บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

1. การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ในน้ำเวย์เต้าหู้ที่ไม่ได้เติมน้ำตาลซูโครส และเติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v)

จากการทดสอบการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 100% (v/v) ที่ไม่ได้เติมน้ำตาลซูโครส ด้วย *S. cerevisiae* V1116 หมักเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่า *S. cerevisiae* V1116 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้เฉลี่ย 0.6 % (v/v) (4.73 g/l) เนื่องจากในน้ำเวย์เต้าหู้เป็นแหล่งโปรตีนที่ดี และมีน้ำตาลที่เหลือจากการตกตะกอนโปรตีน จากการวิเคราะห์โดยสถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท.มช) พบว่ามีปริมาณ reducing sugar 0.36% (w/v), total sugar 0.52% (w/v) และค่า total soluble solid 1% Brix (w/v) (กุลวดี, 2552) เพียงพอต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* V1116 ซึ่งเชื้อยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด และการผลิตเอทานอลได้ มีรายงานการผลิตเอทานอลจาก soybean molasses ที่ได้หลังจากการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองและโปรตีนจากแป้งถั่วเหลืองในถั่วเหลือง 1 ตัน ได้ปริมาณกากน้ำตาล 190.8 kg มีปริมาณน้ำตาล 58% หลังหมักด้วย *S. cerevisiae* LPB-SC โดยปรับความเข้มข้นของกากน้ำตาลถั่วเหลืองที่ 30% (w/v) ได้ปริมาณเอทานอล 8.08 $g/l.h^{-1}$ เมื่อเติมน้ำตาลซูโครสที่ 24% (w/v) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลสามารถผลิต เอทานอลสูงสุด 108.09g/l (Siqueira *et al.*, 2008) มีรายงานการผลิตเอทานอลจากน้ำข้าวฟ่างโดย *S. cerevisiae* NP01 ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลด้วยน้ำตาลซูโครสที่ 280 g/l เติม yeast extract 3 g/l และ peptone 5 g/l ได้ปริมาณเอทานอล 120.68±0.54 g/l (Lakkana, 2009)

การหมักเอทานอลในน้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) โดย *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครส และที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) พบว่า *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ไม่สามารผลิตเอทานอลได้ เนื่องจาก *Zymomonas* sp. สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ในบางสายพันธุ์ ซึ่ง *Zymomonas* sp. TISTR 1102 อาจจะเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ (Holt *et al.*, 1994) และน้ำเวย์เต้าหู้เป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน โดยโปรตีนที่

เหลือเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่และเศษโปรตีนซึ่ง *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ไม่สามารถนำโปรตีนที่เหลือไปใช้ได้โดยตรงทำให้ไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลในน้ำเวย์เต้าหู้โดย *S. cerevisiae* V1116

จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสและเติมน้ำตาลซูโครส 24% (w/v) โดย *S. cerevisiae* V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* V1116 สามารถผลิตเอทานอลได้จึงคัดเลือกเชื้อ *S. cerevisiae* V1116 นำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยออกแบบการทดลองแบบ full factorial experimental design มี 4 ปัจจัยในการศึกษาคือ ความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ ชนิดของน้ำตาล ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลและระยะเวลาการหมัก โดยมีการทดลองทั้งหมด 440 รูปแบบการทดลอง โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) ให้ปริมาณ เอทานอลสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ โดยได้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ยที่ 6.36% (v/v) (50.18 g/l) มีการศึกษาตัวแปรที่ทำให้การผลิตเอทานอลในน้ำข้าวไรน์ที่มีปริมาณน้ำตาล 19.5% Brix (w/v) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบการการผลิตเอทานอลที่ไม่เติมพบว่าการเติมแป้งถั่วเหลือง 2g/dm^3 ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 10.37% (v/v) (Katarzyna *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานการหมักเอทานอลใน Simple fermentation medium พบว่าการเติมแป้งถั่วเหลือง (soybean flour) ในอาหารทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ *S. bayanus* โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งถั่วเหลืองที่ 4% (w/v) ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 30% (w/v) ให้ปริมาณเซลล์มากที่สุดและได้เอทานอลที่ 12.8% (v/v) (Cristina *et al.*, 1985)

ผลของชนิดน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลในการหมักเอทานอลที่เติมในทุกระดับความเข้มข้นน้ำเวย์เต้าหู้ ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และทุกระยะเวลาการหมักพบว่าน้ำตาลซูโครสให้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ย 5.97% (v/v) (47.10 g/l) สูงกว่าน้ำเวย์เต้าหู้ที่เติมกากน้ำตาลได้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ย 4.82% (v/v) (38.03 g/l) แตกต่างกับรายงานการศึกษาปริมาณสังกะสีที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลในเชื้อผสม *Thermoanaerobacter ethanolnolicus* JW200 และ *Thermoanaerobacter* strain 65-2 ปริมาณ 0.17g/l ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 20 g/l และอาหารที่เติมกากน้ำตาล 40 g/l พบว่าสามารถผลิตเอทานอล 5.04 g/l และ 6.5 g/l (Ayse and Sedat, 2005)

ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการหมักเอทานอลที่เติมลงในน้ำเวย์เต้าหู้พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 24% (w/v) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเฉลี่ย 6.18% (v/v) (48.76 g/l) และที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงปริมาณเอทานอลจะลดลงตามโดยต่ำสุดที่ระดับความเข้มข้น 15% (w/v) ได้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ย 4.43% (v/v) (34.95 g/l) ตรงกับผลรายงานการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส โดย *S. cerevisiae* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสจาก 25% เป็น 35% (w/v) พบว่าต้องเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นจาก 3% (v/v) เป็น 6% (v/v) และเติม yeast extract 6 g/l ได้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 11.5% เป็น 16% (v/v) (Gaber, 2010) Silveira และคณะ (2005) ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสและปริมาณออกซิเจนในการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เนย โดย *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 โดยทดสอบปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ 1 g/l ถึง 240 g/l พบว่าปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 80 g/l นอกจากนี้มีการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสที่ 50, 100 และ 150 g/l ในการหมักเอทานอลจากน้ำเวย์เนยพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตส 150 g/l ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 58 g/l (Ghaly and El-Taweel, 1997)

ผลของระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลในน้ำเวย์เต้าหู้พบว่าวันที่ 20 ของการหมักจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเฉลี่ย 7.16% (v/v) (56.49 g/l) และวันที่ 2 เริ่มมีการผลิตเอทานอลแต่มีปริมาณต่ำเฉลี่ย 3.29% (v/v) (25.96 g/l) ที่ระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้นปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นด้วย การศึกษาระยะเวลาการหมักกากน้ำตาลแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) ในการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* พบว่าระยะเวลาที่ 6.94, 10.42, และ 15.63 ชั่วโมงมีปริมาณเอทานอลที่ 6.32, 12.55 และ 19.15 g/l การศึกษาการพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยวิธี continuous very-high-gravity (VHG) fermentation สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส 300 g/l และผลิตเอทานอลได้ 118 g/l เมื่อขยายเวลาการหมักจะทำให้มีการใช้น้ำตาลที่เหลือจนหมดได้ (Lui *et al.*, 2010)

การออกแบบการทดลองแบบ full factorial experiment และทดสอบผลทางสถิติพบว่าทั้ง 4 ปัจจัยคือความเข้มข้นน้ำเวย์เต้าหู้ ชนิดน้ำตาล ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และระยะเวลาในการหมัก มีผลต่อการผลิตเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ จากผลวิเคราะห์ทางสถิติความแตกต่างของชุดการ

ทดลองทางสถิติทั้งหมด 440 การทดลอง (440 combinations) ทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำพบว่ามีอย่างน้อย 2 ชุดการทดลองที่แตกต่างกันโดยชุดการทดลองที่ความเข้มข้นน้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) ที่เติมด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 24% Brix (w/v) และระยะเวลาการหมัก 20 วันให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเฉลี่ย 13.9 % (w/v) (109.67 g/l) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หลังสิ้นสุดการหมักเอทานอลในสภาวะที่เหมาะสมโดย *S. cerevisiae* V1116 เมื่อนำตัวอย่างน้ำเวย์เต้าหู้มาวิเคราะห์หาค่า BOD ด้วยวิธี azide modification พบว่าก่อนการหมักเอทานอลมีค่า BOD ที่ 93.33 mg/l และหลังหมักมี 256 mg/ml ซึ่งมีค่าที่สูงขึ้น ซึ่งมีการเหลือของปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำเวย์เต้าหู้ ซึ่งในการศึกษาเพิ่มเติมจึงควรที่จะมีการเพิ่มระยะเวลาการหมักให้มากขึ้นเพื่อให้ *S. cerevisiae* V1116 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้จนหมด

ปริมาณ total protein ที่ทำการตรวจด้วย Bradford kit มีค่าที่ลดลงคือ ก่อนการหมักมีค่า total protein ที่ 7.1 mg/ml และหลังการหมักที่ 0.77 mg/ml แสดงว่า *S. cerevisiae* V1116 สามารถใช้โปรตีนในน้ำเวย์เตาหู้ในการเจริญได้ มีรายงานว่าการเติมกรดอะมิโนแบบเดี่ยวๆ เช่น cystine, glycine, histidine, lysine, proline หรือ threonine ไม่ช่วยให้เชื้อ *S. cerevisiae* เจริญได้ดีขึ้น (Matthews and Webb, 1991)

น้ำหมักที่ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำเวย์เต้าหู้ 100% (v/v) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) และระยะเวลาการหมัก 20 วัน นำมากลั่นเอทานอลด้วยเครื่องกลั่นแบบหม้อต้มขนาด 2 ลิตร เก็บส่วนใสที่ได้จากการควบแน่น 300 ml วัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer พบว่าได้ปริมาณเอทานอล 60% (v/v) (473.4 g/l) ซึ่งเป็นการกลั่นเพื่อแยกเอทานอลที่ได้ออกจากน้ำหมักให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น (ภาคผนวก ง)

3. ผลของการทดสอบสภาวะการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 100%

จากการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือในน้ำเวย์เต้าหู้หลังกระบวนการผลิตเต้าหู้ด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธีหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด หลังจากหาจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร NA และ YM พบว่าไม่มีจุลินทรีย์เจริญบนอาหารทั้งสอง หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อได้โดยสมบูรณ์ในระดับห้องปฏิบัติการ

การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารเคมี KMS ที่ความเข้มข้น 400 ppm ให้ประสิทธิภาพรองจากการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ มีจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร NA มีจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือ 570 CFU/ml หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จากการตรวจเชื้อพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการสร้าง endospore ลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น ผิวโคโลนีแบบหยัก แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือบนอาหาร YM โดยตรวจทางสัญฐานวิทยาตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al*, 1994) สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. มีรายงานการใช้ KMS ปริมาณ 1 ช้อนชาและกรดมะนาว (citric acid) 2 ช้อนชาในน้ำ 2 แกลลอน (425 mg/l) จะให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อในถังหมักและใช้เป็นวัตถุกันเสีย ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อยืดอายุการเน่าเสียของไวน์ โดยจะทำให้เกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในไวน์ (Lum, 1998)

ผลของการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธีการต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที ให้ประสิทธิภาพน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธีการอื่น มีจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร NA มีจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือ 1,170 CFU/ml และได้ตรวจเชื้อพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการสร้าง endospore ลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น ผิวโคโลนีแบบหยัก แต่ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ที่เหลือบนอาหาร YM หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน โดยการตรวจทางสัญฐานวิทยาตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al*, 1994) สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เช่นเดียวกับการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี KMS ที่ 400 ppm

จากรายงานการมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* ในนมผงสำหรับทารก เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อสุขภาพของประชาชนในประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ พบว่า *Bacillus cereus* ไม่ควรเกิน 1,000 โคโลนีต่อกรัม (Food Standards Australia New Zealand, 2004) เช่นเดียวกับรายงานมาตรฐานอาหารเสริมสำหรับเด็ก (infant formula) ขององค์การอาหารและยาในประเทศสหรัฐอเมริกา (FDA) ไม่ควรเกิน 1,000 CFU/g (Martinez, 2002)

4. ผลของการขยายขนาดการหมักในถังเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ขนาด 200 ลิตร

จากการต้มน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 100% (v/v) ปริมาตร 100 ลิตร เป็นเวลา 15 นาทีพร้อมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) เพื่อละลายน้ำตาลและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บางส่วนด้วยความร้อน จากนั้นเทลงถังเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ขนาด 200 ลิตร และทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือด้วย KMS หนัก 40 g (400 pm) จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลและการฆ่าเชื้อ ทำการหมักเป็นระยะเวลา 20 วัน เก็บน้ำหมักที่ได้มาวัดปริมาณเอทานอล โดยได้ปริมาณเอทานอล 12.9% (v/v) (101.78 g/l) ซึ่งต่ำกว่าการหมักในขวดหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่ได้ปริมาณเอทานอล 13.9% (v/v) (109.67 g/l) ซึ่งการเพิ่มขนาดการผลิตเอทานอลมีประสิทธิภาพลดลงเนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่เหลือในถังเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีมากกว่าในขวดหมักทำให้ไม่เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนอย่างสมบูรณ์ มีรายงานว่าการมีออกซิเจนจะทำให้เกิดการเปลี่ยนจากกระบวนการหมักเป็นการบวนการหายใจทำให้เกิดปริมาณเซลล์ที่มากขึ้นและเกิดกระบวนการ dealcoholization (Ronald, 2008)