

บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัยและผลการวิจัย

2.1 รายละเอียดของระเบียบวิธีวิจัย

2.1.1 การเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์

สารเคมีและอุปกรณ์

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), RCI LabScan, AR1171-PIKG
- โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4), Univar 417-1 KG, B/No.0801267
- เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($FeNH_4SO_4 \cdot 6H_2O$), Ajax Finechem Ltd.
- กรดซัลฟิวริก 98% (H_2SO_4), Volchem AR
- 1,10 ฟีนานโธรีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2H_2O$), Rankem (RFCL Limited)
- เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot H_2O$), Rankem (RFCL Limited)
- ไตแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$], Univar A41-500G (Ajax Finechem)
- Meat Extract, Himedia RM003-500G
- Yeast Extract, Lab-Scan Analytical Sciences
- Peptone, Himedia RM003-005G
- Glucose, Fisher Chemicals.
- Agar, Chemical & Supply.
- เครื่องแรงดันไอน้ำ (Autoclave), Hirayama (HICLAVE HVE 50)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath), Memmert (Schutzart DIN 40050-IP20)
- Hot Plate Stirrer, IKA C-MAG H57

-เครื่องกลั่นไอน้ำแบบธรรมดา

-Gas Chromatography (รุ่น GC-14B, Shimadzu)

-ตู้อบเชื้อ (Incubator, SN.US020654)

การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส (ดัดแปลงจาก TAPPI 2003 om-88)

ซึ่งกากสับปรดแห้งและผ่านการปรับสภาพด้วย NaOH และ H₂SO₄ ในสภาพการให้ความร้อนและความเข้มข้นแตกต่างกันจำนวน 1.5 กรัม ทำการเติม NaOH 17.5% ปริมาตร 100 ml ทำการผสมสารละลายและตัวอย่างด้วย hot plate stirrer เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ทำการกรองแยกสารละลายที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส โดยนำสารละลายที่ได้ 10 ml ทำการเติมน้ำกลั่น 50 ml และโพแทสเซียมไดโครเมต 0.5 N ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากัน เติม H₂SO₄ เข้มข้นปริมาตร 30 ml (โดยการเอียงขวดชมพู 45 องศาเพื่อป้องกันการแตกตัวอย่างรุนแรง) หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น ทำการหยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยดและทำการไตเตรทกับ FeNH₄SO₄6H₂O โดยมีจุดยุติเป็นการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มไปเป็นสีน้ำตาลอมม่วง และทำการคำนวณหาค่าปริมาณแอลฟาเซลลูโลสดังนี้

$$\text{ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส} = 100 - [(6.85(V_2 - V_1) \times N \times 20) / A \times W]$$

เมื่อ 6.85 คือ มิลลิกรัมสมมูลของ FeNH₄SO₄6H₂O ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

V₁ คือ ปริมาตร FeNH₄SO₄6H₂O ที่ใช้ในการไตเตรท (sample)

V₂ คือ ปริมาตร FeNH₄SO₄6H₂O ที่ใช้ในการไตเตรท (blank)

N คือ ความเข้มข้นของ FeNH₄SO₄6H₂O

A คือ ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (ml)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณแกมมาเซลลูโลส} = 100 - \text{ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส}$$

การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์

นำของเหลวที่ได้จากการหมักกากสับประดปริมาณ 100 ml มาทำการกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำแบบธรรมดา ที่อุณหภูมิ $80 \pm 2^\circ\text{C}$ ที่ซึ่งเป็นจุดเดือดของแอลกอฮอล์ ทำการกลั่นด้วยไอน้ำเพื่อสกัดแอลกอฮอล์ออกจากของเหลวที่ได้จากการหมัก ทำการบันทึกปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ได้และทำการคำนวณร้อยละของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้

$$\text{ร้อยละของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้} = [\text{ปริมาตรแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (ml)} / 100 \text{ (ml)}] \times 100$$



ภาพที่ 1 เครื่องกลั่นไอน้ำแบบธรรมดาที่ใช้ในการกลั่นแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมัก



ภาพที่ 2 ลักษณะของเหลวที่ได้จากการหมักกากสับประดก่อนนำไปกลั่นด้วยไอน้ำเพื่อหาปริมาณแอลกอฮอล์

การวิเคราะห์เอทานอลด้วย Gas Chromotography

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่มีอยู่ในแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักกากสับปรดจะใช้วิธี Gas Chromotography ด้วยเครื่องวิเคราะห์รุ่น GC-14B, Shimadzu ที่มี detector แบบ Flame Ionization Detector (FID) และมีคอลัมน์เป็น capillary 0.25 mm ความหนาของสารเคลือบ 0.25 μm (J&W Scientific Co, Ltd.) ซึ่งมีสภาวะการทำงานดังต่อไปนี้

สภาวะของเครื่อง

Inlet temperature	=	200°C
Pressure	=	55 KPa
Split ration	=	1:100
Carrier gas	=	He gas

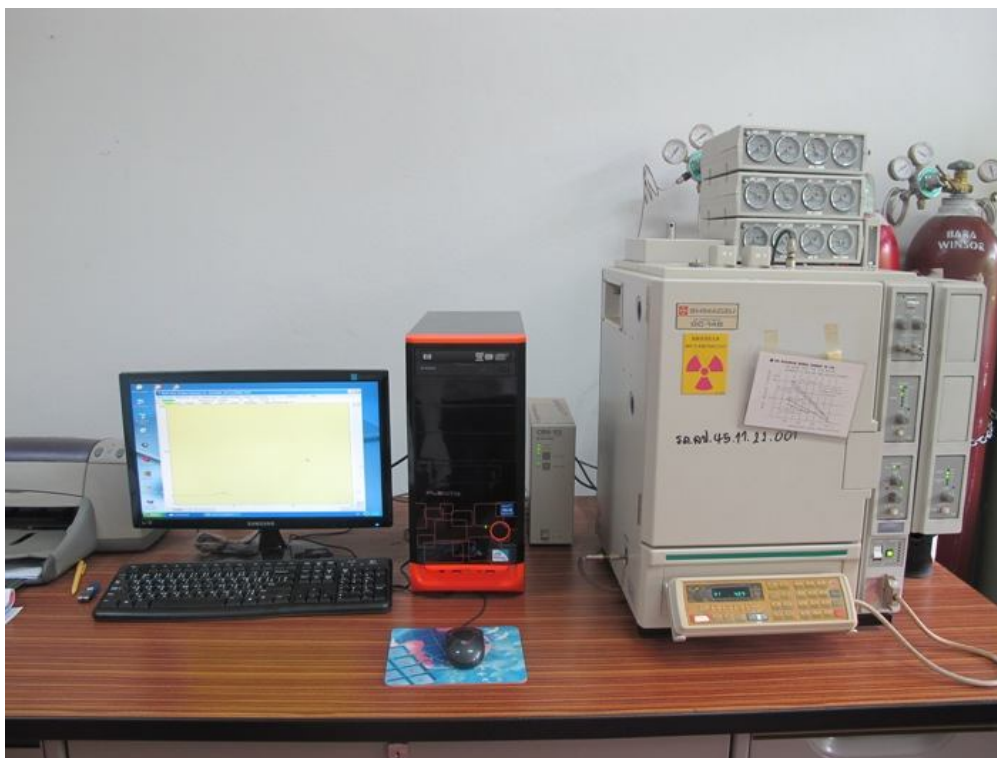
สภาวะของคอลัมน์

Oven temperature	=	70°C
Column mode	=	temperature program
		1) 70°C นาน 3 นาที
		2) เพิ่มขึ้น 40°C จนถึง 200°C
		3) 200°C นาน 5 นาที

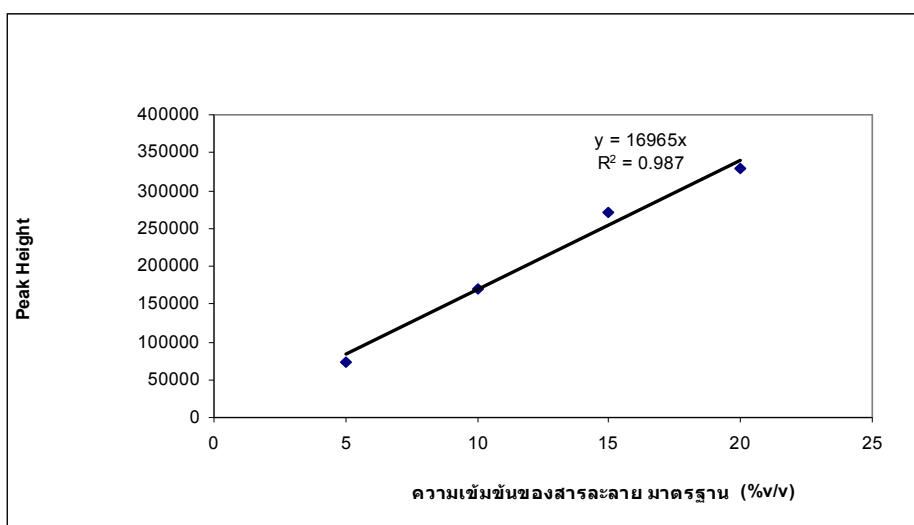
สภาวะของ detector

FID detector	=	Air pressure 50 Kpa
		He pressure 70 Kpa

ทำการสร้าง กราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 %v/v โดยทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นและนำค่า Peak Height (PH) ที่ได้มาสร้าง กราฟเส้นตรงที่แสดงถึง กราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 Gas chromatography รุ่น GC-14B, Shimadzu



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography

การวิเคราะห์เชื้อ *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis TISTR No. 415 ในหลอดเชื้อแห้งแข็งได้นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (Zymo. Medium, TISTR) ที่มีส่วนผสมในอัตราส่วนต่อสารละลาย 1,000 ml ดังต่อไปนี้ 20 กรัมของน้ำตาลกลูโคส, 10 กรัมของ yeast extract, 10 กรัมของ peptone และ 15 กรัมของ agar. อาหารแข็งนี้จะถูกนำมาฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้งานและเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และมีการถ่ายเชื้อทุกๆ 1 สัปดาห์ (ดัดแปลง M.L. Cazetta et al., 2007) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ *Zymomonas mobilis* TISTR No. 415 จะใช้วิธีการ pour plate และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วันก่อนนำมานับจำนวนโคโลนีด้วยการใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$N = \frac{\text{ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดในช่วง 25-250 โคโลนี}}{V \times (n1 + 0.1n2) \times d}$$

เมื่อ V คือ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

n1 คือ จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนีในระดับความเข้มข้นแรก

n2 คือ จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนีในระดับความเข้มข้นที่ 2

d คือ ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี

การวิเคราะห์เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ในรูปของผงแห้งจะถูกนำมาใช้งานทันทีโดยมีอัตราส่วนในการเติมลงในกากสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่มีปริมาณแอลฟาเซลลูโลสมากที่สุด โดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นและทำการเติม (NH₄)₂SO₄ 0.3 กรัม ก่อนนำไปปรับ pH ให้มีค่าเป็น 5.5 แล้วทำการเติมเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอัตราส่วน 1 % w/v สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* จะใช้วิธีการ pour plate บนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมในอัตราส่วนสารละลาย 1,000 ml ดังต่อไปนี้ 20 กรัมของน้ำตาลกลูโคส, 5 กรัมของ yeast extract, 5 กรัมของ meat extract, 5 กรัมของ peptone และ 15 กรัมของ agar. และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วันก่อนนำมานับจำนวนโคโลนีด้วยการใช้สูตรการคำนวณเหมือนกับการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR No. 415

2.2.1 ระเบียบวิธีวิจัย

2.2.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพกากสับประดด้วยวิธีการเคมีฟิสิกส์

สภาวะการทดลอง

นำกากสับประดจากโรงงานแปรรูปสับประดมาทำการบดให้มีขนาด 0.5 ถึง 1.0 มิลลิเมตร แล้วนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเติมกรดซัลฟิวริกที่ระดับความเข้มข้น 0, 3.0 และ 5.0 โมลาร์ และนำส่วนผสมดังกล่าวมาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมงด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) และผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 105 และ 125°C เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที ด้วยเครื่องแรงดันไอน้ำ

การวิเคราะห์ทางเคมี

- ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส (ดัดแปลง TAPPI 2003 om-88)
- ปริมาณแกมมาเซลลูโลส

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 2³ factorial in Completely Random Design (CRD) ข้อมูลที่ได้จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรม SPSS version 11 (SPSS Inc., Chicago, USA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.2.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Zymomonas mobilis* ในการย่อยกากสับประดเพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด

สภาวะการทดลอง

นำกากสับประดที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 2.1.1 มาทำการเติมน้ำตาล และไม่เติมน้ำตาล ก่อนนำทั้งสองสิ่งทดลองมาเติมเชื้อจุลินทรีย์ *Zymomonas mobilis* ในอัตราส่วน 5 % และทำการบ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C

การวิเคราะห์ทางเคมี

- ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ (วิธีการกลั่นแบบธรรมดา)
- ปริมาณเอทานอล (GC Method: AOAC, 2000)

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- ปริมาณเชื้อ *Zymomonas mobilis* (TISTR No. 415)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 2^2 factorial in Completely Random Design (CRD) ข้อมูลที่ได้จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรม SPSS version 11 (SPSS Inc., Chicago, USA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

2.1.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด

สภาวะการทดลอง

นำกากสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 2.1.1 มาทำการเติมน้ำตาล และไม่เติมน้ำตาล ก่อนนำทั้งสองสิ่งทดลองทำการปรับ pH เป็น 5.0 และทำการเติมไดเอมโมเนียซัลเฟต นำตัวอย่างที่ได้ไปทำการบ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C

การวิเคราะห์ทางเคมี

- ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ (วิธีการกลั่นแบบธรรมดา)
- ปริมาณเอทานอล (GC Method: AOAC, 2000)

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- ปริมาณเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) ข้อมูลที่ได้จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรม SPSS version 11 (SPSS Inc., Chicago, USA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

2.2 ผลการวิจัย

2.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพกากสับประดด้วยวิธีการเคมีฟิสิกส์

สำหรับการปรับสภาพกากสับประดด้วยวิธีเคมีเชิงฟิสิกส์ ด้วยการนำกากสับประดจากโรงงานแปรรูปสับประดมาทำการบดให้มีขนาด 0.5 ถึง 1.0 มิลลิเมตรและนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทิ้งจนกระทั่งมีความเป็นกลาง และเติมกรดซัลฟิวริกที่ระดับความเข้มข้น 0, 3.0 และ 5.0 โมลาร์ และนำส่วนผสมดังกล่าวมาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C ด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง และผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 105 และ 125°C เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที ด้วยเครื่องแรงดันไอน้ำ หลังจากนั้นนำมากรองเพื่อล้างความเป็นกรดและนำไปอบให้แห้งด้วยเครื่องอบความร้อน (hot air oven) กากสับประดที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณแอลฟาเซลลูโลสและแกมมาเซลลูโลสของกากสับประดที่ผ่านการให้ความร้อนอุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง

อุณหภูมิที่ใช้ (°C)	85			
ความเข้มข้น H ₂ SO ₄ (M)	3 M		5 M	
เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)	2	4	2	4
ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส (%)	60.83±0.22 ^d	71.05±0.39 ^c	76.61±0.66 ^b	87.75±0.50 ^a
ปริมาณแกมมาเซลลูโลส (%)	39.17±0.22	28.95±0.39	23.39±0.66	12.25±0.50

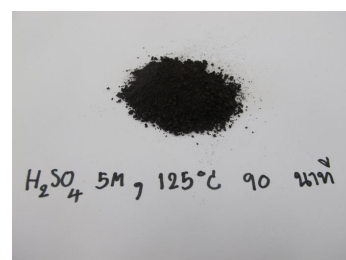
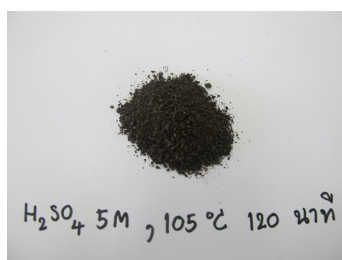
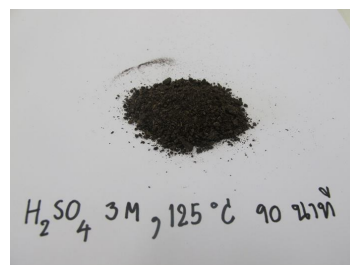
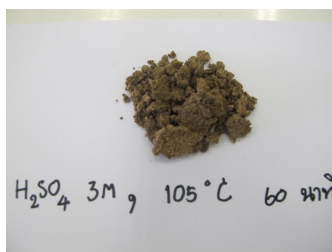
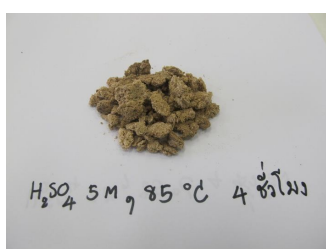
หมายเหตุ: เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวนอน อักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการทดลองในตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าการใช้ความเข้มข้นของ H₂SO₄ ที่ 3 และ 5 M และระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมงนั้นทำให้กากสับประดที่ผ่านการปรับสภาพนั้นมีปริมาณของแอลฟาเซลลูโลสที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยพบว่าปริมาณแอลฟาเซลลูโลสที่สูงที่สุดมีค่าเป็นร้อยละ 87.75 ± 0.50 ในสภาวะที่ใช้ H₂SO₄ ความเข้มข้น 5 M ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าการใช้ความเข้มข้นของ H_2SO_4 ที่ 3 และ 5 M และระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ $105^{\circ}C$ เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที มีปริมาณแอลฟาเซลลูโลสที่แตกต่างกันโดยมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดเป็น 3M ซึ่งแนวโน้มไม่เหมือนกับการใช้ความเข้มข้นของกรดที่ 5 M ที่พบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น

สำหรับปริมาณแอลฟาเซลลูโลสที่ได้จากการผ่านความร้อนที่ $125^{\circ}C$ ด้วยการใช้ความเข้มข้นของ H_2SO_4 ที่ 3 และ 5 M เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาทีพบว่าแนวโน้มที่เหมือนกันที่เป็นลักษณะของกราฟพระฆังคว่ำนั่นคือปริมาณเซลลูโลสที่สูงที่สุดจะใช้เวลาในการให้ความร้อน 90 นาที อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแอลฟาเซลลูโลสพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยสถานะที่ทำให้ได้ปริมาณแอลฟาเซลลูโลสมากที่สุดซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 98.44 ± 0.15 คือ การใช้ความเข้มข้น H_2SO_4 ที่ 5 M ผ่านความร้อน $125^{\circ}C$ เป็นเวลา 90 นาที

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการให้ความร้อนแก่กากสับปะรดที่มีการเติมกรดที่อุณหภูมิ $85^{\circ}C$ ด้วยอ่างน้ำควบคุมความร้อน (water bath) และที่อุณหภูมิ 105 และ $125^{\circ}C$ ด้วยเครื่องแรงดันไอน้ำพบว่าการใช้อุณหภูมิ $125^{\circ}C$ ด้วยเครื่องแรงดันไอน้ำมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพกากสับปะรดมากกว่าการใช้อุณหภูมิ $85^{\circ}C$ ด้วยอ่างน้ำควบคุมความร้อน สถานะที่เหมาะสมที่สุดของการปรับสภาพกากสับปะรดคือสถานะที่ได้รับปริมาณของแอลฟาเซลลูโลสมากที่สุดและจะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการหมักเอทานอลต่อไป



ภาพที่ 5 กากสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย H_2SO_4 ที่ความเข้มข้น 3 และ 5 M และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85, 105 และ $125^{\circ}C$ ที่มีปริมาณของแอลฟาเซลลูโลสมากที่สุด

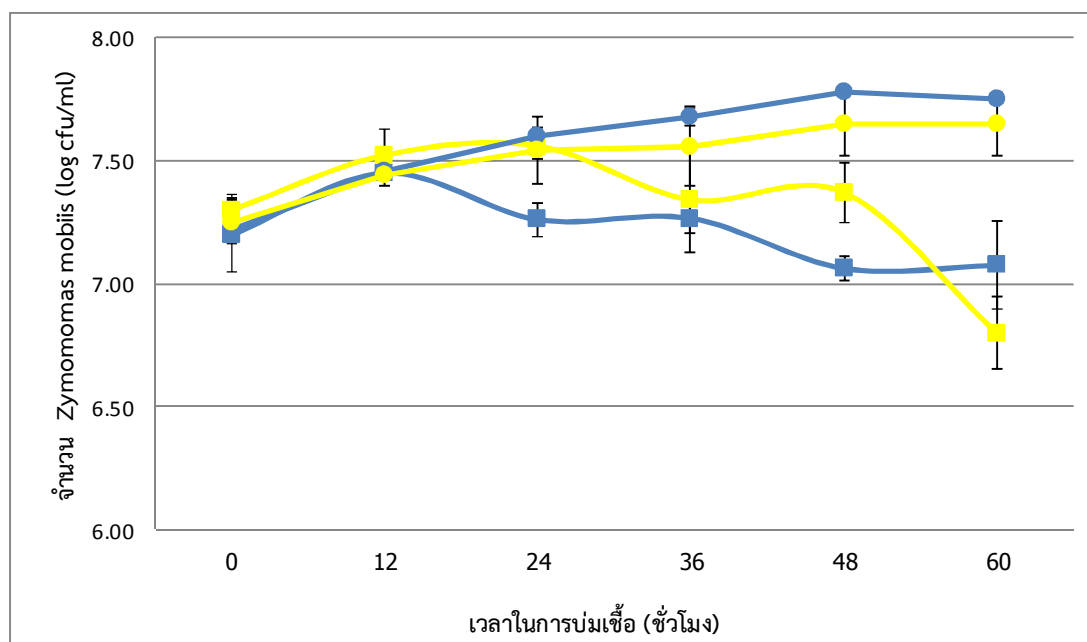
ตารางที่ 2 ปริมาณแอลฟาเซลลูโลสและแกมมาเซลลูโลสของกากสับปะรดที่ผ่านการให้ความร้อนอุณหภูมิ 105, 125°C เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที

อุณหภูมิที่ใช้ (°C)	ความเข้มข้น H ₂ SO ₄ (M)	เวลา (นาที)	ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส (%)	ปริมาณแกมมาเซลลูโลส (%)
105	3 M	60	75.81±0.19 ^f	24.19±0.19
		90	66.18±0.25 ⁱ	33.82±0.25
		120	60.17±0.33 ^j	39.83±0.33
	5M	60	72.17±0.25 ^h	27.83±0.25
		90	72.26±0.62 ^h	27.74±0.62
		120	80.23±0.24 ^e	19.77±0.24
125	3 M	60	75.05±0.30 ^g	24.95±0.30
		90	94.24±0.40 ^b	5.76±0.40
		120	84.22±0.40 ^d	15.78±0.40
	5M	60	90.98±0.40 ^c	9.02±0.40
		90	98.44±0.15 ^a	1.56±0.15
		120	76.36±0.94 ^f	23.64±0.94

หมายเหตุ: เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง อักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Zymomonas mobilis* ในการย่อยกากสับปรดเพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Zymomonas mobilis* ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 w/v และสิ่งทดลองที่ไม่มีการเติมน้ำตาล ที่มีอุณหภูมิในการหมัก 30 และ 35°C และมีระยะเวลาในการหมัก 60 ชั่วโมงโดยมีการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทุก 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง พบว่าการหมักกากสับปรดด้วย *Zymomonas mobilis* ที่อุณหภูมิ 30°C สิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและไม่มีการเติมน้ำตาลมีแนวโน้มของการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมือนกันในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสำหรับสิ่งที่ทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและไม่เติมน้ำตาลโดยการเติมน้ำตาลทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่มากกว่า และในขณะเดียวกันอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักพบว่าที่อุณหภูมิ 30°C สำหรับสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลมีการเจริญเติบโตมากกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 35°C ในสิ่งทดลองกลุ่มเดียวกัน สำหรับสิ่งทดลองที่ไม่มีการเติมน้ำตาลพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มีแนวโน้มไม่คงที่แต่อย่างไรก็ตามที่เวลา 60 ชั่วโมงสำหรับสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมน้ำตาล



หมายเหตุ

■ คือ สิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 30°C

● คือ สิ่งทดลองที่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 30°C

■ คือ สิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 35°C

● คือ สิ่งทดลองที่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 35°C

ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของ *Zymomonas mobilis* ในสิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและน้ำตาลและใช้อุณหภูมิ 30 และ 35°C ที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 ปริมาณเชื้อ *Zymomonas mobilis* (log cfu/ml) ในสิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและเติมน้ำตาลและใช้อุณหภูมิในการหมักที่ 30 และ 35°C เป็นเวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (°C)	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)					
		0	12	24	36	48	60
ไม่เติมน้ำตาล	30	7.20±0.15 ^{klm}	7.45±0.02 ^{defghi}	7.26±0.07 ^{ijkl}	7.27±0.06 ^{hijk}	7.06±0.05 ^m	7.07±0.18 ^{lm}
	35	7.30±0.07 ^{hijk}	7.52±0.10 ^{cdefg}	7.56±0.05 ^{bcdef}	7.34±0.22 ^{ghijk}	7.37±0.12 ^{fghijk}	6.80±0.15 ⁿ
เติมน้ำตาล	30	7.22±0.03 ^{klm}	7.46±0.01 ^{defgh}	7.60±0.04 ^{abcde}	7.68±0.04 ^{abc}	7.78±0.02 ^a	7.75±0.01 ^{ab}
	35	7.25±0.09 ^{jklm}	7.44±0.04 ^{efghij}	7.55±0.14 ^{cdef}	7.56±0.16 ^{bcdef}	7.65±0.13 ^{abcd}	7.65±0.13 ^{abcd}

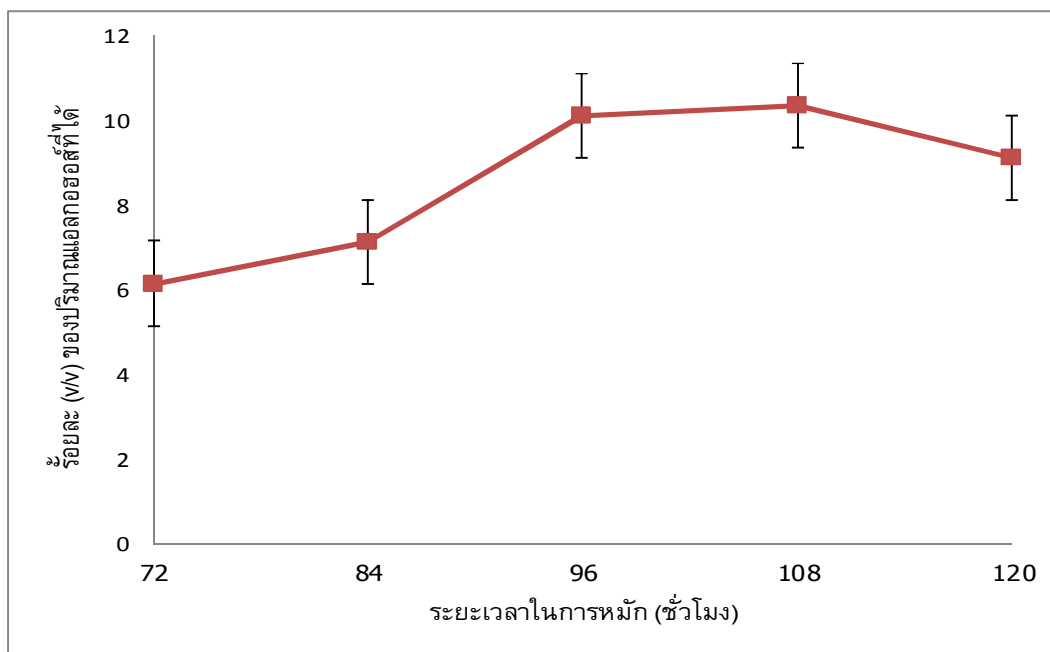
หมายเหตุ: เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งและแนวนอน อักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการทดลองจากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าสิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและเติมน้ำตาล พร้อมกับอุณหภูมิในการหมักที่ 30 และ 35°C พบว่า สิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและใช้อุณหภูมิในการหมักที่ 30°C ในเวลา 48 ชั่วโมงมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่มากที่สุดและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักจึงมาจากสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและทำการหมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง ดังแสดงร้อยละของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ร้อยละ (v/v) ของปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Zymomonas mobilis*

อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (°C)	เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				
	72	84	96	108	120
30	6.13±0.10 ^d	7.10±0.15 ^c	10.10±0.17 ^a	10.33±0.15 ^a	9.10±0.10 ^b

หมายเหตุ: เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวนอน อักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 7 ร้อยละของปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Zymomonas mobilis*

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของเอทานอล*ที่ได้จากการหมักกากสับประดด้วย *Zymomonas mobilis* ในสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและทำการหมักที่อุณหภูมิ 30°C

	เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				
	72	84	96	108	120
อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (30°C)	8.45±6.57 ^a	1.88±0.41 ^b	1.74±0.44 ^b	1.77±0.13 ^b	1.47±0.12 ^c
Retention time	3.894±0.44 ^{ns}	3.759±0.09	3.894±0.44	3.952±0.38	3.587±0.21
Peak Area	6738528	588073.17	6738528	693262.67	465503.50
Peak Height	143404.33	31854.83	143404.33	29943.50	24927.83

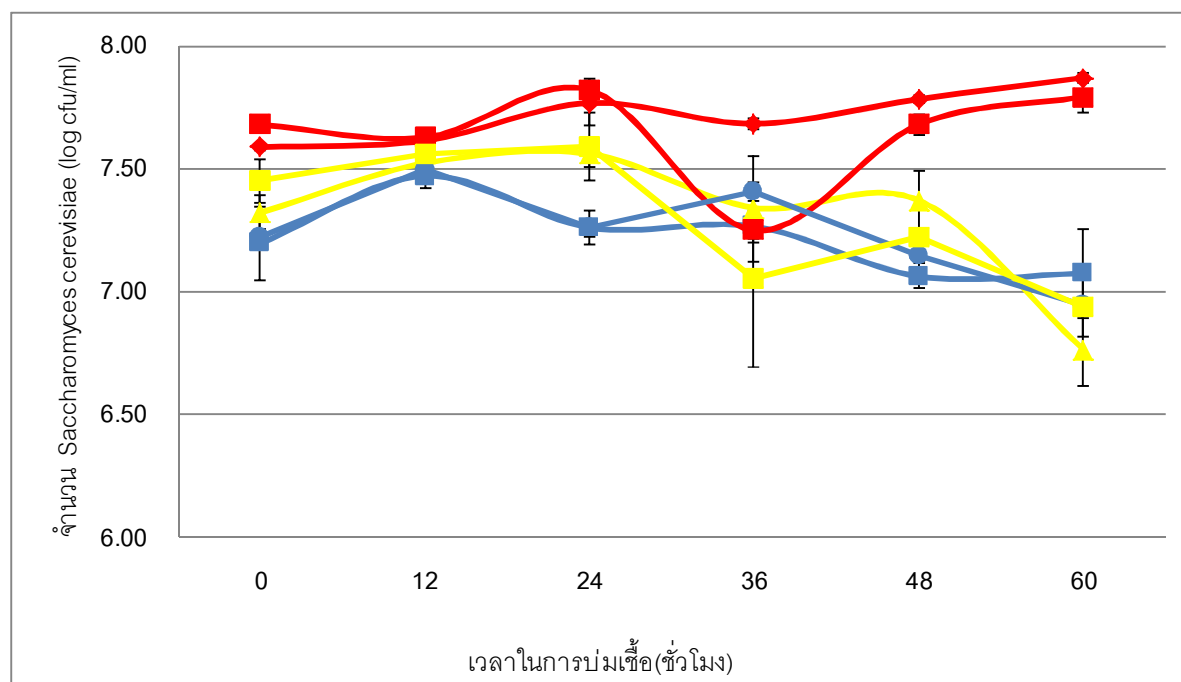
หมายเหตุ: เปรียบเทียบในแนวนอน อักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เครื่องหมาย * หมายถึงความเข้มข้นของเอทานอลหาได้จากกราฟมาตรฐานด้วยการแทนค่าในสมการ $Y = 16965X$

2.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสร้อย 5 w/v และสิ่งทดลองที่ไม่มีการเติมน้ำตาล ที่มีอุณหภูมิในการหมัก 25, 30 และ 35°C และมีระยะเวลาในการหมัก 60 ชั่วโมงโดยมีการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทุก 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง พบว่าการหมักกากสับประดด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 25°C สิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและไม่มีการเติมน้ำตาลมีแนวโน้มของการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมือนกันยกเว้นที่ระยะเวลาในการหมักที่ 36 ชั่วโมงโดยพบว่าสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลมีจำนวนเชื้อยีสต์ที่ต่ำกว่าสิ่งทดลองที่ไม่มีการเติมน้ำตาลอย่างไรก็ตามที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมงของการหมักพบว่าปริมาณเชื้อยีสต์ทั้งสองสิ่งทดลองมีจำนวนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



หมายเหตุ

- คือ สิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 25°C
- คือ สิ่งทดลองที่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 25°C
- คือ สิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 30°C
- คือ สิ่งทดลองที่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 30°C
- คือ สิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 35°C
- คือ สิ่งทดลองที่เติมน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 35°C

ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* ในสิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและน้ำตาลและใช้อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C ที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง

สำหรับการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 30°C ทั้งในสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและไม่มีการเติมน้ำตาลพบว่ามีความคล้ายคลึงกันโดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมักมากขึ้นจะทำให้ปริมาณของเชื้อยีสต์มีจำนวนที่น้อยลง อุณหภูมิในการหมัก 35°C สำหรับสิ่งทดลองทั้งสองพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์จะมีลักษณะขึ้นและลง อย่างไรก็ตามเมื่อมีระยะเวลาในการหมักเป็น 60 ชั่วโมงปริมาณของเชื้อยีสต์มีจำนวนมากกว่าการใช้อุณหภูมิในการหมักเป็น 30°C ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักจึงมาจากการหมักที่เติมน้ำตาลและทำการหมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง ดังแสดงร้อยละของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (log cfu/ml) ในสิ่งทดลองที่ไม่เติมน้ำตาลและเติมน้ำตาลและใช้อุณหภูมิในการหมักที่ 25, 30 และ 35°C เป็นเวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง

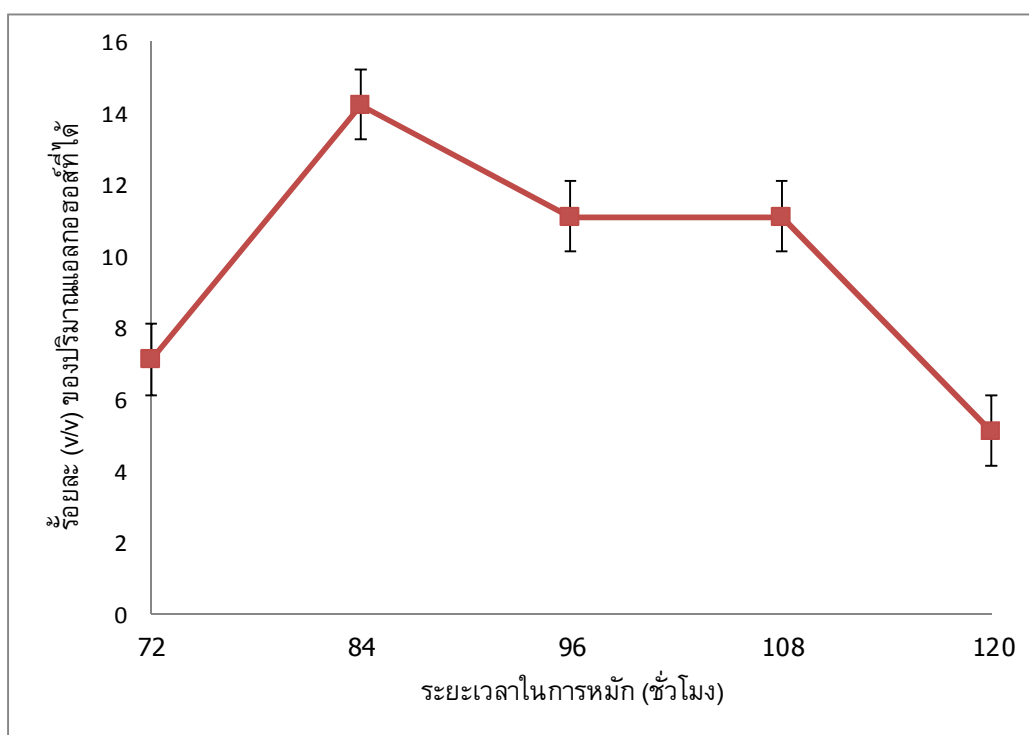
สิ่งทดลอง	อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (°C)	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)					
		0	12	24	36	48	60
ไม่เติมน้ำตาล	25	7.59±0.01 ^{abcdefg}	7.62±0.04 ^{abcdef}	7.77±0.09 ^{abcd}	7.68±0.02 ^{abcde}	7.78±0.01 ^{abc}	7.87±0.02 ^a
	30	7.20±0.15 ^{efghij}	7.47±0.02 ^{abcdefgh}	7.26±0.07 ^{cdefghij}	7.27±0.06 ^{cdefghij}	7.06±0.05 ^{hij}	7.07±0.18 ^{ghij}
	35	7.32±0.07 ^{bcdefghi}	7.52±0.10 ^{abcdefgh}	7.56±0.05 ^{abcdefgh}	7.34±0.22 ^{bcdefghi}	7.37±0.12 ^{abcdefghi}	6.77±0.15 ^j
เติมน้ำตาล	25	7.68±0.02 ^{abcde}	7.63±0.03 ^{abcdef}	7.82±0.05 ^{ab}	7.25±0.04 ^{defghij}	7.68±0.04 ^{abcde}	7.79±0.26 ^{ab}
	30	7.22±0.03 ^{efghij}	7.50±0.01 ^{abcdefgh}	7.26±0.04 ^{cdefghij}	7.40±0.04 ^{abcdefghi}	7.14±0.02 ^{efghij}	6.95±0.01 ^{ij}
	35	7.45±0.09 ^{abcdefghi}	7.56±0.04 ^{abcdefgh}	7.59±0.14 ^{abcdefg}	7.05±0.36 ^{ij}	7.22±0.03 ^{efghij}	6.94±0.13 ^{ij}

หมายเหตุ: เปรียบเทียบในแนวนอนและแนวตั้ง อักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 7 ร้อยละ (v/v) ปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและทำการหมักที่อุณหภูมิ 25°C ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae*

อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (°C)	เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				
	72	84	96	108	120
25	7.10±0.10 ^c	14.23±0.15 ^a	11.10±0.10 ^b	11.10±0.10 ^b	5.10±0.10 ^d

หมายเหตุ: เปรียบเทียบในแนวนอน อักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 9 ร้อยละของปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากสิ่งทดลองที่เติมน้ำตาล และหมักที่อุณหภูมิ 25°C ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae*

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของเอทานอล*ที่ได้จากการหมักกากสับประดในสิ่งทดลองที่มีการเติมน้ำตาลและทำการหมักที่อุณหภูมิ 25°C ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae*

	เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				
	72	84	96	108	120
อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก 25 °C	40.17±3.07 ^a	21.23±1.13 ^c	20.80±1.26 ^c	36.25±1.19 ^b	45.42±2.44 ^a
Retention time	3.619±0.12 ^{ns}	3.582±0.06	3.630±0.11	3.587±0.12	3.661±0.10
Peak Area	6772069.67	16233180.67	6852696.33	9299459.00	8864873
Peak Height	681454.83	360197.33	352836.67	615023.33	770609.17

หมายเหตุ: เปรียบเทียบในแนวนอน อักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เครื่องหมาย * หมายถึงความเข้มข้นของเอทานอลหาได้จากกราฟมาตรฐานด้วยการแทนค่าในสมการ $Y = 16965X$