บทความวิจัย

# ศักยภาพและการใช้ประโยชน์จากลำต้นแก่นตะวันเพื่อเป็นวัสดุตรึงเซลล์ยีสต์

**ขนิษฐา ฤกษ์อรุณ[1], สุรีย์มาศ อาจหาญ[2], อรวรรณ ชุณหชาติ[1,3] และ รัชพล พะวงศ์รัตน์[1*]**

*[1] หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140*

*[2] หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140*

*[3] หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140*

**บทคัดย่อ**

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 บนลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพเพื่อการผลิตเอทานอล และศึกษาประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป พบว่าการตรึงลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ 1 กรัม ที่เวลา 180 นาที มีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์สูงสุดเท่ากับ $7.48\pm0.07\times10^{8}$ เซลล์ต่อกรัมของวัสดุ และการอบเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที สามารถลดความชื้นในวัสดุตรึงรูปเหลือเพียงร้อยละ 40.47±3.61 โดยยังมีประสิทธิภาพการหมักสูง (ร้อยละ 84.72) การผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปนี้ พบว่ามีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอทานอล (P) 9.98±0.19 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอล ($Q_p$) 0.67±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) 0.47±0.01 กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาล และร้อยละประสิทธิภาพการหมัก ($E_y$) 91.49±2.40 ที่ระยะเวลาการหมัก 15 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์ตรึงรูปนี้สามารถนำกลับมาใช้ได้อย่างน้อย 3 ครั้ง ด้วยวิธีการหมักแบบกะซ้ำ โดยประสิทธิภาพในการหมักยังสูงกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นลำต้นแก่นตะวันจึงเป็นวัสดุที่สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงรูปสำหรับเซลล์ยีสต์ และเป็นวัสดุที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอทานอลได้

**คำสำคัญ** : ลำต้นแก่นตะวัน, เอทานอล, การปรับสภาพ และ การตรึงเซลล์ยีสต์

[*] ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: faasrpp@ku.ac.th. / โทร 034-281-105-7 ต่อ 7678 โทรสาร 034-351-895

# The Potential and Utilization of Jerusalem Artichoke as Supporting Material for Immobilization of Yeast Cells

**Kanittha Roekarun[1], Sureemat Arthan[2], Orawan Chunhachart[1,3] and Ratchapol Pawongrat[1*]**

[1] *Bioproducts Science Program, Faculty of Liberal Arts and Science Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

[2] *Biological Science Program, Faculty of Liberal Arts and Science Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

[3] *Microbiology Program, Faculty of Liberal Arts and Science Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

## Abstract

This research aimed to determine the optimal condition for immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 on pretreated stem of Jerusalem artichoke and to study the reusable efficiency of the immobilized yeast cells in ethanol production by repeated-batch fermentation. For the optimal condition of immobilized yeast cells. The result showed that immobilization of yeast cell on the pretreated stem of 1 g at 180 min exhibited the ability to promote cell binding up to $7.48\pm0.07\times10^{8}$ cell/g and incubation of the immobilized material at 50 °C for 180 min can reduce moisture content to 40.47±3.61 % with the high efficiency of fermentation (84.72%). For the ethanol production at 15 hours of fermentation, the highest ethanol concentration (P) was 9.98±0.19 g/l, production rate of ethanol ($Q_p$) was 0.67±0.01 g/l/h, ethanol yield ($Y_{p/s}$) was 0.47±0.01 g ethanol/g sugar and efficiency of fermentation ($E_y$) was 91.49±2.40 %. The Immobilized yeast cells can be reused at least 3 times by repeated batch fermentation and the efficiency of fermentation was higher than 50%. Therefore, stem of jerusalem artichoke has high potential to be used as immobilized material for yeast cells and it can be an alternative raw material for ethanol production.

**Keywords:** Jerusalem Artichoke, Ethanol, Pretreatment and Immobilized yeast cells

[*] Corresponding author: E-mail: faasrpp@ku.ac.th. / Tel 034-281-105-7 ext. 7678, Fax 034-351-895

## บทนำ

ในปัจจุบันความต้องการใช้พลังงานเพื่อใช้ในชีวิตประจำวันและภาคอุตสาหกรรมมีเพิ่มมากขึ้น รัฐบาลจึงหันมาให้ความสำคัญและสนับสนุนโดยเร่งพัฒนาค้นคว้าแหล่งพลังงานทดแทนชนิดใหม่ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน พลังงานทดแทนจากเอทานอล (ethanol) จึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันได้ (เวสารัชและคณะ, 2557) โดยเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัสดุจากธรรมชาติได้หลากหลายประเภท ซึ่งวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งวัสดุที่มีศักยภาพในการผลิต (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) เนื่องจากมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จึงทำให้มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลสูง และยังมีต้นทุนในการผลิตต่ำ (สนั่น และคณะ, 2549)

แก่นตะวัน (jerusalem artichoke) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Helianthus tuberosus* L. อยู่ใน Family Asteraceae เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเขตหนาวแต่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพเพาะปลูกในเขตร้อนได้ดี โดยมีหัวหรือรากใช้ในการสะสมอาหาร (นิมิต และสนั่น, 2549) ปัจจุบันนิยมบริโภคหัวแก่นตะวันกันอย่างแพร่หลาย ทำให้ส่วนของลำต้นเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่เกษตรกรกำจัดโดยการเผา ทำให้เป็นมลพิษทางสิ่งแวดล้อม แต่เนื่องจากลำต้นแก่นตะวันมีองค์ประกอบของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสสูง ร้อยละ 35.6±1.5 และ 10.2±1.1 ตามลำดับ (Kim *et al*., 2013) จึงสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ และเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น การพัฒนากระบวนหมักโดยใช้การใช้เซลล์ตรึงรูป (immobilization of cell) เพื่อจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ในบริเวณต้องการ ทำให้เซลล์สามารถทำปฏิกิริยาในกระบวนการหมักได้อย่างต่อเนื่อง ใช้เวลาในกระบวนการผลิตสั้น และยังช่วยลดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้ยังสามารถนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้อีกด้วย (Cardona *et al*., 2009; Ariyajaroenwong *et al*., 2012; รัชพล และคณะ, 2556)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 บนลำต้นแก่นตะวัน เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล และศึกษาประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ของเชื้อยีสต์ตรึงรูป เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอทานอล และการประยุกต์ใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

## วิธีดำเนินการวิจัย

**1. การเตรียมตัวอย่างลำต้นแก่นตะวัน การปรับสภาพลำต้นแก่นตะวัน และการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339**

1.1 การเตรียมตัวอย่างลำต้นแก่นตะวัน โดยนำลำต้นแก่นตะวัน (จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน) มาล้างน้ำ ตากแดด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (ประมาณ 1-2 เซนติเมตร) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเริ่มต้น ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีการของ AOAC (1980)

1.2 การปรับสภาพลำต้นแก่นตะวัน โดยนำตัวอย่างลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการบดลดขนาด นำไปแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร (อัตราส่วน 1:20 กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการกรองตัวอย่างล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชเป็นกลาง (pH 7) นำตัวอย่างที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร (อัตราส่วน 1:20 กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกรองเก็บส่วนที่เป็นของแข็งทั้งหมด ล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชเป็นกลาง นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยายสูง หรือ Scanning Electron Microscope (SEM) และเก็บรักษาโดยการฉายแสง UV เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อยืดอายุในการเก็บรักษา และเพื่อใช้ในตอนต่อไป

1.3 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ดัดแปลงมาจากวิธีการของจิราพร (2552) วัดจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ $1 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในขั้นตอนการตรึงรูปต่อไป

**2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์ยีสต์ในลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ**

2.1 การศึกษาปริมาณวัสดุตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ยีสต์ นำเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ $1 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดตัวอย่างจำนวน 10 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้มาตรึงโดยใช้ลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ จำนวน 1, 3 และ 5 กรัม ในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายซิเตรต

บัฟเฟอร์ pH 5.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่เหลืออยู่ ที่เวลา 30, 60, 120, 180, 300, 360, 540 และ 720 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ ทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึง และศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยกล้อง SEM

จำนวนเซลล์ที่ถูกตรึง (เซลล์ต่อกรัมของวัสดุ) = (จำนวนเซลล์ในชุดควบคุม–จำนวนเซลล์ที่เหลือในฟลาสก์) ต่อหนักวัสดุ

2.2 การศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในวัสดุตรึงต่อการผลิตเอทานอล เตรียมเซลล์ตรึงรูปในสภาวะที่เหมาะสม (ข้อ 2.1) นำไปอบที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่เวลาต่างๆ กันคือ 60, 120, 180, 240 และ 300 นาที ตามลำดับ และวิเคราะห์ร้อยละความชื้นที่เหลือในวัสดุตรึง และศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยผ่านกล้อง SEM จากนั้นนำวัสดุตรึงแต่ละสภาวะไปศึกษาการผลิตเอทานอล โดยใช้อาหารสำหรับการหมัก (YM broth) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นร้อยละ 2 กรัมต่อปริมาตร yeast extract ร้อยละ 1 กรัมต่อปริมาตร และ Peptone ร้อยละ 2 กรัมต่อปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในรูปของน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณเอทานอลที่เกิด

**3. การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป**

ศึกษาการผลิตเอทานอลเหมือนกับข้อ 2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการหมักที่เวลาต่างๆ จากนั้นหมักตามเวลาที่ได้ นำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่โดยเก็บส่วนเซลล์ยีสต์ตรึงรูป ทำการล้างเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.6 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth เก็บตัวอย่างเช่นเดิม วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในรูปของน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จนกระทั่งปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับเริ่มต้น

## ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

**1. ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นแก่นตะวัน**

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของลำต้นแก่นตะวัน พบว่าลำต้นแก่นตะวันมีองค์ประกอบทางเคมีโดยมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินร้อยละ 30.36±0.76, 3.46±0.80 และ 7.50±0.31 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim *et al*. (2013) ที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นแก่นตะวัน พบว่ามีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 35.6 ± 1.5, 10.2 ± 1.1 และ 22.2 ± 1.2 ตามลำดับ และพบว่าลำต้นแก่นตะวันมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบน้อยที่สุด

**ตารางที่ 1** องค์ประกอบทางเคมีของลำต้นแก่นตะวัน

| องค์ประกอบทางเคมี | ค่าเฉลี่ยร้อยละโดยน้ำหนัก |
|---|---|
| เซลลูโลส | 30.36±0.76 |
| เฮมิเซลลูโลส | 3.46±0.80 |
| ลิกนิน | 7.50±0.31 |
| ส่วนอื่นๆ | 58.68±0.27 |

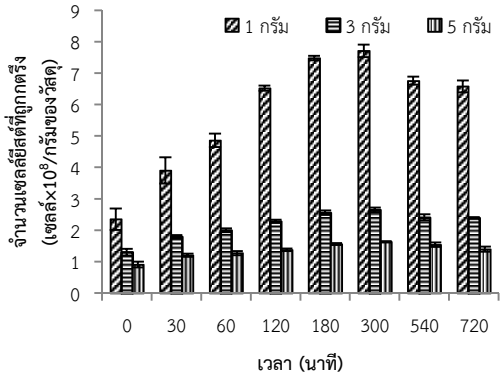
**2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์ยีสต์ในลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ**

2.1 ผลการศึกษาปริมาณวัสดุตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ยีสต์

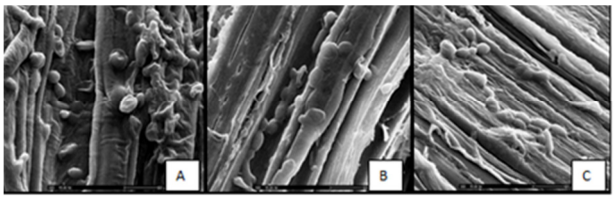
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ในลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณวัสดุตรึงจะส่งผลให้จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงต่อจำนวนวัสดุตรึงลดลง เนื่องจากปริมาณวัสดุตรึงที่เพิ่มขึ้นจะทำให้มีพื้นที่ของวัสดุตรึงมีมากกว่าจำนวนเซลล์ที่สามารถเจริญได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของเวสารัช และคณะ (2556) โดยศึกษาการตรึงเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 บนซังข้าวโพด ปริมาณ 1, 3 และ5 กรัม พบว่าจำนวนเซลล์ลดลงตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพที่ 1) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณวัสดุตรึงมากขึ้นปริมาณเซลล์ที่พบในวัสดุภายใต้กล้องจะยิ่งน้อยลง จากผลการศึกษาโครงสร้างทางกายภาพ พบว่าลำต้นแก่นตะวัน 1 กรัม ที่เวลา 180 นาที มีจำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงสูงสุดคิดเป็น $7.48\pm0.07\times10^{8}$ เซลล์ต่อกรัมของวัสดุ (ภาพที่ 2)

**2.2 ผลการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในวัสดุตรึงต่อการผลิตเอทานอล**

จากการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในวัสดุตรึงต่อการผลิตเอทานอล พบว่าการเตรียมวัสดุ 1 กรัม อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาทีมีค่าร้อยละความชื้นในวัสดุตรึงเท่ากับ 40.47±3.61 ปริมาณน้ำตาล




**ภาพที่ 1** จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงบนลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพในปริมาณต่างๆ



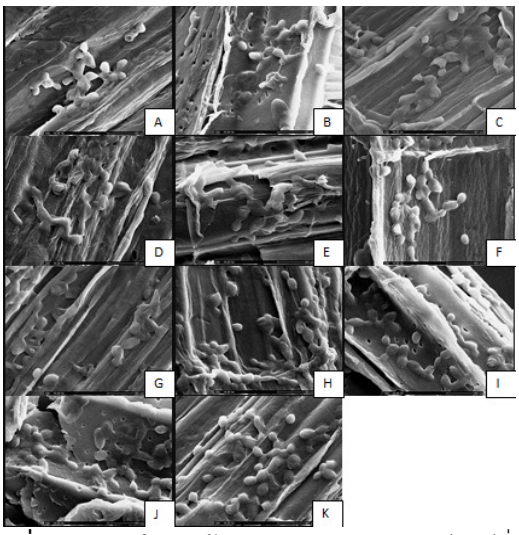

**ภาพที่ 2** ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงบนลำต้นแก่นตะวันในปริมาณของวัสดุต่างๆ A) 1 กรัม; B) 3 กรัม และ C) 5 กรัม ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

กลูโคสที่เหลืออยู่ เท่ากับ 1.26±0.10 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น เท่ากับ 9.81±0.25 กรัมต่อลิตร ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.43±0.03 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิต ($Q_p$) เท่ากับ 0.41±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีร้อยละประสิทธิภาพการหมัก ($E_y$) เท่ากับ 84.72±1.81 ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุด โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ปริมาณเอทานอล ผลผลิตเอทานอล อัตราการผลิต และมีร้อยละประสิทธิภาพการหมักแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เนื่องจากระยะเวลา และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อความชื้นของวัสดุตรึงทำให้ความชื้นลดลงเรื่อยๆ ตามลำดับ (วิไลและคณะ, 2554) แต่ระยะเวลาและอุณหภูมิในการอบไม่มีผลต่อประสิทธิภาพและลักษณะของเซลล์ จึงทำให้ปริมาณเอทานอล ผลผลิตเอทานอล อัตราการผลิต และร้อยละประสิทธิภาพในการหมักไม่แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนควรเลือกที่ระยะเวลาสั้น (ตารางที่ 2) และจากการศึกษาวัสดุที่ตรึงยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า ลักษณะของเซลล์ยีสต์บนวัสดุตรึงที่อุณหภูมิต่างๆ กันมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นอุณหภูมิและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นจึงไม่มีผลต่อลักษณะของเซลล์ยีสต์บนวัสดุตรึง (ภาพที่ 3)

**ตารางที่ 2** ร้อยละความชื้นในวัสดุ น้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ตรึงบนลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ ภายใต้การอบที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน ที่สภาวะน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

| สภาวะ | ความชื้นในวัสดุตรึง (%) | ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตเอทานอล($Y_{p/s}$) (กรัมต่อกรัม) | อัตราการผลิต ($Q_p$) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) | ประสิทธิภาพการหมัก ($E_y$) (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| เซลล์อิสระ | - | $0.99±0.01^{a}$ | $11.56±0.02^{a}$ | $0.50±0.00^{a}$ | $0.48±0.00^{a}$ | $98.72±0.17^{a}$ |
| ชุดควบคุม | $100.00±0.00^{a}$ | $1.10±0.01^{b}$ | $11.42±0.15^{a}$ | $0.50±0.01^{a}$ | $0.48±0.01^{a}$ | $97.93±1.28^{a}$ |
| 30°C,60min. | $84.27±0.41^{b}$ | $1.21±0.02^{cd}$ | $10.34±0.31^{b}$ | $0.45±0.01^{b}$ | $0.43±0.01^{b}$ | $89.11±2.71^{b}$ |
| 30°C,120min. | $83.73±4.40^{b}$ | $1.21±0.03^{cd}$ | $10.25±0.54^{b}$ | $0.45±0.02^{b}$ | $0.43±0.02^{b}$ | $88.33±4.78^{b}$ |
| 30°C,180min. | $78.81±6.25^{b}$ | $1.19±0.08^{bcd}$ | $10.45±0.09^{b}$ | $0.46±0.00^{b}$ | $0.44±0.00^{b}$ | $89.94±0.69^{b}$ |
| 30°C,240min. | $76.77±3.33^{b}$ | $1.21±0.05^{cd}$ | $9.95±0.48^{bc}$ | $0.44±0.02^{bc}$ | $0.41±0.02^{bc}$ | $85.73±4.03^{bc}$ |
| 30°C,300min. | $66.27±5.72^{c}$ | $1.16±0.07^{bc}$ | $10.32±0.48^{b}$ | $0.45±0.02^{b}$ | $0.43±0.02^{b}$ | $88.74±4.05^{b}$ |
| 50°C,60min. | $62.32±4.56^{c}$ | $1.16±0.03^{bc}$ | $10.43±0.36^{b}$ | $0.46±0.02^{b}$ | $0.43±0.02^{b}$ | $89.64±3.01^{b}$ |
| 50°C,120min. | $49.05±8.61^{d}$ | $1.25±0.04^{cde}$ | $9.45±0.14^{c}$ | $0.42±0.01^{c}$ | $0.39±0.01^{c}$ | $81.52±1.10^{c}$ |
| 50°C,180min. | $40.47±3.61^{e}$ | $1.26±0.10^{cde}$ | $9.81±0.25^{bc}$ | $0.43±0.03^{bc}$ | $0.41±0.01^{bc}$ | $84.72±1.81^{bc}$ |
| 50°C,240min. | $36.66±2.48^{e}$ | $1.28±0.05^{de}$ | $9.99±0.32^{bc}$ | $0.44±0.01^{bc}$ | $0.42±0.01^{bc}$ | $86.36±2.88^{bc}$ |
| 50°C,300min. | $35.95±0.20^{e}$ | $1.34±0.08^{de}$ | $9.83±0.65^{bc}$ | $0.43±0.03^{bc}$ | $0.41±0.03^{bc}$ | $85.22±5.89^{bc}$ |

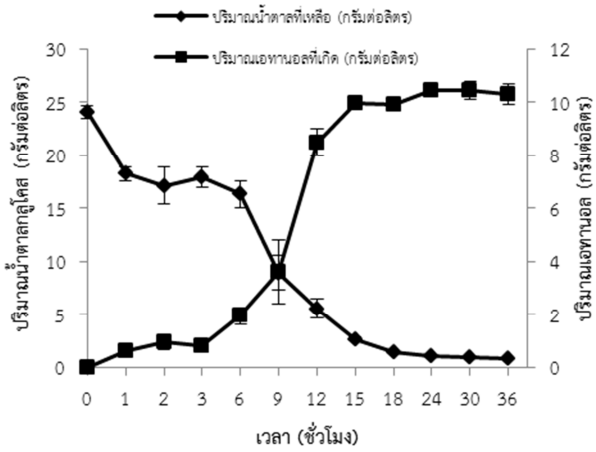
หมายเหตุ: a, b, c,... เป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)




**ภาพที่ 3** ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของเซลล์ยีสต์ที่ตรึงบนลำต้นแก่นตะวัน A) ชุดควบคุม, (B–F) ที่ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 60 120 180 240 และ 300 นาที ตามลำดับ และ (G–K) ที่ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลา 60, 120, 180, 240 และ 300 นาที ตามลำดับ

**3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีตส์ตรึงรูป**

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบนลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะที่เหมาะสม หมักภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือจะมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆโดยลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 9-15 (ภาพที่ 4)




**ภาพที่ 4** ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ตรึงบนลำต้นแก่นตะวันที่ปรับสภาพที่สภาวะน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

**ตารางที่ 3** ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น และค่าพารามิเตอร์อัตราผลผลิต ($Q_p$) ร้อยละผลผลิต ($Y_{p/s}$) และร้อยละของประสิทธิภาพการผลิต ($E_y$) โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ตรึงบนลำต้นแก่นตะวันที่สภาวะน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) (กรัมต่อกรัม) | อัตราการผลิต ($Q_p$) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) | ประสิทธิภาพการหมัก ($E_y$) (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | $24.07\pm0.57^{a}$ | $0.00\pm0.00^{f}$ | $0.00\pm0.00^{d}$ | $0.00\pm0.00^{h}$ | $0.00\pm0.00^{d}$ |
| 1 | $18.23\pm0.66^{b}$ | $0.63\pm0.01^{ef}$ | $0.11\pm0.01^{c}$ | $0.63\pm0.01^{a}$ | $21.65\pm3.77^{c}$ |
| 2 | $17.12\pm1.71^{bc}$ | $0.96\pm0.28^{e}$ | $0.14\pm0.00^{c}$ | $0.48\pm0.14^{cd}$ | $27.02\pm0.66^{c}$ |
| 3 | $17.88\pm0.96^{bc}$ | $0.81\pm0.23^{e}$ | $0.13\pm0.01^{c}$ | $0.27\pm0.08^{g}$ | $25.92\pm1.53^{c}$ |
| 6 | $16.31\pm1.28^{c}$ | $1.95\pm0.32^{d}$ | $0.26\pm0.08^{b}$ | $0.33\pm0.05^{efg}$ | $50.98\pm1.78^{b}$ |
| 9 | $8.94\pm1.63^{d}$ | $3.61\pm1.20^{c}$ | $0.24\pm0.06^{b}$ | $0.40\pm0.13^{def}$ | $46.32\pm1.21^{b}$ |
| 12 | $5.55\pm0.87^{e}$ | $8.49\pm0.49^{b}$ | $0.45\pm0.00^{a}$ | $0.70\pm0.04^{a}$ | $88.95\pm0.46^{a}$ |
| 15 | $2.67\pm0.22^{f}$ | $9.98\pm0.19^{a}$ | $0.47\pm0.01^{a}$ | $0.67\pm0.01^{a}$ | $91.49\pm2.40^{a}$ |
| 18 | $1.39\pm0.01^{fg}$ | $9.91\pm0.11^{a}$ | $0.43\pm0.02^{a}$ | $0.55\pm0.01^{bc}$ | $85.26\pm2.88^{a}$ |
| 24 | $1.05\pm0.02^{g}$ | $10.43\pm0.20^{a}$ | $0.45\pm0.01^{a}$ | $0.43\pm0.01^{cd}$ | $88.89\pm0.93^{a}$ |
| 30 | $0.95\pm0.05^{g}$ | $10.45\pm0.32^{a}$ | $0.45\pm0.00^{a}$ | $0.34\pm0.01^{efg}$ | $88.66\pm0.64^{a}$ |
| 36 | $0.78\pm0.02^{g}$ | $10.32\pm0.39^{a}$ | $0.44\pm0.01^{a}$ | $0.29\pm0.01^{fg}$ | $86.94\pm1.74^{a}$ |

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

**ตารางที่ 4** ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น และค่าพารามิเตอร์อัตราผลผลิต ($Q_p$) ร้อยละผลผลิต ($Y_{p/s}$) ร้อยละของประสิทธิภาพการผลิต ($E_y$) และร้อยละผลการผลิตโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ตรึงบนลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ระยะเวลา 15 ชั่วโมงต่อรอบ

| รอบการหมัก | ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) (กรัมต่อกรัม) | อัตราการผลิต ($Q_p$) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) | ประสิทธิภาพการหมัก ($E_y$) (%) | ผลการผลิต (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1.51±0.11[a] | 9.93±0.66[a] | 0.44±0.03[a] | 0.66±0.04[a] | 85.31±5.45[a] | 100.00 |
| 2 | 0.57±0.02[b] | 8.72±0.59[a] | 0.37±0.03[b] | 0.58±0.04[a] | 71.96±4.89[b] | 88.01 |
| 3 | 0.54±0.10[b] | 5.27±1.08[b] | 0.22±0.04[c] | 0.35±0.07[b] | 43.44±8.76[c] | 52.81 |
| 4 | 0.67±0.17[b] | 3.61±0.18[c] | 0.15±0.01[d] | 0.24±0.01[c] | 29.95±1.24[d] | 36.43 |

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

เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นอาหารในการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอล (Jin *et al.*, 2012) จากตารางที่ 3 พบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 15 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของเอทานอล (P) ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) อัตราการผลิตเอทานอล ($Q_p$) และมีร้อยละประสิทธิภาพการหมัก ($E_y$) เท่ากับ 9.98±0.19 กรัมต่อลิตร 0.47±0.01 กรัมต่อกรัม 0.67±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และร้อยละ 91.49±2.40 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือและปริมาณเอทานอลเริ่มคงที่ ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาในการหมักในที่ 15 ชั่วโมง โดยพบว่าเชื้อยีสต์ตรึงรูปสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่องจำนวน 3 รอบ โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือและปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจะมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตามจำนวนรอบที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 1.51±0.11, 0.57±0.02, 0.54±0.10 และ 0.67±0.17 กรัมต่อลิตร และ 9.93±0.66, 8.72±0.59, 5.27±1.08 และ 3.61±0.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยคิดผลการผลิตเป็นร้อยละ 100, 88.01, 52.81 และ 36.43 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) แต่จากผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่หายไปนั้นไม่สอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่มีอากาศเข้าสู่ระบบ ยีสต์จึงใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตมากกว่าที่จะใช้ในการผลิตเอทานอลจึงทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลง

ดังนั้นจึงสามารถใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปในการหมักเอทานอลแบบกะซ้ำได้อย่างน้อย 3 ครั้ง เนื่องจากในครั้งที่ 4 นั้นมีผลผลิตลดลงต่ำกว่า 50% จากในรอบแรก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของรัชพลและคณะ (2556) ในการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตอง โดยเทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน โดยพบว่าสามารถใช้เซลล์ตรึงรูปในการหมักเอทานอลแบบกะซ้ำได้อย่างน้อย 3 ครั้ง โดยที่เซลล์ยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักครั้งแรก

## สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาศักยภาพและการใช้ประโยชน์จากลำต้นแก่นตะวันเป็นวัสดุตรึงเซลล์ยีสต์เพื่อการผลิตเอทานอล พบว่าการตรึงรูปเซลล์บนลำต้นแก่นตะวันจำนวน 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 180 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์ โดยมีจำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงสูงสุดคิดเป็น $7.48\pm0.07\times10^8$ เซลล์ต่อกรัมของวัสดุ และการเตรียมวัสดุอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสที่เวลา 180 นาที มีความชื้นที่เหมาะสมในวัสดุตรึงรูปต่อการผลิตเอทานอล ซึ่งมีค่าร้อยละความชื้นในวัสดุตรึงเท่ากับ 40.47±3.61 นอกจากนี้การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป พบว่ากระบวนการหมักโดยเซลล์ตรึงรูปที่เวลา 15 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) อัตราการผลิตเอทานอล ($Q_p$) และมีร้อยละประสิทธิภาพการหมัก ($E_y$) เท่ากับ 2.67±0.22 กรัมต่อลิตร 9.98±0.19 กรัมต่อลิตร 0.47±0.01 กรัมต่อกรัม 0.67±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และร้อยละ 91.49±2.40 ตามลำดับ และมียังสามารถนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่โดยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำได้อย่างน้อย 3 ครั้ง ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้กล่าวได้ว่าลำต้นแก่นตะวันมีศักยภาพในการใช้เป็นวัสดุตรึงเพื่อการผลิตเอทานอลได้ และยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกด้วย

**กิตติกรรมประกาศ**

งานนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนสนับสนุนการตีพิมพ์เผยแพร่งานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2558 และหน่วยวิจัยจุลินทรีย์เพื่อการเกษตร คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

**เอกสารอ้างอิง**

จิราพร ลิ้มประเสริฐ. 2552. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงและสภาวะความเป็นกรดสูงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. ปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิมิต วนสูตร และ สนั่น จอกลอย. 2549. อินนูลิน: สาระสำคัญสำหรับสุขภาพในแก่นตะวัน. แก่นเกษตร 34(2): 85-91.

รัชพล พะวงศ์รัตน์, มาลินี อันภักดี และ สุทธิเดช ปรีชารัมย์. 2556. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน. วารสารวิชาการ Veridian E-Journal 6(2): 1025-1036.

วิไล ปาละวิสุทธิ์, ดวงอร อริยพฤกษ์ และพรสุรี กาญจนา. 2554. ผลของการใช้อุณหภูมิสูงในการอบลดความชื้นต่ออายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าว. สัมมนาวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง. วันที่ 14-16 กุมภาพันธ์ 2554. 177-183 น.

เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์, จิราภรณ์ แก้วใสแสง และ รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2557. ศักยภาพของปอคิวบา (*Hibiscus cannabisnus* L.) ในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5019. วารสารเกษตรพระวรุณ 11(2): 167-174.

เวสารัช สุนทรชัยบรูณ์, อรอนงค์ อินทร์ตา, สุทธิเดช ปรีชารัมย์ และรัชพล พะวงศ์รัตน์. 2556. การผลิตเอทานอลจากใบตองในถังหมักแบบแพคเบดด้วยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปบนซังข้าวโพด. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก 6(2): 21-29.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2551. เราไม่ง้อน้ำมัน. พิมพ์ครั้งที่ 1. ฐานบุ๊คส์: กรุงเทพฯ. 180 หน้า.

สนั่น จอกลอย, วีรยา ลาดบัวขาว และ รัชนก มีแก้ว. 2549. แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) พืชชนิดใหม่ใช้เป็นพลังงานทดแทน. แก่นเกษตร 34(2): 104-111.

AOAC. 1980. Official methods of analysis. 13th ed. AOAC: Washington, DC.

Ariyajaroenwong, P., Laopaiboon, P., Jaisil, P. and Laopaiboon, L. 2012. Repeated-batch ethanol production from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sweet sorghum stalks. Energies 5: 1215-1228.

Cardona C.A., Sanchez O.J. and Gutierrez, L.F. 2009. Process synthesis for fuel ethanol production. Florida: CRC Press.

Jin, H., Liu, R. and He, Y. 2012. Kinetics of batch fermentations for ethanol production with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* growing on sweet sorghum stalk juice. Procedia Environ Sci. 12: 137-145.

Kim, S., Park, J.M. and Kim, C.H. 2013. Ethanol production using whole plant biomass of Jerusalem Artichoke by *Kluyveromyces marxianus* CBS1555. Appl. Biochem Biotechnol 169: 1531-1545.