

บทที่ 3

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการวิจัยส่วนที่ 1 พบว่า น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตเอทานอล เพราะนอกจากจะมีน้ำตาลที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้โดยตรงในปริมาณที่สูงแล้ว ยังมีธาตุอาหารที่สำคัญหลายชนิดต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของยีสต์ โดย *S. cerevisiae* NP 01 สามารถเจริญได้ดีในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยไม่พบระยะปรับตัว (lag phase) เมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดหรือ μ_{max} ของยีสต์ในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน พบว่า μ_{max} ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อเริ่มต้นในน้ำหมัก โดย μ_{max} มีค่าลดลงเมื่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้น (ในช่วง 1×10^6 ถึง 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองนี้ (น้ำตาลสภาวะปกติ 240 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลสภาวะ VHG 280 กรัมต่อลิตร) ไม่มีผลต่อ μ_{max} ของยีสต์ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึงระดับ VHG (ถึง 280 กรัมต่อลิตร) ไม่มีผลต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* NP 01 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Laopaiboon และคณะ (2008) ที่พบว่า *S. cerevisiae* NP 01 เจริญและผลิตเอทานอลได้ดี ในอาหารเหลวสมบูรณ์สูตรผลิตเอทานอลที่มีกลูโคสเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ยีสต์บางสายพันธุ์เช่น *S. cerevisiae* TISTR 5339 ไม่สามารถเจริญได้และตกตะกอนในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเพียง 150 กรัมต่อลิตร

ในระหว่างกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานพบว่า พีเอชของน้ำหมักค่อยๆ ลดลงเล็กน้อยใน 24 ชั่วโมงแรก เนื่องจากยีสต์มีการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเมื่อละลายในน้ำหมักจะเกิดกรดคาร์บอนิก ทำให้พีเอชของน้ำหมักลดลง หลังจากนั้นพีเอชจะมีค่าคงที่ ตลอดระยะเวลาการหมัก อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของพีเอชตลอดการหมักอยู่ในช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ (พีเอช 4 – 5) ซึ่งเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตเอทานอล เนื่องจากไม่ต้องปรับพีเอชของน้ำหมักก่อนการหมัก ทำให้ลดขั้นตอนและต้นทุนการผลิตโดยรวมได้ทางหนึ่ง

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมัก พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์มีค่าเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการหมัก เนื่องจากยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ซึ่งมีคุณสมบัติคือสามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่ไม่รีดิวิซ์ เช่น ซูโครสในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวิซ์ เช่น กลูโคสและฟรุกโตส เพื่อให้ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ หลังจากนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์จะลดลงเมื่อยีสต์นำไปใช้เปลี่ยนเป็นเอทานอล

ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล โดยเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะได้อัตราผลผลิต ผลได้ และประสิทธิภาพผลได้สูงกว่าที่เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^7 และ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เนื่องจากที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูง

ทำให้ยีสต์สามารถใช้สารอาหารและสร้างผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่าที่สภาวะที่มีปริมาณเซลล์ต่ำ ดังนั้นการใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูงสามารถลดระยะเวลาการหมักและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานได้

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะที่เดิมและไม่เดิมแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในแง่ของความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราผลผลิตเอทานอล ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมีแหล่งไนโตรเจนเพียงพอต่อการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบกะด้วย *S. cerevisiae* NP 01 อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในแง่ของผลได้ของเอทานอลภายใต้สภาวะที่เดิมไนโตรเจนให้ค่าผลได้เอทานอลต่ำกว่าสภาวะที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเสริมประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า แอมโมเนียมซัลเฟตอาจมีผลทำให้ *S. cerevisiae* NP 01 สร้างผลิตภัณฑ์พลอยได้เพิ่มมากขึ้น เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนต บิวเทนไดออล ไดอะซีทิล และแอลฟา-ไดกลูตาเรท เป็นต้น (Zoecklein และคณะ, 1990) ซึ่งไม่ได้ตรวจวัดในที่นี้

การผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 240 กรัมต่อลิตร ในระบบ cascade ที่ประกอบด้วยถังหมักขนาด 2 ลิตร เชื่อมต่อกับคอลัมน์แก้ว 3 คอลัมน์ พบว่า ระยะเวลาที่น้ำหมักอยู่ภายในระบบมีผลต่อค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญของการหมัก โดยระยะเวลาที่น้ำหมักอยู่ภายในระบบที่นานกว่า ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลและผลิตเอทานอลได้สูงกว่า พีเอชของน้ำหมักที่ออกจากถังหมักและคอลัมน์แต่ละส่วนมีค่าค่อนข้างคงที่อาจเนื่องจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก มีความสามารถในการละลายสูงในน้ำหมัก และเมื่อละลายในน้ำหมักจะเกิดเป็นกรดคาร์บอนิกและแตกตัวออกไปเป็นไฮออนคาร์บอเนตและโปรตอน ซึ่งมีผลช่วยรักษาพีเอชของน้ำหมักให้คงที่ (Shen และคณะ, 2004) ส่วนปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตมีค่าแตกต่างกันเพียงหนึ่งล็อกสเกลที่อัตราการเจือจางระหว่าง 0.007 – 0.04 ต่อชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า *S. cerevisiae* NP 01 สามารถเจริญภายในระบบที่ศึกษาได้

ระบบการหมักที่มีการแบ่งเป็นส่วนๆ แต่ละส่วนต่อกันแบบอนุกรม (series) มีส่วนช่วยให้ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น และได้ความเข้มข้น อัตราการผลิต ผลได้ และประสิทธิภาพผลได้ของเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น และมีค่าสูงสุดเมื่อน้ำหมักไหลผ่านคอลัมน์สุดท้ายของระบบ เนื่องจากการต่อระบบแบบอนุกรมมีส่วนช่วยในการเจือจางความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำหมักก่อนเข้าสู่ระบบ และทำให้ความสามารถของยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางของระบบ *S. cerevisiae* NP 01 สามารถใช้น้ำตาลได้ลดลง เนื่องจากระยะเวลาที่น้ำหมักอยู่ภายในระบบสั้นกว่า ในทำนองเดียวกัน ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้มีค่าลดลงตามความสามารถของยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลภายในระยะเวลาที่น้ำหมักอยู่ในระบบ อย่างไรก็ตามอัตราผลผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากอัตราการเจือจางที่เพิ่มสูงขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยระบบ cascade และ ระบบ CSTR ที่ ปริมาตรทำงานรวมเท่ากันพบว่า ที่อัตราการเจือจางที่เท่ากัน ระบบ cascade ให้ความเข้มข้นเอทานอล และ อัตราผลผลิต สูงกว่าระบบ CSTR ประมาณ 51 – 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลได้ของเอทานอลมีค่าไม่ แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยระบบ cascade กับ การหมักเอทานอลแบบกะ พบว่า ระบบ cascade ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดสูงกว่าใช้ระบบแบบกะประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ระบบแบบกะให้ค่าอัตราการผลิตสูงกว่าระบบ cascade ประมาณ 3 เท่า ส่วนค่าผลได้เอทานอลไม่ขึ้นกับระบบการหมัก แม้ว่าระบบ cascade จะให้ค่าอัตราผลผลิตเอทานอลต่ำกว่าระบบการหมักแบบกะ แต่ในทางปฏิบัติระบบการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลแล้วสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ไม่ต้องเตรียมกล้ำเชื้อใหม่ดังที่พบในการหมักแบบกะ

การวิจัยส่วนที่ 2 ต้องการหาแหล่งอาหารเสริมเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG ในตอนแรกคณะผู้วิจัยจะใช้ particulate yeast cell wall products (PYCWP) เป็นแหล่งอาหารเสริม ซึ่ง PYCWP เตรียมได้จากการนำยีสต์สดที่ใช้แล้วจากโรงงานเบียร์ ไปผ่านขั้นตอนการย่อยด้วยกรดและด่าง เพื่อให้ได้เฉพาะผลิตภัณฑ์จากผนังเซลล์ยีสต์ที่มีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์ อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Phunjumpa (2006) พบว่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของการเตรียม PYCWP จากยีสต์แห้งที่ใช้แล้วมีค่าเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำ PYCWP ไปใช้ในการหมักเอทานอลในการทำไวน์มะขาม เทียบกับเมื่อใช้กากเซลล์ยีสต์แห้ง พบว่าให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเปลี่ยนแหล่งอาหารเสริมจาก PYCWP เป็น กากเซลล์ยีสต์แห้งจากโรงงานเบียร์ หรือ dried spent brewer's yeast ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก เบียร์ทิพย์ บรีวเวอรี่ (1991) จำกัด อ. บางบาล จ. พระนครศรีอยุธยา ซึ่งการใช้ กากเซลล์ยีสต์แห้งนี้มีข้อดีคือ สามารถใช้กากเซลล์ยีสต์แห้งได้โดยตรงไม่ต้องนำไป pretreatment ก่อน

ผลการวิจัยส่วนที่ 2 พบว่า กากเซลล์ยีสต์แห้งมีธาตุอาหารหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์คล้ายกับที่พบในยีสต์เอ็กซ์แทรก และเปปโตน ที่ใช้เป็นองค์ประกอบหลักของอาหารสังเคราะห์สูตรผลิตเอทานอล (Melzoch และคณะ, 1994) ดังนั้นกากเซลล์ยีสต์แห้งจึงน่าจะมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน

การศึกษาการใช้ยีสต์เอ็กซ์แทรกและเปปโตนในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG พบว่า การเติมยีสต์เอ็กซ์แทรกและเปปโตน หรือยีสต์เอ็กซ์แทรกเพียงอย่างเดียว (ในปริมาตรรวมเท่ากัน) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะ VHG ได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้ยีสต์เอ็กซ์แทรกแทนเปปโตนในอาหารสังเคราะห์สูตรผลิตเอทานอลได้เพราะเปปโตนมีราคาแพงกว่ายีสต์เอ็กซ์แทรกประมาณ 1.5 เท่า เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG ที่มีการเติมและไม่เติมยีสต์เอ็กซ์แทรกพบว่า การเติมยีสต์เอ็กซ์แทรก 8 กรัมต่อลิตร สามารถลดระยะเวลาการหมักเอทานอลได้จาก 72 ชั่วโมง เป็น 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ายีสต์เอ็กซ์แทรกสามารถกระตุ้นการผลิตเอทานอลของยีสต์ได้ และเมื่อ

พิจารณาที่ระยะเวลาการหมักเท่ากันคือ 48 ชั่วโมง พบว่า น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่เติมยีสต์เอ็กซ์แทร็กสามารถเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลได้ประมาณ 8 กรัมต่อลิตร (8 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามยีสต์เอ็กซ์แทร็กไม่มีผลต่อผลได้ของเอทานอล

การศึกษาการใช้กากเซลลียีสต์แห้งในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG พบว่า กากเซลลียีสต์แห้งสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมในการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะ VHG ได้ จากการทดลองพบว่า การเติมกากเซลลียีสต์แห้งอย่างน้อย 8 กรัมต่อลิตรสามารถลดระยะเวลาการหมักเอทานอลได้จาก 72 ชั่วโมง เป็น 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการเติมยีสต์เอ็กซ์แทร็ก และเมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการหมักเท่ากันคือ 48 ชั่วโมง พบว่า น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่เติมกากเซลลียีสต์แห้งสามารถเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลได้ประมาณ 5.5 กรัมต่อลิตร (5.6 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามการเติมกากเซลลียีสต์แห้งทำให้ผลได้ของเอทานอลลดลงเล็กน้อย อาจเนื่องจากในกากยีสต์แห้งอาจมีสารอาหารบางอย่างที่ไปกระตุ้นให้ยีสต์สร้างผลิตภัณฑ์พลอยได้เพิ่มขึ้น (Zoecklein และคณะ, 1990)

ความเข้มข้นเริ่มต้นของยีสต์มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG (น้ำตาลเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร) โดยพบว่าปริมาณยีสต์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้ใกล้เคียงกับเมื่อใช้เซลล์เริ่มต้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใน 12 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ยีสต์ในน้ำหมักมีผลต่ออัตราการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลของยีสต์โดยเฉพาะในช่วง 48 ชั่วโมงแรก แต่ไม่มีผลต่อความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลที่ได้ การใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้น 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แทนการใช้เซลล์ยีสต์เริ่มต้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่แนะนำไว้ในงานวิจัยหลายเรื่อง (เช่น Laopaiboon และคณะ, 2007) ทำให้สามารถลดปริมาณของการเตรียมกล้าเชื้อลงได้ 2 เท่า ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการเตรียมกล้าเชื้อได้

การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG (น้ำตาลทั้งหมด 280 กรัมต่อลิตร) โดย *S. cerevisiae* NP 01 พบว่าการหมักเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ คือเมื่อสิ้นสุดการหมักยังมีน้ำตาลเหลือในน้ำหมักประมาณ 20 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เหลือว่าเป็นน้ำตาลอะไร *S. cerevisiae* NP 01 สามารถนำไปใช้ได้หรือไม่

การขยายขนาดการผลิตเอทานอลจากถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็น 50 ลิตร พบว่า รูปแบบการเจริญและการผลิตเอทานอลล้ายกัน แสดงให้เห็นว่าระบบการกวน การผสม และระบบควบคุมอุณหภูมิในถังหมักขนาด 50 ลิตร มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับระบบการกวน การผสม และระบบควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อย่างไรก็ตามควรมีการขยายขนาดเพิ่มสู่ระดับ pilot scale ก่อนนำไปผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไป