บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

1. ผลจากการศึกษาการรักษาน้ำอ้อย ดังแสดงผลในตารางที่ 1 หน้า 32 โดยการใส่สารกันเสียโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข กำหนดปริมาณที่ใช้ในการรักษาอาหารว่า ปริมาณที่ใช้สูงสุดไม่ควรเกิน 500 มก./กก. หรือเทียบเท่า 0.5 กรัม/ลิตร หรือ 500 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ในการทดลองนี้ใช้ที่ระดับความเข้มข้นถึง 0.7 กรัม/ลิตร หรือ 700 ppm ก็ยังไม่สามารถเก็บรักษาน้ำอ้อยให้อยู่ในสภาพปกติได้เกิน 1 วัน ซึ่ง Faparusi (1969) ได้ศึกษาผลการเก็บน้ำตาลสดโดยใช้ซัลไฟต์กับ pH สรุปผลได้ว่าที่ระดับ pH 4 ต้องใช้เกลือซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 800 ppm จึงจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 2000 ppm จึงจะยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ ซึ่งสูงกว่าการใส่ตามปริมาณที่กำหนดมาก และการใส่สารกันเสียโซเดียมเบนโซเอท ซึ่งตามกำหนดของประกาศกระทรวงสาธารณสุขให้ใช้ได้ไม่เกิน 1.0 กรัม/ลิตร แต่ในการทดลองนี้ได้ใช้ที่ความเข้มข้นสูงสุดถึง 2.0 กรัม/ลิตร ก็ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำอ้อยให้อยู่ในปกติเช่นกัน ผลการทดลองนี้สนับสนุนโดยผลงานของ Okafor (1975) ได้รายงานใช้ซอบิคแอซิด (sorbic acid) ในการป้องกันการเสียของน้ำตาลสดว่า ได้ดีกว่าการใช้ไดเอทธิลไพโรคาร์โบเนท (diethyl pyrocarbonate) และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ แต่สารเคมีทั้ง 3 ชนิดนี้ ก็ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ดีเท่าการพาสเจอร์ไรซ์ โดยการผ่านความร้อนที่ 70°ซ. เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนั้นยังมีรายงานกิจกรรมของกรมวิทยาศาสตร์ ฉบับที่ 31 รายงานเกี่ยวกับการเก็บน้ำอ้อยเพื่อใช้เป็นเครื่องดื่ม ถ้าปรับความเข้มข้นของกรดด่างให้น้อยกว่า pH 4 จะทำให้รสน้ำอ้อยเปลี่ยน การต้มฆ่าเชื้อในหม้อต้มที่มีความดัน ทำให้ตกตะกอนมาก มีสีคล้ำ มีกลิ่นเปลี่ยน การต้มเดือด

ก็เก็บไม่ได้นานวัน แต่อาจเก็บน้ำอ้อยบรรจุขวดโดยต้มพอเดือด กรองตะกอนออก ใส่ภาชนะสะอาด ปิดฝา ทำให้เย็น เติมสีเขียวอมเหลืองให้สีใกล้เคียงกับธรรมชาติ แล้วเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 100 ppm บรรจุขวดปิดสนิท จะสามารถเก็บได้นานวัน

จากการทดลองของเครือวัลย์ (2520) ได้เก็บน้ำอ้อยในตู้เย็นที่ 10 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน พบว่า pH ลดลงจาก 6.5 เหลือ 3.7 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีในน้ำอ้อยใช้สารอาหารต่าง ๆ ในน้ำอ้อย แล้วเกิดการสร้าง metabolic product ต่าง ๆ เป็นกรด และเมื่อทดลองเอาน้ำอ้อยที่เก็บไว้ในที่เย็นนี้ไปหมักปริมาณแอลกอฮอลก็ลดลงกว่าแอลกอฮอลที่หมักจากน้ำอ้อยสด

ดังนั้นจากการทดลองใช้สารโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์และโซเดียมเบนโซเอทไม่สามารถจะเก็บรักษาน้ำอ้อยได้เกิน 1 วัน และจากรายงานของผู้อื่นก็เก็บรักษาสภาพน้ำอ้อยไม่สะดวก เพื่อป้องกันการสูญเสียอาหารต่าง ๆ ในน้ำอ้อย และเพื่อให้หมักแอลกอฮอลได้ในปริมาณสูง จึงจำเป็นต้องใช้น้ำอ้อยสดคือน้ำอ้อยที่ไม่เก็บไว้ข้ามวัน

2. การแยกเชื้อจากผลตาลสุกที่รวบรวมได้ ดังรายละเอียดในตารางที่ 2 หน้า 34 และผลการจำแนกเชื้อตามลักษณะโคโลนี และวัดขนาดเซลล์แล้ว แยกยีสต์ได้ 2 กลุ่ม ซึ่งมีลักษณะต่างกันเห็นได้ชัด ได้ผลในทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Shehata (1960) ซึ่งได้ศึกษาการแยกเชื้อยีสต์จากน้ำอ้อย โดยการเก็บตัวอย่างจาก 5 โรงงาน ในรัฐ Sao paulo ประเทศบราซิล โดยทั่วไปก็พบยีสต์ 1 – 2 ชนิด ที่เห็นความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง และให้ความเห็นว่า เชื้อยีสต์ที่รวบรวมได้นี้อาจเป็น predominance species ที่เกิดขึ้นในช่วงที่กำลังมีขบวนการหมักเกิดขึ้น ซึ่งการเก็บรวบรวมเชื้อจากผลตาลในครั้งนี้ก็เก็บขณะที่กำลังมีขบวนการหมักเกิดขึ้นเช่นกัน คือ เก็บเชื้อจากผลตาลที่สุกเต็มที่ มีรอยปริของผลตาลและมีฟองอากาศ และเชื้อ A_4 ซึ่งผ่านการคัดเลือกเพื่อใช้ในการทดลองครั้งนี้

จำแนกชนิดได้เป็น Saccharomyces microellipsodes. ซึ่งก็เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการหมักมาก (Lodder, 1974)

3. การคัดเชื้อโดยใช้ซูโครสเป็น C-source ดังผลในรูปที่ 1 หน้า 37 แสดงเห็นได้ชัดว่า ที่อุณหภูมิ 26 °ซ. สูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัม% จำนวนรอบการหมุน 100 รอบต่อนาที (rpm.) กับซูโครส 25 กรัม% จำนวนรอบการหมุน 80 rpm กลุ่มเชื้อยีสต์ที่ทำการทดสอบความสามารถหมักเอทธานอลนี้ พบว่าที่ 25 กรัม%ซูโครส ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่า ดังเช่นยีสต์สายพันธุ์ A_4 ในภาวะที่มีซูโครส 25 กรัม% 80 rpm ให้เปอร์เซนต์เอทธานอล 11.08% ในขณะที่ซูโครส 20 กรัม% 100 rpm ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลเพียง 5.35% ซึ่งผลการทดลองนี้ได้ผลทำนองเดียวกับการทดลองของ Rose (1976) ซึ่งได้ศึกษาการหมักแอลกอฮอล โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ หมักในภาวะอุณหภูมิที่ 30 °ซ. ความเร็วจำนวนรอบการหมุน 100 rpm ในเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณซูโครส 20 กรัม% และ 25 กรัม% ได้ผลว่ายีสต์สายพันธุ์ Saccharomyces cerevisiae (strain Sa 23) ใช้ซูโครส 20 กรัม% ให้เอทธานอล 10.4% ในขณะที่ซูโครส 25 กรัม% ให้เอทธานอล 13.3% หรือ strain Sa28 ที่ซูโครส 20 กรัม% ให้เอทธานอล 9.9% เมื่อปริมาณซูโครส 25 กรัม% ให้เอทธานอล 12.2% จะเห็นได้ว่าที่ซูโครส 25 กรัม% ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่า ซึ่ง Amerine และคณะ (1967) ก็ได้สรุปว่า การหมักด้วยยีสต์เพียงเชื้อเดียว และใช้น้ำตาลความเข้มข้นประมาณ 25 – 35 กรัม% จะทำให้ได้แอลกอฮอลในปริมาณสูงที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบภาวะที่ซูโครส 25 กรัม% จำนวนรอบการหมุน 80 rpm เท่ากัน ต่างกันที่ 26 °ซ. และ 28 °ซ. แม้ว่าที่อุณหภูมิต่างกันเพียง 2 °ซ. แต่ให้ผลผลิตเอทธานอลต่างกัน คือ ยีสต์สายพันธุ์ A_4 หมักเอทธานอลได้ 11.08% ที่ 26 °ซ. ในขณะที่ 28 °ซ. หมักได้ 9.25% คือที่อุณหภูมิต่ำกว่าให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่า ผลงานของ Rankine (1953) ได้ศึกษาการหมักเอทธานอลจากน้ำองุ่นก็พบว่าที่

อุณหภูมิ 15 °ซ. ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่าที่ 25 °ซ. และยังกล่าวสนับสนุนต่อไปอีกว่า ที่อุณหภูมิสูง 25 °ซ. จะมี volatile acid และ glycerol เกิดขึ้นมากกว่าที่ 15 °ซ. แต่ความสามารถในการสร้างเอทธานอลของยีสต์สายพันธุ์ S_{90} ในการทดลองนี้ ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลที่ 26 °ซ. 5.28%, ที่ 28 °ซ. 6.6% คือที่อุณหภูมิสูง (28 °ซ.) กลับให้เอทธานอลมากกว่าที่ 26 °ซ. จากผลการทดลองที่ได้แย้งกันนี้แม้อุณหภูมิต่างกันเพียง 2 °ซ. เปอร์เซนต์เอทธานอลที่ได้ต่างกัน สรุปได้ว่าอุณหภูมิมีความสำคัญต่อการหมักเอทธานอล แต่ที่อุณหภูมิใดจะให้ผลผลิตดีนั้นต้องขึ้นกับชนิดของเชื้อ เช่น รายงานของ Levine และ Cooney (1973) เชื้อยีสต์ Hansenula polymorpha เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงถึง 45 °ซ. Kunkee และ Amerine (1970) ได้ให้ข้อสังเกตว่า การหมักที่อุณหภูมิสูง จะมีสารบางอย่างที่ยีสต์ผลิตขึ้นนอกเหนือจากแอลกอฮอลมายับยั้งการหมักได้

เป็นที่น่าสังเกตว่า ยีสต์ A_4 ให้ผลแตกต่างกันมาก คือ ที่ 26 °ซ. ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่าที่ 28 °ซ. 1.83% แต่ S_{90} ที่ 26 °ซ. ให้ผลต่างกันเพียง 0.37% แสดงว่า S_{90} จะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากกว่า A_4

4. การคัดเชื้อเบื้องต้น โดยใช้ซูโครส 25 กรัม% เป็น C-source ได้ยีสต์ที่หมักเอทธานอลได้เปอร์เซนต์สูงแล้ว นำไปใช้ในการหมักน้ำอ้อยโดยใช้สูตรอาหารเสริมเช่นเดียวกับกรณีใช้น้ำตาลซูโครสนั้น ตามผลแสดงในรูปที่ 2 หน้า 39 เมื่อดูผลเฉพาะยีสต์สายพันธุ์ A_4 ที่ระยะเวลาหมัก 4 วัน ให้เอทธานอล 12.15% ขณะที่หมักในเวลา 7 วันได้ 10.65% การที่จำนวนวันเพิ่มขึ้น กลับมีเอทธานอลลดต่ำลง เพราะผลจาก nutrient ที่เหลือน้อย และ CO_2 มาระงับการสร้างเอทธานอล (White and Munns, 1951) และ Ueda และ Koba (1980) ได้กล่าวว่า การหมักเอทธานอลถ้าระยะเวลาการหมักมากกว่า 4 วัน จะวัดเอทธานอลได้น้อยลง เพราะจะเริ่มมีการตายของเซลล์ยีสต์เพิ่มมากขึ้น Kunkee และ Amerine (1970) ได้ให้ข้อสังเกตว่า เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น อุณหภูมิที่

เพิ่มขึ้นจากขบวนการสังเคราะห์เอทธานอลจะเพิ่มขึ้น (heat entralpy) และการเกิดสารอื่นมาแทนแอลกอฮอลก็มีมากขึ้นด้วย

ผลของการใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำอ้อยที่เป็นอาหารเสริมจำนวนเท่ากัน ระยะเวลาการหมัก จำนวนรอบการหมุน และอุณหภูมิเท่ากัน ดังผลในรูปที่ 1 หน้า 37 เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็น C-source แสดงผลว่า A_4 หมักได้ 9.25% S_{90} หมักได้ 6.65% ในภาวะเดียวกันเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็น C-source ดังผลในรูปที่ 2 หน้า 39 A_4 หมักได้ 10.65% S_{90} หมักได้ 7.88% จะเห็นว่าเมื่อภาวะต่าง ๆ และเชื้อยีสต์เดียวกัน เมื่อเปลี่ยน C-source ผลที่ได้ย่อมต่างกันด้วย ทั้งนี้เพราะน้ำอ้อยมีสารอาหารต่าง ๆ อยู่เป็นปริมาณมาก ดังตารางแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของน้ำอ้อย (Spencer-Meade, 1963) ในภาคผนวกหน้า 110

จากการคัดสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถหมักน้ำอ้อยให้แอลกอฮอลสูง จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ A_2 A_3 A_4 A_5 และ A_6 ดังแสดงผลในรูปที่ 2 หน้า 39 กับ S_{90} ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานมาคัดอีกรอบหนึ่งโดยใช้อุณหภูมิ 40 °ซ. เป็นเกณฑ์ ทั้งนี้เพื่อคัดสายพันธุ์ที่ทนความร้อนสูงได้ เนื่องจากในขบวนการหมัก อุณหภูมิจะสูงขึ้น ถ้าได้สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ก็จะลดค่าใช้จ่ายในการผลิตลงได้ทางหนึ่ง คือ โดยลดค่าใช้จ่ายของเครื่องลดอุณหภูมิ (cooling system) ทั้งนี้ถ้าอุณหภูมิสูงเกินที่เชื้อยีสต์ทนได้ จะทำให้เชื้อยีสต์ตาย

ในการคัดเชื้อโดยใช้อุณหภูมิสูงเป็นเกณฑ์นี้ ได้แบ่งการทดลองเป็น 2 ตอน ตอนที่ 1 ทดลองหมักที่ 28 °ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อน แล้วจึงเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 40 °ซ. ดังผลการทดลองในรูปที่ 3 หน้า 40 ได้ผลว่ายีสต์สายพันธุ์ A_4 ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลได้สูงสุด 4.8% และ S_{90} วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 1.92% ตอนที่ 2 ทดลองหมักที่ 40 °ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมงต่อกัน ภายหลังจากช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ (propagation) ซึ่งเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมงแล้ว หลังจากเวลาหมัก 72 ชั่วโมง ผลปรากว่า A_4 วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 2.7%

และสายพันธุ์อื่น ๆ ก็ได้เปอร์เซนต์เอทธานอลน้อยลง และ S_{90} ปริมาณแอลกอฮอลมีน้อยมาก วัดไม่ได้

การที่แบ่งทำ 2 ตอน โดยตอนที่ 1 เริ่มให้หมักที่ 28 °ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อน เพื่อศึกษาว่า การปรับตัวของยีสต์จากการเขย่า 150 rpm แล้วเปลี่ยนเป็น 80 rpm ในช่วงเวลาหนึ่งจึงเปลี่ยนเป็นอุณหภูมิ 40 °ซ. เปอร์เซนต์แอลกอฮอลจะแตกต่างกันมากหรือไม่ ผลปรากฏว่าช่วงการปรับตัวของเซลล์ มีความสำคัญต่อการหมักมาก ถ้าให้เซลล์มีเวลาปรับตัวในอุณหภูมิต่ำคือ 28 °ซ. ก่อนจะมีการเพิ่มเป็น 40 °ซ. ดูเหมือนว่าอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น ไม่ได้ทำลายขบวนการหมักเอทธานอลเลย โดยดูค่าเปรียบเทียบเปอร์เซนต์แอลกอฮอลของ A_4 ในตอนที่ 1 หมักได้ 4.8% แต่ตอนที่ 2 หมักได้เพียง 2.7% ดังกล่าวข้างต้น

สรุปผลจากการคัดเลือกยีสต์ที่หมักแอลกอฮอลได้ในที่อุณหภูมิสูง 40 °ซ. คือ A_4 ดังนั้นจึงใช้ยีสต์สายพันธุ์ A_4 ซึ่งจะศึกษาสภาพที่เหมาะสมอื่น ๆ เพื่อให้หมักเอทธานอลด้วยน้ำอ้อยได้ปริมาณสูงต่อไป ถ้าได้ยีสต์สายพันธุ์ที่หมักแอลกอฮอลได้ดีที่ทนอุณหภูมิสูงได้ก็จะลดค่าใช้จ่ายในการลดอุณหภูมิของถังหมักดังกล่าว

5. จากการศึกษาอัตราการเจริญโดยปกติของ A_4 เทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน S_{90} ดังผลในตารางที่ 4 หน้า 42 และรูปที่ 4, 5 หน้า 43, 44 ผลปรากฏว่าทั้ง S_{90} และ A_4 มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน และจากการวัด OD และนับจำนวนเซลล์ได้ผลว่า ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ในชั่วโมงที่ 6 เป็นช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากคือ เป็นช่วงที่มียีสต์กำลังแบ่งตัวได้ดีที่สุด และในชั่วโมงที่ 9 เป็นช่วงที่ยีสต์เริ่มเข้าสู่ stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ใกล้จะสูงสุด จากผลการศึกษานี้จะทราบได้ว่า ในช่วงเวลาที่จะเก็บเซลล์ยีสต์ไปใช้ในการหมักเพื่อเป็นการลดเวลาในช่วง lag phase ได้ด้วย ควรจะเก็บเซลล์ในช่วงที่มีการหมุน 150 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ช่วงเวลาในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลล์ได้สูงสุดนั้น ต้องขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น ชนิดและปริมาณของธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยง การให้

อากาศ อุณหภูมิ อายุของ inoculum ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และสายพันธุ์ของยีสต์ (White, 1956) ดังผลการศึกษาของฉันทนา นันทพงษ์ (2522) เลี้ยงยีสต์ FM (Fleischmann) และ FP (Fermipan) โดยใช้ inoculum อายุ 18 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 1% โดยใช้เครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เวลาที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลล์ได้มากที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 9 และ 10 ตามลำดับ และการเจริญของเชื้อจะคงที่เมื่อเลี้ยงได้ 13 และ 17 ชั่วโมง ซึ่ง Peterson และคณะ (1945) กับ Harris และคณะ (1948) ก็ได้รายงานไว้เช่นกัน และพบว่าเมื่อเลี้ยงได้ 2 ชั่วโมง ทั้งยีสต์ FM และ FP จะเริ่มเข้าสู่ log phase และฉันทนา (2522) ได้อ้างรายงานของบุหลันและคณะ ใช้สารอาหารชนิดเดียวกัน พบว่าช่วงเวลาที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลล์ได้สูงสุดของเชื้อ Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis, Endomycopsis capsularis, Endomycopsis fibuligera และ Schwanniomyces alluvius คือ 15, 10, 15, 8 และ 14 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อ inoculum มีอายุ 24 ชั่วโมง เลี้ยงในฟลาสที่ตั้งบนเครื่องเขย่า หมุนด้วยความเร็ว 200 rpm

เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ S_{90} กับ A_4 โดยการเขย่าที่ 60 rpm แล้ววัดปริมาณเอทธานอลทุก 12 ชั่วโมง ดังผลในตารางที่ 5 หน้า 46 ปรากฏ S_{90} เริ่มวัดปริมาณเอทธานอลได้ในชั่วโมงที่ 48 วัดได้ 0.15% และในชั่วโมงที่ 60 และ 72 วัดเอทธานอลได้เพิ่มเป็น 1.81% และ 3.0% ตามลำดับ โดยชั่วโมงที่ 60 จะมีเอทธานอลเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 48 ถึง 1.06% ในขณะที่ชั่วโมงที่ 72 จะมีเปอร์เซนต์เอทธานอลเพิ่มจากชั่วโมงที่ 60 เป็นจำนวน 1.19% ส่วนยีสต์สายพันธุ์ A_4 เริ่มวัดปริมาณเอทธานอลได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และวัดปริมาณเอทธานอลในชั่วโมงที่ 48 60 72 ได้ 3.0% 4.8% และ 5.6% ตามลำดับ โดยที่ชั่วโมงที่ 72 มีเปอร์เซนต์เอทธานอลมากกว่าชั่วโมงที่ 60 0.8% และชั่วโมงที่ 60 มีเปอร์เซนต์

เอทธานอลมากกว่าที่ชั่วโมงที่ 48 อยู่ 1.8% จากผลของการวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลที่อ่านได้นี้ พอจะสรุปได้ว่าเปอร์เซนต์เอทธานอลที่หมักโดยยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ ยังมีเปอร์เซนต์เอทธานอลสูงมากกว่านี้ได้อีก แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทธานอลที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 48 60 และ 72 แล้ว จะเห็นได้ว่าปริมาณที่เพิ่มขึ้นไม่ต่างกันมาก ฉะนั้นช่วงเวลาที่ควรเก็บผลได้คือช่วงเวลาที่ผ่านการหมักไปแล้วไม่ต่ำกว่า 60 ชั่วโมง

ในการทดลองช่วงนี้ ดังผลในตารางที่ 5 หน้า 46 จะเห็นว่าเปอร์เซนต์เอทธานอลที่วัดได้ปริมาณต่ำกว่าช่วงของการหาเปอร์เซนต์เอทธานอลขณะคัดเลือกสายพันธุ์ อาจเป็นไปได้ว่า ในช่วงนี้ใช้จำนวนรอบของการหมุนเพียง 60 rpm ซึ่งจำนวนรอบการหมุนน้อยไม่น่าจะมีผลต่อการหมักแล้ว เพราะช่วงการหมักอาจเป็นช่วงที่ต้องการออกซิเจนน้อย การหมุนของเครื่องเขย่าอาจเพียงเพื่อให้อาหารคลุกเคล้าได้สม่ำเสมอ แต่เมื่อให้ผลเช่นนี้ น่าจะเป็นไปได้ว่าออกซิเจนมีส่วนช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อการหมุนของเครื่องเขย่าไปช่วยเพิ่มออกซิเจนทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ขึ้นอีก เซลล์ยีสต์ตัวใหม่ที่เพิ่มนี้ จะหมักเอทธานอลได้ด้วยโดยที่ปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นไม่ได้ไปห้ามปฏิกริยาการหมัก (White and Munns, 1951)

ผลการทดลองขั้นต่อไป ดังสรุปผลในตารางที่ 6 หน้า 47 เมื่อเพิ่มจำนวนรอบของการหมุนเป็น 80 rpm ปรากฏว่าจำนวนรอบการหมุนเพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซนต์เอทธานอลเพิ่มขึ้น สามารถวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ในชั่วโมงที่ 12 ได้ 6.47% และ 2.24% เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ S_{90} กับ A_4 ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 72 สามารถวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ถึง 9.4% ในยีสต์สายพันธุ์ S_{90} ซึ่งมากกว่าเปอร์เซนต์เอทธานอลที่เมื่อหมุนด้วยจำนวนรอบ 60 rpm ถึง 6.4% สำหรับยีสต์สายพันธุ์ A_4 วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 6.43% เพิ่มจากเมื่อหมุนด้วยจำนวนรอบ 60 rpm 0.83% จากผลการเปรียบเทียบนี้อาจสรุปว่าการหมุนเร็วขึ้นเท่ากับเพิ่มอากาศมากขึ้น มีส่วนช่วยให้ยีสต์ที่แข็งแรงเพิ่มจำนวนขึ้น จึงเพิ่มเปอร์เซนต์เอทธานอลด้วย ซึ่ง Rankine (1955) ได้ศึกษาการหมักน้ำองุ่นสรุปได้ว่า ถ้าเพิ่มน้ำตาลในน้ำองุ่นและเพิ่มอากาศด้วย จะทำให้ยีสต์เพิ่มปริมาณขึ้นและได้เปอร์เซนต์เอทธานอลเพิ่มขึ้นด้วย

เมื่อเปรียบเทียบผลในตารางที่ 5, 6, 7 และรูปที่ 6 เพื่อศึกษาสารอาหารบางตัวอาจถูกทำลายด้วยความร้อนและความดันและรอบของการเขย่า จะเห็นความแตกต่างในระหว่างการหมักน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยการหมักน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เปอร์เซนต์เอทธานอลจะต่ำกว่าเมื่อหมักด้วยน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งให้ผลเหมือนกันทั้งยีสต์สายพันธุ์ S_{90} กับ A_4 โดยในชั่วโมงที่ 72 วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 7.05% และ 6.2% ซึ่งเปอร์เซนต์เอทธานอลที่วัดได้ต่ำกว่าเมื่อหมักในน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2.35% และ 0.23% ในฟลาสที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ S_{90} กับ A_4 ตามลำดับ

การที่ใช้น้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมาหมักจะได้เปอร์เซนต์เอทธานอลต่ำลง ทั้งนี้เพราะในน้ำอ้อยมีจุลินทรีย์อื่นปนอยู่ ซึ่งมักพบจุลินทรีย์ต่าง ๆ ปะปนในน้ำผลไม้ เช่น ในน้ำอ้อย น้ำตาลเมา น้ำองุ่น (Shehata, 1960; Faparusi, 1974; Rankine, 1955) จุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่จะไปใช้น้ำตาลที่มีอยู่ซึ่งมีผลให้เปอร์เซนต์เอทธานอลต่ำลงได้ (Mehta, 1964) นอกจากนั้นจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ให้ผลในการหมักเอทธานอลยังอาจใช้น้ำตาลที่มีอยู่และเอทธานอลที่ได้จากการหมักไปในการเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ ด้วย (Rose, 1976)

แต่ผลการทดลองผลิตเอทธานอลซึ่งรายงานโดย นิคม ติปะวาโร (2523) ในถังหมักมีการให้อากาศ ใช้น้ำสับปะรดผสมกับน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ เปรียบเทียบเมื่อใช้สารอาหารและอาหารเสริมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121 °ซ. เวลา 5 นาที ฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ที่ 70 °ซ. เวลา 10 นาที และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อใด ๆ ได้ผลว่าสารอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อใด ๆ ให้ผลผลิตเอทธานอลดีที่สุด คือ 11.28% ในเวลา 22 ชั่วโมง ในขณะที่สารอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 212 °ซ. นาน 5 นาที และผ่านการฆ่าเชื้อโดยพาสเจอร์ไรซ์ ให้เอทธานอล 10.65% และ 10.40% ตามลำดับ

สรุปผลจากตารางที่ 5, 6, 7 และรูปที่ 6 ได้ว่า ถ้าภาวะอื่น ๆ เหมือนกัน เปรียบเทียบระหว่างจำนวนรอบการหมุน 80 rpm เปอร์เซนต์เอทธานอลจะสูงกว่าที่จำนวนรอบการหมุน 60 rpm (เปรียบเทียบผลตารางที่ 5 และ 6) ถ้าเปรียบเทียบระหว่างน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ผลที่สรุปในตารางที่ 6 และ 7) น้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อและมีการเขย่า (เพิ่มอากาศ) จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่า

6. การศึกษาสภาพความเป็นกรดที่เหมาะสม ตามผลสรุปในรูปที่ 7 หน้า 52 ได้ผลว่ายีสต์สายพันธุ์ S_{90} จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงที่ pH 4.5 และในสภาพอาหารที่มี pH เพิ่มขึ้น จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลลดลงกว่าที่เป็นกรดมาก ๆ ดังผลการทดลองในรูปที่ 7 ส่วนยีสต์สายพันธุ์ A_4 จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงที่ pH 4 คือได้ 9.87% และให้ผลตรงข้ามกับ S_{90} คือที่สภาพเป็นกรดมาก ๆ ที่ pH 3.5 ให้เปอร์เซนต์เอทธานอล 8.5% ซึ่งให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงใกล้เคียงกับ pH 4.5 และเมื่อสภาพอาหารที่เป็นด่างเพิ่มขึ้น คือ ที่ pH 5.5 กลับมีเปอร์เซนต์เอทธานอลต่ำสุด คือ 4.45% ปกติ pH ที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ก็ย่อมแตกต่างกันไป (Rose and Harrison, 1971; Prescott and Dunn, 1959) Abbott และคณะ (1973) มีความเห็นว่า optimal pH คือ ระดับ pH ที่มีการเจริญสูงสุด แต่ Eroshin และคณะ (1976) กล่าวว่าไม่มีหลักฐานยืนยันว่าที่ optimal pH หรือ optimal temperature จะทำให้ผลผลิตสูงสุดด้วย แต่ในการทดลองนี้ ที่ optimal pH ของ A_4 = 4 และ optimal pH ของ S_{90} = 4.5 นั้น เป็น optimal pH ที่วัดการให้ผลผลิต (เปอร์เซนต์เอทธานอล) สูงสุด ไม่ใช่เป็นการวัดการเจริญสูงสุด

ในรูปที่ 8 หน้า 53 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มไปในน้ำอ้อยเพื่อเป็นอาหารเสริมแก่ยีสต์เพื่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์มีผลต่อเนื่องไปถึงการผลิตเอทธานอล จากผลการทดลองการหมักเอทธานอล โดยเพิ่มอาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำอ้อย พบว่าเปอร์เซนต์เอทธานอลที่ได้ไม่ว่าจะหมักโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ S_{90} หรือ A_4 ปริมาณ

เอทธานอลไม่ต่างกันมาก แต่ในขณะเดียวกันที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอลโดยยีสต์สายพันธุ์ S_{90} กับ A_4 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มไปในอาหารนั้น ก็คือการเพิ่มสารไนโตรเจนนั่นเอง และปริมาณที่ควรเพิ่มไปในวัตถุดิบต่างชนิดกันและให้แก่ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ย่อมแตกต่างกันไป (Prescott and Dunn, 1959) เช่นผลการทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของไนโตรเจนในการศึกษายีสต์สำหรับทำขนมปัง ตามรายงานของ ฉันทนา· นันทพงษ์ (2522) พบว่าปริมาณที่เหมาะสมคือ 30 มก./กรัม หรือเทียบเท่า 0.3 กรัม/ลิตร

อาหารเสริมยีสต์เอกซ์แทรก ที่เพิ่มไปในน้ำอ้อยในปริมาณ 0.2, 0.4, 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร ให้ผลดังแสดงในรูปที่ 9 หน้า 54 คือ S_{90} กับ A_4 จะหมักแอลกอฮอลได้ปริมาณสูงเมื่อเพิ่มอาหารเสริมยีสต์เอกซ์แทรกเพียง 0.2 กรัม/ลิตร แต่ที่ปริมาณอื่น ๆ ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์สามารถหมักแอลกอฮอลได้ไม่ต่างกันมาก แสดงว่าปริมาณอาหารยีสต์เอกซ์แทรกดูเหมือนว่าไม่มีผลต่อการสร้างเอทธานอล ซึ่งสนับสนุนโดย Kiuchi และคณะ (1975) ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์ Saccharomyces ในน้ำต้มถั่ว ก็พบว่ายีสต์เอกซ์แทรกหรือวิตามิน ไม่มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของยีสต์ และสภาพอาหารที่เหมาะสมและเพียงพอในช่วงเวลาของการเพิ่มจำนวนเซลล์ (propagation) เป็นช่วงที่สำคัญมาก ถ้าอาหารไม่พอเหมาะ จะทำให้ได้ผลผลิตต่ำ และอัตราการหมักเกิดขึ้นช้า

7. ผลการปิดจุกฟลาสด้วยวัสดุต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 10 หน้า 56 เพื่อศึกษาผลของอากาศต่อการเกิดเปอร์เซนต์เอทธานอล ปรากฏว่ายีสต์สายพันธุ์ S_{90} และ A_4 ให้ผลเหมือนกันคือ เมื่อปิดจุกฟลาสด้วยสำลีหุ้มฟอล์ยได้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่า เมื่อปิดจุกด้วยสำลี ฟอล์ย หรือพาราฟิล์มอย่างใดอย่างหนึ่ง

เมื่อหุ้มจุกฟลาสด้วยพาราฟิล์ม วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ต่ำ ต่างจากการปิดจุกฟลาสด้วยวัสดุอื่นอย่างเห็นได้ชัด อาจเกิดจากเหตุผลสองอย่างคือ อากาศไม่พอ คือปิดจุกด้วยพาราฟิล์มจะแน่นกว่าปิดด้วยวัสดุอื่น ๆ ทำให้อากาศซึมเข้าออกไม่ได้ แม้ว่า

จะใช้จำนวนรอบในการหมุนถึง 100 rpm และอีกกรณีหนึ่งคือ เมื่อการหมักเกิดขึ้นในช่วงแรกของระยะเวลาหมัก ซึ่งยังมีปริมาณอากาศ (O_2) เริ่มต้นเท่า ๆ กับฟลาสอื่น ขณะเริ่มการทดลองปฏิกิริยาการหมักเอทธานอลดำเนินไปได้ตามปกติ แต่ในช่วงหลังของการหมัก เนื่องจากปิดจุกฟลาสแน่น อากาศผ่านเข้าฟลาสไม่ได้ ขณะเดียวกันคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น ก็ไปจำกัดการเจริญของยีสต์ ทำให้สร้างเอทธานอลได้น้อยลงไปอีก (White and Munns, 1951) และยิ่งเป็นการยืนยันได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 6 – 1 หน้า 50 แสดงการเกิดเอทธานอลมีความสัมพันธ์กับการเจริญด้วย

8. จากการศึกษาจำนวนรอบการหมุนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์/มล. ในรูปที่ 11 หน้า 57 จะเห็นว่าเมื่อจำนวนรอบการหมุนเพิ่มขึ้น ยีสต์ A_4 จะวัดค่า OD และนับจำนวนเซลล์/มล. เพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่ยีสต์ S_{90} จำนวนรอบการหมุนที่ 90 และ 150 rpm ค่า OD และจำนวนเซลล์/มล.เพิ่มขึ้น แต่ถ้าจำนวนรอบการหมุนมากกว่า 150 rpm ขึ้นไป ค่า OD และจำนวนเซลล์ไม่ได้เพิ่มขึ้นตาม และเมื่อพิจารณาผลของจำนวนรอบการหมุนต่อการเกิดเอทธานอลในรูปที่ 12 หน้า 58 เพื่อพิจารณาควบคู่กับจำนวนเซลล์ที่นับได้ดังผลในรูปที่ 11 หน้า 57 แล้วจะเห็นว่ายีสต์ S_{90} เมื่อมีจำนวนเซลล์มาก ปริมาณเอทธานอลก็เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 6 – 1 โดยที่การเพิ่มจำนวนเซลล์กับการสร้างแอลกอฮอล มีความสัมพันธ์กันแบบ primary metabolite, และจำนวนรอบการหมุน 150 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ 9 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนความเร็วเป็น 100 rpm ในช่วงของการหมัก จะเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับยีสต์ S_{90} สำหรับยีสต์ A_4 การเพิ่มจำนวนเซลล์กับการเพิ่มปริมาณเอทธานอลมีความสัมพันธ์กันดีเมื่อให้มีการหมุนในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ 200 rpm แล้วเปลี่ยนความเร็วเป็น 80 rpm ในช่วงของการหมัก แต่ถ้าให้หมุน 200 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วเปลี่ยนความเร็วเป็น 100 rpm ในช่วงการหมักกลับได้เปอร์เซนต์ลดต่ำลงมาก อาจเป็นไปได้ว่า การหมุน 200 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์มีปริมาณเซลล์มากอยู่แล้ว เมื่อหมุนต่ออีก 100 rpm ยิ่งทำให้เซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นอีก

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าจำนวนเซลล์เพิ่มมากไป ปริมาณอาหารไม่พอที่จะใช้ในการสร้างเอทธานอล ซึ่ง Aiba และคณะ (1965) ได้กล่าวว่า จำนวนเซลล์สูงสุดไม่จำเป็นว่าต้องให้ผลิตภัณฑ์อย่างอื่นสูงสุดด้วย Mehta และ Kharna (1964) ก็ได้กล่าวว่าถ้าอาหารไม่พอจะทำให้ยีสต์ไม่มีการสร้างเซลล์ ไม่สร้างแอลกอฮอลแต่ยังจะไปสร้างผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ (by product) อย่างอื่นแทน Hixon และ Gaden (1950) ได้ยกตัวอย่างเกี่ยวกับการผลิตยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินว่าจะให้ผลมากที่สุดเมื่อเซลล์มีการหายใจน้อย แต่ขณะที่เซลล์มีการหายใจสูงสุดจะไม่พบว่ามีสเตรปโตมัยซินเกิดขึ้นเลย การเกิดยาปฏิชีวนะเป็นการสร้างแบบ secondary metabolite คือสร้างหลังจากมีการเจริญ (growth) เต็มที่ ซึ่งไม่เหมือนกับการเกิดเอทธานอลที่เกิดขึ้นพร้อมกับมีการเจริญเติบโตของเซลล์ (primary metabolite) ดังแสดงในรูปที่ 6 – 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอากาศมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิดเอทธานอล

กล่าวโดยสรุปจากผลที่แสดงในรูป 11, 12 ได้ว่า จำนวนรอบการหมุนเพิ่มขึ้นมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์ แต่ต้องขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ยีสต์ คือ ยีสต์สายพันธุ์ S_{90} จำนวนรอบการหมุน 150 rpm จะเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่าที่จำนวนรอบการหมุน 90 200 250 rpm แต่ยีสต์ A_4 ปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มตามความเร็วจำนวนรอบการหมุน และการเพิ่มจำนวนเซลล์กับการสร้างแอลกอฮอลมีความสัมพันธ์แบบ primary metabolite และช่วงการหมุนที่เหมาะที่จะเกิดเซลล์และแอลกอฮอลได้ดี คือ ช่วงการหมุน 150 rpm ในช่วงที่เพิ่มจำนวนเซลล์ กับ 100 rpm ในช่วงการหมัก สำหรับยีสต์ S_{90} ให้เอทธานอล 10.08% ส่วนยีสต์ A_4 ใช้ช่วงการหมุน 200 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ ต่อด้วย 80 rpm ในช่วงการหมัก จะได้เอทธานอล 9.57%

9. การหาปริมาณของเชื้อที่ใส่ (inoculum size) ที่เหมาะสม ผลการศึกษาปริมาณเชื้อที่ใส่เพื่อการสร้างเอทธานอลได้ว่า ยีสต์ S_{90} เมื่อเพิ่ม inoculum size ปริมาณเอทธานอลจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่ง Nagodawthana (1974)

ก็มีรายงานว่าปริมาณเชื้อมากจะหมักให้ปริมาณเอทธานอลเพิ่มมากขึ้นด้วย และยีสต์ A_4 ที่ inoculum size เพิ่มจาก 3% 5% และ 10% จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลเพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นกัน แต่เมื่อเพิ่ม inoculum size เป็น 20% กลับให้เอทธานอลต่ำกว่าที่ inoculum size 10% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณเชื้อหนาแน่นเกินไป อาหารไม่เพียงพอที่จะไปใช้สร้างเซลล์และเอทธานอล (Mehta and Khanna, 1964)

10. ผลการศึกษาความสำคัญการหมุนกับปริมาณเชื้อที่ใส่ (inoculum size) ตามรูปที่ 14 หน้า 61 จำนวนรอบการหมุน 150 rpm ในช่วงการเพิ่มจำนวนเซลล์และตอด้วยช่วงการหมักโดยหมุน 100 rpm จะมีเปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่าเมื่อไม่มีการหมุนในช่วงการหมักเลย และขณะเดียวกันถ้าไม่มีการหมุนในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยเปอร์เซนต์เอทธานอลยิ่งต่ำ ผลการทดลองนี้จะสนับสนุนผลในรูปที่ 12 ด้วย คือ จำนวนรอบการหมุนที่เหมาะสมหรือการให้อากาศในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์มีผลต่อผลิตผลเอทธานอลที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการหมักเอทธานอลจากน้ำอ้อยตามรายงานของ Rankine (1955) ว่า การเพิ่มอากาศในขณะหมักน้ำอ้อยจะได้เปอร์เซนต์เอทธานอลเพิ่มขึ้น White และ Munns (1951) ก็ได้กล่าวถึงการให้อากาศในขณะที่ให้เกิดการหมักด้วยยีสต์ว่า การให้อากาศมีผลต่อยีสต์ คือ ทำให้ยีสต์มีความสามารถพร้อมที่จะสร้างเอทธานอล ทำให้ปฏิกิริยาการหมักเกิดขึ้นได้สมบูรณ์ ขณะเดียวกันช่วยละลายและไล่ CO_2 ที่เกิดขึ้นในขณะเกิดการหมักด้วย เพราะ CO_2 จะมีผลไปจำกัดการเจริญและการหมักได้ และเมื่อไม่ให้มีการหมุนทั้งในช่วงการเพิ่มจำนวนเซลล์และช่วงการหมัก (propagation 0 rpm., Fermentation 0 rpm) ปริมาณเอทธานอลต่ำมาก โดยเฉพาะ A_4 ได้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Ueda และ Koba (1980) ว่า ถ้าให้อากาศโดยให้มีการหมุนบนเครื่องเขย่า พบว่าปริมาณเอทธานอลจะเพิ่มจาก 7% เป็น 11%

เมื่อพิจารณาเฉพาะช่วงที่มีการหมุนในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ 150 rpm ช่วงการหมัก 100 rpm. ดังผลในรูป 14 หน้า 61 จะเห็นว่ายีสต์ S_{90} ที่ 3% 5%, 10% 20% inoculum size ปริมาณเอทธานอลวัดได้เพิ่มขึ้นตามลำดับ ยีสต์ A_4 เมื่อปริมาณเชื้อ 3% 5% 10% ปริมาณเอทธานอลก็เพิ่มขึ้น แต่ที่ 20% inoculum size ปริมาณเอทธานอลลดลง ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการทดลองที่สรุปไว้ในรูปที่ 13 หน้า ขณะเดียวกันก็สนับสนุนผลของรูปที่ 11 ด้วย คือ ในรูปที่ 11 เมื่อวัดค่า OD ที่จำนวนรอบการหมุน 150 rpm จำนวนเซลล์/มล. ของยีสต์ A_4 อ่านที่ OD 5.7 หรือ 4.8×10^8 เซลล์/มล. ถ้าที่ 20% inoculum size จะมีจำนวนเซลล์ $20 \times 4.8 \times 10^8$ หรือ 9.6×10^9 เซลล์/มล. ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณเซลล์มากกว่าเมื่อให้ A_4 หมุน 250 rpm (ผลในรูปที่ 11) ซึ่งนับจำนวนเซลได้ 6.1×10^8 เซลล์/มล. และที่ A_4 จำนวน 6.1×10^8 เซลล์/มล. นี้ เมื่อต่อการหมุนที่ 100 rpm ก็ยังได้เปอร์เซนต์เอทธานอลต่ำ เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์มากเกินไป (ในรูปที่ 12) ดังนั้นจำนวนเซลล์ของ A_4 ที่ใช้ในการทดลองและให้ผลในรูปที่ 14 นี้ ซึ่งมีจำนวนเซลล์ 9.6×10^9 เซลล์/มล. ยิ่งมีความหนาแน่นของจำนวนเซลล์มากขึ้น ปริมาณเอทธานอลที่ได้ต่ำ จะเห็นได้ว่าผลการทดลองในรูป 11 12 13 และ 14 มีผลสอดคล้องกัน

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. การคัดเชื้อยีสต์จากผลตาลแต่ละตัวอย่าง พบยีสต์ที่พบเป็นจำนวนมาก (dominant species) ที่เป็นสายพันธุ์เด่นอยู่ 2 สายพันธุ์ ที่เป็นลักษณะเด่นในแต่ละตัวอย่าง มีลักษณะที่แตกต่างกันเห็นได้ชัด คือ ลักษณะโคโลนี และขนาดเซลล์ ยีสต์ที่มีโคโลนีสีขาวครีม ฟ่าม ๆ เซลล์จะมีขนาดใหญ่ (3.6 – 4.6) x (4.6 – 7.9) μ และโคโลนีสีขาวครีมเป็นมันจะมีขนาดเซลล์เล็ก (2.4 – 3.6) x (4.0 – 4.6) μ เชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเชือกและใช้ในการทดลอง คือ A_4 จำแนกชนิดได้เป็น <u>Saccharomyces microellipsodes</u>.

2. ค่าอินเวิร์ทชูการ์ในน้ำอ้อยซึ่งมีค่าประมาณ 20 – 22 กรัม% เมื่อนำมาใช้เป็น C-source เพื่อการหมักเอทธานอล ได้ค่าเอทธานอลสูงสุดถึง 12% ในขณะที่กากน้ำตาลที่เจือจางไว้ใช้ในการหมักเอทธานอลมีปริมาณอินเวิร์ทชูการ์ 54 กรัม% ก็สามารถหมักเอทธานอลได้เพียง 9 – 11% ดังนั้นน้ำอ้อยมีทางที่จะเป็น C-source ในการสร้างเอทธานอลโดยไม่ต้องเติม C-source อื่นเลย

3. ผลการศึกษาการหมักน้ำอ้อยในที่อุณหภูมิสูง (ในรูปที่ 3) พบว่าถ้าให้ยีสต์มีการปรับตัวก่อนที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนจะเพิ่มอุณหภูมิสูง จะให้ปริมาณเอทธานอลสูงกว่าเมื่อให้หมักในที่อุณหภูมิสูง 40 °ซ. ตลอดเวลา

4. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์กับปริมาณเอทธานอลที่เกิดจากการหมักน้ำอ้อย จะได้ว่าจำนวนเซลล์เพิ่มพร้อม ๆ กับการสร้างเอทธานอล การสร้างผลผลิตพร้อม ๆ กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แสดงว่าการเกิดเอทธานอลเป็นแบบ primary metabolite

5. การศึกษาสภาพอาหารที่เหมาะต่อการสร้างเอทธานอลได้ผลดังนี้ คือ pH มีผลต่อการสร้างเอทธานอลโดยตรง จะเห็นได้ว่าแต่ละสายพันธุ์ของยีสต์จะมีระยะของ pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอทธานอลเฉพาะตัว ยีสต์สายพันธุ์ S_{90} มี optimal pH ที่ 4.5 สามารถสร้างเอทธานอลได้ 8.9% และที่ pH 3.5 จะสร้างได้เพียง 4.3%

ยีสต์ A_4 มี optimal pH ที่ 4.0 และสร้างเอทธานอลต่ำสุดที่ pH 5.5 สร้างได้ 4.45% จะเห็นข้อแตกต่างได้ว่า ที่สภาพ pH ต่างกันมีผลต่อการสร้างเอทธานอล S_{90} สร้างเอทธานอลได้ต่ำเมื่อสภาพอาหารเป็นกรดมาก ๆ แต่ A_4 สร้างเอทธานอลต่ำเมื่อ pH สูงขึ้น ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการสร้างเอทธานอล แอมโมเนียมซัลเฟต มีผลต่อการสร้างเอทธานอลของยีสต์สายพันธุ์ S_{90} คือ S_{90} จะสร้างเอทธานอลได้ดีที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร โดยสร้างได้ 8.41% ขณะที่ถ้าเพิ่มแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 กรัม/ลิตร S_{90} จะสร้างได้เพียง 6.58% แต่ยีสต์ A_4 สามารถสร้างเอทธานอลได้ปริมาณใกล้เคียงกัน คือที่แอมโมเนียม–

ซัลเฟต 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร A_4 สามารถให้เอทธานอล 9.54%, 9.68% 9.49% และ 9.41% ตามลำดับ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของยีสต์ A_4 ที่สามารถใช้อาหารส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำอ้อยไปเป็นเอทธานอล ยีสต์เอกซ์แทรกดูเหมือนว่ามีผลน้อยต่อการสร้างเอทธานอลของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ ปริมาณอาหารเสริมยีสต์เอกซ์แทรกที่เพิ่มไปจำนวน 0.2, 0.4, 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร ไม่สามารถบอกความแตกต่างเป็นนัยสำคัญได้ของปริมาณเอทธานอลที่สร้างขึ้น

6. การเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์เมื่อให้อากาศโดยการหมุนบนเครื่องเขย่าด้วยจำนวนรอบต่าง ๆ กัน พบว่าการเพิ่มอากาศโดยการหมุนถึง 150 rpm กับการเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์จะมีความสัมพันธ์กัน ยิ่งเพิ่มอากาศมาก จำนวนเซลล์ยิ่งมาก ซึ่งมีผลต่อยีสต์ A_4 มีการเพิ่มปริมาณเซลล์ขึ้นมาก สัมพันธ์กับจำนวนรอบเป็นสัดส่วนกัน แต่สายพันธุ์ S_{90} นั้น เมื่อเพิ่มอากาศในช่วง 90 ถึง 150 rpm จะมีผลต่อการเพิ่มเซลล์ แต่เมื่อเลย 200 rpm จะทำให้จำนวนเซลล์ลดลง

7. ผลจากการลองใช้วัสดุต่างชนิดกันในการปิดจุกฟลาสขณะหมักเอทธานอล โดยให้มีการหมุนบนเครื่องเขย่า พบว่าการปิดจุกด้วยพาราฟิล์มจะให้เอทธานอลต่ำสุด การปิดจุกฟลาสด้วยพาราฟิล์มจะแน่นกว่าใช้วัสดุอื่น ๆ โอกาสที่อากาศจะผ่านจึงน้อยและแสดงให้เห็นว่าขณะมีการหมักนั้นยีสต์ต้องการ O_2 ในอากาศ และขบวนการ glycolysis (aerobic respiration) จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับ fermentation

8. การศึกษาผลของจำนวนรอบการเขย่าต่อการเกิดเอทธานอลได้ผลว่า ยีสต์ S_{90} จะให้เอทธานอลสูง ถ้าเขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง และเปลี่ยนหมุน 100 rpm ในช่วงของการหมัก คือ ได้ 10.08% ส่วนยีสต์ A_4 จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงเมื่อให้เขย่า 200 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ 9 ชั่วโมง และเปลี่ยนความเร็วเป็น 80 rpm ในช่วงของการหมัก และปริมาณสูงสุดที่วัดได้ คือ 9.57% แต่อย่างไรก็ตาม การเกิดเอทธานอลที่ช่วงที่มีการหมุน 90 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง และเปลี่ยนมาเป็น 60 80 100 rpm การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทธานอลที่สร้างไม่แสดงความแตกต่างเป็นนัยสำคัญทั้งสายพันธุ์ A_4 และ S_{90}

9. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อที่ใส่ (inoculum size) ต่อปริมาณของอาหาร กับการสร้างเอทธานอล พบว่ายีสต์สายพันธุ์ S_{90} ถ้าปริมาณเชื้อสูง 3% 5% 10% และ 20% จะสร้างเอทธานอลได้มากขึ้น 9.48% 9.69% 10.28% และ 10.74% ตามลำดับ แต่สำหรับยีสต์ A_4 ปริมาณเชื้อที่เหมาะคือ 10% ของอาหารเหลวจะได้เอทธานอลสูงสุด ดังนั้นสายพันธุ์จึงมีความสำคัญต่อปริมาณเชื้อที่ใส่ต่อปริมาณของอาหารหมัก

10. การเพิ่มอากาศมีผลต่อการสร้างเอทธานอล ดังจะเห็นได้ตามผลในรูปที่ 14 คือ ถ้ามีการหมุนในช่วงการเพิ่มจำนวนเซลล์ 150 rpm และให้มีการหมุน 100 rpm ในช่วงการหมักสายพันธุ์ S_{90} และ A_4 สามารถให้เอทธานอลได้สูงกว่า ในกรณีที่มีการหมุนเฉพาะในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์เพียงอย่างเดียว และเมื่อไม่มีการหมุนทั้งช่วงแบ่งเซลล์ และการหมัก จะได้เปอร์เซนต์ต่ำสุด ดังนั้นการเขย่าจึงมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และในช่วงการหมัก ถ้าศึกษาหาเวลาการเขย่าและจำนวนรอบการหมุน ในช่วงการแบ่งเซลล์แล้ว หาช่วงเวลาการเขย่าและรอบการหมุนในช่วงทั้งสองช่วงให้มีความเหมาะสมจะช่วยในการที่มีปริมาณเอทธานอลได้สูงตามต้องการ

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. จากการที่แยกเชื้อยีสต์ได้เพียง 2 สายพันธุ์ ที่มีลักษณะเด่นในแต่ละตัวอย่างของผลตาลน่าจะได้ศึกษาความสัมพันธ์ของยีสต์ 2 ชนิด ในแง่ของเชื้อผสม (mixed culture) ต่อการสร้างแอลกอฮอลและ CO_2 เพราะยีสต์ทั้ง 2 ชนิด อาจทำหน้าที่เสริมกันในขั้นตอนการหมัก คือ สายพันธุ์หนึ่งอาจสร้าง CO_2 ได้ดี และอีกสายพันธุ์หนึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนอะเซทตาลอีฮาย ไปเป็นเอทธานอล ในขบวนการของการหมัก (fermentation)

2. จากการที่พบว่า ถ้าให้ยีสต์มีการปรับตัวในที่อุณหภูมิต่ำก่อนเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงแล้ว จึงเปลี่ยนไปหมักในอุณหภูมิสูง ยีสต์จะให้เอทธานอลได้ดีกว่ากรณีที่ไม่มี

การปรับตัวก่อน คือ หมักในที่อุณหภูมิสูงตลอดระยะเวลาการหมัก ตามผลการทดลองในรูปที่ 3 อาจจะมีความสำคัญต่อโรงงานผลิตเอทธานอล คือให้มีการ cooling ในขณะเริ่มการหมักในช่วงต้นของระยะเวลาการหมัก เพื่อให้ยีสต์ได้ปรับตัว ต่อไปปล่อยให้หมักในที่อุณหภูมิสูงได้ ซึ่งจะเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่าย ที่ใช้ในการลดอุณหภูมิถังหมักตลอดเวลาการหมัก

3. จากผลการศึกษาจำนวนรอบการหมุนต่อการเกิดเอทธานอลได้ว่า เมื่อมีการหมุนในช่วงการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่างกัน 90 150 200 และ 250 rpm และต่อด้วยช่วงการหมักในการหมุนต่างกัน 60 80 และ 100 rpm จากผลสรุปทั้งหมดจะได้ว่า S_{90} ให้เอทธานอลสูงสุดที่จำนวนรอบการหมุน 150 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง และช่วงการหมัก 100 rpm และ A_4 ให้เอทธานอลสูงสุดที่ช่วงการหมุน 200 rpm ต่อด้วยช่วงการหมัก 80 rpm แต่ปริมาณเอทธานอลที่สร้างขึ้นที่ช่วงความเร็ว จำนวนรอบการหมุนต่างกันให้ผลไม่คงที่ ยกเว้นในช่วงการหมุน 90 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ ต่อด้วยช่วงการหมัก 60 80 และ 100 rpm ที่ S_{90} และ A_4 ให้ปริมาณเอทธานอลค่อนข้างเป็นระเบียบ ดังนั้นจึงควรศึกษาผลของจำนวนรอบของการเขย่าต่อการเกิดแอลกอฮอล์ให้ละเอียดว่าเมื่อให้สภาพของการหมุนดังกล่าวแล้วให้ปริมาณเอทธานอลสูงอยู่ตลอดไป และคุ้มกับการสิ้นเปลืองพลังงานในการหมุนหรือไม่

4. แม้ว่าในขณะนี้ต้นทุนการผลิตเอทธานอลจากอ้อยยังสูงอยู่ แต่จากเอกสารเรื่อง How to replace imported fuels with your own domestic energy resource เดือนมกราคม 1980 ของบริษัท NOVO มีข้อมูลที่น่าสนใจคือ การเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรท/เฮคตาร์ และปริมาณเอทธานอลที่ผลิตได้จากพืชต่าง ๆ ดังนี้

วัตถุดิบ	คาร์โบไฮเดรท ตัน/เฮคตาร์	เอทธานอล ลิตร/เฮคตาร์
มันสำปะหลัง	3 – 12	1800 – 7200
อ้อย	6 – 12	3600 – 7200
หัวบีท (Sugar beet)	5 – 7	3000 – 4200
ข้าวฟ่าง	2 – 7	1500 – 4400
ข้าวโพด	4	2400
มันฝรั่ง	7	4200

จากข้อมูลข้างต้น อ้อยเป็นพืชที่สามารถนำมาผลิตเอทธานอลได้ปริมาณสูง แม้ว่า McCann และ Prince (1978) ได้รายงานว่า มันสำปะหลังและหัวบีท มีราคาถูกกว่าอ้อย มีแนวโน้มที่จะใช้ทำแอลกอฮอลมากกว่าอ้อยก็ตาม แต่อ้อยหรือผลิตภัณฑ์จากอ้อย สามารถนำมาผลิตเอทธานอลได้ดี จึงควรที่จะได้รับการส่งเสริมการวิจัยในเรื่องนี้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย