# การลดต้นทุนการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* MGT1/1

# Cost reduction of glucoamylase in the Ethanol Production Process from Cassava by *Saccharomyces cerevisiae* MGT1/1

**เพชรดา ทองเงิน[1] นันทนา บำรุงเชื้อ[1] ปัณณธร ทวีเทพไทกุล[1] ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์[1] ธนพล ธนากรโยธิน[1] พงศธร ประภักรางกูล[1] Joo Shun Tan[2] และ สุกัญญา พึ่งจะแย้ม[1*]**

**Phetrada Thongngen[1], Nantana Bamrungchue[1], Punnathorn Thaveethaptaikul[1], Rachain Visutthipat[1], Thanaphol Thanagornyothin[1], Pongsathon Phapugrangkul[1], Joo Shun Tan[2] and Sukanya Phuengjayaem[1*]**

[1]ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

[2]มหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์แห่งมาเลเซีย

[1]Biodiversity Research Centre, Research and Development Group for Bio-Industries, Thailand Institute of Scientific and Technological Research

[2]Universiti Sains Malaysia

[*]Email: sukanya.pjy@gmail.com

Received: 27 Apr, 2021
Revised: 03 Aug, 2021
Accepted: 19 Aug, 2021

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวทางการลดต้นทุนกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยลดปริมาณการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในกระบวนการผลิตด้วยการใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* MGT1/1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสซึ่งคัดเลือกได้ในประเทศไทย โดยเป็นเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง ที่สามารถทนอุณหภูมิได้สูงกว่า 35 องศาเซลเซียส ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้มากกว่าร้อยละ 15 และทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลได้อย่างน้อยร้อยละ 30 ด้วยวิธีการหมักและย่อยพร้อมกัน (simultaneous saccharification and fermentation; SSF) พบว่าผลิตเอทานอล ได้สูงถึง 116.39 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 14.75) และเมื่อลดการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในกระบวนการย่อยลงร้อยละ 25 พบว่ายังคงผลิตเอทานอลได้ 115.69 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 14.66) ในชั่วโมงที่ 48 และสูงถึง 120.54 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 15.20) ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสามารถลดต้นทุนการใช้เอนไซม์ลงได้อย่างน้อย 1.18 บาทต่อการผลิตเอทานอล 1 ลิตร จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ายีสต์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติสายพันธุ์ *S. cerevisiae* MGT1/1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลรวมถึงสามารถที่จะนำไปเป็นแนวทางในการลดต้นทุนกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังในอนาคตได้

**คำสำคัญ:** เอทานอล กลูโคอะไมเลส แซคคาโรไมซิส ซิริวิซิอี วิธีการหมักและย่อยพร้อมกัน

**Abstract**

This research aimed to study the cost reduction method of ethanol production from cassavas. This method reduced the amount of glucoamylase enzyme in the production process using *Saccharomyces cerevisiae* MGT1/1 capable of producing selective glucoamylase in Thailand. The yeast produced ethanol from cassavas that could withstand temperatures above 35 °C, ethanol concentration was higher than 15% and sugar concentration was at least 30%. By simultaneous saccharification and fermentation (SSF), it was found that ethanol production was up to 116.39 g/L (14.75%). When the enzyme glucoamylase was reduced by 25%, it was found that ethanol could be produced at 115.69 g/L (14.66%) in 48 hours and up to 120.54 g/L (15.20%) in 72 hours. This can reduce the cost of enzymes used by at least 1.18 baht per 1 liter of ethanol production. This study showed that the naturally selected strain of *S. cerevisiae* MGT1/1 is efficient in ethanol production and can be used as a cost-saving approach for ethanol production process from cassavas in the future.

**Keywords:** Ethanol, Glucoamylase, *Saccharomyces cerevisiae*, simultaneous saccharification and fermentation

**1. บทนำ**

จากแหล่งพลังงานหมุนเวียน ไบโอเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพเหลวที่มีการใช้งานมากที่สุดในโลก ในปี 2560 ไบโอเอทานอลคิดเป็น 70% ของการใช้พลังงานหมุนเวียนทั้งหมด [1] ซึ่งสามารถผลิตได้จากพืชที่ให้พลังงานสูง แต่กระบวนการที่ใช้ในการผลิตเอทานอลยังคงมีความยุ่งยากและซับซ้อน จึงได้มีการพยายามพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดความซับซ้อนและต้นทุนในการผลิตเอทานอล [2] เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลหรือธัญพืช เพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นเอทานอล โดยในประเทศไทยมีวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลอยู่สองแบบได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และวัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง [3] อย่างไรก็ตามมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลภายในประเทศไทย เพราะมีปริมาณมาก หาได้ง่าย ราคาถูกและสามารถเพาะปลูกขึ้นมาทดแทนอยู่เสมอ [4], [5] ปัจจุบันประเทศไทยมีโรงงานผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง 9 แห่ง และจากกากน้ำตาล 11 แห่ง และแบบใช้วัตถุดิบได้ทั้งสองประเภท 5 แห่ง [6] สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปประกอบด้วยสองขั้นตอนหลักคือ การย่อยสลายแป้งและการหมัก กระบวนการหมักถือเป็นขั้นตอนหลักในการผลิตเอทานอลหลังจากที่ทำการเตรียมวัตถุดิบเพื่อเข้าสู่กระบวนการหมัก ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลได้ให้ความสำคัญกับการลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากราคาเอทานอลของประเทศไทยอยู่ที่ 23.28 บาท ในขณะที่สหรัฐอเมริกาและและบราซิลมีราคา 11.19 และ 9.92 บาท ตามลำดับ [7] โดยหนึ่งในหลายเทคโนโลยีที่สามารถนำไปสู่การลดต้นทุนได้ คือเทคโนโลยีการหมักภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารตั้งต้นสูง [2] ซึ่งสามารถลดความต้องการใช้น้ำในกระบวนการ ลดปริมาณน้ำเสีย จึงสามารถลดค่าใช้จ่ายและต้นทุนในการบำบัดน้ำเสียได้

นอกจากนี้ในกระบวนการหมักยังคงต้องการเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้ โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลอย่างแพร่หลาย คือเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* [8] ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ทำอาหาร ขนมปังและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ แต่สำหรับการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารตั้งต้นสูง จำเป็นจะต้องใช้เชื้อยีสต์ที่มีศักยภาพและประสิทธิภาพด้านการผลิตเอทานอลที่สูงกว่า โดยเชื้อยีสต์ที่เหมาะกับกระบวนการหมักดังกล่าว ต้องมีคุณสมบัติที่สามารถทนอุณหภูมิสูง สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ได้สูงและทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้ดี [9], [10] แต่เนื่องจากเชื้อยีสต์ไม่มีการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายแป้ง จึงไม่สามารถใช้แป้งได้โดยตรงสำหรับการเจริญและการหมักได้ ดังนั้นกระบวนการหมักจึงต้องใช้พลังงานและเอนไซม์จำนวนมากในการย่อยสลายแป้ง จึงได้มีการวิจัยและพัฒนาดัดแปรพันธุกรรมของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยสลายแป้ง ซึ่งอาจจะสามารถย่อยสลายแป้งและเข้าสู่ขั้นตอนการหมักได้ในขั้นตอนเดียว [11] อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยยังไม่อนุญาตให้ใช้สิ่งมีชีวิตดัดแปรทางพันธุกรรมที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกระบวนการผลิต เอทานอลในเชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้ประเทศไทยยังคงต้องนำเข้าเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นผลทำให้ราคาต้นทุนในการผลิตเอทานอลยังคงสูงอยู่ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะลดปริมาณการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส รวมถึงการลดปริมาณการใช้แหล่งคาร์บอน ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ MGT1/1 ที่คัดเลือกได้ในประเทศไทย เพื่ออาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่จะสามารถช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตเอทานอลได้

**2. วิธีการวิจัย**

**2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา**

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้งหมด 16 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผลไม้ จากจังหวัดปทุมธานี 4 ไอโซเลต (RMT 1, RMT 2, RMT 3, RMT 4) เชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผลมะม่วงสุกจากจังหวันครนายก 6 ไอโซเลต (MGT 1/1, MGT 5, MGT 6, MGT 8/1, MGT-L8/1, MGT 8/3) และเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากอาหารหมักดอง จากจังหวัดปทุมธานี 4 ไอโซเลต (PA 1/1, PA 2/1, PA 1/2, PA 1/3) และเชื้อยีสต์สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ SC-90 (TISTR 5606) และ AD1 (TISTR 5925)

**2.2 ความสามารถในการเจริญของเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลต่างกัน**

การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีเอทานอลความเข้มข้นต่างกัน ที่อุณหภูมิต่างกัน โดยจะนำเชื้อยีสต์ทั้ง 16 สายพันธุ์เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM (Difco, USA) ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และ กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนได้โคโลนีเดี่ยว แล้วจึงนำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว YM ในเครื่องเขย่าแบบ Rotary shaker ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางแบบลำดับส่วน 10 เท่า แล้วนำตัวอย่างเชื้อที่ทำการเจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารแข็ง YM ที่มีส่วนผสมของเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 โดยปริมาตร (v/v) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 และ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง โดยแบ่งเป็น 4 ระดับได้แก่ (+++) เชื้อเจริญได้ดี (++) เชื้อเจริญได้ปานกลาง (+) เชื้อเจริญได้น้อย และ (-) เชื้อไม่สามารถเจริญได้

**2.3 ความสามารถในการเจริญของเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง**

การเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง โดยนำเชื้อยีสต์ที่ถูกคัดเลือกจากการศึกษาความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลต่างกัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD (Difco, USA) ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 20 กรัมต่อลิตร ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 15-35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่ อุณหภูมิ 35, 37 และ 39 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างอาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Visible Spectrophotometer รุ่น SP-8001 (Metertech, Taiwan)

**2.4 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 35, 37 และ 39 องศาเซลเซียส**

การศึกษาปัจจัยการเจริญของเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 15, 20, 25, 30 และร้อยละ 35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35, 37 และ 39 องศาเซลเซียส โดยเตรียมเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกให้มีเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $1X10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ลงในอาหาร YM broth ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35, 37 และ 39 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างอาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Visible Spectrophotometer รุ่น SP-8001 (Metertech, Taiwan) จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง Centrifuge รุ่น 5804 (eppendorf, Germany) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เก็บเฉพาะส่วนใส แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) และ glucoanalyser YSI 2900 Series Biochemistry Analyzers (xylem, USA) ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas Chromatography รุ่น 6890N (Agilent technologies, USA)

**2.5 การตรวจหายีนที่ควบคุมสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)**

ตรวจหาชนิดของยีนที่มีความเกี่ยวข้องในการควบคุมการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้แก่ ยีน (sporulation glucoamylase gene) (*SGA* gene) [12] โดยนำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือก มาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น YM agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว YM broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์มาสกัดสารพันธุกรรม (DNA) โดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม Fungi/ Yeast Genomic DNA Isolation Kit ( Norgen, Canada) โดยสารพันธุกรรมที่สกัดมาได้จะเก็บไว้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดย Forward primer คือ 5'-ATGCTCAGCGTAGGATT-CGG-3' และ Reverse primer ได้แก่ 3'-TGGGAACAGACGG-GGAACTA-5' ซึ่งเป็น primer ที่ออกแบบเองสำหรับงานวิจัยนี้ โดยการใช้จากการเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์หลายสายจากฐานข้อมูล national center for biotechnology information (NCBI) และหาช่วงที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve domain) สำหรับสภาวะที่เหมาะสมคือ pre-denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที, denature 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 30 รอบ โดย PCR Product จะมีขนาดประมาณ 1500 bp และตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของ agarose gel ร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (% w/v)

**2.6 การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 20 และร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธีการหมักและย่อยพร้อมกัน (simultaneous saccharification and fermentation; SSF)**

เตรียมมันสำปะหลังเพื่อเข้าสู่กระบวนการหมัก โดยผสมมันเส้นกับน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 20 และร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก[13] เติมเอนไซม์ลดความหนืด (Viscozyme) (Novoenzyme, Denmark) ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase)(Novoenzyme, Denmark) ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 85-100 องศาซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นปรับความเข้มข้นของมันสำปะหลังด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 20 และ ร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ตวงมันสำปะหลังที่เตรียมแล้วลงถังหมักขนาด 5 ลิตร (Sartorius Stedim Biotech, Germany) เติมยูเรีย (Urea) 0.5 กรัมต่อลิตร (Univar, Australia) แล้วจึงเตรียมหัวเชื้อโดยให้มีเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $1\times10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) (Novoenzyme, Denmark) ร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนัก พร้อมกับเชื้อที่เตรียมไว้เพื่อย่อยและหมักพร้อมกัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล (Ethanol) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) และปริมาณการเจริญของเชื้อ

**2.7 การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธีการหมักและย่อยพร้อมกัน (SSF) โดยลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

เตรียมมันปะหลังและหัวเชื้อเพื่อเข้าสู่กระบวนการหมักด้วยวิธีเดียวกับที่กล่าวไปแล้วข้างต้น จากนั้น เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ร้อยละ 0.45 โดยน้ำหนัก (ลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยน้ำหนักลงร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก) และร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก (ลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยน้ำหนักลงร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก) พร้อมกับเชื้อที่เตรียมไว้เพื่อย่อยและหมักพร้อมกัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมงโดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณการเจริญของเชื้อ

**3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง**

**3.1 ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลต่างกัน**

จากการศึกษาบนอาหารแข็งที่มีเอทานอลความเข้มข้นต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็งที่มีเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0, 10 และร้อยละ 15 ยกเว้นเชื้อยีสต์ SC-90 ที่เจริญได้ปานกลางบนอาหารแข็งที่มีเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 15 และสำหรับอาหารแข็งที่มีเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 เชื้อยีสต์เกือบทุกสายพันธุ์เจริญได้น้อย ยกเว้นเชื้อยีสต์ สายพันธุ์ PA1/1 และ สายพันธุ์ MGT6 ที่ไม่สารถเจริญได้ (Figure 1) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเชื้อเพิ่มเป็น 38 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์เกือบทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็งที่มีเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0 และเจริญได้ปานกลางถึงเจริญได้น้อย บนอาหารแข็งที่มีเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 และร้อยละ 15 สำหรับบนอาหารแข็งที่มีเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 เชื้อยีสต์เกือบทุกสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ ยกเว้นเชื้อยีสต์ SC-90 (Table 1) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีเอทานอลความเข้มข้นสูงได้ดีที่สุดจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อยีสต์สายพันธุ์ SC-90, AD1, RMT2, MGT1/1 และ PA2/1

**Table 1** The growth profile of *S. cerevisiae* on YM agar with various ethanol and temperature for 24 h.

| Strain | Ethanol concentration %(v/v) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | | 5 | | 10 | | 15 | | 20 | |
| | 35 °C | 38 °C | 35 °C | 38 °C | 35 °C | 38 °C | 35 °C | 38 °C | 35 °C | 38 °C |
| SC-90 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + | + | + |
| AD1 | +++ | + | +++ | + | +++ | + | +++ | + | + | - |
| PA 1/1 | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ | + | - | - |
| PA 2/1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | + | + | - |
| PA 1/2 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |
| PA 1/3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |
| MGT1/1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | + | - |
| MGT5 | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ | ++ | + | - |
| MGT6 | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ | + | - | - |
| MGT8/1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |
| MGT-L8/1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |
| MGT 8/3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |
| RMT1 | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ | ++ | + | - |
| RMT2 | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |
| RMT3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |
| RMT4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |

หมายเหตุ: (+++) เชื้อเจริญได้ดี (++) เชื้อเจริญได้ปลานกลาง (+) เชื้อเจริญได้น้อย (-) เชื้อไม่สามารถเจริญได้

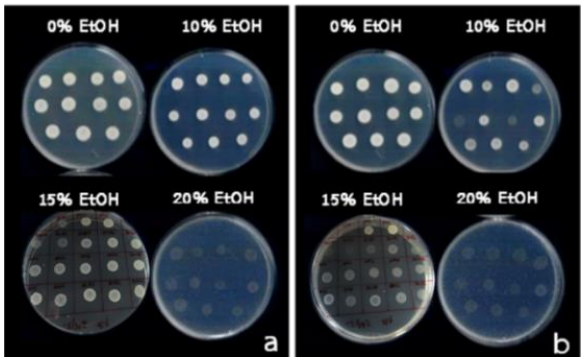


**Figure 1** Growth of yeast on YM agar composed of 0-20% ethanol at (a) 35 °C and (b) 38 °C

**3.2 ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง**

จากการศึกษาพบว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SC-90, AD1, RMT2, MGT1/1 และ PA2/1 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวที่มีกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็นร้อยละ 35 อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์จะลดลง และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ SC-90 เจริญได้น้อยกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ดังแสดงใน Figure 2A เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเป็น 37 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 35 แต่อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ ADY1, MGT1/1 และ PA2/1 มีอัตราการเจริญที่ความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 35 ได้ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ในขณะที่เชื้อยีสต์สายพันธุ์ RMT2 และ SC-90 จะมีอัตราการเจริญดีในช่วงความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 20 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ SC-90 เจริญได้น้อยที่สุด ดังแสดงใน Figure 2B สำหรับการบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของกลูโคส ในช่วงร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 35 และสามารถเจริญได้สูงสุดที่ความเข้มข้นข้องกลูโคสร้อยละ 20 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ในหลายสภาวะพบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ MGT1/1 สามารถเจริญได้ดีในเกือบทุกสภาวะ ในขณะที่เชื้อยีสต์สายพันธุ์ SC-90 เจริญได้น้อยที่สุด ดังแสดงใน Figure 2C จากการจากการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสให้สูงขึ้น จะส่งผลให้ระยะเวลาที่เชื้อยีสต์เจริญเข้าสู่ช่วง exponential phase หรือ log phase ยาวนานขึ้นซึ่งช่วงเวลานี้จะเป็นช่วงที่เชื้อยีสต์เริ่มต้นการผลิตเอทานอล จากการทดลอง พบว่า โดยส่วนใหญ่เชื้อแต่ละสายพันธุ์จะใช้ระยะเวลาประมาณ 12 – 18 ชั่วโมงในการเข้าสู่ log phase ซึ่งหลังจากนี้เชื้อยีสต์จะมีอัตราการเจริญลดลง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงเป็น 39 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์คือ 35 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ AD1, RMT2, MGT1/1 และ PA2/1 มีความสามารถในการทนต่ออุณภูมิสูงได้ถึง 39 องศาเซลเซียส ในกรณีของความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมคือช่วงความเข้มข้นร้อยละ 15-20 ส่งผลให้การเจริญของเชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์สูง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสให้สูงถึง ร้อยละ 35 ส่งผลให้การเจริญของเชื้อยีสต์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 35 นั้นส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากสารตั้งต้น (substrate inhibition)

**3.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 35, 37 และ 39 องศาเซลเซียส**

จากการศึกษาพบว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SC-90, AD1, RMT2, MGT1/1 และ PA2/1 สามารถเจริญในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 15, 20, 25, 30 และ 35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ผลการทดลองแสดงเฉพาะที่ความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 25 ดัง Table 2) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสได้ โดยเชื้อยีสต์สามารถใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลได้จนหมด ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 15, 20 และ 25 เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งแต่ร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อยีสต์จะไม่สามารถใช้น้ำตาลได้หมด สังเกตได้จากความสามารถในการใช้น้ำตาลของยีสต์จะลดลง แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของเซลล์ยีสต์ สำหรับประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลพบว่า ที่ชั่วโมงที่ 48 เชื้อยีสต์สายพันธุ์ PA2/1 มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคิดเป็นร้อยละ 94.77 ตามด้วย MGT1/1 ผลิตเอทานอลร้อยละ 87.56 และที่น้อยที่สุดได้แก่เชื้อยีสต์สายพันธุ์ SC-90 โดยมีประสิทธิภาพการผลิตร้อยละ 77.79 ดังแสดงใน Table 2

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้จนหมด

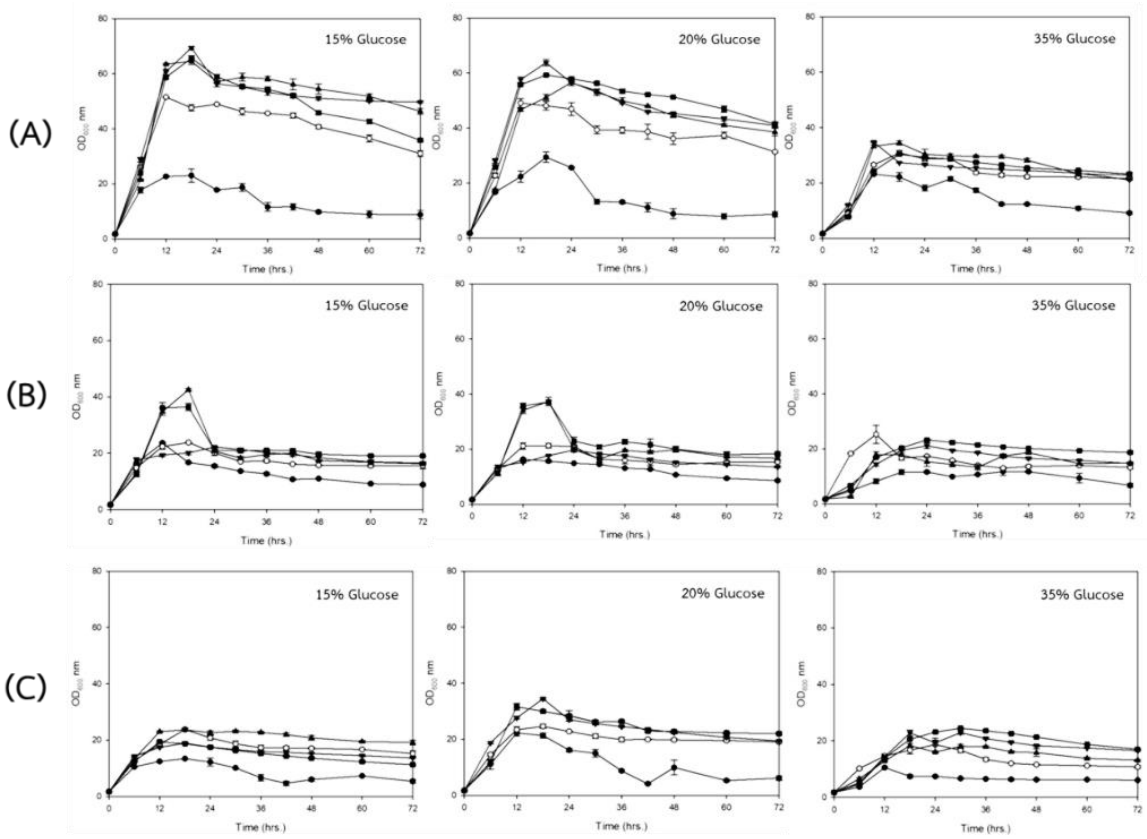


**Figure 2** Growth of *S. cerevisiae* SC-90 (—●—), AD1 (—○—), RMT2 (—▲—), MGT1/1 (—■—) and PA2/1 (—▼—) on YPD broth composed of 15-35% glucose (w/v) when incubated at (A) 35 °C (B) 37 °C and (C) 39 °C for 72 h

แต่เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการใช้น้ำตาลจะทำได้ช้ากว่าและเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 25, 30 และร้อยละ 35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อยีสต์จะมีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ลดลงและไม่สามารถใช้น้ำตาลได้หมด (Table 2) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ15 และร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลได้จนหมด ซึ่งจะเหมือนกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเป็นร้อยละ 25 จะมีเพียงรหัส RMT2, MGT 1/1 และ PA 2/1 ที่สามารถใช้น้ำตาลได้จนหมดขณะที่น้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ไม่สามารถที่จะใช้น้ำตาลได้หมด สำหรับประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 48 เชื้อยีสต์ สายพันธุ์ PA2/1 มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคิดเป็นร้อยละ 97.07 และที่น้อยที่สุดได้แก่เชื้อยีสต์สายพันธุ์ RMT2 โดยมีประสิทธิภาพการผลิตร้อยละ 73.02 (Figure 2)

จากการทดลองนี้ ได้สายพันธุ์ของยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอทานอลและทนต่ออุณหภูมิสูงได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PA2/1 และ MGT1/1 (Table 2) เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการผลิตและความสามารถในการทนน้ำตาลสูง และความคงที่ของการผลิตที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพที่คงที่เมื่อนำไปพัฒนาต่อไปในการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นนั้น เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* MGT1/1 มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยวัตถุดิบจริงจากมันสำปะหลัง จึงถูกเลือกไปใช้เป็นตัวแทนของยีสต์ที่คัดแยกได้ไปใช้ศึกษาต่อในระดับถังหมักต่อไป

**3.4 ผลการตรวจหายีนที่ควบคุมสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)**

จากการตรวจหายีน *SGA* พบว่าเชื้อยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์สามารถพบยีน *SGA* ได้เช่นเดียวกัน ดัง Figure 3 เนื่องจากยีน *SGA* เป็นยีนที่สามารถพบได้ทั่วไปในเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* [12] อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสยังคงเกี่ยวข้องกับกลไกอื่น ๆ อีกมาก ดังเช่น การแสดงออกของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส นอกจากจะต้องมียีน *SGA* แล้วจะต้องอาศัยยีน *MAT* (mating type locus MAT) ในการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ รวมถึงสภาพแวดล้อมปัจจัยต่าง ๆ ที่คอยส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ [14]

**3.5 ผลศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 20 และร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร**

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 20 พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ MGT1/1 มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากเชื้อเริ่มต้น

$6.5x10^6$ CFU/ml เพิ่มเป็นประมาณ $2.0x10^8$ CFU/ml อาจเนื่องมาจากสภาวะของการหมักและปริมาณสารอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ทำให้เชื้อดังกล่าวไม่ต้องใช้เวลาในการปรับตัวมากนัก จึงสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และค่อนข้างคงที่จนถึงช่วงเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เชื้อจึงค่อย ๆ มีแนวโน้มลดลง (Figure 4) เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่ใช้สำหรับการเจริญหมดลง ทำให้เชื้อไม่มีอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญได้อีก สำหรับการใช้น้ำตาลพบว่าเชื้อยีสต์ MGT1/1 สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 และสามารถผลิตเอทานอลได้ 75.14 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Table 3 สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MGT1/1 มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก $9x10^6$ CFU/ml เป็น $2.75\ x10^8$ CFU/ml ใน 12 ชั่วโมง และสามารถใช้น้ำตาลได้เกือบหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่ได้ โดยสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุด 116.39 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงใน Figure 5

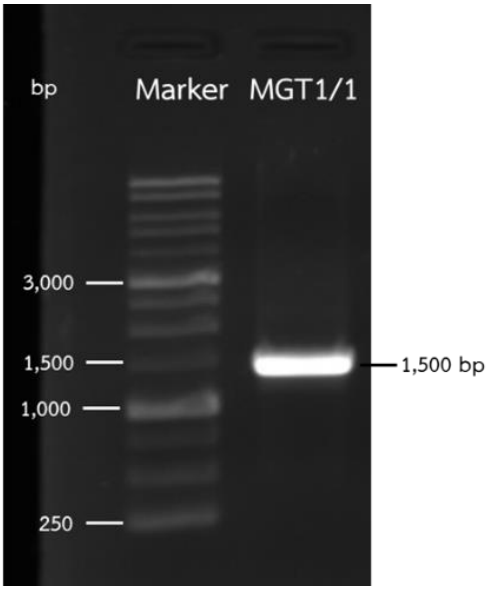


**Figure 3** Detection of *SGA* gene (~1500 bp) by agarose gel electrophoresis with 1% (w/v) of agarose gel

**Table 2** Ethanol concentration, ethanol yield, ethanol production and ethanol production efficiency from 25% glucose at 35, 37 and 39 °C for 48 h

| Strain | Ethanol concentration (g/L) | | | Ethanol Yield ($g/g_{sugar}$) | | | Ethanol production (g/L·h) | | | Ethanol production efficiency (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 35 °C | 37 °C | 39 °C | 35 °C | 37 °C | 39 °C | 35 °C | 37 °C | 39 °C | 35 °C | 37 °C | 39 °C |
| SC-90 | 99.64 ±0.87 | 88.14 ±0.04 | 77.46 ±1.62 | 0.40 ±0.00 | 0.38 ±0.00 | 0.47 ±0.01 | 2.08 ±0.04 | 1.84 ±0.00 | 1.61 ±0.03 | 77.79 ±0.73 | 74.72 ±0.03 | 92.63 ±1.35 |
| AD1 | 97.65 ±0.64 | 87.91 ±0.83 | 64.42 ±0.50 | 0.45 ±0.00 | 0.40 ±0.00 | 0.38 ±0.00 | 2.03 ±0.03 | 1.80 ±0.02 | 0.89 ±0.01 | 87.37 ±0.54 | 78.76 ±0.69 | 75.00 ±0.42 |
| RMT2 | 102.49 ±0.59 | 95.78 ±0.21 | 79.26 ±0.55 | 0.42 ±0.00 | 0.42 ±0.00 | 0.37 ±0.00 | 2.14 ±0.02 | 2.00 ±0.00 | 1.65 ±0.01 | 81.57 ±0.49 | 87.39 ±0.18 | 73.02 ±0.46 |
| MGT1/1 | 96.56 ±0.73 | 93.85 ±0.87 | 86.77 ±0.88 | 0.45 ±0.00 | 0.45 ±0.00 | 0.41 ±0.00 | 2.21 ±0.03 | 1.96 ±0.02 | 1.87 ±0.02 | 87.56 ±0.60 | 88.25 ±0.73 | 81.16 ±0.73 |
| PA2/1 | 106.44 ±1.10 | 89.57 ±0.34 | 95.82 ±0.30 | 0.48 ±0.00 | 0.50 ±0.00 | 0.50 ±0.00 | 2.22 ±0.05 | 1.87 ±0.01 | 2.00 ±0.01 | 94.77 ±0.92 | 98.27 ±0.28 | 97.07 ±0.25 |

All experiments were triplicated. The DATA showed average ± standard deviation

**3.6 ผลศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 25 และร้อยละ 50**

จากการศึกษาในถังหมักระดับปฏิบัติการ โดยลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 25 พบว่า เชื้อยีสต์ MGT1/1 มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก $8.94x10^6$ CFU/ml เป็น $3.38\ x10^8$ CFU/ml ใน 12 ชั่วโมง ก่อนจะมีแนวโน้มลดลง (Figure 5) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นทำให้มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ สำหรับการใช้น้ำตาลพบว่า เชื้อยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 36 ก่อนจะค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องจนสามารถใช้น้ำตาลได้เกือบหมดในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ เอทานอล ที่พบว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24 จาก 89.97 กรัมต่อลิตร เป็น 107.15 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 และยังคงผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้ 120.54 กรัมต่อลิตรดังแสดงใน Figure 5

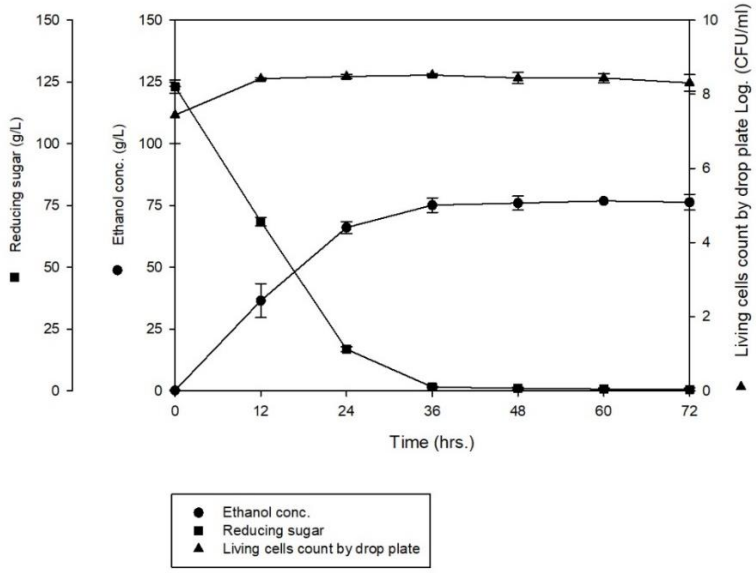


**Figure 4** Ethanol production from 20% (w/v) cassava by *S. cerevisiae* MGT1/1

**Table 3** Ethanol concentration, ethanol yield, ethanol production and ethanol production efficiency from 20% (w/v) cassava at 35°C for 36 and 48 h

| Time (h) | 36 | 48 |
|---|---|---|
| Living Cells count (CFU/mL) | $3.29 \times 10^8$ | $2.83 \times 10^8$ |
| Ethanol concentration (g/L) | 75.14±0.98 | 75.98±1.20 |
| Ethanol concentration (v/v) | 9.52±0.12 | 9.63±0.15 |
| Ethanol productivity (g/L·h) | 2.11±0.03 | 1.60±0.03 |

All experiments were triplicated. The DATA showed average ± standard deviation.

สำหรับผลการลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 50 พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์ MGT1/1 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก จากประมาณ $1\times10^7$ CFU/ml เป็น $2\times10^8$ CFU/ml และมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 ก่อนอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์จะลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 60 ดังแสดงใน Figure 5 นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเชื้อยีสต์ MGT1/1 สามารถใช้น้ำตาลลดลงได้อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงที่สุด และใช้น้ำตาลหมดลงในชั่วโมงที่ 48 เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลพบว่า เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก ก่อนจะผลิตเอทานอลได้ปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยในชั่วโมงที่ 36 และ 48 สามารถผลิตเอทานอลได้ 99.41 กรัมต่อลิตร (2.98 g/L·h หรือ 0.36 $g/g_{sugar}$) และ 106.32 กรัมต่อลิตร (2.41 g/L·h หรือ 0.39 $g/g_{sugar}$) ตามลำดับ ซึ่งถือได้ว่า MGT1/1 นั้นมีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้ในระดับสูงเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ผลิตเอาทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ TMS 30572 (2.34 g/L·h) [13] และ สายพันธุ์ LNF (0.21 $g/g_{sugar}$) [15]

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้พบว่าการลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 25 ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MGT1/1 เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ลดการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือการลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 50 ทั้งนี้การลดเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 50 พบว่าประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์มีค่าใกล้เคียงกับการไม่ลดการใช้เอนไซม์และน้อยกว่าการลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 25 (Table 4) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตของเชื้อยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้กับข้อมูลประสิทธิภาพการผลิตจากสมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย [16] พบว่า เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 13.06

เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิต จากงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าการใช้มันสำปะหลังในการผลิตเอทานอล โดยยังไม่ได้คำนึงถึงการลดเอนไซม์นั้นสามารถใช้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลได้ไม่สูงเมื่อเทียบกับพืชชีวมวลอื่น ๆ เมื่อใช้มันสำปะหลังสามารถผลิตเอทานอลได้ในราคา 6.85 บาทต่อลิตร ในขณะที่การใช้อ้อย ข้าวโพด ข้าว และกากน้ำตาล (Molasses)

สามารถผลิตเอทานอลได้โดยใช้ต้นทุน 7.06 12.45 12.61 และ 15.83 บาทต่อลิตร ตามลำดับ [17] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยต่อมามีรายงานเพิ่มเติมว่า การใช้มันสำปะหลังในการผลิต เอทานอลใช้ต้นทุนเพียง 5.29 บาทต่อลิตร น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอ้อย (7.24 บาทต่อลิตร) และ ข้าวโพด (11.51 บาทต่อลิตร) [18] ดังนั้นจึงสนับสนุนงานวิจัยนี้ว่าการใช้มันสำปะหลังนั้นสามารถลดต้นทุนในการผลิตเอทานอลได้

จากงานวิจัยนี้สิ่งที่ต่อยอดวัตถุประสงค์ของความพยายามในการลดต้นทุนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยสามารถลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในกระบวนการหมักลงได้อย่างมีนัยสำคัญซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตเอทานอลในส่วนของการใช้เอนไซม์ลงได้ประมาณ 0.45 บาทต่อการย่อยมันสำปะหลัง 1 กิโลกรัม หรือลดต้นทุนการใช้เอนไซม์ลงได้ 1.18 บาทต่อการผลิตเอทานอล 1 ลิตร โดยไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลอีกด้วย

**4. บทสรุป**

จากการศึกษาการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญภายใต้สภาวะต่าง ๆ บนอาหารแข็ง จากเชื้อยีสต์ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถทนอุณหภูมิได้มากกว่า 35 องศาเซลเซียส ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้มากกว่าร้อยละ 10 โดยปริมาตร และทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลได้อย่างน้อยร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อที่แยกได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้แก่ RMT 2 (จากผลไม้) MGT1/1 (จากแหล่งธรรมชาติ) PA2/1 (จากอาหารหมักดอง) และ เชื้อยีสต์ เชื้อยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่มักใช้ในการผลิตทางการค้า คือ SC-90 และ AD1 (TISTR5606 และ TISTR 5240 (ATCC 18824) ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบปัจจัยการเจริญของเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ในอาหารสังเคราะห์แบบเหลวทั้งประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลและ อัตราการผลิต เอทานอลภายใต้สภาวะน้ำตาลตั้งต้นสูง พบว่ามีเชื้อยีสต์ที่มีศักยภาพและเหมาะสมสำหรับการผลิต เอทานอลจากมันสำปะหลังได้แก่ เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ ที่ถูกเก็บรักษาที่ศูนย์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สายพันธุ์คัดเลือก MGT1/1 มีความสามารถในการทนต่อน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงและสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์ SC-90 ที่ใช้ในทางการค้าอีกด้วย ผลจากการตรวจสอบในระดับอณูชีววิทยาพบว่า มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (*SGA* gene) จึงยืนยันได้ว่ามีความสามารถในการย่อยแป้งเพื่อไปเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอลได้จริง นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 25 และร้อยละ 50 พบว่า เมื่อลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 25 ประสิทธิภาพการผลิต เอทานอลของเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ลดการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือการลดปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงร้อยละ 50 ซึ่งเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ ที่สามารถคัดเลือกเชื้อยีสต์จากธรรมชาติ ที่มีศักยภาพในการหมักย่อยมันสำปะหลังภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารตั้งต้นสูง สามารถลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตเอทานอล เพื่อลดต้นทุนการผลิตโดยยังคงให้ผลผลิตเอทานอลที่มีปริมาณสูงได้ นอกจากนี้การใช้เชื้อยีสต์ที่คัดแยกจากธรรมชาติ ยังจะสามารถลดต้นทุนจากการนำเข้าหรือการใช้เชื้อยีสต์ทางการค้าได้อีกด้วย

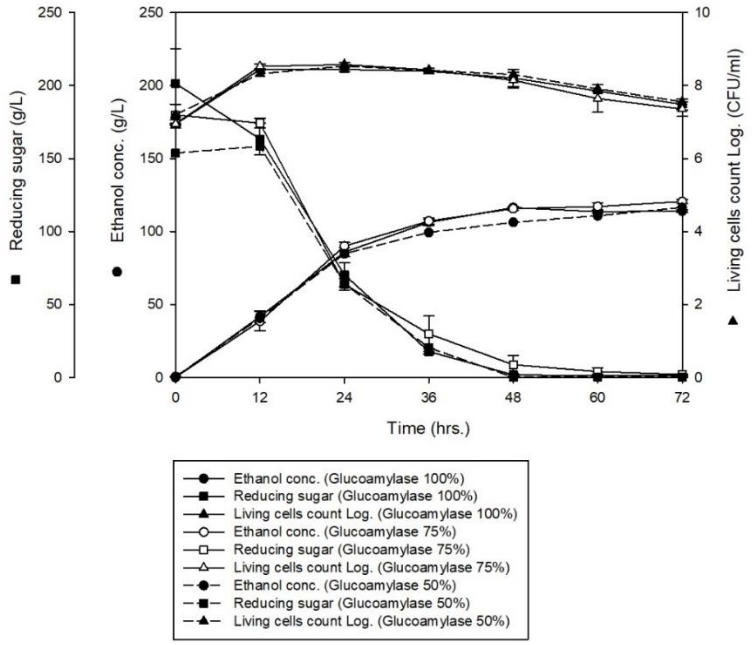


**Figure 5** Ethanol production from 30% (w/v) cassava by *S. cerevisiae* MGT1/1

**Table 4** Ethanol concentration, ethanol yield, ethanol production and ethanol production efficiency from 30% (w/v) cassava at 35°C for 36 and 48 h

| Enzyme | Glucoamylase 100% | | Glucoamylase 75% | | Glucoamylase 50% | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Time (h) | 36 | 48 | 36 | 48 | 36 | 48 |
| Living Cells count. (CFU/mL) | $2.5 \times 10^8$ | $1.75 \times 10^8$ | $1.25 \times 10^8$ | $1.49 \times 10^8$ | $2.59 \times 10^8$ | $2.00 \times 10^8$ |
| Ethanol conc. (g/L) | 106.32±0.96 | 116.39±1.56 | 107.15±0.98 | 115.69±0.87 | 99.41±0.61 | 106.32±0.85 |
| Ethanol conc. (v/v) | 13.47±0.12 | 14.75±0.20 | 13.58±0.12 | 14.66±0.11 | 12.60±0.08 | 13.48±0.11 |
| Ethanol prod. (g/L·h) | 2.95±0.03 | 2.42±0.03 | 2.98±0.03 | 2.41±0.02 | 2.76±0.01 | 2.22±0.02 |

All experiments were triplicated. The DATA showed average ± standard deviation.

**5. กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน ที่ให้การสนับสนุนทางด้านงบประมาณในการดำเนินการศึกษา "โครงการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ยีสต์ดัดแปรพันธุกรรมในอุตสาหกรรมเอทานอล" ขอบคุณผู้ประกอบการที่ให้ความร่วมมือ และอนุเคราะห์สนับสนุนด้านข้อมูล ขอบคุณคณะทำงานกำกับโครงการ กองทุนส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน สำนักงานบริหารกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน (ส.กทอ.) คณะทำงานของรวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่เกี่ยวข้อง ที่สนับสนุนการทำงาน ทั้งทางด้านข้อมูล การอำนวยความสะดวก และการให้ คำชี้แนะที่มีค่า อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เพื่อให้โครงการศึกษาและรายงานฉบับนี้สมบูรณ์ ท้ายสุดนี้ขอขอบคุณผู้แทนจากหน่วยงานราชการ รัฐวิสาหกิจ และเอกชนที่ร่วมให้ความเห็นและแลกเปลี่ยนข้อมูลในการประชุมสัมมนาเพื่อเผยแพร่ผลงาน

**6. References**

[1] Statistics, W. G. B. 2019. Global bioenergy statistics 2019. **World Bioenergy Association: Stockholm.** 58, 1-4.

[2] Blieck, L. and et al. 2007. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high- gravity conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. 73(3): 815–824.

[3] Nguyen, T. L. T., Gheewala, S. H., and Garivait, S. 2007. Full chain energy analysis of fuel ethanol from cassava in Thailand. **Environmental Science and Technology.** 41(11): 4135-4142.

[4] Hershey, C. and Howeler, R. 2008. Cassava in Asia: Designing crop research for competitive markets. In Cassava's potential in Asia in the 21st Century. **Present Situation and Future Research and Development Needs; Proceedings of the 6th Regional Workshop**, Ho Chi Minh City, Vietnam, February. 21-25.

[5] Gheewala, N. 2008. Life cycle assessment of fuel ethanol from cassava in Thailand. **The International Journal of Life Cycle Assessment.** 13(2): 147-154.

[6] Department of Alternative Energy Development and Efficiency. Ethanol plant for fuel and installed capacity. 2020. https://www.dede.go.th/more_news.php?cid=82&filename= index. (*in Thai*). Accessed 15 October 2020.

[7] Thai Ethanol Manufacturing Association. Ethanol price. 2020. http: / / www. thai- ethanol. com/ th/ statistical-data/price.html. (*in Thai*) Accessed 21 October 2020.

[8] Auesukaree, C. and et al. 2012. Characterization and gene expression profiles of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolates from Thai fruits. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 114(2): 144-9.

[9] Gronchi, N. and et al. 2019. Novel yeast strains for the efficient saccharification and fermentation of starchy by-products to bioethanol. **Energies**. 12, 714.

[10] Department of Alternative Energy Development and Efficiency. Guidance to developing and investing in renewable energy production. 2011. https://www.dede.go.th/article_attach/h_ethanal.pdf. (*in Thai*). Accessed 20 October 2020.

[11] Gladis, A. and et al. 2015. Influence of different SSF conditions on ethanol production from corn stover at high solids loadings. **Energy Science and Engineering**. 3(5): 481-489.

[12] Latorre-García, L. and et al. 2005. Improving the amylolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* glucoamylase by the addition of a starch binding domain. **Journal of Biotechnology**. 118(2): 167-176.

[13] Ajibola, F. and et al. 2012. Enzymatic production of ethanol from cassava starch using two strains of *Saccharomyces cerevisiae.* **Nigerian Food Journal**. 30(2): 114-121.

[14] Singh, I. and et al. 2009. Stringent mating-type-regulated auxotrophy increases the accuracy of systematic genetic interaction screens with *Saccharomyces cerevisiae* mutant arrays. **Genetics**. 181(1): 289-300.

[15] Martinez, D. G. and et al. 2018. Ethanol production from waste of cassava processing. **Applied Sciences**. 8(11): 2158.

[16] Thai Ethanol Manufacturing Association. Ethanol production process. 2013. http://www.thaiethanol.com/th/2013-04-06-13-53- 49/ production- process- ethanol. html. (*in Thai*) Accessed 26 October 2020.

[17] Yoosin, S. and Sorapipatana, C. 2007. A study of ethanol production cost for gasoline substitution in Thailand and its competitiveness. **Science and Technology Asia**. 69-80.

[18] Watson, P. and Rao, K. C. 2018. Bio-ethanol from cassava waste (ETAVEN, Carabobo, Venezuela)-Case Study. Rao, K. C. and Gebrezgabher, S. (eds) **Section II – energy recovery from organic waste.** 286-295.