รายงานการวิจัย

การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสิอี สำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล

Enzyme Production from *Trichoderma reesei* for Ethanol Industry

โดย

หัวหน้าโครงการ: ผศ. ผ่องศรี ศิวราศักดิ์

ที่ปรึกษาโครงการ: รศ. ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ

ผู้ร่วมวิจัย: ผศ. ดร. สิทธินันท์ ท่อแก้ว

ลงทะเบียนวันที่ 11 ก.พ. 2552
เลขทะเบียน 099510
เลขหมู่ วพ TP 248 พ ๒๖๗ ก
หัวเรื่อง -เอนไซม์ -การหมัก

กรกฎาคม 2551

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

งบประมาณ ประจำปี 2550

คณะผู้วิจัย

ที่ปรึกษาโครงการ

รศ. ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ

ผู้อำนวยการโครงการเค-ยูไบโอดีเซล

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทรศัพท์ 02-942-8555 ต่อ 1213 แฟกซ์ 02-579-2083

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผศ. ผ่องศรี ศิวราศักดิ์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

คลองหก ธัญบุรี ปทุมธานี 12110 Email: pongsri@gmail.com

โทรศัพท์ 02-549-3093 แฟกซ์ 02-549-4600

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ. ดร. สิทธินันท์ ท่อแก้ว

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ถ. รังสิต-นครนายก อ. องครักษ์ จ. นครนายก 26120

Email: sittinun@swu.ac.th

โทรศัพท์ 037-322-608 แฟกซ์ 037-322-608

กิตติกรรมประกาศ

เอทานอลเป็นหนึ่งในพลังงานทดแทนที่มีความสำคัญในยุคที่น้ำมันจากปิโตรเลียมถูกทำให้ราคาเพิ่มขึ้นรายวันอย่างต่อเนื่องอยู่ขณะนี้ เนื่องจากเอทานอลสามารถนำมาผสมในน้ำมันเบนซินได้แก๊สโซฮอล์ 95 และอาจทำเป็นน้ำมันเบนซิน E20 และ E85 ดังนั้น ความต้องการเอทานอลสูงขึ้นอย่างแน่นอน จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะหาวัตถุดิบเพื่อป้อนกระบวนการผลิตเอทานอล วัตถุดิบที่ต้องการต้องมีราคาไม่แพง เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรซึ่งมีมากมายในประเทศ การใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบเหล่านี้เพื่อพลังงานทดแทนจะช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงได้อย่างยั่งยืน คณะผู้วิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัย เรื่อง การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสิอี สำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล งบประมาณประจำปี 2550 จากคณะกรรมการสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โดยการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา และคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี คณะวิจัยจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่า องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมเอทานอลในประเทศ เกษตรกร และผู้ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมนี้

ผศ. ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ หัวหน้าโครงการวิจัย
รศ. ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ ที่ปรึกษาโครงการ
ผศ. ดร. สิทธินันท์ ท่อแก้ว ผู้ร่วมวิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้ประโยชน์ครูดเซลลูเลสจากการหมักฟางข้าวในอาหารเหลวด้วย *T. reesei* RMUTT01 ในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย *S. cerevisiae* RIT02 แบบสองขั้นตอน (separate enzymatic hydrolysis and fermentation, SHF) เปรียบเทียบกับการหมักเอทานอลจากการมันสำปะหลังแบบรวมปฏิกิริยา (simultaneous saccharification fermentation, SSF) โดยใช้ครูดเซลลูเลส *T. reesei* RMUTT01 ร่วมกับ *S. cerevisiae* RIT02 การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ (1) หาอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ของ *T. reesei* RMUTT01 จากการหมักฟางข้าว 2, 4, 6, 8 และ 10 g ในอาหารเหลว 100 mL เป็นเวลา 7 วัน ที่ pH 5 และอุณหภูมิห้อง (28°C) พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.156 ต่อวัน และผลิตครูดเซลลูเลสโดยการหมักฟางข้าวที่ผ่านการบำบัดเบื้องต้น 60 กรัมกับอาหารเหลว 1 ลิตรด้วยเชื้อรา 0.446 g/L ในถังหมักชีวภาพที่มีการเติมอากาศ 6 ชั่วโมงต่อวัน ที่ pH 5 และอุณหภูมิห้อง (28°C) ใช้เวลาหมักนาน 4 วัน ได้เซลลูเลสแอคทิวิตีเฉลี่ย 2.2 FPU/mL (2) การย่อยสลายกากมันสำปะหลังโดยแปรผันน้ำหนักกากมันสำปะหลัง 4, 5, 7 และ 10 กรัม กับครูดเซลลูเลสปริมาตรคงที่ 100 mL ในขวดรูปชมพู่ 250 mL เขย่าที่อัตราความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28°C) ใช้เวลาหมักนาน 4 วัน พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 10 % โดยน้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง ที่ 4 % (w/v) ของครูดเซลลูเลส ใช้เวลาหมักนาน 2 วัน ขั้นตอน 3 และ 4 เป็นการหมักแบบ SSF และ SHF ตามลำดับ ดังนี้ (3) หมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาจากกากมันสำปะหลัง โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักกากมันสำปะหลังต่อปริมาตรครูดเซลลูเลส 4 % (w/v) และแปรผันหัวเชื้อ *S. cerevisiae* RIT02 ออกเป็น 4 ระดับ คือ 5%, 10%, 15% และ 20% โดยปริมาตร ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ 250 mL เขย่าที่อัตราความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (29°C) ใช้เวลาหมักนาน 4 วัน พบว่า ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ได้มีค่าประมาณ 2 กรัมต่อลิตรหรือ 5 % โดยน้ำหนักกากมันสำปะหลัง (63 ลิตรเอทานอลต่อตันกากมันสำปะหลัง) เมื่อใช้หัวเชื้อยีสต์ 15 % โดยปริมาตร และหมักนาน 2 วัน (4) ขั้นตอนนี้แบ่งออกเป็น การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากครูดเซลลูเลสซึ่งได้จากส่วนใสที่ผ่านการแยกตะกอนฟางข้าวออกแล้วจึงนำมาหมักกับกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 4% (w/v) ที่ pH 5 และอุณหภูมิห้อง (28°C) พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าเฉลี่ย 6 กรัมต่อลิตร (15 % wt) ของกากมันสำปะหลัง ใช้เวลาหมักนาน 1 วัน และการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์โดยแปรผันหัวเชื้อยีสต์ 4 ระดับ คือ 5%, 10%, 15% และ 20% โดยปริมาตร ที่ pH 5 ในขวดรูปชมพู่ 250 mL เขย่าที่อัตราความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25°C)ใช้เวลาหมักนาน 5 วัน พบว่า เอทานอลสูงสุดประมาณ 2.7 กรัมต่อลิตรหรือ 6.8 % โดยน้ำหนักกากมันสำปะหลัง (86 ลิตรเอทานอลต่อตันกากมันสำปะหลัง) เมื่อใช้หัวเชื้อยีสต์ 15 % โดยปริมาตร และหมักนาน 4 วัน

คำสำคัญ: ไตรโคเดอร์มา รีสิอี, เซลลูเลส, ฟางข้าว, กากมันสำปะหลัง, เอทานอล

ABSTRACT

The utilization of *T. reesei* RMUTT01 crude cellulase from rice straws fermentation in liquid medium was carried on cassava waste enzymatic hydrolysis to produce reducing sugar and separate enzymatic hydrolysis and fermentation (SHF) by using *T. reesei* RMUTT01. The simultaneous saccharification fermentation (SSF) of cassava waste with *T. reesei* RMUTT01 and *S. cerevisiae* RIT02 were compared with SHF in the present study for producing ethanol. The experiment was performed into four steps (1) To find *T. reesei* RMUTT01 growth rate from cultivation on 2, 4, 6, 8 and 10 g rice straws in 100 mL liquid medium with 0.446 g/L *T. reesei* RMUTT01 for 7 days at pH 5 and 28°C. It was found that the specific growth rate (μ) of *T. reesei* RMUTT01 was 0.156 per day, and crude cellulase production by using 60 g pretreated rice straws in 1 L liquid medium with 0.446 g/L *T. reesei* RMUTT01 in bioreactor; 6 hours aeration per day which 2.2 FPU/mL average cellulase activity obtained at 4 days of cultivation time. (2) Cassava wastes was carried on enzymatic hydrolysis by using fixed 100 mL *T. reesei* RMUTT01 crude cellulase cultivated with cassava waste weight variation of 4, 5, 7 and 10 g in 250 mL shaker flask at room temperature for 4 days. It was found that the maximum reducing sugar was 10 % by weight for 4 % (w/v) crude enzyme at 2 days of fermentation. The SHF and SSF were performed in step 3 and step 4 respectively. (3) Ethanol simultaneous saccharification and fermentation from cassava waste was investigated by using constant ratio of cassava waste weight to *T. reesei RMUTT01* crude cellulase at 4 % (w/v) and variation yeast culture concentration of 5%, 10%, 15% and 20% (v/v) in 250 mL shaker flask, cultivated for 4 days at room temperature (30 °C). It was found that the maximum ethanol concentration was 2 g/L or 5 % dry weight cassava waste (63 L ethanol per ton cassava waste) at 15 % yeast culture for 2 days cultivation time. (4) In this step was separated into 2 steps. The reducing sugar production by using obtained *Trichoderma reesei RMUTT01* crude enzyme supernatant which was separated from rice straws sediment, hydrolyzed 4 % (w/v) cassava waste for 1 days cultivation time at pH 5 and 28°C. It was found that the average reducing sugar was 6.5 g/L (16 % wt). Then it was sterilized and fermented to produce ethanol in 250 mL shaker flask by using *S. cerevisiae* RIT02 yeast culture variation of 5%, 10%, 15% and 20% (v/v) at pH 5 and room temperature 25°C. It was found that the maximum ethanol concentration was 2.7 g/L or 6.8 % dry weight cassava waste (86 L ethanol per ton cassava waste) at cultivation time of 4 days.

Key word (s): *Trichoderma reesei*, cellulase, rice straws, cassava waste, ethanol