AEN03

การใช้ครูดเอนไซม์ผงสำหรับการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรด

Crude Enzyme Powder Utilization for Ethanol Fermentation from Pineapple Skins

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์*[1] เยาวลักษณ์ แถลงกัณฑ์[1] จุฑารัตน์ นุ้ยหนู[1] นิรันดร์ เจริญศรี[1] และต้อม แม้นรัมย์[1]
[1]ภาควิชาวิศวกรรมเคมีและวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
เลขที่ 39 หมู่ 1 คลอง 6 ธัญบุรี ปทุมธานี 12110
โทรศัพท์: +66(2)-549-4609 โทรสาร: +66(2)-549-4600 อีเมล์: pongsri@gmail.com

บทคัดย่อ

การใช้ครูดเอนไซม์ผงสำหรับการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดในงานวิจัยนี้ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวที่มีต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยครูดเอนไซม์ผงสองชนิด คือครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี และเชื้อผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี กับแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี การหมักเอทานอลใช้เปลือกสับปะรดคงที่เท่ากับร้อยละ 8 โดยน้ำหนักแห้ง ในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่พีเอชเท่ากับ 5 และอุณหภูมิห้อง (30°C) ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าด้วยอัตรา 120 รอบต่อนาที แปรผันอัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวเท่ากับ 1:0.25 และ 1:0.50 และเพื่อเปรียบเทียบเอทานอลที่ได้ระหว่างการหมักเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงกับการหมักแบบรวมปฏิกิริยาด้วย 10%v ของหัวเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอีผสมกับครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี พบว่าเอทานอลที่ได้จากการใช้ครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อผสมที่อัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 1:0.50 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 42 g/L ใช้เวลาหมักนาน 4 วัน สำหรับการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาที่อัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 1:0.50 พร้อมกับ 10%v หัวเชื้อแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี พบว่าเอทานอลที่ได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 47 g/L ใช้เวลาหมัก นาน 4 วัน

คำสำคัญ: เอทานอล เปลือกสับปะรด ครูดเอนไซม์ผง ไตรโคเดอร์มา รีสิอี แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี

Abstract

The objectives of crude enzyme powder utilization for ethanol fermentation from pineapple skins in this study was to find the effect of initial sugar in liquid medium on ethanol concentration obtained from fermentation by using two types of crude enzyme powder. Crude enzyme powder was produced from monoculture of *Trichoderma reesei* and co-culture of *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. Ethanol fermentation was carried out in 250 mL shaking flaks at 120 rpm, by using 8% dry weight of pineapple skin in 100 mL liquid medium at initial pH 5, room temperature (30°C) and varied the ratio of crude enzyme powder to sugar in medium as 1:0.25 and 1:0.50. And also comparison of ethanol obtained between fermentation by using crude enzyme powder and simultaneous sacchairfication and fermentation with 10%v *Saccharomyces cerevisiae* starter mixed with crude enzyme powder from *Trichoderma reesei* were investigated. It was found that the highest ethanol obtained was 42 g/L for 4 days by using crude enzyme powder from co-culture of *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae* at the ratio of crude enzyme powder to sugar in medium as 1:0.50. The highest ethanol concentration from simultaneous sacchairfication and fermentation was 47 g/L for 4 days.

1. บทนำ

เอทานอลผลิตได้จากการหมักทางชีวภาพนอกเหนือจากการสังเคราะห์ทางเคมี เอทานอลบริสุทธิ์ 99.5 %v สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเบนซิน [1] สารตั้งต้นที่นำมาใช้ในการหมักคือน้ำตาลหรือกากน้ำตาลและใช้ยีสต์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอล หรืออาจใช้แป้งจากมันสำปะหลังหรือข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ แต่ต้องเพิ่มกระบวนการย่อยแป้งไปเป็นน้ำตาลก่อนนำไปหมักกับยีสต์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล [2] เนื่องจากน้ำตาล กากน้ำตาล หรือแป้งมันสำปะหลังหรือข้าวโพดเป็นวัตถุดิบที่มีความต้องการสูงทำให้ราคาแพง และบางครั้งขาดแคลนวัตถุดิบดังกล่าว เพื่อลดต้นทุนวัตถุดิบของการผลิตเอทานอลเพื่อพลังงานทดแทน จึงได้มีการศึกษาการนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาใช้ แทนน้ำตาล กากน้ำตาลและแป้งจากมันสำปะหลังหรือข้าวโพด โดยต้องเพิ่มกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล จากนั้นจึงใช้การหมักเอทานอลจากน้ำตาลด้วยยีสต์ [3] การย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสอาจใช้วิธีทางกายภาพ เคมี ฟิสิกส์-เคมี ความร้อน หรือเอนไซม์ที่เหมาะสม [4] อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ตั้งแต่ 2 วิธีร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากการหมักทางชีวภาพ [5]

เปลือกสับปะรดเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสซึ่งได้ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น สับปะรดกระป๋อง น้ำสับปะรดเข้มข้น เหล้าหรือบรั่นดี เป็นต้น สับปะรด 1 ตัน มีวัสดุเหลือทิ้งประมาณ 0.5 ตัน ในปี 2551 ผลผลิตสับปะรดโรงงานรวมทั้งประเทศ 2.476 ตัน ดังนั้น มีปริมาณเปลือกสับปะรดประมาณ 1.238 ตันต่อปี [6] ได้ถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ และปุ๋ยหมัก [7] ประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์สับปะรดประมาณ 688,600 ตัน มูลค่า 2,820 ล้านบาท ในเดือนมกราคมถึงกันยายน 2553 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงได้

วางยุทธศาสตร์สับปะรดปี 2553-2557 โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ประเทศไทยรักษาความเป็นผู้นำอันดับหนึ่งในการผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์ และได้รับอนุมัติจากคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 15 มิถุนายน 2553 [8] หลังการผลิตจะมีวัสดุเหลือทิ้งเปลือกสับปะรดปริมาณมาก ดังนั้นเปลือกสับปะรดจึงเป็นวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสที่มีศักยภาพที่จะนำมาเพิ่มมูลค่าในการผลิตเอทานอลเพื่อพลังงานทดแทน

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาปัจจัยของการผลิตน้ำตาลจากการย่อยสลายเปลือกสับปะรดด้วยเซลลูเลสเอนไซม์ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเชื้อเดี่ยว คือ *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae*, เวลา พีเอช ความเข้มข้นสับสเตรท ขนาดของการเพาะเชื้อ และอุณหภูมิ จากนั้นใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล [9]

การศึกษาที่ผ่านมาได้ผลิตครูดเอนไซม์ชนิดผงแห้งผลิตจากการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วยเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 (T) [10] และเชื้อผสมที่ได้จากการเพาะเชื้อร่วมกันระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และ แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 (TY) และ [11] และหาสภาวะหมาะสมของการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ชนิดผงแห้งจากเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 [12] และเชื้อผสมที่ได้จากการเพาะเชื้อร่วมกันระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และ แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 [13] ในอาหารเหลวสูตรเฉพาะพีเอช 5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) โดยใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอลหาปัจจัยควบคุม 4 พารามิเตอร์ คือ น้ำหนักแห้งเปลือกสับปะรด (8, 10 และ 12 กรัม) ครูดเอนไซม์ชนิดผงแห้ง (4, 5 และ 6 กรัม) น้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลว (1, 2 และ 3 กรัม) และระยะเวลาที่ใช้หมัก (2, 3 และ 4 วัน) พบว่า น้ำหนักแห้งเปลือกสับปะรดของการหมักเอทานอลด้วยครูดเอนไซม์ชนิดผงแห้งจากเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมเท่ากันคือ 8 กรัม ส่วนอัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวสำหรับเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมคือ 1:0.25 และ 1:0.50 ใช้ระยะเวลาหมักคือ 2 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1และเชื้อผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และ แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 โดยศึกษาผลของอัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวที่มีต่อการผลิตเอทานอลจากเปลือกสับปะรดที่สภาวะที่เหมาะสมเพิ่มเติมจากงานวิจัยที่ผ่านมาเพื่อยืนยันผล และเพื่อเปรียบเทียบวิธีการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดที่ใช้ครูดเอนไซม์ผงกับวิธีการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดแบบรวมปฏิกิริยาด้วย10%v หัวเชื้อยีสต์ แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 ผสมกับครูดเอนไซม์ผง

2. วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

2.1 วัตถุดิบ

เปลือกสับปะรดแห้ง บดละเอียด ขนาดอนุภาค 5 – 10 มิลลิเมตร จากบริษัท ยูไนเต็ด ไวน์เนอรี่ แอนด์ดิสทิลเลอรี่ จำกัด อำเภอนครไชยศรี จังหวัดนครปฐม

2.2 จุลินทรีย์

ประกอบด้วย

- เชื้อเดี่ยวยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2
- ครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เรียกสั้นๆ ว่าครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว
- ครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 เรียกสั้นๆ ว่าครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสม

เชื้อจุลินทรีย์ทั้งสามผลิตจากห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลัญบุรี

2.3 อาหารเหลวสูตรเฉพาะ พีเอช 5

อาหารเหลวสูตรเฉพาะ พีเอช 5 ประกอบด้วย 1 g/L $CaHPO_4$, 1g/L $MgSO_4.7H_2O$, 8 g/L ปุ๋ยยูเรีย (46% NH_4SO_4), 15 g/L ปุ๋ยฟอสเฟต (NPK: 0-52-34), น้ำตาลเริ่มต้น 10 g/L หรือ 30 g/L และน้ำสะอาด 1 L ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5

2.4 วิธีการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรด

สภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยว [12] และเชื้อผสม [13] โดยใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอลจากงานวิจัยที่ผ่านมา ดังตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาที่ปริมาณเปลือกสับปะรดเท่ากัน การหมักเอทานอลโดยใช้ครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อผสมใช้ปริมาณมากกว่า และน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลว รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้หมักมีค่ามากกว่าการใช้ครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยว ถ้าพิจารณาที่ครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมปริมาณเท่ากัน การหมักเอทานอลด้วยครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อผสมใช้น้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้น 25%w และระยะเวลาที่ใช้หมักมากขึ้น 2 วันเช่นกัน เปรียบเทียบจากผลการทดลองดังกล่าวในรูปของอัตราส่วนระหว่างปัจจัยควบคุม ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมจากใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอลของการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ชนิดผงแห้งจากเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมจากการศึกษาที่ผ่านมา [12] และ [13]

ปัจจัยควบคุม	ครูดเอนไซม์ผง	
	เชื้อเดี่ยว	เชื้อผสม
เปลือกสับปะรด (PAW) %w	8	8
ครูดเอนไซม์ (CE) ชนิดผงแห้ง %w	4	6
น้ำตาล (G) เริ่มต้นในอาหารเหลว %w	1	3
ระยะเวลาหมัก วัน	2	4

ตารางที่ 2 อัตราส่วนระหว่างปัจจัยควบคุมที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา [12] และ [13]

อัตราส่วนของ	ครูดเอนไซม์ผง	
	เชื้อเดี่ยว	เชื้อผสม
PAW:CE	1:0.500	1:0.750
PAW:G	1:0.125	1:0.375
CE:G ในอาหารเหลว	1:0.250	1:0.500
ระยะเวลาหมัก วัน	2	4

Go Back

งานวิจัยนี้จึงทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลที่ได้จาก การใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอลหาสภาวะที่เหมาะสมจากงานวิจัยที่ผ่านมา โดยกำหนดตัวแปรคงที่ คือ 8 กรัมเปลือกสับปะรด อาหารเหลวสูตรเฉพาะปริมาตร 100 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และอุณหภูมิห้อง (30°C) ตัวแปรแปรผัน คือชนิดของครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม อย่างละ 4 และ 6 กรัม น้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลว 10 และ 30 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาที่ใช้หมัก 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน โดยใช้วิธีการหมักเอทานอลแบบกะซึ่งแบ่งเป็น

วิธีที่1 การหมักเอทานอลด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมมีวิธีการทดลองดังนี้

การทดลองดำเนินการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เริ่มจากผสมครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสมลงในอาหารเหลวสูตรเฉพาะพีเอช 5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก นาน 30 นาที แล้วจึงใส่เปลือกสับปะรด 8 กรัม ปิดจุกด้วยสำลี นำไปวางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และจุลินทรีย์ ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน

วิธีที่ 2 การหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาจากเปลือกสับปะรดด้วย 10%v หัวเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 ผสมกับครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ ทำได้โดยเขี่ยยีสต์ 1-2 โคโลนีจากจานเพาะเลี้ยงวายเอ็มเอ ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งมีอาหารเหลว (น้ำตาลเริ่มต้น 200 g/L) สูตรเฉพาะปริมาตร 100 มิลลิลิตร พีเอช 5 ปิดจุกด้วยสำลี วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 นำหัวเชื้อยีสต์ที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรเทลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งใส่เปลือกสับปะรด 8 กรัมและอาหารเหลว (น้ำตาลเริ่มต้น 30 g/L หรือ 10 g/L) สูตรเฉพาะ พีเอช 5 ที่ได้ผสมครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวไว้ก่อนแล้ว ในปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และจุลินทรีย์ ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน

2.5 วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ความเข้มข้นของจุลินทรีย์จากการวัดเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยใช้เฮมาไซโตมิเตอร์ (Boeco, Germany) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส [14] และเอทานอลด้วยวิธีออกซิเดชันของไดโครเมต [15] โดยวัดค่าการดูดกลืนจากเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 nm และ 600 nm ตามลำดับ

3. ผลและอภิปรายผลการทดลอง

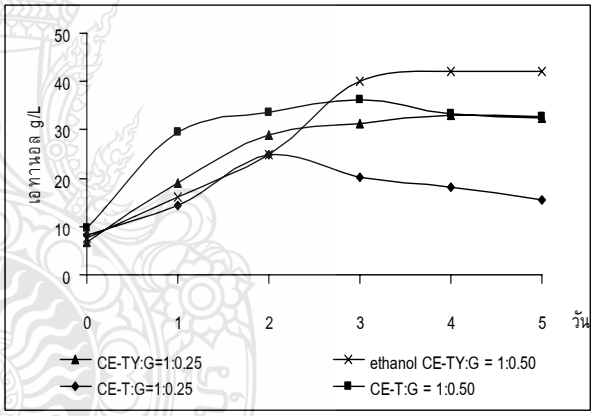
3.1 ผลการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

โปรไฟล์ของเอทานอลที่ได้จากการใช้อัตราส่วนของครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมต่อน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 1:0.25 และ 1:0.50 ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 1

พิจารณาโปรไฟล์เอทานอลจากการใช้ครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวที่อัตราส่วน 1:0.25 และ 1:0.50 ในรูปที่ 1 พบว่า น้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวเพิ่มขึ้น 25% ครูดเอนไซม์ผงสามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น 44.5% ใช้เวลาหมักเท่ากับ 3 วัน ทำนองเดียวกันจากโปรไฟล์เอทานอลของครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสมที่อัตราส่วน 1:0.25 และ 1:0.50 พบว่าน้ำตาลเพิ่มขึ้น 25% เอทานอลที่ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 21.2% ใช้หมักเท่ากับ 4 วัน เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของการหมักเอทานอล

ตารางที่ 3 เอทานอลที่ได้จากการใช้อัตราส่วนของครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวต่อน้ำตาลเริ่มต้น (CE-T:G) และเชื้อผสม (CE-TY:G) ที่อัตราส่วนต่างๆ ใช้ระยะเวลาหมัก 5 วัน

ระยะเวลา (วัน)	เอทานอล (g/L) ที่ได้จาก			
	CE-T:G = 1:0.25	CE-T:G =1:0.50	CE-TY:G = 1:0.25	CE-TY:G = 1:0.50
0	8.07	9.53	6.77	7.73
1	14.36	29.39	18.95	16.17
2	24.81	33.54	28.84	24.74
3	20.05	36.14	31.31	40.10
4	18.05	33.20	33.17	42.08
5	15.43	32.86	32.43	42.00

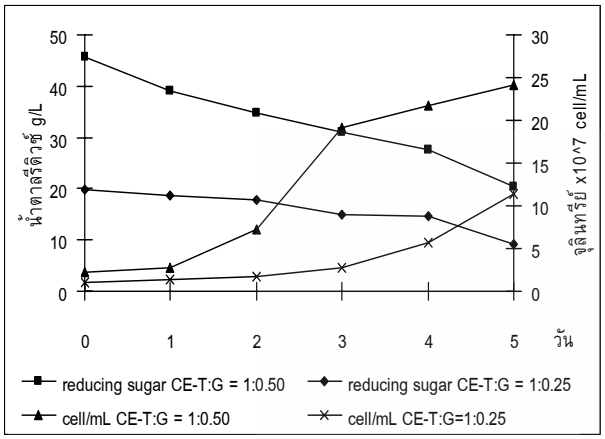


รูปที่ 1 โปรไฟล์เอทานอลจากการหมักเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว (CE-T) และเชื้อผสม (CE-TY) ที่อัตราส่วน 1.025 และ 1:0.50

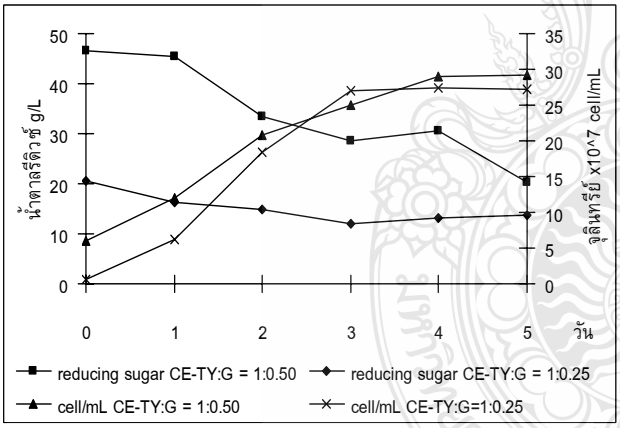
พิจารณาโปรไฟล์ของเอทานอลที่ได้จากการใช้ครูดเอนไซม์ผงระหว่างเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่อัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวเท่ากันคือ 1:0.50 ในรูปที่ 1 พบว่า ครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสม ผลิตเอทานอลได้มากกว่าเชื้อเดี่ยวประมาณ 21% เนื่องจากครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสมมีเชื้อยีสต์ผสมอยู่จึงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้เพิ่มขึ้น และเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อผสมที่อัตราส่วน 1:0.50 มีค่าสูงที่สุด 42 g/L ใช้เวลาหมักเท่ากับ 4 วัน นั่นคือ น้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวมีผลต่อการเกิดเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ

พิจารณาโปรไฟล์ของน้ำตาลเริ่มต้นและการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว พบว่าผลของปริมาณน้ำตาล

เริ่มต้นในอาหารเหลวเพิ่มขึ้นทำให้จุลินทรีย์เติบโตเพิ่มขึ้นด้วยและจุลินทรีย์ใช้เวลาปรับตัวน้อยกว่าจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลน้อยกว่าอยู่ 1 วัน ดังรูปที่ 2 สำหรับครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสม พบว่าจุลินทรีย์ผสมไม่มีระยะเวลาการปรับตัว แต่เติบโตได้ดีตั้งแต่เริ่มต้นการหมัก ดังรูปที่ 3 ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเดี่ยวอย่างชัดเจน



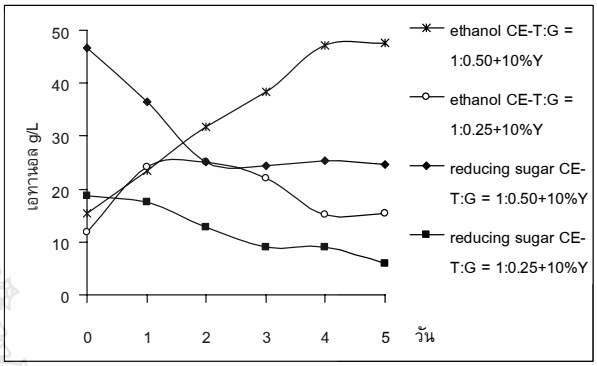
รูปที่ 2 โปรไฟล์น้ำตาลรีดิวซ์และการเติบโตของจุลินทรีย์จากการหมักเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว (CE-T) ที่อัตราส่วน 1.025 และ 1:0.50



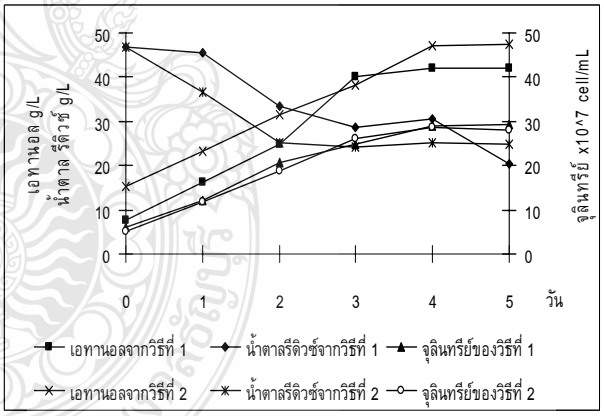
รูปที่ 3 โปรไฟล์น้ำตาลรีดิวซ์และการเติบโตของจุลินทรีย์จากการหมักเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสม (CE-TY) ที่อัตราส่วน 1.025 และ 1:0.50

3.2 ผลการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาจากเปลือกสับปะรดด้วย 10%v หัวเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2 ผสมกับครูดเอนไซม์ผงแห้งเชื้อเดี่ยว

โปรไฟล์เอทานอลและน้ำตาลรีดิวซ์ของการหมักแบบรวมปฏิกิริยาด้วย10%v หัวเชื้อยีสต์ผสมกับครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว ดังรูปที่ 4 พบว่าเอทานอลที่ได้จากการใช้อัตราส่วนของครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวต่อน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวเท่ากับ 1:0.50 มีค่าสูงสุดประมาณ 47 g/L ระยะเวลาหมักเท่ากับ 4 วัน ขณะที่อัตราส่วนเท่ากับ 1:0.25 เอทานอลที่ได้มีค่าสูงสุดประมาณ 25 g/L ระยะเวลาหมักเท่ากับ 2 วัน เนื่องจากที่อัตราส่วนนี้ ทั้งราและยีสต์เติบโตอย่างเอ็กซ์โพเนนเชียลในช่วง 2 วันแรกและมีความชันมากกว่าที่อัตราส่วน 1:0.50 และลดลงที่ระยะเวลาหมัก 3 วัน อาจเป็นเพราะสารอาหารไม่เพียงพอ และเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จึงทำให้เอทานอลลดลง นั่นคือเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบรวมปฏิกิริยาด้วย 10%v หัวเชื้อยีสต์ผสมกับครูดเอนไซม์ที่อัตราส่วน 1:0.50 มีค่ามากกว่าการใช้เฉพาะครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวที่อัตราส่วน 1:0.25 อยู่ประมาณ 46.8%



รูปที่ 4 โปรไฟล์เอทานอลและน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักเปลือกสับปะรดด้วย10%v หัวเชื้อยีสต์ผสมกับครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวที่อัตราส่วน 1:0.25 และ 1:0.50



รูปที่ 5 โปรไฟล์เอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และจุลินทรีย์ของวิธีที่ 1 การหมัก เอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสมที่อัตราส่วน 1:0.50 และวิธีที่ 2 การหมักแบบรวมปฏิกิริยาโดยใช้ 10%v หัวเชื้อยีสต์ผสมกับครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยวที่อัตราส่วน 1:0.50

เปรียบเทียบเอทานอลที่ได้จากการหมัก 2 วิธี คือวิธีที่ 1 การหมักเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสมและวิธีที่ 2 การหมักแบบรวมปฏิกิริยาด้วย 10%v หัวเชื้อยีสต์ผสมกับครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว ดังรูปที่ 5 พบว่าเอทานอลที่ได้จากการหมักวิธีที่ 2 มีค่าประมาณ 47 g/L ซึ่งมากกว่าวิธีที่ 1 ประมาณ 11% ใช้เวลาหมัก

เท่ากับ 4 วัน รวมกับเวลาที่ใช้เตรียมหัวเชื้อยีสต์อีก 1 วัน รวมเป็น 5 วัน อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่า ความเข้มข้นของเอทานอลของวิธีที่ 1 มีค่าประมาณ 42 g/L แต่ใช้เวลาหมักเท่ากับ 4 วัน ซึ่งน้อยกว่าวิธีที่ 2 อยู่ 1 วัน และวิธีที่ 1 เป็นวิธีการหมักที่สะดวกเพราะไม่ต้องเสียเวลาเตรียมหัวเชื้อยีสต์ ดังนั้นวิธีที่ 1 จึงเหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสมที่อัตราส่วน 1:0.50 ใช้ระยะเวลาหมัก 4 วัน

เอทานอลที่ได้จากการหมักเส้นใยข้าวโพดที่ไม่ได้ปรับสภาพ ปรับสภาพด้วยไอน้ำ และด่างอ่อนด้วยเอนไซม์ทางการค้า Spezyme-CP, white rot หรือราขาวเน่า (*P. chrysosporium*, ATCC 24725) brown-rot หรือราน้ำตาลเน่า (*G. trabeum*, ATCC 11349) และ soft-rot หรือราเขียว (*T. reesei*, ATCC 13631) ของงานวิจัยที่ผ่านมาใช้เวลาหมักนาน 6 วัน [16] พบว่าการผลิตเอทานอลโดยปรับสภาพเส้นใยข้าวโพดด้วยด่างอ่อนให้ผลดีกว่าไม่ปรับสภาพ เอทานอลที่ได้จากการหมักแบบรวมปฏิกิริยาเส้นใยข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยด่างอ่อนด้วยเอนไซม์การค้า Spezyme-CP มีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.7 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมเส้นใยข้าวโพด สำหรับเอทานอลที่ได้จากการใช้ *T. reesei*, ATCC 13631, *G. trabeum*, ATCC 11349 และ *P. chrysosporium*, ATCC 24725 ย่อยสลายและหมักเส้นใยข้าวโพดเท่ากับ 5.5, 2.9 และ 2.6 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมเส้นใยข้าวโพด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอลที่ได้จากงานวิจัยนี้ พบว่า เอทานอลที่ได้จากครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสมมีค่าเท่ากับ 50 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมเปลือกสับปะรดโดยใช้เปลือกสับปะรดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และเวลาหมักนาน 4 วัน

งานวิจัยที่ผ่านมาเรื่องปัจจัยของความเข้มข้นเซลลูเลสต่อการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* ในการหมักแบบรวมปฏิกิริยาจากคริสตัลไลน์เซลลูโลส Sigmacell 50 (SIGMA) ด้วยเอนไซม์ทางการค้า Cellulast 1.5 L, FG (Novozymes A/S) ซึ่งผลิตมาจาก *T. reesei* [17] พบว่า เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 43.5 g/L เมื่อใช้เอนไซม์ 15 FPU/g substrate ที่ความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 15%w/v และที่สับสเตรท 10%w/v เอทานอลมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ ที่ระยะเวลาหมัก 3 วัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอทานอลที่ได้จากเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ชนิดผงแห้งจากเชื้อผสมของงานวิจัยนี้

4. สรุป

เอนไซม์ผงเชื้อผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2 เหมาะสำหรับนำมาใช้หมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดได้ในขั้นตอนเดียว สภาวะของการหมัก คือเปลือกสับปะรด 8 กรัมต่อเอนไซม์ชนิดผงแห้งจากเชื้อผสม 6 กรัมในอาหารเหลวพีเอช 5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 3 กรัม ใช้เวลาหมักนาน 4 วัน เอทานอลที่ได้ประมาณ 42 กรัมต่อลิตร

ข้อดีของการใช้เอนไซม์ผงเชื้อผสมสำหรับการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดคือ

1. ใช้สะดวก วิธีเตรียมง่าย เพียงผสมลงเอนไซม์ชนิดนี้ลงในอาหารเหลวปริมาณตามต้องการก่อนนำไปใช้

2. ไม่ต้องปรับสภาพเปลือกสับปะรดก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ จึงไม่ต้องใช้สารเคมี น้ำล้าง พลังงาน และไม่มีน้ำเสียทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

3. การใช้ครูดเอนไซม์ชนิดนี้หมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดในขั้นตอนเดียว ใช้เวลาหมัก 4 วัน เวลาที่ใช้หมักน้อยกว่าการหมักแบบรวมปฏิกิริยาซึ่งต้องใช้เวลาหมัก 4 วัน รวมเวลาหมักหัวเชื้อยีสต์ 1 วัน เวลาที่ใช้ทั้งหมดเป็น 5 วัน นั่นคือการใช้เอนไซม์ชนิดนี้ทำให้ลดเวลาลงได้ 1 วัน

สัญลักษณ์และคำย่อ	ความหมาย
PAW	เปลือกสับปะรด
T	เชื้อเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1
TY	เชื้อผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 กับแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2
CE	ครูดเอนไซม์ (crude enzyme)
CE-T	ครูดเอนไซม์ผงเชื้อเดี่ยว
CTY	ครูดเอนไซม์ผงเชื้อผสม
Trichoderma reesei RT-P1	เชื้อราไตรโครเดอร์มา รีสิอี RT-P1
Saccharomyces cerevisiae RT-P2	เชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี RT-P2
G	น้ำตาลมะพร้าว
°C	องศาเซลเซียส
%w	ร้อยละโดยน้ำหนัก
%v	ร้อยละโดยปริมาตร
%w/v	ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร
mL	มิลลิลิตร
L	ลิตร
g/L	กรัมต่อลิตร
g	กรัม
FPU	Filter paper unit
การหมักแบบรวมปฏิกิริยา	Simultaneous saccharification and fermentation

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรีที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2552 สำหรับงานวิจัยนี้ได้ประสบผลสำเร็จลุล่วงด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

[1] กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. กระทรวงพลังงาน. พลังงานทดแทน Update. แก๊สโซฮอล์. http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=807.

[2] Bothast ,R.J., Schlicher, M,A., 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 67, 19-25.

[3] Farid Talebnia, Dimitar Karakashev and Irini Angelidaki. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: A overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**. 101 (2010) 4744–4753.

[4] Moiser N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 2005; 96:673-86.

[5] Jian Shi, Ratna R. Sharma-Shivappa, Mari Chinn and Noura Howell. 2009. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**. 33 (2009) 88–96.

[6] พรพรรณ พาณิชย์นำสิน และชินพงศ์ วังใน. ผลของกรดโพรพิออนิกต่อการย่อยสลายในกระบวนการเกิดก๊าซชีวภาพของถังหมักเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลาง. สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ. http://www.kmutt.ac.th/rippc/pron27.htm

[7] ไพบูลย์ ใจเด็ด. สมชาย จันทร์ผ่องแสง และวิชัย ศุภลักษณ์. 2545. การปรับปรุงคุณภาพเปลือกสับปะรดำหรับโคนม. **โคนม**. ต.ค. 2544-มี.ค. 2545. 19(1) หน้า 12-16.

[8] http://www.kasikornresearch.com/TH/K-Econ%20Analysis/Pages/ViewSummary.asp...

[9] Omojasola, P. Folakemi, Jilani, Omowumi Priscilla and Ibiyemi, S. A. 2008. Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. **Nature and Science**. 6(2), 64-79.

[10] นุสรา สาระมาศ. เจษฎา ทองศิริ. ธาดาพันธ์ ยอดนุ่ม และ ผ่องศรี ศิวราศักดิ์. 2553. การผลิตเซลลูเลสชนิดผงแห้งจากการหมักแข็งกากมันสำปะหลังโดยใช้ไตรโคเดอร์มา ริสิอี RT-P1. การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 20. 22-23 พฤศจิกายน 2553. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร.

[11] ประดับรัฐ ประจันเขตต์. ผ่องศรี ศรีวราศักดิ์. จุไรรัตน์ ดวงเดือน. และ ณัฐวรรณ คุปตพิทยานันท์. 2553. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อผสมระหว่าง *Trichoderma reesei* RT-P1 และ *Saccharomyces cerevisiae* RT-P2 เพื่อการผลิตเอทานอล. การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 20. 22-23 พฤศจิกายน 2553. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร.

[12] Pongsri Siwarasak. and Pradabrat Prajanket. 2010. Cellulase Production from Pineapple Peel in Submerge-State Fermentation by Using *Trichoderma reesei* RT-P2 and Co-Culture of *Trichoderma reesie* RT-P1 and *Saccharomyces cerevisiae* RT-P2. **RSCE 2010.** November 22-23, 2010. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok. Thailand.

[13] Pongsri Siwarasak. Nuttawan Kuppithayanant. Churairat Duangduen and Pradabrat Prajanket. 2010.. Two Strains Co-culture of *Trichoderma reesei* RT-P1 and *Saccharomyces cerevisiae* RT-P2 and Its Production of Ethanol from Pineapple Peel Waste. The 2nd Rajamangala University of Technology International Conference. 24-26, November, 2010. Chulabhorn Research Institute. Bangkok. Thailand.

[14] Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid and reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem**. 31: 426-427.

[15] Willium, M.B. and Reese, D. 1950. **Analytical Chemistry**. 22:1556. doi: 10.1021/ac60048a025.

[16] Prachand Shrestha, Samir Kumar, Anthony L. Pometto III, and J. (Hans) van Leeuwen. 2010. Ethanol production via in situ fungal saccharification and fermentatoin of mild alkali and steam pretreated corn fiber. **Bioresource Technology**. 101 (2010) 8698-8705.

[17] E. Tomas-Pejo, M. Garcio-Aparicio, M.J. Negro, J.M. Oliva, and M. Ballesteros. 2009. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF process. **Bioresource Technology**. 100 (2009) 890-895.

Go Back