

การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน*

Comparative study of ethanol production from banana leave by using different immobilization techniques

รัชพล พะวงศรีรัตน์**

มาลินี อันภักดี***

สุทธิเดช ปรีชารัมย์****

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยทำการเปรียบเทียบเทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกันในถังหมักแบบแพคเบต โดยห่อหุ้ม *Candida shehatae* TISTR 5843 ด้วยแคลจิเนตและดูดซับยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 บนวัสดุธรรมชาติ เช่น ชังข้าวโพดและขานอ้อย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการดูดซับที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ยีสต์คือวัสดุธรรมชาติร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ 1.8×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วยเซลล์ตรึงรูปบนขานอ้อยสูงที่สุดคือที่ความเข้มข้นของเอทานอล (P) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) และผลได้ของการผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 30.93 ± 0.12 กรัมต่อลิตร 2.58 ± 0.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.68 ± 0.11 กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ใช้ ตามลำดับ หลังจาก 12 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการห่อหุ้มแบบอื่นๆ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความเสถียรของเซลล์ในวัสดุตรึงรูปและความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วยเซลล์ตรึงรูปบนขานอ้อยด้วย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถนำเซลล์ตรึงรูปบนขานอ้อยกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 3 ครั้งในการหมักแบบกะซ้ำ ดังนั้นใบตองจึงอาจเป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยเซลล์ตรึงรูปโดยประยุกต์ใช้เทคนิคการดูดซับร่วมกับถังหมักแบบแพคเบต

Abstract

Comparative study of ethanol production from banana leave using different immobilization techniques. *Candida shehatae* TISTR 5843 was entrapped with calcium alginate and absorbed on natural supporting materials such as corncob and bagasse. The results showed that the suitable absorption method for cell immobilization was observed at 3 % w/v

* บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้ผักตบชวาเพื่อการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ร่วมกับถังหมักชีวภาพแบบตั้ง

** อาจารย์ที่ปรึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140 โทร.034-281-105-7 ต่อ 7678 โทรสาร 034-351-402 E-mail: faasrpp@ku.ac.th

*** นิสิตระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

**** อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม หลักสูตรจุลชีววิทยา โครงการจัดตั้งสายวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

of natural supporting material with yeast cells concentration of 1.8×10^8 cells/mL. The highest efficiency of ethanol production with immobilized cells was obtained on bagasse with ethanol concentration (P), ethanol productivity (Q_p) and ethanol yield ($Y_{p/s}$) of 30.93 ± 0.12 gL⁻¹, 2.58 ± 0.78 gL⁻¹h⁻¹ and 0.68 ± 0.11 g g⁻¹, respectively, after 12 hrs in comparison with another method ($p \leq 0.05$). Moreover, the stability and the reusability of immobilized cells on bagasse for ethanol production efficiency were also studied. The results showed that the immobilized cells on bagasse could be used at least 3 times in repeated-batch fermentation. Therefore, banana leave may be an alternative raw material for ethanol production with immobilized cell by applied absorption techniques with packed-bed reactor.

บทนำ

ในปัจจุบันการพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทน กำลังเป็นที่แพร่หลายทั้งในภาครัฐและภาคเอกชน และหนึ่งในพลังงานทางเลือกนั้น คือ “เอทานอล” ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกหนึ่งที่นำมาทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมได้ ปัจจุบันเอทานอลสามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมีซึ่งได้รับความนิยมสูง โดยใช้พืชผลหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบของแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ เช่น อ้อย กากน้ำตาล ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มของเส้นใยที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ได้แก่ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น ตัวอย่างของวัสดุกลุ่มนี้ที่พบมากทางด้านเกษตรกรรม เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น ใบตองก็จัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล (อรอนงค์, 2555)

การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลนั้นจำเป็นต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยสลายทางเคมีหรือเอนไซม์ให้ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ จากนั้นจึงใช้จุลินทรีย์ซึ่งทั่วไปนิยมใช้เชื้อยีสต์ทำการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล โดยการผลิตเอทานอลให้ได้ประสิทธิภาพสูงนั้น จำเป็นต้องมียีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งในขณะนี้งานทางด้านการศึกษาหมักผลิตเอทานอลที่ได้รับความนิยมมาก คือ การพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลให้มีประสิทธิภาพสูง โดยมีงานวิจัยมากมายที่เป็นไปในแนวทางการหมักเอทานอลด้วยการใช้เทคนิคต่าง ๆ ในกระบวนการหมัก เช่น การหมักแบบต่อเนื่อง (Tyagi and Ghose, 1980) การหมักแบบต่อเนื่องร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ (Limtong *et al.*, 1984; Kuriyama *et al.*, 1985) การตรึงรูปเซลล์ (Tyagi and Ghose, 1982) ซึ่งเทคนิคการใช้เซลล์ตรึงรูปเป็นการจำกัดขอบเขตทางกายภาพหรือสถานที่ทางกายภาพเพื่อให้จุลินทรีย์อยู่ในบริเวณที่ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่งสามารถหมักได้อย่างต่อเนื่องและสามารถนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ดี (สุรารักษ์, 2550) และเปรียบเทียบการใช้เทคนิคตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยวิธีการห่อหุ้ม (entrapment) และวิธีการดูดซับ (absorption) ด้วยวัสดุธรรมชาติ (ชังข้าวโพด และชานอ้อย) ซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนในกระบวนการผลิต และยังเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือจากธรรมชาติในอนาคต

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลระหว่างเซลล์ยีสต์อิสระและจากเซลล์ยีสต์ตรึงรูป
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยเทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
2. เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) ของบริษัท Shimadzu (Class LC10 ประเทศญี่ปุ่น)
3. ยีสต์สายพันธุ์ *C. shehatae* TISTR 5843 (สายพันธุ์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.))
4. วัสดุจากธรรมชาติ ได้แก่ ช้างข้าวโพดและชานอ้อย

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างใบตอง และการปรับสภาพใบตองเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

เก็บตัวอย่างของใบตองโดยการตัดส่วนของใบแฉกจากนั้นนำไปฉีกเอาส่วนของแผ่นใบแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตากแดดให้แห้ง นำไปตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำใบตองบดเพื่อลดขนาด (ขนาดไม่เกิน 2 มิลลิเมตร) จำนวน 5 กรัม แช่วด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเข้าหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนที่เป็นของแข็ง และนำส่วนที่เป็นของเหลวไปปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น และองค์ประกอบของน้ำตาลโดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

2. การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นทำโดยการเชื่อมเชื้อยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 จากอาหารวุ้น YMA (Yeast malt extract agar) จำนวน 1 loop ลงในอาหารเหลว YM (Yeast malt extract medium) ตัดแปลงจากวิธีการของอรอนงค์ (2555) ซึ่งประกอบไปด้วย Yeast extract ร้อยละ 1.5 กรัมต่อปริมาตร Peptone ร้อยละ 2.5 กรัมต่อปริมาตร Malt extract ร้อยละ 2.5 กรัมต่อปริมาตร น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 กรัมต่อปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงในอาหาร YM ปริมาตร 96 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะคงที่ (ตั้งทิ้งไว้) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (วัดปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1 กรัม น้ำหนักแห้งต่อลิตร หรือจำนวนเซลล์ประมาณ 1.8×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการตรึงรูปกับวัสดุตรึงรูปต่อไป

3. การตรึงเซลล์ยีสต์

3.1 การตรึงเซลล์ยีสต์ในวัสดุตรึงรูปโดยวิธีการดูดซับ

ทำการเตรียมวัสดุตรึงรูป (ซึ่งข้าวโพด และขานอ้อย) เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์ตามวิธีของ อรอนงค์ (2555) หลังจากนั้นนำวัสดุตรึงรูป จำนวน 3 กรัม มาตรึงรูปเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำวัสดุตรึงรูปไปใช้ในขั้นตอนการหมักต่อไป

3.2 การตรึงเซลล์ยีสต์ในวัสดุตรึงรูปโดยวิธีการห่อหุ้ม

การตรึงเซลล์ยีสต์โดยวิธีการห่อหุ้มโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตตัดแปลงจากวิธีการของกรรณิการ์ (2553) โดยนำเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม มาปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์มาผสมกับโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และทำการหยดโซเดียมอัลจิเนตที่ผสมกับเซลล์แล้วลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3 ครั้ง แล้วเก็บไว้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 ในถังหมักแบบแพคเบดโดยเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

การผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปในถังหมักแบบแพคเบดตัดแปลงมาจากวิธีการของ Chen *et al.* (2007) โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปจากข้อ 3.1 และ 3.2 มาบรรจุใส่ในคอลัมน์แก้ว (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ความยาว 15 เซนติเมตร) ร้อยละ 80 ของปริมาตรคอลัมน์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YM ปรับปริมาตรด้วยส่วนของของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพไบโตนึงโดยปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นให้ได้ 50 กรัมต่อลิตรด้วยน้ำตาลไซโลส ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการไหลของตัวอย่าง 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 3 มิลลิลิตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น

5. การศึกษาประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ตรึงรูปในวัสดุธรรมชาติ

นำวัสดุตรึงรูปที่มีจำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกดูดซับมาทำการหมักซ้ำภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 4 เก็บตัวอย่างครั้งละ 3 มิลลิลิตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 5.6 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YM เช่นเดียวกับข้อ 4 จากนั้นเก็บตัวอย่างเช่นเดิมจนกระทั่งปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับเริ่มต้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น

6. การศึกษาสมมูลระหว่างวัฏภาคของการดูดซับของเซลล์ตรึงรูปในวัสดุตรึงรูปจากธรรมชาติ

นำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมมาตรึงรูปในวัสดุจากธรรมชาติ (ซึ่งข้าวโพด และขานอ้อย) โดยใช้เซลล์ยีสต์ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ประมาณ 1.28×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120

รอบต่อนาที พีเอช 5.6 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่ถูกดูดซับในวัสดุเปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์อิสระในสภาวะเดียวกันเป็นชุดควบคุม

จำนวนเซลล์ที่ถูกดูดซับในวัสดุ = จำนวนเซลล์อิสระ (ชุดควบคุม) – จำนวนเซลล์ที่เหลือในของเหลว

7. การวิเคราะห์

นำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์หองค์ประกอบเส้นใยเริ่มต้นตามวิธีของ Goering และ Van (1970) นับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) วัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight) วิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลรูปของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (DNS) ตามวิธีของ James (1995) วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยวิธีไดโครเมท โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Seo *et al.* (2009) และวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของรัชพล (2554) โดยนำตัวอย่าง จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดตะกอน แล้วปรับให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ของบริษัท Shimadzu (Class LC10 ประเทศญี่ปุ่น) ด้วยคอลัมน์ SugarPax (Bio-Rad) ที่สภาวะ Mobile phase คือ Deionized water ที่อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส Detector ชนิด Reflexive Index (RI)

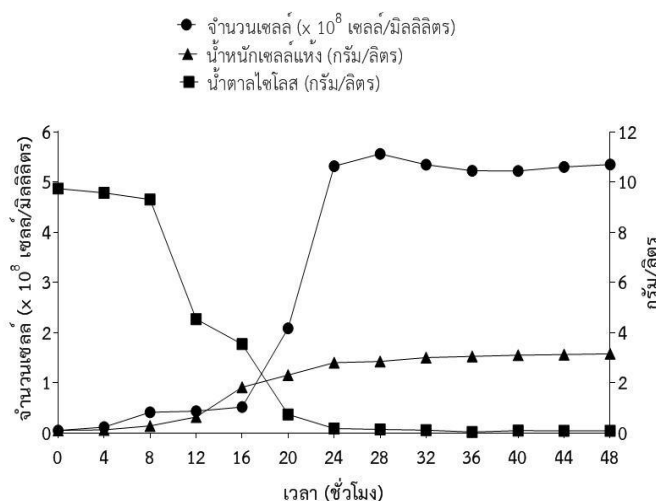
8. การใช้สถิติในการวิเคราะห์ผลข้อมูล

ขั้นตอนในการวิจัยและผลการทดลองทั้งหมดจากการวิจัยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของสองชุดข้อมูลโดยวิธี t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95.0 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843

การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 โดยทำการตรวจวัดค่าการเจริญของเซลล์เปรียบเทียบกับเวลาและปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (ภาพที่ 1) พบว่าในช่วงเวลา 16-24 ชั่วโมงนั้นเป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วหรือแบบทวีคูณ (Exponential phase หรือ Log phase) โดยในชั่วโมงที่ 16 เป็นช่วงที่เริ่มปรับตัวหรือเพิ่มจำนวนทวีคูณอาจมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นได้อีก และหลังจากชั่วโมงที่ 24 เซลล์เริ่มมีการแบ่งเซลล์ลดน้อยลงหรือเริ่มเข้าสู่ระยะคงตัว (Stationary phase) (เทพปัญญา และ วรสิทธิ์, 2553) โดยในชั่วโมงที่ 20 นั้นเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้ในการตรึงเซลล์ ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด โดยที่น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.82 ± 0.70 กรัมต่อลิตร และจำนวนเซลล์ยีสต์เฉลี่ย 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลล์ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่เวลา 20 ชั่วโมงเพื่อใช้ในขั้นตอนการตรึงรูป



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเซลล์ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เวลา 48 ชั่วโมง

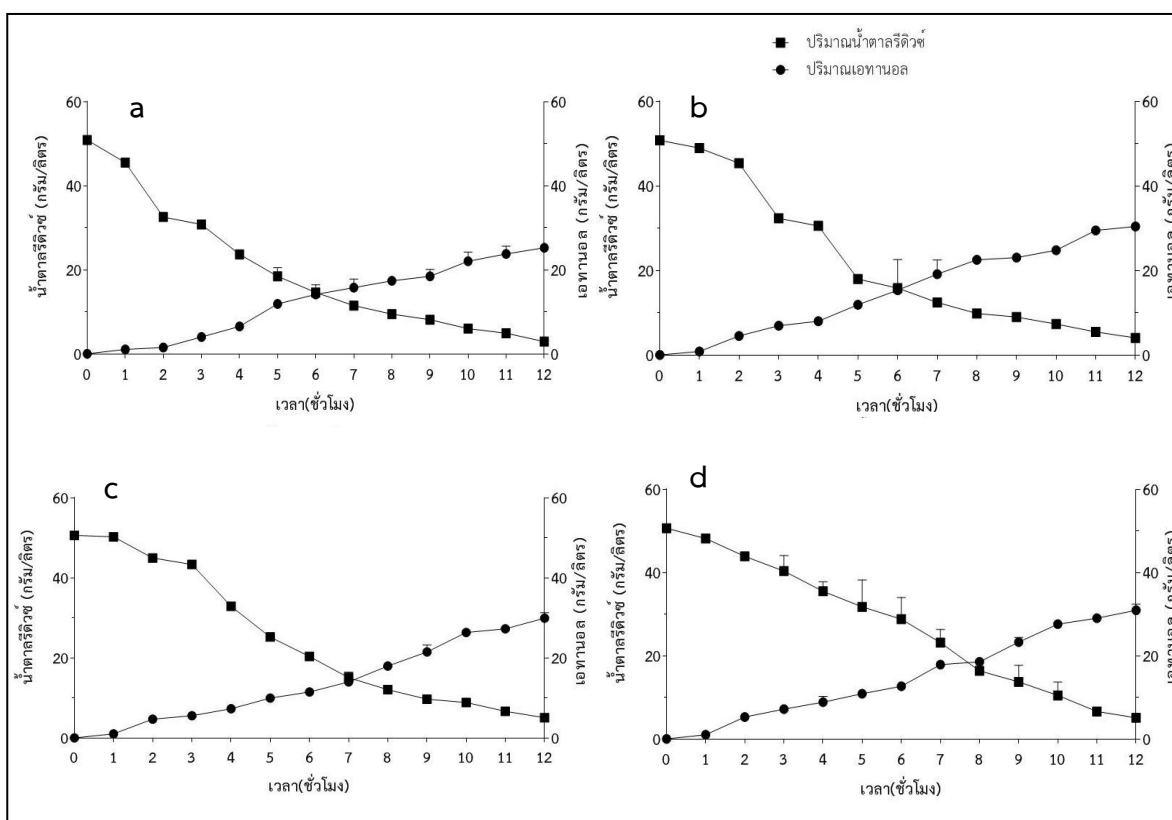
2. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 ในถังหมักแบบแพคเบตโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป

2.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป (วิธีการหมัก และวิธีการดูดซับ) โดยใช้เชื้อยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ทำการหมักในถังหมักแบบแพค-เบตที่ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.6 เวลาการหมัก 12 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในสภาวะการทดลองโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง ในช่วงเวลา 0-12 ชั่วโมง (ภาพที่ 2 a-d) โดยในสภาวะที่ใช้เซลล์อิสระจะสามารถใช้น้ำตาลได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้เซลล์ตรึงรูปแบบหมักด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แบบดูดซับในช่องข้าวโพด และชานอ้อย แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเหลือน้ำตาลรีดิวซ์ในปฏิกิริยาเท่ากับ 2.92 ± 0.12 4.05 ± 0.18 5.06 ± 0.56 และ 5.10 ± 0.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากว่ากระบวนการตรึงรูป เป็นการจำกัดบริเวณให้แก่เซลล์ และยังส่งผลต่อการแพร่ของสารอาหารเข้ามาใช้ภายในเซลล์ได้ช้ากว่าเซลล์อิสระ จึงทำให้ช่วงแรกมีการปรับตัวเพื่อให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมใหม่ (กรณีการ, 2553)

การผลิตเอทานอลจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 0-12 ชั่วโมง (ภาพที่ 2 a-d) โดยในสภาวะที่ใช้เซลล์ตรึงรูปจะสามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้เซลล์อิสระแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสามารถผลิตเอทานอลจากเซลล์ยีสต์ตรึงรูปแบบหมักในแคลเซียมอัลจิเนต แบบดูดซับในช่องข้าวโพด ชานอ้อย และแบบเซลล์อิสระเท่ากับ 30.40 ± 0.78 29.93 ± 0.10 30.93 ± 0.58 และ 25.23 ± 0.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการตรึงรูปช่วยส่งเสริมบริเวณที่เข้าทำปฏิกิริยา (active site) ของเซลล์กับสารตั้งต้น ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 จึงเข้าทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีกว่า ส่งผลให้สามารถผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพและได้ปริมาณ

มากกว่าการใช้เซลล์อิสระโดยตรง (รัชพล, 2554) ดังนั้นการใช้เซลล์ตรึงรูปจึงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระ



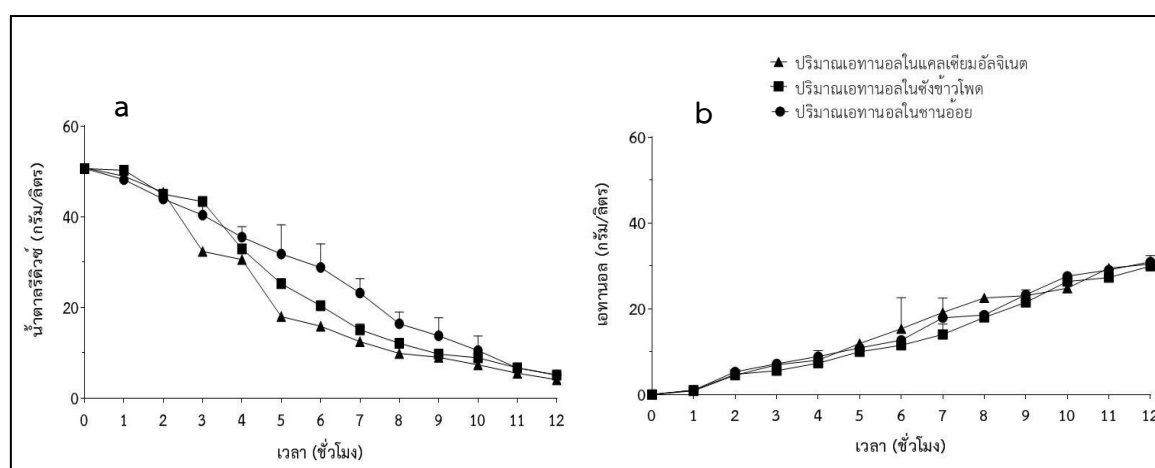
ภาพที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นโดยการใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 อิสระ (a) ที่ตรึงรูปด้วยวิธีการห่อหุ้มในแคลเซียมอัลจิเนต (b) ที่ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับบนซังข้าวโพด (c) และที่ตรึงด้วยวิธีการดูดซับในขานอ้อย (d) ในถังหมักแบบแพคเบด พีเอช 5.6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง

2.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยเทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลระหว่างเซลล์ตรึงรูป 2 แบบ คือ แบบห่อหุ้มในแคลเซียมอัลจิเนตและแบบดูดซับในวัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ซังข้าวโพดและขานอ้อย โดยใช้เชื้อยีสต์ *C. shehatae* TISTR โดยใช้เชื้อยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ทำการหมักโดยถังหมักแบบแพคเบดที่ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.6 เวลาการหมัก 12 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในปฏิกิริยาเมื่อใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปแบบห่อหุ้ม และแบบดูดซับมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง ในช่วงเวลา 0-12 ชั่วโมง (ภาพที่ 3a) โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วนปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาเมื่อใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปทั้งสองแบบเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 0-12 ชั่วโมง (ภาพที่ 3b) โดยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปแบบดูดซับในวัสดุธรรมชาติจากขานอ้อยจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 30.93 ± 0.12 กรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์ทรงรูปแบบห่อหุ้ม ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารสามารถแพร่เข้าไปในวัสดุทรงรูปด้วยวิธีการดูดซับได้ดีกว่าวิธีการห่อหุ้ม จึงทำให้มีการผลิตเอทานอลที่แตกต่างกัน (เวสารัช, 2556)

เมื่อพิจารณาปริมาณผลผลิตต่างๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง จากเซลล์ยีสต์ทรงรูปด้วยวิธีการ (ตารางที่ 1) พบว่า เซลล์ยีสต์ทรงรูปแบบดูดซับจากขานอ้อยจะเป็นวัสดุทรงรูปที่ดีที่สุด โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอล (P) ผลได้ของการผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) เท่ากับ 30.93 ± 0.12 กรัม/ลิตร 0.67 ± 0.79 กรัมต่อกรัม และ 2.38 ± 0.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของศูนย์วิจัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย (2550) ที่แสดงให้เห็นว่า ขานอ้อยมีประสิทธิภาพในการเป็นวัสดุทรงรูปที่ดีเนื่องจากแบคทีเรีย *Clostridium butyricum* ที่ทรงรูปบนขานอ้อยสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงกว่าที่ทรงรูปบนวัสดุธรรมชาติชนิดอื่น นอกจากนี้จากศึกษาโครงสร้างของขานอ้อยด้วยกล้อง SEM ของเวสารัช (2556) ยังแสดงให้เห็นว่า ขานอ้อยมีลักษณะพื้นผิวที่ขรุขระและมีรอยหยักจำนวนมาก ส่งผลให้เซลล์ที่ถูกตรึงยึดเกาะกับพื้นผิวและถูกดูดซับในรูพรุนได้ดี



ภาพที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (a) ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (b) โดยการใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ทรงรูปด้วยวิธีการห่อหุ้ม (แคลเซียมอัลจิเนต) และแบบดูดซับ (ซังข้าวโพด และขานอ้อย) ในถังหมักแบบแพคเบต พีเอช 5.6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง

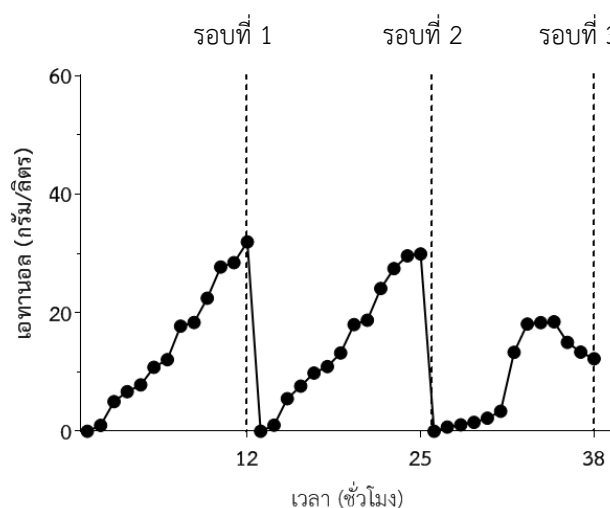
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของเอทานอล (P), ผลได้ของการผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) ในถังหมักแบบแพคเบตโดยยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 พีเอช 5.6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ผลผลิต	เซลล์ยีสต์อิสระ	เซลล์ยีสต์ทรงรูป		
		แคลเซียมอัลจิเนต	ซังข้าวโพด	ขานอ้อย
P (กรัม/ลิตร)	25.23 ± 0.14^b	30.40 ± 0.82^{ab}	29.93 ± 0.82^b	30.93 ± 0.12^a
$Y_{p/s}$ (กรัม/กรัม)	0.52 ± 0.17^b	0.65 ± 0.62^a	0.65 ± 0.62^a	0.67 ± 0.02^a
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	2.10 ± 0.82^b	2.53 ± 0.11^{ab}	2.49 ± 0.12^b	2.58 ± 0.78^a

หมายเหตุ: a,b,c,... เป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$); P คือ ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร), $Y_{p/s}$ คือ ผลได้ของการผลิตเอทานอล (กรัม/กรัม) คำนวณได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัม/ลิตร) ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป (กรัม/ลิตร) และ Q_p คือ อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร ชั่วโมง) คำนวณได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัม/ลิตร) ต่อเวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)

3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในวัสดุธรรมชาติ

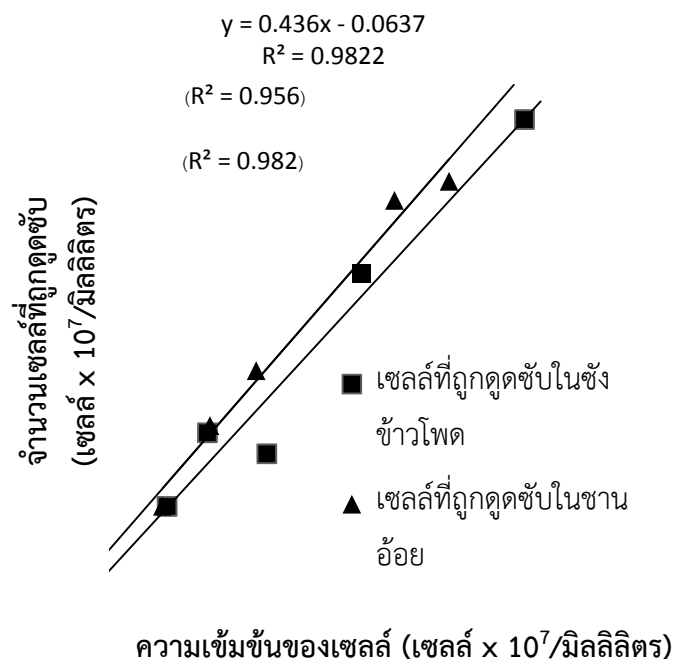
จากการศึกษาการนำเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ โดยใช้เซลล์ตรึงรูปแบบดูดซับบนขานอ้อยทำการหมักโดยถังหมักแบบแพคเบดที่ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.6 ระยะเวลาการหมักรอบละ 12 ชั่วโมง พบว่า สามารถใช้ยีสต์ที่ตรึงรูปทำการหมักเอทานอลได้ 3 รอบ โดยที่เซลล์ยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับรอบหมักครั้งแรก โดยความเข้มข้นของเอทานอล (P) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักทั้งสามครั้ง คือ 31.97 ± 0.72 (ร้อยละ 100.00), 29.91 ± 0.12 (ร้อยละ 93.57) และ 12.25 ± 0.14 (ร้อยละ 57.80) กรัมต่อลิตร ซึ่งคำนวณเป็นผลได้ของการผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.34 ± 0.10 , 0.33 ± 0.19 และ 0.33 ± 0.02 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่า สามารถนำยีสต์ที่ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับบนขานอ้อยกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 3 ครั้ง โดยที่เซลล์ยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลมากกว่าร้อยละ 50



ภาพที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ โดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงบนขานอ้อย ในถังหมักแบบแพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.6 เวลาที่ใช้ในการหมักรอบละ 12 ชั่วโมง

4. ผลการศึกษาสมมูลระหว่างวัฏภาคของการดูดซับในวัสดุรูปร่างแบบดูดซับ

จากการศึกษาสมมูลระหว่างวัฏภาคของการดูดซับในวัสดุรูปร่างแบบดูดซับโดยใช้วัสดุรูปร่างจากขี้ข้าวโพดและขานอ้อย โดยนับปริมาณเซลล์ที่ถูกดูดซับบนวัสดุรูปร่าง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ 120 รอบต่อนาที พีเอช 5.6 เวลา 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 5) พบว่า วัฏภาคของการดูดซับในวัสดุรูปร่างแบบดูดซับจากขี้ข้าวโพดและขานอ้อยที่ได้จากการศึกษาวิจัยจะมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง (R^2 เท่ากับ 0.956 และ 0.982 ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีของกระบวนการดูดซับแบบ Freundlich ซึ่งกล่าวว่า การดูดซับบนพื้นผิวของวัสดุรูปร่างจะมีการเรียงตัวกันแบบหลายชั้น จึงเกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างเซลล์อย่างอ่อน ไม่มีพันธะเคมีเกิดขึ้น แต่จะดึงดูดกันด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der waals) ทำให้เซลล์สามารถใช้พื้นที่ในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนสูงขึ้นได้ (โสภา, 2548) เช่นเดียวกับงานวิจัยของจุลณีย์ (2546) ที่ใช้ขานอ้อยและขี้ข้าวโพดในการดูดซับเพนตะคลอโรฟีนอลเปรียบเทียบกับการใช้ถ่านกัมมันต์ และได้รายงานว่าวัสดุจากธรรมชาติดังกล่าวมีกลไกการดูดซับสารประกอบฟีนอลเป็นไปตามแบบจำลองของ Freundlich



ภาพที่ 5 สมมูลระหว่างวัฏภาคของการดูดซับในวัสดุรูปร่างแบบดูดซับ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลิตเอทานอลจากใบตองโดยในถังหมักแบบแพคเบดด้วยเชื้อยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 พบว่า เซลล์ตรึงรูปมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงกว่าเซลล์อิสระ โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอล (P) และอัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) เท่ากับ 30.93 ± 0.12 กรัมต่อลิตร และ 2.58 ± 0.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบเซลล์ตรึงรูปแบบห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและแบบดูดซับบนวัสดุ

ธรรมชาติ ได้แก่ ช้างข้าวโพดและขานอ้อย พบว่า เซลล์ตรึงรูปแบบดูดซับบนขานอ้อยให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอล (P) และอัตราผลผลิตเอทานอลสูงสุด (Q_p) เท่ากับ 30.93 ± 0.12 กรัมต่อลิตร และ 2.58 ± 0.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ เซลล์ตรึงรูปแบบขานอ้อยยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ โดยที่เซลล์ยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลมากกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นการใช้เซลล์ตรึงรูปจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงเหมาะแก่การพัฒนาและส่งเสริมให้ใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนา แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ปี 2555

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรรณิการ์ แก้วมาก. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843 โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล.” ปัญหาพิเศษ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2553.
- จุฬาลักษณ์ แสงระวี. “ศึกษาความเป็นไปได้ของช้างข้าวโพดในการดูดซับสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในน้ำทิ้ง.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2546.
- เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และ รัชพล พะวงศรีรัตน์. “การใช้ประโยชน์วัสดุตรึงรูปจากวัสดุธรรมชาติสำหรับการตรึงเซลล์ และประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล” *Veridian E-Journal SU* 6, 1 (มกราคม-เมษายน 2556): 795-807.
- เทพปัญญา เจริญรัตน์ และ วรสิทธิ์ โทจำปา. *ปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก*. ปทุมธานี: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต), 2553.
- รัชพล พะวงศรีรัตน์. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทผักตบชวาโดยหมอน้ำร้อนแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล.” *Veridian E-Journal SU* 4, 2 (พฤษภาคม-กรกฎาคม 2554): 891-901.
- ศูนย์วิจัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย. “รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการส่งเสริมและสนับสนุนการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวเคมีที่ใช้ข่อยเป็นวัตถุดิบต้นน้ำ.” คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, 2550.
- โสภา กลิ่นจันทร์. “การดูดซับ.” ใน *กระบวนการแยกสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ* 1, 297-343. กรุงเทพฯ : ศูนย์ผลิตตำราเรียนสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 2548.
- สุรารักษ์ อวนฉนวน. “โครงการการผลิตเอทานอลจากไซโลสโดยใช้เซลล์ตรึงของ *Candida shehatae*.” ใน *ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน ประจำปีงบประมาณ 2550*, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2550.

อรอนงค์ อินทร์ตา. “การผลิตเอทานอลจากใบตองในถังหมักแบบแพคเบตด้วยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปบนซังข้าวโพด.” ปัญหาพิเศษ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2555.

ภาษาต่างประเทศ

Chen, J.P. et al. “Bioethanol Production from Uncooked Raw Starch by Immobilized Surface-engineered Yeast Cells.” Appl. Biochem Bioethanol, 145, (2008): 59-67.

Goering, H. K., and Van Soest, P. J. Forage fiber analysis: Apparatus, reagents, procedures and some applications. Agricultural Handbook 379. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture. iv, 1970.

James, C.S. Analytical chemistry of foods. London: Blackie A&P, 1995.

Kuriyama, H. et al. “Continuous ethanol fermentation with cell recycling using flocculent yeast.” J. Ferment Tech. 63 (1985): 159-165.

Lee, Jae-Heung et al. “The effect of temperature on kinetics of ethanol production by *Saccharomaces uvarum*.” Biotechnol. Lett. no. 2 (1980): 141-146.

Limtong, S. et al. “Continuous ethanol production by concentrated culture of flocculating yeast.” J. Ferment. Tech. 62 (1984): 55-62.

Prasad, B., and I.M. Mishra. “On the kinetics and effectiveness of immobilized whole-cell batch cultures.”, Biores. Technol. 53 (1995): 269-275.

Seo, H.B. et al. “Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process.” J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36 (2009): 285-292.

Tayagi, R.D., and T.K. Ghose. “Studies on immobilized *Saccharomaces cerevisiae* analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor.” Biotechnol. Bioeng. 24 (1982): 781-795.

Tayagi, R.D., and T.K. Ghose. “Batch and multistage continuous ethanol fermentation of cellulose hydrolysate and optimum design of fermentor by graphical analysis.” Biotechnol. Bioeng. 22 (1980): 1907-1928.