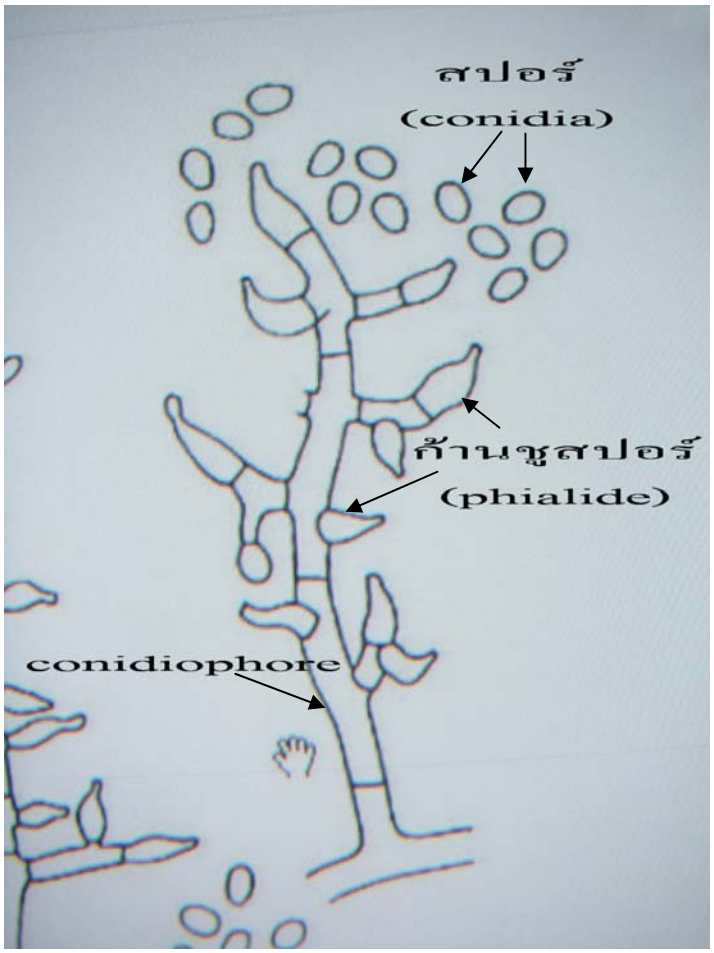
บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยว

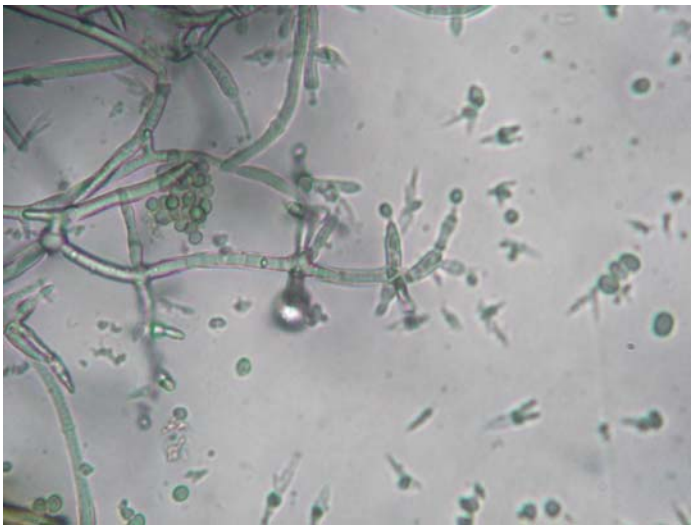
4.1.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1

รูปที่ 4.1 คือภาพวาดไตรโคเดอร์มา รีสิอี ที่ได้จากเว็บไซด์ ซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบกับภาพถ่ายจากการส่องกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอ ดังรูปที่ 4.2 พบว่า ลักษณะของสปอร์ (conidia) ก้านชูสปอร์ (phialide) และโคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) ของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 คล้ายคลึงภาพวาดที่เป็นสายพันธุ์เดียวกัน



รูปที่ 4.1 ภาพวาดไตรโคเดอร์มา รีสิอี ที่ได้จากเว็บไซด์ [17]

(ก)

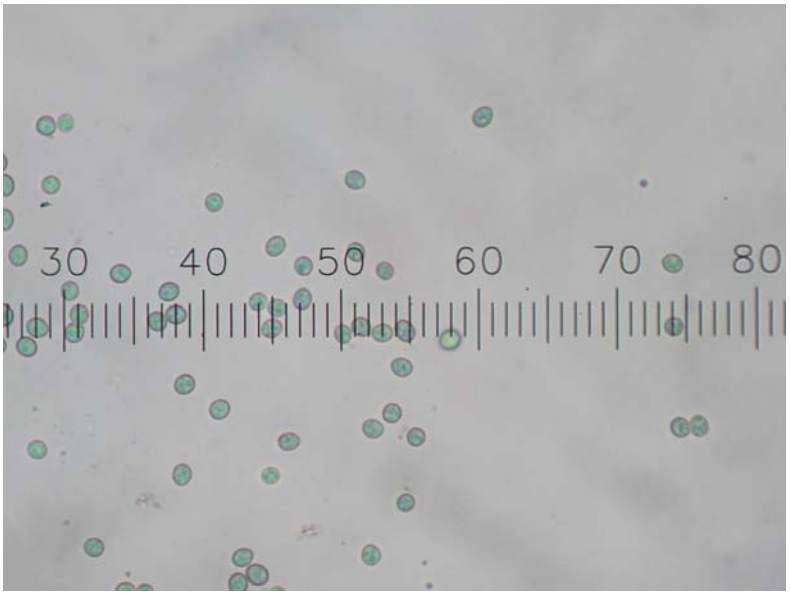


(ข)

(ค)

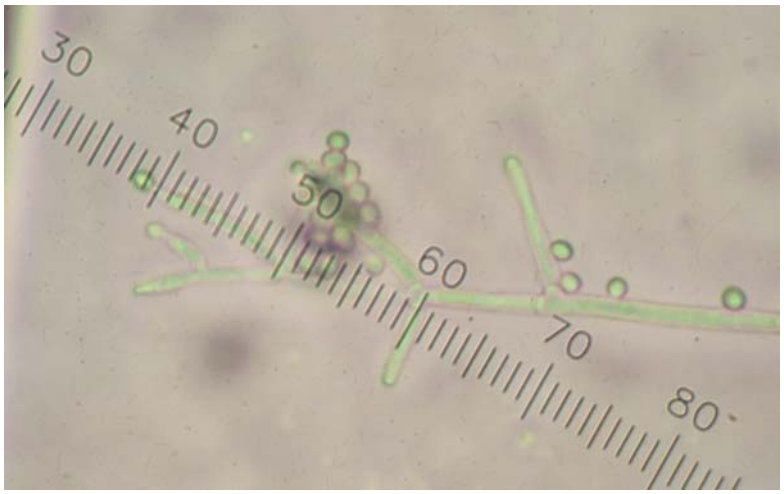
รูปที่ 4.2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 40 เท่าของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ

วัดขนาดไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 40 เท่าดังรูปที่ 4.3 ถึงรูปที่ 4.6 พบว่าขนาดกว้างและยาวของสปอร์ ก้านชูสปอร์ และโคนิดิโอฟอร์ ดังตาราง ที่ 4.1

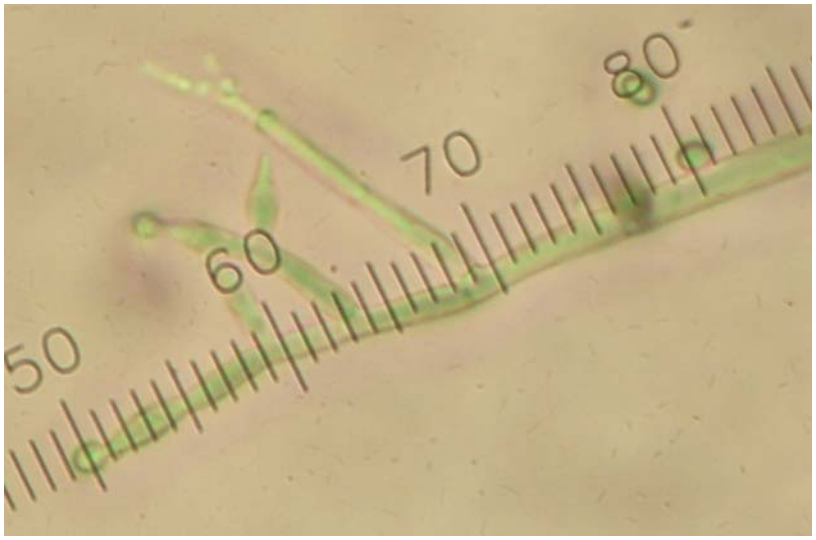


รูปที่ 4.3 สเกลความกว้างและยาวสปอร์ของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ

รูปที่ 4.4 สเกลความกว้างก้านชูสปอร์ของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบกำลังขยาย 40 เท่า ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ



รูปที่ 4.5 สเกลความยาวก้านชูสปอร์ของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบกำลังขยาย 40 เท่า ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ



รูปที่ 4.6 สเกลความยาวโคนิดิโอฟอร์ของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบกำลังขยาย 40 เท่า ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ

ตารางที่ 4.1 ขนาดของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ที่วัดได้จากกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

ส่วนประกอบไตโคเดอร์มา รีสิอี	ขนาด (μm)	
	กว้าง	ยาว
ก้านชูสปอร์	2.7-3.5	5.1-6.8
โคนิดิโอฟอร์	3.6-4.1	4.6-5.0
สปอร์ รูปไข่หรือวงรี	2.7-3.2	3.5-4.1

ผลของขนาดกว้าง ยาวของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ที่ได้จากตารางที่ 1 นำไปสืบค้นเพื่อหาสปีชีส์สายพันธุ์ได้จากเว็บไซต์ของ Department of Agriculture, Agricultural Research Service, United States (http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/ framekey.cfm?gen=trichoderma) [18] พบว่า เป็นเชื้อราสายพันธุ์ไตรโคเดอร์มา รีสิอี ดังนี้คือ

☑ **T. reesei**

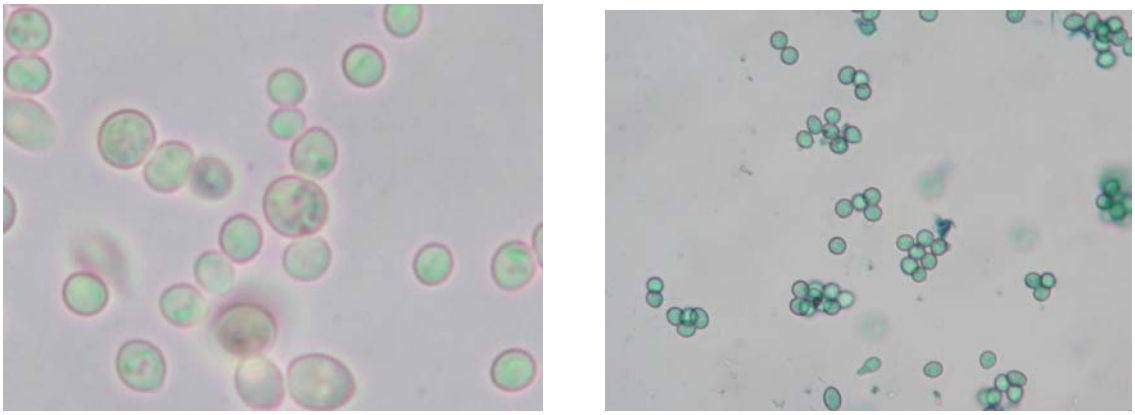
Submit Clear All

Criteria selected:
• Conidia - Shape: **oblong**
• Conidia - Length µm: **3.5-4.1**
• Conidia - Width µm: **2.7-3.2**
• Conidia - Length/width ratio: **1.2-1.5**
• Conidia - Ornamentation: **smooth**
• Conidia - Pigmentation: **green or gray green**
• Conidiophore - Conidiophore: **with a more or less long central axis; phialides arising singly over a long distance**
• Phialides - Percurrently proliferating phialides: **absent on CMD or PDA**
• Phialides - Length µm: **5.1-6.8**
• Phialides - Mid point µm: **2.7-3.5**
• Phialides - Base µm: **2.0-2.6**
• Phialides - Supporting cell µm: **2.2-3.0**
• Phialides - Ratio of length to widest point: **2.3-4.2**
• Phialides - Ratio of length to supporting cell: **1.4-2.3**
• Phialides - Ratio of widest point to width of supporting cell: **0.9-1.1**
• Phialides - Intercalary phialides: **present**
• Chlamydospore - Presence: **present**
• Chlamydospore - Width µm: **8.3-11.4**
• Chlamydospore - Chlamydospore form: **unicellular, most terminal, solitary**
• Culture - PDA, radius at 30 c after 72 h in darkness: **42-54**
• Culture - PDA, radius at 35 c after 72 h in darkness: **38-55**
• Culture - SNA, radius at 35 c after 72 h in darkness: **44-63**
• Culture - Strong sweet (coconut) odor: **absent**
• Culture - Growth on PDA at 40C: **Colony radius > 5 mm after 72 h**
• Part-ascospores - Color: **hyaline**
• Part-ascospores - Shape: **monomorphic**

4.1.2 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยวแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2

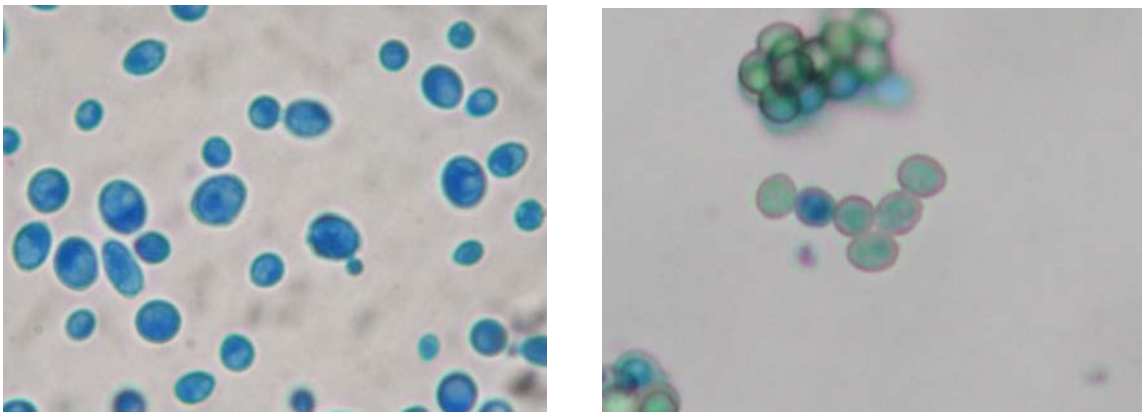
เมื่อนำแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งวายเอ็มเอ ย้อมสีด้วยเมทธิลีน บลูกับเลคโตฟีนอล เปรียบเทียบกับไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 พบว่า แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 ติดสีได้ทั้งเมทธิลีน บลูและเลคโตฟีนอล ขณะที่ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ติดสีจากเมทธิลีนบลูได้บ้างเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8 ลักษณะของเซลล์ราแตกต่างกับเซลล์ยีสต์อย่างเห็นได้ชัด

เซลล์รามีสีเขียวสม่ำเสมอ สปอร์รามีขนาดใกล้เคียงกัน และไม่พบการแตกหน่อของรา แต่พบการแตกหน่อของยีสต์



(ก) แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 -เมธทิลีน บลู (ข) ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 -เมธทิลีน บลู

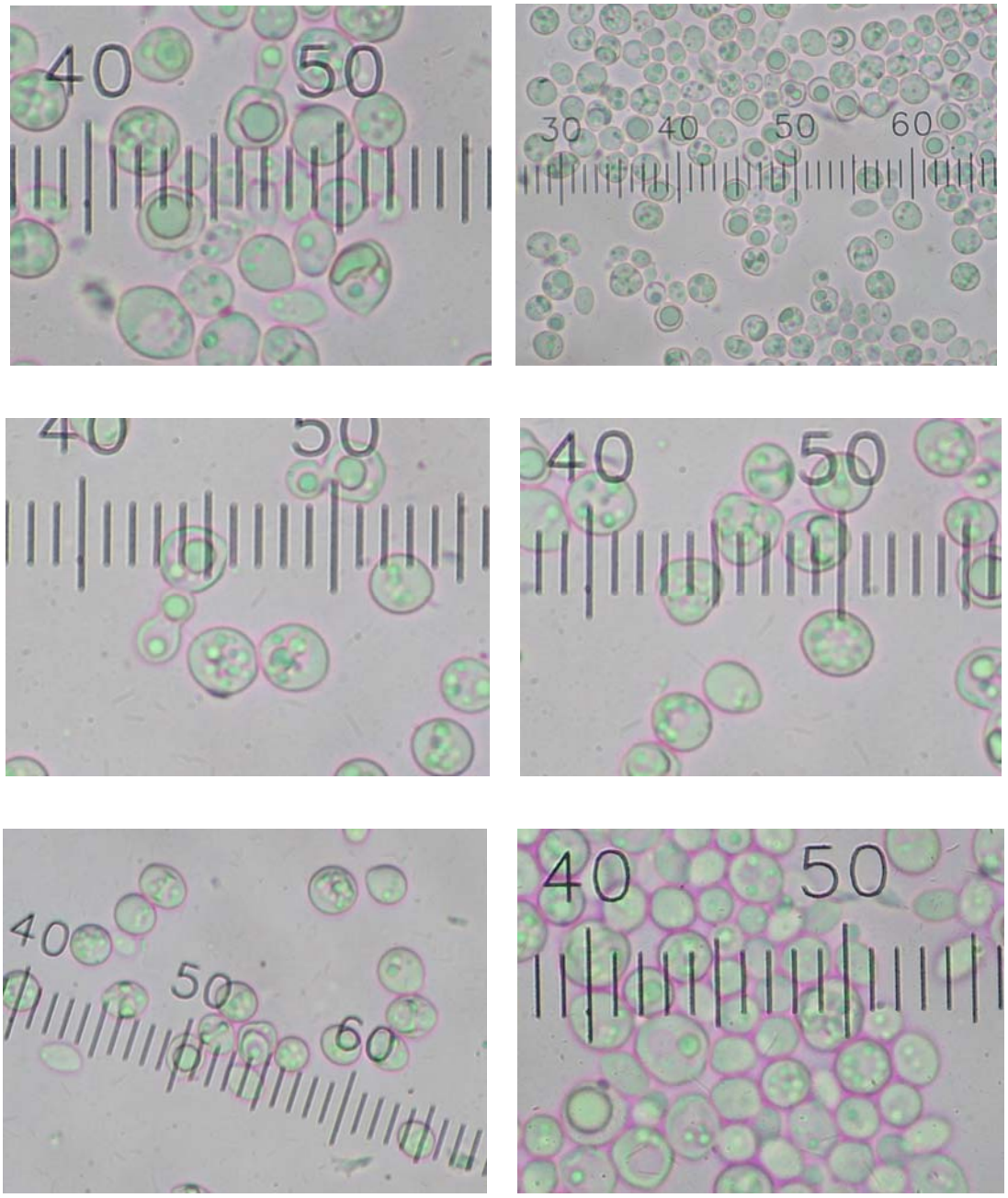
รูปที่ 4.7 การติดสีเมธทิลีนบลูของแซคคาโรมายซิส สีรีวิซิอี RT-P2 และไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1



(ก) แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2-เลคโตฟีนอล (ข) ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1-เลคโตฟีนอล

รูปที่ 4.8 การติดสีเลคโตฟีนอลของแซคคาโรมายซิส สีรีวิซิอี RT-P2 และไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1

เมื่อวัดขนาดความกว้าง-ยาวของเซลล์ยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 จากกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 40 เท่า ดังรูป 4.9 พบว่า ความกว้างและยาวของเซลล์ยีสต์เฉลี่ยในช่วง 5.1-6.4 และ 5.1-7.7 ไมโครเมตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าขนาดของเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าสปอร์รา ซึ่งมีความกว้างในช่วง 2.7-3.2 และความยาวในช่วง 3.5-4.1 ไมโครเมตร

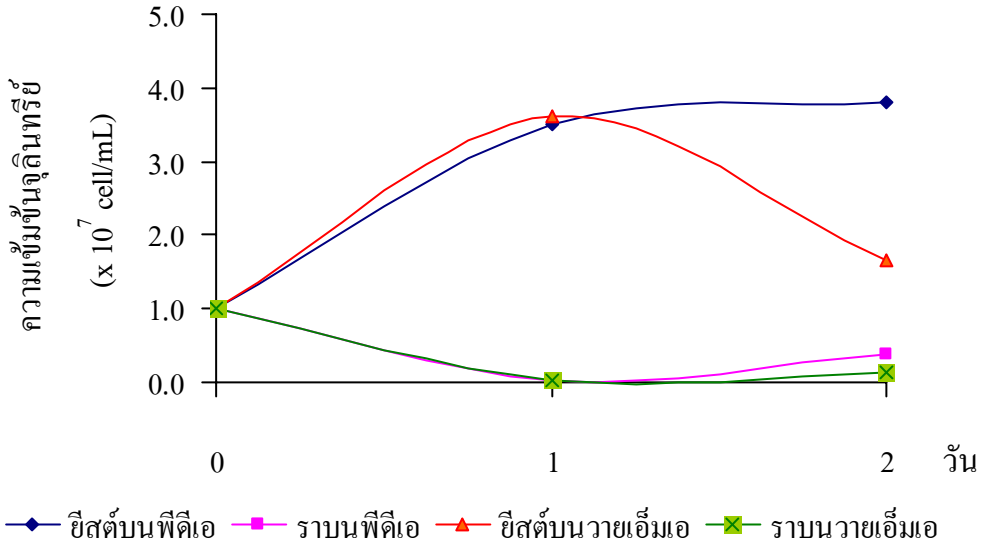


รูปที่ 4.9 ขนาดของเซลล์แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 จากกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 40 เท่า

4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY บนอาหารวุ้นแข็ง 2 ชนิด

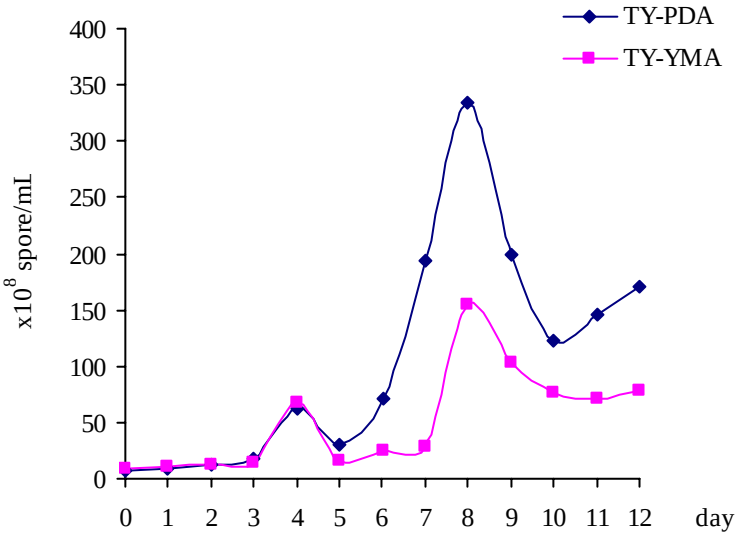
ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY ระหว่างเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 กับแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 บนอาหารวุ้นแข็ง 2 ชนิด คือ พีดีเอและวายเอ็มเอ พบว่า ระยะเวลา 2 วัน สามารถสังเกตเห็นเซลล์ยีสต์และสปอร์ราได้อย่างชัดเจน จึงสามารถวัดความเข้มข้นของยีสต์และราบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอและวายเอ็มเอได้ ดังรูปที่ 4.10 ยีสต์และราเติบโตบนอาหารพีดีเอได้ดีกว่าวายเอ็มเอ ใน

ระยะเวลา 1 วัน ยีสต์เติบโตแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล แต่เชื้อราต้องใช้ระยะเวลาปรับตัวก่อนจึงเติบโตอย่างช้าๆ ใช้เวลาประมาณ 2 วัน บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอและวายเอ็มเอ



รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสม TY บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอและวายเอ็มเอกับระยะวลา 2 วัน

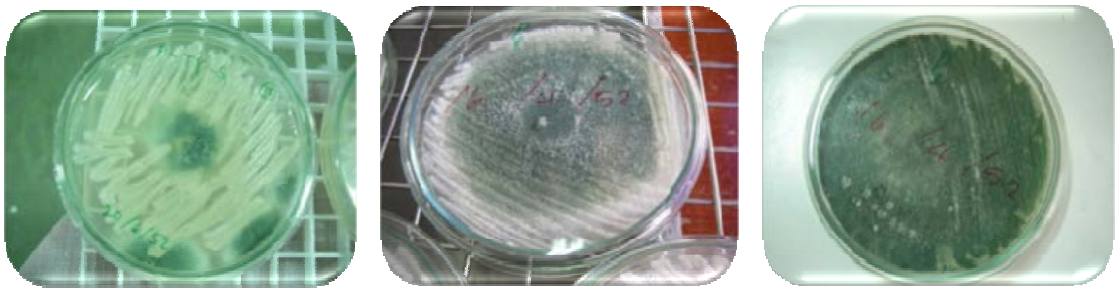
อย่างไรก็ตาม ระยะเวลา 3 วันขึ้นไป ไม่สามารถแยกเซลล์ยีสต์ออกจากสปอร์ราได้ จึงวัดความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสม TY หรือเชื้อผสม TY ของแต่ละวันจนถึง 12 วัน จุลินทรีย์ผสมเติบโตบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอได้ดีกว่าวายเอ็มเอ และเติบโตแบบเอ็กซ์โพเนนเชียลเริ่มจาก 5 วันถึง 8 วัน หลังจากนั้นมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วที่ระยะเวาลา 9 วันขึ้นไป เนื่องจากอาหารไม่เพียงพอต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก ดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 จุลินทรีย์ผสม TY บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอและวายเอ็มเอกับระยะเวลา 12 วัน

4.3 ผลการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ผสมจากจานเพาะเลี้ยงที่อายุ 3วัน 5 วัน และ 7 วัน

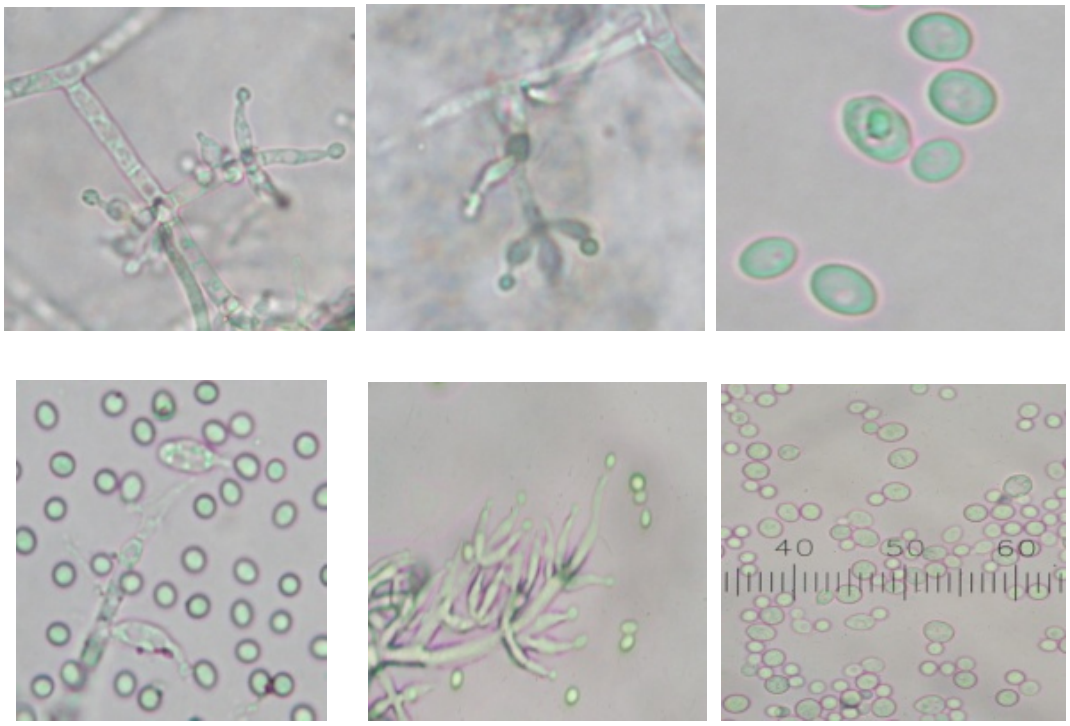
การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *T.reesei* RT-P1 กับ *S .cerevisiae* RT-P2 บนอาหารพีดีเอ โดยใช้การบ่มเชื้อในจานที่ระยะเวลา 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน จะได้เชื้อผสม TY-P อายุ 3 วัน อายุ 5 วัน และ อายุ 7 วัน ตามลำดับ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ผสมอายุ 3 วัน ราสีเขียวตรงกลางยังเติบโตได้น้อยกว่ายีสต์ ซึ่งมีสีขาว เชื้อจุลินทรีย์ผสม TY อายุ 5 วัน พบว่าไมซีเลียมของราเจริญเป็นสีเขียว ขึ้นเกือบเต็มจานเพาะเชื้อ และยังคงมียีสต์ โคโลนีสีขาวอยู่โดยรอบบริเวณขอบจาน ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่อายุ 7 วัน พบว่าไมซีเลียมของราเต็มจานเพาะเชื้อ ดังรูปที่ 4.12



อายุ 3 วัน อายุ 5 วัน อายุ 7 วัน

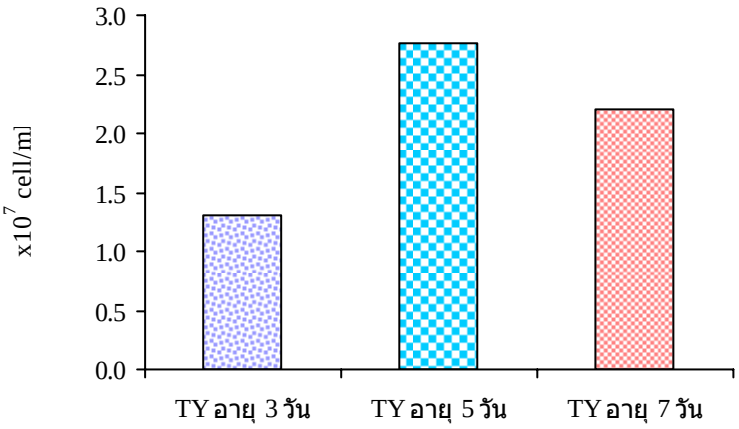
รูปที่ 4.12 เชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *T.reesei* RT-P1 กับ *S .cerevisiae* RT-P2 อายุ 3 วัน 5 วันและ 7 วัน เพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ

ลักษณะของเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ผสม TY จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบการแตกหน่อของยีสต์ รวมทั้งสปอร์ และเส้นใยของราอยู่ร่วมกัน ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 เส้นใยและสปอร์จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อจุลินทรีย์ผสม

ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ผสม TY พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ผสมอายุ 5 วัน มีการเติบโตสูงสุด เมื่อเทียบกับอายุ 3 วันและ 7 วัน ดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 ความเข้มข้นจุลินทรีย์ผสม TY-P บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ อายุ 3 วัน อายุ 5 วัน และอายุ 7 วัน

4.4 ผลของสภาวะการหมักแข็งกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตจุลินทรีย์ผสมชนิดหัวเชื้อสด TY-FS

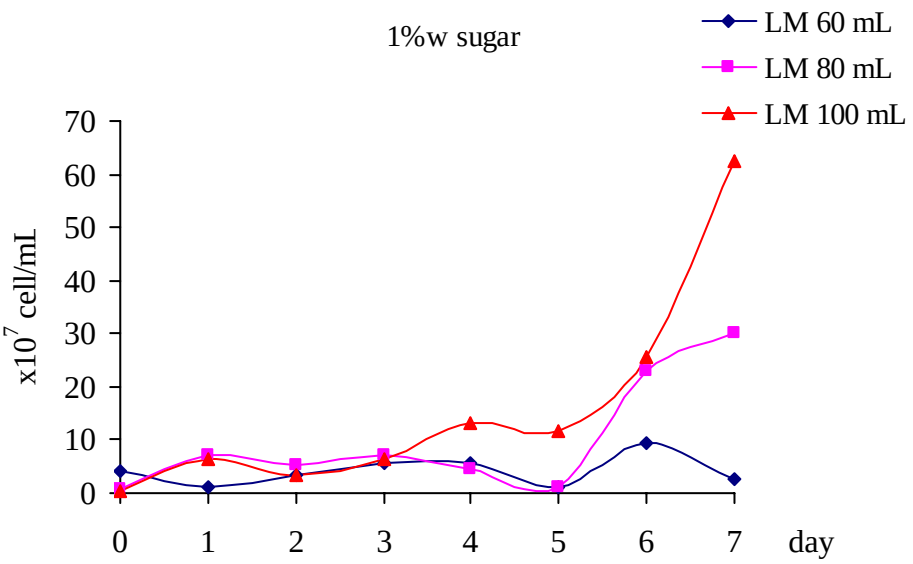
สภาวะการหมักแข็งของกากมันสำปะหลังด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *T. reesei* RT-P1 กับ *S .cerevisiae* RT-P2 กำหนดตัวแปรคงที่คือ

- พีเอชเท่ากับ 5
- อุณหภูมิ 26^{o}C
- กากมันสำปะหลัง 100 กรัม
- เชื้อจุลินทรีย์ผสมจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ
- ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ผสม 2 จานในอาหารเหลว 1 ลิตร

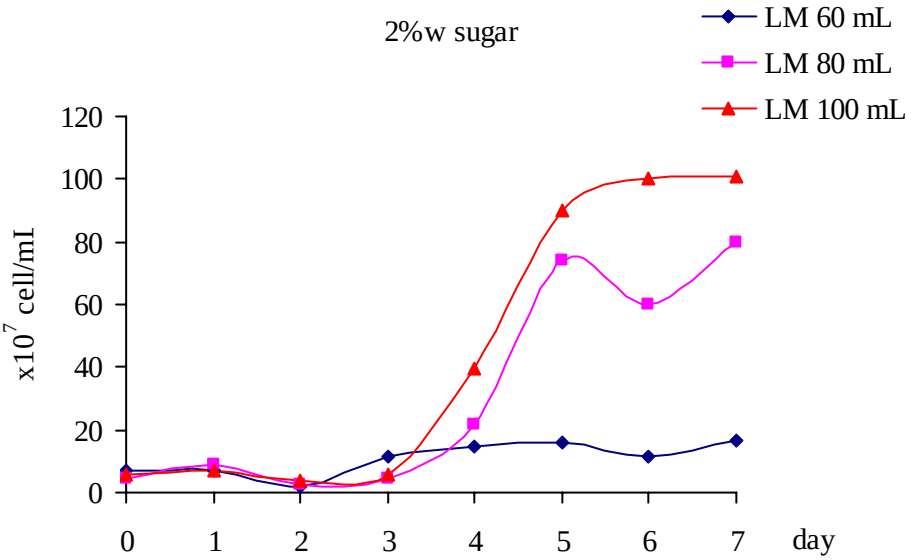
ตัวแปรแปรผัน คือ

- ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวในอาหารเหลว LM-pH5 1%w, 2%w, 3%w และ 4%w
- ปริมาตรอาหารเหลว 60 80 และ 100 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลมะพร้าวในอาหารเหลว LM-pH5 ที่ 1%w, 2%w, 3%w และ 4%w เมื่อใช้อาหารเหลวปริมาตร 60 mL, 80 mL และ 100 mL สำหรับการหมักแข็งกากมันสำปะหลัง 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 26 ^{o}C ที่สภาวะดังกล่าว ความชื้นเริ่มต้นมีค่าเฉลี่ยประมาณ 44%w, 49%w และ 56%w พบว่า ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมมีค่าประมาณ 55%w พิจารณาจากเชื้อจุลินทรีย์ผสมเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเหลว LM-pH5ปริมาตร 100 mL ที่ 1%w , 2%w, 3%w และ 4%w น้ำตาลมะพร้าวใน LM-pH5 ดังรูปที่ 4.15 ถึง 4.18 เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของจุลินทรีย์ผสมที่ความเข้มข้นดังกล่าวในอาหารเหลวปริมาตร 100 mL พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าว 4% ระยะเวลาเอ็กซ์โพเนนเชียลของจุลินทรีย์ผสมเริ่มตั้งแต่วันแรกจนถึง 3 วัน ขณะที่ความเข้มข้น 3%w น้ำตาลมะพร้าว ระยะเวลาเอ็กซ์โพเนนเชียลของ



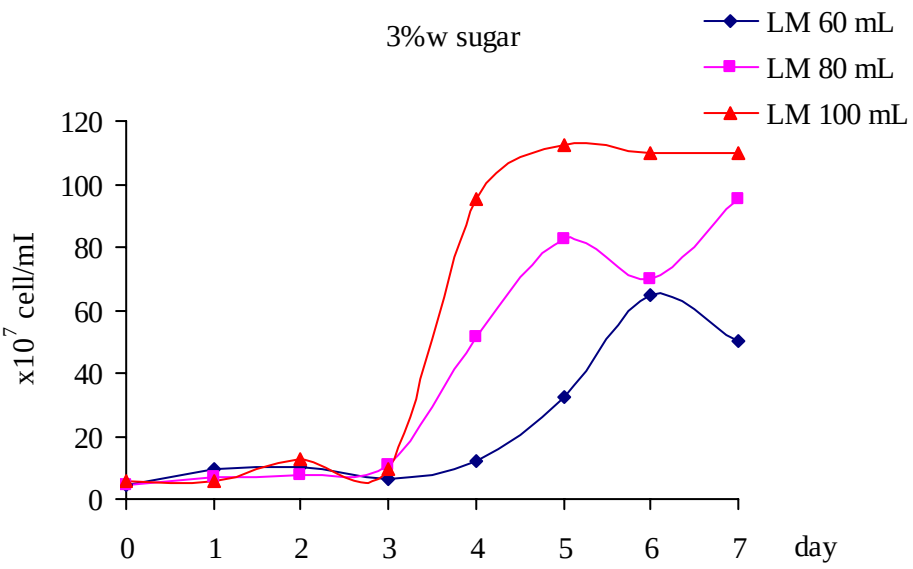
รูปที่ 4.15 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมกับเวลาของการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วย 1 %w น้ำตาลมะพร้าวในปริมาตรอาหารเหลว 60, 80 และ 100 mL



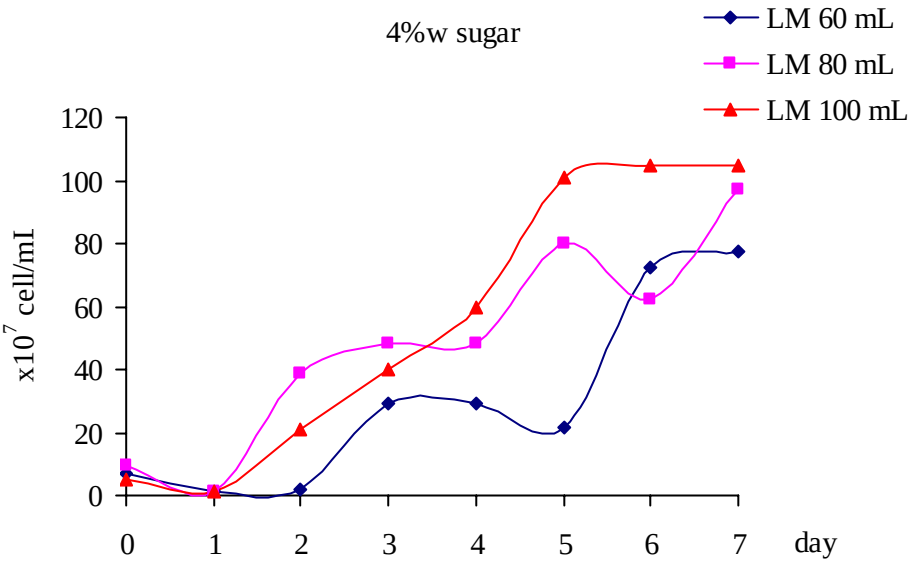
รูปที่ 4.16 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมกับเวลาของการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วย 2 %w น้ำตาลมะพร้าวในปริมาตรอาหารเหลว 60, 80 และ 100 mL

จุลินทรีย์ผสมคือ 3 วัน เติบโตสูงสุดที่ระยะเวลา 5 วัน และเส้นกราฟมีความชันมากกว่าความเข้มข้น 1%w, 2%w และ 4%w ดังรูปที่ 4.19

น้ำตาลในอาหารเหลวที่มากกว่า 3%w ให้ผลดีช่วงเริ่มต้น เพราะจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างเหลือเฟือ อย่างไรก็ตาม การเติบโตอย่างรวดเร็วทำให้ไม่สามารถรักษาความชื้นในกากมันสำปะหลังไว้ได้ จึงทำให้การเติบโตลดลงที่ระยะเวลา 3 วันขึ้นไป ความสัมพันธ์ระหว่างการเติบโตของจุลินทรีย์และความชื้นของกากมันสำปะหลัง ดังรูปที่ 4.20



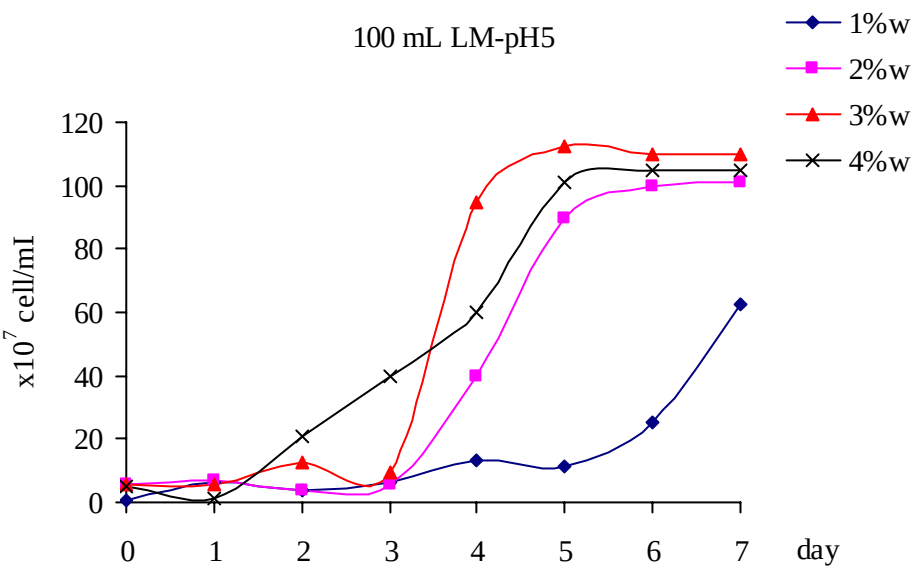
รูปที่ 4.17 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมกับเวลาของการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วย 3 %w น้ำตาลมะพร้าวในปริมาตรอาหารเหลว 60, 80 และ 100 mL



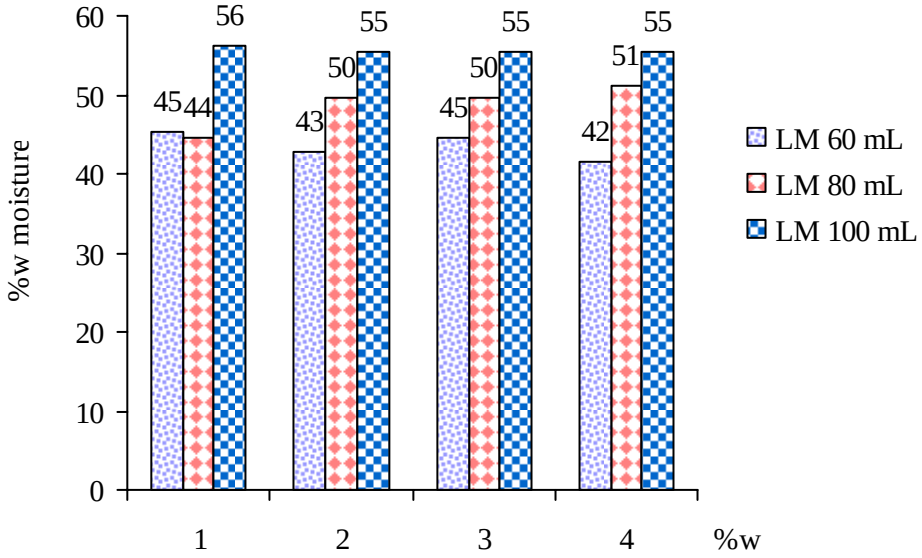
รูปที่ 4.18 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมกับเวลาของการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วย 4 %w น้ำตาลมะพร้าวในปริมาตรอาหารเหลว 60, 80 และ 100 mL

นั่นคือ ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวในอาหารเหลว LM-pH5 และปริมาตรที่เหมาะสมคือ 3%w และ 100 mL ดังนั้น จึงใช้สภาวะนี้เพื่อเปรียบเทียบอายุจุลินทรีย์ผสมที่ใช้ในการหมักแข็งกากมันสำปะหลัง ผลจากการทดลองดังรูปที่ 4.21 ถึงรูปที่ 4.23 อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลินทรีย์ผสมอายุ 5 วัน มีระยะเวลาปรับตัว (lag phase) น้อยที่สุดคือประมาณ 1-2 วัน และการเติบโตแบบเอ็กซ์โพเนนเชียลเริ่มที่ 4 วัน นั่นคือระยะเวลาที่ต้องการใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสมบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอและการ

หมักแข็งบนกากมันสำปะหลังคือระยะเวลา 5 วัน ที่ 3%w น้ำตาลมะพร้าวในอาหารเหลว LM-pH5 ปริมาตร 100 mL



รูปที่ 4.19 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมกับเวลาของการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วย 1%w, 2%w, 3%w และ 4 %w น้ำตาลมะพร้าวในปริมาตรอาหารเหลว 100 mL

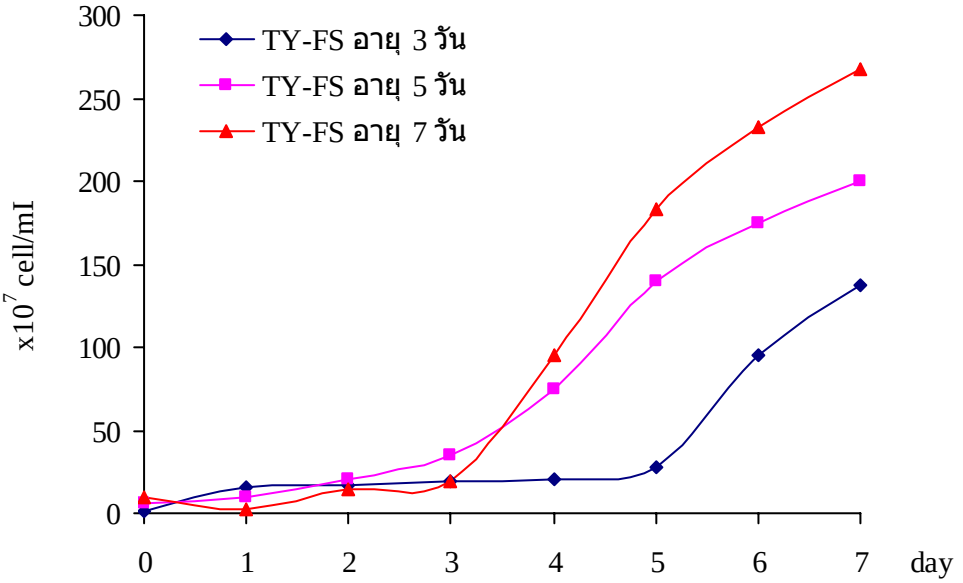


รูปที่ 4.20 ความชื้นเริ่มต้นของการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วยจุลินทรีย์ผสมที่ 1%w, 2%w, 3%w และ 4 %w น้ำตาลมะพร้าวในปริมาตรอาหารเหลว LM-pH5 เท่ากับ 60, 80 และ 100 mL

ในกากมันสำปะหลัง 100 กรัม และเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเหลว LM-pH5 ประมาณ 1×10^7 cell/mL ความชื้นเริ่มต้นของการหมักแข็งที่สภาวะนี้มีค่าประมาณ 56%w

ผลการหมักกากมันสำปะหลังปริมาณ 100 กรัม โดยใช้ 3%w น้ำตาลมะพร้าวในอาหารเหลว LM-pH5 ปริมาตร 100 mL (ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 55%w) ด้วยจุลินทรีย์ผสม (TY-P) ที่ได้จากการ

เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเออายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ใช้ระยะเวลาในการหมักแข็งนาน 5 วัน พบว่า ระยะเวลา 3 วันของการหมักแข็ง จุลินทรีย์ผสมชนิดหัวเชื้อสด (TY-FS) อายุ 5 วัน เริ่มเติบโตได้ดีกว่าอายุ 3 วัน และ 7 วัน และระยะเวลาของการเติบโตแบบเอ็กซ์โพเนนเชียลคือ 3 วันเป็นต้นไป อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลินทรีย์ผสมอายุ 7 วัน มีการเติบโตดีกว่าอายุ 5 วัน พิจารณาได้จากความชันของกราฟและค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่ระยะเวลาของการหมัก 5 วัน ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตจุลินทรีย์ผสมชนิดหัวเชื้อสด (TY-FS) จากการหมักแข็งกากมันสำปะหลัง 100 กรัม คือใช้น้ำตาลมะพร้าว 3%w ในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ เชื้อจุลินทรีย์อายุ 7 วัน มีเติบโตที่มากที่สุด ดังรูปที่ 4.21 และจุลินทรีย์ผสมชนิดหัวเชื้อสดที่ได้จากการหมัก ดังรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.21 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมที่ได้ (TY-FS) จากการหมักกากมันสำปะหลังด้วยจุลินทรีย์ผสมบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (TY-P) อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน กับระยะเวลานาน 5 วัน

อายุ 3 วัน อายุ 5 วัน อายุ 7 วัน

รูปที่ 4.22 จุลินทรีย์ผสมชนิดหัวเชื้อสดจากการหมักแข็งกากมันสำปะหลัง อายุ 3 วัน 5 วันและ 7 วัน

วิธีการผลิตเชื้อผสมชนิดผงแห้ง ซึ่งใช้ตัวย่อ TY-DP ทำได้โดยการนำเชื้อผสม TY-FS อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน มาอบแห้งในตู้อบที่ 60°C นาน 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อผสม TY-DP มีความชื้นสุดท้ายไม่เกิน 13%w ดังรูปที่ 4.23

รูปที่ 4.23 จุลินทรีย์ผสมชนิดผงแห้งจากการอบแห้งเชื้อผสมชนิดหัวเชื้อสด TY-FS

4.5 การเปรียบเทียบจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวและผสมจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

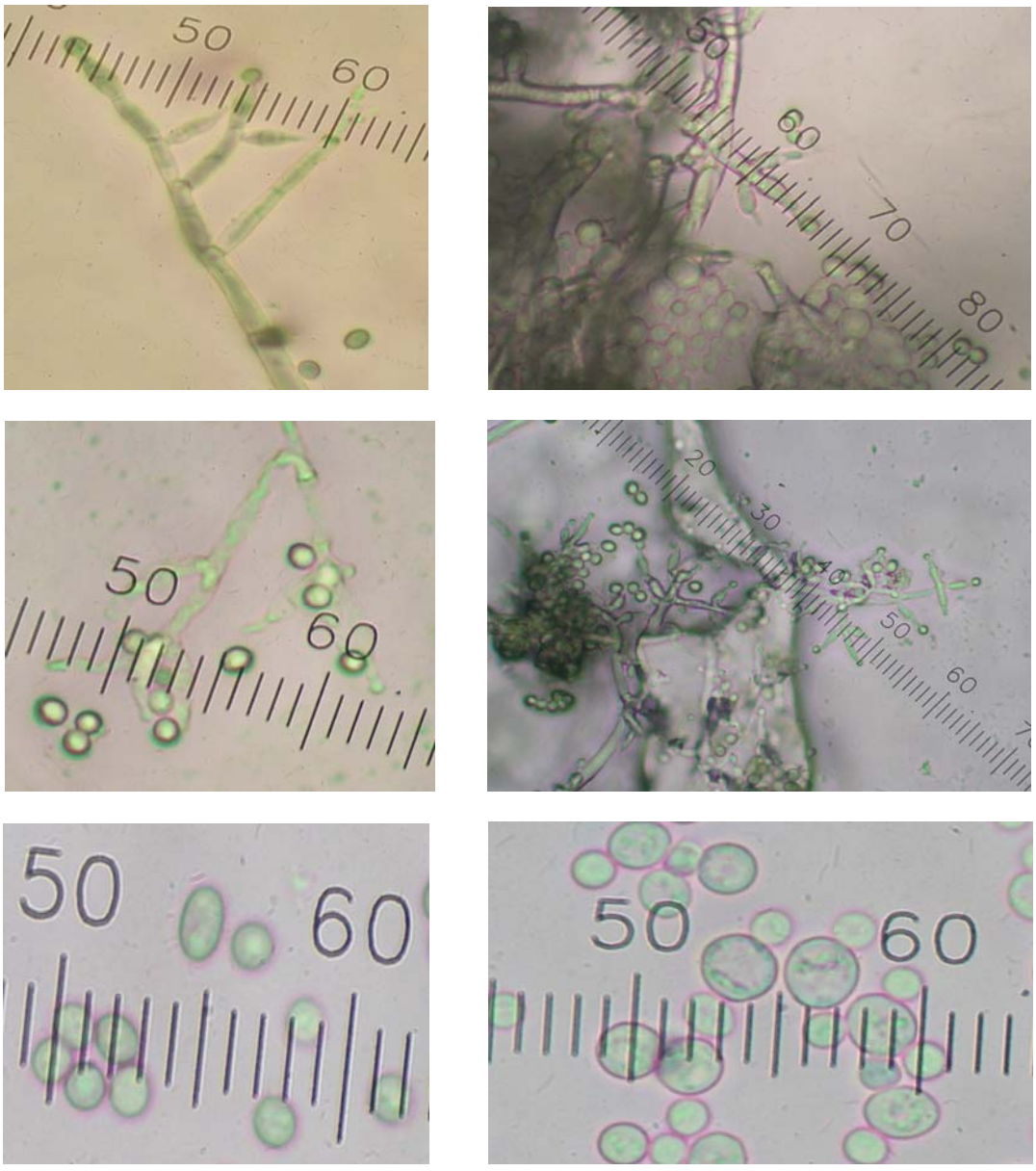
ผลของขนาดและรูปร่างลักษณะของเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 และเชื้อผสมระหว่างเชื้อเดี่ยวทั้งสอง จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบกำลังขยาย 40 เท่า ใช้สัญลักษณ์และคำย่อดังตารางที่ 4.2 พบว่า ขนาดสปอร์ของเชื้อเดี่ยวเล็กกว่าเชื้อผสมด้านกว้างและยาว ดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.24 ถึงรูปที่ 4.27

ตารางที่ 4.2 สัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้แทนเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

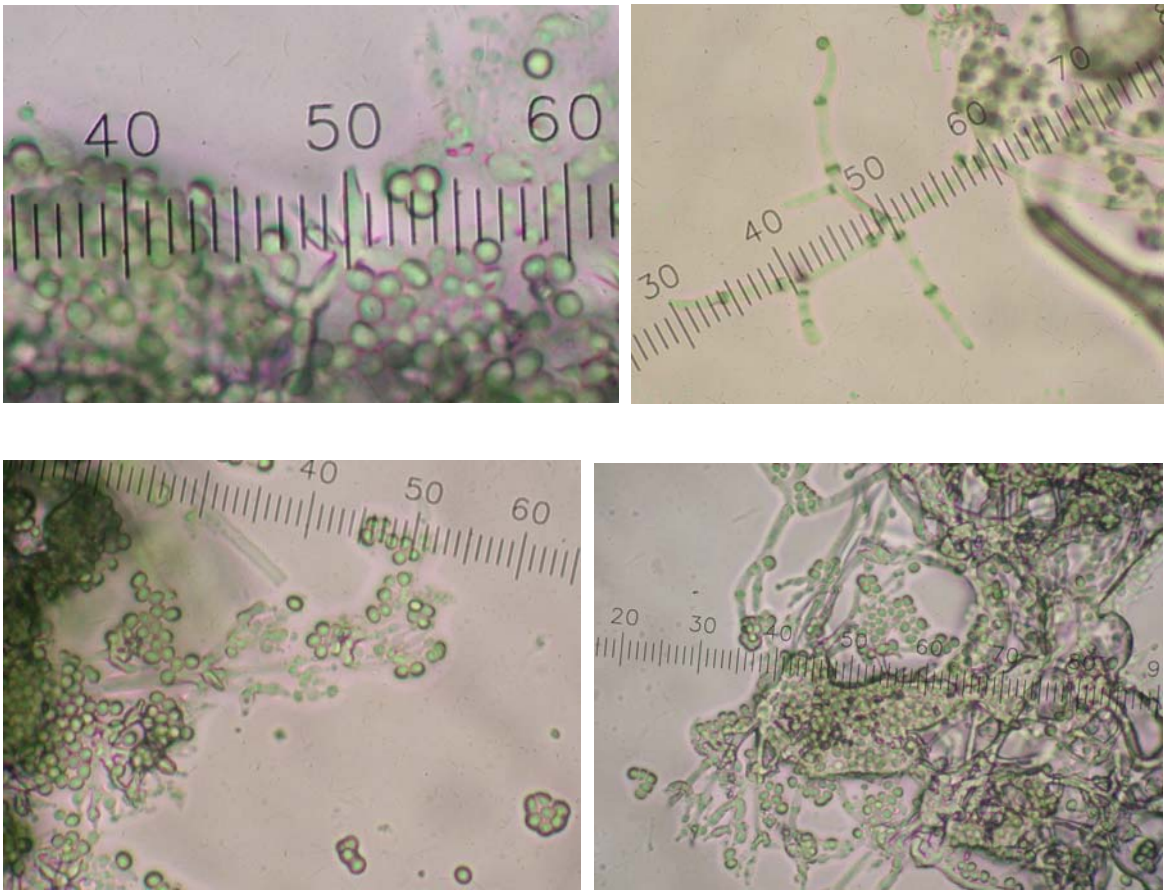
สัญลักษณ์และคำย่อ	หมายถึง
T-P	ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ
T-FS	ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากการหมักแข็งบนกากมันสำปะหลังในอาหารเหลว LM-pH5
TY-P	เชื้อผสมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสอี RT-P2 บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอจานเดียวกัน
TY-FS	เชื้อผสมจากจากการหมักแข็งบนกากมันสำปะหลังในอาหารเหลว LM-pH5 ด้วยเชื้อผสม TY-P

ตารางที่ 4.3 ขนาดของ T-P, Y-P, TY-P และ TY-FS จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า

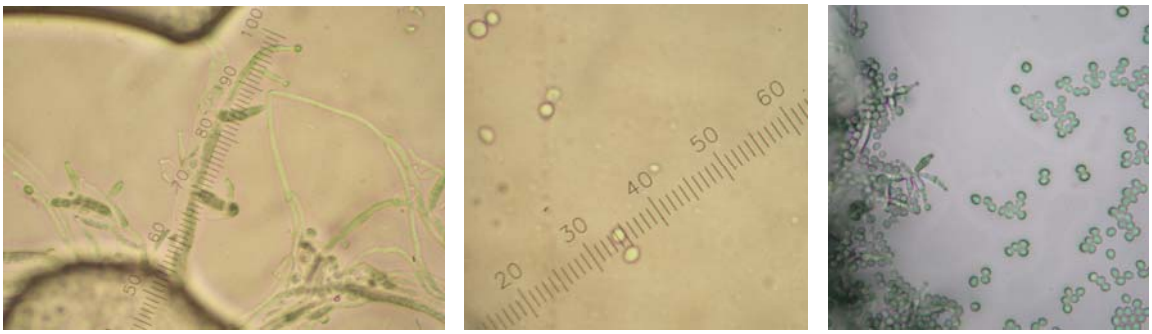
จุลินทรีย์	ส่วนประกอบและขนาด (μm)						รูปที่
	สปอร์ รูปทรงกลมรี		ก้านชูสปอร์		โคนิดิโอฟอร์		
	กว้าง	ยาว	กว้าง	ยาว	กว้าง	ยาว	
T-P	2.70-3.07	3.39-4.70	2.60-3.20	7.58-12.67	1.70-4.35	15.9-28.67	4.24
T-FS	2.46-3.58	3.28-4.17	3.52-3.99	11.34-12.08	3.96-4.03	12.80-30.12	4.25
TY-P	2.88-5.23	4.35-5.92	3.03-3.07	12.25-14.59	3.59-5.97	25.60-30.29	4.26
TY-FS	2.73-3.75	3.58-4.61	2.05-3.07	10.29-11.52	3.18-4.81	18.39-23.04	4.27



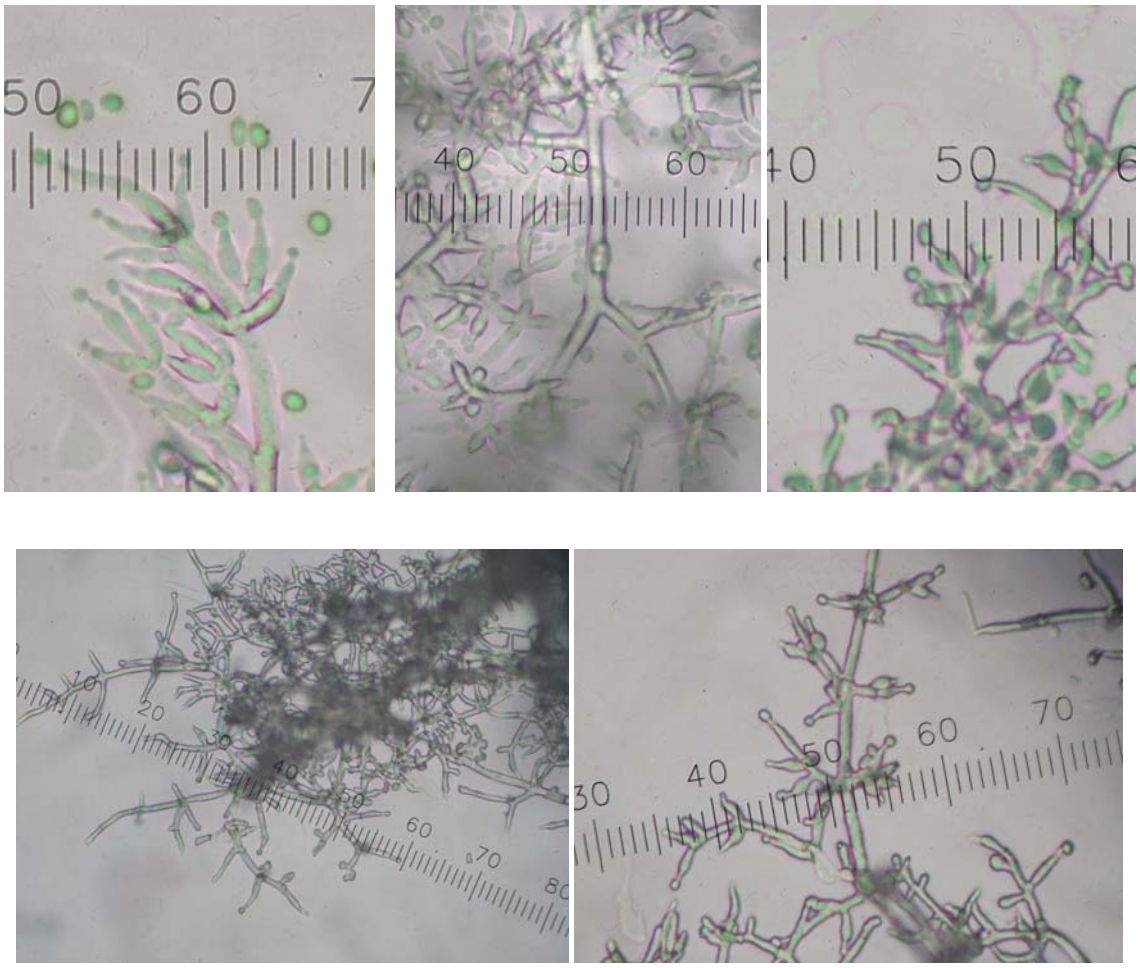
รูปที่ 4.24 ส่วนประกอบและขนาดของจุลินทรีย์บริสุทธิ์บนจานอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ T-P



รูปที่ 4.25 ส่วนประกอบและขนาดของจุลินทรีย์บริสุทธิ์บนกากมันสำปะหลังชนิดเชื้อเดี่ยวสด T-FS



รูปที่ 4.26 ส่วนประกอบและขนาดของจุลินทรีย์ผสมบนจานอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ TY-P



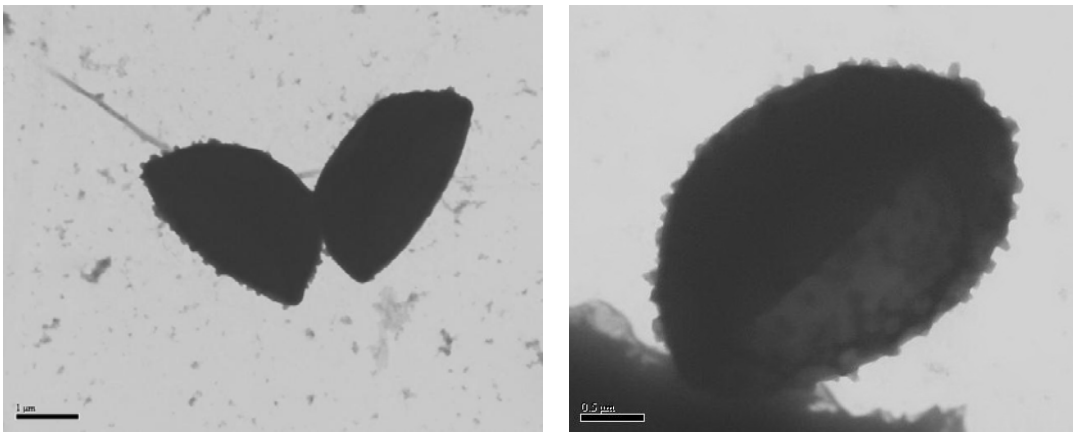
รูปที่ 4.27 ส่วนประกอบและขนาดของจุลินทรีย์ผสมบนกากมันสำปะหลังเชื้อผสมชนิดสด TY-FS

4.6 เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของเชื้อเดี่ยวและผสมจากการส่องด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

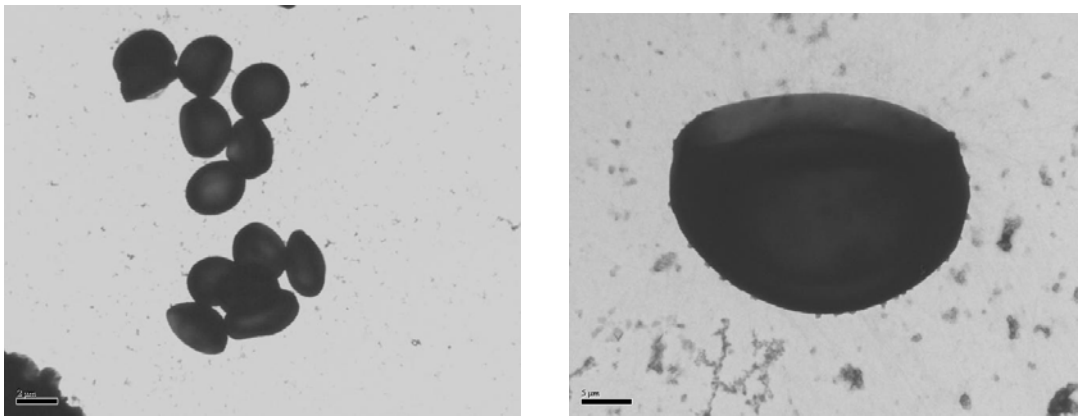
เนื่องจากการเติบโตของเชื้อผสม TY-FS อายุ 3 วัน บนกากมันสำปะหลังใช้เวลาในการปรับตัวนานมากกว่า TY-FS อายุ 5 วันและ 7 วัน และความเข้มข้นของเชื้อผสมมีค่าน้อยที่สุด ดังรูปที่ 4.21 ดังนั้น จึงใช้เชื้อผสม TY-FS อายุ 5 วัน และ 7 วัน เพื่อการเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเชื้อเดี่ยวและผสมใช้เชื้อที่อายุ 5 วันและ 7 วันจากภาพถ่ายด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) จุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวคือไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 (T-P) และแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 (Y-P) โดยที่ใช้สัญลักษณ์และคำย่อ ดังตารางที่ 4.4 พบว่า เซลล์ของทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางรูปทรง ขนาด และผิวอย่างมีนัยสำคัญ ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 อายุ 5 วัน มีรูปร่างลักษณะกลมค่อนข้างเป็นรูปไข่ มีผิวขรุขระและหนามอยู่ที่ผิว ส่วนไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 อายุ 7 วัน มีรูปร่างเหมือนอายุ 5 วัน มีหนามที่ผิวน้อยกว่า ดังรูปที่ 4.28 ส่วนแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 มีรูปร่างลักษณะกลม มีการแตกหน่อและอยู่กันเป็นลูกโซ่ ผิวเรียบ ไม่มีหนามที่ผิว ดังรูปที่ 4.29

ตารางที่ 4.4 สัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้แทนเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

สัญลักษณ์และคำย่อ	หมายถึง
T-P	ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ
T-DP	ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 จากการหมักแข็งบนกากมันสำปะหลังในอาหารเหลว LM-pH5 ชนิดผงแห้ง
TY-P	เชื้อผสมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสอี RT-P2 บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอจานเดียวกัน
TY-DP	เชื้อผสมจากจากการหมักแข็งบนกากมันสำปะหลังในอาหารเหลว LM-pH5 ด้วยเชื้อผสม TY-P ชนิดผงแห้ง

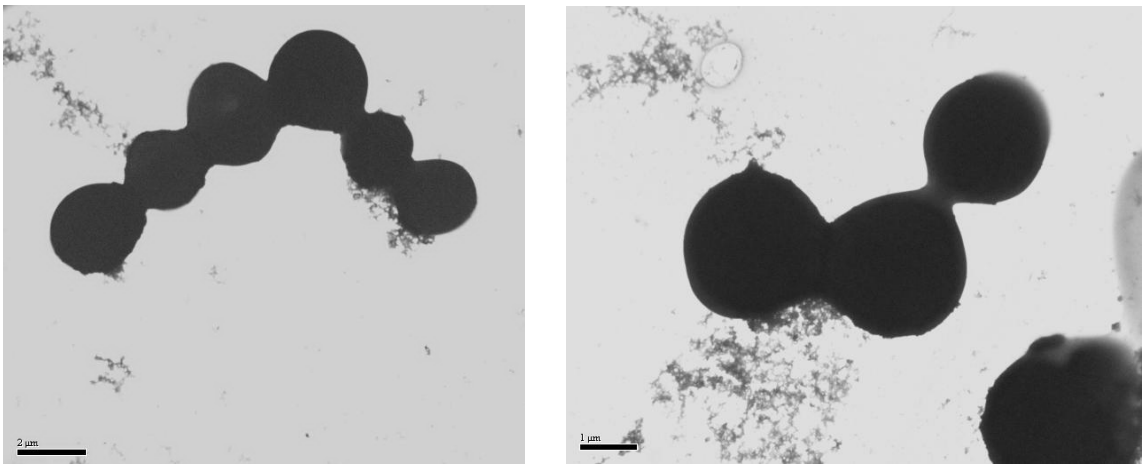


อายุ 5 วัน

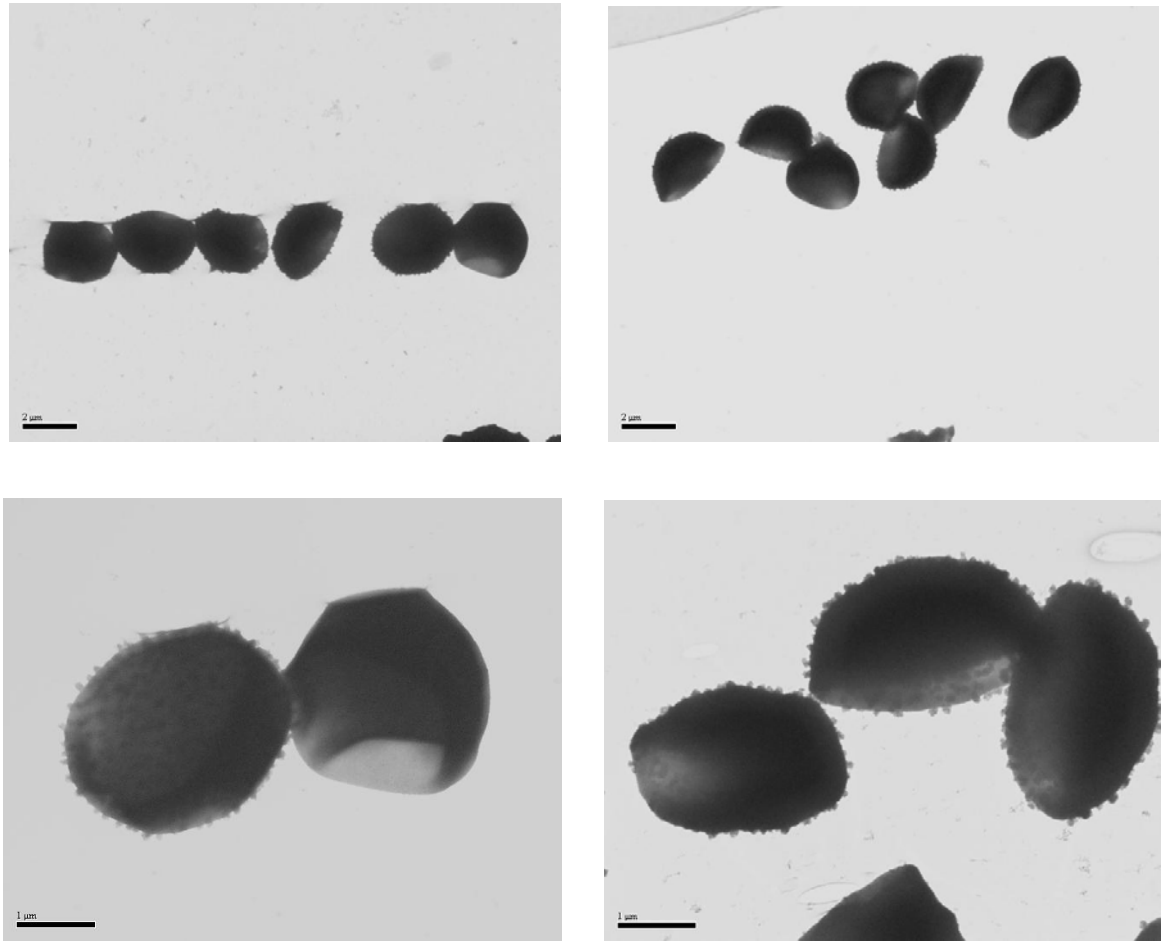


อายุ 7 วัน

รูปที่ 4.28 ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 (T-P) อายุ 5 วัน และ 7 วัน จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



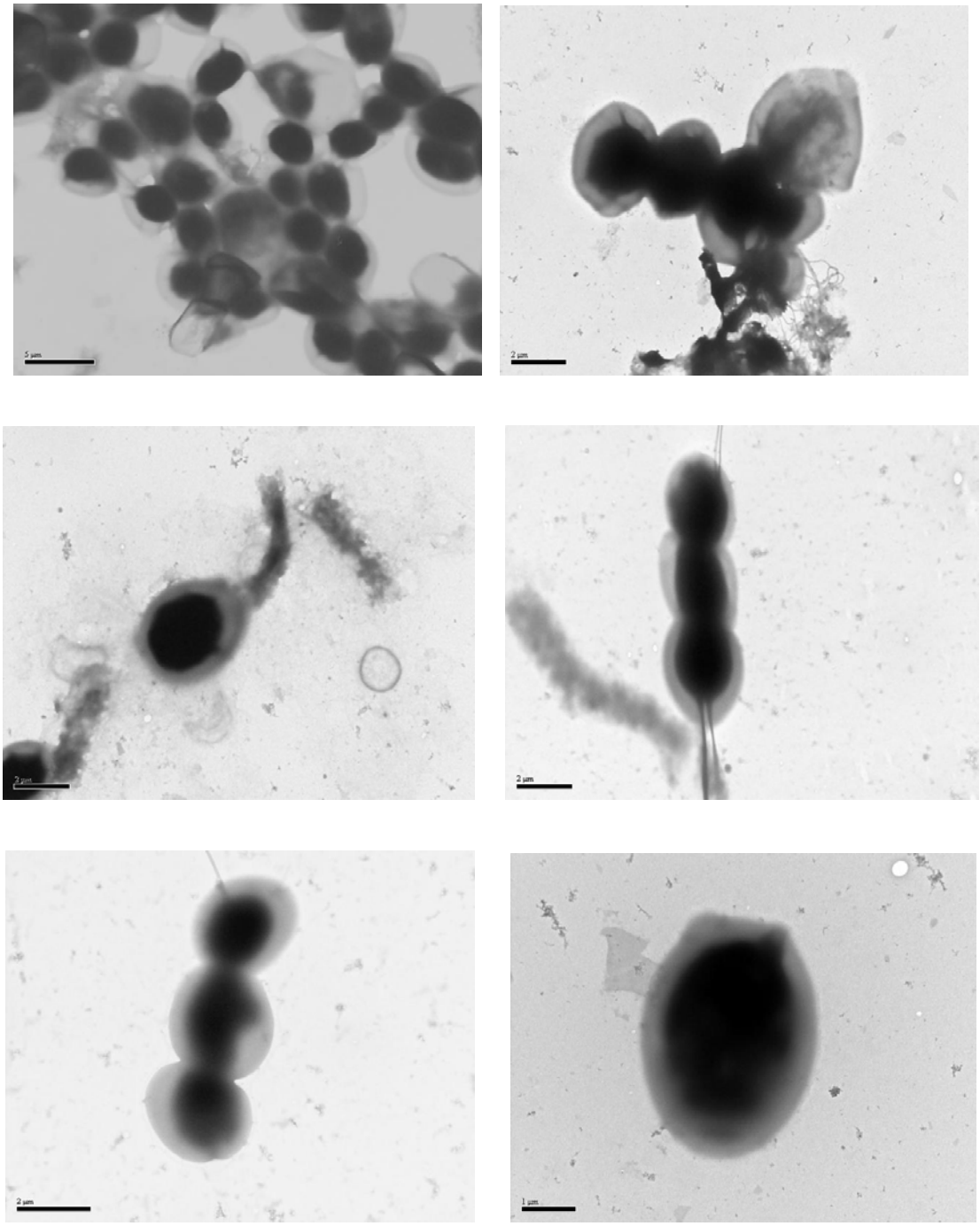
รูปที่ 4.29 แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 ที่มีสีขาวจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



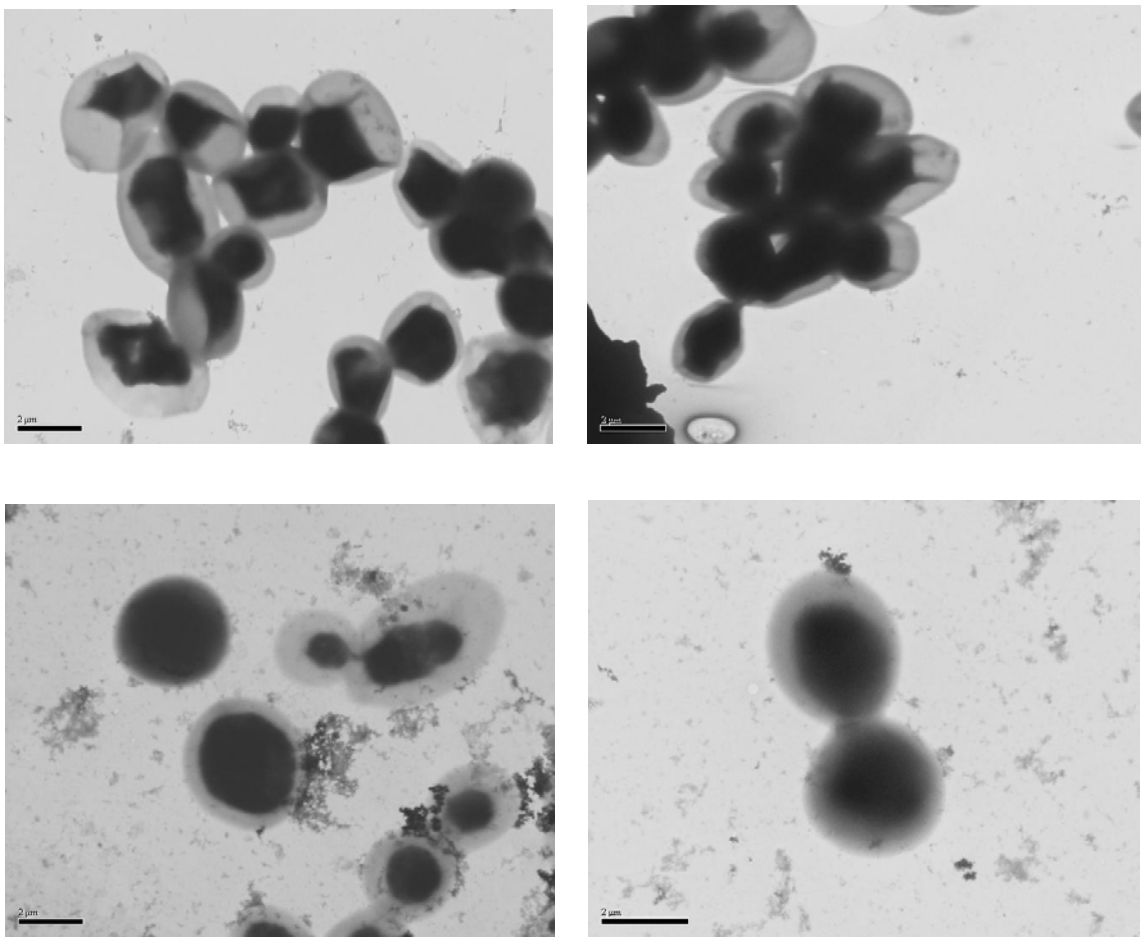
รูปที่ 4.30 เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีสีเขียว (TY-P) อายุ 5 วัน จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เปรียบเทียบไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เชื้อเดี่ยว (T-P) และเชื้อจุลินทรีย์ผสม (TY-P) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอที่อายุ 5 วัน พบว่า จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เชื้อจุลินทรีย์ผสม

(TY-P) ที่มีสีเขียว มีรูปร่างลักษณะเหมือนไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เชื้อเดี่ยว (T-P) ดังรูปที่ 4.30 แตกต่างกับเชื้อผสม TY-P ที่มีสีเขียวปนขาว ซึ่งพบว่ามีรูปร่างลักษณะกลมรี เรียงตัวกัน ผิวเรียบและไม่มีหนามที่ผิว เหมือนกับ TY-P ที่มีสีขาวเพียงอย่างเดียว ดังรูปที่ 4.31 และรูปที่ 4.32 ตามลำดับ



รูปที่ 4.31 เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีสีเขียวปนขาว (TY-P) อายุ 5 วัน จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

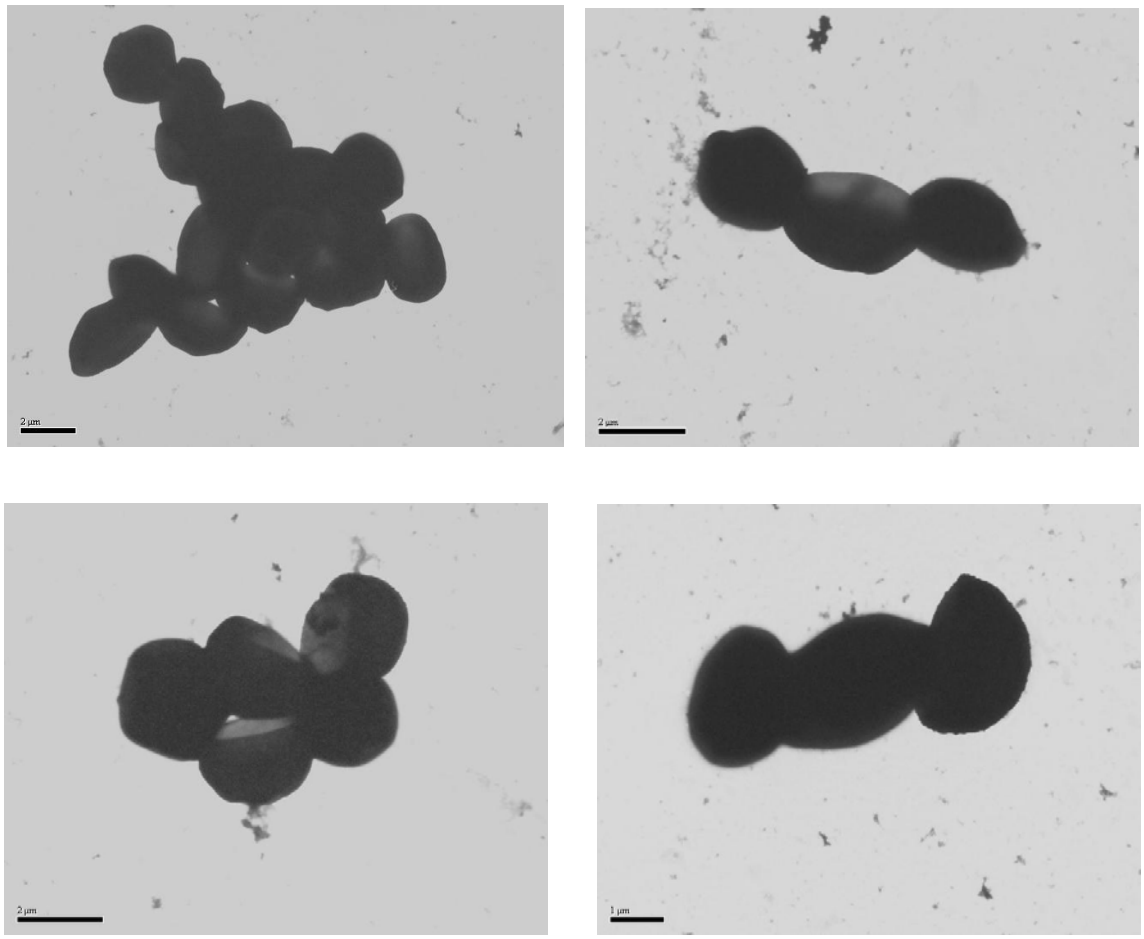


รูปที่ 4.32 เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีสีขาว (TY-P-W) อายุ 5 วัน จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

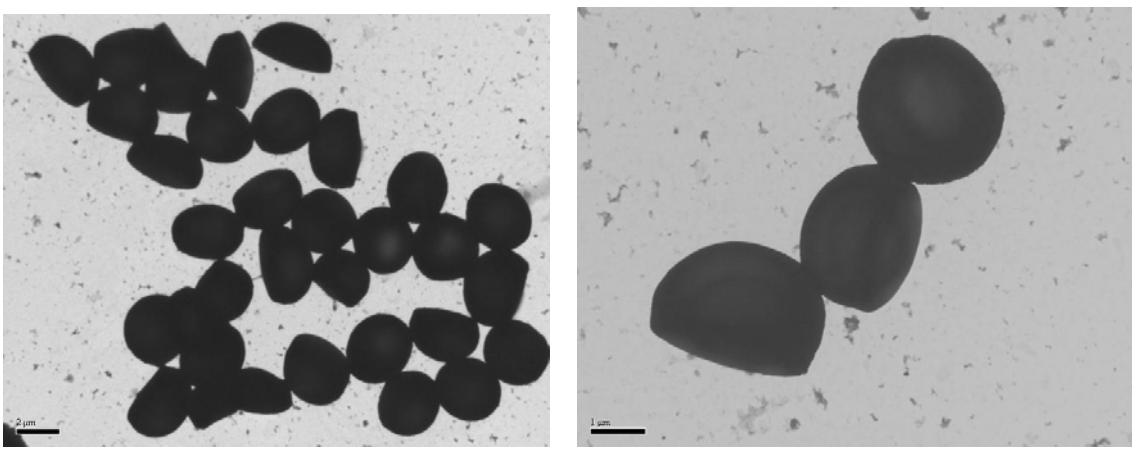
แสดงให้เห็นว่าการผสมเชื้อสองสายพันธุ์โดยนำมาเลี้ยงร่วมกันบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอทำให้ลักษณะของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เชื้อเดี่ยว (T-P) อย่างชัดเจน

สำหรับเชื้อผสม TY-P อายุ 7 วัน บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอจะมีสีเขียวสม่ำเสมอ ภาพจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า มีรูปร่างลักษณะกลมรี เรียงตัวกันคล้ายสายโซ่ ผิวเรียบไม่มีหนามที่ผิว ดังรูปที่ 4.33 แสดงให้เห็นว่า มีการเปลี่ยงแปลงของเซลล์เกิดขึ้นจริงเหมือนกับเชื้อผสม TY-P อายุ 5 วัน แต่ลักษณะของเซลล์เชื้อผสม TY-P อายุ 5 วัน รูปร่างไม่ทึบเหมือนอายุ 7 วัน

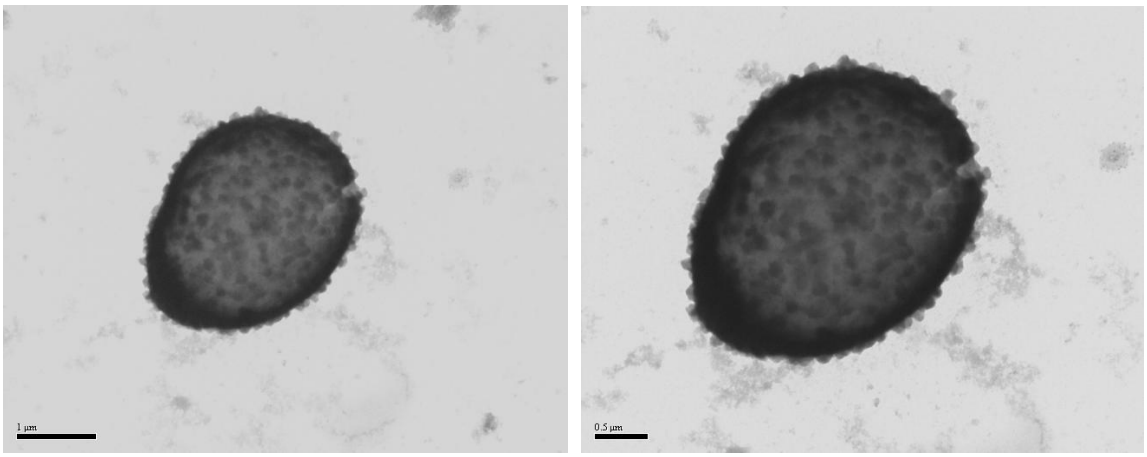
เชื้อผสม TY-P อายุ 5 วันที่มีสีเขียวปนขาว ลักษณะการเรียงตัวของเซลล์เป็นสายโซ่ ผิวเรียบคล้ายกับยีสต์เชื้อเดี่ยว เพียงแต่มีสีขาวรอบๆ เซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นเส้นใยของเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี มาคลุมเซลล์ยีสต์ระหว่างการเพาะเลี้ยงร่วมกัน ซึ่งจะไม่พบลักษณะนี้กับเชื้อผสม TY-P อายุ 7 วัน ดังนั้น เชื้อผสมอายุ 7 วัน มีความคล้ายคลึงกับยีสต์เชื้อเดี่ยว มากกว่าอายุ 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบเชื้อผสม TY-P อายุ 7 วันกับเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี อายุ 7 วันเท่ากัน พบว่ามีรูปร่างลักษณะเซลล์แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.34



รูปที่ 4.33 เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีสีเขียว (TY-P-G) อายุ 7 วัน จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



รูปที่ 4.34 เชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี (T-P) อายุ 7 วัน จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

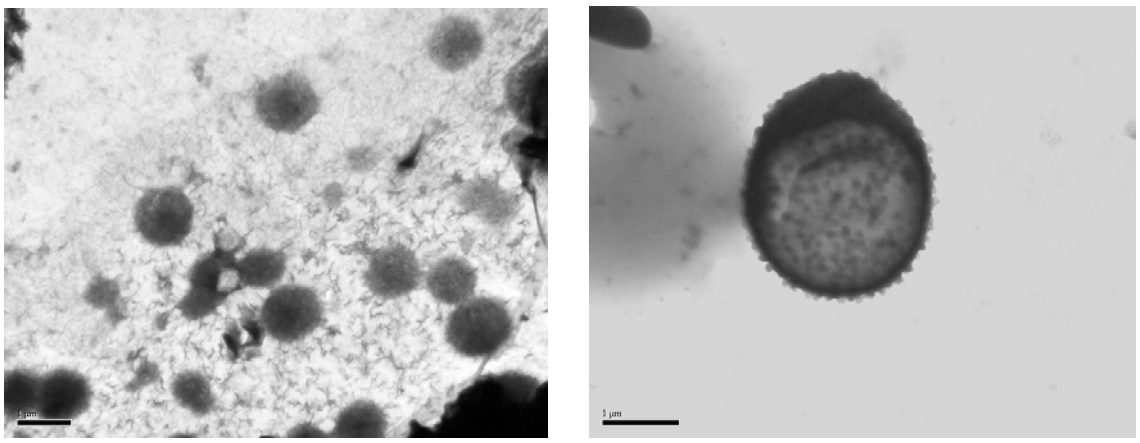


T-DP อายุ 5 วัน T-DP อายุ 7 วัน

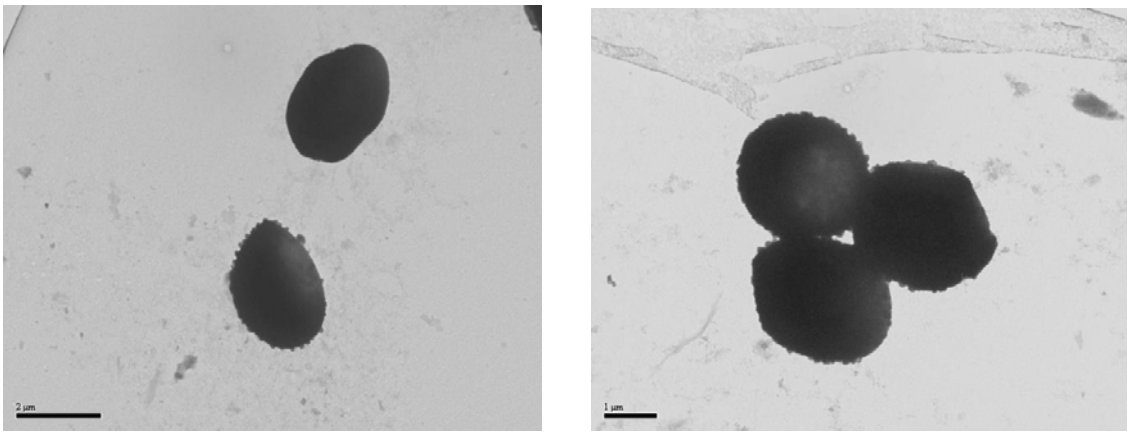
รูปที่ 4.35 เชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี ชนิดผงแห้ง (T-DP) อายุ 5 วัน และ 7 วันจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เปรียบเทียบไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ชนิดผงแห้ง (T-DP) อายุ 5 วัน และ 7 วัน กับไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ชนิดสด (T-P) ที่อายุเท่ากันจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า T-DP อายุ 5 วัน และ 7 วันมีรูปร่างลักษณะกลมรี ผิวขรุขระ มีหนามอยู่ที่ผิวเหมือนกันและไม่มีความแตกต่างกับ T-P ที่อายุเท่ากัน ดังรูปที่ 4.28 และ รูปที่ 4.35

จุลินทรีย์ผสมชนิดผงแห้ง (TY-DP) ที่อายุ 5 วัน พบว่า ลักษณะรูปร่างกลม ผิวไม่เรียบ มีการแตกหน่อ ดังรูปที่ 4.36 สำหรับ TY-DP อายุ 7 วัน พบว่า แตกต่างจาก TY-DP อายุ 5 วัน ตรงที่ไม่พบการแตกหน่อและไม่มีเส้นใยคลุม อย่างไรก็ตาม ลักษณะรูปร่างเหมือนกับ T-DP อายุ 7 วัน ดังรูปที่ 3.37



รูปที่ 4.36 เชื้อผสมชนิดผงแห้ง (TY-DP) อายุ 5 วัน จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



รูปที่ 4.37 เชื้อผสมชนิดผงแห้ง (TY-DP) อายุ 7 วัน จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

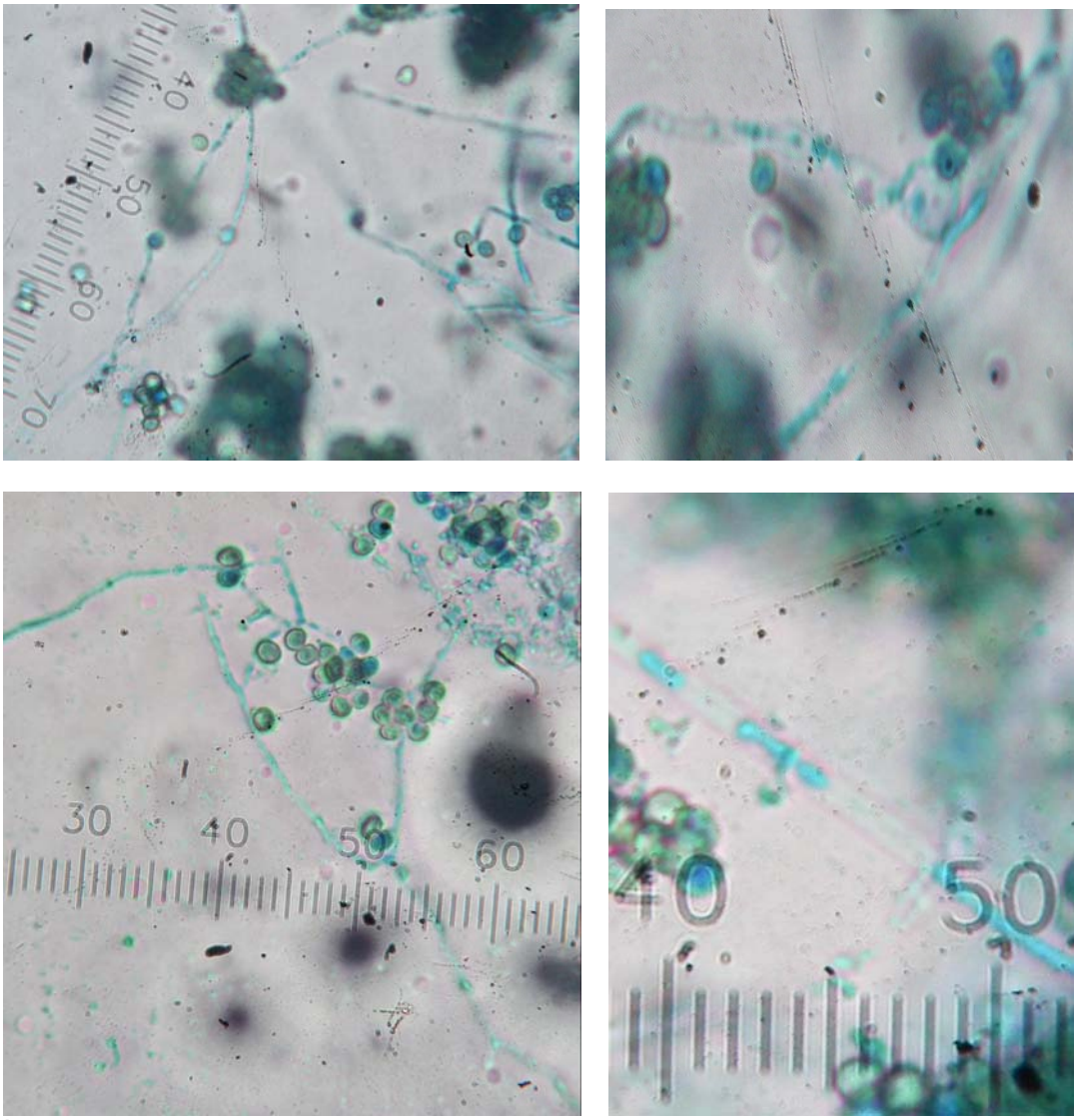
ผลการวัดขนาดเซลล์และสปอร์ด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 และจุลินทรีย์ผสม (TY) ระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 (T) และแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 (Y) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อร่วมกันบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (TY-P) และบนกากมันสำปะหลังจากการหมักแข็ง (TY-DP) อายุ 5 วันและ 7 วัน พบว่า เชื้อผสมชนิดสด TY-P ที่อายุเท่ากับ 5 วัน ขนาดความกว้างและยาวของเซลล์มีค่ามากกว่า ตรงกันข้ามกับเชื้อผสมชนิดสด อายุ 7 วัน ซึ่งมีขนาดเล็กลงและใกล้เคียงกับขนาดของเซลล์ยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบจุลินทรีย์ชนิดผงแห้งระหว่างเชื่อเดี่ยวกับเชื้อผสม พบว่า เชื้อผสมอายุ 5 วัน ขนาดเล็กลง ซึ่งตรงกันข้ามกับอายุ 7 วันซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังตารางที่ 4.5

ผลการวัดขนาดสปอร์ของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เปรียบเทียบกับขนาดที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านพบว่า เชื้อเดี่ยวและผสมชนิดผงแห้งมีขนาดเล็กกว่าเชื้อเดี่ยวและผสมชนิดเชื้อสด การอบแห้งทำให้ขนาดของเซลล์เล็กลง

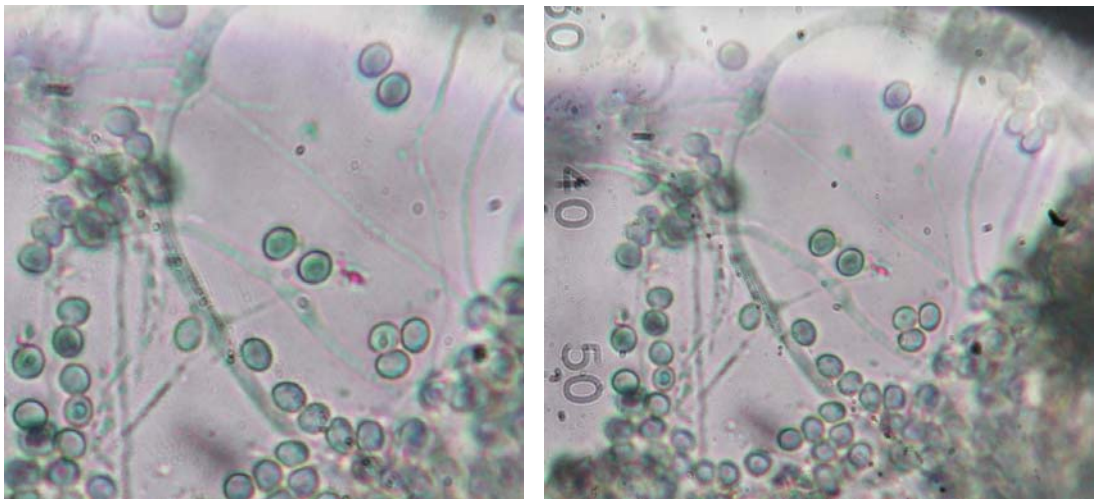
ตารางที่ 4.5ขนาดความกว้างและยาวของเซลล์จุลินทรีย์เดี่ยวและผสมที่อายุ 5 วันและ 7 วัน

จุลินทรีย์	ขนาดเซลล์ของจุลินทรีย์ (ไมโครเมตร)					
	อายุ 5 วัน		อายุ 7 วัน		อายุ 3 วัน	
	กว้าง	ยาว	กว้าง	ยาว	กว้าง	ยาว
T-P	2.11-4.82	3.13-6.34	2.00-2.52	3.05-3.12	-	-
T-DP	1.74-3.31	2.03-3.74	1.93-2.24	2.38-2.65	-	-
TY-P	2.01-6.42	2.67-8.67	1.85-2.25	2.63-2.66	-	-
TY-DP	1.61-2.25	1.71-2.87	2.02-2.38	2.50-2.79		
ยีสต์ (Y)	-	-	-	-	2.5-2.8	2.5-3.83

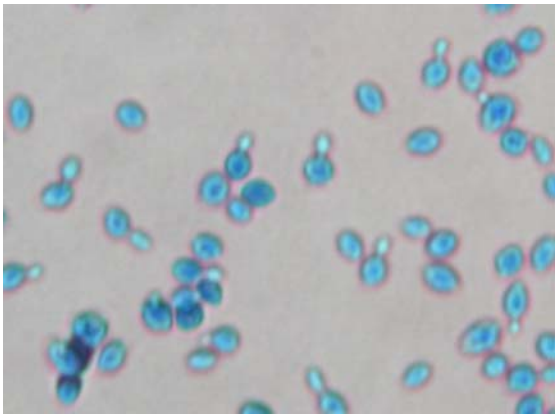
จากการวิจัยที่ผ่านมา [19] พบว่า สัณฐานวิทยาของไตรโคเดอร์มา รีสิอีขึ้นกับชนิดของอาหารที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง นั่นคือ ขนาด และรูปร่างลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ขึ้นกับแหล่งคาร์บอน เช่น น้ำตาลกลูโคส ซูโคส ซึ่งใช้เป็นสับสเตรท และสารอาหารเสริม เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส สำหรับงานวิจัยนี้ ได้ใช้น้ำตาลมะพร้าว (ซูโคสเป็นส่วนใญ่) กากมันสำปะหลัง และเปลือกสับปะรด เป็นสับสเตรท และเพาะเลี้ยงให้เชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี และแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี เติบโตอยู่ร่วมกันตามธรรมชาติ เพราะฉะนั้น ขนาดและรูปร่างของเชื้อผสมที่ได้จึงมีลักษณะเฉพาะตัว ที่บ่งบอกว่าเชื้อจุลินทรีย์ผสมได้เปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะของเชื้อเดี่ยว แต่มีลักษณะผสมผสานระหว่างเชื้อเดี่ยวทั้งสอง โดยพิจารณาจากการย้อมสี ไฮฟีของเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ด้วยเลคโตฟีนอลบริเวณเส้นใยมีการติดสีเขียวอมฟ้า ดังรูปที่ 4.38 เมื่อเทียบกับที่ไม่ได้ย้อมสีซึ่งมีสีเขียวอ่อน ดังรูปที่ 3.39 (ก) ส่วนเชื้อเดี่ยวยีสต์ติดสีย้อมเลคโตฟีนอลเป็นสีน้ำเงินตรงกลาง รอบๆ สีฟ้าสม่ำเสมอทั่วเซลล์ ดังรูปที่ 3.39 (ข)



รูปที่ 4.38 ไฮฟีของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ติดสีเลคโตฟีนอล



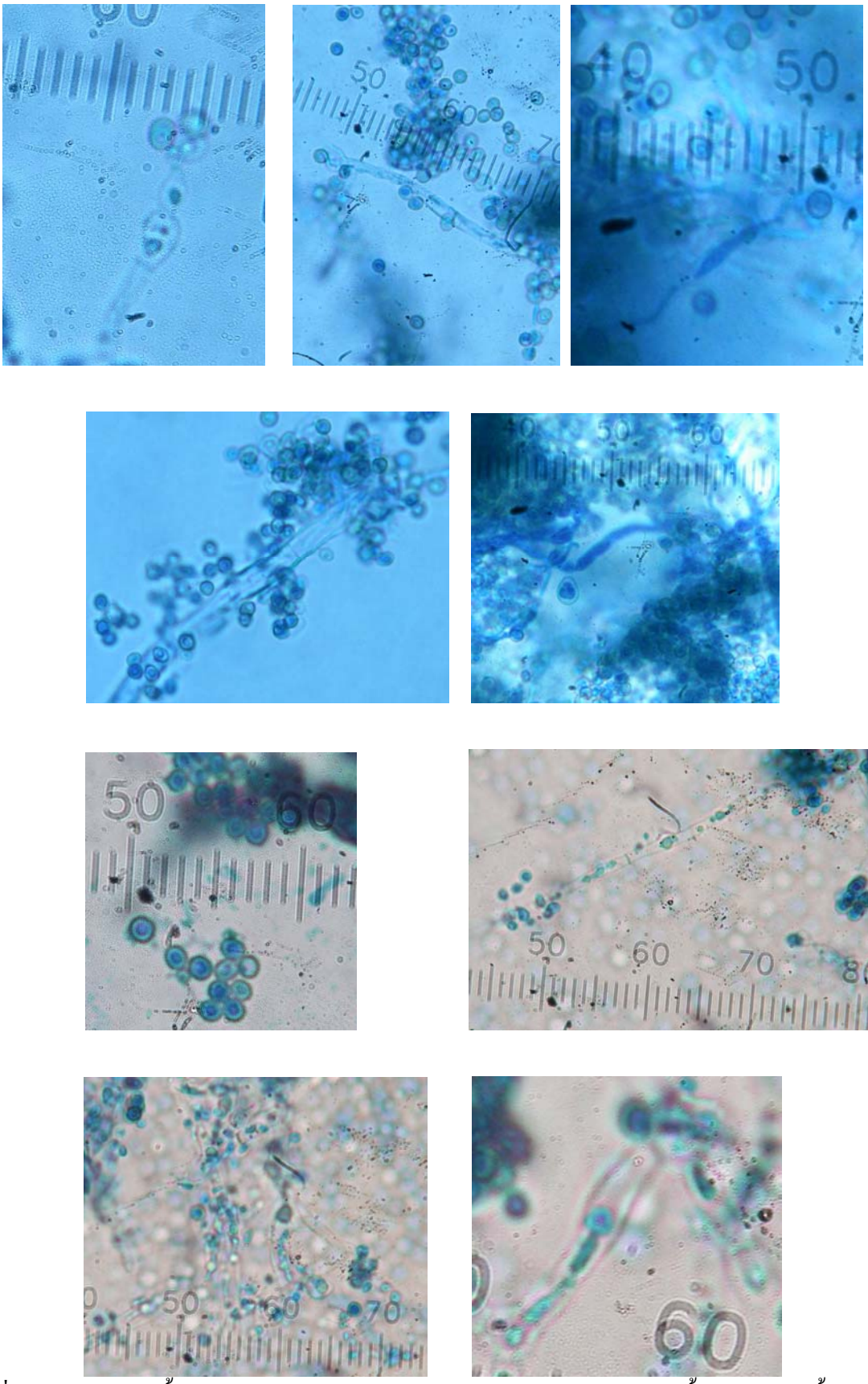
(ก)



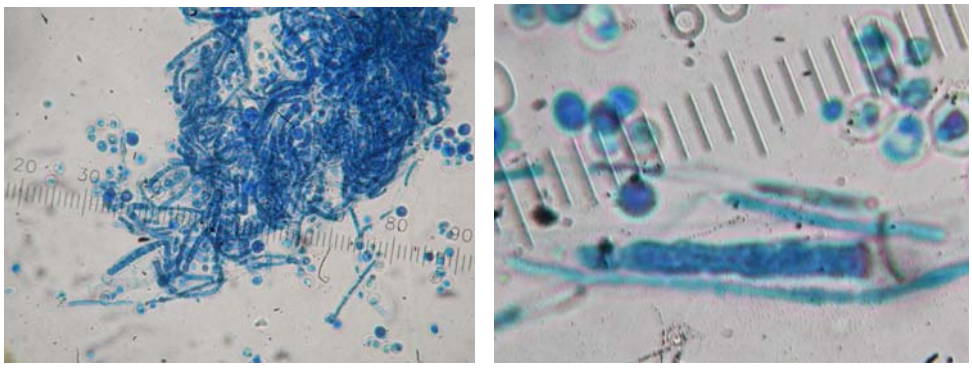
(ข)

รูปที่ 4.39 (ก) ไฮฟีของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ที่ไม่ได้ย้อมสี (ข) แซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2 ย้อมสีด้วยเลคโตฟีนอล

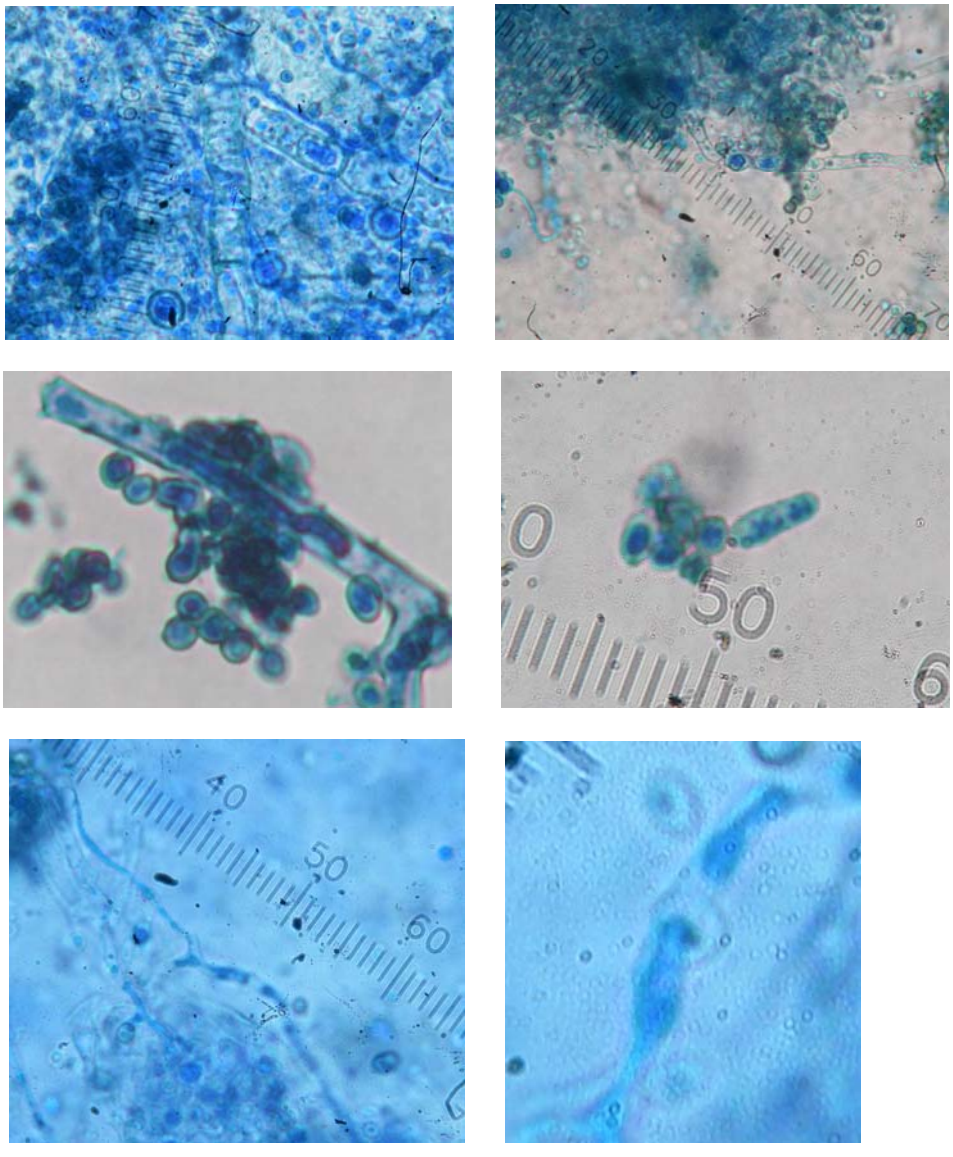
การย้อมสีของเชื้อผสม TY อายุ 3 วัน โดยนำเชื้อผสมบริเวณสีเขียวปนขาว (เชื้อราผสมกับยีสต์) และสีขาว (ยีสต์ถูกคลุมด้วยเส้นใยรา) บนจานเพาะเชื้อด้วยเลคโตฟีนอล จะเห็นได้ว่า เซลล์ของเชื้อผสมติดสีน้ำเงินตรงกลางเซลล์ และเซลล์ที่อยู่ภายในไฮฟีติดสีน้ำเงินของเลคโตฟีนอล ลักษณะของเซลล์ภายในไฮฟีเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากไฮฟีของเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ดังรูปที่ 4.40 และรูปที่ 4.41 ตามลำดับ ทำนองเดียวกันเชื้อผสม TY อายุ 5 วัน ซึ่งติดสีน้ำเงินภายในเซลล์และไฮฟี มีเซลล์คล้ายยีสต์ในไฮฟี ดังรูปที่ 4.42 ถึงรูปที่ 4.45 อายุของเชื้อผสมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และไฮฟี คือเชื้อผสม TY อายุ 3 วัน และ 5 วัน มีไฮฟีมากกว่าอายุ 7 วัน ซึ่งพบไฮฟีน้อยมากและติดสีเลคโตฟีนอลได้สีฟ้าอ่อน แต่พบเซลล์ซึ่งติดสีน้ำเงินของเลคโตฟีนอลอย่างสำเสมอเป็นส่วนใหญ่ ดังรูปที่ 4.46 นั่นคือ เชื้อผสม TY อายุ 7 วัน มีการเติบโตเต็มที่ ส่วนเชื้อผสม TY อายุ 3 วัน ส่วนใหญ่ยังเป็นเซลล์ยีสต์อยู่ ดังนั้น เชื้อผสมอายุ 5 วัน จึงอยู่ระหว่างการผสมจึงมีความเป็นไปได้ที่สามารถนำเชื้อผสมไปใช้ในการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดหรือวัสดุเหลือทิ้งอื่นๆ ที่เป็นเซลลูโลสได้ดีกว่า



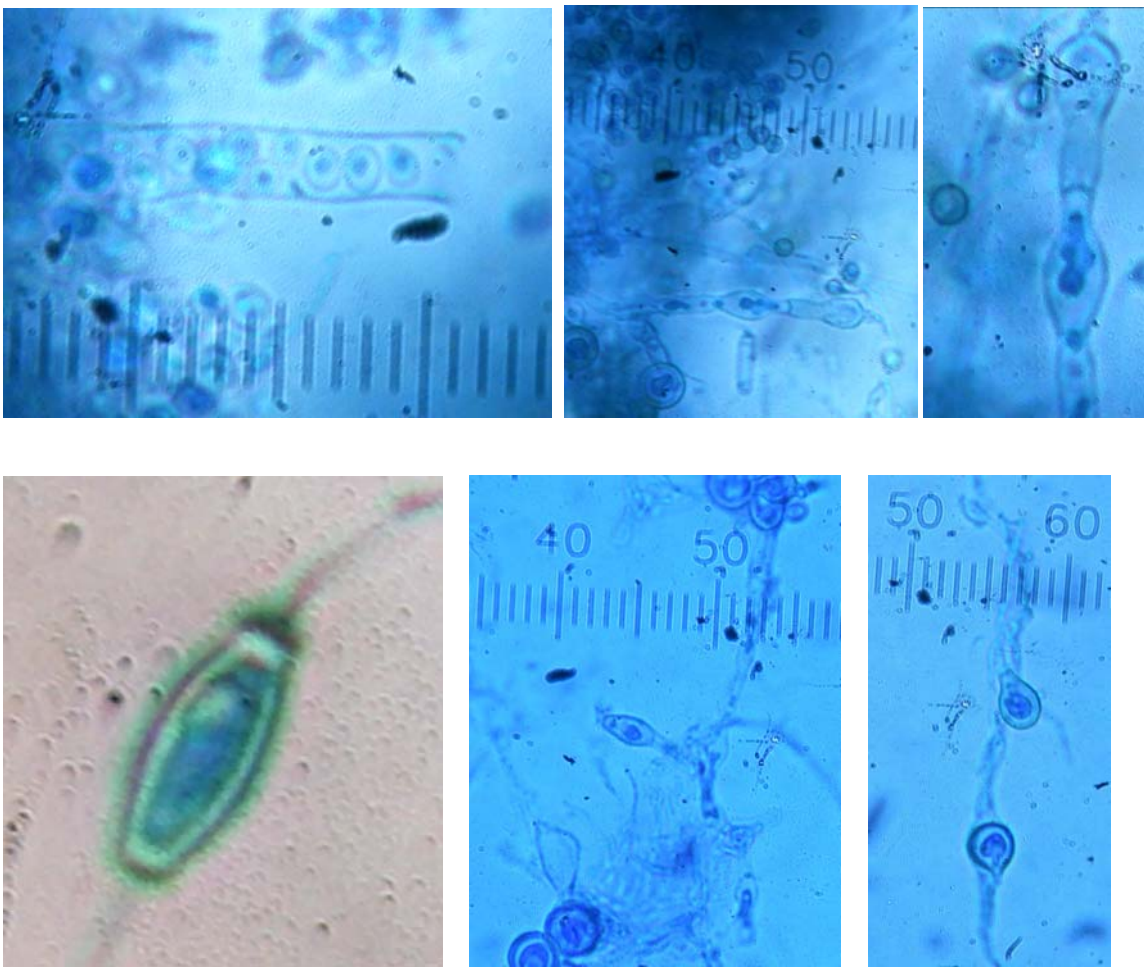
รูปที่ 4.40 ไฮฟีของเชื้อผสม TY อายุ 3 วัน บริเวณสีเขียวปนขาวบนจานเพาะเชื้อพีดีเอ ติดสีน้ำเงินเลคโตฟีนอล



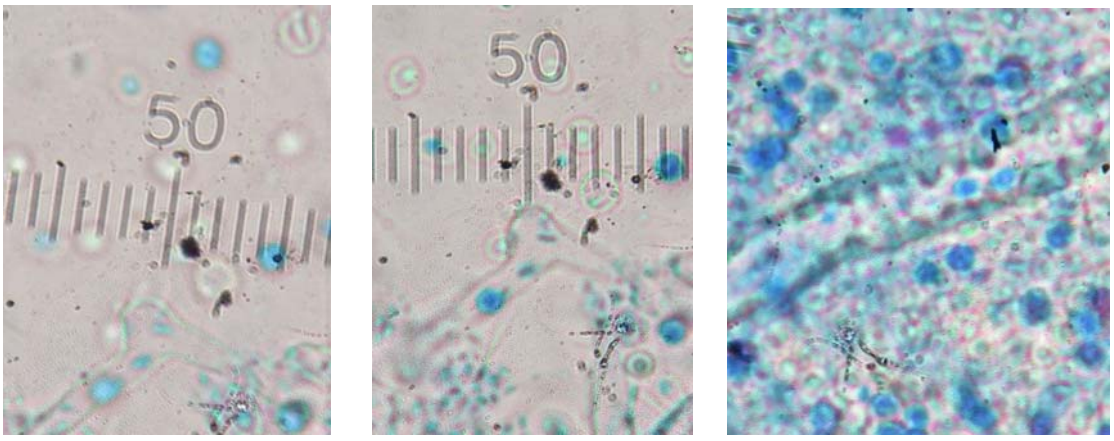
รูปที่ 4.41 ไฮฟีของเชื้อผสม TY อายุ 3 วัน บริเวณสีขาวบนจานอาหารพีดีเอติดสีน้ำเงินเลคโตฟีนอล



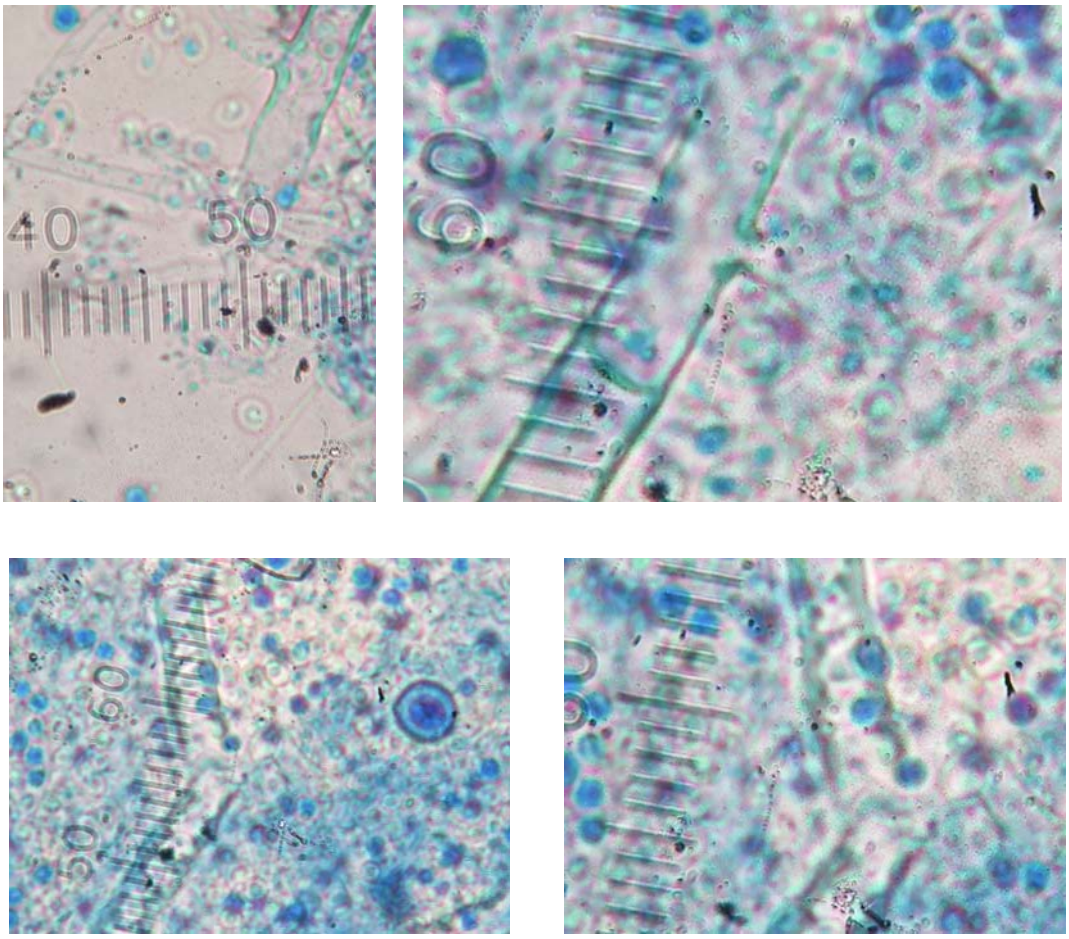
รูปที่ 4.42 ไฮฟีของเชื้อผสม TY อายุ 5 วัน บริเวณที่มีสีเขียวปนขาวบนจานพีดีเอติดสีน้ำเงินเลคโตฟีนอล



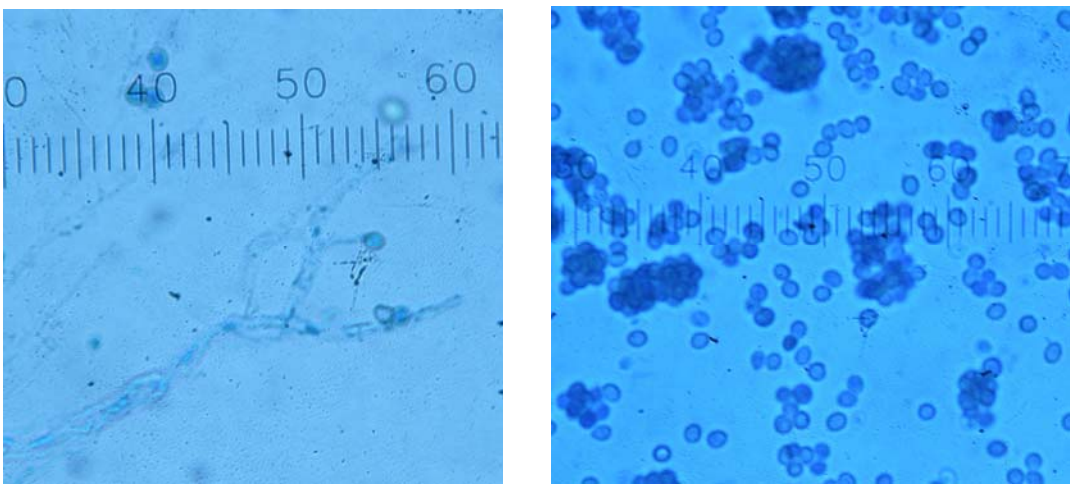
รูปที่ 4.43 เซลล์เชื้อผสม TY อายุ 5 วัน ติดสีน้ำเงินอยู่ในไฮฟีที่รูปร่างเปลี่ยนไปจากไฮฟีของเชื้อเดี่ยว



รูปที่ 4.44 เซลล์เชื้อผสม TY อายุ 5 วันรูปร่างลักษณะคล้ายยีสต์ติดสีน้ำเงินเลคโตฟีนอลอยู่ในไฮฟี



รูปที่ 4.45 การติดสีเลคโตฟีนอลของเชื้อผสม TY-P อายุ 5 วัน บริเวณที่มีสีขาว



รูปที่ 4.46 ไฮฟีของเชื้อผสม TY-P อายุ 7 วันติดสีฟ้าอ่อน เซลล์ติดสีน้ำเงินสม่ำเสมอ

4.7 ผลสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมชนิดผงแห้ง (TY-DP) ด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

การหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมชนิดผงแห้ง TY-DP โดยใช้วิธีการทดลองออร์โกนอล (orthogonal experiment method) เปรียบเทียบ TY-DP อายุ 3 วัน 5 วันและ 7 วัน แปรผันปัจจัยควบคุมที่มีผลต่อการหมัก 4 ตัวแปร คือ น้ำหนักเปลือกสับปะรด (PAW) ความเข้มข้นของน้ำตาลมะพร้าว (CSG) ในอาหารเหลว LM-pH5 ปริมาตรคงที่ 100 mL ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ผสม (TY-DP) และระยะเวลาในการหมัก (time) แต่ละตัวแปรแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังตาราง 4.6 และผลของความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อปัจจัยควบคุมต่างๆ ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ปัจจัยควบคุมและระดับการแปรผันของวิธีทดลองออร์โธโกนอล

ปัจจัยควบคุม	ระดับการแปรผัน		
	M1	M2	M3
เปลือกสับปะรด (PAW) %w	8	10	12
น้ำตาลมะพร้าว (CSG) %w	1	2	3
เชื้อจุลินทรีย์ผสม (TY-DP) %w	4	5	6
ระยะเวลาในการหมัก (time) วัน	2	3	4

ตารางที่ 4.7 ผลของปัจจัยควบคุมที่มีต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน

ลำดับ	PAW (%w)	CSG (%w)	TY-DP (%w)	Time (วัน)	จุลินทรีย์ผสม (cell/mL) จากเชื้อผสม TY-DP		
					อายุ 3 วัน	อายุ 5 วัน	อายุ 7 วัน
1	8	1	6	4	1.46×10^{8}	2.45×10^{8}	1.25×10^{8}
2	10	1	4	2	5.13×10^{7}	1.75×10^{7}	3.25×10^{7}
3	12	1	5	3	5.38×10^{7}	3.00×10^{7}	1.00×10^{7}
4	8	2	5	3	8.25×10^{8}	1.66×10^{8}	6.25×10^{8}
5	10	2	6	4	6.00×10^{7}	7.50×10^{7}	4.38×10^{7}
6	12	2	4	2	3.63×10^{7}	2.50×10^{7}	1.50×10^{7}
7	8	3	4	2	4.25×10^{7}	2.63×10^{7}	9.25×10^{7}
8	10	3	5	3	4.25×10^{7}	2.75×10^{7}	5.00×10^{7}
9	12	3	6	4	3.75×10^{8}	9.88×10^{8}	2.75×10^{7}

ผลของความเข้มข้นเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน และ 7 วัน ต่อปัจจัยควบคุม 4 พารามิเตอร์โดยใช้ข้อมูลจากการทดลองในตารางที่ 4.7 คำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล แสดงดังตารางที่ 4.8 ถึง 4.10 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเหลวเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP ในอาหารเหลว LM-pH5 ขึ้นกับอายุของเชื้อผสม TY-DP ที่นำมาใช้ในการหมัก

ตารางที่ 4.8 ผลของปัจจัยควบคุมต่อความเข้มข้นของเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน จากการคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ปัจจัยควบคุม	ความเข้มข้นของเชื้อผสม TY-DP ที่ระดับ (cell/mL)			Rj
	M1	M2	M3	
PAW (%w)	9.04×10^7	5.13×10^7	4.25×10^7	4.79×10^7
CSG (%w)	8.38×10^7	5.96×10^7	4.08×10^7	4.29×10^7
TY-DP (%w)	4.33×10^7	5.96×10^7	8.13×10^7	3.79×10^7
Time (วัน)	4.33×10^7	5.96×10^7	8.13×10^7	3.79×10^7

ตารางที่ 4.9 ผลของปัจจัยควบคุมต่อความเข้มข้นของเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน จากการคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ปัจจัยควบคุม	ความเข้มข้นของเชื้อผสม TY-DP ที่ระดับ (cell/mL)			Rj
	M1	M2	M3	
PAW (%w)	14.60×10^7	4.00×10^7	5.13×10^7	10.60×10^7
CSG (%w)	9.75×10^7	8.88×10^7	5.08×10^7	4.67×10^7
TY-DP (%w)	2.29×10^7	7.46×10^7	14.00×10^7	11.70×10^7
Time (วัน)	2.29×10^7	7.46×10^7	14.00×10^7	11.70×10^7

ตารางที่ 4.10 ผลของปัจจัยควบคุมต่อความเข้มข้นของเชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน จากการคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ปัจจัยควบคุม	ความเข้มข้นของเชื้อผสม TY-DP ที่ระดับ (cell/mL)			Rj
	M1	M2	M3	
PAW (%w)	9.33×10^7	4.21×10^7	1.75×10^7	7.58×10^7
CSG (%w)	5.58×10^7	4.04×10^7	5.67×10^7	1.63×10^7
TY-DP (%w)	4.67×10^7	4.08×10^7	6.54×10^7	2.46×10^7
Time (วัน)	4.67×10^7	4.08×10^7	6.54×10^7	2.46×10^7

ผลการคำนวณจากตารางที่ 4.8 ถึง 4.10 สำหรับเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ของการหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดโดยใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอล พิจารณาผลของปัจจัยควบคุมต่อการเติบโตของเชื้อผสม สรุปดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 สภาวะที่เหมาะสมจากผลของปัจจัยควบคุมต่อการเติบโตของเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน

เชื้อผสม TY-DP ที่ใช้หมัก	PAW (%w)	CSG (%w)	TY-DP (%w)	Time (วัน)
อายุ 3 วัน	8	1	6	4
อายุ 5 วัน	8	1	6	4
อายุ 7 วัน	8	3	6	4

จากการคำนวณ ดังตารางที่ 4.11 ผลของปัจจัยควบคุมต่อการเติบโตของเชื้อผสม พบว่า เชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ใช้เปลือกสับปะรด 8%w หมักกับความเข้มข้นของเชื้อผสม TY-DP และระยะเวลาที่ใช้หมัก คือ 6%w และ 4 วัน แต่ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นต่างกัน คือ เชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วันและ 5 วัน มีค่าเท่ากับ 1%w ขณะที่ TY-DP อายุ 7 วัน คือ 3%w วิธีการทดลองออร์โธโกนอลที่พิจารณาผลของปัจจัยควบคุมต่อการเติบโตของเชื้อผสมให้ค่าที่ขัดแย้งกัน จากนั้นพิจารณาผลของปัจจัยควบคุม 4 พารามิเตอร์ต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักเหลวเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ในอาหารเหลว LM-pH5 โดยใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอล ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ผลของปัจจัยควบคุมที่มีต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากจุลินทรีย์ผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน

ลำดับ	PAW (%w)	CSG (%w)	TY-DP (%w)	Time (วัน)	เอทานอลที่ได้ (g/L) จากเชื้อผสม TY-DP		
					อายุ 3 วัน	อายุ 5 วัน	อายุ 7 วัน
1	8	1	6	4	17.2	19.70	14.24
2	10	1	4	2	10.30	10.83	8.18
3	12	1	5	3	5.38	9.32	15.98
4	8	2	5	3	19.32	18.94	13.57
5	10	2	6	4	3.94	18.03	19.39
6	12	2	4	2	10.30	12.80	9.47
7	8	3	4	2	21.89	11.21	15.08
8	10	3	5	3	9.55	12.88	15.00
9	12	3	6	4	7.42	20.00	12.58

ตารางที่ 4.13 ผลของปัจจัยควบคุมต่อความเข้มข้นของเอทานอลจากเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน ที่ได้จากการคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ปัจจัยควบคุม	ความเข้มข้นของเอทานอล ที่ระดับ (g/L)			Rj
	M1	M2	M3	
PAW (%w)	19.55	7.93	7.70	11.84
CSG (%w)	11.04	11.19	12.95	1.92
TY-DP (%w)	14.17	11.41	9.60	4.57
Time (วัน)	14.17	11.41	9.60	4.57

ตารางที่ 4.14 ผลของปัจจัยควบคุมต่อความเข้มข้นของเอทานอลจากเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน ที่ได้จากการคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ปัจจัยควบคุม	ความเข้มข้นของเอทานอล ที่ระดับ (g/L)			Rj
	M1	M2	M3	
PAW (%w)	16.62	13.91	14.04	2.70
CSG (%w)	13.28	16.59	14.70	3.31
TY-DP (%w)	11.62	13.71	19.24	7.63
Time (วัน)	11.62	13.71	19.24	7.63

ตารางที่ 4.15 ผลของปัจจัยควบคุมต่อความเข้มข้นของเอทานอลจากเชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน ที่ได้จากการคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ปัจจัยควบคุม	ความเข้มข้นของเอทานอล ที่ระดับ (g/L)			Rj
	M1	M2	M3	
PAW (%w)	14.30	14.19	12.68	1.62
CSG (%w)	12.80	14.15	14.22	1.42
TY-DP (%w)	10.91	14.85	15.40	4.49
Time (วัน)	10.91	14.85	15.40	4.49

ผลการคำนวณจากตารางที่ 4.13 ถึง 4.15 สำหรับเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ของการหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดโดยใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอล พิจารณาผลของปัจจัยควบคุมต่อเอทานอลที่ได้จากการหมัก สรุปดังตารางที่ 4.16

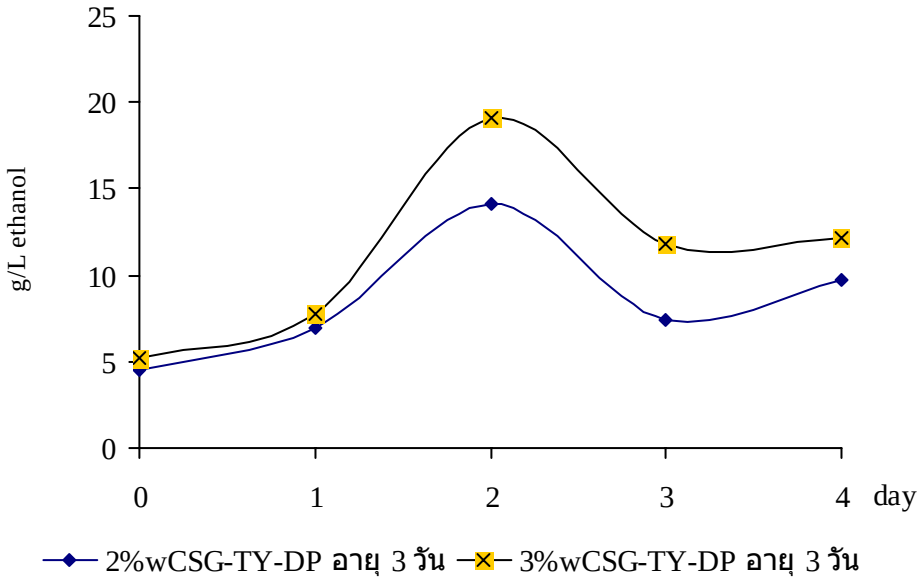
ตารางที่ 4.16 สภาวะที่เหมาะสมจากผลของปัจจัยควบคุมต่อความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน

เชื้อผสม TY-DP ที่ใช้หมัก	PAW (%w)	CSG (%w)	TY-DP (%w)	Time (วัน)
อายุ 3 วัน	8	3	4	2
อายุ 5 วัน	8	2	6	4
อายุ 7 วัน	8	3	6	4

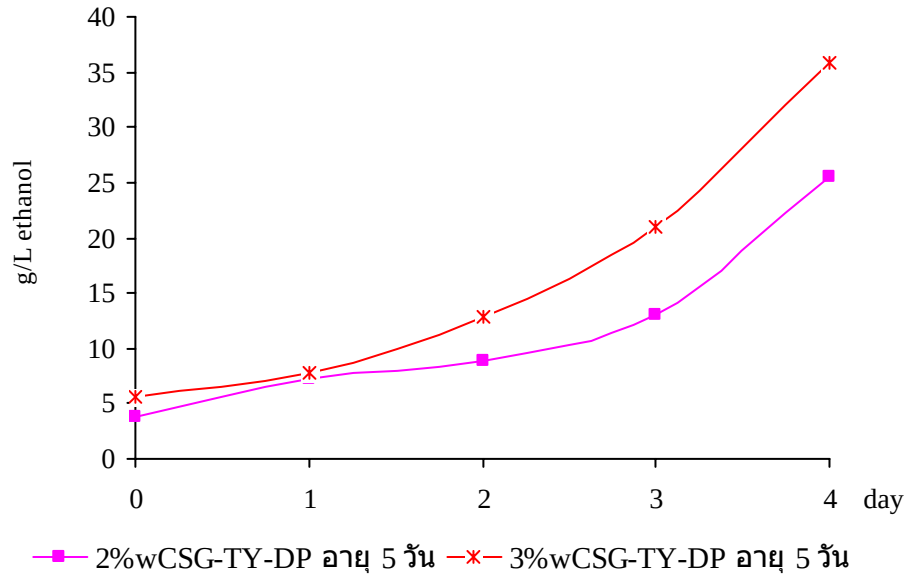
สภาวะเหมาะสมจากการพิจารณาผลของปัจจัยควบคุมต่อการเกิดเอทานอลของเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ เปลือกสับปะรด 8%w ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าว หัวเชื้อผสม TY-DP และ ระยะเวลาที่ใช้หมัก คือ 3%w, 4%w และ 2 วัน เนื่องจากเชื้อผสมอายุ 3 วัน มียีสต์จำนวนมากในช่วง 1-2 วันแรกจึงได้เปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ในตอนเริ่มต้นให้เป็นเอทานอล น้ำตาลเริ่มต้นมีค่ามากทำให้เอทานอลที่ได้มีค่ามากตามไปด้วยและเกิดขึ้นภายใน 2 วันตามการเติบโตของยีสต์ ส่วนสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วันและอายุ 7 วันคือเปลือกสับปะรด 8%w หัวเชื้อผสม TY-DP และ ระยะเวลาที่ใช้หมัก คือ 6%w และ 4 วัน ส่วนความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวเท่ากับ 2%w และ 3%w ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมของการหมักเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP จึงขึ้นกับอายุของการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม และผลของปัจจัยควบคุมต่อการเติบโตของเชื้อผสมและการเกิดเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของเปลือกสับปะรดมีค่าเท่ากัน

ดังนั้นจึงทำการทดลองการหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน โดยแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นในอาหารเหลว LM-pH5 ที่ 2%w และ 3%w และกำหนดตัวแปรคงที่คือ 8%w เปลือกสับปะรด 6%w เชื้อผสม TY-DP และระยะเวลาของการหมักนาน 4 วัน จากการทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ เอทานอลที่ได้จาก 3%w ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นมีค่ามากกว่าที่ความเข้มข้น 2%w สำหรับเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ดังรูปที่ 4.47 ถึงรูปที่ 4.49 อย่างไรก็ตาม ที่ 3%w น้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นในอาหารเหลว เชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน เกิดเอทานอลมากที่สุดที่ระยะเวลาหมัก 2 วัน เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ที่วัดได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีการแตกหน่อของเซลล์ของยีสต์มากกว่าสปอร์ของราอย่างมีนัยสำคัญ พิจารณาจากรูป 4.10 ดังนั้น เอทานอลที่ได้จากเชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วันจึงได้มาจากการทำงานของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกันกับรา

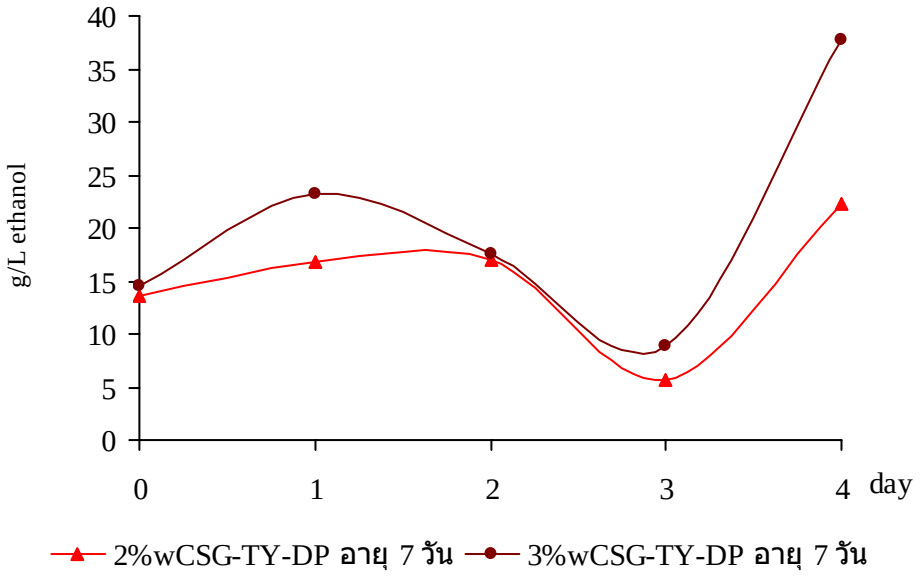
สำหรับเอทานอลที่ได้จากเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วันที่ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้น 3%w ในอาหารเหลว LM-pH5 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะเวลาหมัก 2 วันขึ้นไป และมีค่ามากที่สุดที่ระยะเวลา 4 วัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้น 3%w เท่ากัน เอทานอลที่ได้จากเชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน มีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 1 วัน และลดลงในระยะเวลา 2 ถึง 3 วัน จากนั้นจึงมีค่าเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 4 วัน ดังรูป 4.50



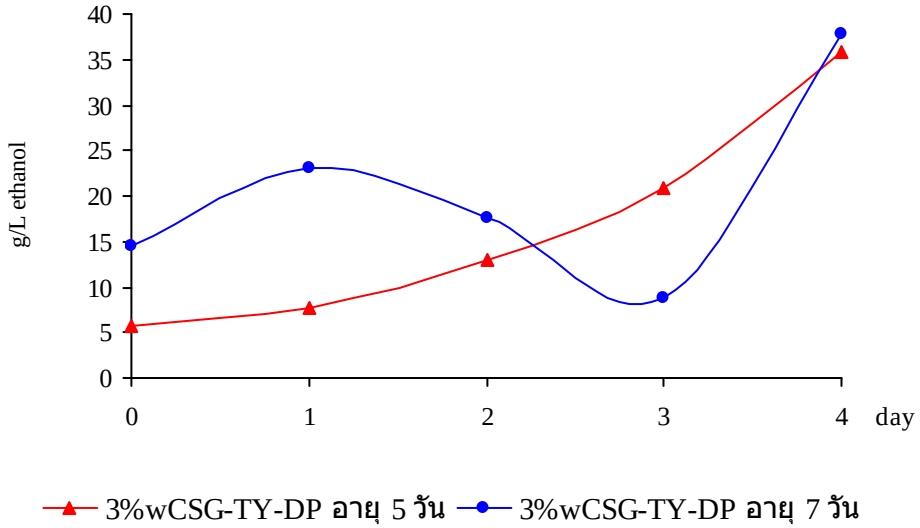
รูปที่ 4.47 เอทานอลที่ได้กับเวลาจากการหมัก 8%w เปลือกสับปะรดด้วย 6%w เชื้อผสม TY-DP อายุ 3 วัน ในอาหารเหลว LM-pH5 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 2%w และ 3%w



รูปที่ 4.48 เอทานอลที่ได้กับเวลาจากการหมัก 8%w เปลือกสับปะรดด้วย 6%w เชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน ในอาหารเหลว LM-pH5 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 2%w และ 3%w



รูปที่ 4.49 เอทานอลที่ได้กับเวลาจากการหมัก 8%w เปลือกสับปะรดด้วย 6%w เชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน ในอาหารเหลว LM-pH5 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 2%w และ 3%w



รูปที่ 4.50 เอทานอลที่ได้กับเวลาจากการหมัก 8%w เปลือกสับปะรดด้วย 6%w เชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน และ 7 วัน ในอาหารเหลว LM-pH5 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 3%w

เนื่องจากการเติบโตของเชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน ที่ระยะเวลา 3 วันแรกใช้เวลาในการปรับตัวนานกว่าเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน ดังรูปที่ 4.21 เอทานอลที่ได้ที่ระยะเวลาหมัก 1 วันมีความเป็นไปได้ที่เกิดจากยีสต์ซึ่งเติบโตร่วมกันเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารเหลวเป็นเอทานอล และใช้น้ำตาลในการเติบโตมากกว่าที่ระยะเวลา 2 ถึง 3 วัน หลังจากนั้นเชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน จึงมีการเติบโตแบบ

เอ็กซ์โพเนนเชียลภายในระยะเวลา 3 ถึง 5 วัน เชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน จึงทำการเปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายของเซลลูโลสของเปลือกสับปะรดเป็นเอทานอลเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 4 วันของการหมัก ได้เอทานอลใกล้เคียงกับเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน ดังนั้น จึงเลือกเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน มาใช้ในการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดในอาหารเหลว LM-pH5 ที่มีน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นเท่ากับ 3%w เนื่องจากทำให้ลดเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการผลิตเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน จากการหมักแข็งกากมันสำปะหลังลงได้ 4 วัน เมื่อเทียบกับการผลิตเชื้อผสม TY-DP อายุ 7 วัน

4.8 ผลการหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วันที่สภาวะเหมาะสม

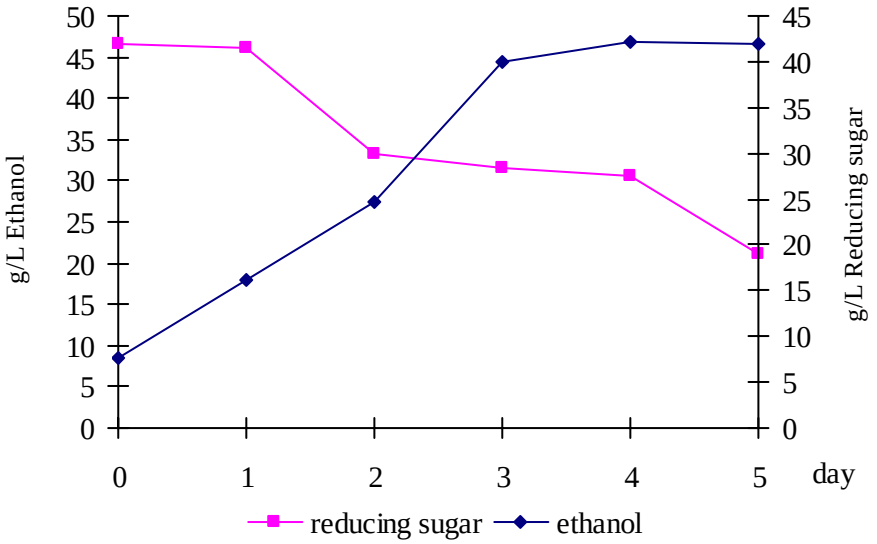
สภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดในอาหารเหลว LM-pH5 คือ 8%w เปลือกสับปะรด 6%w เชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน และระยะเวลาที่ใช้หมักเท่ากับ 4 วัน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเอทานอลที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นถึงค่าสูงสุดที่เวลาซึ่งได้กำหนดเป็นขอบเขตไว้ในวิธีการทดลองออร์โธโกนอล 4 วัน ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่ใช้ในการหมักที่สภาวะเหมาะสมใหม่เป็น 5 วัน พบว่าเอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 42 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาหมัก 4 วัน ดังรูปที่ 4.51

เชื้อผสม TY-DP ได้เปลี่ยนน้ำตาลที่อยู่ในอาหารเหลวไปเป็นเอทานอลตั้งแต่ระยะเวลาเริ่มต้น 1 วัน เอทานอลที่ได้ประมาณ 16 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าเป็นช่วงเวลาของการปรับตัวของเชื้อผสม แต่เมื่อพิจารณาเซลลูเลสที่ได้ในรูปที่ 4.52 พบว่ามีค่ามากที่สุดที่ระยะเวลา 1 วัน นั่นคือหัวเชื้อผสมได้เปลี่ยนน้ำตาลทั้งที่อยู่ในอาหารเหลวในตอนเริ่มต้นและน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสที่เกิดขึ้นไปเป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลนี้ไปเป็นเอทานอลพร้อมๆ กัน หลังจากนั้นเมื่อเชื้อผสมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เซลลูเลสที่ได้มีค่าค่อนข้างคงที่ น้ำตาลรีดิวซ์จึงถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนได้ค่าสูงสุดที่ระยะเวลา 4 วัน

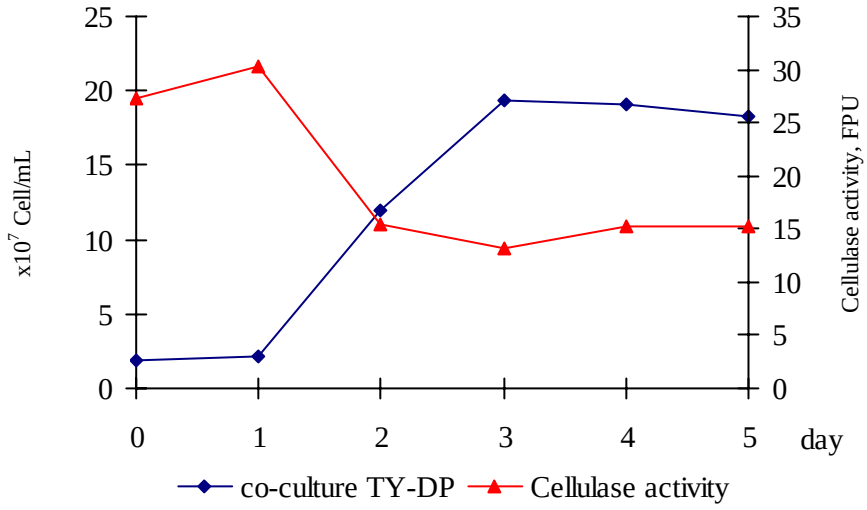
ผลได้ของเอทานอลของงานวิจัยนี้มีค่าประมาณ 52% ของน้ำหนักเปลือกสับปะรดแห้ง จากการหมักเปลือกสับปะรด 8%w ด้วย 6%w เชื้อผสม TY-DP ที่ระยะเวลา 4 วัน และความเข้มข้นของน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้น 3%w ในอาหารเหลว LM-pH5 และที่ประมาณ 30^{o}C เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา [20] เซลลูเลสที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Trichoderma longibrachiatum* และ *Aspergillus niger* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* บนเปลือกสับปะรด ใช้เวลานาน 7 วันที่ pH 4.5 ใช้ระยะเวลาหมัก 5 วันที่ pH 3.5 และ pH 4.5 จึงผลิตน้ำตาลได้สูงสุด ตามลำดับ

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ใช้ช่วงระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 40 วันสำหรับใช้ย่อยสลายเซลลูโลสของเปลือกกาแฟด้วยเชื้อราชนิดต่างๆ ทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ [21] น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากเชื้อผสมมีค่ามากกว่าที่ได้จากเชื้อเดี่ยวที่ระยะเวลา 30 วัน

งานวิจัยที่ผ่านมาเรื่องการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากเปลือกกล้วยโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* กลายพันธุ์ [22] พบว่าอัตราของการผลิตเอทานอลเพิ่มกับความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรทที่เหมาะสมกับระยะเวลาของการหมักที่ 5 วัน



รูปที่ 4.51 เอทานอลที่ได้ และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่กับเวลาของการหมักเหลวเอทานอลจาก 8%w เปลือกสับปะรดด้วย 6%w เชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วันในอาหารเหลว LM-pH5 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 3%w



รูปที่ 4.52 เซลลูเลส แอคทิวิตี และเชื้อผสม TY-DP กับเวลาของการหมักเหลวเอทานอลจาก 8%w เปลือกสับปะรดด้วย 6%w เชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วันในอาหารเหลว LM-pH5 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 3%w

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อเอทานอลที่ได้จากการหมักเหลวจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP ที่ทำให้มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา [21] - [26] คือ

- สายพันธุ์เชื้อเดี่ยว คือ ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2 ถึงแม้เป็นสายพันธุ์เหมือนกับที่ใช้ในงานวิจัยที่ผ่านมา แต่มีความแตกต่างของสภาวะแวดล้อม และได้มาจากการเพาะเลี้ยงจากฟางข้าวและกากมันสำปะหลังงานวิจัยที่ผ่านมา [1] และได้นำมาเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเชื้อผสม TY-DP ในสูตรอาหารเฉพาะของงานวิจัยนี้
- วิธีการเพาะเลี้ยงหรือการนำเชื้อเดี่ยวทั้งสองสายพันธุ์มาเลี้ยงร่วมกันก่อนในจานอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ หลังจากนั้นผลิตให้เป็นหัวเชื้อในรูปของผงแห้งด้วยการหมักแข็งจากกากมันสำปะหลัง ดังนั้น การใช้กากมันสำปะหลังแห้งตรึงเซลล์ของเชื้อผสมสามารถนำไปใช้ในการผลิตในระดับขยายขนาดได้ในการศึกษาต่อไป
- เชื้อผสม TY-DP ซึ่งอยู่ในรูปผงแห้งนำมาใช้ผลิตเอทานอลทำได้ง่าย และสะดวกรวดเร็ว
- สูตรอาหารเหลวเป็นสูตรเฉพาะที่ได้พัฒนามาจากการหมักแข็งและหมักเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ ที่จำเป็นเท่านั้น
- เชื้อผสม TY-DP สามารถย่อยเปลือกสับปะรดซึ่งไม่ได้ผ่านการปรับสภาพเพื่อกำจัดลิกนินออกก่อนได้ระดับหนึ่ง ดังนั้น การผลิตเอทานอลจากเปลือกสับปะรดซึ่งมีลิกนินประมาณ 11%w ด้วยเชื้อผสม TY-DP จึงอาจจะไม่ต้องผ่านการปรับสภาพเพื่อประหยัดเวลา สารเคมี และพลังงาน
- ขนาดของเปลือกสับปะรดมีผลต่อการหมักเหลวเพื่อผลิตเอทานอลด้วยเชื้อผสม TY-DP เปลือกสับปะรดบวมขึ้นเมื่อนำมาหมักเหลว และถ้าขนาดอนุภาคเล็กเกินไปทำให้อัดแน่น ของเหลวและอากาศแทรกเข้าไปได้ยาก หรืออากาศแพร่เข้าไปได้น้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป ขณะที่เชื้อผสม TY-DP ต้องการอากาศสำหรับการเติบโตและปลดปล่อยเซลลูเลสออกมาใช้ย่อยสลายเซลลูโลส [10]

การเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเชื้อผสมจากงานวิจัยที่ผ่านมา เอทานอลที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าประมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมา แต่ใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่างานวิจัยที่ผ่านมาของ [23], [24], [25] และ [26] ดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 เปรียบเทียบเอทานอลที่ได้จากการหมักวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกับเชื้อผสมสายพันธุ์ต่างๆ ของงานวิจัยที่ผ่านมาและงานวิจัยนี้

สับสเตรท	สายพันธุ์เชื้อผสม	ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้	เวลา	เอทานอล g/L	pH/ อุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
เปลือกกล้วย 100 g/L	Mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*	2%v/v	120 h	9	4.5/33°C	[22]
แป้งข้าวโพด 160 g/L	*Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae*	1300 IU/g 50 IU	50 h	63.4	5.5/30°C	[23]
Steam-pretreated spruce 50 g/L	*Trichoderma reesei* และ *Trichoderma atroviride*	5 FPU/g WIS กับ 2 g DM/L ยีสต์	96 h	18.0	5.0/35°C	[24]
Microcrystalline cellulose 100 g/L	Recombinant *Klebsiella oxytoca* P2 กับ *Saccharomyces pastorianus*	15 FPU/g	216 h	41.5	5.2/45°C	[25]
Dried grass (%C 38.29, %N 1.41,%H 5.41) 10 g/L	Intergeneric fusant *Trichoderma reesei* QM 9414 และ *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3288	-	30 h	0.17	5.0/30.5°C	[26]
เปลือกสับปะรด 80g/L	เลี้ยงเชื้อผสมร่วมกัน *Trichoderma reesei* RT-P1 และ *Saccharomyces cerevisiae* RT-P2	30 FPU	120 h	42.0	5.0/30°C	งานวิจัยนี้

หมายเหตุ: WIS คือ water-insoluble solids, h คือชั่วโมง g คือกรัม g/L คือกรัมต่อลิตร °C คือ องศาเซลเซียส