บทที่4
วิจารณ์ผลการทดลอง

การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ ได้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 3 ลิตร พร้อมถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตร สำหรับแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมักด้วยวิธีการปลอดเชื้อเพื่อนำเซลล์ยีสต์เข้มข้นป้อนเข้าสู่ระบบการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องในถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร ที่มีระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ด้วยถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตรในขั้นตอนที่สองต่อไป

ในขั้นตอนการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่อง ศึกษาถึงความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารสูตร A ต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในการหมักแบบขวดเขย่า เพื่อหาความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในระบบหมักแบบต่อเนื่องที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์สูงที่สุด พบว่าในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารสูตร A มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของยีสต์ที่ผลิตได้ผันแปร เช่นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นบางครั้งทำให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูง บางครั้งก็ให้ค่าต่ำ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากตัวอย่างที่เก็บมาวิเคราะห์มีปริมาตรเพียง 2 มิลลิลิตร ซึ่งน้อยเกินไปทำให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่คำนวณได้ไม่น่าเชื่อถือ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์แทนการพิจารณาที่ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ซึ่งมีค่าความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

การทดลองศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลในอาหารสูตร B ที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง ต่อการเจริญของยีสต์ พร้อมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของถังตกตะกอนซึ่งใช้ในการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมัก ในงานวิจัยนี้จะพิจารณาที่ภาวะที่ทำให้ถังตกตะกอนแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมักได้มากที่สุดเป็นหลัก เหตุเพราะต้องการเซลล์ยีสต์เข้มข้นปริมาณมากที่สุดจากถังตกตะกอนเพื่อเพียงพอสำหรับป้อนเข้าสู่ระบบการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง ดังผลการทดลอง 3.1.4 จะพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติม 100 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเซลล์ได้ปริมาณมากที่สุด คือ 8.37 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีอัตราการแยกเซลล์ในถังตกตะกอนสูงที่สุด

ส่วนการศึกษาผลอัตราการเจือจางต่อการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่องในผลการทดลองที่ 3.1.5 การเพิ่มอัตราการเจือจาง ความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้เป็นกรัมต่อลิตรลดลงและค่าผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ต่ำมาก เนื่องมาจากภายในเซลล์ยีสต์เกิดทั้งกระบวนการหมักเอทานอลและการหายใจของยีสต์ ทำให้น้ำตาลบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลซึ่งจะเห็นได้จากค่าผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้นั้นต่ำมาก (Dellweg et al, 1977; Johnstone and Barford, 1991) นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณน้ำตาลที่เหลือเพิ่มมากขึ้น เมื่อน้ำหมักที่ประกอบด้วยน้ำตาลปริมาณสูง

และเซลล์ยีสต์อิสระ เข้าสู่ถังตกตะกอนซึ่งเป็นถังปิดจึงเกิดกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ในถังตกตะกอน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการหมักนี้เองเป็นตัวการที่ทำให้เซลล์ยีสต์ฟุ้งกระจายในถังและไม่สามารถตกตะกอนได้ ซึ่งพบปัญหานี้ที่อัตราการเจือจาง 0.15 – 0.40 ต่อชั่วโมง

จากการทดลองข้างต้นจึงได้ภาวะที่พร้อมสำหรับการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่องสำหรับป้อนเข้าระบบการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่อง แต่ก่อนที่จะเริ่มการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องต้องทราบปริมาณน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลเริ่มต้นในการหมักเอทานอลเช่นเดียวกับขั้นตอนการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่อง ซึ่งได้ศึกษาดังผลการทดลองที่ 3.2.1 และ 3.2.2 ทำให้ทราบว่าการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องใช้อาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น และมีการเติมอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอลที่ชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก และจากการศึกษาการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องที่มีระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ดังผลการทดลองที่ 3.2.3 พบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์ในระบบมีน้อย ถึงแม้ใช้อัตราเวียนเซลล์ยีสต์ครึ่งหนึ่งของอัตราการป้อนสารเข้าระบบ ซึ่งส่วนหนึ่งมาจากปริมาณเซลล์ในถังตกตะกอนไม่เพียงพอสำหรับป้อนเข้าสู่ระบบการหมักเอทานอล อีกทั้งอัตราการเจือจางที่ใช้อาจจะสูงไปจนทำให้เซลล์หนีออกจากระบบ (wash out) เป็นผลให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ปริมาณน้อย นอกจากนี้ถังตกตะกอนของระบบการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องเพื่อเวียนกลับเซลล์ยีสต์ ก็ประสบปัญหาเช่นเดียวกับผลการทดลอง 3.1.5 คือเกิดการหมักเอทานอลในถังตกตะกอนเพราะมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำหมักสูง เมื่อทำการทดลองเป็นเวลานานจะพบว่าระบบการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่องก็ไม่สามารถผลิตเซลล์ป้อนได้ทันตามต้องการและถังตกตะกอนของการผลิตเอทานอลก็ไม่สามารถตกตะกอนเซลล์ยีสต์ได้ เซลล์ยีสต์จึงหลุดไปกับน้ำหมักส่วนที่ออกจากถังตกตะกอน ถ้าหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์นี้ ต้องมีการเปลี่ยนแปลงระบบการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการตกตะกอน เช่นการกรอง การใช้เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง หรือการเลือกใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถตกตะกอนได้ดี ซึ่งมีรายงานการใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถตกตะกอนได้ดีนี้ทำให้เซลล์ในระบบการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องสูงถึง 80 – 100 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตเอทานอลได้ 67 – 70 กรัมต่อลิตร (Kuriyama et al, 1993)

ด้วยขีดจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมัก ในงานวิจัยนี้จึงพิจารณาระบบการตรึงเซลล์ยีสต์เข้ามาทดแทนระบบเวียนเซลล์ยีสต์ โดยข้อดีของระบบตรึงเซลล์ยีสต์คือ ป้องกันเซลล์หนีออกจากระบบการหมักแบบต่อเนื่อง และสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ในระบบได้มากตามต้องการดังที่กล่าวในบทนำ จึงได้ศึกษาระบบการตรึงเซลล์ยีสต์ โดยเลือกใช้โซเดียม อัลจิเนต เป็นวัสดุตัวกลางในการตรึงเซลล์ยีสต์ที่ได้จากถังตกตะกอนของการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่อง มีรายงานว่าโซเดียม อัลจิเนตสามารถรักษาสภาพเจลได้ดีในสภาพการหมักเป็นเวลา

นานและให้อัตราการผลิตเอทานอลสูง (Nagashima et al, 1984) เมื่อทำการขึ้นรูปเจลโดยปั๊มเจลผ่านเข็มฉีดยา พบว่าไม่สามารถควบคุมรูปร่างของเม็ดให้เป็นทรงกลมได้ แต่รูปร่างของเม็ดตรึงเซลล์ที่เตรียมได้มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำ ดังนั้นการวัดขนาดของเม็ดจึงวัดเป็นความกว้างและความยาวแทน เช่น ขนาด 2.10x3.45 มิลลิเมตร 2.10 คือความกว้างของเม็ดตรึงเซลล์ในส่วนที่กว้างที่สุดมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และ 3.45 คือความยาวของเม็ดตรึงเซลล์มีหน่วยเป็นมิลลิเมตรเช่นเดียวกัน ส่วนผลของขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ต่อการผลิตเอทานอลได้ทำการทดลองแปรขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ โดยการขึ้นรูปเจลผ่านเข็มฉีดยาที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างๆ กันคือ 0.5 , 0.7 และ 1.0 มิลลิเมตร แต่ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ที่เตรียมได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังผลการทดลองที่ 3.2.4 ทำให้ผลการผลิตเอทานอลที่ขนาดเม็ดต่างๆกัน มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ที่เล็กที่สุดสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงที่สุด อาจเป็นเพราะมีการถ่ายเทมวลสารอาหารได้ดีกว่าเม็ดขนาดใหญ่ นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าแม้จะใช้ระบบตรึงเซลล์ยีสต์ แต่พบเซลล์ยีสต์อิสระหลุดออกมากับน้ำหมักปริมาณเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นเพราะเซลล์ยีสต์บางส่วนบนผิวของเม็ดตรึงเซลล์หลุดออกมา หรือยีสต์มีการเจริญได้แม้อยู่ในสภาพตรึงเซลล์ สอดคล้องกับรายงานที่ว่าพบการเจริญของยีสต์ภายนอกเม็ดตรึงเซลล์หลังจากเริ่มระบบการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องได้ 1 วัน (Godia et al, 1987b)

ในงานวิจัยนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบการหมักแบบตรึงเซลล์ยีสต์กับระบบการเวียนกลับเซลล์ยีสต์โดยใช้เซลล์อิสระ พบว่าระบบการหมักแบบตรึงเซลล์ยีสต์มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลดีกว่า ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ในระบบ เหตุเพราะการหมักแบบตรึงเซลล์ยีสต์มีปริมาณเซลล์ยีสต์ในระบบคิดเป็น 75.0 – 80.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรน้ำหมัก หรือ 37.5 – 40.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรเจล ในขณะที่ระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์มีปริมาณเซลล์ประมาณ 9.0 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ว่าการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องระบบตรึงเซลล์ยีสต์ให้การผลิตที่ดีกว่าระบบเซลล์อิสระ คือระบบสามารถผลิตเอทานอลได้ที่อัตราการเจือจางสูงๆ โดยเซลล์ยีสต์ไม่หนีออกนอกระบบ และสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ในระบบได้ตามต้องการ (Galazzo et al, 1990 ; Vives et al, 1993)

ในงานวิจัยนี้มีอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 17.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจือจาง 0.30 ต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นพบว่ามีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากมีปริมาณเซลล์ในระบบ และสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ เช่นจากรายงานของ Sheoran และคณะ (1998) มีปริมาณเซลล์ในระบบสูงถึง 30 %(น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิตเอทานอลได้ 20.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อีกทั้งเรื่องของขนาดและรูปร่างของเม็ดตรึงเซลล์ที่เตรียมได้มีความแตกต่างกันซึ่งจากรายงานของ Vives และคณะ(1993) สามารถเตรียมขนาดเม็ดเป็นทรงกลมได้

และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 1.0 มิลลิเมตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 90.3 กรัมต่อลิตร

ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เช่น อุณหภูมิ และพีเอช สำหรับค่าพีเอชระหว่างการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในงานวิจัยนี้มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 4.40 – 4.70 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสมบัติของอาหารกากน้ำตาลที่มีความสามารถในการรักษาความเป็นกรด-ด่าง (buffering capacity) สูง จึงทำให้พีเอชระหว่างการหมักไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ค่าพีเอชนี้เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับช่วงของค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลคือ 4.80 – 5.00 และเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับช่วงของค่าพีเอชที่นิยมใช้ผลิตเอทานอล คือ 4.00 - 4.50 เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน และยีสต์ยังสามารถเจริญได้ดี (Hodge and Hildebrandt, 1954 ; Prescott and Dunn, 1959) ในงานวิจัยนี้จึงได้แต่เพียงปรับพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น แต่มิได้ควบคุมพีเอชระหว่างการหมักเอทานอล ซึ่งทำให้ลดต้นทุนเกี่ยวกับการควบคุมค่าพีเอชระหว่างการหมักได้ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลคือ 30 องศาเซลเซียส และสามารถเพิ่มอุณหภูมิการหมักได้ถึง 33 องศาเซลเซียส ซึ่งมีผลทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลลดลงเพียง 5.2 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับรายงานของ Reed และ Peppler (1973) ที่ว่าอุณหภูมิที่ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ดีไม่ควรเกิน 32 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิของระบบการหมักสูงถึง 36 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลลดลงอย่างมาก ดังผลการทดลองที่ 3.2.6

สำหรับการศึกษาการนำน้ำหมักที่ผ่านการกลั่นแยกเอทานอลแล้ว นำมาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำรับผลิตเอทานอลอีกครั้ง พบว่าไม่สามารถนำน้ำหมักกลับมาใช้ได้อีกครั้ง ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากปริมาตรน้ำหมักที่นำกลับมาใช้เตรียมอาหารกากน้ำตาล มีรายงานว่าถ้ามีการนำปริมาตรน้ำหมักกลับมาใช้เตรียมอาหารมากกว่า 50 % (ปริมาตร:ปริมาตร) จะทำให้มีผลต่อการผลิตเอทานอล (Shojaosadati et al, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้โดยได้นำปริมาตรน้ำหมักกลับมาใช้อีกครั้งคิดเป็น 66 % (ปริมาตร:ปริมาตร) ของการทดลองที่ 3.2.5.1 และ 72 % (ปริมาตร:ปริมาตร) ของการทดลองที่ 3.2.5.2 นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากการสะสมผลิตภัณฑ์ของยีสต์ที่ผลิตขึ้นระหว่างการหมัก (by product) เช่น กรดซัคซินิก กลีเซอรอล อะซีตัลดีไฮด์ และสารที่มีอยู่แล้วในกากน้ำตาลซึ่งยีสต์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ จะถูกสะสมมากขึ้นเมื่อนำน้ำหมักกลับมาใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น เกลือ อนินทรีย์ โลหะหนักต่างๆ เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ลงในอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอลเพื่อรักษาสภาพของเม็ดตรึงเซลล์มิให้สลาย และมีการเติมแอมโม-เนียมซัลเฟตกับโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและ ฟอสฟอรัส ตามลำดับ จึงเกิดการสะสมของสารเหล่านี้มากขึ้นเมื่อนำน้ำหมัก

กลับมาใช้อีกครั้ง มีรายงานว่าสารเหล่านี้มีผลยับยั้ง 80 % ต่อการผลิตเซลล์และเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.23, 0.24, 0.73 โมลต่อลิตร ของแคลเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ตามลำดับ (Maiorella et al, 1984)

การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ในงานวิจัยนี้ มีข้อเสียบางประการที่ต้องมีการปรับปรุงคือเรื่องวิธีการขึ้นรูปเม็ดตรึงเซลล์โดยต้องควบคุมให้มีขนาดเล็กและมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมากที่สุดเหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลมากกว่านี้ อีกทั้งเนื้อหาของงานวิจัยยังไม่ครอบคลุมปัญหาทั้งหมดในระบบการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่อง ซึ่งยังมีประเด็นอื่นอีกที่น่าสนใจสำหรับผู้ที่ต้องการศึกษาระบบการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์นี้ต่อไป เช่น ปัญหาการกำจัดปนเปื้อนของจุลินทรีย์ไม่พึงประสงค์ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง ด้วยระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่มีอัตราการเจือจางเป็นตัวกำหนดและการตรึงเซลล์ยีสต์ที่ป้องกันเซลล์หลุดหนีออกนอกระบบการหมัก จุลินทรีย์ปนเปื้อนที่เป็นเซลล์อิสระอาจจะถูกกำจัดออกจากระบบได้โดยไม่ต้องใช้สารเคมีใดๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย