บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างโดยปกติแล้วจะต้องเก็บในบริเวณที่เป็นแหล่งที่คาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ จึงต้องมีการเก็บตัวอย่างจากบริเวณที่มีปานศรนารายณ์ขึ้น หรือบริเวณที่ได้มีการนำเอาส่วนของปานศรนารายณ์มาใช้ ได้แก่บริเวณ อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา และ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ จะเห็นได้ว่าทั้งสองบริเวณนี้เป็นแหล่งที่มีการเพาะปลูกและนำปานศรนารายณ์มาใช้ ดังนั้นน่าจะมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบพวกเซลลูโลสที่อยู่ในปานศรนารายณ์ Waksman (1932) ได้รวบรวมผลงานของนักวิจัยซึ่งได้ทำไว้ในสมัยแรกๆ ที่เริ่มมีความสนใจในการรวบรวมและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ และได้รายงานว่านักโรคพืชได้ค้นพบเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) และเชื้อราที่เป็นตัวการที่ทำให้ต้นพืชเกิดโรค โดยการย่อยสลายเซลลูโลสตรงบริเวณที่เชื้อจุลินทรีย์เข้าทำอันตราย หลังจากนั้นจึงได้มีการค้นคว้าหาสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลส เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ การตัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินและส่วนที่ถูกจุลินทรีย์เข้าทำอันตราย (infected meterials) สำหรับยีสต์นั้นโดยธรรมชาติแล้วจะอาศัยอยู่กับเซลล์ของพืชที่เป็นเจ้าบ้าน (host) (สมศรี ศิริพิยางกูร, 2524) จากตัวอย่างเหล่านี้จะพบว่ามีส่วนประกอบของเซลลูโลสอยู่มาก ในธรรมชาติจะพบว่าวัสดุต่างๆ ที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลสอยู่ถ้ามีเชื้อราหรือแบคทีเรียเจริญเติบโตได้แสดงว่าเชื้อราและแบคทีเรียนั้นๆ สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายสารประกอบของเซลลูโลสแล้วนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (McBeth, 1916.)

ในการทดลองนี้จึงได้เลือกเก็บตัวอย่างมาทั้งหมด 80 ตัวอย่างจากบริเวณต่างๆ ที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ เช่น ดินบริเวณใต้ต้นปานศรนารายณ์ เศษใบแห้งของปานศรนารายณ์ น้ำคั้นจากใบปานสด น้ำที่ขังอยู่บนพื้นดินจากโรงงานผลิตเชือก ที่ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ 40 ตัวอย่าง และดินบริเวณใต้ต้นปานศรนารายณ์ เศษใบแห้งของปานศรนารายณ์ เศษต้นปานศรนารายณ์ที่ตายแล้ว จาก อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา 40 ตัวอย่าง

2. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การคัดแยกเชื้อราเหล่านี้ได้ใช้อาหารสูตร Czapex's dox ทำให้สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 45 isolates ใน 45 isolates นี้เป็นเชื้อราที่ได้มาจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษใบแห้งของป่านศรนารายณ์และเศษลำต้นป่านศรนารายณ์ที่ตายแล้ว จาก จ.นครราชสีมา และจ. ประจวบคีรีขันธ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ถึงตารางที่ 4.5 เชื้อราที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ นี้คาดว่าจะมีความแตกต่างกันในแง่ของพันธุกรรมที่เกี่ยวกับเอนไซม์เซลลูเลส สำหรับความแตกต่างนี้สามารถจะบอกในรายละเอียดได้ต่อเมื่อได้มีการศึกษาอย่างละเอียดเพิ่มเติมมากขึ้นในขั้นต่อไป เชื้อราทั้ง 45 isolates นี้จะพบว่ามีทั้งเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้และเชื้อราปนเปื้อนทั่วๆ ไป นอกจากนี้ยังพบว่าจากตัวอย่างดินโคนต้นป่านที่ได้จาก อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา มีจำนวน isolate ของเชื้อรามากที่สุดถึง 18 isolate ดังนั้นจึงต้องนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไปเพื่อให้ได้เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเท่านั้น เพื่อการนำไปเก็บรวบรวมพันธุ์ไว้เป็นแหล่งพันธุกรรมต่อไป ซึ่งการคัดแยกและเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสนั้น ในปัจจุบันก็ยังมีความพยายามค้นหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และอย่างต่อเนื่อง (Masaki,1983) สำหรับในอดีตก็ได้มีการศึกษาและรวบรวมเอาไว้บ้างแล้ว สุนทร วงค์สวัสดี (2516) ได้คัดแยกและรวบรวมเชื้อราที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสจาก ดินสวน มูลม้า มูลวัว ดินที่เกิดการเน่าทับถมและใบไม้เปื่อย กากชี้เลื่อย และดินที่เกิดจากการเน่าสลายของชี้เลื่อย ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อราได้ 5 สายพันธุ์ คือ Penicillium sp. Aspergillus sp. Gilmaniella sp. Curvularia sp. และ Hormiscium sp. Loginova และ Tashpulatav (1965) ได้คัดแยกและรวบรวมเชื้อราที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากดินและไม้ผุที่เก็บจากสวนสาธารณะในกรุงมอสโคว์ สามารถคัดแยกเชื้อราได้ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ Trichoderma viride Penicilium oxalicum Chaetomium globosum Stemphylium botrysum Stachybotrys atra และ Myrothecium verrucaria

สำหรับขั้นตอนในการคัดแยกเพื่อให้ได้เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้นได้ทำโดยใช้อาหารสูตร CMC และสี Congo red เป็นตัวทดสอบ การคัดแยกทำโดยสังเกตจากวงใส ที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา เนื่องจาก CMC จะถูกเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายไป จึงทำให้ไม่ติดสี Congo red จึงเกิดเป็นบริเวณวงใส (Teather and Wood,1982) จากขั้นตอนนี้ทำให้สามารถทำการคัดแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ 23 isolates ซึ่งจะได้นำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจริง ในขั้นตอนต่อไปโดยวิธีของ หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ (2532) สามารถคัดแยกเชื้อราที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้จริง และให้ปฏิกริยาเอนไซม์นี้มากพอสมควรทำให้ได้เชื้อราทั้งหมด 7 isolates ดังแสดงในตารางที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าเชื้อราทั้ง 7 isolates นี้ ได้แก่ isolates ที่ 13, 33, 37, 6, 19, 23 และ 11 เรียงตามลำดับ เชื้อราเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งที่อุณหภูมิ 30 °C

และ 37 °C แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการคัดแยกนี้ใช้อุณหภูมิที่ 37 °C เนื่องจากเป็นอุณหภูมิห้องในขณะทดลอง ซึ่งอุณหภูมินี้เชื้อรา isolate ที่ 13 ให้ activity สูงสุดถึง 0.41 หน่วย/มล. ซึ่งพบจากตัวอย่างดินใต้ต้นปาน ที่ อ.โนนสูง ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อราและนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งเป็นการประหยัดพลังงาน แต่เมื่อลองทดสอบ การผลิตเอนไซม์นี้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 °C ก็พบว่ามีเชื้อราบาง isolate ที่สามารถจะให้เอนไซม์เซลลูเลสได้ ได้แก่ isolate ที่ 13 และ 11 สำหรับ isolate ที่ 13 นั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้แต่ activity ของเอนไซม์ลดลงแต่สำหรับ isolate ที่ 11 นั้นพบว่ามีแนวโน้ม activity ของเอนไซม์สูงขึ้นที่อุณหภูมิ 45 °C น้อย เกษมสุขสกุล (2529) ได้คัดแยกเชื้อราสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่า A.fumigatus (Fresenius) สามารถที่จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ที่อุณหภูมิ 40 °C ดังนั้นเชื้อรา isolate ที่ 11 นี้น่าจะมีจีนที่ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสมี activity สูงได้ถึงแม้จะอยู่ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งน่าจะมีการนำไปศึกษาต่อเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราชนิดนี้

3. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การคัดแยกในขั้นนี้ได้ใช้อาหารสูตร mineral salt medium ทำให้สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 78 isolates ทั้ง 78 isolates นี้เป็นเชื้อราที่ได้มาจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดินบริเวณใต้ต้นปานศรนารายณ์ เศษใบแห้งของปานศรนารายณ์ และเศษลำต้นปานศรนารายณ์ที่ตายแล้วจาก จ.นครราชสีมา และ จ. ประจวบคีรีขันธ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ถึงตารางที่ 4.11 เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ นี้คาดว่าจะมีความแตกต่างกันในแง่ของพันธุกรรมที่เกี่ยวกับเอนไซม์เซลลูเลส สำหรับความแตกต่างนี้สามารถจะบอกในรายละเอียดได้ต่อเมื่อได้มีการศึกษาอย่างละเอียดเพิ่มเติมมากขึ้นในขั้นต่อไป เชื้อแบคทีเรียทั้ง 78 isolates นี้จะพบว่ามีทั้งเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้และเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนทั่วๆ ไป ซึ่งพบมากจากตัวอย่างดินใต้ต้นปาน มีจำนวน isolate ของแบคทีเรียมากที่สุด ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบขั้นต่อไปเพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้เท่านั้น เพื่อนำมาเก็บรวบรวมพันธุ์ไว้เป็นแหล่งพันธุกรรมต่อไป ซึ่งการคัดแยกและเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสนั้นในปัจจุบันก็ยังมีความพยายามค้นหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดและอย่างต่อเนื่อง (Masaki,1983) สำหรับในอดีตก็ได้มีการศึกษาและรวบรวมเอาไว้บ้างแล้ว McBeth (1916) ได้คัดแยกและรวบรวมสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส จากดินในแถบตอนใต้ของรัฐคาลิฟอเนียในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แบคทีเรียพวก Bacillus sp. สายพันธุ์ต่างๆ 20 สายพันธุ์ Pseudomonas sp. สายพันธุ์ต่างๆ 7 สายพันธุ์ และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ 9 สายพันธุ์ Hungate (1947) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัวจึงพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่

Bacteroides succinogenes ต่อมาก็ได้มีการค้นพบ และเก็บรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้เพิ่มมากขึ้น เช่น Actinomyces cellulosae Angiococcus cellulosum B. cellulosae Cellulomonas acidula C. aurogena C. fimi C. biazotea Clostridium cellulosovens Polyangium cellulosum Sporangium cellulosum Streptomyces celluloflavus (Dunlap and Chang, 1979)

สำหรับขั้นตอนในการคัดแยกเพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้น ได้ทำโดยใช้อาหารสูตร CMC medium แล้วราดทับด้วยสี Congo red โดยสังเกตจากวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจาก CMC จะถูกเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายไปจึงทำให้เกิดวงใสที่ไม่ติดสี Congo red (Teather and Wood, 1982) จากขั้นตอนนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 26 isolate จะได้นำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจริง ในขั้นตอนต่อไป โดยวิธีของ chosson and Dupuy (1983) สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้จริงแต่ให้ปฏิกริยาของเอนไซม์ต่ำมาก ทำให้ได้แบคทีเรียทั้งหมด 6 isolates ดังแสดงในตารางที่ 4.12 จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 isolate ได้แก่ isolate 74, 65, 9, 16, 1, และ 18 ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งที่อุณหภูมิ 30 °C และ 37 °C สำหรับ isolate ที่ 74 พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่ให้ activity สูงสุดถึง 0.067 และ 0.033 หน่วย/มล. ตามลำดับ ซึ่งพบได้จากตัวอย่างเศษใบแห้ง อ.หัวหิน แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการคัดแยกใช้อุณหภูมิ 37 °C เนื่องจากเป็นอุณหภูมิในขณะทดลอง ซึ่งทำให้สามารถจะเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ที่อุณหภูมิห้องจึงเป็นการประหยัดพลังงาน แต่เมื่อทดลองผลิตที่เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 °C พบว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรีย isolates ใดที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เลย ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้อาจจะไม่มียีนสำหรับผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิสูง

4. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์

ภายใต้สภาวะที่เป็นการหายใจโดยไม่ใช้ ออกซิเจน น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอล 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{จุลินทรีย์}} 2C_2H_5OH + 2CO_2 + \text{พลังงาน}$$ (Wilke, 1983)

จะเห็นว่า โดยทั่วๆ ไปเมื่อมีการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยจุลินทรีย์ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนจะทำให้เกิดกาซคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ดังนั้นการคัดแยกในขั้นแรกจึงสังเกตการเกิดกาซในหลอดเก็บกาซ ทำให้ได้แบคทีเรียที่ทำให้เกิดกาซในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน 50 isolates (ตารางที่ 4.13 ถึง ตารางที่ 4.15) แต่แบคทีเรียทั้ง 50 isolates อาจเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้และแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ จากตัวอย่างน้ำที่อยู่บนพื้นดิน

โรงงานผลิตเชือก และน้ำคั้นจากใบปาน อ.หัวหิน พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนมากที่สุดถึง 40 isolates จึงนำไปคัดแยกต่อเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้

การคัดแยกในขั้นตอนต่อไปเป็นการคัดแยก เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนออกไปทำให้ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้จริง โดยการเอาไปคัดแยกด้วยอาหารแข็งสูตร W.L. defferenteal medium เพราะโดยส่วนใหญ่เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้จะให้โคโลนีสีเขียวเข้ม (รูปที่ 4.10) โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย Zymomonas sp . ซึ่งดำพูน และคณะ (2526) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรีย Zymomonas sp. สายพันธุ์ที่มีสร้างแอลกอฮอล์จากแหล่งน้ำตาลในธรรมชาติ จากการทดลองด้วยวิธีเดียวกันนี้ทำให้ได้แบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเขียวเข้ม 13 isolated จากตัวอย่างน้ำที่อยู่บนพื้นดินโรงงานผลิตเชือก และน้ำคั้นจากใบปาน อ.หัวหิน ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้จำนวนมากที่สุดถึง 10 isolates หลังจากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 13 isolates ไปคัดแยกหาแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากที่สุด โดยการนำมาหมักด้วยอาหารสูตร fermentation medium สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 5 isolates (ตารางที่ 4.16) แบคทีเรียทั้ง 5 isolates คือ isolate ที่ 9, 25, 15, 37, และ 44 จากผลการทดสอบปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 30 °C แบคทีเรียทั้ง 5 isolates ผลิตแอลกอฮอล์ได้ต่ำมาก เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจาก Zymomonas mobilis UQM 410 เมื่อทำการทดลองหมักแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 isolates รวมทั้ง Z. mobilis UQM 410 ยังสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้แต่ปริมาณลดลง และเมื่อทดลองทำการผลิตแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 45 °C แบคทีเรียทั้ง 5 isolates ก็ยังผลิตแอลกอฮอล์ได้แต่น้อยมาก ในขณะที่ Z. mobilis UQM 410 ไม่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้เลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุดคือ 30 °C ซึ่ง Torres และ Baratli (1987) ได้ทำการทดลองหมักแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิต่างๆ ด้วยเชื้อแบคทีเรีย Z. momonas พบว่าถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 30 °C การผลิตแอลกอฮอล์จะลดลง แต่สำหรับแบคทีเรียที่คัดแยกได้น่าจะมีจีนที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ซึ่งยังไม่มีการศึกษาและยืนยันไว้

5. การคัดแยกยีสต์ที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์

เนื่องจากการทดลองนี้จะเป็นการหมักชิ้นส่วนของปานศรนารายณ์เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดจึงน่าจะเป็นการรวบรวมยีสต์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในส่วนของปานศรนารายณ์ที่ถูกทิ้งหมักไว้เพื่อเป็นการคัดเลือกเองโดยธรรมชาติมาขั้นตอนหนึ่ง และเมื่อทำการคัดแยกโดยใช้วิธีของ Kumnuanta และคณะ (1981) ทำให้สามารถคัดแยกยีสต์ได้รวมทั้งสิ้น 14 isolates ยีสต์ทั้ง 14 isolates คือ isolates ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, และ 14 (ตารางที่ 4.17 ถึง ตารางที่ 4.19) ยีสต์เหล่านี้คัดแยกได้จากน้ำคั้นในปานสดและน้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดินของโรงงานผลิตเชือก จ.ประจวบคีรีขันธ์ และน้ำคั้นจากใบปานสด

จ.นครราชสีมา

หลังจากนั้นนำยีสต์ไปคัดแยกเพื่อให้ได้ยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดการคัดแยกในขั้นนี้จึงเป็นการศึกษาเปรียบเทียบจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นโดยใช้อาหารสูตร Basal modium ของ Szczodrak และ Targonski (1988) ที่อุณหภูมิ 37 °C ทำให้สามารถคัดแยกยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณที่มากพอสมควร จำนวน 8 isolates ได้แก่ isolate ที่ 4, 6, 13, 3, 9, 12, และ 7 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.20 พบว่ายีสต์ isolate ที่ 4 ซึ่งพบมาจากตัวอย่าง น้ำคั้นจากใบปานสด อ.โนนสูง สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดในกลุ่มของยีสต์ที่คัดแยกได้และสูงกว่า S.cerevisiae TISTR 5021 เมื่อทดลองหมักแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30 °C พบว่ายีสต์ทุก isolates ที่คัดแยกได้ผลิตแอลกอฮอล์ลดลงรวมทั้ง S.cerevisiae TISTR 5021 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30 °C พบว่ายีสต์ isolate ที่ 4 ก็ยังผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดและเมื่อทดลองหมักแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 45 °C พบว่ายีสต์ทุก isolates ผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อยมากรวมทั้ง S.cerevisiae TISTR 5021 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีสต์ isolates ที่ 4 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลกอฮอล์ที่ 37 °C ซึ่ง Kumnuanta และคณะ(1981)ได้ทดลองผลิตแอลกอฮอล์จากยีสต์ S.cerevisiae No. 327 พบว่าที่อุณหภูมิ 35-37 °C ยีสต์ชนิด นี้สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ดี ดังนั้นจึงน่าจะมีการนำยีสต์ isolate ที่ 4 มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตแอลกออล์ต่อไป

6. การจำแนกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การจำแนกเชื้อราในการศึกษานี้จะเอาเฉพาะเชื้อราที่ให้ปฏิกริยาเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในกลุ่มซึ่งมี 2 isolates ได้แก่ isolate ที่ 13 และ 36 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) โดยการนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ slide culture technique ตรวจสอบเชื้อราตามแนวของ Barnett (1972) จากการทดสอบปรากฏว่าเชื้อรา isolate ที่ 13 คือ Botryotrichum sp. เป็นเชื้อราที่อยู่ใน class Fungi Imperfecti order Moniliales family Moniliaceae genus Botryotrichum เชื้อราที่อยู่ในคลาสนี้จะมีผนังกั้นแบ่งออกเป็นเซลล์ๆ และไม่สร้าง sexual spore แต่สำหรับ Botryotrichum sp. จะสร้าง Sterile hairs (รูปที่ 4.14 ก) เส้นใยมีสีน้ำตาล ซึ่ง Botryotrichum sp. เป็นเชื้อราที่พบได้จากดิน Abdel-Hafez (1982) ได้คัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากดินในทะเลทราย ประเทศซาอุดิอาระเบีย พบว่าเชื้อรา Botryotrichum sp. สามารถย่อยสลายสารประกอบพวกเซลลูโลสได้

7. การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

ก. เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียในการศึกษานี้จะเอาเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ให้ปฏิกริยาเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในกลุ่ม 2 isolates มาทำการจำแนกตามแนวของ Bergey 's Manual. (1974) ซึ่งแบคทีเรีย isolates ที่ 74 และ 65 ให้ปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เรียงตามลำดับ (ตารางที่ 4.12) จากการทดสอบทางชีวเคมี (ตารางที่ 4.21) ปรากฏว่าแบคทีเรีย isolate ที่ 74 และ 65 คือ Bacillus sp. (รูปที่ 4.15 ถึงรูปที่ 4.17) ซึ่ง Bacillus sp. เป็นแบคทีเรียอยู่ใน order Eubacteriales family Bacillaceae genus Bacillus ซึ่ง Bacillus sp. เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่ว ๆ ไปในดินโดยที่ McBeth (1916) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส จากตัวอย่างดินในแทบตอนใต้ของแคลิฟอเนีย 92 ตัวอย่าง พบ Bacillus sp. ชนิดต่างๆ 20 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้ Man และคณะ (1987) ได้ทำการโคลนเซลลูเลสจีนของ Bacillus sp. N-4 แล้วใส่เข้าไปใน E.coli ปรากฏว่าสามารถย่อยสลาย carboxymethyl cellulose ได้ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่า Bacillus sp. มียีนที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

ข. เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียในการศึกษานี้จะเอาเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 2 isolates มาทำการจำแนกตามแนวของ Bergey 's Manual (1974) ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากที่สุด 2 isolates คือ isolate ที่ 9 และ 25 เรียงตามลำดับ (ตาราง 4.16) จากการทดสอบทางชีวเคมี (ตารางที่ 4.22) ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรีย isolate ที่ 9 คือ Enterobacter sp.(รูปที่ 4.18) ส่วนแบคทีเรีย isolate ที่ 25 คือ Klebsiella sp. (รูปที่ 4.19) ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน order Eubacteriales family Enterobacteriaceae แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ได้โดยการใช้วิถีเมตาบอลิซึมแบบ Thioclastic Reaction Pathway ซึ่งต่างจาก Z.mobelis ที่ใช้วิถีเมตาบอลิซึมแบบ Enter-Doudoroff Pathway (Goldstein,1978)

8. การจำแนกยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์

การจำแนกยีสต์ในการศึกษานี้จะเอาเฉพาะยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดในกลุ่มของยีสต์ที่คัดแยกได้ 2 isolates มาทำการจำแนกตามแนวของ Lodder (1971) ซึ่งยีสต์ที่สามารถแอลกอฮอล์ได้มากที่สุด 2 isolates คือ isolate ที่ 4 และ 6 เรียงตามลำดับ (ตารางที่ 4.20) จากการทดสอบทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้ง 2 (ตารางที่ 4.23) พบว่ายีสต์ isolate ที่ 4 คือ Candida sp. (รูปที่ 4.20 ถึงรูปที่ 4.21) เป็นยีสต์ที่อยู่ใน

class Fungi Imperfecti order Cryptococcales family Cryptococcaccae subfamily Cryptococcoideae ยีสต์ชนิดนี้สามารถที่จะสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมได้ ส่วนยีสต์ isolate ที่ 6 คือ Schizosaccharomyces sp. (รูปที่ 4.22 ถึงรูปที่ 4.23) เป็นยีสต์ที่อยู่ใน class Ascomycetes order Saccharomycetales family Saccharomycetaceae subfamily Endomycetoideae ยีสต์ชนิดนี้สามารถที่จะสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมได้ ยีสต์ทั้ง 2 ชนิดนี้พบได้ทั่วๆ ไปจากพืชและผลไม้ต่าง ๆ Ahmad และคณะ (1954) สามารถคัดแยกยีสต์ Schizosaccharomyces pombe จากน้ำตาลโตนดสดในแถบอินโดปากีสถาน Shehata (1960) ได้คัดแยกยีสต์ Candida sp. จากน้ำอ้อยจากโรงงานในรัฐ Sao Paulo ประเทศบราซิลและ Ehiraj และคณะ (1980) ได้คัดแยกยีสต์ Candida sp. จากดอก Mahua Flower ในประเทศอินเดีย ซึ่งยีสต์ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ได้ Ciriacy (1976) ได้เสนอว่าในกลุ่มเอนไซม์ของยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคลไลซีสสำหรับเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ได้นั้นมีเพียงตัวเดียวคือ alcohol dehydrogenase หรือ ADH เท่านั้นที่เป็นลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของยีสต์ Saccharomyces cerevisiae

9. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 37 ° C พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate ที่ 13 ให้ปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 ซึ่งเป็นการให้ผลที่ตรงกับการทดสอบ คือเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate ที่ 13 ให้ปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลส 0.74 หน่วย/มล. สำหรับเอนไซม์เซลลูเลส ของ T. reesei QM 9414 ให้ปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลส 0.58 หน่วย/มล. สำหรับสาเหตุที่ทำให้ปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จาก isolate ที่ 13 สูงกว่า T.reesei QM 9414 อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม เพราะในขั้นตอนการผลิตจะใช้ฟลาสก์ขนาด 500 มล. และใช้ microcrytalline cellulose 6 กรัม ในอาหารเหลว 200 มล. ดังนั้นเมื่อภาชนะใหญ่ขึ้นก็จะทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับออกซิเจนได้มากขึ้น จึงทำให้ออกซิเจนมีการละลายเข้าไปสู่อาหารและเชื้อราได้มากขึ้นเมื่อมีการกวนเกิดขึ้น ซึ่ง Mudgett (1980) กล่าวว่า การให้อากาศและการกวนเป็นสิ่งที่จำเป็นมากในขณะที่มีการหมักเกิดขึ้น เพราะการให้อากาศและการกวนจะเป็นการรักษาสถานแอโรบเอาไว้แล้ว ยังช่วยขจัดคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ออกไปจากภาชนะที่ใช้หมัก ดังนั้นน่าเป็นสาเหตุให้เชื้อรา isolate ที่ 13 เจริญเติบโตได้ดีกว่า จึงทำให้ผลิตเอนไซม์ออกมาได้มากกว่า T. reesei QM 9414 ทั้งที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมือนกัน สาเหตุที่สองอาจเนื่องจากปริมาณ microcrytalline cellulose ที่เพิ่มขึ้นเพราะ microcrytalline cellulose นี้เป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้นเมื่อมีตัวกระตุ้นเพิ่มขึ้นจึงอาจจะไปกระตุ้นให้เชื้อรา

isolate ที่ 13 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาได้มากกว่า T.reesei QM 9414 และสาเหตุประการสุดท้ายคือเนื่องมาจากอุณหภูมิเพราะในขั้นตอนการทดสอบพบว่าที่อุณหภูมิ 37 °C T.reesei QM 9414 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อยกว่าเชื้อรา isolate ที่ 13 ซึ่ง Wilke (1983) ได้เสนอว่าที่อุณภูมิ 28-30 °C T.reesei QM 9414 จะผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด ดังนั้นอุณหภูมิในช่วงนี้จึงน่าจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม ที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ T.reesei QM 9414 และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นราชนิดนี้จึงผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ลดลง

10. การหมักแอลกอฮอล์แบบ Simultaneouse Saccharification and Fermentation

การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ microcrystalline cellulose เป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 รายระเอียดแสดงดังตารางที่ 4.23 และกราฟที่ 4.1 พบว่าตั้งแต่เริ่มต้นการหมักไปจนถึงวันที่ 3 ของการหมักนั้นเซลล์ยีสต์ C. brassiae IFO 1664 จะลดลงอย่างรวดเร็วและหลังจากนั้นจึงเข้าสู่ระดับที่ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งสาเหตุนี้เกิดจากการที่ยีสต์ขาดน้ำตาลกลูโคสที่จะใช้เป็นพลังงานอย่างรุนแรง เพราะในวันแรกของการหมักไม่มีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นเลยจนกระทั่งถึงวันที่ 3 จึงมีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นมาบ้าง ซึ่งเพียงพอสำหรับเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ได้ในระดับ $6x10^7$ เซลล์เท่านั้น อีกประการหนึ่งเนื่องมาจากค่าของ pH เพราะจากค่า pH ที่เริ่มต้นการหมักนั้นมีค่าความเป็นกรดมากคือ 4 ซึ่งค่า pH 4 นี้ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่จะเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสเพราะค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสคือ 4.8 (Mendle, 1976) ดังนั้นจึงทำให้ในช่วงเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลเกิดขึ้นน้อยมากจนไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ จากการทดลองในวันที่ 3 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 4.10 มก./มล. วันที่ 5 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 6.94 มก./มล. และวันที่ 7 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 7.69 มก./มล. เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิ้ว พบว่ามีน้ำตาลเหลืออยู่น้อยมากแสดงว่ากระบวนการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และกระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเพราะยีสต์สามารถนำน้ำตาลกลูโคสมาเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์จึงทำให้มีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่น้อยมาก

การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.25 และกราฟที่ 4.2 พบว่าตั้งแต่เริ่มต้นการหมักจนถึงวันที่ 3 นั้นจำนวนเซลล์ยีสต์ C. brassicae IFO 1664 จะลดลงอย่างรวดเร็วและต่อจากนั้นก็ค่อนข้างจะคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งสาเหตุมาจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าของ pH เริ่มต้น ซึ่งเหมือนกับการหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ microcrystalline cellulose เป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่

isolate ที่ 13 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาได้มากกว่า T.reesei QM 9414 และสาเหตุประการสุดท้ายคือเนื่องมาจากอุณหภูมิเพราะในขั้นตอนการทดสอบพบว่าที่อุณหภูมิ 37 °C T.reesei QM 9414 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อยกว่าเชื้อรา isolate ที่ 13 ซึ่ง Wilke (1983) ได้เสนอว่าที่อุณภูมิ 28-30 °C T.reesei QM 9414 จะผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด ดังนั้นอุณหภูมิในช่วงนี้จึงน่าจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม ที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ T.reesei QM 9414 และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นราชนิดนี้จึงผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ลดลง

10. การหมักแอลกอฮอล์แบบ Simultaneouse Saccharification and Fermentation

การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ microcrystalline cellulose เป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 รายระเอียดแสดงดังตารางที่ 4.23 และกราฟที่ 4.1 พบว่าตั้งแต่เริ่มต้นการหมักไปจนถึงวันที่ 3 ของการหมักนั้นเซลล์ยีสต์ C. brassiae IFO 1664 จะลดลงอย่างรวดเร็วและหลังจากนั้นจึงเข้าสู่ระดับที่ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งสาเหตุนี้เกิดจากการที่ยีสต์ขาดน้ำตาลกลูโคสที่จะใช้เป็นพลังงานอย่างรุนแรง เพราะในวันแรกของการหมักไม่มีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นเลยจนกระทั่งถึงวันที่ 3 จึงมีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นมาบ้าง ซึ่งเพียงพอสำหรับเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ได้ในระดับ $6x10^7$ เซลล์เท่านั้น อีกประการหนึ่งเนื่องมาจากค่าของ pH เพราะจากค่า pH ที่เริ่มต้นการหมักนั้นมีค่าความเป็นกรดมากคือ 4 ซึ่งค่า pH 4 นี้ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่จะเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสเพราะค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสคือ 4.8 (Mendle,1976) ดังนั้นจึงทำให้ในช่วงเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลเกิดขึ้นน้อยมากจนไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ จากการทดลองในวันที่ 3 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 4.10 มก./มล. วันที่ 5 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 6.94 มก./มล. และวันที่ 7 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 7.69 มก./มล. เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิ้ว พบว่ามีน้ำตาลเหลืออยู่น้อยมากแสดงว่ากระบวนการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และกระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเพราะยีสต์สามารถนำน้ำตาลกลูโคสมาเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์จึงทำให้มีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่น้อยมาก

การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.25 และกราฟที่ 4.2 พบว่าตั้งแต่เริ่มต้นการหมักจนถึงวันที่ 3 นั้นจำนวนเซลล์ยีสต์ C. brassicae IFO 1664 จะลดลงอย่างรวดเร็วและต่อจากนั้นก็ค่อนข้างจะคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งสาเหตุมาจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าของ pH เริ่มต้น ซึ่งเหมือนกับการหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ microcrystalline cellulose เป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่

ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 จากการทดลองในวันที่ 3 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 3.12 มก./มล. วันที่ 5 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 4.79 มก./มล. วันที่ 7 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 5.34 มก./มล. เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ปรากฏว่า ตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงวันที่ 7 ของการทดลองมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือสะสมอยู่น้อยมาก แสดงว่ากระบวนการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และกระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเพราะยีสต์สามารถนำน้ำตาลกลูโคสมาเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์จึงทำให้มีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่น้อยมาก

การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate ที่ 13 (Botryotrichum sp.) และใช้ยีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.26และกราฟที่ 4.3 พบว่าตั้งแต่เริ่มต้นการหมักจนถึงวันที่ 3 นั้นจำนวนเซลล์ยีสต์ Candida sp. ที่คัดแยกได้จะลดลงอย่างรวดเร็วและหลังจากนับเซลล์พบว่าค่อนข้างที่จะคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งสาเหตุมาจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสซึ่งเหมือนกับการทดลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ microcrystalline cellulose เป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 และการทอลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 แต่สำหรับค่าของ pH เริ่มต้นนั้นอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเพราะเอนไซม์เซลลูเลสมี pH ที่เหมาะสมต่อการทำคือ 4.8 (Mendle,1976) แต่สำหรับค่า pH ที่ลดลงมานั้นเนื่องมาจากเซลล์ยีสต์ เพราะเมื่อเกิดการตายของยีสต์ก็จะทำให้เกิดการสะสมของเสียและของเสียนี้อาจจะเป็นตัวการทำให้ pH ลดลง จากการทดลองในวันที่ 3 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 4.14 มก./มล. เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีเหลืออยู่น้อย ในวันที่ 5 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 4.56 มก./มล. เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งพบว่าเริ่มมีการสะสมน้ำตาลมากขึ้น และในวันที่ 7 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 5.79 มก./มล. เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ พบว่ามีการสะสมน้ำตาลมากขึ้น ในกรณีนี้สาเหตุน่าจะมาจากยีสต์เองซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามียีสต์บางส่วนที่ตายไป และมีบางส่วนที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ได้แต่น้อยมาก และสาเหตุอีกประการหนึ่งคือ ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นยีสต์ที่เพิ่งคัดแยกได้จากธรรมชาติยังไม่ได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ของยีสต์ชนิดนี้เมื่อนำมาใช้หมักแอลกอฮอล์ในกระบวนการ SSF จึงอาจจะยังไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อไป

การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.27 และกราฟที่ 4.4 พบว่าตั้งแต่เริ่มต้นการหมักไปจนถึงวันที่ 3 ของการหมักนั้น พบว่าเซลล์ยีสต์ Candida sp. ที่คัดแยกได้จะลดลงอย่างรวดเร็ว เหมือนกับการทดลองอื่นๆ ที่ผ่านมา แต่เป็นที่น่าสังเกตุว่าหลังจากวันที่ 3 ไปแล้วปริมาณเซลล์ยีสต์ก็ยังลดลงต่อไปเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 มีปริมาณเซลล์ยีสต์ลดลงเหลือ 4.5×10^6 เท่านั้นเอง ซึ่งสาเหตุนี้อาจมาจากอุณหภูมิซึ่งไม่เหมาะสมกับยีสต์ชนิดนี้ สำหรับค่าของ pH นั้นพบว่าต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับทุกการทดลองที่ผ่านมาซึ่งว่ามียีสต์ตายเป็นจำนวนมาก จากการทดลองในวันที่ 3 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 1.58 มก./มล. เมื่อวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่ามีน้ำตาลกลูโคสสะสมอยู่ 3.76 มก./มล. และน้ำตาลรีดิ้ว 7.05 มก./มล. วันที่ 5 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 2.13 มก./มล. มีน้ำตาลกลูโคสสะสมอยู่ 4.19 และน้ำตาลรีดิ้วสะสมอยู่ 7.53 มก./มล. วันที่ 7 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 3.74 มก./มล. มีน้ำตาลกลูโคสสะสมอยู่ 5.08 มก./มล. และน้ำตาลรีดิวซ์ 8.90 มก./มล. จากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือสะสมอยู่แสดงให้เห็นว่ายีสต์ Candida sp. ที่ใช้ในการหมักนี้นำน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นไปใช้ได้น้อยมากซึ่งสาเหตุมาจากยีสต์เอง จากการทดลองที่ผ่านมาและจากการทดลองนี้ที่ใช้ยีสต์ Candida sp. ที่ใช้คัดแยกได้เป็นตัวการหมักแอลกอฮอล์เหมือนกัน สามารถยืนยันได้ว่ายีสต์ที่คัดแยกได้นี้ยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในกระบวนการ SSF ควรจะนำมาศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมของยีสต์ชนิดนี้แล้วจึงนำมาใช้ในกระบวนการ SSF ต่อไป

การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate ที่ 13 (Botryotrichum sp.) และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.28 และกราฟที่ 4.5 พบว่าตั้งแต่เริ่มต้นการหมักไปจนถึงวันที่ 3 8ของการหมักพบว่าเซลล์ยีสต์ C.brassicae FO 1664 จะลดลงอย่างรวดเร็วเหมือนกับการทดลองอื่น ๆ ที่ผ่านมาแต่เป็นที่น่าสังเกตว่าจะมีปริมาณเซลล์ยีสต์เหลืออยู่มากกว่าการทดลองอื่น ๆ ที่ผ่าน คือในวันที่ 3 มีเซลล์ยีสต์เหลืออยู่ 1×10^8 เซลล์ วันที่ 5 มีเซลล์ยีสต์เหลืออยู่ 7.1×10^7 เซลล์ วันที่ 7 มีเซลล์ยีสต์เหลืออยู่ 4.7×10^7 เซลล์ สาเหตุอาจเนื่องมาจากค่า pH เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 4.8 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Mandle,1976) จึงทำให้ในช่วงก่อน 3 วันแรกของการหมักมีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นเพียงพอที่ให้ยีสต์จำนวน 1×10^8 เซลล์ นำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานจึงทำให้เซลล์ยีสต์ลดลงน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองอื่น ๆ ที่ผ่านมาและหลังจากวันที่ 3 พบว่าค่า pH เปลี่ยนไปน้อยมากคือจะคงที่อยู่ที่ pH 5 ตลอดการทดลองซึ่งแสดงให้เห็นว่าในการทดลองนี้เซลล์ยีสต์มีการตายน้อยกว่าการทดลองอื่น ๆ ที่ผ่านมา จากทดลองในวันที่ 3 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 3.43 มก./มล. วันที่ 5 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 6.08 มก./มล. วันที่ 7 มีปริมาณแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 6.48

มก./มล. เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่ามีน้ำตาลสะสมอยู่น้อยมาก ซึ่งน้อยกว่าการทดลองอื่น ๆ ที่ผ่านมา ดังนั้นจึงแสดงว่าการทดลองนี้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถไฮโดรไลซีสเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และมีการหมักแอลกอฮอล์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้มีน้ำตาลกลูโคสสะสมอยู่น้อยมาก และให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงกว่าการทดลองอื่น ๆ ที่ใช้ปานศรนารายณ์เป็นวัสดุหมัก ดังนั้นจากการทดลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate ที่ 13 (Botryotrichum sp.) และใช้ยีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.) และ การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก เชื้อรา isolate ที่ 13 (Botryotrichum sp.) และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 สามารถยืนยันได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้สามารถย่อยปานศรนารายณ์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้จริง

และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดลองหมักแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการ SSF ของการทดลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมัก กับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 กับการหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก เชื้อรา isolate ที่ 13 (Botryotrichum sp.) และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 ซึ่งการทดลองทั้งสองนี้จะใช้ปานศรนารายณ์และยีสต์ C. brassicae IFO 1664 เหมือนกัน แต่จะต่างกันตรงเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าการทดลองที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก เชื้อรา isolate ที่ 13 (Botryotrichum sp.) ให้ปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าการทดลองที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate ที่ 13 (Botryotrichum sp.) ที่ใช้ในการทดลองให้ปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลสสูงถึง 0.74 หน่วย/มล. ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 ที่ใช้ในการทดลองนั้นมีปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลสเพียง 0.58 หน่วย/มล. ดังนั้นเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate ที่ 13 (Botryotrichum sp.) จึงย่อยเส้นใยปานศรนารายณ์ไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้มากกว่าการทดลองที่เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 ซึ่งเป็นผลให้ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสไปเป็นแอลกอฮอล์ได้มากกว่าด้วยเช่นกัน

การเปรียบเทียบผลการทดลองการหมักแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการ SSF ของการทดลองหมักแอลกอฮอล์ โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมัก กับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664 และการหมักแอลกอฮอล์โดยใช้การเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.) ซึ่งการทดลองทั้งสองจะใช้เส้นใยปานศรนารายณ์เป็นวัสดุหมักและใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T. reesei QM 9414 เหมือนกันแต่จะแตกต่างกันที่ยีสต์ C. brassicae IFO 1664 กับยีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.) จากที่คัดแยกได้ พบว่าการทดลองที่ใช้ยีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.) มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาล

รีดิวซ์เหลือสะสมอยู่มากกว่าการทดลอง C. brassicae IFO 1664 แสดงให้เห็นว่ายีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.) ที่คัดแยกได้ยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการหมักแอลกอฮอล์แบบ SSF ซึ่งใช้อุณหภูมิสูงถึง 40 °C เพราะโดยปกติแล้วการหมักแอลกอฮอล์แบบ SSF จะใช้ยีสต์ C.brassicae ซึ่งยีสต์ชนิดนี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ที่ 30-35 °C และที่อุณหภูมิ 40 °C ก็ยังสามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ดี (Wilke,1983) ดังนั้นจึงควรนำยีสต์ Candida sp. ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาให้ได้สภาวะที่เหมาะก่อนแล้วจึงนำไปใช้ในการหมักแอลกอฮอล์แบบ SSF ต่อไป

สรุปผลการศึกษา

การคัดแยกจุลินทรีย์

ในการศึกษานี้ดำเนินการเก็บตัวอย่าง 80 ตัวอย่าง สามารถเก็บรวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากดินบริเวณใต้ต้นปาล์มศรนารายณ์ เศษใบแห้งของปาล์มศรนารายณ์และเศษต้นปาล์มที่ตายแล้ว ได้เชื้อราจำนวน 23 isolates แบคทีเรีย 26 isolates และจุลินทรีย์ที่สร้างแอลกอฮอล์จากน้ำต้นใบปาล์มสดและน้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดินของโรงงานผลิตเชือก ได้แบคทีเรียจำนวน 13 islates และยีสต์จำนวน 14 isolates

สามารถเก็บรวบรวมและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. เชื้อรา เก็บรวบรวมและคัดเลือกได้ 23 isolates พบว่า isolate ที่ 13 เท่านั้น ที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงถึง 0.74 หน่วย/มิลลิลิตร ในขณะที่ T.reseei QM 9414 ผลิตได้เพียง 0.58 หน่วย/มิลลิลิตร โดยควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 37 °C pH 5 เหมือนกัน หลังจากนั้นนำเชื้อรา isolate ที่ 13 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาปรากฏว่าเป็นเชื้อราในสกุล Botryotrichum sp.

2. เชื้อแบคทีเรีย เก็บรวบรวมและคัดเลือกได้ 26 isolates พบว่ามี 6 isolates ที่สร้างเอนไซม์ในปริมาณสูง ได้แก่ isolate ที่ 74, 65, 9, 16, 1 และ 18 แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย ให้ปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลสน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา แบคทีเรีย isolate ที่ 65 และ 74 เป็นแบคทีเรียที่ให้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในกลุ่ม จึงนำมาตรวจสอบทางชีวเคมี และ ย้อมแกรม ผลที่แสดงออกมาเป็นแบคทีเรียในสกุล Bacillus sp. ทั้งสอง isolates

สามารถเก็บรวบรวมและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างแอลกอฮอล์ได้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. เชื้อแบคทีเรีย เก็บรวบรวมและคัดเลือกได้ 13 isolates พบว่ามี 5 isolate ได้แก่ isolate ที่ 9, 25, 15, 37 และ 44 แบคทีเรียทั้ง 5 isolates ผลิตแอลกอฮอล์ได้แต่ปริมาณแอลกอฮอล์ได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจาก Z.mobilis UQM 410 ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำไปผลิตแลกอฮอล์และเมื่อนำแบคทีเรีย isolate ที่ 9 และ 25 ที่ให้ปริมาณแอลกอฮอล์มากที่สุดในกลุ่มมาทดสอบทางชีวเคมีพบว่า isolate ที่ 25 คือ Klebsiella sp. และ isolate ที่ 9 คือ Enterobacter sp.

2. เชื้อยีสต์ เก็บรวบรวมและคัดเลือกได้ 14 isolates คือ isolate ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 ยีสต์ isolate ที่ 4 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดและ สูงกว่า S.cervisae TISTR 5021 ที่อุณหภูมิ 37 °C และเมื่อนำเชื้อยีสต์ isolate ที่ 4 และ isolate ที่ 6 มาตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา พบว่ายีสต์ isolate ที่ 4 คือ Candida sp. ส่วนยีสต์ isolate ที่ 6 คือ Schizosaccharomyces sp.

การหมักแอลกอฮอล์แบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation

สามารถใช้กากเส้นใยปานศรนารายณ์เป็นวัตถุดิบในการหมักแอลกอฮอล์แบบ SSF ได้ โดยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา isolate ที่ 13 และยีสต์ isolate ที่ 4 เป็นตัวการในการหมักได้ พบว่าที่ระยะเวลาหมัก 7 วัน ให้แอลกอฮอล์สูงถึง 5.79 มก./มล. ซึ่งสูงกว่าการทดลองที่ใช้กากเส้นใยปานศรนารายณ์เป็นวัสดุหมักเหมือนกัน แต่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และยีสต์ C.brassicae IFO 1664 เป็นตัวการ ในการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งที่ระยะเวลาหมัก 7 วัน ให้แอลกอฮอล์ 5.34 มก./มล.