จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

รายงานผลการวิจัย

การผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิงจากน้ำตาลเพนโตส

THE PRODUCTION OF FUEL ALCOHOL FROM A PENTOSE SUGAR

โดย

พรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ มุกดา ภูหิรัญ

ปีงบประมาณ 2537

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ไซโลสเป็นน้ำตาลที่พบอยู่ทั่วไปในพืชบกรวมทั้งวัสดุการเกษตรที่เหลือทิ้ง การหมักน้ำตาลไซโลสไปเป็นเอทธานอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์เชื้อเพลิงที่สำคัญ อาจทำได้โดยใช้ P. tannophilus การวิจัยถึงสภาวะที่เหมาะสมในการหมักของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant ทำให้ทราบว่า ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอทธานอลได้ดีในช่วง pH ต่ำ (2.5-3.5) โดยสายพันธุ์ mutant มีความสามารถผลิตได้สูงกว่าและมีช่วง pH ที่กว้างกว่าถึง 4.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลของทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ ช่วง 30-35°C และสภาวะการมีอากาศประเภท semiaerobic ในสภาวะที่เหมาะสม สายพันธุ์ mutant สามารถผลิตเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลสได้ ประมาณ 0.31 g เอทธานอล ต่อ g ไซโลส ขณะที่สายพันธุ์ wild type ผลิตได้ในระดับ ประมาณ 0.23 g เอทธานอลต่อ g ไซโลส งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงแนวทางการหมักน้ำตาลไซโลสเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตในการหมักวัสดุการเกษตรให้เป็นแอลกอฮอล์เชื้อเพลิงต่อไป

ABSTRACT

Xylose is a sugar commonly found in land plant biomass including crop residues. The fermentation of xylose to ethanol may be accomplished by P. tannophilus. The investigation of optimum conditions for xylose fermentation by the wild type and mutant strains of P. tannophilus revealed that both prefer lower pHs, between 2.5 - 3.5, with the mutant being more tolerant at a broader range of pH to 4.6. The optimum temperature for fermentation of the two strains were between 30-35^{o}C and under semiaerobic conditions. Under optimum conditions, the mutant yielded approximately 0.31 g ethanol per g xylose, while the wild type yielded only approximately 0.23 g/g. Suitable conditions have been established for xylose fermentation which could be beneficial to the conversion of crop residues into fuel alcohol.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2537 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอขอบคุณ ฝ่ายวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ นายพรเทพ ถนนแก้ว นายพงศ์ธารินทร์ ลัดตระกูล และนางสาวสุวรรณา นพพรพันธุ์ ซึ่งช่วยให้งานวิจัยนี้ลุล่วงไปด้วยดีและขอขอบคุณ Dr. T. W. Jeffries แห่ง United States Department of Agriculture, Madison, Wisconsin. USA ผู้กรุณามอบเชื้อสายพันธุ์ Mutant ให้ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	3
ผลการวิจัย	7
การอภิปรายผล	26
ข้อสรุปและเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม	29

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% โดย P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant ที่ pH 2.5, 3.5, 4.6 และ 6.5..... 9

2. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% โดย P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant ที่อุณหภูมิ 25°C, 30°C และ 35°C..... 16

3. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่สภาวะอากาศต่างกันของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 21

สารบัญภาพ

ภาพประกอบที่ หน้า

1. ผังแสดงถึงการทดลองการหมักน้ำตาลไซโลสและการหาสภาวะที่เหมาะสม..... 5

2. ลักษณะเซลของ

ก. P. tannophilus wild type..... 8

ข. P. tannophilus mutant NO_3NO_3-4..... 8

3. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH ระหว่าง 2.5 ถึง 6.5 ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 10

4. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 2.5 ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 12

5. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 3.5 ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 13

6. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 4.6 ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 14

7. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 6.5 ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 15

8. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่อุณหภูมิ 25°C, 30°C และ 35°C ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 17

9. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่อุณหภูมิ 25°C ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 18

10. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่อุณหภูมิ 30°C ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 19

11. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่อุณหภูมิ 35°C ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 20

12. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ในสภาวะ aerobic, semiaerobic และ anaerobic ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 22

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ หน้า

13. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ในสภาวะ aerobic ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 23
14. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ในสภาวะ semiaerobic ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 24
15. การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ในสภาวะ anaerobic ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant..... 25

บทนำ

น้ำตาลไซโลส (D-xylose) เป็นน้ำตาลที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยคาร์บอนห้าตัว เป็นน้ำตาลที่มีความสำคัญคือ เป็นองค์ประกอบหลักใน hemicellulose ซึ่งประกอบเป็นโครงสร้างแทรกอยู่ตามผนังเซลล์ของพืชบกทั่ว ๆ ไป ยกตัวอย่างเช่น ฟางข้าวสาลี (wheat straw) มี hemicellulose 29 % เป็นองค์ประกอบ มีน้ำตาลไซโลสประมาณ 21 % ของปริมาณ carbohydrate ทั้งหมด ขณะที่ต้นข้าวโพดมีน้ำตาล ไซโลส 15.5 % เป็นต้น (Goldstein, 1981) ในเทคโนโลยีของการนำเอาวัสดุการเกษตรมาผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง ส่วนของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ที่เป็นองค์ประกอบในเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งมาจากโครงสร้างหลักของผนังเซลล์พืชจะถูกใช้ในการหมัก (fermentation) เพื่อให้ได้เอทธานอล โดยยีสต์ปกติที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเช่น Saccharomyces cerevisiae ยีสต์พวกนี้ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสที่มีอยู่จำนวนมากพวกนี้ให้เป็นแอลกอฮอล์ได้ จึงเป็นส่วนที่ถูกทิ้งไปกับกากอย่างน่าเสียดาย (Slininger, 1982)

Boidin และ Adzet ในปี 1957 เป็นผู้แยกเชื้อยีสต์ชนิดหนึ่งได้จากน้ำยางจากเปลือกไม้ที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง และส่งให้สถาบัน Agriculture Research Culture Collection ตั้งเป็นเชื้อยีสต์ genus ใหม่คือ Pachysolen tannophilus ซึ่ง Schneider, Wang, Chan, Maleszka (1981) ได้ทดลองและรายงานถึงยีสต์ชนิดนี้ว่ามีความสามารถใช้น้ำตาลไซโลสในกระบวนการหมักให้เกิดเอทธานอลได้ ทำให้มีผู้สนใจและศึกษาการหมักน้ำตาลไซโลสให้เป็นเอทธานอล อาทิเช่น Slininger และคณะ (1982) และ Punnapayak และ Emert (1983) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำตาลไซโลสจากสายพันธุ์ P. tannophilus NRRL Y-2460 ต่อมา Punnapayak และ Emert (1986) ได้ทดลองและแสดงถึงการใช้ P. tannophilus ในการหมักวัสดุการเกษตรประเภทฟางข้าว

และซังข้าวโพดเพื่อผลิตเอทธานอล และได้มีรายงานถึงความสามารถของ P. tannophilus ในการหมักได้ทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ต่อมา Jeffries (1984) แห่ง United State Department of Agriculture (USDA) สหรัฐอเมริกาได้ทดลองแปลงสายพันธุ์ของ P. tannophilus โดยวิธี mutagenesis จากการฉายแสง UV และได้เลือกสายพันธุ์ mutant No_3-No_3 ที่คัดเลือกได้จากการเลี้ยงเชื้อใน nitrate-xylitol broth ทำให้ได้สายพันธุ์ที่มีลักษณะเด่นกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ทั้งสามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทธานอลได้ในอัตราสูงกว่า การที่ได้สายพันธุ์ใหม่นี้ทำให้เกิดแนวทางใหม่ที่จะใช้ประโยชน์จาก P. tannophilus ในการหมักน้ำตาลไซโลสเพื่อเพิ่มผลผลิตของเอทธานอลได้มากยิ่งขึ้น จากที่มีอยู่แล้วในการหมักยีสต์อื่น ๆ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการวิจัยนี้ขึ้นเพื่อศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการหมักน้ำตาลไซโลส ในการผลิตเอทธานอล เปรียบเทียบสายพันธุ์ปกติของ P. tannophilus และสายพันธุ์ mutant No_3-No_3 ซึ่งยังไม่มีผู้ใดศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบกันมาก่อน การหาสภาวะที่เหมาะสมนี้มีความสำคัญก่อนที่จะสามารถนำสายพันธุ์นี้ไปใช้ในวงการอุตสาหกรรมหมักเอทธานอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่สำคัญ มีคุณสมบัติเป็นที่ยอมรับ เป็นเชื้อเพลิง สามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

การวิจัยครั้งนี้จะครอบคลุมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำตาลไซโลส ให้ได้ผลผลิตคือเอทธานอล โดยเปรียบเทียบระหว่างยีสต์ P. tannophilus สายพันธุ์ปกติ (wild type) กับ P. tannophilus สายพันธุ์แปลง (mutant, No_3-No_3) สภาวะที่เหมาะสมจะครอบคลุมถึง pH, อุณหภูมิ และสภาวะการมีอากาศ (aeration)

วิธีการวิจัย

I. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือยีสต์ Pachysolen tannophilus NRRL-Y2460 เป็นสายพันธุ์ wild type ได้รับจาก University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas, USA. และ P. tannophilus No_3 - No_3 - 4 เป็นสายพันธุ์ mutant ได้รับจาก Dr. T.W. Jeffries United States Department of Agriculture (USDA), Madison, Wisconsin, USA

การเลี้ยงเชื้อแบ่งได้เป็น

1. การเตรียมหัวเชื้อ (stock culture) เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร Yeast - Malt Extract (YM) ซึ่งประกอบด้วย 0.3% Bactopeptone, 1.0% glucose, 1.5% agar และน้ำกลั่น เลี้ยงหัวเชื้อในรูปของ slant culture

2. การเตรียมเชื้อตั้งต้น (inoculum) เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YM ประกอบด้วย 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% Bactopeptone, 0.5% D-xylose และน้ำกลั่น การเตรียม inoculum ทำโดยถ่ายเชื้อจาก slant ลงมาในอาหาร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร อุดจุกสำลี เขย่าที่อุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่เลี้ยงได้จะใช้เป็นเชื้อตั้งต้นสำหรับการทดลองหมักต่อไป

3. การตรวจดูลักษณะของเชื้อตั้งต้น ทำโดยการทำ whole mount ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 X

II. การหมักน้ำตาลไซโลส และการหาสภาวะเหมาะสม

การหมักน้ำตาลไซโลสใช้เทคนิคเป็นขั้นตอนเริ่มจากการถ่ายเชื้อจาก slant มาเตรียม inoculum แล้วจึงถึงขวดหมัก ซึ่งในขวดหมักนี้แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่หนึ่งเพิ่มปริมาณเซล กับระยะที่สองซึ่งเป็นการหมักน้ำตาลไซโลส ในสภาวะต่างๆ ดังผังแสดงการทดลอง (ภาพประกอบที่ 1)

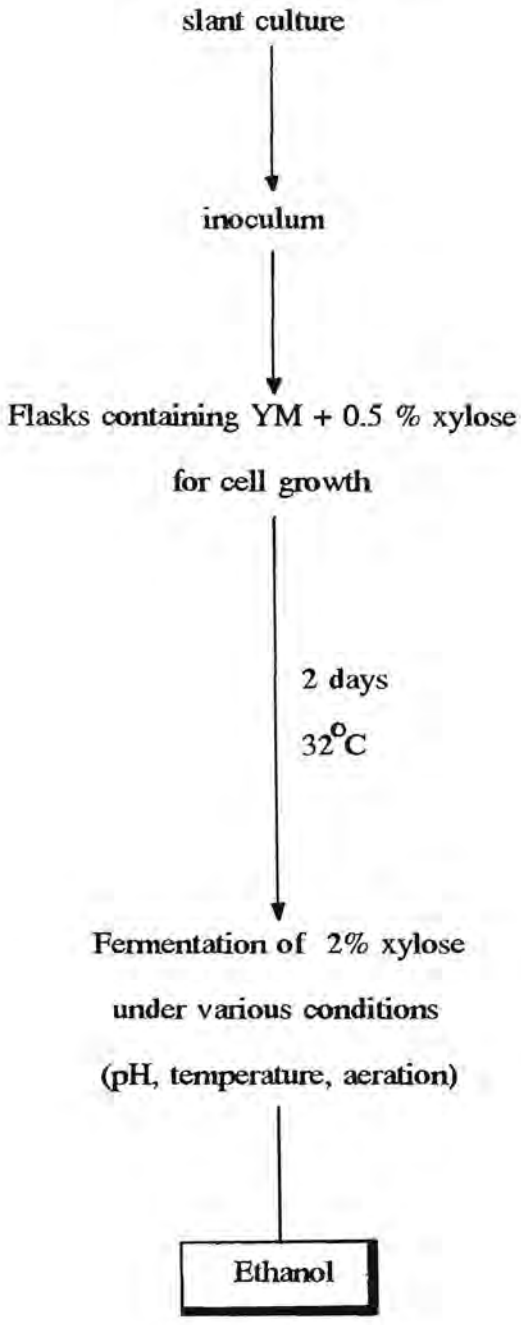
1. การหมักที่สภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) ต่างกัน

ใช้อาหารเหลวสูตร YM ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็น C-source 0.5% ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ pH 2.5, 3.5, 4.6 และ 6.5 ใช้ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรของแต่ละ flask 96 มิลลิลิตร เติม inoculum ที่เตรียมไว้แล้ว 4 มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลอยู่ในระดับ 10^8 เซล/มล ปมเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเซล เป็นเวลา 2 วัน จนได้เป็น 10^8 เซล/มล ใน flask ที่ใช้หมัก เติมน้ำตาลไซโลสลงไปจนได้ ความเข้มข้น 2% เริ่มนับเวลาการหมักน้ำตาลไซโลสจาก จุดนี้ ไปจนถึง 4 วัน

2. การหมักที่สภาวะอุณหภูมิต่างกัน

ใช้อาหารเหลวสูตร YM ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็น C-source 0.5 % ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ pH 2.5 ใช้ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรในแต่ละ flask 96 มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลอยู่ในระดับ 10^8 เซล/มล ปมเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเซล เป็นเวลา 2 วัน จนได้เป็น 10^8 เซล/มล ใน flask ที่ใช้หมัก ทำที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35^{o}C เติมน้ำตาลไซโลสลงไปจนได้ความเข้มข้น 2% เริ่มนับเวลาการหมักจาก จุดนี้ ไป จนถึง 4 วัน ที่อุณหภูมิเหล่านี้ การควบคุมอุณหภูมิทำโดยใช้ Controlled Environment Incubator Shaker Model G25, New Brunswick Scientific Co, Inc., New Jersey, USA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพประกอบที่ 1. ผังแสดงถึงการทดลองการหมักน้ำตาลไซโลสและการหาสภาวะที่เหมาะสม

3. การหมักที่สภาวะการมีอากาศต่างกัน

ใช้อาหารเหลวสูตร YM ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็น C-source 0.5% ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ pH 2.5 ใช้ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรในแต่ละ flask 96 มิลลิลิตร หรือ 146 มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลอยู่ในระดับ 10^8 เซล/มล ปมเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเซลเป็นเวลา 2 วัน จนได้เป็น 10^8 เซล/มล ทำที่อุณหภูมิ 32°C เติมน้ำตาลไซโลสลงไปจนได้ความเข้มข้น 2% เริ่มนับเวลาการหมัก จากจุดนี้ ไปจนถึง 4 วัน ที่สภาวะ

ก. aerobic คือใช้จุกสำลีอุด flask ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

ข. anaerobic ใช้จุกไม้คอร์คอุด flask ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

ค. semiaerobic ใช้จุกสำลี อุด flask ปริมาตรรวม 150 มิลลิลิตร

การเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างระหว่างการหมักทุกวัน นำมาวัด pH, นับจำนวนเซล วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล และเอทธานอล

การวัด pH ใช้เครื่อง pH meter

การนับจำนวนเซล ใช้วิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Counting chamber ของ Haemacytometer (American Optical)

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล เนื่องจากการทดลองนี้มีน้ำตาลไซโลสเป็น sole C-source จึงใช้วิธี Dinitrosalicylic acid Assay (DNS) เพื่อหาปริมาณน้ำตาลไซโลส ตามวิธีของ Miller (1959)

การวิเคราะห์หาปริมาณเอทธานอล ใช้วิธี Gas Chromatography โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu, 7AG) แบบ flame ionization detector มี Porapak Q column

การทดลองมีการทำ 4 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

ผลการวิจัย

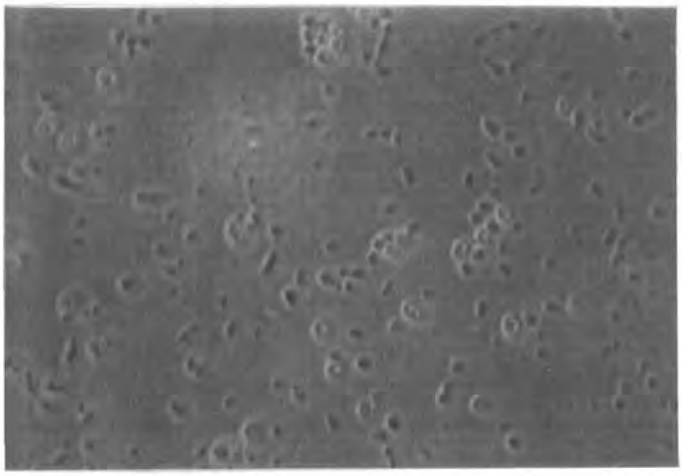
I. การตรวจดูลักษณะของเชื้อตั้งต้น

จากการทำ whole mount slide ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อยีสต์ ทั้ง wild type และ mutant มีลักษณะบริสุทธิ์ โดยเซลของสายพันธุ์ wild type มีลักษณะเล็กกว่าสายพันธุ์ mutant ดังแสดงในภาพประกอบ ที่ 2

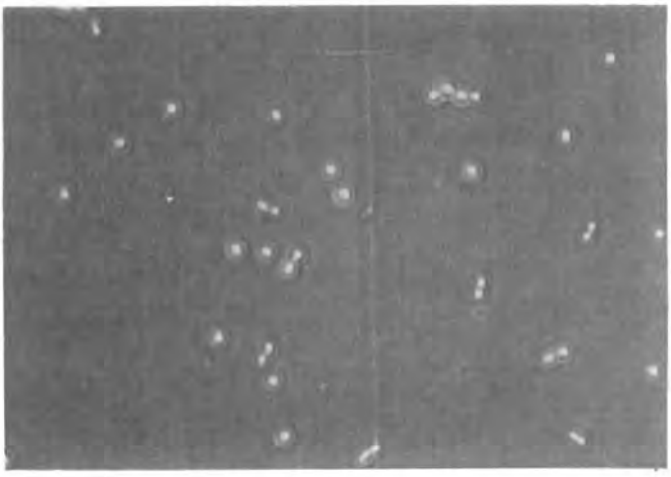
II. การหมักน้ำตาลไซโลสที่สภาวะ pH ต่างกัน

การทดลองหมักน้ำตาลไซโลสที่ pH 2.5, 3.5, 4.5 และ 6.5 ของทั้งสายพันธุ์ wild type และ mutant พบว่า P. tannophilus ทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอทธานอลได้ดีในช่วงที่เป็นกรด ผลผลิตลดลงเมื่อ pH สูงกว่า 4.6 (ตารางที่ 1 และ ภาพประกอบที่ 3) สายพันธุ์ wild type ผลิตเอทธานอลได้ดีที่สุดที่ pH ระหว่าง 2.5 ถึง 3.5 โดยผลิตเอทธานอลได้สูงสุด 0.53-0.55 g/100 ml หรือเท่ากับ 0.265-0.275 g เอทธานอล/g น้ำตาลไซโลส (g/g) แต่เมื่อ pH สูงขึ้นคือที่ pH 4.6 wild type ผลิตเอทธานอลได้สูงสุดได้เพียง 0.33 g/100 ml หรือ 0.165 g/g และลดลงอีกที่ pH 6.5 เป็นเพียง 0.24 g/100 ml หรือ 0.12 g/g

ก



ข



ภาพประกอบที่ 2. ลักษณะเซลของ

ก. **P. tannophilus** wild type NRRL-Y2460

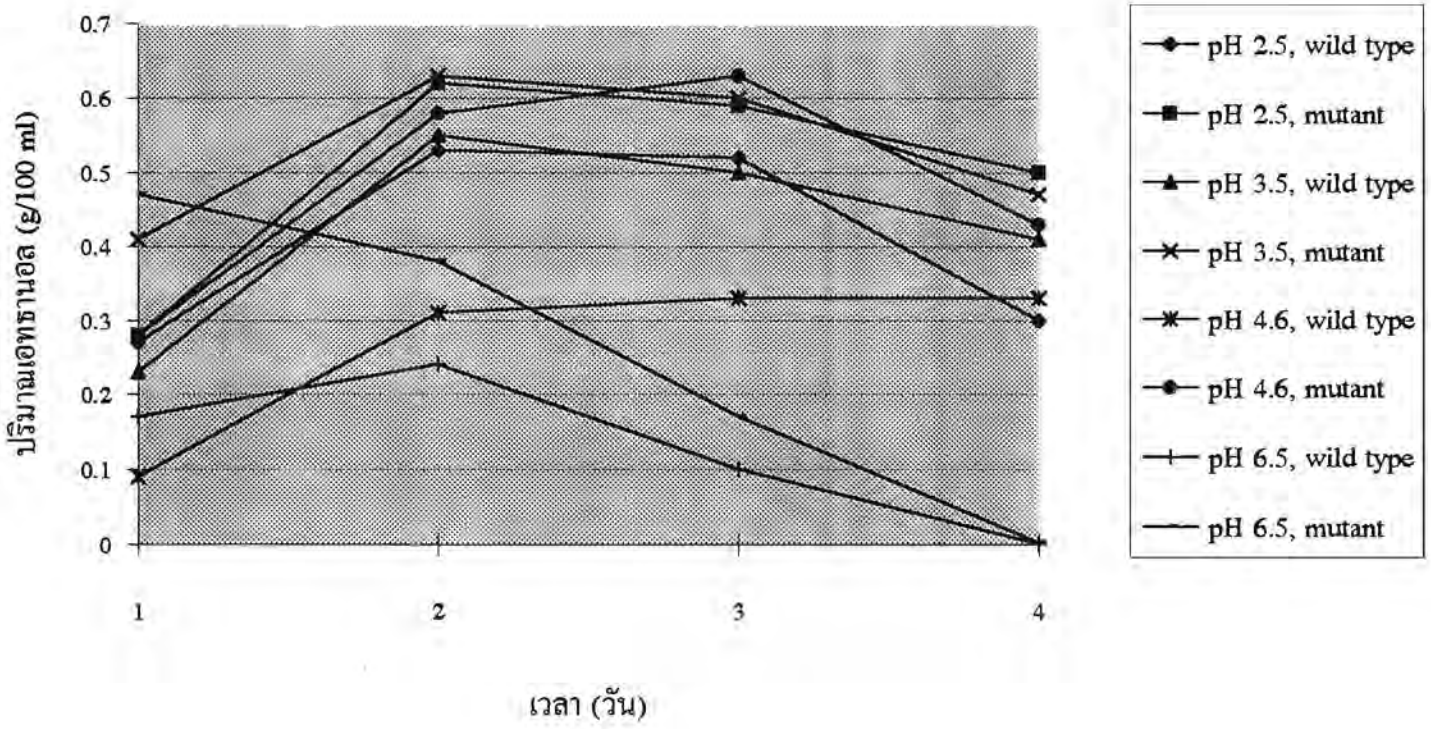
ข. **P. tannophilus** mutant NO_3 NO_3-4

กำลังขยาย 1,000 X

วันที่หมัก	ปริมาณ เอทธานอล (g/100 ml)							
	pH 2.5		pH 3.5		pH 4.6		pH 6.5	
	wild type	mutant	wild type	mutant	wild type	mutant	wild type	mutant
1	0.27	0.28	0.23	0.41	0.09	0.28	0.17	0.47
2	0.53	0.62	0.55	0.63	0.31	0.58	0.24	0.38
3	0.52	0.59	0.50	0.60	0.33	0.63	0.10	0.17
4	0.30	0.50	0.41	0.47	0.33	0.43	0.001	0.003

ตารางที่ 1 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% โดย P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant ที่ pH 2.5, 3.5, 4.6 และ 6.5

ภาพประกอบที่ 3 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH ระหว่าง 2.5 ถึง 6.5 ของ *P. tannophilus* สายพันธุ์ wild type และ mutant



ส่วนสายพันธุ์ mutant พบว่ามีความสามารถผลิตเอทธานอลได้ดีที่สุดในช่วง pH ระหว่าง 2.5 ถึง 4.6 สามารถผลิตเอทธานอลได้ถึง 0.62-0.63 g/100 ml หรือ 0.31-0.315 g/g กราฟแสดงถึงการใช้น้ำตาลไซโลสและการผลิตเอทธานอลของยีสต์ทั้ง 2 ชนิด ที่ pH 2.5 แสดงในภาพประกอบที่ 4, pH 3.5 ภาพประกอบที่ 5, pH 4.6 ภาพประกอบที่ 6 และ pH 6.5 ภาพประกอบที่ 7

<u>การหมักน้ำตาลไซโลสที่สภาวะอุณหภูมิต่างกัน</u>

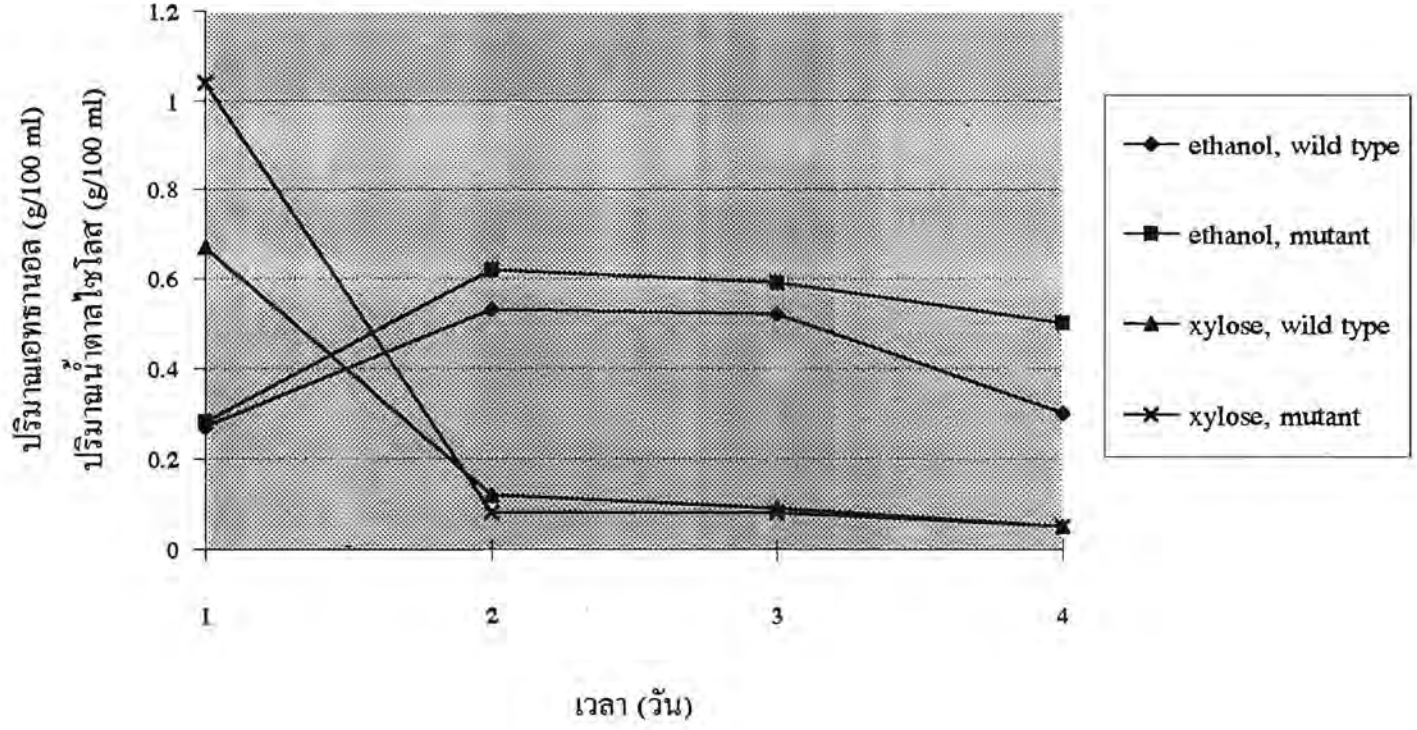
การทดลองหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 2.5 อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C พบว่าสายพันธุ์ mutant มีความสามารถผลิตเอทธานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์ wild type ดังผลแสดงในตารางที่ 2 ภาพประกอบที่ 8 กราฟแสดงถึงการใช้น้ำตาลไซโลสและการผลิตเอทธานอลของยีสต์ทั้ง 2 ชนิด ที่ 25°C แสดงในภาพประกอบที่ 9, 30°C ภาพประกอบที่ 10 และ 35°C ภาพประกอบที่ 11

<u>การหมักน้ำตาลไซโลสที่สภาวะการมีอากาศต่างกัน</u>

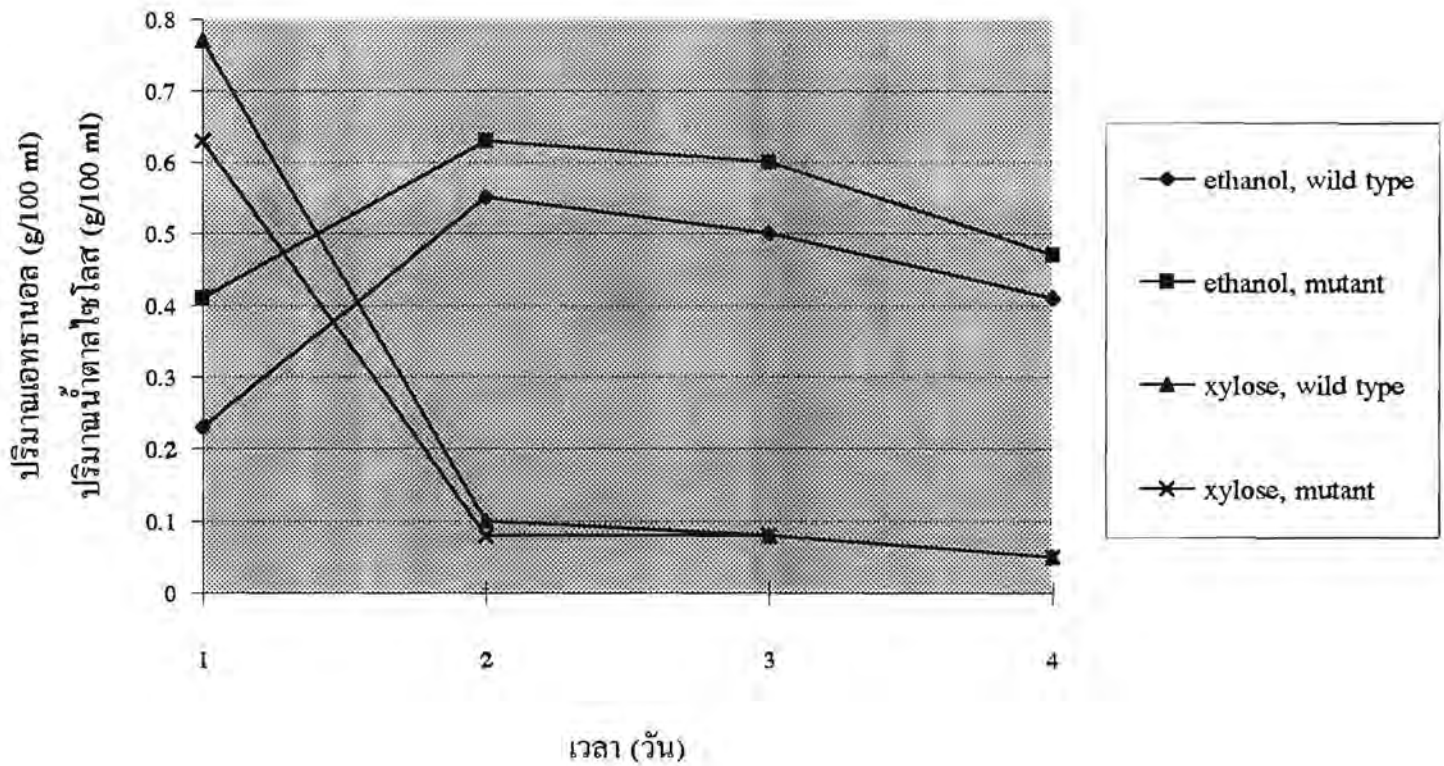
การทดลองหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 2.5 อุณหภูมิ 32°C สภาวะการมีอากาศแบบ aerobic, semiaerobic และ anaerobic พบว่า สายพันธุ์ mutant มีความสามารถผลิตเอทธานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์ wild type ในทุกสภาวะอากาศที่ทดลอง ดังผลแสดงในตารางที่ 3 ภาพประกอบที่ 12

กราฟแสดงถึงการใช้น้ำตาลไซโลส และการผลิตเอทธานอลของยีสต์ทั้ง 2 ชนิดที่สภาวะ aerobic แสดงในภาพประกอบที่ 13, semiaerobic ภาพประกอบที่ 14 และ anaerobic ภาพประกอบที่ 15

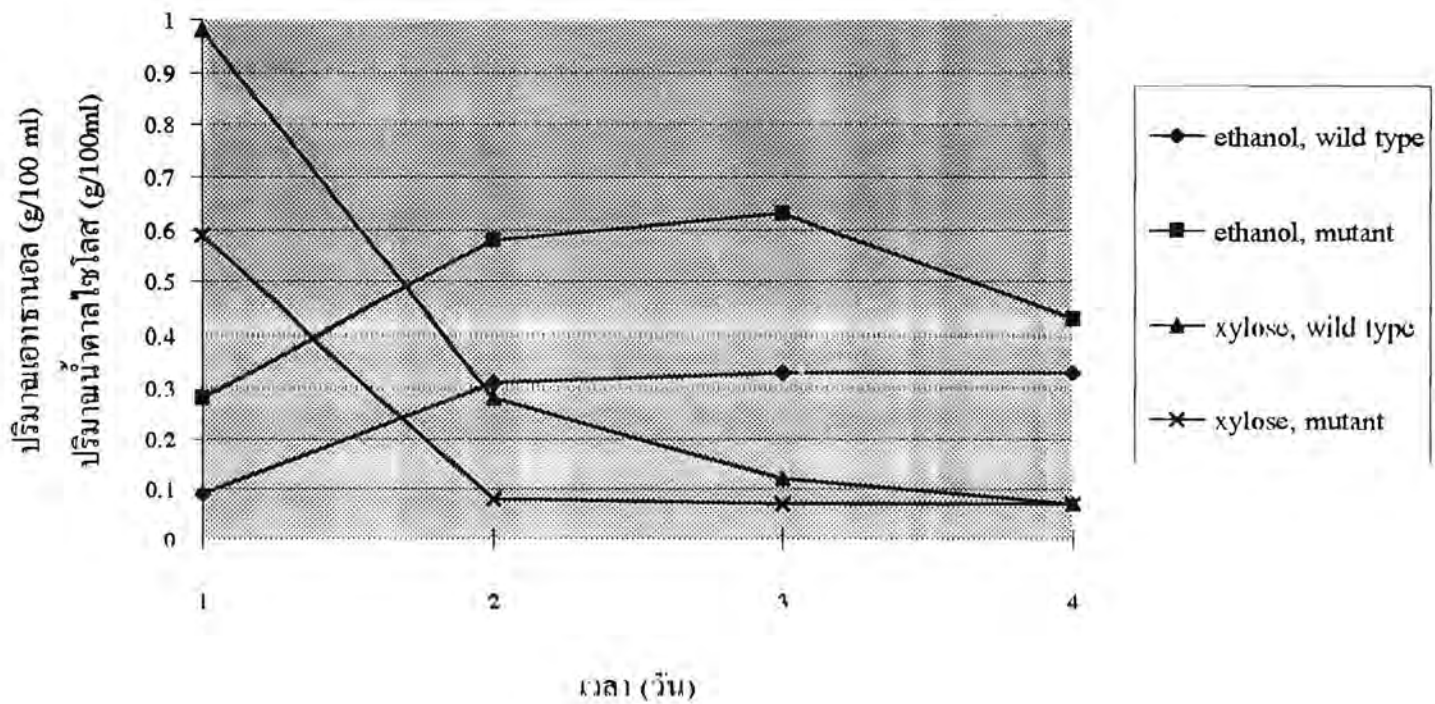
ภาพประกอบที่ 4 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 2.5 ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant



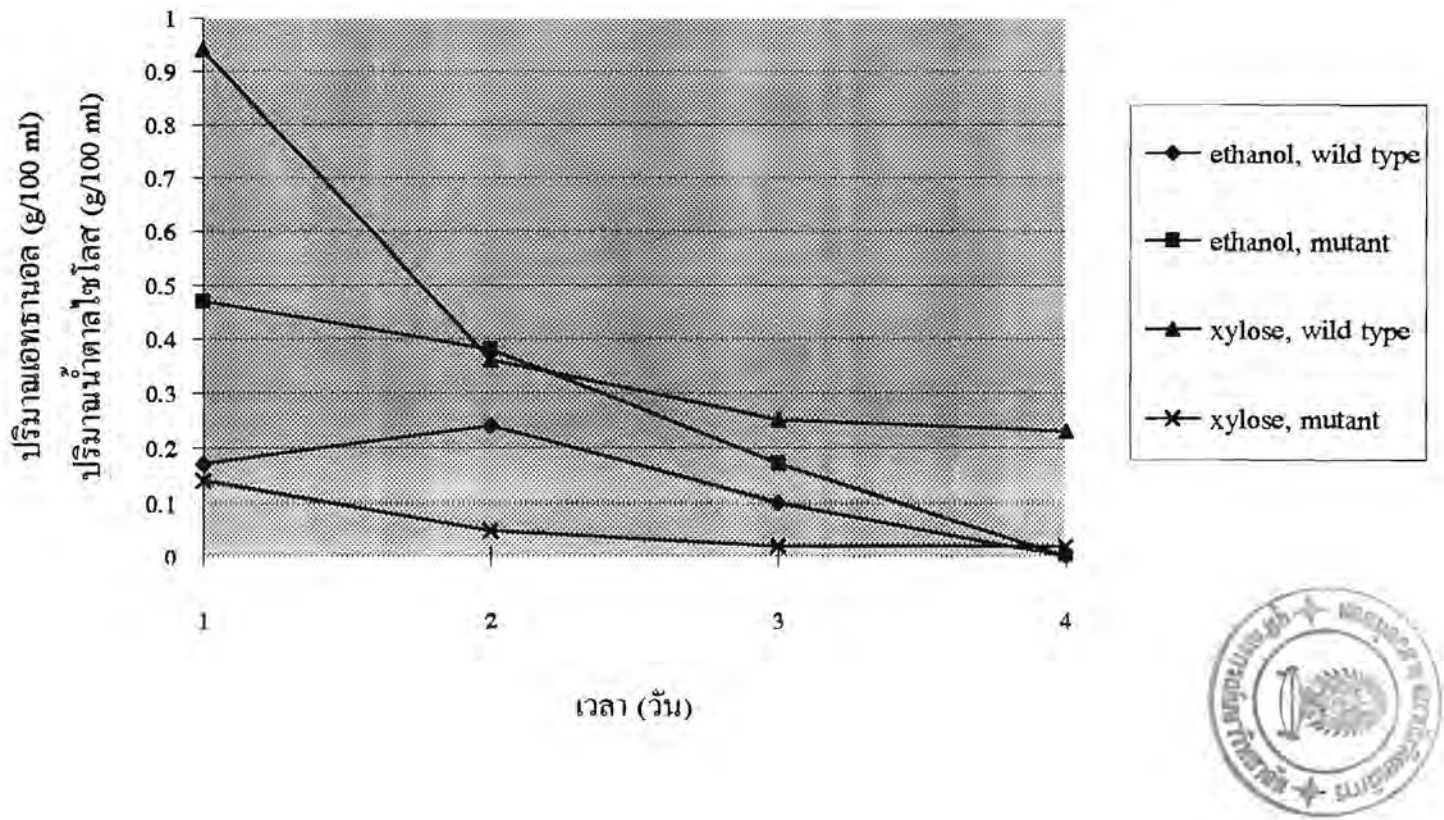
ภาพประกอบที่ 5 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 3.5 ของ *P. tannophilus* สายพันธุ์ wild type และ mutant



ประกอบที่ 6 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่ pH 4.6 ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant



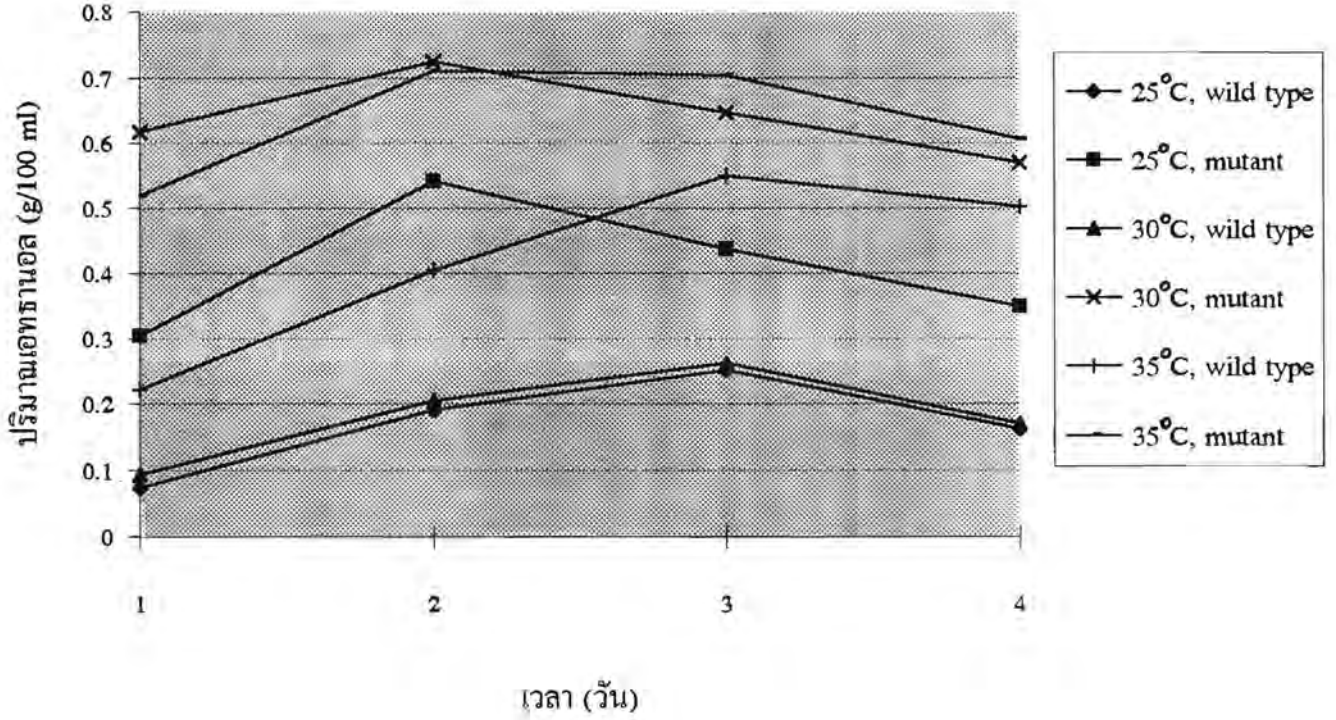
ภาพประกอบที่ 7 การหมักน้ำตาลไซโลส 2 % ที่ pH 6.5 ของ *P. tannophilus* สายพันธุ์ wild type และ mutant



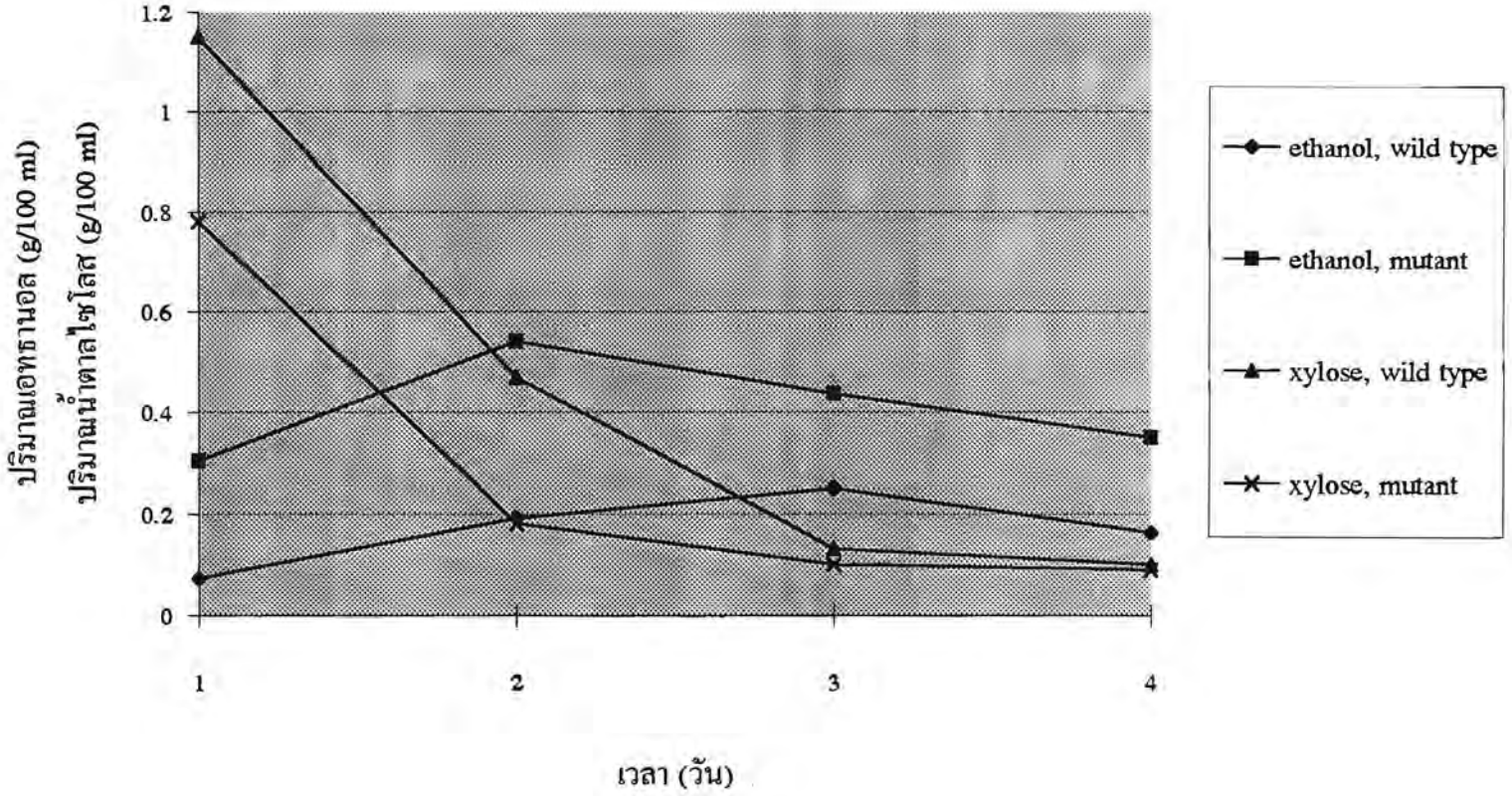
วันที่	ปริมาณเอทธานอล (g/100 ml)					
	25°C		30°C		35°C	
	wild type	mutant	wild type	mutant	wild type	mutant
1	0.073	0.303	0.093	0.617	0.221	0.518
2	0.190	0.541	0.204	0.724	0.404	0.710
3	0.250	0.436	0.261	0.646	0.549	0.703
4	0.162	0.349	0.169	0.569	0.501	0.606

ตารางที่ 2 การหมักน้ำตาลไซรัลส 2% โดย P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant ที่อุณหภูมิ 25°C 30°C และ 35°C

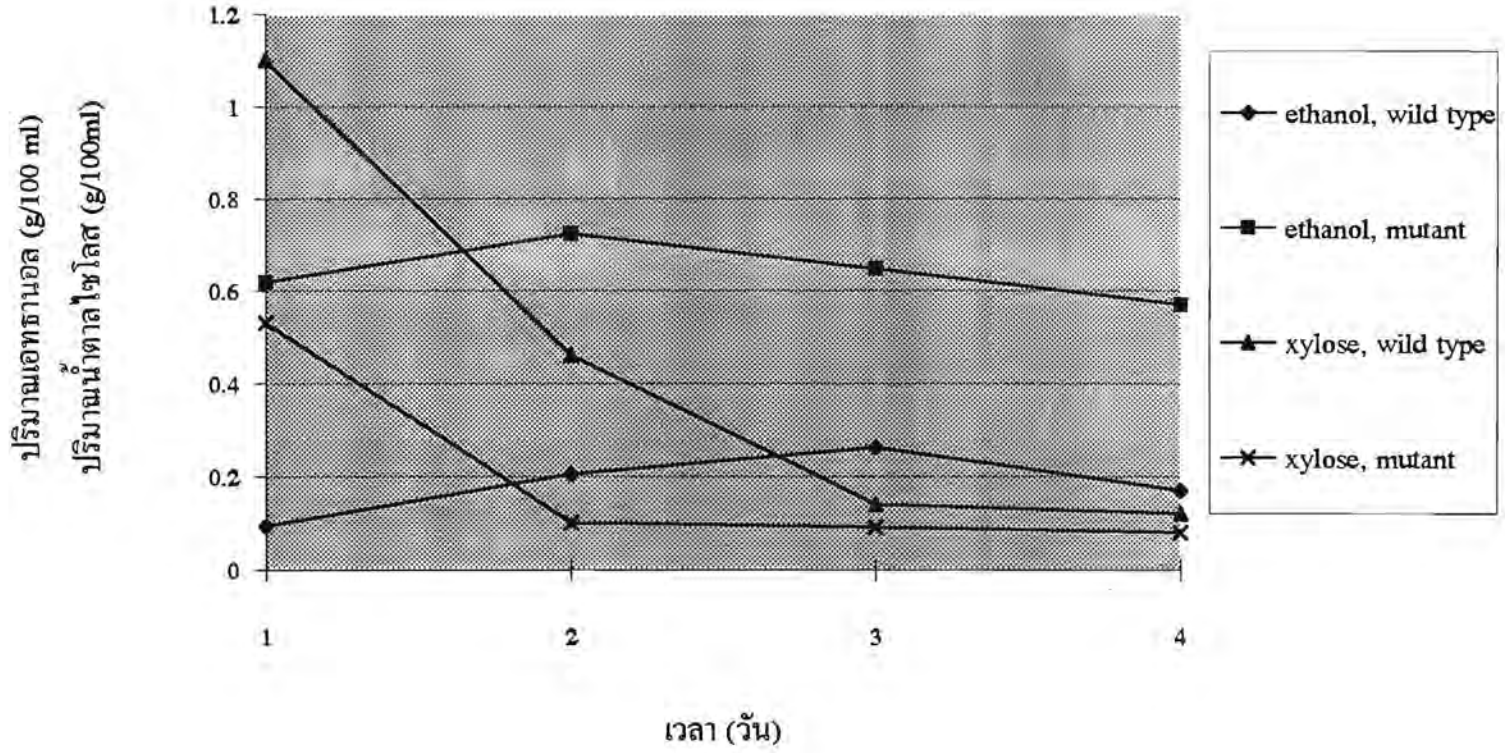
ภาพประกอบที่ 8 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่อุณหภูมิ 25°C, 30°C และ 35°C ของ **P. tannophilus** สายพันธุ์ wild type และ mutant



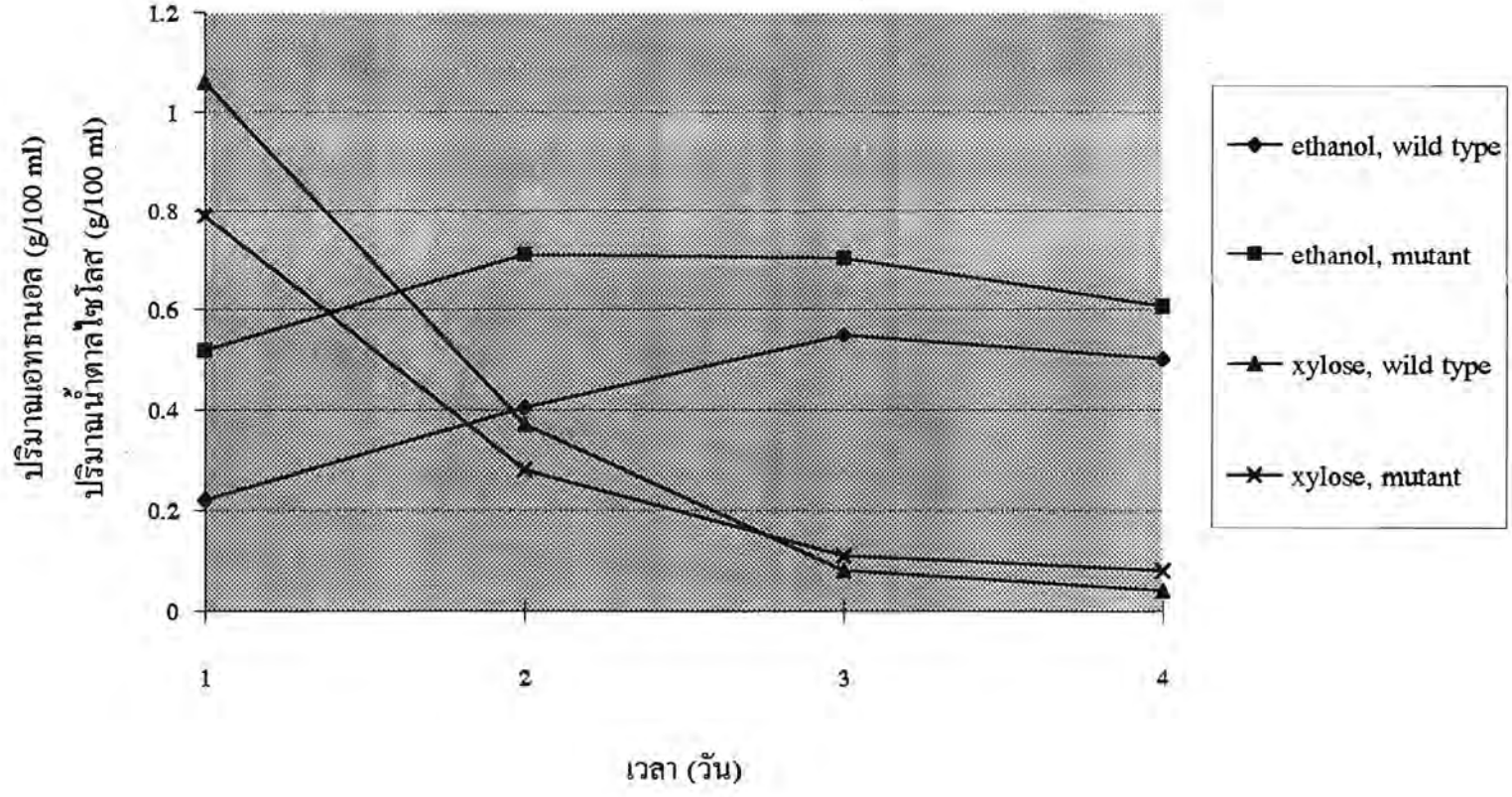
ภาพประกอบที่ 9 การหมักน้ำตาลไซโลส 2 % ที่อุณหภูมิ 25°C ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant



ภาพประกอบที่ 10 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่อุณหภูมิ 30°C ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant



ภาพประกอบที่ 11 การหมักน้ำตาลไซโลส 2 % ที่อุณหภูมิ 35°C ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant

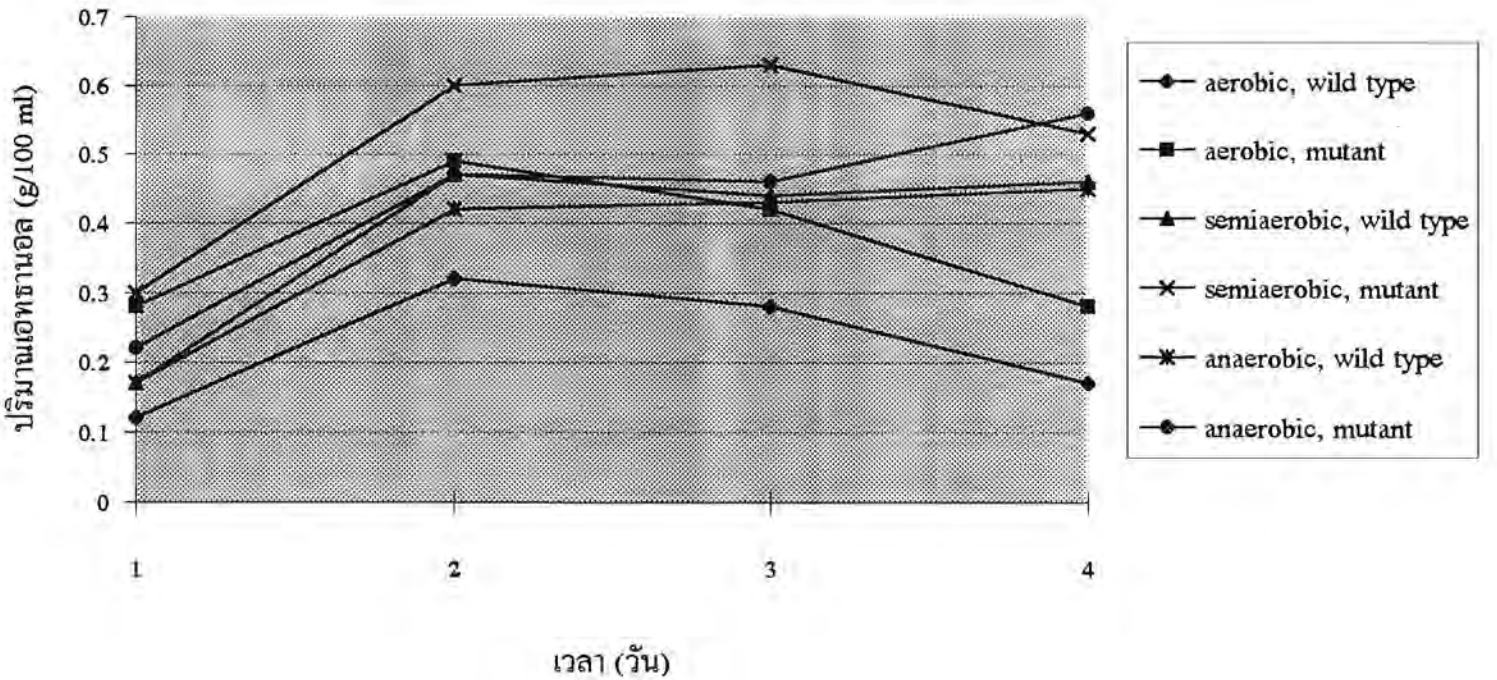


หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

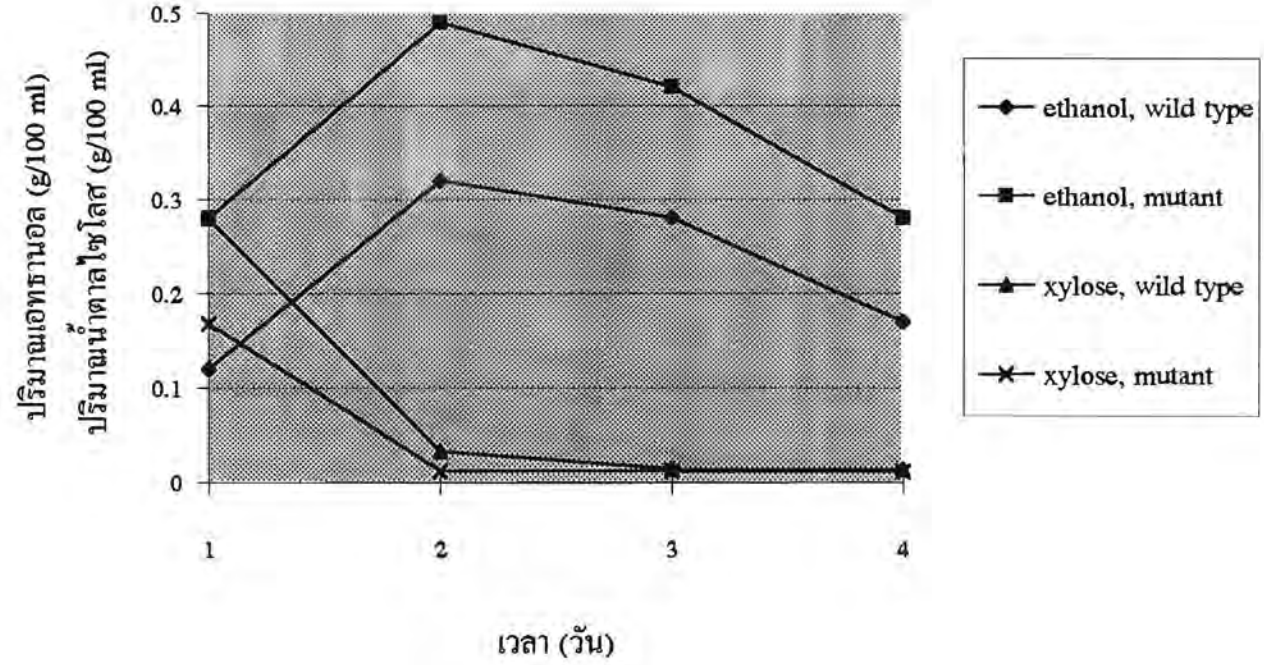
วันที่	ปริมาณเอทธานอล (g/100 ml)					
	สภาวะอากาศ					
	aerobic		semiaerobic		anaerobic	
	wild type	mutant	wild type	mutant	wild type	mutant
1	0.12	0.28	0.17	0.30	0.17	0.22
2	0.32	0.49	0.47	0.60	0.42	0.47
3	0.28	0.42	0.44	0.63	0.43	0.46
4	0.17	0.28	0.46	0.53	0.45	0.56

ตารางที่ 3 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ที่สภาวะอากาศต่างกัน ของ P. tannophilus wild type และ mutant

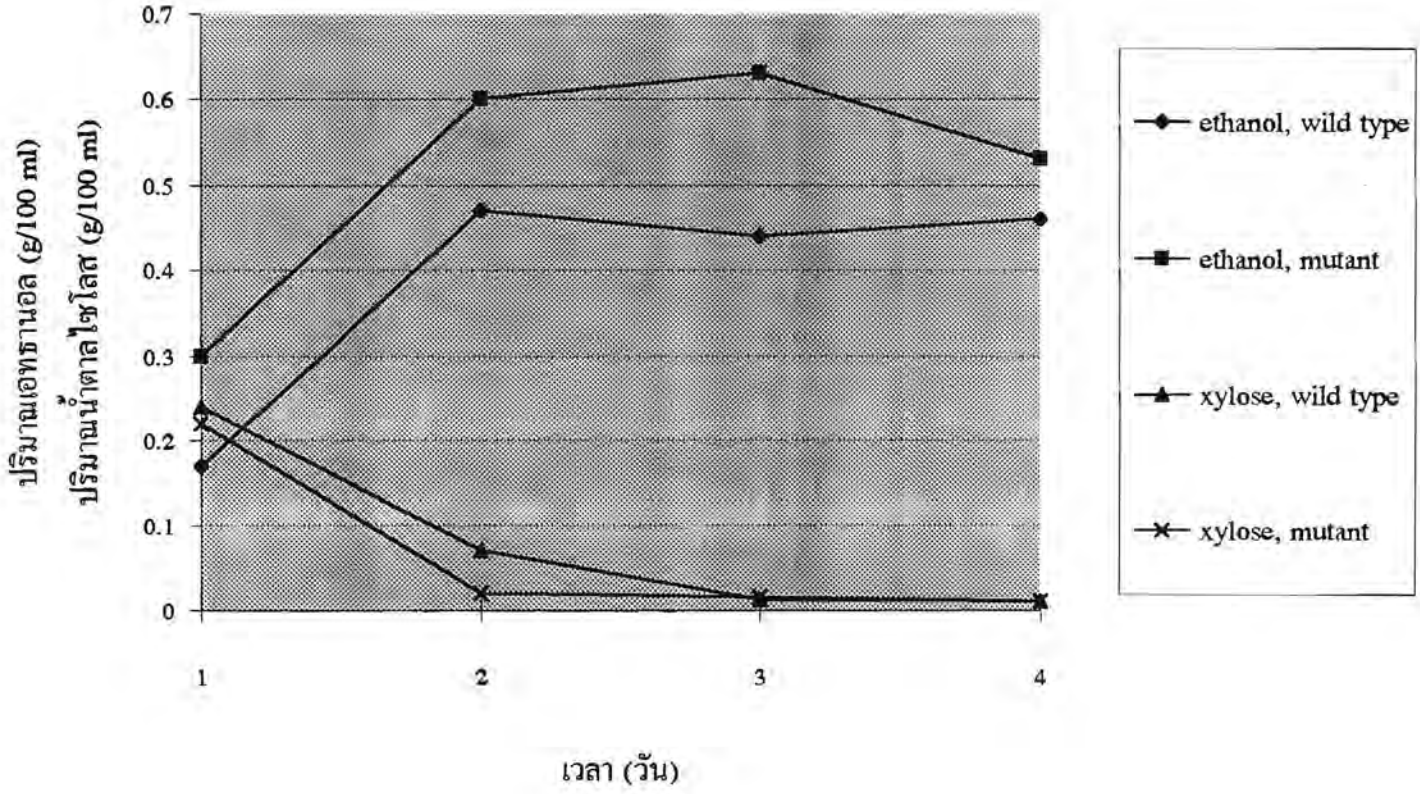
ภาพประกอบที่ 12 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ในสภาวะ aerobic, semiaerobic และ anaerobic ของ P. tannophilus สายพันธุ์ wild type และ mutant



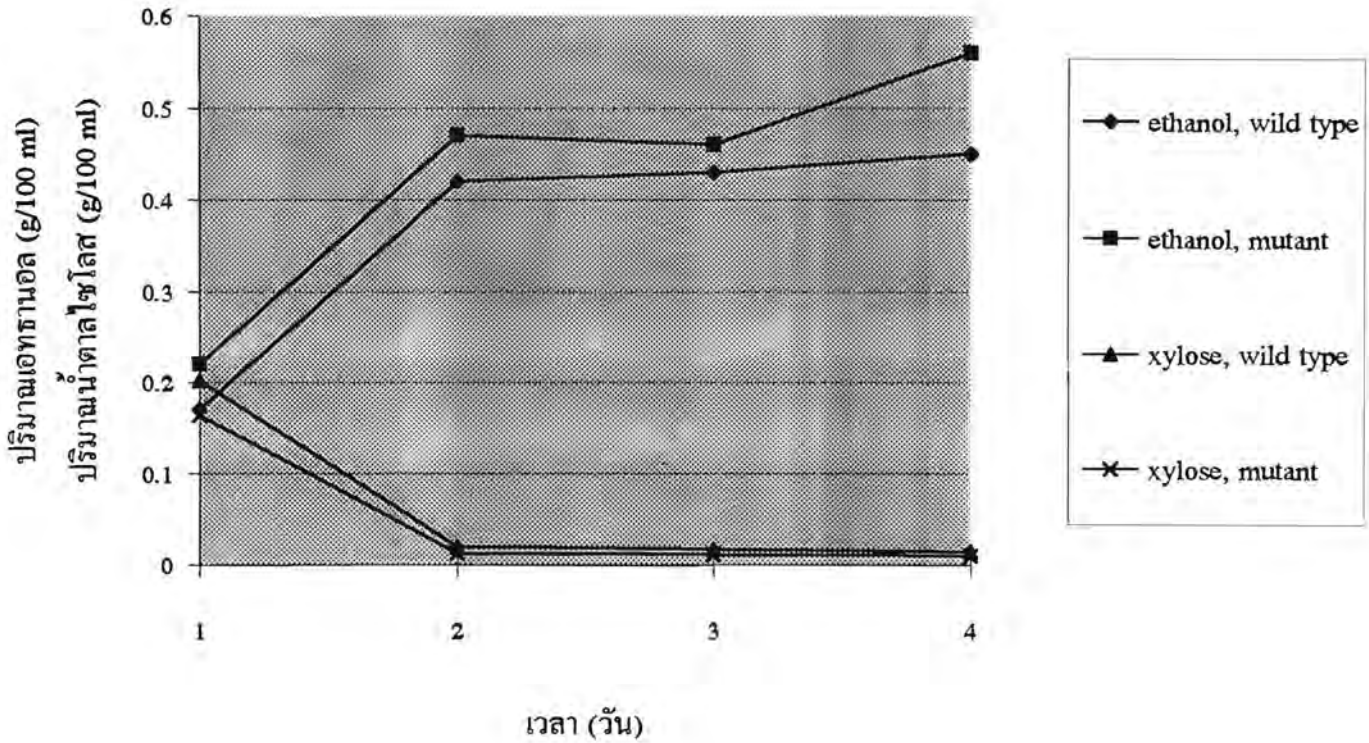
ภาพประกอบที่ 13 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ในสภาวะ aerobic ของ *P. tannophilus* สายพันธุ์ wild type และ mutant



ภาพประกอบที่ 14 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ในสภาวะ semiaerobic ของ *P. tannophilus* สายพันธุ์ wild type และ mutant



ภาพประกอบที่ 15 การหมักน้ำตาลไซโลส 2% ในสภาวะ anaerobic ของ *P. tannophilus* สายพันธุ์ wild type และ mutant



การอภิปรายผล

การทดลองหมักน้ำตาลไซโลส ที่ pH ระหว่าง 2.5 ถึง 6.5 ทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ mutant สามารถผลิตเอทธานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์ wild type ในช่วงของ pH ที่กว้างกว่า คือหมักได้ดีใน pH ระหว่าง 2.5 ถึง 4.6 ขณะที่ wild type หมักได้ดีในช่วง pH ระหว่าง 2.5 ถึง 3.5 ซึ่งสอดคล้องกับ Slininger และคณะ (1982) และ Punnapayak and Emert (1983) ที่เคยรายงานถึงสภาวะที่เหมาะสมของ P. tannophilus wild type ในการหมักน้ำตาลไซโลสว่าชอบ pH ต่ำ การที่สายพันธุ์ mutant ให้ผลผลิตสูงกว่าและทนต่อช่วง pH ที่กว้างกว่า แสดงให้เห็นถึงเสถียรภาพของสายพันธุ์ mutant ว่ามีความคงทน ต่อสภาวะแวดล้อมได้ดีกว่าสายพันธุ์เดิม ทำให้น่าที่จะมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการหมักน้ำตาลไซโลสที่อยู่ในรูปองค์ประกอบของวัสดุการเกษตรได้ดี

การทดลองหมักน้ำตาลไซโลสเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมเลือกใช้ pH 2.5 เนื่องจากเป็น pH ที่ใช้ได้ดีสำหรับยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 25°C สายพันธุ์ mutant มีการผลิตเอทธานอลมากกว่าสายพันธุ์ wild type โดยมีอัตราการผลิตสูงสุดในวันที่ 2 เมื่ออุณหภูมิเพิ่มเป็น 30°C สายพันธุ์ mutant ผลิตเอทธานอลสูงกว่าสายพันธุ์ wild type อย่างชัดเจน โดยผลิตได้สูงสุดในวันที่ 2 ถึง 0.72% ซึ่งเป็นค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 35°C ปริมาณการผลิตเอทธานอลของ wild type ยังคงต่ำกว่า mutant ทำให้สรุปได้ว่าสายพันธุ์ mutant มีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์ wild type ในการหมักน้ำตาลไซโลส ในทุกอุณหภูมิที่ทดลองในช่วง 25 - 35°C โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมของยีสต์ทั้งสองอยู่ในช่วง 30 - 35°C

การหาสภาวะอากาศที่เหมาะสมสำหรับการหมักน้ำตาลไซโลส ของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ทำให้ทราบว่า สายพันธุ์ mutant มีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์ wild type ในทุกสภาวะอากาศที่ทดลอง การหมักในสภาวะ semi aerobic คือมีอากาศบ้าง แต่ไม่มากเท่า aerobic เนื่องจากมีปริมาตรของเหลวใน flask มากกว่า มีความเหมาะสมต่อทั้งสองสายพันธุ์ Schneider และคณะ (1981) ได้เคยรายงานถึงคุณสมบัตินี้ของสายพันธุ์ wild type

การทดลองนี้ทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ mutant มีความต้องการสภาวะอากาศเช่นเดียวกันกับสายพันธุ์ wild type โดยให้ผลผลิตได้สูงกว่า

ในระหว่างการหมักของทุกการทดลองมีการตรวจสอบดูสิ่งที่เกี่ยวข้องกับการหมักที่สำคัญได้แก่ ปริมาณน้ำตาลเพื่อติดตามดูการใช้น้ำตาลไปในขณะที่เกิดการผลิตเอทธานอลขึ้น

จากการติดตามวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซโลส ในระหว่างการหมักทำให้ทราบว่ายีสต์ mutant โดยทั่วไปใช้น้ำตาลได้เร็วกว่า wild type ซึ่งอาจมีผลโดยตรงให้เกิดผลผลิตเอทธานอลได้เร็วและสูงกว่า แต่เมื่อหมักไปจนถึงวันที่ 4 โดยทั่วไปน้ำตาลจะหมดเหลืออยู่ในระดับต่ำมากพอๆกันทั้ง2 สายพันธุ์ ทำให้อาจเป็นไปได้ว่า สายพันธุ์ wild type มีการใช้น้ำตาลไปเพื่อการผลิตสิ่งอื่นที่นอกเหนือไปจาก ethanol อาทิเช่น xylitol (Jeffries, 1984) งานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบว่า สายพันธุ์ mutant P. tannophilus No_3 _ No_3 – 4 มีเสถียรภาพดี เหมาะสมที่จะใช้ในการหมักมากกว่าสายพันธุ์ wild type NRRL-Y2460 เมื่อส่องกล้องดูลักษณะเซลของ wild type และ mutant จะเห็นว่า mutant มีลักษณะเซลที่สมบูรณ์กว่า สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการหมักที่ดีกว่าสายพันธุ์เดิม

ข้อสรุปและเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบถึงการหมักน้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่พบในพืชและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ให้เป็นเอทธานอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ประเภทเชื้อเพลิงที่สำคัญชนิดหนึ่ง สภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำตาลไซโลสของ P. tannophilus ทั้ง wild type และ mutant มีความคล้ายคลึงกันคือ ชอบ pH ในช่วงกรด โดย mutant ชอบช่วง pH กว้างกว่าระหว่าง 2.5 - 4.6 ขณะที่ wild type ชอบระหว่าง 2.5 - 3.5 ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ชอบสภาวะอุณหภูมิในช่วง 30 - 35°C และสภาวะการมีอากาศแบบ semiaerobic เหมือนกัน แต่โดยสรุปแล้วสายพันธุ์ mutant ใช้น้ำตาลได้เร็วกว่าและให้ผลผลิตเอทธานอลสูงกว่า

เนื่องจากน้ำตาลไซโลสมีมากในวัสดุการเกษตรที่เหลือทิ้ง เป็นน้ำตาลที่ยีสต์โดยทั่วไปที่ใช้ในอุตสาหกรรม หมัก เช่น Saccharomyces cerevisiae ไม่สามารถจะนำมาใช้ได้ การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการหมักน้ำตาลไซโลสโดยใช้ P. tannophilus สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ mutant ทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้เพิ่มผลผลิตเอทธานอลที่ได้จากการหมักวัสดุการเกษตร โดยการใช้น้ำตาลไซโลสให้เป็นประโยชน์ เพิ่มเติมจากการหมักแบบเดิมที่ใช้เฉพาะน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะมีผลให้การผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิงจากวัสดุเหลือใช้การเกษตร มีประสิทธิภาพมากขึ้นซึ่งแอล-กอฮอล์ที่ได้นี้ สามารถจะนำไปผสมกับน้ำมันแกสโซลีนในอัตราส่วน 9:1 เพื่อใช้ในเครื่องยนต์ขับเคลื่อน ดังเช่นในต่างประเทศ (Lyons, 1984) ซึ่งเป็นโครงการที่รัฐบาลไทยและสหรัฐอเมริกาได้ให้ความสนใจ เพราะเป็นการใช้วัสดุที่หาเพิ่มเติมได้ภายในประเทศและเป็นการลดมวลภาวะต่อไป (Crawford, 1990)

Crawford, M. 1990. DOE's born-again solar energy plan. Science, 247 : 1403-1404.

Goldstein, I. (ed.) 1981. Organic chemicals from biomass. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl, USA.

Jeffries, T. 1984. Mutants of Pachysolen tannophilus showing enhanced rates of growth and ethanol formation from D-xylose. Enzyme Microb. Technol., 6 : 254-258.

Lyons, T.P. 1984. Industrial Uses of yeast in the production of fuel ethanol. Developments in Industrial Microbiology, 25 : 231-243.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31:426-428.

Punnapayak, H. and G.H. Emert. 1983. The study of D-xylose fermentation by Pachysolen tannophilus. Abstract of the Arkansas Academy of Science Annual meeting, Conway, Arkansas, USA

Punnapayak, H. and G.H. Emert. 1986. Use of Pachysolen tannophilus in the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosics. Biotechnol. Lett., 8 : 63-66.

Schneider, H., P.Y. Wang, Y.K. Chan, and R. Maleszka. 1981. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Lett., 3 : 89-92.

Slininger, P.J., R.J. Bothast, J.E. Van Cauwenberge, and C.P. Kurtzman. 1982. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast Pachysolan tannophilus. Biotechnol. Bioeng., 24 : 371-384.