บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

ผลจากการวิจัยเชื้อเดี่ยวที่นำมาเป็นเชื้อเริ่มต้น คือเชื้อรา ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และเชื้อยีสต์ แซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2 เป็นเชื้อบริสุทธิ์ทั้งสองสายพันธุ์ เนื่องจากเชื้อทั้งสองได้รับการพัฒนาในห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ภาควิชาวิศวกรรมและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จึงตั้งชื่อต่อท้ายด้วย RT-P1 และ RT-P2 ตามลำดับ

ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เติบโตได้ดีบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (T-P) ขณะที่อาหารวุ้นแข็งวายเอ็มเอเหมาะสมกับแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2 (Y-P) อย่างไรก็ตาม เชื้อผสม TY-P ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง T-P ร่วมกับ Y-P บนจานเพาะเชื้อเดียวกัน สามารถเติบโตบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอได้ดีกว่าวายเอ็มเอ และระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY-P ที่เหมาะสมคือ 5 วัน

การศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 40 เท่า และกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เชื้อเดี่ยวทั้งสองสายพันธุ์มีขนาดและรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน ผิวของเชื้อราขรุขระคล้ายหนาม ส่วนยีสต์ผิวเรียบ การย้อมสีด้วยเลคโตฟีนอลและเมทธิลีน บลู สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อเดี่ยวทั้งสองได้ การติดสีของเชื้อรา T-P น้อยมากในสีทั้ง 2 ชนิด แต่ติดสีน้ำเงินของเลคโตฟีนอลได้ดีกว่าเมทธิ-ลีน บลู ส่วนเชื้อยีสต์ติดสีน้ำเงินของเลคโตฟีนอลได้ดีกว่าเมทธิลีน บลูเช่นกัน ขนาดของเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าสปอร์รา

การศึกษาเซลล์และไฮฟีของเชื้อผสมด้วยการย้อมสีด้วยเลคโตฟีนอล พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์อย่างชัดเจน การเปลี่ยนแปลงของเชื้อผสมไปจากเชื้อเดี่ยวขึ้นกับอายุของการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม

รูปร่างลักษณะของเชื้อผสม TY-P จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งร่วมกัน เป็นวงกลมค่อนข้างรี บางเซลล์มีผิวขรุขระคล้ายหนามอยู่ร่วมกับเซลล์ที่มีผิวเรียบ สัณฐานวิทยาของเชื้อผสมที่ได้มีการเปลี่ยนแปลง โดยโครงสร้างของโคนิโอฟอร์ ก้านชูสปอร์ และสปอร์มีขนาดใหญ่ขึ้น และเชื้อผสมมีการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าเชื้อบริสุทธิ์ตั้งต้นในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เท่ากัน โดยไมซีเลียมของเชื้อราสามารถเจริญปกคลุมเซลล์ยีสต์อย่างชัดเจน

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมของการนำเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เพาะเลี้ยงร่วมกับแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2 คือ อาหารวุ้นแข็งพีดีเอ และระยะเวลาบ่มนาน 5 วัน จะได้ความเข้มข้นของเชื้อผสมมากที่สุด

5.2 สภาวะการหมักแข็งกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตจุลินทรีย์ผสมชนิดหัวเชื้อสด TY-FS

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเชื้อผสมชนิดหัวเชื้อสด TY-FS จากวิธีการหมักแข็ง คือ อัตราส่วนของเชื้อผสมจากจานอาหารวุ้นแข็งพีดีเอจำนวน 2 จานต่ออาหารเหลว LM-pH5 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นในอาหารเหลวเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ผสมกับกากมันสำปะหลังแห้งปริมาณ 1000 กรัม ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 55%w บ่มที่ 26°C นาน 5 วัน ถึง 7 วัน อายุของเชื้อผสม TY-FS กำหนดได้จากระยะเวลาการบ่มเชื้อ

การผลิตเชื้อผสมชนิดผงแห้งทำได้โดยนำเชื้อผสมชนิดสดไปอบแห้งในตู้อบที่ 60°C ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งความชื้นในกากมันสำปะหลังน้อยกว่า 13%w

5.3 สภาวะที่เหมาะสมของการหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมชนิดผงแห้ง (TY-DP) ด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการทดลองออร์โธโกนอลของการหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรด คือ 8%w เปลือกสับปะรดแห้ง 6%w เชื้อผสม TY-DP อายุ 5 วัน 3%w น้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นในอาหารเหลว LM-pH5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และระยะเวลาของการหมัก 4 วัน ข้อสังเกตจากผลที่ได้ คือ ระยะเวลาที่ใช้ ความเข้มข้นของเชื้อผสม TY-DP และความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้น เป็นค่าที่กำหนดไว้ที่ขอบเขตสูงสุด แต่ความเข้มข้นของเปลือกสับปะรดได้ค่าที่กำหนดไว้ในขอบเขตที่ค่าต่ำที่สุด

การใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอลหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ผลคำนวณจากความเข้มข้นของเชื้อผสมไม่เหมือนกับผลการคำนวณจากความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ วิธีการทดลองนี้จึงให้ผลที่ขัดแย้งกันในปัจจัยควบคุมบางตัวคือความเข้มข้นของน้ำตาลระหว่าง 1%w และ 3%w ทำให้ต้องทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล ผลการทดลองที่ได้คือ 3%w น้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นในอาหารเหลว LM-pH5 ดังนั้นเชื้อผสมต้องการใช้น้ำตาลในการเติบโต และสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลพร้อมๆ กัน ดังนั้น ถ้าต้องการผลิตเอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสูงจึงควรใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นสูง แต่ถ้าความเข้มน้ำตาลสูงเกินจะไปยับยั้งการเติบโตของเชื้อผสมซึ่งจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์จะถูกยับยั้งไปด้วย ดังนั้นในการหมักเอทานอลจากวัสดุเซลลูโลสต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม

5.4 การหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP ที่สภาวะเหมาะสม

เอทานอลที่ได้จากการหมักเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP ชนิดผงแห้งในอาหารเหลว LM-pH5 ที่สภาวะเหมาะสม พบว่า เอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 42 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาหมัก 4 วัน

5.5 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์เชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 และเชื้อผสม TY ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 40 เท่า ร่วมกับกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน สำหรับงานวิจัยต่อไปควรศึกษาเกี่ยวกับการเจริญร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ ให้ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันเพื่อให้เชื้อมีโอกาสเกิดการถ่ายทอดในระดับอณูวิทยาตามธรรมชาติ จากนั้นควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเชื้อผสมที่ได้ในระดับอณูวิทยา สำหรับการพัฒนาเชื้อผสมที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายและกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียวเพื่อการสร้างพลังงานทดแทนจากเอทานอลต่อไปในอนาคต

เอทานอลที่ได้จากการหมักแบบกะจากงานวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปใช้ต่อยอดในกระบวนการหมักเหลวในระดับขยายขนาดได้ เช่น การหมักเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเฟด-แบทช์ (กึ่งกะ) หรือแบบต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลให้มีผลได้เพิ่มขึ้น และพัฒนาเชื้อผสมให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเพื่อลดระยะเวลาที่ใช้ในการหมักลง หรือควรมีการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเติบโตของเชื้อผสมในการหมักเหลวเอทานอลจากเปลือกสับปะรดต่อไป

ในงานวิจัยนี้ใช้เปลือกสับปะรดเป็นสับสเตรทสำหรับเชื้อผสม TY-DP จึงควรศึกษากับสับสเตรทอื่นๆ ในงานวิจัยต่อไป และศึกษาขนาดอนุภาคที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลจากการย่อยสลายด้วยเชื้อผสมที่ผลิตได้

การวิเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีการเกิดสีกับไดโครเมตที่มีการออกซิเดชันกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้นมีความคลาดเคลื่อนได้ถ้าสารละลายตัวอย่างมีความขุ่น เพราะฉะนั้นจึงควรวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟีเพื่อความแม่นตรง

งานวิจัยนี้ใช้เปลือกสับปะรดที่ยังไม่ได้ผ่านการปรับสภาพเพื่อกำจัดลิกนินออกไป จึงควรหาสภาวะที่เหมาะสมของการกำจัดลิกนินออกจากเปลือกสับปะรดโดยไม่ต้องใช้สารเคมีในงานวิจัยต่อไป เนื่องจากเปลือกสับปะรดแห้งที่นำมาใช้เป็นสับสเตรทยังมีปริมาณของน้ำตาลที่เหลืออยู่ส่วนหนึ่ง ถ้านำไปผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีได้เซลลูโลสเพิ่มขึ้นจริง แต่สิ่งที่หายไปกับน้ำทิ้งคือน้ำตาล และต้องมีการบำบัดน้ำเสียหลังการใช้ปรับสภาพ จึงเป็นข้อด้อยของการปรับสภาพสับสเตรทด้วยสารเคมี

ข้อดีของงานวิจัยนี้คือการใช้สูตรอาหารที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี คือสูตรอาหารเหลว LM-pH5 ซึ่งประกอบด้วยสารที่จำเป็นและราคาถูก อาหารนี้เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมทั้งในการหมักแข็งและแข็งกึ่งเหลวเพื่อผลิตเอทนอลจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ พิจารณาจากเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมมีความแข็งแรง และเพาะเลี้ยงได้ง่าย