บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและการเก็บตัวอย่างวัชพืช

วัชพืชที่สำรวจพบและเก็บตัวอย่างมาใช้ในการทดลองนั้นมีทั้งที่เป็นพืชอายุหลายปี (perennial plant) และพืชอายุสั้นปีเดียว (annual plant) ในด้านการใช้ชีวมวลจากพืชเป็นพืชพลังงาน พืชที่เป็นพืชอายุหลายปีจะมีความได้เปรียบพืชอายุสั้นปีเดียว เนื่องจากพืชอายุหลายปีสามารถเจริญขึ้นใหม่หลังจากการเก็บเกี่ยวในแต่ละปี จึงไม่ต้องปลูกทดแทนใหม่ทุกปี ซึ่งประหยัดต้นทุนได้มาก (Samson, 1991; McLaughlin and Walsh, 1998)

2. การหาผลผลิตชีวมวลและปริมาณความชื้นขณะเก็บเกี่ยวในพืช

วัชพืชที่มีผลผลิตชีวมวลสูงคือ *P. purpureum* และ *T. maxima* ซึ่งเป็นวัชพืชที่มีต้นใหญ่และสูง ในขณะที่วัชพืชที่มีลำต้นใต้ดินและส่วนเหนือดินเป็นส่วนของใบ เช่น *I. cylindrica* *T. angustifolia* จะมีผลผลิตชีวมวลต่อพื้นที่ต่ำ ถิ่นอาศัยและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของวัชพืชก็สำคัญต่อผลผลิตชีวมวลเช่นกัน คือ วัชพืชที่เจริญเติบโตอยู่บริเวณใกล้น้ำหรือมีน้ำขังและมีลำต้นหรือใบอวบน้ำจะมีปริมาณความชื้นขณะเก็บเกี่ยวในพืชสูงกว่าวัชพืชที่เจริญเติบโตบริเวณพื้นที่แห้ง ในผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างจึงพบว่า *C. aquatica* และ *T. angustifolia* มีปริมาณความชื้นขณะเก็บเกี่ยวในพืชสูงถึง 91.09% และ 90.17% ตามลำดับ ในขณะที่วัชพืชบกอื่นที่พบมีปริมาณความชื้นขณะเก็บเกี่ยวอยู่ในช่วง 66.56-77.45% และมีค่าต่ำสุดใน *S. spontaneum* คือ 58.84% ซึ่งเป็นวัชพืชที่ชอบเจริญอยู่บริเวณที่เป็นดินร่วนปนทรายซึ่งไม่ชุ่มน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงฤดูการเก็บเกี่ยวก็มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากวัชพืชบางชนิดจะแห้งลงในช่วงเข้าสู่ฤดูหนาว วัชพืชที่เป็นอายุสั้นปีเดียวจะตายไป ส่วนวัชพืชที่มีอายุหลายปีจะเข้าสู่ช่วงพักเพื่อเตรียมสะสมธาตุอาหารไว้เจริญเติบโตในฤดูการเจริญเติบโตของปีถัดไป (Lewandowski et al., 2000) แต่ในการทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างวัชพืชในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิยายนซึ่งเป็นช่วงปลายฤดูฝนเข้าสู่ต้นฤดูหนาว วัชพืชทั้ง 10 ชนิดจึงยังไม่เริ่มแห้ง ทำให้ปริมาณความชื้นขณะเก็บเกี่ยวในพืชค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ switchgrass และ miscanthus ซึ่งเป็นพืชพลังงานในสหรัฐอเมริกาและยุโรปที่จะมีการเก็บเกี่ยวเมื่อผ่านช่วงฤดูหนาวไปแล้ว วัชพืชทั้งสองชนิดนี้จะถูกปล่อยให้ยืนต้นแห้งอยู่ในแปลง ซึ่งจะช่วยลดความชื้นได้มาก ดังนั้นเมื่อเก็บเกี่ยวในฤดูใบไม้ผลิจึงมีความชื้นเหลือเพียง 15% (Scurlock, 1998) แต่ใน

ประเทศไทยเป็นเขตร้อนชื้น ไม่มีช่วงฤดูหนาวที่แห้งแล้งเช่นเดียวกับในสหรัฐอเมริกาและยุโรป ดังนั้นถ้าต้องการเก็บเกี่ยววัชพืชโดยให้มีปริมาณความชื้นในพืชต่ำที่สุดจึงควรเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม เพราะจากการสำรวจพบว่าวัชพืชส่วนใหญ่ใน 10 ชนิดนี้ มีการแห้งของต้นในทุกพื้นที่ที่สำรวจพบ ยกเว้นวัชพืชน้ำ 2 ชนิดคือ *C. aquatica* และ *T. angustifolia* การที่ชีวมวลมีปริมาณ ความชื้นขณะเก็บเกี่ยวในพืชต่ำนั้น จะมีความสำคัญมากเพราะจะช่วยลดต้นทุนและพลังงานที่ใช้ในการอบแห้งได้มาก (Scurlock, 1998)

3. การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลซึ่งได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน สามารถใช้เป็นดัชนีเบื้องต้นในการประมาณค่าพลังงาน (energy content) ในพืชแต่ละชนิดได้ เนื่องจากพืชที่มีปริมาณคาร์บอนยิ่งน้อย ค่า heating value ก็จะยิ่งน้อยตามไปด้วย พืชที่มีปริมาณเซลลูโลสและลิกนินสูงจะมีค่า heating value ที่สูงกว่า เนื่องจากเซลลูโลสและลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักของชีวมวลที่มีคาร์บอนในโครงสร้างสูงจึงให้ค่า heating value สูง (Klass, 1998)

วัชพืชที่มีปริมาณเซลลูโลสสูงจะเป็นปัจจัยเบื้องต้นในการเลือกเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ (Samson and Omielan, 1992) แต่ทั้งนี้ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นด้วย ที่สำคัญคือ การปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อเพิ่มความสามารถในการเข้าย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้ (McMillan, 1994; Hsu, 1996)

4. การหาปริมาณซัลเฟอร์ในชีวมวลพืช

ปริมาณซัลเฟอร์ในชีวมวลพืชจะมีผลต่อการนำพืชมาใช้ในการเผาไหม้โดยตรง (direct combustion) เพื่อให้ความร้อนและพลังงาน เนื่องจากในการเผาไหม้จะมีการปลดปล่อยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ออกมาด้วย โดยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะรวมตัวกับน้ำทำให้เกิดกรดซัลฟูริก ซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาฝนกรด (Chongpeerapien et al., 1990) ปริมาณก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์นี้จะแปรผันตามปริมาณซัลเฟอร์ในชีวมวลของพืชแต่ละชนิด (Lewandowski et al., 1995) สำหรับวัชพืชทั้ง 10 ชนิดที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ แล้วพบว่ามีถึง 6 ชนิด ที่มีปริมาณซัลเฟอร์ไม่ถึง 1% คือ ตั้งแต่ 0.06-0.77% วัชพืชทั้ง 6 ชนิดนี้ได้แก่ *C. aquatica* *P. maximum* *S. propinquum* *I. cylindrica* *T. maxima* และ *S. spontaneum* ปริมาณซัลเฟอร์ที่ไม่ถึง 1% นั้นเป็นปริมาณที่ต่ำมาก สอดคล้องกับในรายงานของ Klass (1998) ที่รายงานว่าปริมาณซัลเฟอร์ในชีวมวลพืชมีได้ตั้งแต่ระดับที่ต่ำมากจนถึงที่ระดับประมาณ 1% แต่โดย

ทั่วไปแล้วจะมีปริมาณน้อยมาก ส่วนวัชพืชอีก 4 ชนิดที่เหลือนั้นมีปริมาณซัลเฟอร์สูงคือ 1.09-1.54%

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟอร์ของวัชพืช 6 ชนิดที่ทำการศึกษาแล้วพบว่ามีปริมาณซัลเฟอร์ไม่ถึง 1% กับพืชพลังงานชนิดอื่นและถ่านหิน จะพบว่า วัชพืชทั้ง 6 ชนิดมีปริมาณซัลเฟอร์ที่ต่ำกว่าถ่านหิน แต่ถ้าพิจารณาเปรียบเทียบเฉพาะพืชด้วยกัน จะพบว่ามีวัชพืช 5 ชนิดที่มีปริมาณซัลเฟอร์อยู่ในช่วงเดียวกับพืชพลังงานที่สำคัญ 4 ชนิด คือ switchgrass miscanthus reed canary grass และ kentucky bluegrass วัชพืชทั้ง 5 ชนิดที่มีคุณสมบัติน่าสนใจนี้คือ *P. maximum* *S. propinquum* *I. cylindrica* *T. maxima* และ *S. spontaneum*

5. การหาปริมาณเถ้าในชีวมวลพืช

ปริมาณเถ้าในวัชพืชทั้ง 10 ชนิด แตกต่างกันเนื่องจากปริมาณเถ้าในพืชจะแตกต่างกันตามวงศ์ ชนิดของพืช แหล่งที่ปลูก และฤดูการเก็บเกี่ยว เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเถ้าในพืชพลังงานคือ switchgrass miscanthus และ reed canary grass จะพบว่าปริมาณเถ้าในวัชพืชทั้ง 10 ชนิด จะอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับ ปริมาณเถ้าในพืชพลังงานเหล่านี้ กล่าวคือ ปริมาณเถ้าใน switchgrass จะอยู่ในช่วง 4.5 -10.5% ปริมาณเถ้าใน miscanthus จะอยู่ในช่วง 1.6-4.0% และปริมาณเถ้าใน reed canary grass จะ อยู่ในช่วง 1.9 -11.5% การลดปริมาณเถ้าในพืชจำพวกหญ้าที่เป็นพืชอายุหลายปีอาจทำได้ โดยการเก็บเกี่ยวพืชในฤดูใบไม้ผลิ เพราะหญ้าที่เจริญผ่านช่วงฤดูหนาวมาแล้ว ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในส่วนเหนือดินของพืช จะลดลงปริมาณเถ้าจึงต่ำลงด้วย (Samson and Mehdi, 1998)

ปริมาณเถ้าที่ต่ำจะมีความสำคัญมาก เนื่องจากในการเผาไหม้ชีวมวลพืชเพื่อให้ได้พลังงานนั้นจะเกิดเถ้าอยู่ในเตาเผา ปริมาณเถ้าที่สูงนอกจากจะยากต่อการกำจัดแล้ว ยังเป็นปัญหาในการอุดตันตะแกรงของเตาเผาด้วย โดยเถ้าจะมีการหลอมตัวเป็นก้อนแข็งเมื่อมีการเผาไหม้ที่อุณหภูมิสูงมากๆ (Paulrud and Nilsson, 2001)

6. การหาค่า heating value ของชีวมวลพืช

จากที่กล่าวเบื้องต้นในข้อ 3 ว่าปริมาณองค์ประกอบชีวมวลสามารถใช้เป็นดัชนีเบื้องต้นในการประมาณค่าพลังงานในพืชแต่ละชนิดได้ พืชที่มีปริมาณเซลลูโลสและลิกนินสูงจะมีค่า heating value ที่สูงกว่า เนื่องจากเซลลูโลสและลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักของชีวมวลที่มีคาร์บอนในโครงสร้างสูงและให้ค่า heating value สูง (Klass, 1998) จากผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับหลักการนี้ กล่าวคือ *T. maxima* ที่มีค่า heating value สูงสุดนั้น เป็นวัชพืชที่

มีปริมาณลิกนินสูงสุดเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น และมีปริมาณเซลลูโลสสูงเป็นอันดับสองรองจาก *S. spontaneum* ในขณะเดียวกัน *S. spontaneum I. cylindrica* และ *P. karka* ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสและลิกนินสูงก็มีค่า heating value สูงรองลงมาจาก *T. maxima*

7. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ทั้งสามสายพันธุ์ของ *Acrophialophora* sp. ที่ทำการศึกษานั้นพบว่า แอคติวิตีของ exoglucanase และ endoglucanase มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าการใช้อัลฟาเซลลูโลสเข้มข้น 3% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ โดย exoglucanase จะทำหน้าที่ตัดปลายสายส่วนที่เป็น non-reducing end ของเซลลูโลส ทำให้ได้เซลโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่และได้กลูโคสด้วย endoglucanase ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-glucosidic โดยการตัดแบบสุ่ม ทำให้ได้กลูโคสและเซลโลไบโอส (Smith and Aidoo, 1988; Eriksson et al., 1990) ทั้งนี้มีรายงานว่าทั้ง exoglucanase และ endoglucanase จะถูกยับยั้งได้โดยเซลโลไบโอสที่เป็นผลิตภัณฑ์ (Saha et al., 1998) แต่ในการทดลองนี้พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป และมีค่าสูงสุดในวันที่ 15 ของการบ่มเชื้อ แสดงว่าเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้นจากการทำงานของทั้งสองเอนไซม์ยังมีปริมาณไม่มากพอที่จะทำให้เกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ได้

สำหรับแอคติวิตีของ β-glucosidase ในทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 12 วันแรกของการบ่มเชื้อ และมีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 15 อย่างมีนัยสำคัญนั้นอาจเป็นเพราะในช่วงเวลา 12 แรก เซลโลไบโอสที่เป็นสับสเตรทและกลูโคสที่เป็นผลิตภัณฑ์ยังมีไม่มาก เนื่องจากแอคติวิตีของ exoglucanase และ endoglucanase ยังไม่สูงมาก เชื้อราจึงผลิตเอนไซม์ β-glucosidase แค่เพียงพอที่จะย่อยสลายสับเสตรทเท่านั้นเพื่อประหยัดพลังงานของเซลล์ แต่เมื่อเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 15 ของการบ่มเชื้อกลับพบว่า แอคติวิตีของ β-glucosidase ใน *Acrophialophora* sp. UV10-2 และ *Acrophialophora* sp. UV10-7 มีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นเพราะแอคติวิตีของ exoglucanase และ endoglucanase มีค่าสูงสุดเช่นกัน ทำให้มีสับสเตรทคือเซลโลไบโอสอยู่มาก เชื้อราจึงผลิต β-glucosidase ออกมามากขึ้นเพื่อย่อยสลายให้ได้กลูโคสแล้วนำไปใช้ในเซลล์ต่อไป แสดงว่าปริมาณเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้นจากการทำงานของทั้งสองเอนไซม์นี้เหมาะสมในการกระตุ้นการทำงานของ β-glucosidase นอกจากนี้ปริมาณเซลโลไบโอสและกลูโคสนี้ยังมีไม่มากพอที่จะ

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ เพราะเอนไซม์ β-glucosidase สามารถถูกยับยั้งได้โดยเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นสับสเตรทได้ดีเท่าๆ กับกลูโคสที่เป็นผลิตภัณฑ์ (Saha et al., 1998)

สำหรับ *Acrophialophora* sp. wild type ที่มีแอคติวิตีของ β-glucosidase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 15 วันของการบ่มเชื้อ อาจเป็นเพราะเซลโลไบโอสและกลูโคสในระบบที่มีมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปสามารถยับยั้งการทำงานของ β-glucosidase ของเชื้อราสายพันธุ์นี้ได้ ซึ่งเป็นการยับยั้งโดยสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ (Saha et al., 1998)

แม้ว่าแอคติวิตีของ endoglucanase และ β-glucosidase ของ *Acrophialophora* sp. UV10-2 และ *Acrophialophora* sp. UV10-7 จะมีค่าสูงไม่แตกต่างกัน แต่ *Acrophialophora* sp. UV10-2 มีแอคติวิตีของ exoglucanase สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้ *Acrophialophora* sp. UV10-2 ในการผลิตเซลลูเลสเพื่อใช้ในกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง เพราะการทำงานร่วมกันของเซลลูเลสทั้งสามองค์ประกอบจะมีความสัมพันธ์กันในการย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อให้ได้กลูโคสมาใช้ในการหมักต่อไป (Philippidis, 1996)

8. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตร Potato Dextrose Broth (PDB)

จากผลการเจริญเติบโตของ *Acrophialophora* sp. UV10-2 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร PDB จะพบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบอย่างรวดเร็ว จากเริ่มต้นการบ่มเชื้อจนถึงปลายระยะ log phase ใช้เวลา 2 วัน ซึ่งนับว่าเร็วมากเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้เวลาถึง 7 วันตามการทดลองของพิสุทธ์ พวงนาค (2542) ดังนั้นการเลี้ยง *Acrophialophora* sp. UV10-2 ในอาหารสูตร PDB เป็นเวลา 2 วัน จึงเหมาะที่จะใช้เป็น seed culture เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเซลลูเลสต่อไป เนื่องจากจะได้หัวเชื้อปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว และยังช่วยประหยัดอาหารเลี้ยงเชื้อและพลังงานที่ใช้ในการบ่มเชื้อได้

9. การศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์

การศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์ *K. marxianus* NRRL Y-1109 ในอาหารสูตร YMB ที่เก็บผลการทดลองทุก 6 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จากเริ่มต้นการบ่มเชื้อจนถึงปลายระยะ log phase ใช้เวลา 12 ชั่วโมง การที่ยีสต์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเพราะว่ายีสต์ที่เจริญในภาวะเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch culture) ระดับของการสะสมคาร์โบไฮเดรตในเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเจริญเติบโต เพราะในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีน้ำตาลสูงและมีไนโตรเจนอยู่จำกัด (Berry, 1989) ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์สายพันธุ์นี้ที่มีอายุในการบ่ม 12 ชั่วโมง เป็นหัวเชื้อในการหมักต่อไป

10. การหาความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมัก

ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นมีผลต่อผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมัก ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากการทดลอง และสอดคล้องกับการทดลองของ Blotkamp และคณะ (1981) ที่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นแล้ว ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้เพิ่มขึ้นด้วย แต่ในการทดลองของ Blotkamp และคณะ ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น $3.3x10^7$ ถึง $1.62x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่าในงานวิจัยนี้ ยิ่งไปกว่านั้นจากผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นที่มากหรือน้อยเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลที่ต่ำกว่าการใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นที่เหมาะสม การใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น $1x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงกว่าการใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น $1x10^8$ และ $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบได้ดี มีการเพิ่มของจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วภายในวันที่ 1 ของการหมัก มีประสิทธิภาพของการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลที่ดี เพราะเหลือกลูโคสในระบบต่ำมาก

ผลผลิตเอทานอลที่ต่ำกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น $1x10^8$ และ $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อาจเป็นเพราะว่ากลูโคสถูกใช้ไปในการหายใจมากกว่าใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล เซลล์ที่อยู่ในน้ำหมักที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเข้มข้นสองค่านี้อาจอยู่ในภาวะพัก หรือที่เรียกว่า resting cell เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญตลอด 7 วันที่ทำการหมัก ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่า เซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตจะมีการหายใจที่ใช้พลังงานจากน้ำตาล โดยจะใช้น้ำตาลเพียง 3-20% เท่านั้น เปรียบเทียบกับเซลล์ที่อยู่ในภาวะพักจะใช้น้ำตาลในการหายใจถึง 25-100% (Lagunas et al., 1982: cited in Berry, 1988; Walker,1998)

ค่า pH ของน้ำหมักที่ลดลงเป็นผลมาจากการเจริญเติบโตและกระบวนการหมักของยีสต์ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น $1x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงสุดและมีการเจริญเติบโตดีที่สุดนั้น มีค่า pH ของน้ำหมักลดลงจากวันเริ่มต้นการหมัก โดยสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้น จำนวนเซลล์ที่มากขึ้น และน้ำตาลที่ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการหมักนอกจากจะมีเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักแล้ว ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก็เป็นผลิตภัณฑ์หลักเช่นกัน บางส่วนของก๊าซนี้จะอยู่ในน้ำหมักในรูปของกรดคาร์บอนิก และบางส่วนระเหยเป็นก๊าซ นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์รอง (minor product) อื่นๆ เกิดขึ้นด้วย ซึ่งจะแตกต่างกันไปในยีสต์แต่ละชนิดและสภาวะที่เลี้ยง กรดอินทรีย์เป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์รองที่เกิดขึ้น ตัวอย่างเช่น กรดซิตริก กรดซักซินิค และกรดอะซิติก เป็นต้น (Walker, 1998) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้น้ำหมักที่มีแอคติวิตีของเซลล์ในกระบวนหมักสูงมีค่า pH ลดลงมากกว่าค่า pH ของน้ำหมักที่มีแอคติวิตีของเซลล์ในกระบวนหมักน้อยกว่า

อย่างไรก็ตาม *K. marxianus* เป็นยีสต์ที่มีการเจริญเติบโตได้ในช่วง pH ที่กว้าง คือ 3-8 โดยมีค่า pH ที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อการเจริญเท่ากับ 4 (Viver et al., 1993) แม้ว่าค่า pH ของน้ำหมักจะลดลงเหลือประมาณ 4.1-4.9 แต่ก็ยังอยู่ในช่วงที่ยีสต์เจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ค่า pH ที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากยีสต์ชนิดนี้ก็อยู่ในช่วง 4-5 เช่นกัน เพราะในสภาวะที่เป็นกรด ยีสต์สามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียได้ดี (Hack and Marchant, 1998)

K. marxianus เป็นยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (Abdel-Fattah et al., 2000) และมีรายงานว่ายีสต์ในสกุลนี้สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40 องศาเซลเซียส ถึง 50 องศาเซลเซียส (Banat, Nigam, and Marchant, 1992)

ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเจือจางหรือหนาแน่นจนเกินไป ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม คือ $1x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเอทานอลในวันแรกยังคงสูงไม่ต่างจากผลผลิตที่ 40 องศาเซลเซียส แต่ผลผลิตก็ยังมีการเพิ่มคงและลดลงสลับกันไปเมื่อเวลาผ่านไป ไม่คงที่เหมือนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงว่ายีสต์ชนิดนี้มีความสามารถในการทนร้อนและผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งต่างจากยีสต์ที่ไม่ทนร้อน เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ที่ประสิทธิภาพในการหมักจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Abdel-Fattah et al., 2000)

ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ Banat และคณะ (1992) ที่ทดลองเลี้ยง *K. marxianus* หลาย isolate ที่อุณหภูมิ 30 37 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตร Yeast Ferment Medium ที่มีกลูโคส 14% (w/v) จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทุก isolate จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด ผลผลิตเอทานอลที่ได้รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 45 37 50 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากการทดลองในงานวิจัยนี้ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญในช่วงแรกของยีสต์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การเจริญเติบโตได้เร็วในช่วงแรกจะมีความสำคัญเพราะในกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่องในช่วงแรกนั้น จะไม่มีกลูโคสเกิดขึ้นมาก กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอทานอล ดังนั้นเซลล์ที่แข็งแรงและเจริญเติบโตได้รวดเร็วในช่วงแรกของการหมักจะมีความได้เปรียบมากกว่า (Belkacemi, 1998) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ใน

กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง ทั้งนี้การทำงานที่ดีของเอนไซม์เซลลูเลสก็อยู่ในช่วงนี้เช่นกัน คือ 40 – 60 องศาเซลเซียส (Boyle, Barron, and McHale, 1997)

11. **การหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง** (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

11.1 <u>การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส</u>

แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละองค์ประกอบที่ผลิตได้จาก *Acrophialophora* sp. UV10-2 มีค่าแตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทำการผลิต แต่ยังมีค่าอยู่ในช่วงที่ไม่ต่างกันมาก นอกจากนี้ยังตรวจพบแอคติวิตีของไซแลนเนสด้วย แต่มีค่าแอคติวิตีที่ต่ำ การพบว่า crude enzyme มีแอคติวิตีของไซแลนเนส เนื่องจากเซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์นี้มีแอคติวิตีร่วมกับแอคติวิตีของไซแลนเนส (common activity) คือ สามารถย่อยสลายไซแลนได้บางส่วน

11.2 <u>การปรับสภาพพืช</u>

การปรับสภาพพืชก่อนนำมาใช้ในกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่องมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดอุปสรรคต่างๆ ที่ป้องกันการเข้าย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเพิ่มความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างเซลลูเลสกับเซลลูโลส ปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์หรือความสามารถในการหมักของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ชนิด คือ ความเป็น crystallinity ของเซลลูโลส การปกป้องเซลลูโลสด้วยลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ล้อมรอบชั้นของมัดสายเซลลูโลส และพื้นที่ผิวของเซลลูโลสที่เอนไซม์สามารถเข้าไปจับเพื่อย่อยสลาย (Hsu, 1996)

จากผลการทดลองที่พบว่าวัชพืชทั้ง 10 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสหลังการปรับสภาพโดยการตัดและบด และแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่มีวัชพืชบางชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณลิกนินหลังการปรับสภาพ การเปลี่ยนแปลงปริมาณขององค์ประกอบหลักของชีวมวลทั้ง 3 ชนิดนี้ จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ปริมาณองค์ประกอบแต่ละองค์ประกอบ ลักษณะสมบัติของแต่ละองค์ประกอบนั้นๆ และการตอบสนองที่ต่างกันต่อวิธีการปรับสภาพที่หลากหลาย (McMillan, 1994; Hsu, 1996)

การตัดและบดเป็นการลดขนาดและความยาวของเส้นใยลิกโนเซลลูโลส ส่วนการปรับสภาพด้วยสารเคมี เช่น สารละลายด่างซึ่งใช้ในการทดลองนี้ เป็นสารที่ทำให้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสบวมพอง นิ่มขึ้น ทำให้ย่อยสลายได้มากขึ้น เพราะมีการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ออกไปบางส่วน เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินประเภท alkali lignins สามารถละลายได้ในสารละลายด่างเจือจาง (Bungay, 1981) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและ

ลิกนินเมื่อเทียบต่อน้ำหนักแห้งของวัชพืชลดลง และทำให้ปริมาณเซลลูโลสต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น

แต่ในวัชพืชบางชนิดได้แก่ *I. cylindrica* *P. maximum* *P. polystachyon* *P. purpureum* และ *S. spontaneum* มีปริมาณลิกนินต่อหน่วยน้ำหนักแห้งคงที่ เป็นเพราะว่าลิกนินถูกกำจัดออกไปได้เพียงบางส่วน แต่มีการกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกไปได้ จึงทำให้ปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเท่านั้นที่เปลี่ยนแปลง ในทางเดียวกัน วัชพืชที่มีปริมาณลิกนินต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นหลังการปรับสภาพได้แก่ *P. karka* และ *T. angustifolia* เป็นเพราะว่าลิกนินถูกกำจัดออกไปได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย

11.3 <u>การเตรียมหัวเชื้อยีสต์</u>

หัวเชื้อยีสต์ที่ใช้มีอายุอยู่ในระยะ log phase และมีการเจริญเติบโตสูงสุด จึงเหมาะสมที่จะใช้ถ่ายเชื้อเพื่อหมัก เพราะเซลล์ที่มีความแข็งแรงและมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมจะมีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล

11.4 <u>การหมักในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร</u>

ผลการย่อยสลายและหมักของวัชพืชแต่ละชนิดหลังการปรับสภาพเห็นได้ชัดเจนจากผลผลิตเอทานอลที่ได้และการลดลงของสับสเตรท วัชพืชที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดและการลดลงของกากพืชสูงสุด คือ *C. aquatica* ซึ่งวัชพืชชนิดนี้เป็นสับสเตรทที่มีปริมาณลิกนินต่อหน่วยน้ำหนักแห้งต่ำสุด คือ 4.32% (หลังผ่านการปรับสภาพแล้ว) แสดงว่าปริมาณลิกนินที่เหลืออยู่ในสับสเตรทมีความสำคัญมาก เพราะหลังผ่านการปรับสภาพ วัชพืชชนิดนี้มิได้มีปริมาณเซลลูโลสต่อหน่วยน้ำหนักแห้งสูงสุด แต่มีการลดลงของปริมาณเฮมิเซลลูโลสมากเป็นอันดับสอง และมีการลดลงของปริมาณลิกนินมากที่สุด

ปริมาณลิกนินที่เหลืออยู่ในสับสเตรทมีความสำคัญมาก เนื่องจากมีสมมติฐานที่ว่าลิกนินจะขัดขวางการเข้าย่อยสลายเซลลูโลสโดยอยู่ล้อมรอบมัดสายเซลลูโลสและจะจับกับเอนไซม์เซลลูเลสแบบแปรผันกลับไม่ได้ สมมติฐานนี้ได้รับการสนับสนุนจากงานวิจัยหลายงานที่แสดงว่าเซลลูเลสจับกับ lignaceous material ทำให้ลดโอกาสของเอนไซม์ที่จะเข้าจับกับเซลลูโลส (Ooshima et al., 1990; McMillan, 1994) นอกจากนี้ตำแหน่งและธรรมชาติของการจับกันระหว่างลิกนินและเซลลูโลสอาจมีผล อย่างมากต่อการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เนื่องจากวัสดุที่มีปริมาณลิกนินเท่ากัน แต่กลับมีความแตกต่างกันอย่างมากในความสามารถของการถูกย่อยสลาย (McMillan, 1994)

อีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อผลผลิตเอทานอลเช่นกัน คือ ลักษณะสมบัติของเซลลูโลสในพืชแต่ละชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังผ่านการปรับสภาพแล้ว จากผลการทดลองพบว่า วัชพืชหลายชนิดที่เป็นสับสเตรทมีปริมาณเซลลูโลสหลังการปรับสภาพสูงกว่าใน *C. aquatica* แต่ผลผลิตเอทานอลที่ได้กลับต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากผลของปริมาณลิกนินที่เหลืออยู่แล้ว อาจเป็นเพราะว่าเซลลูโลสที่มีอยู่มีความเป็น crystallinity สูงกว่าก็เป็นได้ (Hsu, 1996) เพราะเซลลูโลสส่วนที่เป็น crystallinity คือ บริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนอยู่อย่างหนาแน่น จึงยากต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Eriksson, 1990) ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จึงต่ำ ปริมาณเอทานอลจึงต่ำไปด้วย ในทางตรงกันข้าม เซลลูโลสส่วนที่เป็น amorphus คือ ส่วนที่สายของกลูแคน (glucan) จับตัวกันอย่างหลวมๆ จึงง่ายต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ดังนั้นผลผลิตเอทานอลที่มากกว่าซึ่งได้จากการใช้ *C. aquatica* เป็นสับสเตรท อาจเนื่องมาจากการมีเซลลูโลสส่วนที่เป็น amorphus อยู่มากกว่าในสับสเตรทอื่นก็เป็นได้

ปัจจัยอื่นๆ เช่น ความมีรูพรุนหรือมีพื้นที่ผิวของสับสเตรทมากก็มีความสำคัญเช่นกัน ซึ่งจะเพิ่มพื้นที่ให้เอนไซม์มาจับได้มากขึ้น ซึ่งจะสัมพันธ์กับอัตราการย่อยสลายในช่วงเริ่มต้นจะสูงขึ้น ปริมาณสับสเตรทที่เหลือจะลดลงอย่างรวดเร็ว และปริมาณเอทานอลก็จะสูงตามไปด้วย ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากการใช้ *C. aquatica* เป็นสับสเตรท

ปริมาณเซลโลไบโอสที่ไม่พบในน้ำหมักของวัชพืชบางชนิด คือ *C. aquatica P. karka T. maxima* และ *T. angustifolia* แสดงว่า เซลโลไบโอสถูกย่อยสลายไปเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่าในน้ำหมักของวัชพืชที่เหลือชนิดอื่นที่มีเซลโลไบโอสเกิดขึ้น ก็จะพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณก็จะลดลงจนเป็นศูนย์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยเหตุผลเดียวกันกับที่กล่าวมา ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Chang และคณะ (2001) ที่พบว่าเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF ของ switchgrass ซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ จะถูกย่อยสลายไปเป็นกลูโคสได้เกือบสมบูรณ์

สำหรับปริมาณไซโลสที่พบในน้ำหมักของพืชบางชนิดนั้น มีปริมาณที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับกลูโคส และมีปริมาณคงที่ตลอดระยะเวลาในการหมัก การมีไซโลสปริมาณต่ำในน้ำหมักเป็นเพราะ crude enzyme ที่ใช้มีแอคติวิตีของไซแลนเนสด้วย แต่มีแอคติวิตีที่ต่ำมาก การที่ crude enzyme ซึ่งได้จากการผลิตด้วยอาหารสูตรซักนำให้ผลิต เซลลูเลสนั้น มีแอคติวิตีของไซแลนเนสอาจเป็นเพราะเซลลูเลสมีแอคติวิตีร่วมกับไซแลนเนส คือ เซลลูเลสที่ได้นี้สามารถย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสได้บางส่วน จึงทำให้ได้น้ำตาลไซโลสที่เป็นหน่วยย่อยของสายไซแลน แอคติวิตีของไซแลนเนสที่วัดได้ต่ำมากจึงทำให้ได้ไซโลสปริมาณต่ำไปด้วย

การตรวจสอบปริมาณไซโลสร่วมกับปริมาณกลูโคสในน้ำหมักมีความสำคัญ เนื่องจาก *K. marxianus* เป็นยีสต์ที่สามารถหมักไซโลสให้กลายเป็นเอทานอลได้ แต่ทั้งนี้วิถีของการหมักที่ใช้ไซโลสเป็นสับสเตรทเพื่อผลิตเอทานอล จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อปริมาณกลูโคสในระบบหมดยีสต์จึงจะเปลี่ยนไปใช้น้ำตาลไซโลสแทน เพราะยีสต์มีความชอบต่อกลูโคสมากกว่า นอกจากนี้ภาวะของการหมักที่ใช้ไซโลสเป็นสับสเตรทมีความซับซ้อนมากกว่าการหมักที่ใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท คือ จะต้องมีออกซิเจนไม่น้อยเกินไปเพราะยีสต์จะต้องหายใจ และต้องมีออกซิเจนไม่มากเกินไปเพื่อให้เกิดการหมักได้ (Walker, 1998) ดังนั้นเอทานอลที่เกิดขึ้นจึงมาจากการหมักกลูโคส

จำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้ในน้ำหมักเกี่ยวข้องกับผลผลิตเอทานอลที่ได้เช่นกัน กล่าวคือการที่จะได้ผลผลิตเอทานอลสูงนั้นยีสต์จะต้องมีการเจริญเติบโตที่ดี มีความแข็งแรง และมีอัตราการเพิ่มขึ้นของเซลล์มีชีวิตอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการหมัก แต่ผลของการเจริญเติบโตจะต่ำกว่าในช่วงท้าย (Walker, 1998) จากผลการทดลองของงานวิจัยนี้พบว่า ในการหมักที่ใช้ *C. aquatica* เป็นสับสเตรทซึ่งให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดนั้น มีจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้ต่ำกว่าในน้ำหมักที่ใช้วัชพืชชนิดอื่นเป็นสับสเตรท แต่ในการทดลองนี้ การหมักวัชพืชทั้ง 10 ชนิด ใช้ภาวะเดียวกันและยีสต์ชนิดเดียวกัน ต่างกันเพียงชนิดของสับสเตรท ดังนั้นการที่น้ำหมักที่ใช้ *C. aquatica* เป็นสับสเตรทมีจำนวนเซลล์ยีสต์น้อยกว่า อาจเป็นความผิดพลาดบางอย่างในการนับเซลล์โดยการใช้ haemacytometer

ผลของ pH ที่ลดลงในน้ำหมักของวัชพืชทุกชนิดเกิดจากการสะสมของเสียของยีสต์ที่มีการตาย และผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น กรดซิตริก กรดซักซินิค และกรดอะซิติก เป็นต้น แม้ว่าในระบบจะมีบัฟเฟอร์ช่วยปรับค่า pH แล้ว แต่ก็ยังไม่เพียงพอที่จะคงค่า pH ไว้ที่ระดับ 5 เช่นเดียวกับเมื่อเริ่มการหมัก

11.5 <u>การหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร (batch process)</u>

การหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบ batch process ที่ใช้ *C. aquatica* เป็นสับสเตรท ให้ผลผลิตที่ดีกว่าในระดับฟลาสก์พอสมควรเมื่อเทียบปริมาณเอทานอลต่อหน่วยของสับสเตรท ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการหมักในระดับถังหมักมีการกวนร่วมกับการให้อากาศ ทำให้โอกาสการเข้าจับของเอนไซม์กับสับสเตรทมีมากขึ้น จึงย่อยสลายได้มากขึ้น ปริมาณเอทานอลจึงสูงขึ้น (Philippidis, 1996)

11.6 <u>การกลั่น</u>

จากการกลั่นแบบ Simple distillation พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงถึง 11.02 เท่า คือจากที่มีความเข้มข้น 8.8 กรัมต่อลิตรไปเป็น 96.48 กรัมต่อลิตร การเพิ่ม

ความเข้มข้นวิธีที่ง่ายที่สุดในระดับห้องปฏิบัติการคือ การกลั่นซ้ำ แต่ปริมาตรของเอทานอลที่ได้จะลดลงเพราะมีการแยกน้ำออกไปอีก

ในการทดลองครั้งนี้มิได้ทำการกลั่นซ้ำ เนื่องจากต้องใช้ของเหลวที่ได้จากการกลั่นในรอบที่ 1 ปริมาณมากประมาณ 400 มิลลิลิตรสำหรับการกลั่นรอบที่ 2 นั่นหมายความว่า ในตอนเริ่มต้นจะต้องใช้น้ำหมักปริมาณมากประมาณ 16 ลิตรสำหรับการกลั่นในรอบแรก เพื่อให้ได้ของเหลวเพียงพอที่จะกลั่นในรอบที่ 2 เพราะน้ำหมักประมาณ 400 มิลลิลิตร จะได้ของเหลวจากการกลั่นรอบที่ 1 ประมาณ 10 มิลลิลิตร ถ้ากลั่นนานกว่านี้เพื่อให้ได้ของเหลวมากปริมาณขึ้น เอทานอลที่ได้จะมีความเข้มข้นน้อยลง เพราะน้ำจะกลั่นตัวออกมามากขึ้น ซึ่งอธิบายได้จากผลการทดลองที่ทดลองกลั่นเป็นเวลานาน 40 นาที ความเข้มข้นเอทานอลจะลดลงจาก 8.8 กรัมต่อลิตร (เก็บผลที่เวลา 15 นาทีนับจากเริ่มกลั่นตัว) ไปเป็น 4.09 กรัมต่อลิตร หรือลดลง 2.36 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย