สภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเชื้อยีสต์บนชานอ้อยและการประยุกต์ใช้เพื่อผลิตเอทานอล

The Optimal Condition for Immobilization of Yeast Cells on Bagasse and its Application for Ethanol Production

เวสารัช สุนทรชัยบรูณ์[1] จารุวรรณ เจียดอนไพร[2] และ รัชพล พะวงศ์รัตน์[1]

Waesarat Soontornchaiboon[1] Jaruwan Jiadonprai[2] and Ratchapol Pawongrat[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 บนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ และการประยุกต์ใช้เพื่อผลิตเอทานอล พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ยีสต์ คือ ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ จำนวนร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้เวลา 30 โดยสามารถตรึงเซลล์ยีสต์ได้สูงสุด เท่ากับ 1.9×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัม ($p<0.05$) และเมื่อเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อนำไปใช้งาน พบว่าเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สามารถลดความชื้นในวัสดุตรึงรูปให้เหลือร้อยละ 25.79±0.10 โดยยังมีค่ากิจกรรมที่สูง เมื่อเทียบกับสภาวะอื่นที่เหลือ ($p<0.05$) สำหรับการประยุกต์ใช้ในเพื่อผลิตเอทานอล พบว่า มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอล (P) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) และผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 2.21 กรัมต่อลิตร, 1.18 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.09 กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ใช้ ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังทำการศึกษาประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปโดยการหมักแบบกะซ้ำ พบว่า สามารถนำกลับมาใช้ได้อย่างน้อย 5 ครั้ง ดังนั้นการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชานอ้อยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลอย่างยั่งยืนในอนาคต

คำสำคัญ : การตรึงรูป เซลล์ยีสต์ ชานอ้อย เอทานอล

---

[1] หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Bioproduct Science Program Department of Sciences Faculty of Liberal Arts and Sciences Kasetsart University Kamphang Saen Campus Nakhon Pathom 73140

[2] หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Bioproduct Science Program Department of Sciences Faculty of Liberal Arts and Sciences Kasetsart University Kamphang Saen Campus Nakhon Pathom 73140

[2] Bioscience Program Department of Sciences Faculty of Liberal Arts and Sciences Kasetsart University Kamphang Saen Campus Nakhon Pathom 73140

Abstract

This study aims to investigate the optimum conditions of immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 on pretreated bagasse and application for ethanol production. The results showed that the opitimum conditions for yeast immobilization were using 1 % (w/v) of 30 min pretreated bagasse with the highest amount of immobilized yeast cells of 1.9 ± 10^8 cells/ml/mg ($p < 0.05$). Biocatalyst preparations, including immobilization and drying were also evaluated. Hot air-drying of the immobilized cells at 50 ºC for 60 was found to be the most effective process which could decrease moisture content to 25.79 ± 0.10%. Batch fermentation using immobilized yeast on bagasse reported that the highest ethanol concentration (P), rate of ethanol production (Q_p) and yield of ethanol ($Y_{p/s}$) were 2.21 grams per liter, 1.18 grams per liter per hour, and 0.09 grams of ethanol per gram of utilized sugar, respectively. The immobilized yeast on bagasse could be reused at least five batches fermentation. In conclusion, the immobilized yeast on bagasse is possible to be used for ethanol production in the future.

Keywords : Immobilization, yeast cells, bagasse, ethanol

บทนำ

ในปัจจุบันนี้วิกฤติทางด้านพลังงานที่เกิดขึ้นทั่วโลกซึ่งรวมถึงประเทศไทย ส่งผลกระทบต่อทั้งทางด้านเศรษฐกิจและการดำรงชีพมากขึ้นเรื่อย ๆ ปัญหาการขาดแคลนน้ำมันซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญ เอทานอลจึงเป็นพลังงานทดแทนที่น่าสนใจ โดยเฉพาะเอทานอลที่ผลิตได้จากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (วนิดา, 2553) เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว ขี้เลื่อย แกลบ เป็นต้น ชานอ้อยเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูง การนำวัสดุเหลือเหลือทิ้งทางการเกษตรลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล จำเป็นต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยสลายทางเคมีหรือเอนไซม์ให้ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ จากนั้นจึงใช้ยีสต์หมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล เพื่อการผลิตเอทานอลให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด จึงจำเป็นต้องมียีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอลได้ (รัชพล และคณะ, 2555)

ปัจจุบันงานทางด้านการหมักเอทานอลที่ได้รับความสนใจ คือการพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลให้มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือ การตรึงเซลล์การใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยอาศัยวิธีการตรึงรูป (Immobilization) เป็นการนำเอ็นไซม์หรือเซลล์ใดๆมายึดติดไว้กับวัสดุใดๆเพื่อเพิ่มความทนทานของเอ็นไซม์หรือเซลล์ในการใช้งาน อีกทั้งให้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้เหมือนอย่างกับเอนไซม์หรือเซลล์เดิม ข้อดีของวิธีการนี้คือ ช่วยในกระบวนการผลิตที่ยุ่งยากและมีราคาแพง ช่วยให้สามารถลดต้นทุนการผลิตของกระบวนการที่ต้องอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์หรือเซลล์ที่มีราคาแพงนั้นได้ (ประสิทธิชัย และยุทธพงษ์, 2549)

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 บนชานอ้อย และศึกษาประสิทธิภาพในการนำไปใช้เพื่อการผลิตเอทานอล รวมทั้งการนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างชานอ้อย และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำชานอ้อยมาล้างทำความสะอาด ตากแดดให้แห้ง แล้วนำไปตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ (ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเริ่มต้นคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

2. การเตรียมปรับสภาพชานอ้อย

การปรับสภาพชานอ้อยเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Genisheva *et al.* (2011) โดยนำตัวอย่างชานอ้อยที่เตรียมไว้ อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร (อัตราส่วน 1 : 20 กรัมต่อมิลลิลิตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชเป็นกลาง (pH~7) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร(อัตราส่วน 1 : 20 กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกรองแยกส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชเป็นกลาง (พีเอช~7) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ก่อนการเก็บรักษาทำการฉายแสง UV เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อยืดอายุในการเก็บรักษา แล้วเก็บตัวอย่างไว้ในถุงพลาสติกที่มิดชิด

3. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339

เขี่ยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone dextrose (YPD) ซึ่งประกอบด้วยยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรและเปปโตน 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการวัดจำนวนเซลล์ยีสต์ โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 1 กรัมต่อลิตร

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์ยีสต์ในชานอ้อย

นำเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 (ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ล้างด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.6 จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาตรึงในชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพที่เตรียมไว้ในข้อ 2 โดยใช้ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพจำนวน 1 3 และ 5 กรัม ตามลำดับ เติมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 30 60 120 และ 180 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ ทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ และคำนวณจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุ โดยใช้สูตร ดังนี้

จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึง (เซลล์/มิลลิลิตร) = จำนวนเซลล์ในชุดควบคุม (เซลล์/มิลลิลิตร) – จำนวนเซลล์ที่เหลือในฟลาสก์ (เซลล์/มิลลิลิตร)

5. การศึกษาการเตรียมตัวอย่างเซลล์ยีสต์ตรึงรูปเพื่อนำไปใช้งาน

จากข้อ 4 แยกชานอ้อยที่ตรึงเซลล์ยีสต์ออกจากบัฟเฟอร์แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 60

120 180 240 และ 300 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นเก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนน้ำหนักคงที่ ทำการวิเคราะห์ร้อยละความชื้นในวัสดุตรึง เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนการอบ (Control) และเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ผ่านการทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dry จากนั้นนำไปทดสอบการผลิตเอทานอลโดยใช้อาหารเหลว YPD broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ก่อนการปิดจุกทำการไล่อากาศในฟลาสก์ด้วยก๊าซ N_2 แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างครั้งละ 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือและปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น

6. การศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลและการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

การทดลองนี้ทำการหมักเอทานอลเหมือนกับข้อ 5 แต่จะนำเอาเซลล์ยีสต์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ โดยเก็บส่วนเซลล์ยีสต์ตรึงรูป ทำการล้างเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 5.6 และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ทำเช่นเดิมกับการเตรียมในรอบแรก เก็บตัวอย่างเมื่อครบ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จากนั้นในรอบถัดไปทำเช่นเดิมจนผลผลิตเอทานอลลดลงน้อยกว่าร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับรอบแรก

$$\text{ร้อยละผลการผลิต} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นรอบแรก (กรัมต่อลิตร)}} \times 100$$

7. ศึกษาโครงสร้างทางกายภาพก่อนและหลังการตรึงรูป

ทำการศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของชานอ้อยก่อน และหลังการตรึงรูปโดยผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนกำลังขยายสูง (Scanning Electron Microscope, SEM) เพื่อศึกษาโครงสร้างทางกายภาพและลักษณะของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ได้

8. การวิเคราะห์

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ AOAC (1980) ค่าความหนาแน่นของเซลล์วัดที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) หาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยวิธีการของ James (1995) วิเคราะห์จำนวนเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือโดยวิธี DNS (Dinitrosalicylic colorimetric method) ดัดแปลงมาจากวิธีการของ James (1995) และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดโครเมท ดัดแปลงมาจากวิธีการของ (Beom seo *et al*., 2009)

คำนวณค่าพารามิเตอร์ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เป็นค่าของผลผลิตเอทานอลที่ผลิตที่เกิด แสดงเป็นกรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อกรัม) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) เป็นค่าของเอทานอลที่ผลิตที่เกิดขึ้นจริงในช่วงเวลาหนึ่ง (กรัมต่อชั่วโมง) และร้อยละของประสิทธิภาพการหมัก (E_y) เป็นค่าร้อยละของผลผลิตเอทานอลเทียบกับค่าที่ได้ทางทฤษฎี

$$Q_p = \frac{P}{t} \qquad \text{และ} \qquad E_y = \frac{Y_{p/s} \times 100}{0.51}$$

P คือ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตที่เกิดขึ้นจริง (กรัมต่อลิตร), t คือเวลาของการผลิตเอทานอลที่ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด และค่า 0.51 เป็นค่าคงที่ของผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎีโดยเทียบกับน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม

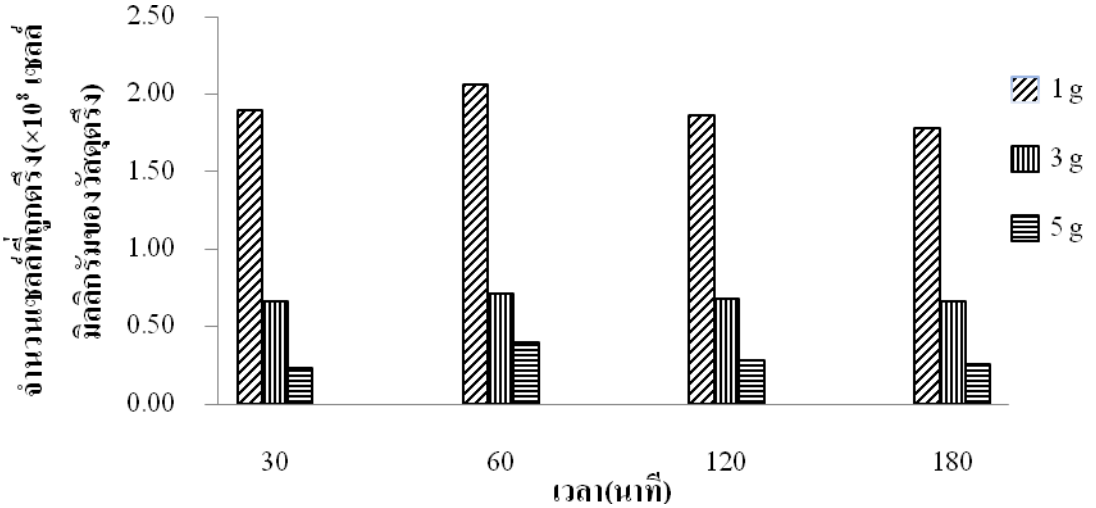
8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนในการวิจัยและผลการทดลองทั้งหมดจากการวิจัยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95.0 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

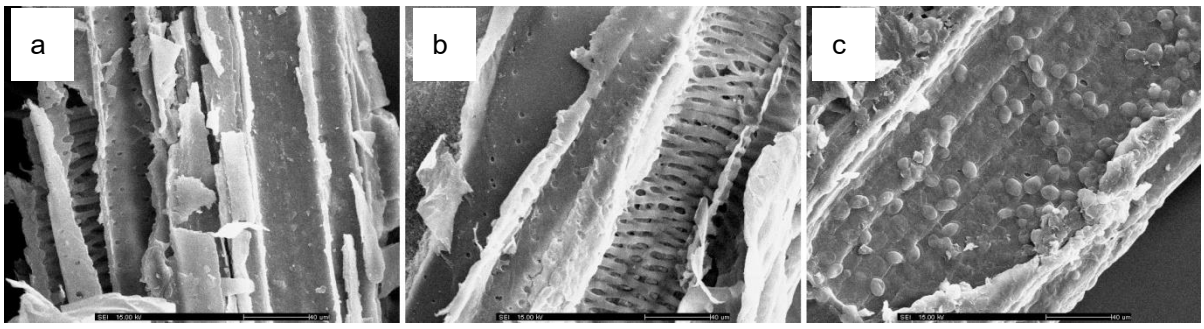
1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์ยีสต์ในชานอ้อย

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ในชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ โดยทำการศึกษาปริมาณวัสดุตรึงรูปและเวลาที่ใช้ในการตรึงรูปชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพที่เหมาะสม จากรูปที่ 1 เมื่อเพิ่มปริมาณวัสดุตรึงมากขึ้นจะส่งผลให้จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงลดลง ทั้งนี้เนื่องจากว่าเมื่อปริมาณวัสดุตรึงเพิ่มมากขึ้นจะทำให้มีปริมาณวัสดุมีมากกว่าจำนวนเซลล์ที่สามารถเจริญได้ จึงส่งผลให้จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงลดลง ส่วนเวลาที่ใช้ในการตรึงรูปพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้เมื่อทำการพิจารณาจะเห็นว่าการตรึงเซลล์ในชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพจำนวน 1 กรัม 3 กรัม และ 5 กรัม พบว่าจำนวนเซลล์ยีสต์ต่อกรัมของวัสดุตรึงรูปลดลงตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เวสารัช และคณะ (2556) ในการผลิตเอทานอลจากใบตองในถังหมักแบบแพคเบดด้วยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปบนซังข้าวโพด โดยพบว่า ความสามารถในการตรึงเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณวัสดุตรึงรูปกับระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงเซลล์ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงเซลล์ยีสต์ในชานอ้อยจะเห็นว่า ชานอ้อยร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงต่อปริมาณวัสดุตรึงที่ใช้สูงสุดคิดเป็น 1.90×10^8 เซลล์ต่อมิลลิกรัม เนื่องจากจำนวนชานอ้อยที่ใช้มีความสอดคล้องกับจำนวนเชื้อที่มีมากกว่าจำนวนชานอ้อยจำนวนอื่น โดยการใช้ชานอ้อยร้อยละ 3 และร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนชานอ้อยที่มากกว่าจำนวนเซลล์ที่เจริญได้ ทำให้ชานอ้อยเหลือ คือเซลล์สามารถถูกตรึงรูปในชานอ้อยได้เกือบทั้งหมดแต่ชานอ้อยบางส่วนอาจไม่มีเซลล์หรือมีเซลล์อยู่ในปริมาณน้อย ดังนั้นจึงเลือกใช้ชานอ้อยร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่เวลา 30 นาที ในการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลต่อไป



รูปที่ 1 จำนวนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพในปริมาณต่าง ๆ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 120 รอบต่อนาทีที่เวลาต่าง ๆ

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางกายภาพของชานอ้อย (รูปที่ 2 a-c) พบว่า โครงสร้างของชานอ้อยหลังการปรับสภาพ (รูปที่ 2b) จะมีช่องว่างสำหรับให้เซลล์แทรกตัวอยู่ และพื้นที่หน้าตัดที่แตกต่างกันไปเปรียบเทียบกับก่อนการปรับสภาพ (รูปที่ 2a) จึงทำให้สามารถตรึงรูปเซลล์ได้อย่างดี (รูปที่ 2c) ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ เวสารัช และรัชพล (2556) ที่ศึกษาการใช้ประโยชน์วัสดุตรึงรูปจากวัสดุธรรมชาติสำหรับการตรึงเซลล์ และใช้ในการผลิตเอทานอล



รูปที่ 2 โครงสร้างทางกายภาพของชานอ้อย ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (a) ก่อนการปรับสภาพ (b) หลังการปรับสภาพด้วย (c) ชานอ้อยตรึงรูป (ร้อยละ 1 เวลา 30 นาที)

2. การศึกษาการเตรียมตัวอย่างเซลล์ยีสต์ตรึงรูปเพื่อนำไปใช้งาน

จากการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในเซลล์ยีสต์ตรึงรูปต่อการผลิตเอทานอลตรึงโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ตรึงรูปในชานอ้อยภายใต้การอบที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาอบที่ 60 120 180 240 และ 300 นาที เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนการอบ (Control) และเครื่อง freeze dry จากตารางที่ 1 พบว่า อุณหภูมิและเวลาในการอบที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อร้อยละความชื้นในวัสดุตรึง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เถลิงราช และคณะ (2555) กล่าวว่าในช่วงเริ่มต้นการอบแห้งจะเกิดการระเหยของน้ำอิสระที่ผิวของวัสดุเท่านั้น เมื่อระยะเวลาผ่านไปน้ำที่อยู่ภายในโครงสร้างมายังอากาศแวดล้อมทำให้ความชื้นลดลงตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาร่วมกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น พบว่า การเตรียมตัวอย่างเซลล์ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสม โดยมีค่าร้อยละความชื้นในวัสดุตรึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น เท่ากับ 25.79±0.10 1.03 ± 0.05 กรัมต่อลิตร และ 3.59 ± 0.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ยีสต์ตรึงรูปก่อนการอบ (Control) และแบบfreeze dry ทั้งนี้เนื่องจาก Control มีร้อยละความชื้นที่สูงไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในระยะยาว และวิธีการ freeze dry ใช้ระยะเวลานานในการเตรียมตัวอย่าง

3. การศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลและการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339ที่ตรึงรูปในชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพโดยเลือกสภาวะที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ในรอบแรกพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือจะมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ โดยลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 12-24 เนื่องจากยีสต์ที่ถูกตรึงรูปในชานอ้อยอาจมีการการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณเอทานอลจะเกิดขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาในการหมักนานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ

งานวิจัยของ เวสารัช และคณะ (2556) โดย พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงเนื่องจากยีสต์ที่ถูกตรึงรูปในชานอ้อยอาจมีการการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือสามารถปรับตัวและใช้อาหารได้มากขึ้น ในขณะที่การผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นคงที่และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาในการหมักมากขึ้น จากตารางที่ 2 พบว่า มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอล (P) อัตราการผลิตเอทานอล (Qp) และผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 2.21 กรัมต่อลิตร 1.18 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.09 กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ใช้ ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ร้อยละความชื้นในวัสดุ น้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น และค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ตรึงรูปในซานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพภายใต้การอบที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่เวลา 60 120 180 240 และ 300 นาที ตามลำดับ และโดยวิธีการ freeze dry เพื่อทำการหมักภายใต้สภาวะการเขย่า 120 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

สภาวะ	ความชื้นในวัสดุตรึง (%)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (Q_p) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (E_y)(%)
Control	100 ± 0.00^{a}	0.91 ± 0.02^{b}	4.32 ± 1.23^{a}	0.23±0.06^{a}	0.18±0.05^{a}	44.66±12.01^{a}
Freeze dry	23.17 ± 0.46^{f}	0.92 ± 0.03^{b}	4.35 ± 0.99^{a}	0.22±0.05^{a}	0.18±0.04^{a}	43.55±8.90^{a}
30°C,60 min.	74.78 ± 4.08^{b}	0.92 ± 0.04^{b}	3.62 ± 0.47^{ab}	0.19±0.02^{a}	0.15±0.02^{a}	36.41±3.16^{ab}
30°C,120 min.	57.51 ± 3.66^{c}	0.97 ± 0.03^{b}	3.78 ± 0.06^{ab}	0.20±0.01^{a}	0.16±0.00^{a}	38.24±1.66^{ab}
30°C,180 min.	43.62 ±2.77^{d}	0.96 ± 0.10^{b}	3.55 ± 0.92^{ab}	0.19±0.05^{a}	0.15±0.04^{a}	37.67±10.00^{ab}
30°C,240 min.	31.26 ± 3.22^{e}	1.17 ± 0.07^{ab}	3.91 ± 0.10^{a}	0.20±0.01^{a}	0.16±0.00^{a}	40.12±1.82^{a}
30°C,300 min.	27.07 ± 0.21^{ef}	1.23 ± 0.11^{ab}	3.56 ± 0.49^{ab}	0.20±0.02^{a}	0.15±0.02^{a}	38.25±4.87^{ab}
50,°C, 60 min.	25.79 ± 0.10^{f}	1.03 ± 0.05^{b}	3.59 ± 0.72^{ab}	0.19±0.04^{a}	0.15±0.03^{a}	36.35±7.01^{ab}
50°C,120 min.	25.75 ± 0.82^{f}	1.05 ± 0.19^{b}	3.59 ± 0.43^{ab}	0.18±0.02^{a}	0.15±0.02^{a}	36.18±4.00^{ab}
50°C,180 min.	25.19 ± 0.19^{f}	1.11 ± 0.02^{ab}	3.56 ± 0.63^{ab}	0.19±0.02^{a}	0.15±0.03^{a}	37.04±4.46^{ab}
50°C,240 min.	24.60 ± 0.12^{f}	1.20 ± 0.01^{ab}	3.53 ± 0.35^{ab}	0.18±0.03^{a}	0.15±0.01^{a}	36.08±5.71^{ab}
50°C,300 min	24.16 ± 1.57^{f}	1.40 ± 0.46^{a}	3.41 ± 1.42^{ab}	0.18±0.07^{a}	0.14±0.06^{a}	34.83±13.83^{ab}

หมายเหตุ: a, b, c,... เป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ตรึงรูปในชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่(กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (Q_p) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (E_y)(%)
0	19.96±0.21^{a}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}
1	18.65±0.26^{ab}	0.21±0.06^{e}	0.16±0.09^{b}	0.21±0.06^{ab}	33.74±16.45^{ab}
2	17.51±0.48^{bc}	0.30±0.14^{e}	0.26±0.12^{b}	0.15±0.07^{b}	24.47±13.83^{bc}
3	16.62±0.73^{bc}	0.90±0.42^{d}	1.00±0.35^{ab}	0.30±0.14^{a}	52.03±22.58^{a}
6	15.84±0.44^{cd}	1.05±0.34^{cd}	1.33±0.68^{ab}	0.18±0.06^{b}	49.60±13.93^{ab}
12	13.96±1.83^{d}	1.55±0.14^{bc}	0.83±1.96^{ab}	0.13±0.01^{b}	53.59±16.17^{a}
18	3.75±2.43^{e}	2.08±0.55^{ab}	0.20±0.02^{b}	0.12±0.03^{bc}	24.92±4.08^{bc}
24	1.87±0.63^{e}	2.21±0.42^{a}	1.18±4.37^{a}	0.09±0.02^{bc}	23.89±4.12^{bc}

หมายเหตุ: a, b, c,... เป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น และค่าพารามิเตอร์ต่างๆโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ตรึงรูปในชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

รอบการหมัก	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (Q_p) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (E) (%)	ผลการผลิต (%)
1	1.87±0.63[a]	2.21±0.42[a]	0.12±0.02[a]	0.09±0.17[a]	23.89±4.12[a]	100.00
2	0.93±0.14[b]	2.07±0.81[a]	0.11±0.04[a]	0.08±0.32[a]	22.21±8.51[a]	93.67
3	0.78±0.02[b]	1.99±0.80[a]	0.10±0.04[a]	0.08±0.32[a]	20.44±7.94[a]	89.89
4	0.80±0.06[b]	1.53±0.94[a]	0.08±0.05[a]	0.06±0.40[a]	16.44±10.18[a]	69.08
5	0.76±0.04[b]	1.11±0.92[a]	0.06±0.05[a]	0.04±0.40[a]	11.81±9.63[a]	50.23

หมายเหตุ: a, b, c,... เป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p<0.05$)

เมื่อพิจารณาผลของการศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป จากตารางที่ 3 พบว่าเชื้อยีสต์ ตรึงรูปมีความสามารถในการผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่องได้มาสูงถึงจำนวน 5 รอบ โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มลดลงตามจำนวนรอบที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ และส่งผลให้ร้อยละของผลผลิตลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 ในรอบที่ 5 ของการหมัก ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากประสิทธิภาพในการทำงานเซลล์ยีสต์ลดลง โดยความเข้มข้นของเอทานอลของการหมักรอบที่ 1 - 5 คือ 2.21±0.42, 2.07±0.81, 1.99±0.80, 1.53±0.94 และ 1.11±0.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยคิดเป็นร้อยละของผลผลิต เท่ากับ 100, 93.67, 89.89, 69.08 และ 50.23 ตามลำดับ ทำนองเดียวกับงานวิจัยของรัชพลและคณะ (2555) โดยพบว่า สามารถใช้เซลล์ตรึงรูปในการหมักเอทานอลแบบกะซ้ำได้อย่างน้อย 3 ครั้ง

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ คือการศึกษาปริมาณวัสดุตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ยีสต์ พบว่า ชานอ้อยร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่เวลา 30 นาที มีความสามารถตรึงเซลล์ได้ 1.9×10^8 เซลล์ต่อมิลลิกรัม และการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในเซลล์ยีสต์ตรึงรูปต่อการผลิตเอทานอล พบว่า การเตรียมวัสดุอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสที่เวลา 60 นาที มีความชื้นที่เหมาะสมในเซลล์ยีสต์ตรึงรูปต่อการผลิตเอทานอล ซึ่งมีค่าร้อยละความชื้นในวัสดุตรึงเท่ากับ 25.79 ± 0.10 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่เท่ากับ 1.03 ± 0.05 กรัมต่อลิตรและปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นเท่ากับ 3.59 ± 0.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. การศึกษาประสิทธิภาพการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ตรึงรูปในการผลิตเอทานอล คือ การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ตรึงรูปบนชานอ้อย พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเท่ากับ 1.87±0.63 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นเท่ากับ 2.21±0.42 กรัมต่อลิตร

3. การศึกษาประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชานอ้อย พบว่า ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงรูปในชานอ้อยที่ถูกใช้ทั้งหมด 5 รอบ ของการหมักมีปริมาณเอทานอลลดลงในระดับสูงกว่า 50% จึงสามารถที่จะนำกลับไปใช้ซ้ำในการหมักรอบต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากหน่วยวิจัยจุลินทรีย์เพื่อการเกษตร คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เอกสารอ้างอิง

ประสิทธิชัย บุญสวาสดิ์ และ ยุทธพงษ์ พิลัย. 2549. การออกแบบและจำลองระบบการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

วนิดา ปานอุทัย. 2553. การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เถลิงราช นิลเชื้อวงศ์, อนุพงศ์ เอกผล, สุภวรรณ ฏิระวณิชย์กุล และยุทธนา ฏิระวณิชย์กุล. 2555. การอบแห้งยางแผ่นผึ่งแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนและเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์สำหรับวิสาหกิจและกลุ่มสหกรณ์สวนยางพาราขนาดย่อม. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 17(2), 50-59.

เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และ รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2556. การใช้ประโยชน์วัสดุตรึงรูปจากวัสดุธรรมชาติสำหรับการตรึงเซลล์ และประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. Veridian E-Journal SU. 6(1), 795-807.

เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์, อรอนงค์ อินทร์ตา, สุทธิเดช ปรีชารัมย์ และ รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2556. การผลิตเอทานอลจากใบตองในถังหมักแบบแพคเบดด้วยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปบนซังข้าวโพด. วารสารวิจัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก. 6(2), 21-29.

รัชพล พะวงศ์รัตน์, มาลินี อันภักดี และ สุทธิเดช ปรีชารัมย์. 2555. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน. Veridian E-Journal SU. 6(2), 1025 -1036.

AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). 1980. Official methods of analysis. 13th ed. AOAC, Washington, DC.

Beom seo, H., H. Joo kim. O. Kyu Lee, J. Hye Ha, H. Yong Lee and K. Hwan Jung. 2009. Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidationand its application to bioethanol production process. J Ind Microbiol Biotechnol. 36, 285-292.

Genisheva, Z., S. I. Mussatto, J. M. Oliveira and J. A. Teixeira. 2011. Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol Production. Ind. Crops Prod. 34, 979-985.

Jame, C.S. 1995. Analytical chemistry of foods. London: Blackie A&P.