

การปรับสภาพฟางข้าวเพื่อผลิตไบโอเอทานอลโดยเชื้อ *Kluyveromyces marxianus*
PRETREATMENT OF RICE STRAW INTO BIOETHANOL BY *Kluyveromyces marxianus*.

กุสุมาวดี ฐานเจริญ

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม 44000

Kusumawadee Thancharoen

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat MahaSarakhm University, 44000

Kthancharoen@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* มีวัตถุประสงค์คือ 1) เพื่อศึกษาผลของการปรับสภาพของฟางข้าว โดยใช้กรด /ด่าง ร่วมกับ เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (*Aspergillus niger*) 2) เพื่อศึกษาการทนต่อความเข้มข้นเอทานอล และความทนต่ออุณหภูมิสูงของเชื้อ *K.marxianus* 3) เพื่อศึกษาความสามารถของ *K.marxianus* ในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ไฮโดรไลเสทฟางข้าวเป็นสับสเตรท จากผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า 500 ไมโครลิตร สภาวะการย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 21.53 และ 69.59 กรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิที่ 30, 35, 40, 45, 50 และ 55°C และผลการทนต่อเอทานอลที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15% (v/v) แสดงให้เห็นว่า *K. marxianus* สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40°C และทนต่อความเข้มข้นของเอทานอล 10% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกำจัดสารพิษในไฮโดรไลเสทด้วยวิธี Overliming-detoxified และหมักด้วยเชื้อ *K. marxianus* 20% (v/v) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.226 % (v/v).

คำสำคัญ: ฟางข้าว *Kluyveromyces marxianus* เอทานอล ไฮโดรไลเสท

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of rice straw as a substrate for ethanol production using *Kluyveromyces marxianus* purpose were: 1) To study pretreatment method of rice straw using acid / base with commercial cellulase enzymes (*Aspergillus niger*), 2) To study the resistance to ethanol concentration and high temperature of *K.marxianus* 3) To study the ability of *K.marxianus* in ethanol fermentation process using rice straw hydrolysate as substrate. The results showed that pretreatment with sulfuric acid 1% (v/v) with the commercial enzyme cellulose 500 microliter digestion at 37°C for 6 hours release glucose and xylose were 21.53 and 69.59 g/l. The tolerance at temperatures of 30, 35, 40, 45, 50 and 55°C and high ethanol concentrations of 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 and 15% (v/v) present *K. marxianus* can tolerance temperatures up to 40°C and ethanol concentration 10% (v/v) at a temperature of 30°C for 48 hours. Removal of toxic compounds by overliming-detoxified and inoculating of *K. marxianus* 20% (v/v) in hydrolysate under conditions temperature at 30°C, shaking speed of 150 rpm rate for 120 hours gave highest ethanol was 0.226% (v/v) for 24 hours.

Keywords: Rice Straw, *Kluyveromyces marxianus*, Ethanol, Hydrolysate

บทนำ

จากปัญหาวิกฤตพลังงานที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน พลังงานทางเลือกจึงเป็นทางออกที่น่าสนใจโดยเชื้อเพลิงทางเลือกเหลวซึ่งเป็นที่นิยมในขณะนี้ ได้แก่ ไบโเอทานอล ซึ่งใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนในเครื่องยนต์เบนซิน โดยใช้ในรูปแบบของแก๊สโซฮอล์ ซึ่งแก๊สโซฮอล์เกิดจากการผสมน้ำมันเบนซิน 91 กับไบโเอทานอล เอทานอลที่ใช้กันโดยทั่วไปมี 2 ประเภทคือ เอทานอลสังเคราะห์ (synthetic ethanol) ซึ่งได้จากการกระบวนการผลิตทางเคมี หรือเอทานอลชีวภาพซึ่งได้จากการใช้จุลินทรีย์จำพวกยีสต์หมักกับวัตถุดิบจาก

การเกษตรเช่น วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง และเส้นใยที่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร (ชานอ้อย ฟางข้าว ชังข้าวโพด) ข้อดีของการใช้ไบโเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนมีหลายประการเช่น ช่วยลดมลพิษในสิ่งแวดล้อมจากการใช้สาร MTBE เพื่อเพิ่มค่าออกเทนเนื่องจากสาร MTBE มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมสูงทำให้เกิดมลพิษทางอากาศและปนเปื้อนในน้ำใต้ดิน ช่วยให้เครื่องยนต์มีการเผาไหม้ดีขึ้นทำให้ไอเสียจากการใช้แก๊สโซฮอล์มีปริมาณแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ลดลงร้อยละ 20 และปริมาณไฮโดรคาร์บอนลดลงร้อยละ 10 เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันเบนซิน ซึ่งจะส่งผลให้

ลดค่าใช้จ่ายในการแก้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม และสุขภาพของประชาชน ลดปริมาณการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงและสาร MTBE จากต่างประเทศได้ประมาณ 3,000 ล้านบาทต่อปี มีผลทำให้ลดการขาดดุลทางการค้า ช่วยยกระดับราคาผลผลิตทางการเกษตรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ทำให้เกิดการลงทุนในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมต่อเนื่องหลายสาขา นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความมั่นคงและมีเสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศไทย (อรพิมพ์ มงคลเคหา. 2549) การผลิตเอทานอล ทั่วโลกในปัจจุบันนี้ใช้วัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีราคาสูงทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลมีราคาสูงตามไปด้วย ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากแหล่งพลังงานทางเลือก (Alternative energy sources) แหล่งใหม่เช่น ชานอ้อย เศษไม้ ชังข้าวโพด พางข้าว เป็นสิ่งที่น่าสนใจเพราะวัสดุเหล่านี้เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและมีราคาถูก ซึ่งวัสดุเหล่านี้เรียกว่า Lignocellulosic material (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส 39%, เฮมิเซลลูโลส 27% และลิกนิน (Kaur *et al.* 1998) ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลหลัก 5 ชนิด คือ น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ กลูโคส, แมนโนส และกาแลกโตส และน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ ไซโลส และอะราบิโนส โดยพบว่าน้ำตาลแมนโนส, กาแลกโตส และอะราบิโนสจะพบเป็น

องค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสในรูปของสารประกอบกลูโคแมนแนน, อะราบิโนไซแลน และกลูคูโรโนไซแลน ซึ่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลที่สามารถนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์แล้วให้ผลผลิตเป็นเอทานอล และหลังการย่อยสลายแล้วจะให้น้ำตาลกลูโคสประมาณ 30% และมีน้ำตาลไซโลสประมาณ 17% ของน้ำหนักแห้ง (Thomas and Yong-su. 2000) จุลินทรีย์ที่มีการหมักน้ำตาลไซโลสให้เป็นเอทานอลในปัจจุบันพบว่า มีทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ในบรรดาจุลินทรีย์ทั้งหมดยีสต์จัดได้ว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมมากที่สุดในการผลิตเอทานอล เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้สับสเตรทได้หลากหลาย และมีอัตราในการผลิตเอทานอลได้สูง รวมทั้งในบางสายพันธุ์พบว่า มีความทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงและทนอุณหภูมิสูงในระหว่างกระบวนการหมักได้ดี ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida shehatae*, *C. boidinii*, *Kluyveromyces marxianus* และ *Pichia stipites* การลดต้นทุนของการผลิตเอทานอลนั้นนอกจากจะทำได้โดยการเลือกใช้วัตถุดิบสำหรับการหมักแล้ว ยังอาจเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้โดยการใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะสมมาใช้ในกระบวนการหมัก สำหรับการหมักเอทานอลในประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนอุณหภูมิของถังหมักจะสูงอยู่ตลอดเวลาโดยเฉพาะในฤดูร้อนทำให้ค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการลดอุณหภูมิของถังหมักสูง การคัดเลือกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงได้แก่ *K. marxianus* ซึ่งเป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูง

(Thermotolerant yeast) สามารถโตได้ที่อุณหภูมิสูงมาก ประมาณ 45 - 50 องศาเซลเซียส (Thermotolerant yeast) เนื่องจากความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ทำให้ค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการลดอุณหภูมิของถังหมักลดลง มีผลให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลโดยรวมต่ำลง ซึ่งอาจทำให้เอทานอลสามารถแข่งขันในด้านราคากับน้ำมันจากปิโตรเลียมได้ (Fonseca *et al.* 2008) ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวจึงคาดว่า *K.marxianus* จะเป็นเชื้อยีสต์ที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพในปัจจุบัน โดยเฉพาะการหมักเอทานอลซึ่งเป็นพลังงานทดแทนที่มีความน่าสนใจ โดยมีวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในการศึกษาผลของการปรับสภาพฟางข้าวด้วยวิธีการที่เหมาะสม เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* ที่เวลาที่แตกต่างกัน และศึกษาความทนต่ออุณหภูมิและความทนต่อเอทานอลของเชื้อ *K. marxianus* เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงในขั้นตอนต่อไป

วิธีการ

1. สายพันธุ์ยีสต์ (Yeast strain) เชื้อยีสต์ *K.marxianus* TISTR 5057 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร YM (Yeast-Malt extract agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การเตรียมฟางข้าว (Rice straw preparation) ฟางข้าว (rice straw) นำมาบดจนมีขนาดเท่ากับ 30 - 60 mesh นำฟางข้าวที่บดละเอียดไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เก็บไว้ในสภาวะแห้ง)

3. ปรับสภาพฟางข้าว (Rice straw pretreatment)

3.1 ปรับสภาพฟางข้าวด้วย NaOH ความเข้มข้น 1% (w/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส ฟางข้าวน้ำหนัก 1g ปรับสภาพด้วย NaOH ความเข้มข้น 1% (w/v) อัตราส่วนฟางข้าวต่อปริมาณไฮโดรอกไซด์ เท่ากับ 1:10 จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M ที่ pH 5.0 ปริมาตร 500, 1000, 1500, 2000 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS (Miller. 1959)

3.2 ปรับสภาพฟางข้าวด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส ฟางข้าวน้ำหนัก 1 g ปรับสภาพด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 1% (v/v) อัตราส่วนฟางข้าวต่อปริมาณกรดซัลฟิวริก 1:10 จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M ที่ pH 5.0 ปริมาตร 500, 1000, 1500, 2000 ไมโครลิตร น้ำไปต้มที่อุณหภูมิ 37°C หรือ 55°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS (Miller. 1959)

4. การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ (Yeast inoculum) เชื้อยีสต์ *K.marxianus* ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร YM broth (ประกอบด้วย Yeast extract 4 g, Malt extract 10 g, Glucose 4 g, น้ำกลั่น 1 L) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 150 rpm/min หลังจากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วย haemocytometer ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^7 cell/ml เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

5. การหมักไฮโดรไลเสทฟางข้าว (Rice straw hydrolysate fermentation) ไฮโดรไลเสทที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว ด้วยวิธีที่เหมาะสมนำมาปรับสภาพให้มีค่า pH = 10 ด้วย CaOH และปรับสภาพด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 98% ให้มีค่า pH = 5.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm/min เป็นเวลา 30 นาที แล้วใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารหมักโดยทำการเตรียม fermentation medium (ประกอบด้วย Yeast extract 3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.25 g/L, $CaCl_2$ 0.25 g/L, $MgSO_4$ 0.25 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L) โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและไซโลสเริ่มต้น เท่ากับ 21.53 และ 69.59 กรัม ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (วิธีที่เหมาะสมได้จากการปรับสภาพฟางข้าวในข้อ 3) เติมหิวเชื้อยีสต์ *K.marxianus* ความเข้มข้น 20% (v/v) ที่เตรียมได้จากข้อ 4 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30°C อัตราการให้อากาศ 150 rpm/min เก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ ทุก 24 ชั่วโมง (0, 24, 48, 72, 96 และ 120) และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่ได้ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

วิธีคำนวณ (Yoswathana *et al.* 2010)

Ethanol.Yield

$$= \frac{\text{Measured.Ethanol.in.Sample (g)}}{\text{Theoretical.Ethanol (g)}}$$

Theoretical.Ethanol (g) Theoretical ethanol (g)

$$= \text{Amount of initial sugar content (g) in fermentation solution} \times 0.5$$

6. การศึกษาความทนต่ออุณหภูมิ (Thermotolerant) ทำการทดสอบโดยนำเชื้อยีสต์ *K. marxianus* มาเลี้ยงบนอาหาร YM agar plate โดยวิธีการ Spread plate หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50°C บันทึกผลการเจริญของเชื้อบน YM agar plate โดยตรวจสอบจากการนับเซลล์ที่รอดชีวิตจากการ Spread plate (จำนวนเซลล์เริ่มต้น - จำนวนเซลล์สุดท้าย)

7. การศึกษาความทนต่อความเข้มข้นของเอทานอล (Ethanol tolerant) (Kumar *et al.* 2011) ทำการทดสอบความทนต่อเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *K. marxianus* ในอาหาร YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 150 rpm/min แล้วนำมานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยให้มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 1×10^7 cell/ml จากนั้นนำไปเลี้ยงใน fermentation medium ที่มีการเติมเอทานอลเข้มข้น 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15% (v/v) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร YM agar plate โดย

ตรวจสอบจากการนับเซลล์ที่รอดชีวิตจากการ Spread plate (จำนวนเซลล์เริ่มต้น - จำนวนเซลล์สุดท้าย)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ผลของการปรับสภาพฟางข้าว (Rice straw pretreatment)

จากการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว ด้วยวิธีต่างๆ ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสในไฮโดรไลเสทฟางข้าว

กระบวนการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	
	37°C	55°C	37°C	55°C
NaOH 1%+ Enzyme 500 µl	2.53	4.44	0.64	0.68
NaOH 1%+ Enzyme 1000 µl	2.18	4.23	0.67	0.67
NaOH 1%+ Enzyme 1500 µl	2.14	4.05	0.69	0.70
NaOH 1%+ Enzyme 2000 µl	1.95	3.94	0.91	0.95
H ₂ SO ₄ 1%+ Enzyme 500 µl	69.59	59.06	21.53	16.02
H ₂ SO ₄ 1%+ Enzyme 1000 µl	61.98	57.42	21.40	15.29
H ₂ SO ₄ 1%+ Enzyme 1500 µl	67.19	51.22	20.58	14.76
H ₂ SO ₄ 1%+ Enzyme 2000 µl	58.59	46.72	18.14	18.14

ผลการทดลองพบว่า กระบวนการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุด คือ ปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 500 µl ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 21.53 g/L และปริมาณน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 69.59 g/L เนื่องจากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ดีจึงให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูง การย่อยฟางข้าว

โดยใช้กรดที่มีความเข้มข้นต่ำร่วมกับเอนไซม์จะสามารถเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสเป็นน้ำตาล ทำให้ได้น้ำตาลเป็นจำนวนมาก ได้แก่ กลูโคส, อะราบิโนส และไซโลส ซึ่งไซโลสจะมีปริมาณมากกว่า 90% ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีผลพลอยได้อื่นๆ ได้แก่ กรดอะซีติก, เฟอร์ฟูรอล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (HMF) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์

1. ผลของการศึกษาความทนต่ออุณหภูมิ (Thermotolerant)

จากการศึกษาความทนต่ออุณหภูมิของเชื้อยีสต์ *K.marxianus* บนอาหาร YM agar plate โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 องศาเซลเซียสด้วยวิธีการ Spread plate ได้ผลการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 2 ผลของการศึกษาความทนต่ออุณหภูมิของเชื้อยีสต์ *K.marxianus*

ความทนต่ออุณหภูมิ (°C)	จำนวนเซลล์เริ่มต้น	จำนวนเซลล์สุดท้าย	เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิต
30	270	228	84.44
40	364	316	86.81
50	ไม่มีการเจริญ		

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ในการหมักจะสูงกว่าการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส (สาวิตรี ลิ้มทอง. 2540) ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับกระบวนการทางชีวเคมี รวมทั้งเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องยีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่า เซลล์ยีสต์ในระยะที่มีการเจริญเกิดการตายได้เมื่อนำไปไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50-60 องศาเซลเซียส ในเวลาน้อยกว่า 30 นาที (Rose and Harrison. 1970) นอกจากนี้ในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น มีผลต่อการอยู่รอด และกิจกรรมการทำงานของยีสต์ ยีสต์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

จากตารางที่ 2 ผลการทดลองพบว่า เชื้อยีสต์ *K. marxianus* สามารถเจริญได้ตามปกติที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50°C เมื่อสังเกตการเจริญที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งข้อดีของการทนอุณหภูมิสูงถึง 40°C ในระหว่างการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงคือ ทำให้อัตราการผลิตเอทานอลสูง ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และช่วยลดต้นทุนการผลิต

1. ผลของการศึกษาความทนต่อเอทานอล (Ethanol tolerant)

จากการศึกษาความทนต่อเอทานอลของเชื้อยีสต์ *K.marxianus* ที่ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15% (v/v) ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 3 ผลของการศึกษาความทนต่อเอทานอลของเชื้อยีสต์ *K.marxianus*

ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v)	จำนวนเซลล์เริ่มต้น	จำนวนเซลล์สุดท้าย	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
2.5	270	224	90.37
5	270	220	81.48
7.5	270	202	74.81
10	270	175	64.81
12.5		ไม่มีการเจริญ	
15		ไม่มีการเจริญ	

เอทานอลมีผลต่อการเติบโตของยีสต์ การมีเอทานอลสะสมอยู่ในถังหมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Roehr. 2001) ความเข้มข้นของเอทานอล ร้อยละ 1 - 2 โดยน้ำหนัก ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เกือบหยุดลง Brown et al. (Brown et al. 1981) ได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าผลของการยับยั้งนั้นมีความซับซ้อนมาก ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว (อาจเป็นผลเนื่องมาจากการสังเคราะห์โปรตีน) ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพ

อย่างถาวร (ปฏิพล และคณะ. 2555) นอกจากนี้ยังพบว่า ในระหว่างกระบวนการหมักจะมีเอทานอลบางส่วนสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ยีสต์แตกได้ (lysis) ยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอลได้สูงจึงส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

จากตารางที่ 3 ผลการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *K.marxianus* สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเอทานอล 2.5, 5, 7.5, 10% (v/v) แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเอทานอล 12.5 และ 15% (v/v) เมื่อสังเกตการเจริญที่เวลา 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้น เชื้อยีสต์ *K.marxianus* มีอัตราการเจริญลดลงเนื่องจากเมื่อสภาวะในการเจริญที่มีความเข้มข้นของ

เอทานอลสูงขึ้นจะมีผลต่อเมแทบอลิซึมของ *K. marxianus* ส่งผลให้การเจริญค่อยๆ ลดลง จากผลการศึกษาพบว่า *K. marxianus* มีความสามารถทนต่อเอทานอลเข้มข้นสูงถึง 10% (v/v) ถือได้ว่าเป็นข้อดีเนื่องจากในสถานะของ

การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อเริ่มมีการผลิตเอทานอลสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 10% (v/v) เชื้อก็ยังมีชีวิตรอดต่อไปได้ ทำให้ผลผลิตสูงได้อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของกระบวนการหมัก

1. ผลของความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *K.marxianus* (Bioethanol production by *K.marxianus*)

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *K.marxianus* ใช้กระบวนการหมักเอทานอลโดยกำจัดสารพิษในไฮโดรไลสเสทด้วยวิธี Overliming-detoxified ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้ และผลได้เอทานอล

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (g/L)	ผลได้เอทานอล (g/g)	อัตราการผลิต (g/L.h)
24	2.26	0.1	0.09
48	1.61	0.07	0.03
72	1.16	0.05	0.01
96	1.10	0.05	0.01
120	1.10	0.05	0.009

จากตารางที่ 4 พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้สูงสุดอยู่ที่ชั่วโมง 24 เท่ากับ 2.26 g/L เนื่องจากการปรับสภาพด้วยวิธีนี้จะมีการกำจัดสารพิษซึ่งได้แก่ เพอร์ฟอรอล และ ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟอรอล (ที่จะไปยับยั้งกระบวนการผลิตเอทานอล) จึงทำให้เมแทบอลิซึมของเซลล์สามารถดำเนินไปได้ตามปกติ สำหรับการผลิตเอทานอลได้สูงในช่วงชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากในชั่วโมงที่ 24 ในแง่ของการเจริญในกราฟการเจริญของเซลล์จะอยู่ในช่วง log phase ซึ่งในระยะนี้เซลล์จะมีการผลิตสารที่เป็นเมแทบอลิต์ปฐมภูมิได้ดี ซึ่งรวมทั้งเอทานอลด้วย

สรุป

การใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสปริมาตร 500 μ l เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ฟางข้าว น้ำหนัก 1 กรัมต่อปริมาตรกรด 1 มิลลิลิตร เนื่องจากให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 69.59 g/L และน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 21.53 g/L การศึกษาความทนต่ออุณหภูมิของเชื้อยีสต์ *K. marxianus* พบว่า สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 84.44 และ 86.81% ตามลำดับ แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ

50 องศาเซลเซียส การศึกษาความทนต่อเอทานอลของเชื้อยีสต์ *K. marxianus* พบว่าสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเอทานอล 2.5, 5, 7.5, 10% (v/v) โดยมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 90.37, 81.48, 74.81 และ 64.81% ตามลำดับ แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเอทานอล 12.5 และ 15% (v/v) และการศึกษาการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *K. marxianus* โดยกำจัดสารพิษจากไฮโดรไลสเสท ด้วยวิธี Overliming - detoxified ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุก 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้สูงสุดอยู่ที่ชั่วโมง 24 เท่ากับ 2.26 g/L จากผลการทดลองในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทฟางข้าวที่มีอยู่อย่างแพร่หลายในท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าจากวัสดุต้นทุนต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มผลได้เอทานอลและการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเพื่อลดต้นทุนในการหล่อน้ำเย็นในการหมักระดับถึงหมัก

ข้อเสนอแนะ การหมักเอทานอลควรจะต้องเจือจางปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 15 - 25% (v/v) จะสามารถผลิตเอทานอลได้ 8 - 12% (v/v) ต่อการหมักเอทานอล เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากงานทดลองจะเป็นความเข้มข้นสูงเกินไป อาจเป็นความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมต่อการเป็นสารตั้งต้นที่ยีสต์จะเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledge)

ขอขอบคุณทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2558

เอกสารอ้างอิง (Reference)

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2549). การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า : รายงานบทสรุปผู้บริหาร. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ปฏิพล ชัยเทพ, ไพรัช साใจ และ รัชฎาภรณ์ ปวงก้องตัน. (2555). การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อน. ปรินญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร วิทยาลัย เทคโนโลยีและสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2540). ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรพิมพ์ มงคลเคหา. (2549). พลังงานทดแทน ตอนที่ 1. วารสารก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์. 6(1), 18.
- Brown, S.W., Oliver, S.G., Harrison, D.E.F. and Righelato, R.C. (1981). Ethanol inhibition of yeast

- growth and fermentation : Differences in the magnitude and complexity of the effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 11, 151-155.
- Fonseca G, Heinzle E, Wittmann C, Gombert A. (2008). The yeast *Kluyveromyce marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 79, 339–354.
- Kaur PP, Arneja JS, Singh J. (1998). Enzymatic hydrolysis of rice straw by crude cellulose from *Trichoderma reesei*. **Bioresource Technology**. 16, 267-269.
- Miller, G.C. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**. 31, 426-428.
- Nutawan Yoswathana, Phattayawadee Phuriphat, Pattranit Treyawutthiwat and Mohammad Naghi Eshtiaghi. (2010). Bioethanol Production from Rice Straw. **Energy Research Journal**. 1(1), 26-31.
- Roehr M. (2001). **The Biotechnology of Ethanol : Classical and Future Applications**. Germany: Wiley-Vch Publishing.
- Rose, A.H. and Harrison, J.S. (1970). **Yeast technology**. V.3. London: Academic Press.
- Rose, A.H. and Harrison, J.S. (1971). **Physiology and Biochemistry of Yeast**. London: Academic Press.
- Rose, A.H. and Harrison, J.S. (1993). **Yeast Technology**. London: Academic Press.
- Sathees Kumar R., Shankar T. and Anandapandian K.T.K.. (2011). Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. **International Research Journal of Microbiology**. 2(10), 399 - 405.
- Thomas, W. J., and Yong-su, J. (2000). Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Advance in Applied Microbiology**. 47, 221 - 268.