักเอทานอลที่เติมลงในทุกระดับความเข้มข้นน้ำเวย์เต้าหู้ ทุกระดับความเข้มข้นของแต่ละชนิดน้ำตาล และทุกระยะเวลาการหมักพบว่า น้ำตาลซูโครสให้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ย $5.95 \pm 3.64\%$ (v/v) (46.95 g/l) สูงกว่าการใช้กากน้ำตาลในการหมักเอทานอลได้ปริมาณเฉลี่ย $4.82 \pm 1.80\%$ (v/v) (38.03 g/l) (ภาพ 13)



ภาพ 13 ~~ชนิด~~น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* V1116

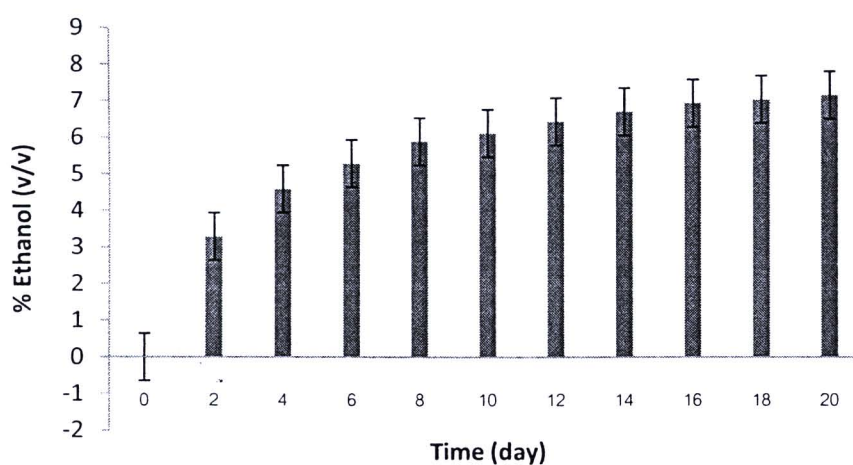
ผลของระดับความเข้มข้นของทุกชนิดน้ำตาลในการหมักเอทานอลที่เติมลงในทุกระดับความเข้มข้นน้ำเวย์เต้าหู้ ชนิดน้ำตาลและระยะเวลาการหมักพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 24% Brix (w/v) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเฉลี่ย $6.18 \pm 3.19\%$ (v/v) (48.76 g/l) และระดับความเข้มข้นน้ำตาลลดลง ปริมาณเอทานอลจะลดลงตามโดยต่ำสุดที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 15% (w/v) ได้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ย $4.43 \pm 2.28\%$ (v/v) (34.95 g/l) (ภาพ 14 และภาคผนวกตาราง 4)



ภาพ 14 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลโดย

Saccharomyces cerevisiae V1116

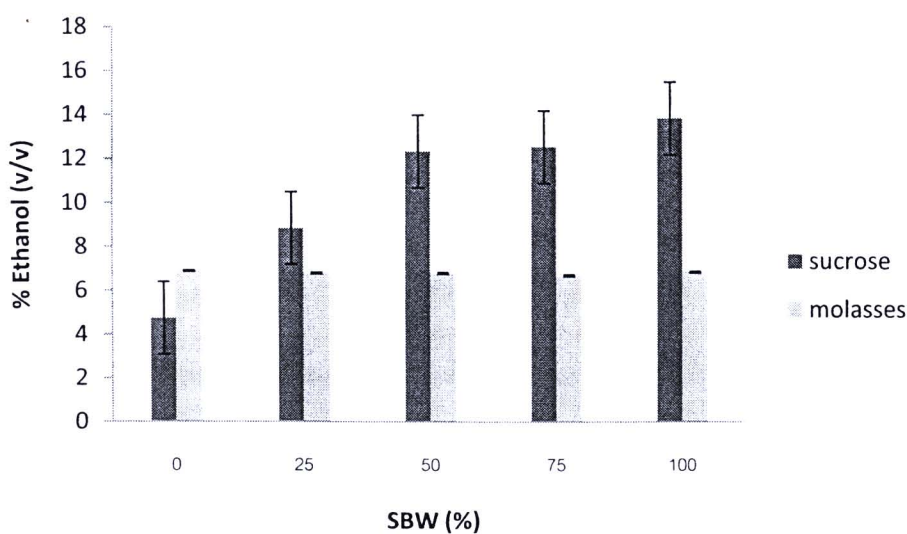
ผลของระยะเวลาการหมักที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลในทุกระดับความเข้มข้นน้ำตาลเวย์เด้าหัวชนิดน้ำตาล และระดับความเข้มข้นของน้ำตาลพบว่าวันที่ 0 ของการหมักซึ่งเป็นวันที่เริ่มเติม *S. cerevisiae* V1116 ยังไม่มีการผลิตเอทานอล แต่วันที่ 2 เริ่มมีการผลิตเอทานอลแต่ได้ปริมาณต่ำเฉลี่ย $3.27 \pm 1.18\%$ (v/v) (25.80 g/l) และวันที่ 20 ของการหมักจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเฉลี่ย $7.11 \pm 2.66\%$ (v/v) (56.10 g/l) (ภาพ 15 และภาคผนวกตาราง 5)



ภาพ 15 ระยะเวลาการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลโดย

Saccharomyces cerevisiae V1116

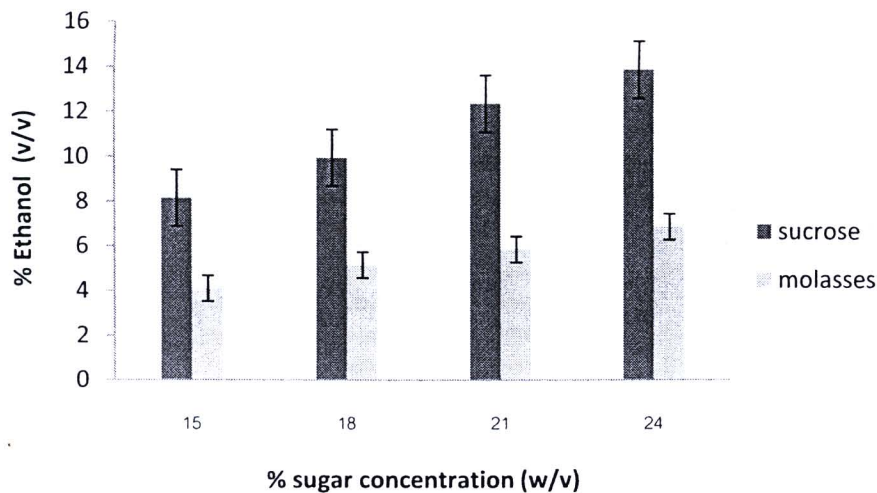
จากการออกแบบการทดลองพบว่าความเข้มข้นน้ำเวย์เต้าหู้กับชนิดน้ำตาลมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ โดยระดับความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ที่มากขึ้นและมีการเติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 13.9% (v/v) (109.67 g/l) มากกว่าการหมักเอทานอลที่ใช้น้ำเวย์เต้าหู้เติมกากน้ำตาล 24% Brix (w/v) แต่ในน้ำเวย์เต้าหู้ที่ระดับ 0% (น้ำเปล่า) การเติมด้วยกากน้ำตาลให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าการเติมน้ำตาลซูโครส โดยได้ปริมาณเอทานอลที่ 6.9% (v/v) (54.44 g/l) หลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 20 วัน (ภาพ 16)



ภาพ 16 ความสัมพันธ์ความเข้มข้นของ SBW กับชนิดน้ำตาล ที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลโดย

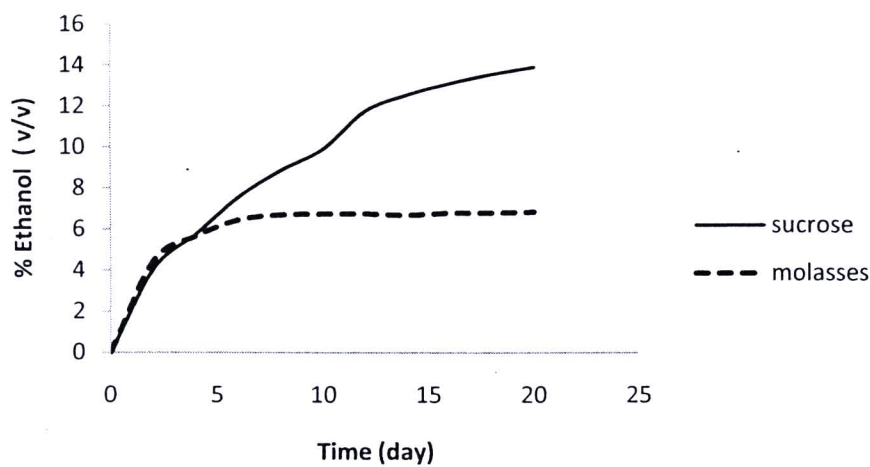
Saccharomyces cerevisiae V1116

ความเข้มข้นของน้ำตาลมีความสัมพันธ์กับชนิดน้ำตาลอย่างมีนัยสำคัญ โดยระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ 24% Brix (w/v) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 13.9% (v/v) (109.67 g/l) หลังระยะเวลาหมักเป็นเวลา 20 วัน มากกว่าระดับอื่นๆให้ชนิดน้ำตาลเดียวกัน เช่นเดียวกับความเข้มข้นของกากน้ำตาล 24% (w/v) ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลในระดับอื่นๆ (ภาพ 17)



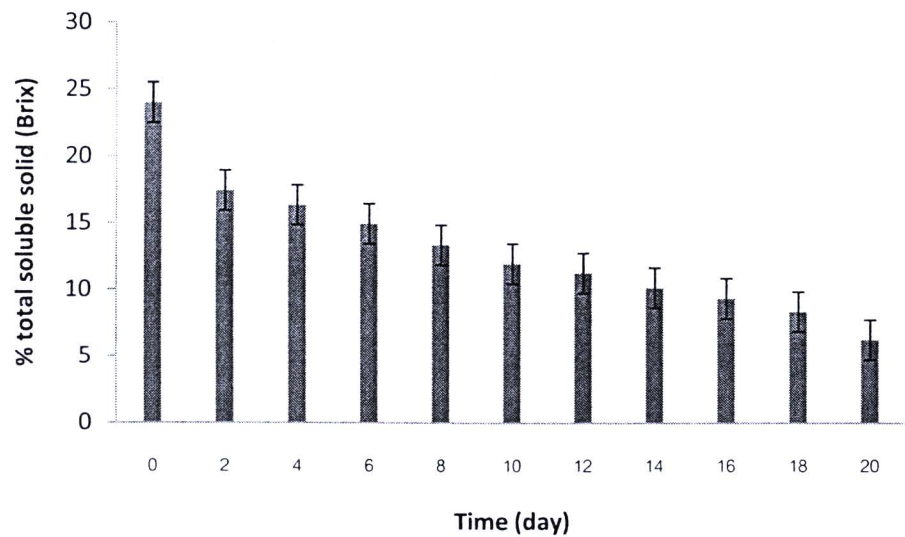
ภาพ 17 ความสัมพันธ์ชนิดของน้ำตาลกับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* V1116

ระยะเวลาการหมักเอทานอลมีความสัมพันธ์กับชนิดน้ำตาลที่เติมลงในน้ำเวย์เต้าหู้ที่หมักด้วย *S. cerevisiae* V1116 พบว่าในวันที่ 20 ของการหมัก น้ำตาลซูโครสจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 13.9% (v/v) (109.67 g/l) แต่การหมักด้วยกากน้ำตาลในวันที่ 10 ของการหมักปริมาณเอทานอลจะเริ่มคงที่ที่ 6.9% (v/v) (54.44 g/l) (ภาพ 18)



ภาพ 18 ความสัมพันธ์ชนิดของน้ำตาลกับระยะเวลาการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* V1116

ความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ ชนิดของน้ำตาล ความเข้มข้นของน้ำตาลและระยะเวลาการหมักมีผลต่อค่า total soluble solid โดยที่ความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ 100% น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 24% Brix (w/v) และวันที่ 20 ของการหมักเอทานอลจะมีค่า total soluble solid น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 19 และภาคผนวกตาราง 6)



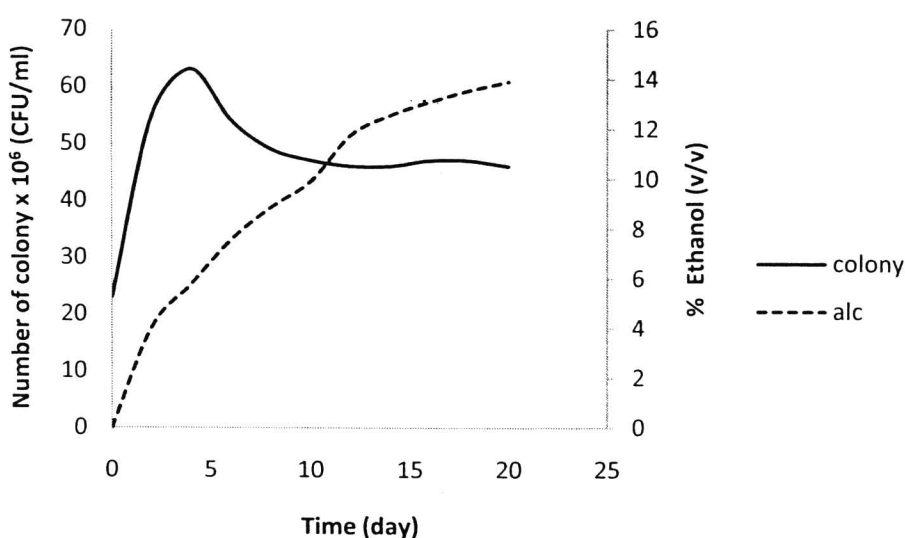
ภาพ 19 ความสัมพันธ์ระยะเวลามีผลต่อค่า total soluble solid จากชุดการทดลองที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดย *Saccharomyces cerevisiae* V1116

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นน้ำเวย์เต้าหู้ ชนิดน้ำตาล ความเข้มข้นของน้ำตาล และระยะเวลาการหมัก มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ในจำนวนชุดการทดลองทางสถิติทั้งหมด 440 การทดลอง ชุดการทดลองที่ความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) เติมน้ำตาลซูโครสที่ 24% Brix (w/v) และวันที่ 20 ของการหมักจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 13.9% (v/v) (109.67 g/l)

หลังสิ้นสุดการหมักเอทานอลด้วยน้ำเวย์เต้าหู้ที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) เป็นเวลา 20 วัน ด้วย *S. cerevisiae* V1116 เก็บตัวอย่างน้ำเวย์เต้าหู้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในการย่อยสลายสารอินทรีย์และใช้ในการดำรงชีวิต (BOD) ด้วยวิธี Azide modification พบว่าค่า BOD ก่อนการหมักเอทานอลได้ 93.33 mg/l และหลังการหมักเอทานอลได้ค่า BOD ที่ 256 mg/l และนำตัวอย่างน้ำเวย์เต้าหู้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ total protein ด้วย Bradford

kit พบว่าก่อนการหมัก มีปริมาณ total protein 7.1 mg/ml และหลังการหมักมีปริมาณ total protein เหลือ 0.77 mg/ml

การศึกษากิจกรรมของ *S. cerevisiae* V1116 ในสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล ในน้ำเวย์เต้าหู้ที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) โดยวัด viable count ทุก 2 วัน เป็นเวลา 20 วัน พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการหมัก โดยมีจำนวนเซลล์สูงที่สุด 54×10^6 CFU/ml หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ลดลงและคงที่เมื่อวันที่ 10 โดยมีจำนวนเซลล์เฉลี่ย 46×10^6 CFU/ml (ภาพ 20)



ภาพ 20 ค่า viable count และปริมาณเอทานอล ของ *Saccharomyces cerevisiae* V1116 จากน้ำเวย์เต้าหู้ที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v)

นำน้ำหมักที่ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่น้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) และระยะเวลาหมัก 20 วัน มากลั่นเอทานอลด้วยเครื่องกลั่นแบบหม้อต้มขนาด 2 ลิตร ปรับอุณหภูมิหม้อต้มที่ 78-85°C เก็บน้ำส่วนใสจาก condenser ของเครื่องกลั่นปริมาตร 300 ml วัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer พบว่าจากการกลั่นได้ความเข้มข้นเอทานอลเพิ่มขึ้นที่ 60% (v/v) (473.40 g/l)

3. ผลการทดสอบสภาวะการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 100%

การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือในน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 500 ml ในขวดชมพู่ขนาด 1,000 ml ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆทั้ง 3 วิธีคือ

1. การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

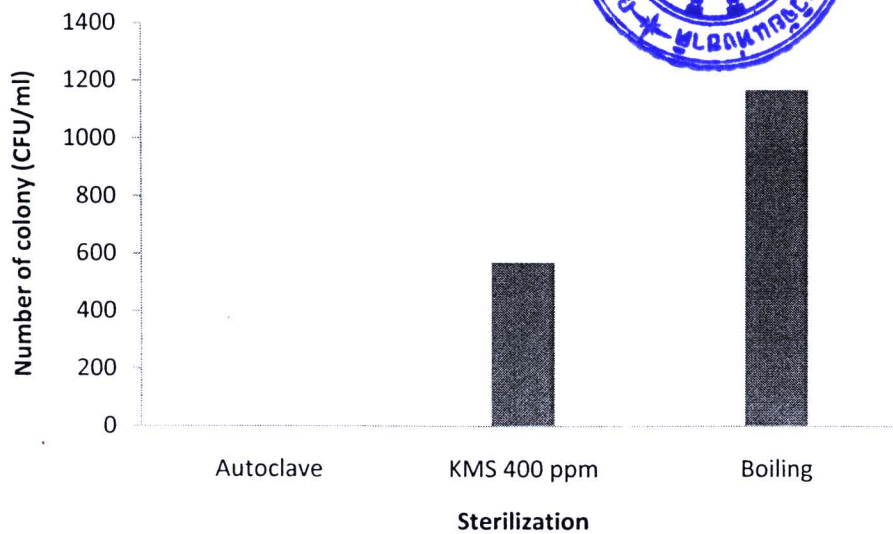
2. การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยสารเคมี Potassium metabisulfite (KMS) ที่เติมลงน้ำเวย์เต้าหู้ 0.2 g (400 ppm)

3. การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธีการต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที

หาจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธีการ Spread plate บนอาหาร NA และ YM เป็นเวลา 3 วันพบว่า การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธีหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดโดยไม่เหลือจุลินทรีย์บนอาหาร NA และ YM

การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วย KMS ความเข้มข้น 400 ppm ให้ประสิทธิภาพรองจากการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ พบว่าบนอาหาร NA มีจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือ 570 CFU/ml เชื้อที่ได้ตรวจพบเป็นแบคทีเรียดิดส์แกรมบวก มีการสร้าง endospore ลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น ผิวโคโลนีแบบหยัก แต่ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ที่เหลือบนอาหาร YM หลังเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ เป็นเวลา 3 วัน

การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธีการต้มให้เดือดมีประสิทธิภาพน้อยสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธีการอื่น มีจุลินทรีย์ที่เหลือเจริญบนอาหาร NA โดยมีจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือ 1170 CFU/ml เชื้อที่ตรวจได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น ผิวโคโลนีแบบหยัก มีการสร้าง endospore และไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ที่เหลือบนอาหาร YM หลังเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ 25°C เป็นเวลา 3 วัน (ภาพ 21)



ภาพ 21 ปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือจากการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ

4. ผลของการขยายขนาดการหมักในถังเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ขนาด 200 ลิตร

ต้มน้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) ปริมาตร 100 ลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% (w/v) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทลงถังเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ขนาด 200 ลิตรและใส่ KMSหนัก 40 g (400 ppm) เติม *S. cerevisiae* V1116 ที่ทำการขยายขนาดเชื้อตั้งต้นปริมาตร 10 ลิตร ทำการหมักเป็นระยะเวลา 20 วัน เก็บน้ำหมักที่ได้มาวัดปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น พบว่าได้ปริมาณเอทานอลที่ 12.9% (v/v) (101.78 g/l)