บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดยเชื้อ *Acrophialophora sp.* และ *C. brassicae* ที่ใช้เส้นใยป่านศรนารายณ์เป็นวัสดุหมัก โดยทำการศึกษา ปริมาณเอนไซม์ ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และการเติมอาหารเสริม จากการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์ทั้ง 4 ระดับ มีผลต่อการผลิตเอทธานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปริมาณเอนไซม์ 25 เท่า (75 มล.) คำนวณจากจำนวนกรัมน้ำหนักแห้งของวัสดุหมักให้ผลผลิตเอทธานอลได้สูงสุด ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้เป็นน้ำตาลมากขึ้น และยีสต์สามารถใช้น้ำตาล ผลิตเป็นเอทธานอลได้เพิ่มขึ้น (Wright et al., 1988) และสอดคล้องกับการทดลองของ Blotkamp และคณะ (1981) ที่ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในกระบวนการ SSF โดยใช้เอนไซม์จาก *Trichoderma reesei* และยีสต์ *Candida brassicae* พบว่าที่ปริมาณเอนไซม์ 70 %(v/v) จะให้ผลผลิตเอทธานอลได้สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ 25 เท่า หรือ 75 มิลลิลิตร ในการศึกษาความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นต่อไป

จากการศึกษาความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น พบว่าความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นทั้ง 4 ระดับ มีผลต่อการผลิตเอทธานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. ให้ผลผลิตเอทธานอลสูงสุด 0.6793 กรัม/100มล. ภายในเวลา 24 ชั่วโมงของการหมัก ขณะที่ความเข้มข้นยีสต์ 10^{8} เซลล์/มล. และ 10^{9} เซลล์/มล. ผลิตเอทธานอลได้ 0.6342 กรัม/100 มล. และ 0.5833 กรัม/100 มล. ตามลำดับ ภายในเวลา 48 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลผลิตสูงสุดของแต่ละความเข้มข้น จึงทำให้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Blotkamp และคณะ (1981) ที่

ศึกษาความเข้มข้นยีสต์ที่เหมาะสมในกระบวนการ SSF พบว่า ความเข้มข้นยีสต์ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการผลิตเอทธานอลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ที่ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. สามารถผลิตเอทธานอลได้สูงสุด ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่าที่ความเข้มข้น 10^{8} เซลล์/มล. และ 10^{9} เซลล์/มล. ที่สามารถผลิตเอทธานอลได้สูงสุดภายในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งถ้าคิดในแง่เศรษฐกิจของทางอุตสาหกรรมการได้ผลผลิตสูงสุดภายในเวลาอันสั้นย่อมคุ้มทุนกว่าการใช้ระยะเวลานานในการผลิต ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. ในการศึกษาความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อไป

จากการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น พบว่าค่า pH เริ่มต้นทั้ง 5 ระดับ มีผลต่อการผลิตเอทธานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ pH 5.0 ให้ผลผลิตเอทธานอลสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Blotkamp และคณะ (1981) ที่ใช้ pH 5.0 ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการ SSF Palnitkar และ Lachke (1990) ศึกษาการใช้วัสดุทางการเกษตรในกระบวนการ SSF โดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* และ *C. shehatae* ซึ่งใช้ pH 5.0 ในการทดลองเช่นกัน ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสจะมี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 4.5-5.5 (Durand, Soucaille and Tiraby 1984; Singh et al., 1990) และในกระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมปรับให้ค่า pH อยู่ในช่วง 4.0-4.5 เนื่องจากยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่เป็นกรด (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) จากผลการทดลองการปรับค่า pH เริ่มต้นเป็น 5.0 สามารถให้ผลผลิตเอทธานอลสูงสุดดังนั้นจึงเลือกใช้ pH 5.0 ในการศึกษาอุณหภูมิในการหมักต่อไป

จากการศึกษาอุณหภูมิในการหมักพบว่าอุณหภูมิทั้ง 4 ระดับ มีผลต่อการผลิตเอทธานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยที่อุณหภูมิ 45^{o}ซ สามารถให้ผลผลิตเอทธานอลได้สูงสุด Wright และคณะ (1988) รายงานว่า activity ของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นประมาณ 8 เปอร์เซนต์ต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 1^{o}ซ และพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องจาก 37^{o}ซ เป็น 43^{o}ซ

จะทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 60 เปอร์เซนต์ โดยใช้ยีสต์ที่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ เช่น *C. brassicae* *C. lusitaniae* และ *S.uvarum* Spindler และคณะ (1988) ศึกษาการใช้ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงในกระบวนการ SSF พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น *C. brassicae* สามารถให้ผลผลิตได้สูงถึง 82 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 45°ซ และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 47°ซ โดยที่ความสามารถในการหมักลดลงเหลือเพียง 66.5 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจะอยู่ในช่วง 45-50°ซ (Mandels et al, 1976) ซึ่งจากผลการทดลอง ที่อุณหภูมิ 45°ซ จะสามารถให้ผลผลิตได้สูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น อาจเนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ทำให้ได้ปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้น และยังเป็นอุณหภูมิที่ยีสต์ *C. brassicae* สามารถทนได้ และใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 45°ซ ในการศึกษาการเติมอาหารเสริมต่อไป

การเติมอาหารเสริม 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า มีผลต่อการผลิตเอทธานอล แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่การเติม casein peptone type S ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ สามารถให้ผลผลิตได้สูงสุดคือ 1.267 กรัม/100 มล. และการเติม soy peptone ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซนต์ ให้ผลผลิตรองลงมาคือ 0.9301 กรัม/100มล. ซึ่งที่ความเข้มข้นอื่นให้ผลผลิตใกล้เคียงกับวัสดุหมักที่ไม่มีการเติมอาหารเสริม เมื่อพิจารณาองค์ประกอบอาหารเสริมทั้ง 2 ชนิดพบว่า casein peptone type S มี thiamine เป็นองค์ประกอบ 0.04 เปอร์เซนต์ (Rohde, 1973) และพบว่า thiamine เป็น co-enzyme ที่สำคัญต่อเอนไซม์ pyruvate decarboxylase ซึ่งจะไปมีผลช่วยให้มีการผลิตเอทธานอลได้สูงขึ้น (Voet D. and Voet J.G.,1990) ขณะที่ soy peptone พบว่ามี Zn เป็นองค์ประกอบ 0.005 เปอร์เซนต์ (Archer Daniels Midland Company) ซึ่งพบว่า Zn เป็น activator ที่สำคัญของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (Voet D. and Voet J.G., 1990) ซึ่งการเติม casein peptone ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ จะให้ผลผลิตดีกว่าการเติม

soy peptone อาจเนื่องจาก thiamine ที่อยู่ในองค์ประกอบของ casein มีปริมาณมาก และมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์มากกว่า Zn จึงทำให้สามารถผลิตเอทธานอลได้สูงกว่าวัสดุที่ไม่มีการเติมอาหารเสริม

การผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันเป็นแนวความคิดที่จะพัฒนาการผลิตเอทธานอล โดยลดขั้นตอนต่าง ๆ ให้มารวมอยู่ในถังหมักเดียวกัน โดยอาศัยหลักการ คือ ให้เชื้อราผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แล้วยีสต์จึงทำการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้ไปเป็นเอทธานอลต่อไป จากผลการศึกษาอายุเริ่มต้นของเชื้อราที่เหมาะสมในการเติมยีสต์ พบว่า อายุเชื้อราเริ่มต้นที่ 6 วัน 9 วัน และ 12 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อผลการผลิตเอทธานอล และจากการศึกษาของ พรเทพ และคณะ (2538) พบว่าเชื้อราอายุ 6 วัน มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในระยะ log phase ถึงแม้ว่าเชื้อราที่อายุ 12 วัน จะมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มี activity สูงกว่าก็ตาม แต่เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงร่วมกับยีสต์ พบว่าให้ผลผลิตเอทธานอลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อราที่มีอายุ 6 วันในการศึกษาความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นต่อไป

การศึกษาความเข้มข้นยีสต์ในการผลิตเอทธานอลแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน โดยใช้เชื้อราที่มีอายุ 6 วัน พบว่า ความเข้มข้นยีสต์ทั้ง 4 ระดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อผลการผลิตเอทธานอล อาจเนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็น limiting factor ที่สำคัญในกระบวนการหมัก โดยจะเกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อราผลิตออกมาได้ ซึ่งเชื้อราที่ใช้ในการทดลองมีอายุเพียง 6 วัน จึงสามารถผลิตเอนไซม์ได้ activity ที่ต่ำกว่าการผลิตเอนไซม์ที่ใช้เวลา 15 วัน ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นมีอยู่ในปริมาณที่จำกัด จึงทำให้การเพิ่มความเข้มข้นยีสต์ไม่มีผลต่อการผลิตเอทธานอล แต่ที่ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. สามารถให้ผลผลิตได้สูงกว่าความเข้มข้นอื่น ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้น 10^{8} และ 10^{9} เซลล์/มล.ให้ผลผลิตเอทธานอลได้ใกล้เคียงกันแต่ใช้เวลาถึง 72 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{10} เซลล์/มล. ในการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ใน

การหมักต่อไป

การศึกษาอุณหภูมิในการหมักพบว่า อุณหภูมิทั้ง 4 ระดับมีผลต่อการผลิตเอทธานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยที่อุณหภูมิ 45°ซ สามารถให้ผลผลิตเอทธานอลได้สูงสุดภายในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งที่อุณหภูมิ 40°ซ และ 43°ซ เป็นอุณหภูมิที่เชื้อราสามารถยังสามารถเจริญเติบโตได้ดี อาจมีการใช้น้ำตาลที่ย่อยสลายได้มาใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อจึงทำให้ยีสต์นำน้ำตาลที่ได้มาหมักเป็นเอทธานอลได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ขณะที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นอุณหภูมิที่ทั้งเชื้อรา และยีสต์สามารถเจริญได้ดีจึงทำให้ได้ผลผลิตเอทธานอลค่อนข้างสูง แต่เมื่อเทียบกับอุณหภูมิที่ 45°ซ สามารถผลิตเอทธานอลได้สูงกว่าที่อุณหภูมิ 37°ซ อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่ 45°ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส(Mandels et al., 1976) และยังเป็นอุณหภูมิที่ยีสต์สามารถทนได้ (Spindler et al., 1988) จึงทำให้ได้ผลผลิตเอทธานอลสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น จึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 45°ซ เป็นอุณหภูมิในการหมัก

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลยีสต์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ pH ในระหว่างการหมักพบว่าจำนวนเซลยีสต์ลดลงในวันแรกของการหมักอาจเนื่องจากยีสต์ขาดแคลนแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญในช่วงแรก เพราะต้องรอให้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนยีสต์จึงจะนำน้ำตาลกลูโคสที่ได้ไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และใช้ในการหมัก จึงทำให้จำนวนเซลยีสต์เพิ่มขึ้นในวันต่อมาของการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันแรกก็พบน้อยเช่นกันและเพิ่มขึ้นในวันต่อมาของการหมัก เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเริ่มเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลาย จึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จึงพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการหมัก ค่า pH ลดลงในระหว่างการหมักอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการสะสมของเสียในกระบวนการหมัก หรือการเกิดผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น เช่น กรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งมีผลทำให้ pH ในการหมักลดลงแต่ก็ยังอยู่ในช่วงที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้คือ pH 3.8-4.5 (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529)

ในการศึกษาการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส ด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง (SHF) ยังคงเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในการศึกษาวิจัย จากการศึกษาของ Punnapayak and Hoffmann(1994) โดยใช้ *Amsonia* spp. เป็นวัสดุหมักในกระบวนการ SSF โดยสามารถผลิตเอทธานอลได้ 0.46-0.51 g/g เมื่อเปรียบเทียบกับ การย่อยสลายให้เกิดน้ำตาลกลูโคสพบว่า สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้เพียง 0.22-0.39 g/g เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้นมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งในกระบวนการ SHF ยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นหมักต่อไปเป็นเอทธานอลได้ จึงสามารถช่วยลดปัญหาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และให้ผลผลิตเอทธานอลสูง (Blotkamp et al., 1981; Wright et al., 1988.) แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัด คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส อยู่ในช่วงประมาณ 45-50^{o}ซ (Mandels et al., 1976) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์อยู่ในช่วง 30-35^{o}ซ (Roger et al., 1980) ซึ่งในการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง มักจะทำการศึกษาอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 37-40^{o}ซ (Huang and Chen , 1988 ; Blotkamp et al. , 1981 ; Punnapayak and Emert, 1986) ซึ่งจากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง พบว่าให้ผลผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 45^{o}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงจะสามารถช่วยลดค่าใช้จ่าย และพลังงานที่ใช้ในระบบหล่อเย็นภายในถังหมักได้ และในการศึกษาการผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน พบว่าให้ผลผลิตต่ำกว่าการผลิตด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง อาจเนื่องจาก activity ของเอนไซม์ในการผลิตแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันต่ำกว่า activity ของเอนไซม์ ที่ใช้ในการผลิตด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง และจากงานวิจัยของ Hagerdal และ Haggstrom (1985) ที่ศึกษาการผลิตเอทธานอลจากวัสดุเซลลูโลสโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *T. reesei* และ *S. cerevisiae* รายงานว่า ข้อจำกัดของการใช้เชื้อผสมในการผลิตเอทธานอล คือ ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ที่จะย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการทำงานของยีสต์ในกระบวนการ

หมัก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ให้สูงขึ้น เพื่อพัฒนาแนวทาง การใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรมต่อไป