

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU-53” สำเร็จลุล่วงลงได้ คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย ประเพณุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2555 และใคร่ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ และเครื่องมือพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการทดลอง และการวิเคราะห์ทางเคมีด้านต่างๆ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ นายสุนันท์ นวลเพ็ง นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้กรุณาช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ช่วยเก็บข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลอง จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

สุดท้ายคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุกท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และใคร่ขอขอบคุณผู้ที่มีอุปการคุณทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ และให้คำแนะนำอันมีค่าสำหรับการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ใคร่ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2556

ABSTRACT

In this study, statistical experimental designs were used for optimization of ethanol production from sweet sorghum juice by thermotolerant yeast *S. cerevisiae* DBKKUY-53. The fermentation was carried out at 37°C in 500-mL air-locked Erlenmeyer flasks under static condition. Based on the Plackett-Burman design, initial cell

concentrations, initial sugar concentrations and yeast extract were chosen as the important factors for ethanol production from sweet sorghum juice by thermotolerant yeast *S. cerevisiae* DBKKUY-53. These selected factors (initial cell concentrations 5×10^6 - 1×10^8 cells mL⁻¹, initial sugar concentrations 180-300 g L⁻¹ and yeast extract 3-12 g L⁻¹) were optimized by response surface methodology (RSM) based on a central composite design (CCD). The response factors considered in this work were ethanol concentration and productivity. The result showed that the optimum conditions for ethanol fermentation were 7.85×10^7 cells mL⁻¹ initial cell concentration, 247 g L⁻¹ initial sugar concentration and 9.99 g L⁻¹ yeast extract. Verification of the ethanol production based on the optimum conditions revealed that the maximum ethanol concentration of 99.75 ± 3.93 g L⁻¹ and productivity of 2.77 ± 0.11 g L⁻¹ h⁻¹ were achieved. When the ethanol production was carried out in 2-L bioreactor under the optimum conditions, the ethanol concentration and productivity of 101.81 ± 2.72 g L⁻¹ and 2.83 ± 0.08 g L⁻¹ h⁻¹ were achieved, respectively.

Keywords: Thermotolerant yeast, sweet sorghum juice, ethanol production, *Saccharomyces cerevisiae*, optimization.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 โดยอาศัยแผนการทดลองทางคณิตศาสตร์ ทั้งนี้ โดยทำการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์แบบ air-lock ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง ภายหลังจากการใช้แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman เพื่อคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 คือความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น และความเข้มข้นของยีสต์สกัด จึงนำปัจจัยเหล่านี้มาศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface methodology) ภายใต้อันตรกิริยาแบบ Central Composite Design โดยกำหนดค่าตอบสนองเป็นความเข้มข้นของเอทานอลและค่าอัตราการผลิตเอทานอล ผล

การศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 7.85×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 247 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 9.99 กรัมต่อลิตร เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมจากแผนการทดลองทางคณิตศาสตร์มาทวนสอบ (verification) โดยทำการทดลองหมักเอทานอลพบว่าค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดมีค่าเท่ากับ 99.75 ± 3.93 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 2.77 ± 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมไปทดสอบการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลมีค่าเท่ากับ 101.81 ± 2.72 กรัมต่อลิตร และ 2.83 ± 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
Abstract	ข
บทคัดย่อ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ซ
คำสำคัญ	ณ
 บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	4

บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล	5
2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป	5
2.1.2 ประโยชน์ของเอทานอล	5
2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล	6
2.2.1 การผลิตเอทานอลทางเคมี	6
2.2.2 การผลิตเอทานอลทางชีวภาพ	7
2.3 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในกระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ	7
2.4 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล	10
2.5 ยีสต์	13
2.6 ข้าวฟ่างหวาน	15
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน	16

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์การทดลอง	20
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	21
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	21
3.4 วิธีเก็บรักษาจุลินทรีย์	22
3.5 การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลและการวิเคราะห์องค์ประกอบในวัตถุดิบ	22
3.6 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อใช้ในการศึกษาการเจริญและผลิตเอทานอล	22
3.7 วิธีการทดลอง	17
3.7.1 การศึกษารูปแบบการเจริญและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53 ในอาหารเหลวสูตรสมบูรณ์ (YM medium) และอาหารสูตรผลิตเอทานอล (EP medium)	22
3.7.2 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อน <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53	23
3.8 การวิเคราะห์ผลการทดลอง	25
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน	27
4.2 การศึกษารูปแบบการเจริญและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53 ในอาหารเหลวสูตรสมบูรณ์ (YM medium) และอาหารสูตรผลิตเอทานอล (EP medium)	28
4.3 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้น	29

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
บรรณานุกรม	44

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	46
ภาคผนวก 1 การปรับปริมาณของแข็งละลาย	47
ภาคผนวก 2 การหาอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์	48
ภาคผนวก 3 การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric	49
ภาคผนวก 4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)	51
ภาคผนวก 5 การวัดการเจริญของจุลินทรีย์ โดยวิธี Microscopic count	53
ภาคผนวก 6 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography method)	55
ภาคผนวก 7 การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์จากร้อยละโดยปริมาตร (% v/v) เป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (g/l)	57
ภาคผนวก 8 การคำนวณค่าประสิทธิภาพผลได้ (yield efficiency)	58
ภาคผนวก 9 กราฟมาตรฐาน	59
ประวัติและผลงานวิจัยของหัวหน้าโครงการวิจัย	60

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 การสลายน้ำตาลกลูโคสโดยยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ผ่านวิถีไกลโคไลซิสเพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก แล้วกรดไพรูวิก ถูกสลายต่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	8
รูปที่ 2.2 การสลายน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรีย <i>Zymomonas mobilis</i> ผ่านวิถี Entner-Doudoroff pathway เพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล	9
รูปที่ 4.1 แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติแสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของ เซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาล และยีสต์สกัดต่อการผลิตเอทานอล จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์หน่อร้อน <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53	36
รูปที่ 4.2 แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติเพื่อแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของ ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น ความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน เมื่อใช้แผนการทดลองแบบ CCD	39
รูปที่ ผ. 1 ปฏิกริยาระหว่างฟีนอลและคาร์โบไฮเดรต (ฟรุคโตส) ในกรดซัลฟิวริก เข้มข้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสีส้มของสาร triarymethane dyes	49
รูปที่ ผ. 2 เครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ใช้ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลง การดูดกลืนแสงของสารละลาย	50
รูปที่ ผ.3 ปฏิกริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวส์และสาร 3,5-dinitrosalicylic acid ได้ผลิต ภัณฑ์ที่มีสีเข้มของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid	51
รูปที่ ผ. 4 ตัวอย่างช่องสีเหลี่ยมภายในสไลด์	54
รูปที่ ผ. 5 เครื่อง Gas chromatography ในการวิเคราะห์หาเอทานอล	55

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานและน้ำอ้อย	28
ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์หน่อร้อน <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YM และในอาหารสูตรผลิตเอทานอล	29

(EP medium) ที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน	
ตารางที่ 4.3 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการคัดเลือกด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman	30
ตารางที่ 4.4 ชุดการทดลองเพื่อทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53 และค่าตอบสนอง ภายหลังจากการออกแบบการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman	30
ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเพื่อตรวจสอบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยยีสต์ทนร้อน <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53	31
ตารางที่ 4.6 ระดับและรหัสของแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แผนการทดลองแบบ central composite design	32
ตารางที่ 4.7 ชุดการทดลองการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53 ภายใต้อันุการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)	33
ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53 ภายใต้อันุการทดลองแบบ central composite design	34
ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่เกิดจากอิทธิพลของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่อค่าอัตราการผลิตเอทานอลภายใต้อันุการทดลองแบบ central composite design	37
ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นและอัตราการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน <i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53 ภายใต้อันุการที่เหมาะสม	40

คำสำคัญ

การผลิตเอทานอล (Ethanol Production)
Saccharomyces cerevisiae
 ข้าวฟ่างหวาน (Sweet sorghum)
 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)
 พลังงานทดแทน (Renewable energy)