บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงจากตัวอย่างดิน น้ำ อาหารหมัก และลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ รวม 64 ตัวอย่าง ได้จุลินทรีย์ 145 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ จากการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ 10 ไอโซเลทที่ให้ผลดีที่สุด ซึ่งเป็นแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท แอคติโนมัยซิส 2 ไอโซเลท และเชื้อรา 1 ไอโซเลท โดยเลือกจากความสามารถในการย่อยข้าวกล้องได้ดี คือย่อยแล้วให้กลิ่นดี (ไม่เหม็นบูด) ให้ปริมาณน้ำตาลสูง มีค่า amylase activity และ specific activity สูง แล้วนำมาทดสอบเปรียบเทียบกันอีกครั้ง พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท SB 29 ให้ผลในการย่อยข้าวกล้องที่ดีกว่าไอโซเลทอื่นอย่างเห็นได้ชัด คือให้กลิ่นหอมแบบข้าวหมาก และให้เปอร์เซ็นต์ในการย่อยสูงสุด อาจเนื่องมาจากการทดสอบนี้ ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวกล้องเพียง 3 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่แบคทีเรียสามารถเจริญและทำงานได้ดีกว่าเชื้อรา และแอคติโนมัยซิส ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเจริญที่นานกว่า และอีกเหตุผลหนึ่งคือ แบคทีเรียSB 29 นี้แยกมาจากลูกแป้งข้าวหมาก จึงมีความสามารถในการย่อยแป้งในข้าวได้ดี และจากการที่แยกได้จากลูกแป้งนี้ จึงทำให้ค่อนข้างมั่นใจได้ในเรื่องความปลอดภัย ว่าเชื้อจะไม่สร้างสารพิษ แต่ถ้าให้แน่ใจก็ควรนำไปตรวจวิเคราะห์ให้ละเอียดอีกครั้งหนึ่ง

จากการบ่งชนิดของแบคทีเรีย SB 29 โดยดูจากรูปร่างลักษณะของเชื้อจากการย้อมสีแกรม และดูการสร้าง endospore และการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเป็น *Bacillus* sp. และมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับ *Bacillus stearothermophilus* มากที่สุด จะมีข้อแตกต่างก็เพียง SB 29 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20° C ถึง 65°C แต่ *B. stearothermophilus* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30°C ลงมา จึงยังไม่สามารถสรุปสปีชีส์ของแบคทีเรียSB 29 นี้ได้ ต้องนำไปศึกษาโดยละเอียดต่อไป

สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยข้าวกล้องและผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Bacillus* SB 29 พบว่าที่อุณหภูมิ 45°C เชื้อสามารถทำงานได้ดีที่สุด และเมื่อทดลองปรับ pH เริ่มต้นของอาหาร โดยการปรับให้ pH ต่ำกว่า 7.0 ใช้กรดแลคติค 10% และการปรับให้ pH สูงกว่า 7.0 ใช้ 0.1 N NaOH ผลที่ได้คือ ที่ pH เป็นเบส จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นค่อนข้างเหม็น และการทำงานของเชื้อก็ยังต่ำกว่าสภาวะที่เป็นกรด คือเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับ pH เป็นกรด เชื้อสามารถทำงานได้ดี และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นหอม อาจเนื่องมาจากกการเติมกรดแลคติคลงไปจะไปช่วยการทำงานของเชื้อ

(อ้างโดยนพกาญจน์, 2543) คือ กรดแลคติคที่เติมไปนี้อาจไปช่วยย่อยสลายพันธะต่าง ๆ และแป้งในข้าวกล้อง ทำให้เอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อสามารถทำงานได้ดีขึ้น

จากการศึกษาอัตราส่วนอาหารข้าวกล้องที่เหมาะสมต่อการทำงานของ *Bacillus* SB 29 ในสภาวะเขย่า พบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนของอาหารข้าวกล้องต่ำ ๆ คือ 5 % เปอร์เซ็นต์การย่อยจะสูงที่สุด แต่ให้น้ำตาล ให้ค่า amylase activity และ specific activity ต่ำที่สุด และเมื่อใช้อัตราส่วนของอาหารข้าวกล้อง 10% พบว่าค่า amylase activity และ specific activity สูงสุด แต่ให้น้ำตาลเพียง 6.2°Brix และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนอาหารให้สูงขึ้นเรื่อย ๆ พบว่าน้ำตาลที่ได้ก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย จนสูงสุดที่อัตราส่วนอาหาร 20% คือให้น้ำตาลสูงถึง 17.0°Brix แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนอาหารเป็น 30% ไม่เกิดการย่อยเลย อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงในครั้งนี้ทำในเครื่องเขย่า อาหารข้าวกล้องที่มีอัตราส่วนตั้งแต่ 5-20% ซึ่งยังมีส่วนที่เป็นของเหลวอยู่ เมื่อเขย่า เชื้อจึงสามารถกระจายตัวและทำงานได้ดี แต่สำหรับอัตราส่วนอาหาร 30% นี้ ลักษณะของอาหารจะกลายเป็นของแข็ง (คล้ายข้าวหุง) ซึ่งลักษณะที่เป็นของแข็งนี้เอง ทำให้เชื้อไม่สามารถกระจายตัวได้ดี จึงเกิดการย่อยเพียงเล็กน้อย โดยเกิดเฉพาะผิวหน้าอาหารที่สัมผัสกับอากาศเท่านั้น การทดลองอัตราส่วนอาหารนี้ เลือกที่ 20% เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม เนื่องจากให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการนำไปหมักแอลกอฮอล์ในขั้นตอนต่อไป

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม พบว่า การย่อยข้าวกล้องจะให้เปอร์เซ็นต์สูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากยังมีวัตถุดิบให้เชื้อสามารถใช้งานได้ ดังนั้นค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยจึงสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลา ส่วนน้ำตาลที่ได้ ค่า amylase activity และ specific activity ของวันที่ 3 จะสูงสุด จึงเลือกระยะเวลา 3 วันเป็นเวลาที่เหมาะสม

เมื่อเปรียบเทียบกับงานของ Hatoh (1999) พบว่าไอโซเลท SJ 23 ให้เปอร์เซ็นต์การย่อย 58.5% และ amylase activity 4.54 U/ml crude extract จะเห็นว่าให้เปอร์เซ็นต์การย่อยต่ำกว่า การทดลองในครั้งนี้ แต่ให้ amylase activity สูงมาก อาจเนื่องมาจาก การศึกษาการทำงานของ amylase activity ทำที่อัตราส่วนอาหาร 10% แต่การศึกษาการย่อยยึดแบบมาจาก วิธีการทดสอบความสามารถในการย่อยข้าวของ Nakamura (1999) ซึ่งศึกษาในอาหารที่มีอัตราส่วน 25% แตกต่างจากการทดลองครั้งนี้ ซึ่งทำการศึกษาทั้ง ความสามารถในการย่อย และการทำงานของ amylase activity ในอาหารอัตราส่วน 20% ผลที่ได้จึงแตกต่างกัน

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อได้แล้ว ก็นำไปใช้ในการหมักข้าวกล้องในภาชนะที่มีขนาดใหญ่ขึ้น คือขนาด 4 ลิตร โดยภาชนะที่ใช้นี้เป็นขวดปากแคบ ปรากฏว่าเชื้อไม่สามารถทำงานได้ดีเท่ากับการหมักใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยการหมักในขวดปากแคบนี้จะอุดด้วยสำลีพันปลายไม้เพื่อใช้กวนให้อากาศแก่เชื้อเท่านั้น ซึ่งไม่ดีเท่ากับการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า

และอัตราส่วนอาหาร เมื่อใช้ 20% พบว่า มีความหนาแน่นของข้าวมากเกินไป ลักษณะอาหารที่ได้เกือบจะเป็นอาหารแข็ง จึงลดอัตราส่วนของอาหารลงเป็น 15% ทำให้การกวนให้อากาศทำได้ง่ายขึ้น และจากการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อติดตามดูการทำงานของเชื้อพบว่าใช้ระยะเวลาในการทำงานนานขึ้น จาก 3 วันเป็น 5 วันจึงจะให้น้ำตาล และ amylase activity สูงสุด

การศึกษาการหมักแอลกอฮอล์ร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5094 ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด พบว่าชุดที่ 2 ซึ่งใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นเชื้อร่วมระหว่างแบคทีเรียกับยีสต์จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์สูงสุด อาจเนื่องมาจากการเติมยีสต์ไปตั้งแต่แรกทำให้ระยะเวลาในการทำงานยาวนานกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และจากการที่ให้แบคทีเรียและยีสต์ทำงานไปพร้อม ๆ กันนี้ การเจริญและการทำงานของทั้งคู่อาจส่งเสริมกัน คือ การทำงานของแบคทีเรีย SB 29 จะให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล ซึ่งยีสต์จะนำไปใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งการทำงานในลักษณะนี้อาจเกิดขึ้นต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ทำให้ได้น้ำตาลออกมามากกว่าชุดการทดลองอื่นซึ่งใช้เวลาในการทำงานของแบคทีเรียเพียง 5 วัน เมื่อน้ำตาลที่ได้สูงกว่า แอลกอฮอล์ที่ได้ก็จะสูงกว่าตามไปด้วย

เมื่อเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักข้าวขาว พบว่า ข้าวกล้องจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ใสกว่า และกลิ่นดีกว่าข้าวขาว ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีขาวขุ่น และมีตะกอนมากกว่า อาจเนื่องมาจากข้าวกล้องยังมีเยื่อหุ้มเมล็ดอยู่ ซึ่งเยื่อนี้อาจทำหน้าที่ในการกรองแอลกอฮอล์ในลักษณะเดียวกับ แกลบที่เป็นส่วนผสมในการหมักอุ (ประดิษฐ์, 2543) ผลจากการกรองนี้เองจึงทำให้ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ของข้าวกล้องใสกว่า

เมื่อนำผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ของข้าวกล้อง ไปทำการตรวจชนิดของแอลกอฮอล์โดยวิธี gas chromatography เทียบกับสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐาน methanol และ ethanol ซึ่งผลที่ได้สามารถสรุปได้ว่าแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักนี้เป็น เอธานอล ซึ่งปลอดภัยต่อการบริโภค แต่ปริมาณเอธานอลที่ผลิตได้ยังน้อยอยู่มากเมื่อเทียบกับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ หรือไวน์อื่น ๆ คือ ได้แอลกอฮอล์สูงสุดเพียง 6.2% ในขณะที่ไวน์อาจมีแอลกอฮอล์สูงถึง 15% เนื่องมาจากในขั้นตอนการทำไวน์จะมีการเติมน้ำตาลไปเพื่อปรับให้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของการหมักอยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือ 20-25°Brix (วิทยา, 2540) แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีการเติมน้ำตาลเพื่อปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของการหมักแต่อย่างใด โดยปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการทำงานของแบคทีเรีย SB 29 จะอยู่ในช่วง 7.5-8.0°Brix เท่านั้น ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการมีปริมาณ น้ำตาลเริ่มต้นสูงกว่า ก็จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าตามไปด้วย ซึ่งจากสาเหตุนี้การเติมน้ำตาลเพื่อปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นจึงสามารถนำมาปรับปรุงใช้เพื่อการเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์จากการหมักในครั้งต่อไปได้