# การศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เชื้อรา *T. reesei*

# The Study of Ethanol Fermentation from Reducing Sugar of Rice Straws by Enzymatic Hydrolysis with *T. reesei*

ผศ.ผ่องศรี ศิวราศักดิ์[1]

**บทคัดย่อ:**

การศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เชื้อรา เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและสภาวะที่ใช้ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ของฟางข้าว การปรับสภาพฟางข้าวได้ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ แยกเซลลูโลสในฟางข้าว ซึ่งทำให้เพิ่มเซลลูโลสจาก 65.35 กรัมต่อกรัมสับสเตรทเป็น 99.34 กรัมต่อกรัมสับสเตรท จากนั้นใช้เซลลูโลสในอัตราส่วน 1 หน่วยน้ำหนักต่อ 20 หน่วยปริมาตรของอาหารเหลว ย่อยสลายด้วยเอนไซม์เชื้อราด้วยวิธีการเขี่ยเฉพาะเชื้อรา ปริมาณ 1 ใน 4 ของจานเลี้ยงเชื้อ กวนให้เชื้อราผสมกับอาหารเหลวด้วยแท่งแก้ว ปรับค่า pH เริ่มต้นเป็น 5.3 เขย่าที่อุณหภูมิห้อง (31 °C) ด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ 1 วัน พบว่าเอนไซม์จากเชื้อราสามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.2771 กรัมต่อกรัมสับสเตรท หรือคิดเป็นประมาณ 28 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของฟางข้าว ค่า pH ที่วัดได้เท่ากับ 7.4 สำหรับการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่ใช้ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากฟางข้าว โดยนำยีสต์ *S. Cerevisiae* TISTR 5339 มาเลี้ยงในน้ำตาลรีดิวซ์ในอัตราส่วนความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สภาวะของการหมักทำโดยการปรับค่า pH เริ่มต้นเป็น 5 เขย่าที่อุณหภูมิห้อง (31 °C) ด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้สูงสุดเท่ากับ 0.1307 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และใช้เวลาในการหมักเพียง 1 วัน

Keyword: *T. reesei, S. Cerevisiae* น้ำตาลรีดิวซ์, เอทานอล

**Abstract**

The study of rice straws enzymatic hydrolysis by using with *T. reesei* TISTR 3080 was to increase quantity of reducing sugar. Several conditions of enzymatic hydrolysis in rice straws cellulose were utilized. And also this study was to find the yeast concentrations, which were used for ethanol fermentation from reducing sugar. Cellulose in rice straws was pretreated with 2 M sodium hydroxide. This method provided increasing cellulose from 65.36 g/g substrate to 99.34 g/g substrate. The ratio of pretreated rice straws cellulose weight to production medium volume was 1:20 which was hydrolyzed with enzyme from *T. reesei* TISTR 3080 by inoculating only fungi, adjusted pH until 5.3, shaking at room temperature (31 °C) with speed 120 rpm for 1 hour and incubated further without shaking for 1 day. The average obtained reducing sugars were 0.2771 g/g substrate at pH 7.4. These reducing sugars were fermented with 15 % (v/v) of *S.* cerevisiae TISTR 5339 at initial pH

[1] ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ธัญบุรี ปทุมธานี 12110
โทรศัพท์ 02-549-3093 Email: pongsri@access.rit.ac.th

5 and shaking incubated at room temperature (31 °C), 120 rpm in anaerobic system for 1 day. The average ethanol quantity form fermentation was 0.1307 g/g substrate.

Keyword: *T. reesei*, *S. Cerevisiae*, reducing sugar, ethanol

## 1. บทนำ

พลังงานจากปิโตรเลียมถูกนำมาใช้จนกระทั่งกำลังจะหมดไปในอีกไม่นานนัก สถานการณ์ของโลกในขณะนี้จึงหาทางออกด้วยการหาพลังงานใหม่ที่ยั่งยืนขึ้นมาทดแทน พลังงานจากพืชหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ประเทศไทยมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ พลังงานจากเอทานอลได้รับความสนใจสูงมากเพราะประเทศไทยมีพืชผลทางการเกษตรมากมายที่จะนำมาเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลได้ ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลยังคงมีต้นทุนสูง จึงทำให้เอทานอลมีราคาแพงกว่าราคาน้ำมันเบนซิน การผลิตเอทานอลมีต้นทุนสูงเนื่องจากในการผลิตต้องใช้กระบวนการต่างๆ ได้แก่ กระบวนการหมักทางชีวภาพ กระบวนการกลั่นและกระบวนการทำให้มีความบริสุทธิ์ถึง 99.99 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จึงจะสามารถนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินได้ รวมทั้งต้องมีต้นทุนจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียหรือกากของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตาม เมื่อคำนึงถึงอนาคตที่น้ำมันใต้พิภพกำลังจะหมดไป จึงมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนต่ำลง การศึกษาการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด ฯลฯ มาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะก่อให้เกิดการใช้ทรัพยากรให้ได้ประโยชน์ต่อประเทศอย่างคุ้มค่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟางข้าวซึ่งมีปริมาณมากเพราะในปีหนึ่งๆ มีการปลูกข้าวทั้งเพื่อบริโภคและส่งออกในปริมาณมากและบางภูมิภาคของประเทศสามารถทำนาได้ตลอดปี ผู้วิจัยได้ทำการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากฟางข้าวและชานอ้อย (2544) [1] พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์จากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 ย่อยสลายเซลลูโลสในฟางข้าวได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.168 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ใช้เวลาในการย่อยสลายนาน 2 วัน เมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์นี้ไปทำการหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ได้เอทานอล 0.0516 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ใช้เวลาหมัก 6 วัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณน้อยเนื่องจากเชื้อราที่เลี้ยงได้ไม่แข็งแรง และเชื้อราที่ใส่ในอาหารเหลวไม่ได้ผสมกันอย่างสม่ำเสมอบางส่วนยังอยู่บนอาหารแข็ง จึงทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ ดังนั้นจุดประสงค์ของการวิจัยนี้ (2545) เพื่อศึกษาสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เชื้อราเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและสภาวะที่ใช้ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว ทำการทดลองโดยใช้เชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 และยีสต์ *S. cerevisiae* เหมือนเดิมแต่สภาวะและวิธีการเลี้ยงเชื้อแตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา (1)

## 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 วัสดุ

วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการทดลอง คือ ฟางข้าวพันธุ์สุพรรณ 1 จากสถาบันวิจัยข้าว ปทุมธานี นำมาตัดด้วยเครื่องตัดให้มีขนาดความยาวประมาณ 2 ถึง 5 เซนติเมตร เก็บรักษาในภาชนะสะอาดที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 31 องศาเซลเซียส

จุลินทรีย์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง คือ เชื้อรา *T. reesei*. TISTR 3080 และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

### 2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อราและยีสต์

อาหารเหลวพีดีเอ (Potato-Dextrose-Agar)

การเตรียมอาหารเหลวพีดีเอโดยละลายพีดีเอ 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารแข็งวายเอ็มเอ (Yeast-Malt-Agar)

มีส่วนประกอบ ดังต่อไปนี้ (กรัม) ยีสต์แอ็กซ์แทรค 3.0, มอลต์ แอ็กซ์แทรค 3.0, เบคโต-เปปโตน 5.0, กลูโคส 20.0, วุ้น 20.0, และน้ำกลั่น 1.0 ลิตร นำสารละลายไปนึ่งที่สภาวะเดียวกับพีดีเอ

อาหารเหลววายเอ็ม (Yeast-Malt)

ใช้ส่วนประกอบเหมือนวายเอ็มเอ ยกเว้นไม่ใส่วุ้นและนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะเหมือนกับข้างต้น

อาหารเหลวสำหรับเชื้อรา

มีส่วนประกอบด้วยสารละลายเกลือแร่ ดังต่อไปนี้ (กรัม/ลิตร) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 1.00, แคลเซียมโปแตสเซียมฟอสเฟต ($CaKPO_4$) 0.05, แอมโมเนียมไดซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 4.00, น้ำข้าวโพด (Corns steep liquor) 7.00, เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) 5.00, ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) 1.40, แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) 1.60, โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) 3.60, ทวีน 80 (Tween 80) 20.00 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 1 ลิตร นำสารละลายทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่า pH เป็น 5.5

### 2.3 สารเคมี

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก โซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรท สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.5 นอร์มัล แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

### 2.4 อุปกรณ์

เครื่องชั่งสาร (Analytical balance) บริษัท Sartorius เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) บริษัท Heidolph รุ่น MR 3001 K ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ ผลิตในประเทศไทย หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) บริษัท Wisconsil Aluminum Foundry Co., Inc. รุ่น 1925 X เครื่องเขย่าเชื้อ ผลิตในประเทศไทย เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท Shimadzu รุ่น UV-1601 และเครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) บริษัท Utech Instruments รุ่น Cyber scan PC 510

### 2.5 วิธีการ

*การปรับสภาพเซลลูโลส*

การปรับสภาพเซลลูโลสใช้อัตราส่วนฟางข้าวต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยแช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหนึ่งคืน นำวัตถุดิบทั้งสองชนิดที่ผ่านการแช่มาต้มในสารละลายด่างความเข้มข้นเท่าเดิมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที วิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสก่อนและหลังการปรับสภาพตามวิธีทดสอบของ TAPPI 203 om-88 เซลลูโลสที่ได้ถูกนำไปปรับสภาพให้เป็นกลาง (pH7) ก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการย่อยสลายต่อไป

*การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา*

วิธีการเลี้ยงเชื้อรา *T. reesei.* TISTR 3080 โดยการนำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรพีดีเอและนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 7 ถึง 12 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จนได้สปอร์ของเชื้อราจำนวนมาก สังเกตการเจริญเติบโตเต็มที่ของเชื้อราได้จากมีสีเขียวกระจายเต็มจานเพาะเชื้อ

การย่อยสลายเซลลูโลสจากฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเชื้อราแบ่งเป็น 3 การทดลอง ดังนี้ การทดลองที่ EH-1 การหาเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์และเวลาเขย่าที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อราผสมกับเซลลูโลสของฟางข้าวและอาหารเหลว ด้วยวิธีการถ่ายเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งสูตรพีดีเอ โดยการใช้ลูพ (loop) เขี่ยเฉพาะเชื้อรา 1 ส่วนใน 4 ส่วนของจานเลี้ยงเชื้อ (ไม่ให้ติดอาหารแข็ง) ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร (ใช้ขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร) ซึ่งมีเซลลูโลสของฟางข้าวอยู่ปริมาณ 10 กรัม จำนวน 3 ขวด ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อคนให้เชื้อราผสมกับอาหารเหลว จึงนำแต่ละขวดไปเลี้ยงในสภาพเขย่า 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (31 องศาเซลเซียส) นาน 1 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากเขย่าจึงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเซลลูเลสในการย่อยสลายตามวิธีของ M.F.

Chaplin และ J.F. Kennedy (1987) โดยหาน้ำตาลรีดิวซ์ ใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในช่วง 5 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลาย วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงก์แทนสารละลายเอนไซม์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและวัดค่าพีเอชทุกวัน เพื่อหาเวลาของการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 และเวลาของการเขย่าที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงที่สุด การทดลองที่ EH-2 หาค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสจากฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเชื้อราที่สภาวะเหมาะสม แยกน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ด้วยวิธีให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำไปเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลต่อไป และการทดลองที่ EH-3 การเปรียบเทียบน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองที่ EH-2 และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลายกับเชื้อราที่ยังมีชีวิตอยู่บนเซลลูโลสมาทำการย่อยสลายซ้ำด้วยการเติมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อราลงไปใหม่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และทำการย่อยสลายที่สภาวะเหมาะสม วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ส่วนเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลายในการทดลองนี้ถูกนำไปฆ่าเชื้อและวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสที่ถูกใช้ไป

*การหมักเอทานอล*

การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้ การทดลองที่ EF-1 หาปริมาณของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่เตรียมเพื่อใช้ในการหมักเอทานอลด้วยวิธี colony forming unit per milliliter (cfu/mL) โดยนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งวายเอ็มเอมาเพิ่มปริมาณเชื้อให้สูงขึ้นโดยถ่ายลงในอาหารเหลววายเอ็มปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ในขวดชมพู่ 250 มิลลิลิตร) นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (31 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูการเจริญเติบโตและปริมาณเชื้อยีสต์ที่ติดสีของเมทิลีนบลูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการต่อเชื้อยีสต์โดยปิเปตยีสต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวปลอดเชื้อที่เตรียมใหม่ 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิห้อง อัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 1 วัน หาปริมาณยีสต์ในอาหารเหลวที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในจานเลี้ยงเชื้อต่อมิลลิลิตร ยีสต์ที่ผ่านการเลี้ยงจะถูกนำไปใช้ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป

การทดลองที่ EF-2 หาสภาวะของการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสด้วยยีสต์ในอาหารเหลวที่ได้จากการต่อเชื้อ นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 1, 3, 6, 9 และ 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แต่ละขวดมาปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เติมเกลือแร่ คือ ปริมาณกรัมต่อลิตรของสารละลายน้ำตาลของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 ถึง 0.5 แอมโมเนียมไดซัลเฟต 0.5 และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของยีสต์ลงไปในสารละลายน้ำตาลกลูโคส จึงนำไปทำให้ปลอดเชื้อก่อนเติมเชื้อยีสต์จากการต่อเชื้อในอาหารเหลวอายุ 1 วัน ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของยีสต์ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (31 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ M.F. Chaplin และ J.F. Kennedy (1987) และปริมาณเอทานอลใช้วิธี flash distillation [5] ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสารละลายเอทานอลในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงก์ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและวัดพีเอชทุกวัน

การทดลองที่ EF-3 หาสภาวะที่ใช้หมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ในอาหารเหลวที่ได้จากการต่อเชื้อ โดยการปรับพีเอช และเติมเกลือแร่ที่จำเป็นเหมือนการทดลองที่ EF-2 ลงในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลาย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด นำไปทำให้ปลอดเชื้อก่อนเติมยีสต์ที่ได้จากการต่อเชื้อที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของยีสต์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลเหมือนการทดลองที่ EF-2 และวัดค่าพีเอช

## 3. ผลการทดลอง

### 3.1 เซลลูโลสที่ได้จากการปรับสภาพ

การปรับสภาพฟางข้าวด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ สามารถเพิ่มเซลลูโลสที่มีอยู่ในฟางข้าวจาก 65.35 ได้เป็น 99.34 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ปริมาณของฟางข้าวที่หายไปหลังการปรับสภาพเท่ากับ 40.63 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตาราง 1, 2 ตามลำดับ ดังนั้น ปริมาณเซลลูโลสในตะกอนฟางข้าวที่ได้จากการคำนวณจึงเท่ากับ 58.98 กรัม

### 3.2 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสของฟางข้าวด้วยเซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei.* TISTR 3080

ผลจากการทดลองที่ EH-1 พบว่า การเขย่าวันละ 1 ชั่วโมง ให้น้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกับการเขย่าวันละ 6 และ 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าสูงที่สุดในวันแรกของการย่อยสลายซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.2734 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ในทุกอัตราการเขย่า และพีเอชสุดท้ายมีค่าประมาณ 7.38 ดังแสดงในรูปที่ 1 ผลการทดลองที่ EH-2 และ EH-3 เอนไซม์จากเชื้อราใช้เซลลูโลสเท่ากับ 4.59 และ 2.48 กรัมต่อกรัมสับสเตรท เปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.29 และ 0.25 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ดังแสดงในตาราง 3 และ 4 การย่อยสลายเซลลูโลสของฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเชื้อราสามารถเปลี่ยนเซลลูโลสปริมาณ 1 กรัมไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 0.06 กรัม และ 0.1 กรัม ดังแสดงในรูป 2 หรือคิดเป็น 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเซลลูโลส ตามลำดับ นั่นคือ เซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลายและเชื้อราที่อยู่บนเซลลูโลสสามารถนำมาใช้ซ้ำได้อีกโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อราลงไปใหม่ภายใน 1 วัน ซึ่งอายุของเชื้อราเดิมยังไม่แก่มากจึงสามารถผลิตเอนไซม์ขึ้นมาใหม่และเปลี่ยนเซลลูโลสที่เหลืออยู่ไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้อีก น้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลองที่ EH-3 มีค่ามากกว่าการทดลองที่ EH-2 ในขณะที่เซลลูโลสถูกใช้ไปน้อยกว่า เนื่องจากยังคงมีน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลองที่ EH-2 เหลือค้างอยู่ในขวดหลังจากถูกแยกออกจากเซลลูโลส

ตารางที่ 1 เซลลูโลสจากฟางข้าวก่อนและหลังการปรับสภาพ

| สับสเตรท | เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) | |
|---|---|---|
| | ก่อนปรับสภาพ | หลังปรับสภาพ |
| ฟางข้าว | 65.35 | 99.34 |

ตารางที่ 2 ปริมาณของฟางข้าวที่หายไปหลังการปรับสภาพ

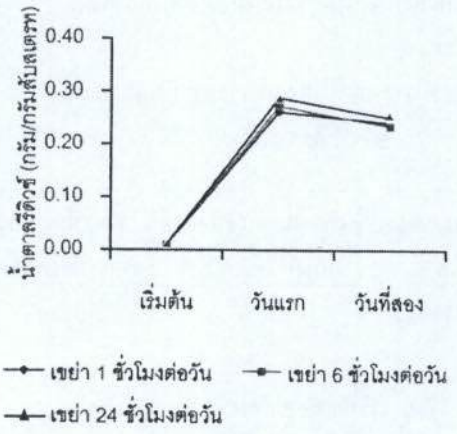
| สับสเตรท | น้ำหนัก (กรัม) | | เปอร์เซ็นต์ |
|---|---|---|---|
| | เริ่มต้น | สุดท้าย | (น้ำหนักแห้ง) |
| ฟางข้าว | 100 | 59.37 | 40.63 |

ตารางที่ 3 เซลลูโลสที่ถูกใช้ไปของการทดลองที่ EH-2 และ EH-3

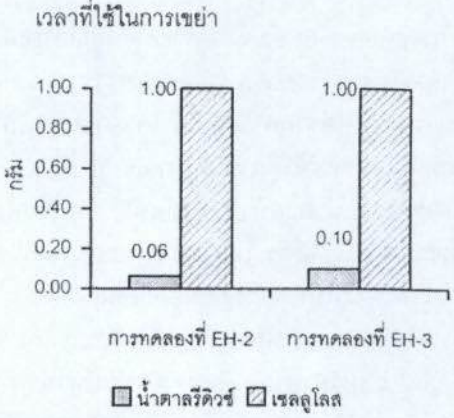
| การทดลองที่ | เซลลูโลส (กรัมต่อกรัมสับสเตรท) | | |
|---|---|---|---|
| | เริ่มต้น | เหลือ | ถูกใช้ไป |
| EH-2 | 99.32 | 94.73 | 4.59 |
| EH-3 | 94.73 | 92.25 | 2.48 |

ตารางที่ 4 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองที่ EH-2 และ EH-3

| ครั้งที่ | น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัมสับสเตรท) | |
|---|---|---|
| | การทดลองที่ EH-2 | การทดลองที่ EH-3 |
| 1 | 0.29 | 0.25 |
| 2 | 0.28 | 0.25 |
| 3 | 0.30 | 0.25 |
| เฉลี่ย | 0.29 | 0.25 |




รูปที่ 1 น้ำตาลรีดิวซ์ เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายและเวลาที่ใช้ในการเขย่า




รูปที่ 2 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลส 1 กรัมของการทดลองที่ EH-2 และ EH-3

### 3.3 เอทานอลจากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339

ผลการทดลองที่ EF-1 พบว่า ที่อัตราส่วนเจือจาง 1:10 ปริมาณของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 มีค่า colony forming unit per milliliter เฉลี่ยเท่ากับ 45 cfu/mL ซึ่งเป็นอัตราส่วนเจือจางที่มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณยีสต์เพื่อใช้ในการหมักเอทานอลที่ได้จากการต่อเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณของยีสต์ที่อัตราส่วนเจือจางของการทดลองที่ EF-1

| อัตราส่วนเจือจาง | ปริมาณยีสต์ในจานเลี้ยงเชื้อ (cfu/mL) | | | เฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | cfu/mL |
| 1:10 | 45 | 30 | 46 | 45 |
| 1:100 | na | 0.85 | 1.9 | 1.38 |
| 1:1000 | 0.01 | 0.03 | 0.08 | 0.04 |
| 1:10000 | $5.5\times10^{-3}$ | $7\times10^{-3}$ | $6.5\times10^{-3}$ | $2.1\times10^{-3}$ |
| 1:100000 | $1.4\times10^{-3}$ | $0.3\times10^{-3}$ | $0.4\times10^{-3}$ | $0.7\times10^{-3}$ |

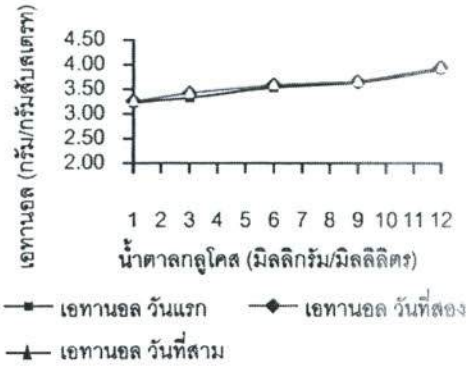
ผลการทดลองที่ EF-2 พบว่า เอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายน้ำตาลกลูโคสด้วยยีสต์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นานหนึ่งวัน สองวันและสามวันมีค่าใกล้เคียงกัน นั่นคือ เวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ คือหนึ่งวัน และปริมาณยีสต์มีค่าเฉลี่ย 45 cfu/mL เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้นขึ้น

ปริมาณของเอทานอลที่ได้จากการหมักมีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3 ส่วนพีเอชของการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของวันแรกถึงวันที่สาม ดังแสดงในรูปที่ 4

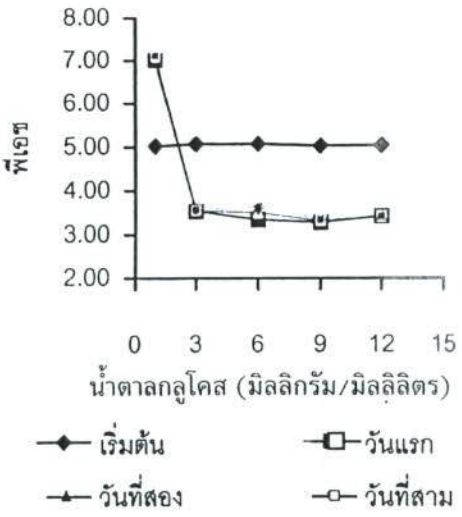
ผลการทดลองที่ EF-3 พบว่า สภาวะของการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์จากฟางข้าวเมื่อใช้ยีสต์ที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการหมักนาน 1 วัน ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.10 กรัม/กรัมสับสเตรท และมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 4.89 ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักกับเอทานอลที่ได้จากความเข้มข้นของยีสต์ที่ 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ดังแสดงในรูปที่ 5 และรูปที่ 6 ตามลำดับ จึงใช้ยีสต์เข้มข้น15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการหมักน้ำตาลรีดิวซ์นาน 1 วัน โดยทำการทดลอง 5 ครั้ง ได้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 0.1307 กรัม/กรัมสับสเตรท และค่าพีเอชสุดท้ายเฉลี่ยเท่ากับ 5.94 ดังแสดงในตารางที่ 6

**4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง**

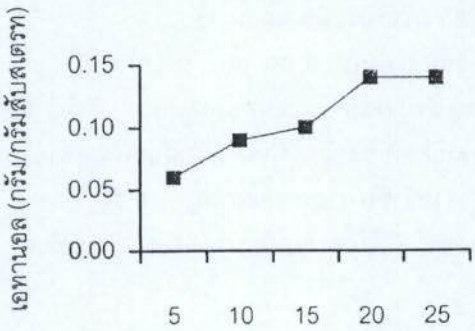
เซลลูโลสจากฟางข้าวหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์มีค่าเพิ่มขึ้นและการสูญเสียฟางข้าวในขั้นตอนการปรับสภาพลดลงเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา เพราะได้ทำการปรับปรุงการตัดฟางข้าวให้มีขนาดพอเหมาะกับการกรอง การปรับสภาพวิธีนี้เพื่อทำให้ลิกนินแยกออกจากฟางข้าวขณะเดียวกันยังแยกเฮมิเซลลูโลสออกไปด้วยแต่เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสในฟางข้าวมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเซลลูโลส วิธีการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์จึงมีความเหมาะสม การย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เท่านั้น อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา พบว่าเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสับสเตรทสามารถถูกย่อยสลายซ้ำได้อีกเพราะยังมีปริมาณเซลลูโลสเหลืออยู่ปริมาณมากหลังจากถูกย่อยสลายไป 2 ครั้ง (ดังตารางที่ 3) เซลลูโลสปริมาณ 4.59 และ 2.48 กรัม ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา ได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.29 และ 0.25 กรัม/กรัมสับสเตรท หรือน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 0.06 และ 0.10 กรัม/กรัมเซลลูโลส ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยที่ได้คิดเป็น 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเซลลูโลส มีพีเอชเริ่มต้นและสุดท้าย 5 และ 7 ตามลำดับ เวลาย่อยสลายนาน 1 วัน เขย่า 1 ชั่วโมงและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (31 องศาเซลเซียส)



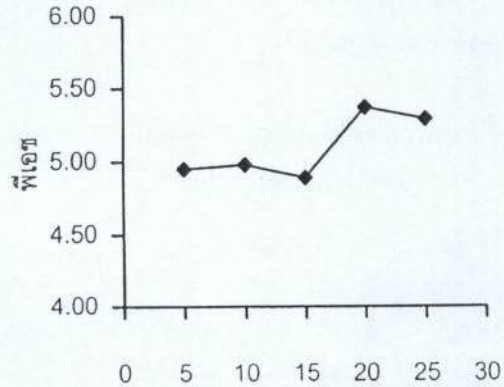

รูปที่ 3 เอทานอลที่ได้จากน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของการทดลองที่ EF-2




รูปที่ 4 พีเอชของการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของการทดลองที่ EF-2




รูปที่ 5 เอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยยีสต์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ของการทดลองที่ EF-3




รูปที่ 6 พีเอชของการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยยีสต์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 5 เอทานอลจากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยยีสต์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

| กรัม/กรัมสับสเตรท | | | พีเอช |
|---|---|---|---|
| น้ำตาลรีดิวซ์ | | เอทานอล | |
| 0.2970 | | 0.1220 | 5.95 |
| 0.2879 | | 0.1350 | 5.08 |
| 0.2950 | | 0.1161 | 5.99 |
| 0.2522 | | 0.1271 | 6.24 |
| 0.2536 | | 0..1532 | 6.43 |
| เฉลี่ย | 0.2771 | 0.1307 | 5.94 |

เอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ในสภาพเขย่า หมักนาน 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (31 องศาเซลเซียส) เปลี่ยนจากพีเอช 5 เป็น 6 และใช้ยีสต์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ค่าเฉลี่ย 45 cfu/mL) ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักคิดเป็นประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำตาลรีดิวซ์

การศึกษานี้สามารถลดเวลาของการย่อยสลายเซลลูโลสจากเดิมใช้เวลานาน 2 เป็น 1 วัน เชื้อราถูกเลี้ยงในอาหารโดยมีการผสมอย่างทั่วถึงโดยเขย่าเพียง 1 ชั่วโมง เพราะว่า เชื้อราที่เลี้ยงมีความแข็งแรงและสามารถควบคุมความเข้มข้นของเชื้อราให้มีความสม่ำเสมอได้ในแต่ละการทดลองจึงทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสมีค่าค่อนข้างคงที่และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.28 กรัม/กรัมสับสเตรท การทดลองนี้สามารถลดเวลาที่ใช้ในการหมักเอทานอลจาก 6 วันเป็น 1 วัน ได้ปริมาณเอทานอลเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา [1]

## 5 เอกสารอ้างอิง

[1] Siwarasak Pongsri.2002. "Experimental Research of Ethanol Fermentation from Rice Straws and Bagasse" in **ISAF XVI-International Symposium on Alcohol Fuels The Role of Alcohol Fuels in Meeting the Energy, Environmental and Economic Needs of the 21 st Century**. pp. 2002-FT-17. Bangkok: National Metal and Materials Technology Center (MTEC).

[2] Tsao, G.T., Ladish, M.R., Ladish, C., HUS, T.A., Dale, B. and Chout, T. **Ethanol and Chemical from Cellulose.** Processing of the International Symposium: Alternative sources of energy for agriculture. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pasific Region, 1985, pp. 117-183.

[3] Austin, George T. 1984. **Chemical Process Industries.** 5 th ed. Singapore: McGraw-Hill.

[4] Sitton, O.C., Foutch, G.L., Book, N.L. and Gaddy, J.L. 1979. "Ethanol from agriculture residues." **Process Biochemistry.** Vol.4 no. 9: 7-10.

[5] สิรินทรเทพ เต้าประยูร และ สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2530. **บทปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.**สาขาจุลชีววิทยาภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.