

หัวข้อโครงการวิจัย	การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เอนไซม์ในกระบวนการ แซ็คคาริฟิเคชัน ร่วมกับกระบวนการหมักด้วยเซลล์ตรึงรูปของ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน)	สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช)		
ประจำปีงบประมาณ	2555		
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน	250,000	บาท	
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2555		
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		

บทคัดย่อ

ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งใช้อุณหภูมิในการย่อยที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งใช้อุณหภูมิในการย่อยที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลเปรียบเทียบกับระหว่างกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ในรูปแบบที่เป็นเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป ในขั้นตอนการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 ใช้ปริมาณเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้กระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักด้วยเซลล์อิสระจะให้ผลผลิตของเอทานอลสูงสุด คือ 14.64 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดเป็น 0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด

การผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 มีการเติมแร่ธาตุและวิตามิน (แร่ธาตุ คือ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และวิตามิน คือ Ca-pantothenate and myo-inositol) โดยเติมวิตามินและแร่ธาตุเพียงอย่างเดียวหรือผสมกัน หมักแบบกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) ด้วยเซลล์อิสระของ *S. cerevisiae* YRK 017 เมื่อเวลา 48 ชั่วโมง ในชุดที่มีการเติมแร่ธาตุให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.56 กรัมต่อลิตร และกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) ชุดที่เติมแร่ธาตุโดยใช้เซลล์อิสระให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 12.77 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 72 กระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการย่อยพร้อมการหมัก และการใช้เซลล์อิสระจะผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ตรึงรูป เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

คำสำคัญ : เอทานอล *Saccharomyces cerevisiae* เซลล์ตรึงรูป กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก
มันเทศ

Research Title	Bioethanol Production from Sweet Potato Starch by Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation with Immobilized Cells of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Researcher	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

Process of ethanol production from sweet potato starch hydrolyzed by alpha-amylase concentration of 0.05% and volume of 5 ml at 90 °C for 2 h and amyloglucosidase concentration of 0.015% and volume of 20 ml at 60 °C for 4 h was carried on for the optimal conditions of the production ethanol by free cell. Followed by the fermentation process of ethanol compared with both separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017, in form of free and immobilized cells. In the process of fermentation of *S. cerevisiae* YRK 017, inoculum volumes were 10%(v/v) at 30 °C in shaking speed of 150 rpm for 72 h. To analyze the concentration of ethanol Gas Chromatography was used and total sugar concentration was utilized the phenol - sulfuric acid method. Cell dry weight was analyzed by drying at a temperature of 70 °C for 48 h. The maximum concentration of ethanol was 14.64 g/l and the yield of ethanol from total sugar was 0.38 g.g⁻¹ from simultaneous saccharification and fermentation process using free cell *S. cerevisiae* YRK 017

Ethanol production from sweet potato by using Immobilized cell and free cell of *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 in a batch system was studied. The effect of addition of various yeast activators (mineral salt: ZnSO₄ · 7H₂O and MgSO₄ · 7H₂O and vitamin: Ca-pantothenate and myo-inositol) separately or mixed. The cultivation of *S. cerevisiae* YRK 017 for 48 hour of activators ZnSO₄ · 7H₂O 0.3g and MgSO₄ · 7H₂O 2.0g. This process resulted 14.56 g.l⁻¹ of ethanol. Simultaneous enzymatic saccharification and fermentation (SSF) was add mineral salt by using free cell for 72 hour and were given 12.77 g.l⁻¹ of ethanol. SHF and SSF process of ethanol production was used immobilized and free cell. SHF process gave higher ethanol than SSF process and using free cell gave higher ethanol than immobilized cell. Both SHF and SSF process were studied at 30 °C and 150 rpm in shaken flasks.

Keywords : Ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, immobilized cell, SSF, Sweet potato

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพและสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่สาขาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนคือสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหารที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	15
4.1	แสดงส่วนประกอบของผงมันเทศแห้งที่เตรียมได้และปริมาณของส่วนประกอบต่าง ๆ	32
4.2	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศ โดยกระบวนการย่อยผงมันเทศ แยกกับกระบวนการหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง	34
4.3	แสดงค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) กระบวนการย่อยผงมันเทศแยกกับการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง	37
4.4	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศ โดยกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	39
4.5	แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) กระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง	42
4.6	แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักและกระบวนการย่อยผงมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยใช้เซลล์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง	43
4.7	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	48
4.8	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ตรึงรูป หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	52
4.9	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	56
4.10	แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการหมักแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก มีการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะเซลล์ของ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.2	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเซลล์ตรึง <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 (A : 500X, B : 1000X, C : 2000X)	20
2.3	องค์ประกอบของเครื่อง Gas Chromatograph	21
4.1	แสดงการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก โดยใช้ (a) เซลล์อิสระและ (b) เซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YRK 017 หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ♦ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ แทนความเข้มข้นของเอทานอล, ■ แทนความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด	35
4.2	แสดงปริมาณเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบการย่อยไขมันเทศแยกกับกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YRK 017	36
4.3	แสดงการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยพร้อมการหมัก โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YRK 017 ในรูปแบบ (a) เซลล์อิสระ และ (b) เซลล์ตรึงรูป ใช้เวลาหมักทั้งหมด 72 ชั่วโมง ♦ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ แทนความเข้มข้นของเอทานอล, ■ แทนความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด	40
4.4	แสดงปริมาณเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยไขมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมัก ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YRK 017	41
4.5	แสดงปริมาณเอทานอลที่ถูกผลิตโดยกระบวนการย่อยไขมันเทศแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยไขมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YRK 017	44
4.6	แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมด ($Y_{p/s}$) ของกระบวนการย่อยแป้งมันเทศแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยแป้งมันเทศพร้อมกับกระบวนการหมักที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YRK 017	45
4.7	แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) ชุดควบคุม (a), เติมแร่ธาตุ (b), เติมวิตามิน (c), เติมแร่ธาตุผสมวิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์อิสระของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย ♦ น้ำตาลทั้งหมด, ▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเอทานอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อยีสต์อิสระ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 ที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงด้วย กระบวนการย่อยแป้ง เป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก โดยการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ	50
4.9	แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยแยกกับ กระบวนการ หมัก (SHF) ชุดควบคุม (a),เติมแร่ธาตุ (b), เติมนิโอส (c), เติมนิโอสผสม วิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงโดย ◆ น้ำตาลทั้งหมด,▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล	53
4.10	เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเอทานอลที่ถูกผลิตโดยเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมงด้วยกระบวนการย่อยเป็น น้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก โดยเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ	54
4.11	แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับ กระบวนการหมัก ชุดควบคุม (a),เติมแร่ธาตุ (b), เติมนิโอส (c), เติมนิโอสผสมวิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์อิสระของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 เป็นเวลา72 ชั่วโมง โดย ◆ น้ำตาลทั้งหมด,▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล	57
4.12	เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเอทานอลที่ถูกผลิตโดยเซลล์อิสระของ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมงของกระบวนการย่อยแป้ง เป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ	58
4.13	แสดงการหมักแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับ กระบวนการหมัก ชุดควบคุม (a),เติมแร่ธาตุ (b), เติมนิโอส (c), เติมนิโอสผสมวิตามิน (d) หมักด้วยเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย ◆ น้ำตาลทั้งหมด, ▲ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นของเอทานอล	60
4.14	เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเอทานอลที่ถูกผลิตโดยเซลล์ตรึงรูปของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมงของกระบวนการย่อยแป้ง เป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยการเติมแร่ธาตุและวิตามินชนิดต่างๆ	61
4.15	เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยก จากการหมักที่มีการเติมแร่ธาตุ โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017	62
4.16	เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อย เกิดขึ้นพร้อมการหมัก ที่มีการเติมแร่ธาตุโดยใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017	63
ข-1	กราฟมาตรฐานกลูโคสวัดโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร	71
ข-2	แผนภาพแสดงวิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล	72
ข-3	กราฟมาตรฐานเอทานอลวัดโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี	73

