

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อน
***Saccharomyces cerevisiae* DBKKU-53**

การขยายตัวของภาคเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมของประเทศ มีผลทำให้ความต้องการใช้พลังงาน โดยเฉพาะน้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งถือเป็นแหล่งพลังงานหลักคิดเป็น 80% ของพลังงานที่ใช้ในปัจจุบัน เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และเนื่องจากประเทศไทยยังต้องพึ่งพาการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศเป็นหลัก เมื่อปริมาณการใช้น้ำมันภายในประเทศเพิ่มสูงขึ้น และความไม่แน่นอนของราคาน้ำมันดิบในตลาดโลก ดังนั้นวิกฤตการณ์ด้านราคาน้ำมันจึงส่งผลกระทบต่ออย่างรุนแรงกับระบบเศรษฐกิจและความมั่นคงของประเทศ ด้วยเหตุนี้รัฐบาลจึงต้องผลักดัน ส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการอนุรักษ์และใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะเดียวกันก็ผลักดันให้มีการพัฒนาพลังงานชีวภาพและพลังงานทางเลือกชนิดต่างๆ ขึ้นใช้ภายในประเทศ เอทานอลเป็นหนึ่งในพลังงานชีวภาพที่รัฐบาลให้ความเห็นชอบ และได้เสนอไว้เป็นวาระแห่งชาติในเรื่องพลังงานทดแทน โดยวัตถุดิบหลักที่สำคัญในการผลิตเอทานอลภายในประเทศคือ กากน้ำตาล มันสำปะหลัง (ในรูปมันสด และมันเส้น) และอ้อย แต่เนื่องจากวัตถุดิบเหล่านี้ไม่เพียงแต่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลเท่านั้น ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกมากมาย อาทิเช่น มันสำปะหลังใช้ในอุตสาหกรรมผลิตแป้ง ผลิตภัณฑ์ปรุงแต่งรสอาหาร ผลิตรครดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก เป็นต้น หรือผลิตอาหารสัตว์ ส่วนอ้อยมีการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลทราย และผลพลอยได้ (by product) จากกระบวนการผลิต คือ กากน้ำตาล ก็มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสุรา ผงชูรส เป็นต้น เพื่อหลีกเลี่ยงและลดปัญหาการแก่งแย่งวัตถุดิบซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืชอาหาร การใช้พืชพลังงานทางเลือกที่มีคุณภาพเทียบเท่าวัตถุดิบข้างต้น จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจและมีการศึกษาวิจัยกันมากในปัจจุบัน

ข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sorghum bicolor* L. Moench เป็นพืชพลังงานทางเลือกอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากเป็นพืชที่เจริญเติบโตเร็ว มีอายุเก็บเกี่ยวสั้นประมาณ 120-140 วันหลังปลูก เมื่อเทียบกับอ้อยหรือมันสำปะหลัง (ประมาณ 12-18 เดือน) ทำให้สามารถปลูกได้ปีละ 2-3 ครั้ง ให้ผลผลิตต่อพื้นที่สูง (ประมาณ 5 ตันต่อไร่) สามารถปลูกในเขตร้อนและร้อนชื้นได้ดี ทนทานต่อความแห้งแล้งได้ นอกจากนี้ยังมีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตทั้งที่ละลายน้ำได้ เช่น น้ำตาล และที่ละลายน้ำไม่ได้ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ในปริมาณสูงที่ผ่านมามีการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานและพบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 70 ลิตรต่อตันวัตถุดิบ ซึ่งให้ผลผลิตเทียบเท่าผลผลิตเอทานอลจากอ้อย

ประมาณร้อยละ 95 ของเอทานอลที่ใช้ในปัจจุบันได้มาจากการบวนการผลิตทางชีวภาพ โดยจุลินทรีย์ที่นิยมใช้กันมากคือ *Saccharomyces cerevisiae* ทั้งนี้เพราะสามารถผลิตเอทานอลได้ในระดับสูง และเป็นที่ยอมรับในเรื่องความปลอดภัย อย่างไรก็ตาม *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้กันในปัจจุบันไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีเมื่อสภาวะอุณหภูมิในถังหมักสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส ด้วยเหตุนี้เมื่อระดับอุณหภูมิในถังหมักเพิ่มขึ้น อาจเพิ่มสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระดับที่ทำให้การเจริญและการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* หยุดชะงักได้ โรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จึงต้องใช้ระบบหล่อเย็นเพื่อช่วยควบคุมอุณหภูมิ ส่งผลให้เกิดการสิ้นเปลืองพลังงาน และทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นหากสามารถหาจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูง ปัญหาการใช้พลังงานในระบบหล่อเย็นน่าจะลดลง ในขณะเดียวกันต้นทุนการผลิตก็จะลดลงตามไปด้วย

งานวิจัยนี้สนใจที่จะทดสอบการผลิตเอทานอลในสภาวะอุณหภูมิสูงโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 ซึ่งคัดแยกได้จากธรรมชาติ โดยมีคุณสมบัติเด่นคือสามารถเจริญได้ที่ระดับอุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กันพบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด 8.06% โดยปริมาตร เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ก็สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 7.37% โดยปริมาตร (Nuanpeng et al., 2010) จะเห็นได้ว่ายีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 ที่คัดแยกได้นี้มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิสูง เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่ได้มีการศึกษาถึงปัจจัยที่อาจมีผลต่อการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้ ดังนั้นจุดมุ่งหมายหลักของงานวิจัยในครั้งนี้คือ การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 โดยคาดหวังว่าข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 ไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 และเพื่อศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมวัตถุดิบ (น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน)

นำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีอายุประมาณ 100-140 วันหลังปลูก มาบีบสกัดน้ำหวานโดยใช้เครื่องหีบ จากนั้นแบ่งน้ำหวานส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี และส่วนที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป โดยการวิเคราะห์ทางเคมีประกอบด้วย pH (โดยใช้ pH meter) ความหวาน (โดยใช้ hand refractometer) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (โดยใช้วิธี phenol-sulfuric) ปริมาณแร่ธาตุบางชนิด (โดยใช้เครื่อง atomic absorption)

2. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เพื่อใช้ในการศึกษาการเจริญและผลิตเอทานอล

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKU-53 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YM จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงสู่อาหารใหม่โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และนำไปบ่มที่สภาวะเช่นเดิม จนกระทั่งเซลล์ยีสต์มีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจนับด้วย haemocytometer นำเซลล์ที่ได้ไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลองต่อไป

3. การศึกษารูปแบบการเจริญและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ *S. cerevisiae* DBKKU-53

ถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* DBKKU-53 ลงในอาหารสูตร YM จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องบ่มเขย่า (incubator shaker) ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อลงสู่อาหารใหม่โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงจนกระทั่งเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด (log phase) จึงถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเหลวสูตร YM และอาหารสูตรผลิตเอทานอล (EP medium) ซึ่งมีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะนิ่ง (static culture) โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส และติดตามการเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer และวัด

ปริมาณการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธี phenol-sulfuric นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าอัตรา การเจริญสูงสุด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวางแผนการทดลองต่อไป

4. การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

4.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53

คัดเลือกปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 โดยใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman design ซึ่งปัจจัยที่ทำการคัดเลือก และ ระดับของปัจจัยแต่ละปัจจัยสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การคัดเลือกปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการผลิตเอทานอลด้วยแผนการทดลอง Plackett-Burman

codes	Factors	units	Low level (-1)	High level (+1)
A	Sugar concentration	g L ⁻¹	180	250
B	pH		4.5	5.5
C	Cell concentration	Cells mL ⁻¹	1×10 ⁶	1×10 ⁸
D	NH ₄ NO ₃	g L ⁻¹	0.00	1.5
E	urea	g L ⁻¹	0.00	1.5
F	Yeast extract	g L ⁻¹	0.00	9.0
G	DAP	g L ⁻¹	0.00	1.5
H	MgSO ₄ ·7H ₂ O	g L ⁻¹	0.5	3.0

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53

หลังจากทราบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลด้วยแผนการทดลอง Plackett-Burman แล้ว นำ ปัจจัยเหล่านั้นมาศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แผนการทดลองที่เรียกว่า central composite design (CCD) ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง response surface methodology (RSM) ซึ่งปัจจัยที่นำมา ศึกษา รวมทั้งระดับของแต่ละปัจจัยหลังจากการวิเคราะห์ทางสถิติ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปัจจัย และระดับของแต่ละปัจจัยสำหรับใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยแผนการทดลอง แบบ central composite design

code	Factors	units	Levels				
			-1.68	-1	0	+1	+1.68
A	Cell concentration	cells mL ⁻¹	5.00×10 ⁶	2.43×10 ⁷	5.25×10 ⁷	8.07×10 ⁷	1.00×10 ⁸
B	Sugar concentration	g L ⁻¹	180	204	240	276	300
C	Yeast extract	g L ⁻¹	3	4.8	7.5	10.2	12

ในการทดสอบการหมักเอทานอลภายใต้สภาวะต่างๆ ทำการหมักในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร และ ในระหว่างการหมักจะสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ หาค่าต่างๆ คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) (ด้วยวิธี Phenol – sulphuric) การเจริญของ เซลล์ (ด้วยวิธี haemocytometer) ค่าความเป็นกรด – ด่าง (ด้วย pH meter) ปริมาณของเอทานอล (ด้วย

Gas chromatography) จากนั้นนำค่าต่างๆ ที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลโดยยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKU-53

5. การทดสอบผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKU-53 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

นำสภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้ไปใช้ทดสอบผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKU-53 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยกำหนดปริมาตรเริ่มต้นในการทำงาน (working volume) เท่ากับ 1.5 ลิตร ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักโดยการเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ และนำไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด การเจริญของเซลล์ ค่าความเป็นกรด – ด่าง และปริมาณของเอทานอล

ผลการศึกษาวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKU-53 โดยอาศัยแผนการทดลองทางคณิตศาสตร์ ทั้งนี้โดยทำการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์แบบ air-lock ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง ภายหลังจากการใช้แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman เพื่อคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKU-53 คือความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น และความเข้มข้นของยีสต์สกัด จึงนำปัจจัยเหล่านี้มาศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface methodology) ภายใต้อันตรการทดลองแบบ Central Composite Design โดยกำหนดค่าตอบสนองเป็นความเข้มข้นของเอทานอลและค่าอัตราการผลิตเอทานอล ผลการศึกษพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือ 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

ข้อเสนอแนะเพื่อการศึกษาวิจัย

1. ในการทดสอบผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในการทดลองครั้งนี้ใช้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองในระดับฟลาสก์ ซึ่งปริมาตรและสภาวะต่างๆ ในการหมักแตกต่างไปจากสภาวะการหมักในฟลาสก์ ดังนั้นหากต้องการให้ผลผลิตของเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น จำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลในระดับถังหมักอีกครั้ง
2. จากข้อมูลผลการทดลองที่ได้ จะเห็นว่ายีสต์พันธุ์ *S. cerevisiae* DBKKU-53 มีศักยภาพสูงในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยเฉพาะในสภาวะอุณหภูมิสูง หากต้องการนำผลการวิจัยไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่มีกำลังการผลิตขนาดใหญ่ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

3. นอกเหนือจากการใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลแล้ว ควรมีการศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น กากน้ำตาล มันสำปะหลัง หรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส