



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

การผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยการหมักแบบกะและ
กึ่งกะ โดยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*

Ethanol production from cassava pulp hydrolysate by batch and fed-batch
fermentation of *Zymomonas mobilis*

โดย

ผศ. ดร. วิชัย ลีลาวัชรมาศ

รศ. ดร. พรเทพ ถนอมแก้ว

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โดยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2546

บทคัดย่อ

กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง มีแป้งเป็นองค์ประกอบร้อยละ 56 ของน้ำหนักแห้ง จึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ แอลฟา-อะไมเลส และอะไมโลกลูโคซิเดส ในระดับขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร ทำการศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรีย *Z. mobilis* และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดม และการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่า และการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่า พบว่าแบคทีเรียที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลคือแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 สำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลคือการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งจะให้ผลได้ของเอทานอลเท่ากับ 0.463 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป สำหรับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่า พบว่าการใช้เกลือ NH_4Cl ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดคือ 0.419 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่า พบว่าการใช้ความเร็วรอบของใบกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.444 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป และการใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.412 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป สำหรับการผลิตเอทานอลในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คงที่ พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คงที่เท่ากับ 5.5 จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.481 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป ในขณะที่การหมักแบบกึ่งกะ พบว่าการเติมน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง จะให้เอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 71.70 กรัมต่อลิตร

Abstract

Cassava pulp is a by-product of the cassava starch processing with remaining starch content of 56 % dry weight. An experiment was conducted to study the ethanol production from cassava pulp hydrolysate by two enzymes, α -amylase and amyloglucosidase, both in shake flask scale of 500 ml and in 5 l stirred tank fermentor. Preliminary study was conducted to select an appropriated strain of bacteria *Z. mobilis*. Further study, ethanol production from cassava pulp hydrolysate as rich medium was studied and after that the nitrogen sources for producing ethanol from cassava pulp hydrolysate as minimal medium was studied in shake flask scale of 500 ml including in scale-up in 5 l stirred tank fermentor. It was found that the *Z. mobilis* TISTR 548 is an appropriated strain for producing ethanol. For ethanol production from cassava pulp hydrolysate as rich medium by *Z. mobilis* TISTR 548, it was found that the optimum conditions for producing ethanol were using the initial reducing sugar of 100 g/l, at pH 5.5 and agitation speed of 100 rpm with the highest ethanol yield of $0.463 \text{ g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Reducing sugar utilized}}$. For the nitrogen sources for producing ethanol from cassava pulp hydrolysate as minimal medium, it was found that using 1 g/l. of NH_4Cl give the highest ethanol yield of $0.419 \text{ g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Reducing sugar utilized}}$ and the optimum conditions for producing ethanol in 5 l stirred tank fermentor were using agitation speed of 100 rpm and inoculum size of 10 % (v/v) with the highest ethanol yield of 0.451, $0.412 \text{ g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Reducing sugar utilized}}$, respectively. For producing ethanol in the controlled pH, it was found that the controlled pH at 5.5 give more the highest ethanol yield of $0.481 \text{ g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Reducing sugar utilized}}$ than another one. For fed-batch fermentation, it was found that adding 1 l of reducing sugar of 300 g/l. each time give the highest ethanol concentration of 71.70 g/l.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน (สนพ.) ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สามารถดำเนินการได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยขอนแก่น ในส่วนของการสนับสนุนสถานที่ปฏิบัติการวิจัย และขอขอบคุณโรงงาน Asia Modified Starch จังหวัดกาฬสินธุ์ ในการสนับสนุนวัตถุดิบสำหรับการวิจัย

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบจำกัดและขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กากมันสำปะหลัง	4
2.2 แป้งมันสำปะหลัง	5
2.3 กลไกของการย่อยแป้ง	5
2.4 การผลิตน้ำเชื่อมจากกากมันสำปะหลัง	7
2.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล	8
2.6 แบคทีเรียจีโนส <i>Zymomonas</i>	9
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i>	14
2.8 คุณสมบัติที่เหมาะสมของแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> ต่อการผลิตเอทานอล	24
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	25
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	25
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	25
3.3 เคมิภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	26
3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	27
3.5 วิธีการวิจัย	28
3.6 การวิเคราะห์	35
บทที่ 4 ผลการทดลอง	36
4.1 การศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i>	36
4.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดมดัดแปลงสูตรจากวิธีของ Siva Kesava <i>et al.</i> (1995) ในระดับขวดเขย่า ขนาด 500 มิลลิลิตร	47

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
4.3 การศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ในระดับขวดเขย่า ขนาด 500 มิลลิลิตร	68
4.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในอาหาร เลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร	70
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	79
5.1 การศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i>	79
5.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจาก น้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดม คัดแปลง สูตรจาก Siva Kesava <i>et al.</i> (1995) ในระดับขวดเขย่า ขนาด 500 มิลลิลิตร	85
5.3 การศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ในระดับขวดเขย่า ขนาด 500 มิลลิลิตร	91
5.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในอาหาร เลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร	92
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	95
เอกสารอ้างอิง	96
ภาคผนวก	102

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	4
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> และ <i>S. uvarum</i>	15
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของ B starch ที่เหลือจากกระบวนการผลิตแป้งสาลี	17

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้าง (ก) อะไมโลส และ (ข) อะไมโลเพคติน	6
ภาพที่ 2 กลไกของการเกิดเจลของเม็ดแป้ง	7
ภาพที่ 3 สมมติฐานของการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	11
ภาพที่ 4 แผนผังแสดงขั้นตอนการผลิตน้ำเชื่อมจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และอะไมโลกลูโคซิเดส คัดแปลงวิธีการผลิตจาก จีวรธรณ อภิรักษ์ภากร (2540) และลิขิต ศิริสันติเมธาคม และคณะ (2543)	28
ภาพที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{550}) ของแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 และแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 1042 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร yeast extract-peptone glucose	37
ภาพที่ 6 น้ำหนักแห้งของมวลเซลล์ของแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 และแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 1042 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร yeast extract-peptone glucose	38
ภาพที่ 7 เปรียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 และแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 1042 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร cultivation medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร	40
ภาพที่ 8 เปรียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 และแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 1042 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร cultivation medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร	42
ภาพที่ 9 เปรียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 และแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 1042 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร cultivation medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร	44
ภาพที่ 10 เปรียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 และแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 1042 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร cultivation medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร	45
ภาพที่ 11 เปรียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ที่อัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที	48
ภาพที่ 12 เปรียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 23 เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น 5.5 โดยเติมเฉพาะ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NH_4Cl และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ชุดควบคุม) และที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที	69
ภาพที่ 24 เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร ที่ความเร็วรอบของใบกวนเท่ากับ 50 100 และ 200 รอบต่อนาที	71
ภาพที่ 25 เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาณกล้ายเชื้อเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 10 15 และ 20 (โดยปริมาตร)	73
ภาพที่ 26 เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร โดยการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คงที่เท่ากับ 5.5 และ 6.5 โดยใช้ปริมาณกล้ายเชื้อเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 10 (โดยปริมาตร)	74
ภาพที่ 27 การหมักเพื่อผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะ โดยวิธีการเติมน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้นเท่ากับ 75 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 8 ครั้ง	76
ภาพที่ 28 เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะ โดยวิธีการเติมน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง	77
ภาพที่ 29 เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะ โดยวิธีการเติมน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้นเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง	78