งานวิจัยนี้จึงทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลที่ได้จาก การใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอลหาสภาวะที่เหมาะสมจากงานวิจัยที่ผ่านมา โดยกำหนดตัวแปรคงที่ คือ 8 กรัมเปลือกสับปะรด อาหารเหลวสูตรเฉพาะปริมาตร 100 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และอุณหภูมิห้อง (30°C) ตัวแปรแปรผัน คือชนิดของครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม อย่างละ 4 และ 6 กรัม น้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลว 10 และ 30 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาที่ใช้หมัก 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน โดยใช้วิธีการหมักเอทานอลแบบกะซึ่งแบ่งเป็น

วิธีที่1 การหมักเอทานอลด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมมีวิธีการทดลองดังนี้

การทดลองดำเนินการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เริ่มจากผสมครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสมลงในอาหารเหลวสูตรเฉพาะพีเอช 5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก นาน 30 นาที แล้วจึงใส่เปลือกสับปะรด 8 กรัม ปิดจุกด้วยสำลี นำไปวางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และจุลินทรีย์ ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน

วิธีที่ 2 การหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาจากเปลือกสับปะรดด้วย 10%v หัวเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 ผสมกับครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ ทำได้โดยเขี่ยยีสต์ 1-2 โคโลนีจากจานเพาะเลี้ยงวายเอ็มเอ ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งมีอาหารเหลว (น้ำตาลเริ่มต้น 200 g/L) สูตรเฉพาะปริมาตร 100 มิลลิลิตร พีเอช 5 ปิดจุกด้วยสำลี วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 นำหัวเชื้อยีสต์ที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรเทลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งใส่เปลือกสับปะรด 8 กรัมและอาหารเหลว (น้ำตาลเริ่มต้น 30 g/L หรือ 10 g/L) สูตรเฉพาะ พีเอช 5 ที่ได้ผสมครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวไว้ก่อนแล้ว ในปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และจุลินทรีย์ ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน

2.5 วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ความเข้มข้นของจุลินทรีย์จากการวัดเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยใช้เฮมาไซโตมิเตอร์ (Boeco, Germany) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส [14] และเอทานอลด้วยวิธีออกซิเดชันของไดโครเมต [15] โดยวัดค่าการดูดกลืนจากเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 nm และ 600 nm ตามลำดับ

3. ผลและอภิปรายผลการทดลอง

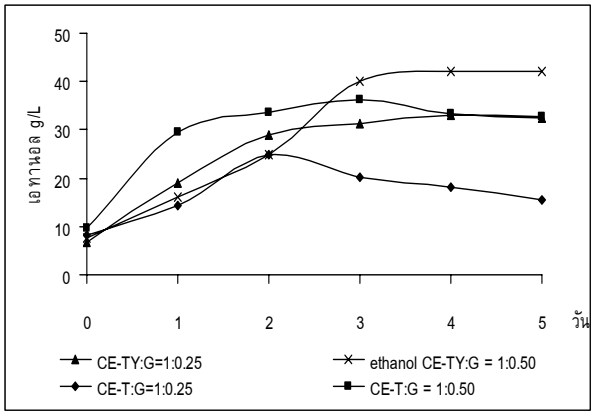
3.1 ผลการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

โปรไฟล์ของเอทานอลที่ได้จากการใช้อัตราส่วนของครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมต่อน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 1:0.25 และ 1:0.50 ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 1

พิจารณาโปรไฟล์เอทานอลจากการใช้ครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวที่อัตราส่วน 1:0.25 และ 1:0.50 ในรูปที่ 1 พบว่า น้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวเพิ่มขึ้น 25% ครูดเอนไซม์ผงสามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น 44.5% ใช้เวลาหมักเท่ากับ 3 วัน ทำนองเดียวกันจากโปรไฟล์เอทานอลของครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสมที่อัตราส่วน 1:0.25 และ 1:0.50 พบว่าน้ำตาลเพิ่มขึ้น 25% เอทานอลที่ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 21.2% ใช้หมักเท่ากับ 4 วัน เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของการหมักเอทานอล

ตารางที่ 3 เอทานอลที่ได้จากการใช้อัตราส่วนของครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวต่อน้ำตาลเริ่มต้น (CE-T:G) และเชื้อผสม (CE-TY:G) ที่อัตราส่วนต่างๆ ใช้ระยะเวลาหมัก 5 วัน

ระยะเวลา (วัน)	เอทานอล (g/L) ที่ได้จาก			
	CE-T:G = 1:0.25	CE-T:G =1:0.50	CE-TY:G = 1:0.25	CE-TY:G = 1:0.50
0	8.07	9.53	6.77	7.73
1	14.36	29.39	18.95	16.17
2	24.81	33.54	28.84	24.74
3	20.05	36.14	31.31	40.10
4	18.05	33.20	33.17	42.08
5	15.43	32.86	32.43	42.00



รูปที่ 1 โปรไฟล์เอทานอลจากการหมักเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว (CE-T) และเชื้อผสม (CE-TY) ที่อัตราส่วน 1.025 และ 1:0.50

พิจารณาโปรไฟล์ของเอทานอลที่ได้จากการใช้ครูดเอนไซม์ผงระหว่างเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่อัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวเท่ากันคือ 1:0.50 ในรูปที่ 1 พบว่า ครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสม ผลิตเอทานอลได้มากกว่าเชื้อเดี่ยวประมาณ 21% เนื่องจากครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสมมีเชื้อยีสต์ผสมอยู่จึงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้เพิ่มขึ้น และเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อผสมที่อัตราส่วน 1:0.50 มีค่าสูงที่สุด 42 g/L ใช้เวลาหมักเท่ากับ 4 วัน นั่นคือ น้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวมีผลต่อการเกิดเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ

พิจารณาโปรไฟล์ของน้ำตาลเริ่มต้นและการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว พบว่าผลของปริมาณน้ำตาล