การหมักเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวานด้วยไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ที่ผลิตได้จากการหมักแข็ง

Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Fresh Stalk with *Trichoderma reesei* RT-P1 Produced from Solid-State Fermentation

เบญจมาศ สุกใส[1*], อุมาภรณ์ กิจสนิท[1] และ ผ่องศรี ศิวราศักดิ์[1]
[1]ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
เลขที่ 39 หมู่ 1 คลอง 6 ธัญบุรี ปทุมธานี 12110
โทรศัพท์: +66(2)-549-309 โทรสาร: +66(2)-549-4600 อีเมล์: pongsri@gmail.com

บทคัดย่อ

การหมักเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวานโดยใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแข็ง มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอลจากการหมักข้าวฟ่างหวาน 2 สายพันธุ์ คือ เคลเลอร์และคลาวลี่ กำหนดปัจจัยควบคุม 3 พารามิเตอร์ แบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ ระยะเวลาที่ใช้หมัก 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน ความเข้มข้นของเชื้อราเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 % น้ำหนักแห้ง และลำต้นสดข้าวฟ่างหวานเท่ากับ 10, 15, 20, 25 และ 30 % น้ำหนักเปียก การหมักเอทานอลทำในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตรกับอาหารเหลว pH 5 ปริมาตรคงที่ 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (32°C) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เมื่อใช้ข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์เคลเลอร์และคลาวลี่ คือความเข้มข้นของเชื้อรา 4% และ 5% น้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน 25% และ 30% น้ำหนักเปียก และระยะเวลาที่ใช้หมักเท่ากันคือ 9 วัน ตามลำดับ จากการทดลองหมักเอทานอลที่สภาวะเหมาะสม พบว่า เอทานอลที่ได้จากลำต้นสดข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์คลาวลี่และเคลเลอร์เท่ากับ 240 ลิตร และ 220 ลิตร ต่อ 1 ตันลำต้นสด ใช้ระยะเวลาหมัก 8 วัน

คำสำคัญ: เอทานอล, ลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน, ไตรโคเดอร์มา ริสิอี RT-P1

1. บทนำ

ปัจจุบันเราให้ความสำคัญกับพืชพลังงานที่นำไปเป็นวัตถุดิบที่ผลิตเป็นเอทานอลโดยเราจะเน้นไปที่อ้อยในรูปกากน้ำตาลที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาล และมันสำปะหลังซึ่งทำให้เกิดการขาดแคลน ดังนั้นเราจึงได้คิดค้นพืชพลังงานมาทดแทน พืชชนิดใหม่คือข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้เสริมกากน้ำตาล และพบว่าข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพอีกชนิดหนึ่งเพราะมีต้นทุนการผลิตเอทานอลต่ำรองจากมันสำปะหลัง [1] ถ้าสามารถผลิตในเชิงพาณิชย์ก็จะเป็นพืชไร่ที่เป็นทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลของประเทศไทยได้

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการใช้ไตรโคเดอร์มา ริสิอี RT-P1 ชนิดผงแห้ง สำหรับผลิตเป็นเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน เนื่องจากส่วนใหญ่งานวิจัยอื่นๆจะใช้น้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน (สับสเตรท) ในการผลิตเอทานอล [2] โดยการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์ที่ความหวานเริ่มต้น 18 บริกซ์ ใช้ปริมาณหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RT-P2 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YM อัตราร้อยละ 5 (v/v) พีเอชเท่ากับ 5 พบว่าน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์ให้อัตราการผลิตเอทานอล ความเข้มข้นของเอทานอล ระยะเวลาในการหมัก มากกว่าน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เคลเลอร์ และหัวเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้น้ำข้าวฟ่างหวานที่เข้มขันร้อยละ 5 (v/v) ได้ผลมากกว่าที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YM งานวิจัยนี้ใช้

ลำต้นสดข้าวฟ่างหวานแทนการใช้น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานเพื่อเป็นการลดพลังงานและลดขั้นตอนการผลิต โดยไม่ต้องนำข้าวฟ่างหวานมาหีบให้เป็นน้ำคั้น และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าข้าวฟ่างหวานให้เกิดประโยชน์มากที่สุด โดยใช้ไตรโคเดอร์มา ริสิอี RT-P1 ชนิดผงแห้ง เป็นเอนไซม์มาย่อยลำต้นสดข้าวฟ่างหวานให้เป็นเอทานอล โดยในการหมักใช้อาหารเหลวสูตรเดียวกับการหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* RT-P2 กับ *Trichoderma reesei* RT-P1 ชนิดผงแห้งจากเปลือกสับปะรด [3] โดยวิธีการทดลองออร์โธโกนอลด้วยยีสต์ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อทำการหมักโดยใช้ *T.reesei* RT-P1 ชนิดผงแห้ง 4 เปอร์เซ็นต์ เปลือกสับปะรด 8 กรัม ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้เวลาการหมัก 2 วัน ที่พีเอชเท่ากับ 5 ณ อุณหภูมิห้องพบว่า เอทานอลที่ได้ประมาณ 30 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ในการผลิตเอทานอล

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง

ไตรโคเดอร์มา ริสิอี RT-P1 จากจานอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (potato dextrose agar) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ได้จากเพาะเลี้ยงจากห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมีในงานวิจัยนี้

2.2 วัตถุดิบและสูตรอาหารเหลวTN-2 [2] สำหรับการหมักเอทานอล

ข้าวฟ่างหวานหั่นละเอียด ขนาด 5 มิลลิเมตร

อาหารเหลว (LM-pH5) 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), และน้ำสะอาด 1 L ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5

2.3 หาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน

การหมักเหลวเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน โดยใช้ไตรโคเดอร์มา รีสีอี RT-P1 ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแข็ง ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอลจากข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์เคลเลอร์และสายพันธุ์คลาวลี่โดยกำหนดปัจจัยควบคุม 3 พารามิเตอร์ แบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ ระยะเวลาที่ใช้หมัก 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน ความเข้มข้นของเชื้อราเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 % โดยน้ำหนักแห้งและลำต้นสดข้าวฟ่างหวานเท่ากับ 10, 15, 20, 25 และ 30 % โดยน้ำหนักเปียก การหมักเหลวเอทานอลทำในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตรกับอาหารเหลว pH 5 ปริมาตรคงที่ 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (32°C) เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ตามระยะเวลาที่ใช้หมัก

2.4 วิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้นของจุลินทรีย์จากการวัดเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยใช้เฮมาไซโตมิเตอร์ (Boeco, Germany) ใช้วิธีการของ Ghose [4] ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส [5] และเอทานอลด้วยวิธีดีเอ็นเอส [5] โดยวัดค่าการดูดกลืนจากเครื่อง UV-visible spectrophotomete ที่ความยาวคลื่น 570 nm และ 600 nm ตามลำดับ

3. การอภิปรายและวิเคราะห์ผลงานวิจัย

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสม

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเหลวเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์เคลเลอร์และสายพันธุ์คลาวลี่ ด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสีอี RT-P1 โดยใช้วิธีออร์โธโกนอล ดังตารางที่ 1 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของข้าวฟ่างหวานทั้งสองสายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์เคลเลอร์ใช้ปริมาณเชื้อรา 4 % โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน 25 % โดยน้ำหนักเปียก ส่วนสายพันธุ์คลาวลี่จะใช้ปริมาณเชื้อรา 5 % โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน 30 % โดยน้ำหนักเปียก โดยใช้เวลาทั้งสิ้น 9 วันเท่ากัน โดยนำสภาวะที่ได้มาทำการศึกษาตามวิธีออร์โธโกนอล ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะต่าง ๆตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ปัจจัย	ระดับ				
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
ลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน (กรัม)	10	15	20	25	30
ปริมาณเชื้อรา (กรัม)	1	2	3	4	5
จำนวนวันที่ใช้หมัก (วัน)	1	3	5	7	9

จากนั้นนำสภาวะที่ได้นี้ไปทำการศึกษา ตามวิธีของออร์โธโกนอล แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเชื้อราในแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษาจะได้ผลดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์เคลเลอร์

ปัจจัย	ระดับ				
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
ลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน (กรัม)	18.4	16.2	13.0	20.3	19.1
ปริมาณเชื้อรา (กรัม)	12.2	12.2	14.3	25.3	23.1
จำนวนวันที่ใช้หมัก (วัน)	11.1	15.2	18.6	20.0	22.2

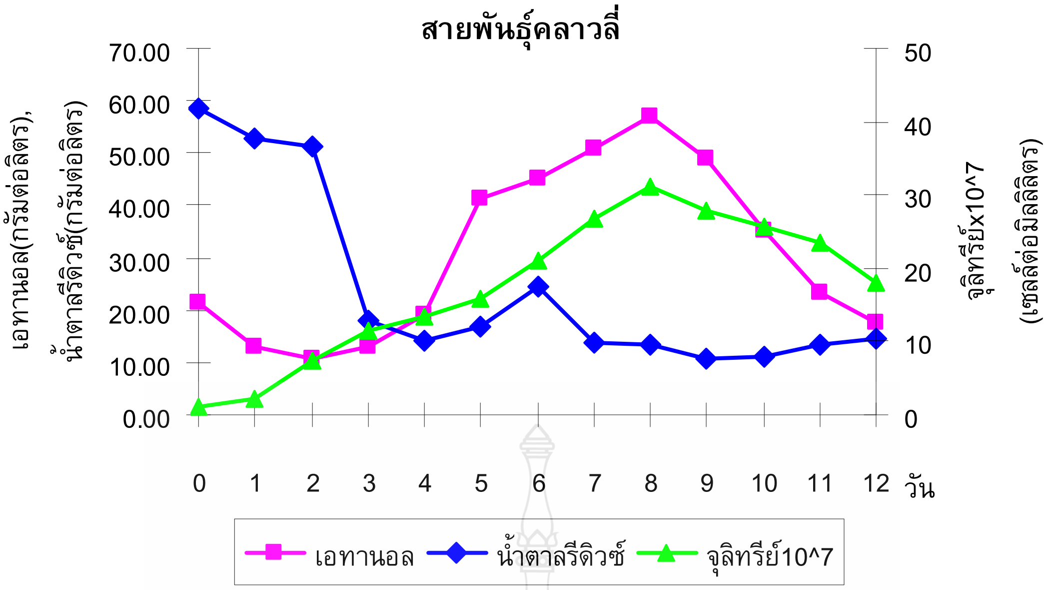
ตารางที่ 3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์คลาวลี่

ปัจจัย	ระดับ				
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
ลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน (กรัม)	16.8	17.2	17.5	18.3	22.0
ปริมาณเชื้อรา (กรัม)	13.4	13.0	17.4	22.7	25.5
จำนวนวันที่ใช้หมัก (วัน)	11.1	16.2	19.7	21.9	24.0

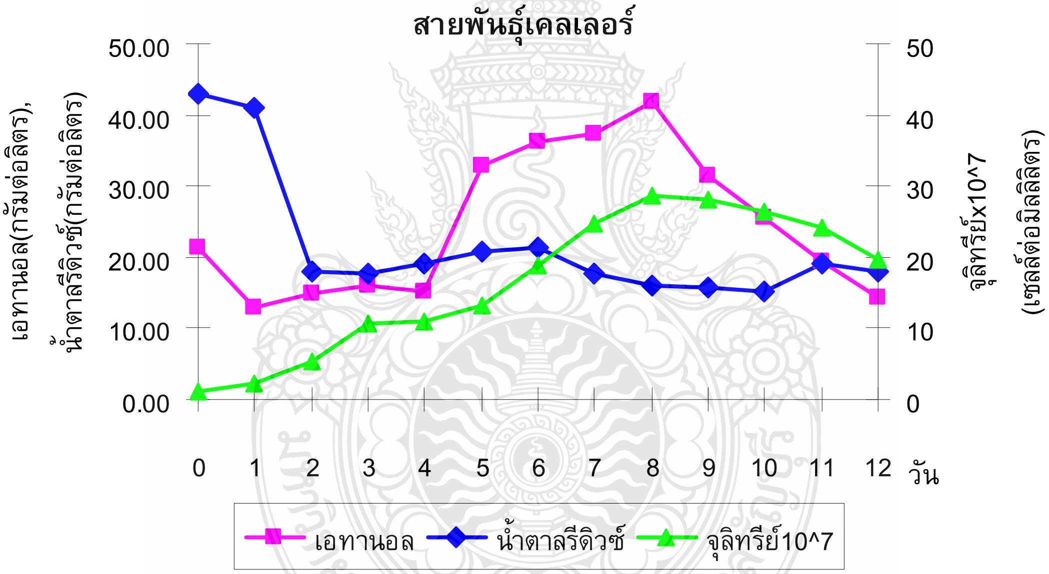
เมื่อได้ผลการทดลองดังตารางเราจะทำการเลือกค่าเฉลี่ยที่มีค่ามากที่สุดเป็นสภาวะที่เหมาะสม เพราะเป็นค่าที่เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเพื่อนำสภาวะที่ได้ไปหาปริมาณเอทานอล โดยสายพันธุ์เคลเลอร์ได้สภาวะเหมาะสมที่ปริมาณเชื้อรา 4 % โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน 25 % โดยน้ำหนักเปียก ใช้เวลา 9 วัน ส่วนสายพันธุ์คลาวลี่ได้สภาวะเหมาะสมที่ปริมาณเชื้อรา 5 % โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน 30 % โดยน้ำหนักเปียก ใช้เวลา 9 วัน และนำสภาวะที่ได้ไปทำการทดลองต่อโดยทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อราทุก ๆวัน เนื่องจากเวลาที่ใช้หมัก 9 วันเป็นเวลาที่มากที่สุดจึงทำการขยายเวลาที่ใช้หมักเป็น 12 วัน

3.2 การหาเอทานอลที่สภาวะที่เหมาะสม

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเหลวเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์เคลเลอร์และสายพันธุ์คลาวลี่ ด้วยไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 พบว่าสายพันธุ์เคลเลอร์ ได้ปริมาณเอทานอล 41.82 กรัมต่อลิตร และสายพันธุ์คลาวลี่ได้ปริมาณเอทานอล 56.82 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



รูปที่ 1 ปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และจุลินทรีย์ของข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์คลาวลี่



รูปที่ 2 ปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และจุลินทรีย์ของข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์เคลเลอร์

จากรูปที่ 1 และ 2 พบว่า ปริมาณเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ จนกระทั่งถึงเวลาที่ใช้หมักที่สภาวะเหมาะแล้วจึงมีค่าลดลง มีผลมาจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จะเห็นว่าจุลินทรีย์มีค่าเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงเวลาที่ใช้หมักที่สภาวะเหมาะสมแล้วจึงมีค่าลดลงเช่นกัน เนื่องจากปริมาณสารอาหารในอาหารเหลวเหลือ แสดงว่าการเจริญเติบโตของจุลิทรีย์มีผลต่อการหมักเอทานอล แต่ปริมาณเอทานอลจะลดลงเร็วกว่าจุลินทรีย์เนื่องจากเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วเอทานอลจะมีปริมาณสูงสุดทำให้เอทานอลเกิดการระเหยออกไปมากในวันที่ 9 จึงทำให้ลดลงอย่างมาก และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าปริมาณเอทานอลพบว่าลำต้นสดข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์คลาวลี่ 1 ตันลำต้นสด ได้ปริมาณเอทานอล 240 ลิตร ส่วนลำต้นสดข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์เคลเลอร์ 1 ตันลำต้นสด ได้ปริมาณเอทานอล 220 ลิตร ซึ่งคำนวณมาจาก 99% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาฟาเรนไฮต์ มีความถ่วงจำเพาะ 0.79 [6] และพบว่าเอทานอลที่ได้จากสายพันธุ์คลาวลี่มีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์เคลเลอร์ เนื่องจากสายพันธุ์คลาวลี่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมากกว่าสายพันธุ์เคลเลอร์คิดเป็นร้อยละ 2.4 จึงทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่มากกว่าคิดเป็นร้อยละ 2.21 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเปลือกสับปะรดที่มี

4. บทสรุป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์เคลเลอร์และสายพันธุ์คลาวลี่ ด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล ได้สภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์เคลเลอร์ที่ปริมาณเชื้อรา 4 % โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน 25 % โดยน้ำหนักเปียก ส่วนสายพันธุ์คลาวลี่ได้สภาวะเหมาะสมที่ปริมาณเชื้อรา 5 % โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน 30 % โดยน้ำหนักเปียก โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 8 วันเท่ากัน จะได้ปริมาณเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์คลาวลี่และเคลเลอร์เท่ากับ 240 ลิตร และ 220 ลิตร ต่อ 1 ตันลำต้นสด ตามลำดับ ดังนั้น เราจึงควรส่งเสริมการปลูกข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์คลาวลี่ เนื่องจากลำต้นสดมีปริมาณน้ำตาลสูง จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ผลิตเอทานอลมากกว่าสายพันธุ์เคลเลอร์

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงงานเรื่องการหมักเอทานอลจากลำต้นสดข้าวฟ่างหวานด้วยไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ที่ผลิตได้จากการหมักแข็ง สามารถประสบความสำเร็จรุ่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากการอนุเคราะห์จากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคำแนะนำในทุกเรื่องที่เกี่ยวข้องกับโครงงานเป็นอย่างยิ่ง

สถาบันวิจัยพืชไร่ จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ได้รับการอนุเคราะห์ลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน และให้ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับลำต้นสดข้าวฟ่างหวาน

ทั้งนี้ขอขอบคุณบุคคลและหน่วยงานดังกล่าวข้างต้นเป็นอย่างสูง รวมทั้งขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการทำโครงงานที่ผ่านไปด้วยดีและหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ

6. เอกสารอ้างอิง

[1] ประสิทธิ์ ใจศิล และคณะ. การวิจัยและพัฒนาข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลในเชิงพานิชย์. รายงานวิจัย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะเกษตรศาสตร์.

[2] ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ และ กนกทิพย์ เลิศประเสริฐรัตน์. 2553. จลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์และเคลเคลอร์ด้วยวิธีการหมักแบบกะ. วารสารวิจัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

[3] นิรันดร์ เจริญศรี และ ต้อม แม้นรัมย์. 2553. การศึกษากระบวนการผลิตยีสต์ตรึงรูปสำหรับการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยากับไตรโคเดอร์มา รีสิอี ชนิดผงแห้งจากเปลือกสับปะรด. ปริญญานิพนธ์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

[4] Ghose, T.K., Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem*. 1987, 59: 257-268.

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

[6] ความถ่วงจำเพาะของเอทานอล [Online]. Available: http://water-pacific.com/index.php/2010-08-18-16-37-43