การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด โดยยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* RMU Y-10 โดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบ Orthogonal Array Design

Enhancement of Ethanol Production from Acid-hydrolyzed Cassava Starch by Thermotolerant Yeast *Saccharomyces cerevisiae* RMU Y-10 Using An Orthogonal Array Design

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์[1] และกิติพงษ์ เวชกามา[2]

Kanlayani Chraroensopharat[1]and Kitipong Wechgama[2]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

[1]Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University

[2]คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

[2]Faculty of Sciences and Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Isan

Received: July 3, 2018

Revised: October 3, 2018

Accepted: October 3, 2018

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดโดยยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* RMU Y-10 ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี L_9 (3^4) Orthogonal array design ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษาได้แก่ ค่าพีเอช (4, 5 และ 6) แมกนีเซียมซัลเฟต (0.25, 0.50 และ 0.75 กรัมต่อลิตร) และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (0.25, 0.50 และ 0.75 กรัมต่อลิตร) หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้การหมักแบบกะ โดยใช้การผลิตเอทานอลใน YM medium เป็นชุดควบคุมที่ 1 ขณะที่มันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดที่ไม่เติมและเติมสารอาหารตามสูตรอาหารของ YM ถูกใช้เป็นชุดควบคุมที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าลำดับของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังสูงสุดคือ พีเอช ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต ตามลำดับ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล คือ พีเอช 5 แมกนีเซียมซัลเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 58.21 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ขณะที่ผลได้และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.46 และ 1.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าสภาวะดังกล่าวสามารถผลิตและให้อัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่าชุดควบคุม

คำสำคัญ: เอทานอล, ยีสต์ทนร้อน, แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด

Abstract

The purpose of this study was to investigate the optimum conditions for ethanol production from acid-hydrolyzed cassava starch by a thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* RMU Y-10

using L_9 (3^4), an Orthogonal array design. Three parameters: pH (4, 5 and 6), magnesium sulphate (0.25 0.50 and 0.75 g/l) and di-ammonium phosphate (0.25, 0.50 and 0.75 g/l) were optimized; all batch fermentations were carried out at 40°C. The ethanol concentrations from YM medium, pretreated cassava without and with YM medium were used as experiment 1, 2 and 3, respectively. The results revealed that the order of these parameters influences on ethanol concentration was pH > di-ammonium phosphate > magnesium sulphate, respectively. The optimal condition for ethanol production was pH 5, magnesium sulphate 0.50 g/l and di-ammonium phosphate 0.75 g/l. The highest concentration of ethanol (58.21 g/l) was obtained at 36 h of fermentation time, while the ethanol yield and productivity were 0.46 and 1.61 g/l/h respectively. The results also showed the ethanol concentration and productivity under the optimal condition was higher than those of the control experiments.

Keywords: ethanol, thermotolerant yeast, Acid-hydrolyzed cassava starch

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยกำลังเผชิญปัญหาวิกฤติด้านพลังงาน จากข้อมูลสถิติการใช้พลังงานเปิดเผยว่าในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีการใช้พลังงานมากถึง 63 ล้านตัน (เทียบกับน้ำมันดิบ) และเป็นที่คาดการณ์ว่าหากสถานการณ์การใช้พลังงานยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เช่นนี้ พลังงานฟอสซิลจะหมดลงในอนาคต จากเหตุผลดังกล่าวทำให้มีการศึกษาการผลิตพลังงานทดแทนจากกระบวนการชีวภาพ ไบโอเอทานอลเป็นหนึ่งในพลังงานทดแทนที่สามารถผลิตได้ในปัจจุบัน โดยผลิตได้จากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ด้วยจุลินทรีย์ที่เรียกว่า “กระบวนการหมัก” วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล ได้แก่ กากน้ำตาล อ้อย วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (agricultural waste) หรือวัสดุชีวมวล (biomass) (Nuanpeng et al., 2016) มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลักชนิดหนึ่งที่มีปริมาณมากในประเทศไทย ซึ่งมีผลผลิตประมาณ 31,190,000 ตันต่อปี อีกทั้งมีราคาถูก (1,310 บาทต่อตัน) (Office of Agricultural Economics, 2017) ดังนั้นการผลิตไบโอเอทานอลจากมันสำปะหลังจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจด้วยเหตุผลในการลดต้นทุนการผลิตและความยั่งยืนด้านพลังงาน แต่หนึ่งในปัญหาที่พบในระหว่างการผลิตเอทานอลจากกระบวนการทางชีวภาพ คือ ในระหว่างการหมักจะเกิดปฏิกิริยาทางชีวภาพระหว่างอาหารกับจุลินทรีย์ ทำให้อุณหภูมิระหว่างการหมักสูงขึ้น โดยอาจจะสูงถึง 37–40 องศาเซลเซียส ทำให้มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ และส่งผลต่อการผลิตเอทานอล ผลได้ และอัตราการผลิต (Charoensopharat et al., 2015) ดังนั้นถ้าสามารถผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล และลดปัญหาดังกล่าวได้ อีกทั้งการหมักที่อุณหภูมิสูงจะเป็นการช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ และลดต้นทุนการหล่อเย็นในภาคอุตสาหกรรมได้ (Limtong et al., 2007) การใช้ยีสต์ทนร้อนจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการผลิตเอทานอล นอกจากชนิดของยีสต์ทนร้อนแล้ว การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลยังมีอีกหลายปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ เช่น สภาวะการหมัก แหล่งคาร์บอน และสารอาหารต่าง ๆ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากมันสำปะหลังโดยยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* RMU Y-10 (Thipawan et al., 2015) โดยศึกษาผลของ พีเอช แมกนีเซียมซัลเฟต และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ต่อการผลิตเอทานอลออกแบบการทดลองโดยใช้ L_9(3^4) Orthogonal array design และคาดว่าผลที่ได้จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น

ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การผลิตเอทานอลทางชีวภาพเกิดจากการหมักน้ำตาลแบบไร้อากาศโดยใช้จุลินทรีย์ที่เหมาะสม ส่วนใหญ่แล้ว *S. cerevisiae* จะเมตาโบไลซ์น้ำตาลกลูโคสโดยผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof-Pasnas (EMP pathway) ซึ่งน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลจะถูกเมตาโบไลซ์ได้ไพรูเวท 2 โมเลกุล ภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลที่มีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาใน EMP pathway ในทางทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม จะถูกเมตาโบไลซ์ได้เป็นเอทานอลเท่ากับ 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลได้จริงเพียง 90-93 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นส่วนที่เหลือจุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อสร้างพลังงานและผลิตภัณฑ์พลอยได้อื่น ๆ (Ingledew, 1999)

ยีสต์ทนร้อนเป็นยีสต์ที่เจริญเติบโตได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 20 ถึง 50 องศาเซลเซียส มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูง สารเคมี สารดีเทอร์เจนท์ (detergents) และผลิตสารที่มีความสามารถในการทนต่อความร้อน เช่น เอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด นอกจากนี้การใช้ยีสต์ทนร้อนในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายทั้งพลังงานและน้ำในการทำระบบหล่อเย็นได้ (Limtong et al., 2007)

การออกแบบการทดลองโดยวิธี Orthogonal array design หรือทากูชิ เป็นการประยุกต์การออกแบบการทดลองที่ประกอบด้วยปัจจัยควบคุม (control factor) และปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ (uncontrollable factor) ซึ่งอิทธิพลที่เกิดจากตัวแปรเหล่านี้ไม่สามารถที่จะกำจัดได้ เพราะฉะนั้นหน้าที่หลักของวิธีทากูชิ คือ การลดความผันแปรของผลิตภัณฑ์ และประโยชน์ที่ได้จากวิธีทากูชิ คือ ช่วยลดจำนวนของการทดลอง ทำให้ประหยัดเวลา และต้นทุนในการทดลอง ช่วยทำให้การทดลองง่าย สะดวกขึ้น และให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือ (Roy, 2001)

จากทฤษฎีข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะลดต้นทุนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักเพื่อการผลิตเอทานอลโดยแนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้ คือ การใช้ยีสต์ทนร้อนซึ่งสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูง ยีสต์ทนร้อนยังมีข้อได้เปรียบในด้านอื่น ๆ อีกหลายประการ เช่น อัตราการหมักเอทานอลเกิดขึ้นได้เร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิต่ำ และที่อุณหภูมิสูง เอทานอลที่เกิดขึ้นในระบบสามารถระเหยทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวโดยอาศัยระบบที่เรียกว่า continuous stripping การใช้ gas stripping ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถกู้คืนเอทานอล (ethanol recovery) ในน้ำหมักได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Kumar et al., 2015) และในงานวิจัยนี้ยังได้ทำการออกแบบการทดลองโดยวิธี Orthogonal array design หรือทากูชิ เพื่อทำให้ประหยัดเวลาและทำให้การหมักเพื่อผลิตเอทานอลมีต้นทุนที่ลดลงอีกด้วย มีงานวิจัยหลายงานวิจัยที่รายงานผลของการเติมสารอาหารเพิ่มในน้ำหมัก เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต หรือสารสกัดจากยีสต์ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพและผลได้การผลิตเอทานอลได้ (Limtong et al., 2007; Laopaiboon et al., 2009; Charoensopharat et al., 2015; Nuanpeng et al., 2016) การศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาผลของพีเอช แมกนีเซียมซัลเฟต และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต โดยคาดว่าปัจจัยที่นำมาศึกษา และสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองจะมีส่วนช่วยส่งเสริมการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการหมักที่อุณหภูมิสูงจากแป้งมันสำปะหลังโดยยีสต์ทนร้อน และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต ซึ่งมีตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

Chan-U-tit et al. (2013) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเติมสารสกัดจากยีสต์ (1 3 และ 5 กรัมต่อลิตร) กากเซลล์ยีสต์ (Dried Spent Yeast; DSY: 4 12 และ 20 กรัมต่อลิตร) และสารป้องกันแรงดันออสโมติก (ไกลซีน: 1 3 และ 5 กรัมต่อลิตร) โดยใช้ *S. cerevisiae* NP01 ออกแบบการทดลองด้วยวิธี $L_9(3^4)$ Orthogonal array design หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าลำดับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอล สูงสุด คือ สารสกัดจากยีสต์ รองลงมา คือ ไกลซีน และสุดท้าย คือ กากเซลล์ยีสต์ โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร

กากเซลล์ยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร และไกลซีน 5 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะดังกล่าวพบว่าได้ความเข้มข้นเอทานอล (*P*) ผลได้ของเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) เท่ากับ 119.90 กรัมต่อลิตร 0.49 กรัมต่อกรัม และ 2.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

Charoensopharat et al. (2015) คัดแยกและคัดเลือกยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* DBKKU Y-102 ซึ่งเป็นยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้อินูลินในการเจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ภายใต้กระบวนการ consolidated bioprocessing (CBP) ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 104.83 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 97.46 กรัมต่อลิตร

Chamnipa et al. (2018) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 จากกากชานอ้อยที่ผ่านการย่อยแล้ว ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 85 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 35.51 กรัมต่อลิตร และ 33.84 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของพีเอช แมกนีเซียมซัลเฟต และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ต่อการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิสูงโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10 ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี L_9 (3^4) Orthogonal array design

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10 (Thipawan et al., 2015) ดัดแปลงวิธีการของ Charoensopharat and Wechgama (2018) โดยเขี่ยเชื้อลงใน YM medium ที่มีองค์ประกอบดังนี้ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และสารสกัดจากมอลท์ (malt extract) อย่างละ 3 กรัมต่อลิตร เปปโตน (peptone) 5 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 2 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงใน YM medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป

2. การเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด

อบตัวอย่างหัวมันสำปะหลังสดจากอำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม และบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร จากนั้นย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมล โดยใช้แป้งมันสำปะหลังต่อกรดไฮโดรคลอริก ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปรับพีเอช เท่ากับ 10 ด้วย 10 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองเอาส่วนใส และปรับพีเอช เป็น 6 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมล จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Sirisantimathakom et al., 2014) โดยตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วจะมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นประมาณ 130 กรัมต่อลิตร

3. การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* RMU Y-10 จาก YM medium และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด

เตรียมกล้าเชื้อโดยนำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *S. cerevisiae* RMU Y-10 เพาะเลี้ยงเซลล์เข้าสู่ระยะ log phase บรรจุอาหาร YM medium ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และบรรจุแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด น้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 130 กรัมต่อลิตร เติมสารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากมอลท์ 3 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น

เติมกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในทั้ง 2 ฟลาสก์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง เก็บตัวอย่างทุกระยะ จนครบเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์

4. ศึกษาผลของพีเอช แมกนีเซียมซัลเฟต และไดแอมโมเนียมฟอสเฟตต่อการผลิตเอทานอล โดยอาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี L_9 (3^4) Orthogonal array design

เตรียมตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย(น้ำตาลเริ่มต้นที่ 130 กรัมต่อลิตร) เติมสารอาหารตามองค์ประกอบของ YM medium ยกเว้นกลูโคส และแปรผัน Factor A (พีเอช 4-6) Factor B (แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25-0.75 กรัมต่อลิตร) Factor C (ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.25-0.75 กรัมต่อลิตร) และ Factor D (Blank เป็นดัมมี่และใช้สำหรับการประเมินความคลาดเคลื่อน) ตามตารางการออกแบบด้วยวิธี L_9 (3^4) Orthogonal array design (ตาราง 1) โดยลำดับที่ (Level) 1, 2 และ 3 แสดงค่าน้อยสุด ค่ากลาง และค่าสูงสุด ของแต่ละปัจจัยที่ทดสอบ ขณะที่ Blank ถูกใช้เพื่อคำนวนค่าการคลาดเคลื่อนของการทดลอง จากนั้นหาค่าความแตกต่างลำดับอิทธิพล และสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองโดยใช้ ANOVA (Farzaneh et al., 2011)

เริ่มต้นการผลิตเอทานอลโดยหมักในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร (ปริมาตรน้ำหมัก 250 มิลลิลิตร) ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อใช้วิเคราะห์ ขณะที่ YM medium มันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยที่ไม่มีการเติมและเติมสารอาหารตามสูตรของ YM medium ถูกใช้เป็นชุดควบคุมที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ตาราง 1
การออกแบบทดลองโดย L_9, (3^4) Orthogonal array design

RUN	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Response
	พีเอช	**แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)**	**ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)**	**Blank**	
1	(Level 1) 4	(Level 3) 0.75	(Level 3) 0.75	(Level 1)	
2	(Level 1) 4	(Level 1) 0.25	(Level 1) 0.25	(Level 3)	
3	(Level 3) 6	(Level 3) 0.75	(Level 1) 0.25	(Level 2)	
4	(Level 3) 6	(Level 2) 0.50	(Level 3) 0.75	(Level 1)	
5	(Level 3) 6	(Level 1) 0.25	(Level 2) 0.50	(Level 1)	
6	(Level 2) 5	(Level 3) 0.75	(Level 2) 0.50	(Level 3)	
7	(Level 2) 5	(Level 1) 0.25	(Level 3) 0.75	(Level 2)	
8	(Level 2) 5	(Level 2) 0.50	(Level 1) 0.25	(Level 3)	
9	(Level 1) 4	(Level 2) 0.50	(Level 2) 0.50	(Level 2)	

*Level 1: ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดของแต่ละปัจจัย; Level 2: ระดับความเข้มข้นกลางของแต่ละปัจจัย; Level 3: ระดับความเข้มข้นสูงที่สุดของแต่ละปัจจัย

5. วิธีวิเคราะห์

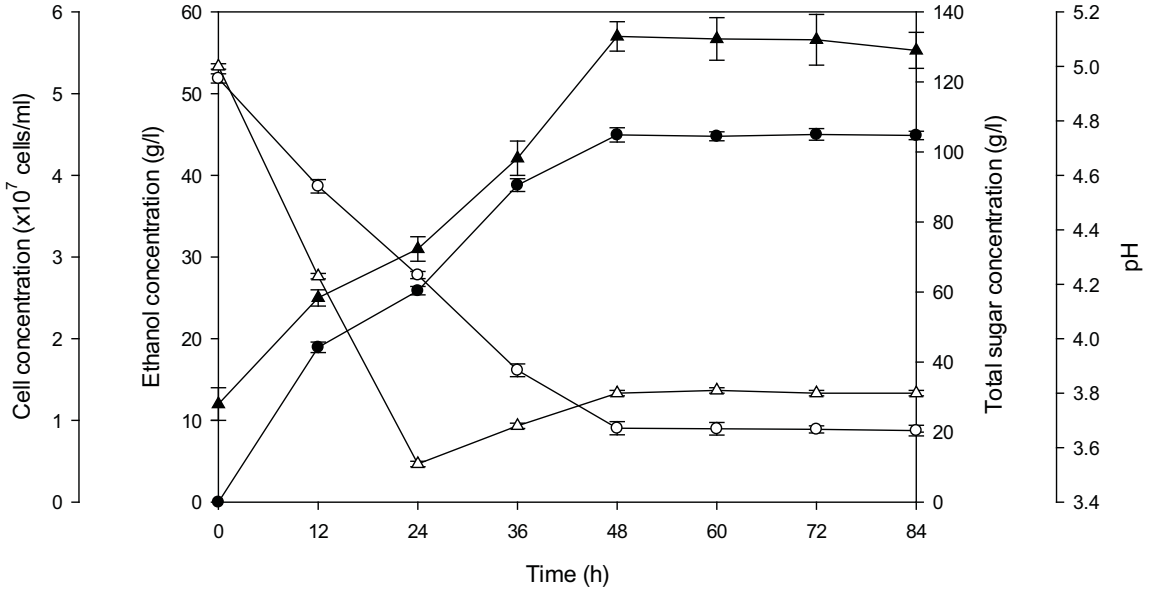
หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ phenol sulfuric method (Dubois et al., 1965) และ HPLC (Shimadzu, Japan) ดัดแปลงวิธีการของ Sirisantimathakom et al. (2004) ใช้คอลัมน์ Bio-Rad Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายกรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของสารที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ตัวตรวจวัดชนิด refractive index detector (RID) หาจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer (Zoecklein et al., 1995) วัดค่าพีเอช โดย pH meter วิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลโดยใช้เครื่อง gas chromatography (GC) (Shimadzu GC-14B, Japan) ตามวิธีการของ Laopaiboon et al. (2009)โดยใช้คอลัมน์ polyethylene glycol (PEG-20 M) packed column ใช้แก๊ส N_2 เป็นแก๊สพา อุณหภูมิของ isothermal Pack column 150 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิ injection 180 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิ flame ionization detector 250 องศาเซลเซียส ใช้สารละลายมาตรฐานเอทานอล (absolute ethanol) และใช้สารละลายไอโซโพรพานอล (propan-2-ol) เป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard)

ทำการทดลองสามซ้ำ ข้อมูลรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากนั้นคำนวนค่าประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในรูปต่าง ๆ ดังนี้ ผลได้ของเอทานอล ($Y_{p/s}$) คำนวนจากอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) ต่อปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) คำนวนจาก อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) ต่อระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลโดยใช้ One way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมทางด้านสถิติ IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corp, 2011)

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* RMU Y-10 จาก YM medium และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด

การศึกษาประสิทธิภาพการหมักเพื่อผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของยีสต์ *S. cerevisiae* RMU Y-10 แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุมที่ 1 คือ YM medium ชุดควบคุมที่ 2 คือ แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด และ 3 คือ YM medium ที่เติมแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด ผลการทดลองพบว่า ในการผลิตเอทานอลในชุดควบคุมที่ 1 ความเข้มข้นของมวลเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 48 มีความเข้มข้นของมวลเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 5.7×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพ 1) จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลและน้ำตาล พบว่าชั่วโมงที่ 48 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 44.96 กรัมต่อลิตร (ภาพ 1) มีปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป เท่ากับ 99.91 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลได้ของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอล เท่ากับ 0.45 และ 0.93 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักน้ำหมักมีค่า พีเอช เท่ากับ 3.80 (ภาพ 1)

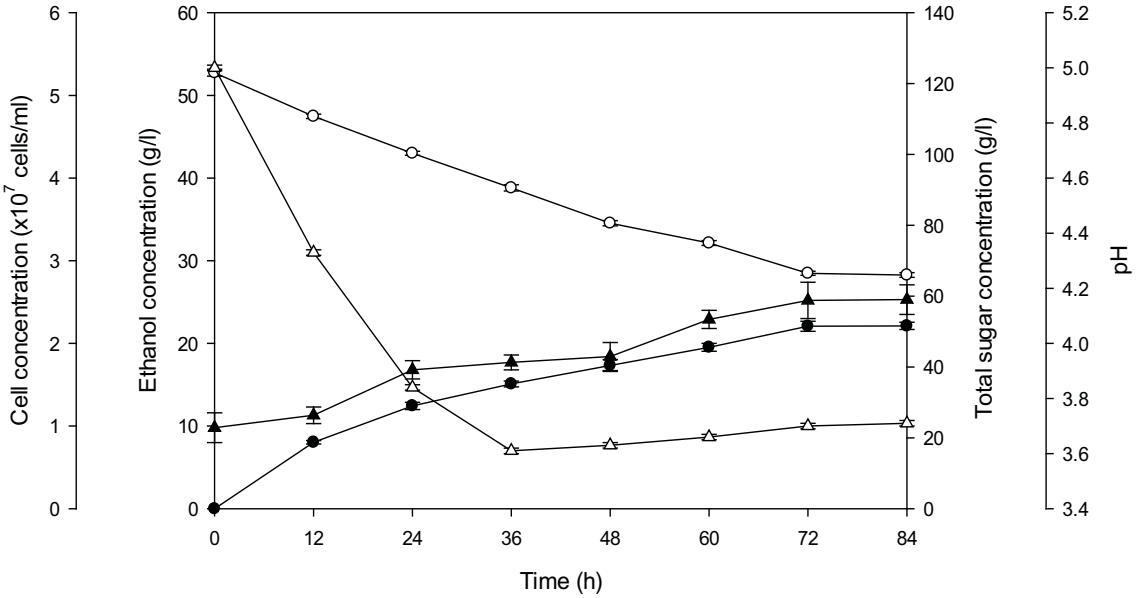


ภาพ 1 การผลิตเอทานอลจาก YM medium โดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10

(● เอทานอล; ○ ปริมาณน้ำตาล; ▲ จำนวนเซลล์ และ △ พีเอช)

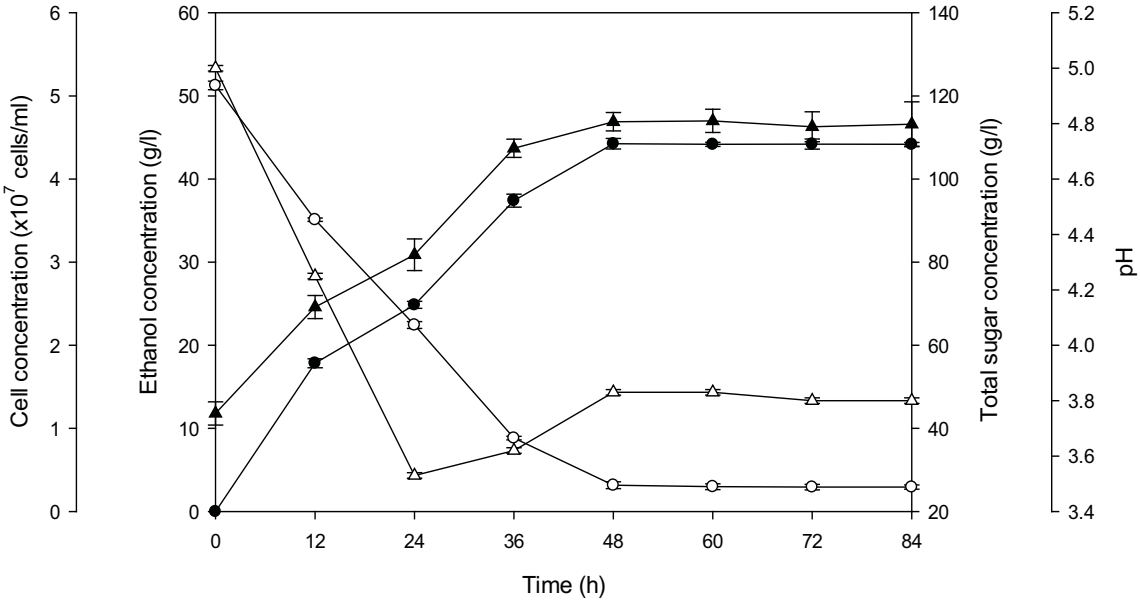
ชุดควบคุมที่ 2 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 22.07 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 (ภาพ 2) มีปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป เท่ากับ 56.59 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอช เท่ากับ 3.70 และมวลเซลล์เท่ากับ 2.52×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพ 2) โดยให้ผลได้ของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.39 และ 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งพบว่า *S. cerevisiae* RMU Y-10 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดโดยไม่มีการเติมสารอาหารอื่น อย่างไรก็ตามสภาวะดังกล่าวให้ความเข้มข้นของเอทานอลน้อย และมีระยะเวลาในการหมักนาน ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีปริมาณสารอาหารที่ไม่เพียงพอ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล จึงมีการเติมสารอาหารตามสูตร YM medium ในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (ชุดควบคุมที่ 3)

ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมที่ 3 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 44.25 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพ 3) มีปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 96.20 กรัมต่อลิตร มีค่า พีเอช เท่ากับ 3.83 และมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.69×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพ 3) โดยให้ผลได้ของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.46 และ 0.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งชุดควบคุมที่ 3 สามารถผลิตเอทานอล ผลได้ของเอทานอล และอัตราการผลิต ใกล้เคียงกับเมื่อใช้ YM medium และสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดที่ไม่มีการเติมสารอาหาร ดังนั้นมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยและเติมสารอาหารตามสูตรของ YM medium จึงถูกเลือกเพื่อศึกษาต่อไป



ภาพ 2 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดที่ไม่เติมสารอาหาร โดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10

(● เอทานอล; ○ ปริมาณน้ำตาล; ▲ จำนวนเซลล์ และ △ พีเอช)



ภาพ 3 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดที่มีการเติมสารอาหาร YM medium โดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10

(● เอทานอล; ○ ปริมาณน้ำตาล; ▲ จำนวนเซลล์ และ △ พีเอช)

2. การศึกษาผลของพีเอช แมกนีเซียมซัลเฟต และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ต่อการผลิตเอทานอล

จากการศึกษาผลของพีเอช แมกนีเซียมซัลเฟต และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต โดยผลิตเอทานอลตามสภาวะที่ได้ออกแบบการทดลองด้วยวิธี L_9 (3^4) Orthogonal array design (ตาราง 1) ผลการทดลองแสดงดังตาราง 2 ซึ่งพบว่า การทดลองที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ RUN ที่ 7 ซึ่งมีสภาวะการหมัก คือ พีเอช 5 แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร โดยสภาวะดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 53.07 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง มีมวลเซลล์สูงสุด เท่ากับ 5.45×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 106.50 กรัมต่อลิตร และมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.78 มีผลได้ของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอล คือ 0.50 และ 1.47 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตาราง 2) การที่ RUN ที่ 7 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด แสดงให้เห็นว่าสภาวะการหมักที่เหมาะสมมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตและไดแอมโมเนียมฟอสเฟตที่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์และ/หรือการผลิตเอทานอล

ตาราง 2
การผลิตเอทานอลจากยีสต์ทนร้อน S. cerevisiae RMU Y-10 ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิสูง โดยอาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี L_9 (3^4) Orthogonal array design

RUN	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ผลได้, $Y_{P/s}$	อัตราการผลิต, Q_p (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
1	43.36 ± 0.34^{c}	88.64 ± 0.74^{c}	0.49 ± 0.00^{d}	1.20 ± 0.01^{c}
2	39.24 ± 0.32^{b}	79.86 ± 0.30^{a}	0.49 ± 0.00^{d}	1.09 ± 0.01^{b}
3	35.99 ± 0.22^{a}	81.67 ± 0.72^{a}	0.44 ± 0.00^{a}	1.00 ± 0.01^{a}
4	42.09 ± 0.41^{c}	89.33 ± 0.51^{c}	0.47 ± 0.00^{bc}	1.17 ± 0.02^{c}
5	38.76 ± 0.26^{b}	84.10 ± 0.66^{b}	0.46 ± 0.00^{b}	1.08 ± 0.01^{b}
6	51.85 ± 0.31^{e}	106.97 ± 0.52^{e}	0.48 ± 0.00^{c}	1.44 ± 0.01^{e}
7	53.07 ± 0.34^{e}	106.50 ± 0.62^{e}	0.50 ± 0.00^{e}	1.47 ± 0.01^{f}
8	50.89 ± 0.61^{e}	104.68 ± 0.55^{e}	0.49 ± 0.00^{d}	1.41 ± 0.02^{e}
9	46.11 ± 0.32^{d}	93.42 ± 0.81^{d}	0.49 ± 0.00^{d}	1.28 ± 0.01^{d}

* $^{a-f}$ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้วิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

การทดลองที่สามารถผลิตเอทานอลได้น้อยสุด คือ RUN ที่ 3 ซึ่งมีสภาวะการหมักคือ พีเอช 6 แมกนีเซียมซัลเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร โดยสภาวะดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 35.99 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง มีมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.62×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 81.67 กรัมต่อลิตร และมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.83 มีผลได้เอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอล คือ 0.44 และ 1.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตาราง 2) การที่ RUN ที่ 3 ผลิตเอทานอลได้น้อย อาจเนื่องมาจากมีสภาวะการหมักที่ไม่เหมาะสม คือ พีเอช 6 ซึ่งทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้ไม่ดีในสภาวะดังกล่าว และได้รับสารอาหารจากแมกนีเซียมซัลเฟต และไดแอมโมเนียมฟอสเฟตในปริมาณที่ไม่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามทุกการทดลองใช้ระยะเวลาการหมักที่เร็วกว่าชุดควบคุม (36 ชั่วโมง)

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาค่าการตอบสนอง (response value, *R*) เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละระดับปัจจัยที่ใช้ในการผลิตเอทานอล และใช้เป็นค่าแสดงความสำคัญของลำดับปัจจัยที่มีอิทธิผลต่อการผลิตเอทานอลจากยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10 ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิสูง ผลการทดลองแสดงดังตาราง 3

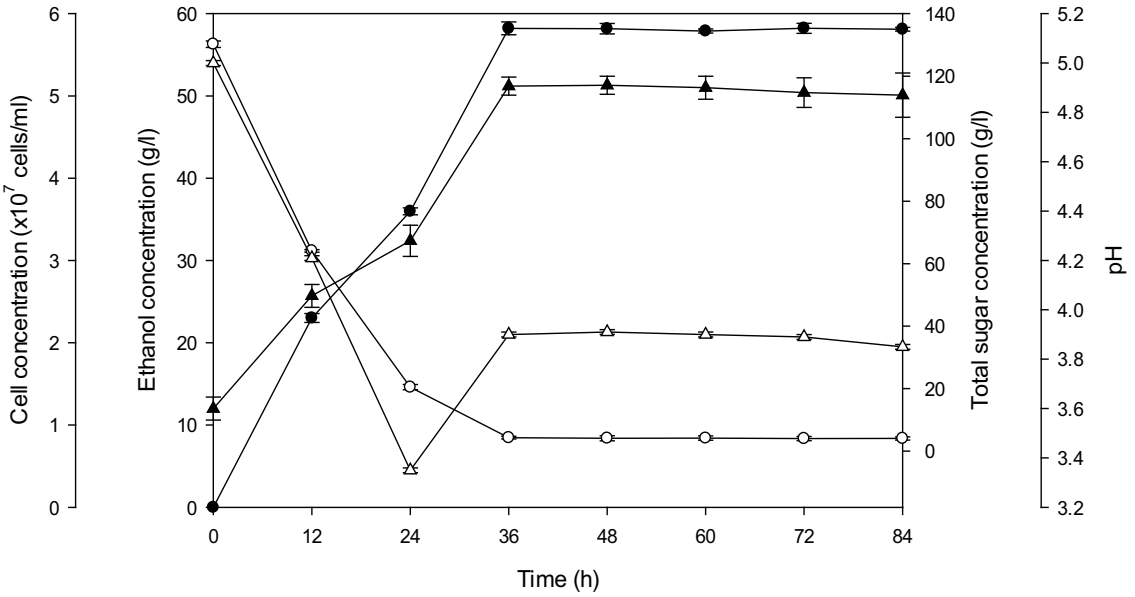
ตาราง 3
ค่าการตอบสนองเพื่อแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละระดับปัจจัย และค่าที่แสดงความสำคัญของลำดับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอล ออกแบบทดลองโดย L_9 (3^4) Orthogonal array design

Factor	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
	พีเอช	**แมกนีเซียมซัลเฟต**	**ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต**	**Blank**
K_1	128.77	131.06	126.12	133.18
K_2	155.80	139.15	136.77	135.23
K_3	116.85	131.20	138.52	133.38
k_1	42.92	43.69	42.04	44.39
k_2	51.93	46.38	45.59	45.08
k_3	38.95	43.73	46.17	44.46
R	12.98	2.70	4.14	0.68
Q	A_2	B_2	C_3	
R^2	0.9869			
Model	0.0098			

* K_1 หมายถึง ผลรวมของเอทานอลของแต่ละปัจจัยในระดับต่ำ
K_2 หมายถึง ผลรวมของเอทานอลในแต่ละปัจจัยในระดับกลาง
K_3 หมายถึง ผลรวมของเอทานอลในแต่ละปัจจัยในระดับสูง
k_1 หมายถึง ค่าเฉลี่ยของเอทานอลของแต่ละปัจจัยในระดับต่ำ
k_2 หมายถึง ค่าเฉลี่ยของเอทานอลของแต่ละปัจจัยในระดับกลาง
k_3 หมายถึง ค่าเฉลี่ยของเอทานอลของแต่ละปัจจัยในระดับสูง
R หมายถึง ค่าการตอบสนอง (Response value) (k_{max} - k_{min})
Q หมายถึง ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย

จากตาราง 3 พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลมากที่สุด (โดยการพิจารณาจากค่าการตอบสนอง (*R*) ซึ่งปัจจัยมีค่า *R* สูงสุดจะมีผลต่อการผลิตเอทานอลสูงสุด) คือ พีเอช ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต ตามลำดับ โดยมีค่า *R* เท่ากับ 12.98 4.14 และ 2.72 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย (*Q*) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ พีเอช 5 (A_2) โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของเอทานอล (ตาราง 3) ซึ่งค่าเฉลี่ยของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 51.93 กรัมต่อลิตร (k_2) ขณะที่พีเอช 4 และ 6 ให้ค่าเฉลี่ยของเอทานอลเท่ากับ 42.92 (k_1) และ 38.95 (k_3) กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ 0.50 กรัมต่อลิตร (B_2) โดยได้ค่าเฉลี่ยของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 46.38 กรัมต่อลิตร (k_2) ขณะที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยของเอทานอลเท่ากับ 43.69 (k_1) และ 43.73 (k_3) กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไดแอมโมเนียมฟอสเฟตที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ 0.75 กรัมต่อลิตร (C_3) โดยมีค่าเฉลี่ยของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 46.17 กรัมต่อลิตร (k_3) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสภาวะที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อลิตร ที่ให้ค่าเฉลี่ยของเอทานอลเท่ากับ 45.59 (k_2) กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้น 0.25 ให้ค่าเฉลี่ยของเอทานอลน้อยสุด เท่ากับ 42.04 (k_1) จากการศึกษานี้พบว่า วิธีการออกแบบการทดลองด้วยวิธี L_9 (3^4) Orthogonal array design เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการทดลอง โดยพิจารณาจากค่า Model ที่ได้ ซึ่งมีค่า *p-value* น้อยกว่า 0.05 (*p-value* = 0.0098) (Jangchud et al., 2006) และให้ค่า R^2 สูงถึง 0.9869 (ตาราง 3) จากนั้นนำค่าที่เหมาะสมที่ได้จาการทดลอง (A_2 B_2 C_3) มาทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดลอง โดยผลการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมนี้แสดงดังภาพ 4

ผลการทดลองพบว่าที่สภาวะที่เหมาะสม (A_2 B_2 C_3) สามารถผลิตเอทานอลได้ 58.21 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย โดยน้ำตาลถูกใช้ไปเท่ากับ 125.94 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง มีมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 5.12×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.90 (ภาพ 4) ผลได้และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.46 และ 1.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมที่ 1, 2 และ 3 สามารถผลิตเอทานอลได้ 44.96, 22.07 และ 44.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ของเอทานอลเท่ากับ 0.66, 0.10 และ0.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราการผลิตของเอทานอลเท่ากับ 1.24, 0.61 และ 1.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมกับชุดควบคุม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิตเอทานอลและให้อัตราการผลิตสูงกว่าชุดควบคุมทั้งหมด จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการหาสภาวะที่เหมาะของพีเอช แมกนีเซียมซัลเฟต และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี L_9 (3^4) Orthogonal array design สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10 ได้



ภาพ 4 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10

(● เอทานอล; ○ ปริมาณน้ำตาล; ▲ จำนวนเซลล์ และ △ พีเอช)

การอภิปรายผล

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลในชุดควบคุม สามารถสรุปได้ว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *S. cerevisiae* RMU Y-10 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ใน YM medium และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด และสารอาหารจาก YM medium มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Charoensopharat et al. (2015) และ Nuanpeng et al. (2016) ที่ศึกษาผลของสารอาหารต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากแก่นตะวัน และน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ขณะที่การหาลำดับอิทธิพลของปัจจัยที่นำมาศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดคือ พีเอช ซึ่งค่าพีเอชของน้ำหมักเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล ผลได้ และและการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Charoensopharat et al., 2015) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thenmozhi &Victoria (2013) ศึกษาผลของพีเอช (3-7) ต่อการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* MTCC 178 โดยพบว่าที่สภาวะการหมักที่พีเอช 5 ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด และ Hashem et al. (2013) ที่ได้รายงานว่าค่าพีเอชมีผลต่อการผลิตเอทานอลจากอาหารสังเคราะห์โดยยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *Kluyveromyces* sp. ZMS1 GU133329 และ ZMS3 GU133331 ปัจจัยที่มีอิทธิพลลำดับที่สอง ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต ซึ่ง Sue and Horst (1981) รายงานว่าแมกนีเซียมมีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอลและการเจริญเติบโตของ *Zymomonas mobilis* โดยมีส่วนช่วยในขั้นตอนการใช้น้ำตาล (glucose uptake) การแบ่งเซลล์ และเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ในเชื้อจุลินทรีย์ (Walker, 1994) และสุดท้าย คือ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต โดยสารประกอบไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนและโครงสร้างภายในเซลล์ (Charoensopharat et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอล (58.21 กรัมต่อลิตร) ได้สูงกว่างานวิจัยของ Auesukaree et al. (2012) ที่ศึกษาการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยยีสต์ *S. cerevisiae* C3751 ซึ่งผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 37.30 กรัมต่อลิตร Hack & Marchant (1998) ศึกษาการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยยีสต์ *K. marxianus* var. *marxianus* และผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และ Charoensopharat et

al. (2018) ศึกษาการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเชื้อ *P. kudriavzevii* Y-22 และผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 39.25 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้ โดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* RMU Y-10 จึงมีประสิทธิภาพและสามารถพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังได้

สรุปผลการทดลอง

ยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *S. cerevisiae* RMU Y-10 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด ในขณะที่ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลสูงสุดได้แก่ พีเอช ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต ตามลำดับ โดยมีสภาวะที่เหมาะสมคือ $A_2 B_2 C_3$ (พีเอช 5 แมกนีเซียมซัลเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร) ที่สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 58.21 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง โดยมีผลได้และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.46 และ1.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าสภาวะดังกล่าวสามารถผลิตและให้อัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่าชุดควบคุม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม และสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตรและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดนครราชสีมา ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณคุณธีระพันธ์ จำเริญพัฒน์ นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม สำหรับเทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือขั้นสูง

References

Auesukaree, C., & et al.(2012). Characterization and gene expression profiles of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolates from Thai fruits. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 114*(1), 144–149.

Chamnipa, N., Thanonkeo, S., Klanrit, P., & Thanonkeo, P. (2018). The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavezevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Brazilian journal of microbiology, 49*(1), 378-391.

Chan-U-tit, P., Laopaiboon, L., Jaisil, R., & Laopaiboon, P. (2013). High level ethanol production by nitrogen and osmoprotectant supplementation under very high gravity fermentation conditions. *Energies, 6*(1), 884-899.

Charoensopharat, K., & Wechgama, K. (2018). Isolation and selection of newly thermotolerant yeast from edible local fruits for ethanol production from cassava starch. *Prawarun Agricultural Journal, 15*(1), 29-39.

Charoensopharat, K., Thanonkeo, P., Thanonkeo, S., & Yamada, M. (2015). Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at high temperature by newly isolated thermotolerant inulin utilizing yeast *Kluyveromyces marxianus* using consolidated bioprocessing. *Antonie van Leeuwenhoek, 108*(1), 173–190.

Dubois, M., & et al. (1956). Colourimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry, 28*(1), 350-356.

Hashem, M., Naser, A., Zohri, A., & Ali, M.M.A. (2013). Optimization of the fermentation conditions for ethanol production by new thermotolerant yeast strains of *Kluyveromyces* sp. *African Journal of Microbiology Research, 7*(37), 4550-4561.

Farzaneh, A., Ehteshamzadeh, M., & Mohammadi, M. (2011). Corrosion performance of the electroless Ni–P coatings prepared in different conditions and optimized by the Taguchi method. *Journal of Applied Electrochemistry, 41*(1), 19-27.

IBM Corp. (2011). *IBM SPSS statistics for windows, version 20.0.* New York: Author.

Ingledew, M.W. (1999). *Alcohol Production by Saccharomyces cerevisiae: a yeast primer. In: The alcohol textbook.* Nottingham: Nottingham University Press.

Jangchud, A. (2006). *Product optimization in: statistics for product development and application.* Bangkok: Kasetsart University.

Kumar, S., & et al. (2015). Continuous ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate at high temperature with cell recycle and in-situ recovery of ethanol. *Chemical Engineering Science, 138*(1), 524–530.

Laopaiboon, L., & et al. (2009). Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technology, 100*(18), 4176-4182.

Limtong, S., Sringiew, C., & Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology, 98*(1), 3367-3374.

Nuanpeng, S., Thanonkeo, S., Yamada, M., & Thanonkeo, P. (2016). Ethanol production from sweet sorghum juice at high temperatures using newly isolated thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU Y-53. *Energies 9*(4), 253-263.

Office of Agricultural Economics. (2017). *Status of cassava in Thailand 2016-2017*. Retrieved from http://www.oae.go.th/ewt_news.php? nid=23597& filename=news. (In Thai)

Roy, R. K. (2001). *Design of experiments using. The Taguchi approach*. New York: John Wiley & Sons.

Sirisantimathakom, L., Laopaiboon, L., & Laopaiboon, P. (2004). *Identification and quantification acid, sugar and glycerol composition in sato using high performance liquid chromatography. Proceeding of 2nd Meeting of Yeast and Fermented Beverage in Thailand.* Bangkok: Thailand.

Sue, C., & Horst, D.W. (1981). Nutritional effects on the kinetics of ethanol production from glucose by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiological and Biotechnology, 11*(2), 116-119.

Thenmozhi, R., & Victoria, J. (2013). Optimization and improvement of ethanol production by the incorporation of organic wastes. *Advances in Applied Science Research, 4*(5), 119-123.

Thipawan, P., & et al. (2015). *Isolation of thermotolerant yeasts isolated from local fruits for ethanol production*. (Research Report). Maha Sarakham: Rajabhat Maha Sarakham University. (in Thai)

Walker, G.M. (1994). The roles of magnesium in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology, 14*(1), 311–354.

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., & Nury, F.S. (1995). *Wine analysis and production*. New York: Chapman & Hall.