ศักยภาพของมันเทศคุณภาพต่ำในการผลิตเอทานอลด้วยระเบียบวิธีพื้นผิวตอบสนอง

Potential use of low quality sweet potato for ethanol production by response surface methodology

ปาริฉัตร นิลอุปถัมภ์[1] ธณิกานต์ ธรสินธุ์[1] และสุภาษิต ชูกลิ่น[2*]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช

[2]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาศักยภาพในการผลิตเอทานอลด้วยมันเทศคุณภาพต่ำ (โรคด้วงงวงมันเทศ) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซีสและการหมักโดยใช้มันเทศคุณภาพต่ำ 25% w/v ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริก 1% v/v ความดันไอน้ำ 15 lb/in^2 อุณหภูมิ 121ºC นาน 30 min. ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 390.99 g/L พิจารณาผลของเชื้อ (*S. cerevisiae* TISTR 5339, *Z. mobilis* TISTR 405 และเชื้อร่วม *Z. mobilis* TISTR 405 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339) ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10%v/v พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 30°C เวลา 48 h และผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (10, 20 และ 30 g/L) ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล พบว่า มันเทศคุณภาพต่ำที่ผ่านการไฮโดรไลซีสแล้วหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จะมีค่าจลนพลศาสตร์ (*P*, $Y_{p/s}$ และ Q_p) สูงสุด เท่ากับ 26.00 g/L, 8.1 และ 0.72 g/L/h ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405 และเชื้อร่วม *Z. mobilis* TISTR 405 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 20 g/L หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10%v/v พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 30ºC เวลา 48 h จะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด (5.00%) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์ 10 และ 30 g/L ส่วนการพิจารณาผลของแอมโมเนียมซัลเฟต (0.05-0.15%) พีเอช (4.5-5.5) และปริมาณเชื้อเริ่มต้น (5-10%) ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลด้วยระเบียบวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) แบบ Box-Benhken design พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% พีเอช 5.5 และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 6.64 g/L และผลิตเอทานอลได้ 9.06% ดังนั้นมันเทศคุณภาพต่ำจึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลเพื่อนำไปใช้ผลิตเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนได้

คำสำคัญ : มันเทศ, เอทานอล, ไฮโดรไลซีส, การหมัก, *S.* Cerevisiae

Abstract

Potential use of low quality sweet potato (sweet potato weevil) for ethanol production by hydrolysis and fermentation process was determined in this research. Low quality sweet potato (25% w/v) was hydrolyzed by 1% sulfuric acid under 15 lb/in^2 pressure at 121°C for 30 min. It was found that maximum content of reducing sugar production was 390.99 g/L. Effects of microorganism strains (*S. cerevisiae* TISTR 5339, *Z. mobilis* TISTR 405 and co-culture of *Z. mobilis* TISTR 405 and *S. cerevisiae* TISTR 5339) at 10%v/v inoculum, pH 5.5 at 30°C for 48 h and effects of reducing sugar content (10, 20 and 30 g/L) on efficiency of ethanol production was studied. Results showed that *S. cerevisiae* TISTR 5339 was superior in terms of ethanol production compared to *Z. mobilis* TISTR 405 and co-culture of *Z. mobilis* TISTR 405 and *S. cerevisiae* TISTR 5339. Furthermore, kinetic value of this strain was 26.00 g/L, 8.1 and 0.72 g/L/h for *P*, $Y_{p/s}$ and Q_p, respectively. The highest ethanol content (5%) was produced when *S. cerevisiae* TISTR 5339 used with 10%v/v inoculum, pH 5.5 at 30ºC for 48 h. Moreover, effects of ammonium sulphate content (0.05-0.15%), pH (4.5-5.5) and inoculum content (5-10%) on reducing sugar and ethanol content was evaluated with response surface methodology (RSM) in Box-Benhken design. Optimum

conditions were 0.05% ammonium sulphate, pH 5.5 and 5% inoculum to show both residual reducing sugar 6.64 g/L and 9.06% ethanol production. Therefore, low quality sweet potato had a promising potential as substrate for ethanol production for sustainably renewable energy resource.

Keywords : Sweet potato, Ethanol, Hydrolysis, Fermentation, *S. cerevisiae*

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน supasit.c2015@gmail.com โทร. 08-6965-5608

1. บทนำ

โลกของเรากำลังประสบปัญหาภาวการณ์ขาดแคลนน้ำมัน จากปัญหาเรื่องน้ำมันในตลาดโลกมีราคาแพง ก่อให้เกิดผลกระทบต่อเศรษฐกิจและวิถีชีวิตของประชาชนอย่างมีนัยสำคัญไปทั่วโลก เช่นเดียวกันความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคขนส่ง [1] ประกอบกับอัตราการใช้น้ำมันของประเทศไทย มีอัตราเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศมากกว่าร้อยละ 90 คิดเป็นปริมาณโดยเฉลี่ยสูงถึง 6.16 แสนบาร์เรลต่อวัน ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศในการนำเข้าน้ำมันดิบมากกว่า 168,000 ล้านบาท ประเทศไทยมีวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตรที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้เป็นจำนวนมาก ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันเทศ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ โรงงานปาล์มน้ำมัน เป็นต้น [2]

มันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวสามารถผลิตแป้งที่มีความสำคัญทั่วโลก ในภูมิภาคเอเชีย และแอฟริกาสามารถผลิตได้คิดเป็นร้อยละ 95 ของโลก [3] เนื่องจากมันเทศเป็นพืชที่ให้ผลผลิตสูง โดยทั่วไปมันเทศมีองค์ประกอบของแป้งร้อยละ 20-30 [4-5] อย่างไรก็ตามในการเพาะปลูก จะมีโรคและแมลงศัตรูพืชของมันเทศทำให้ผลผลิตเสียหายและราคาตกตั้งแต่ร้อยละ 5-97 ซึ่งจากการศึกษาของพิทักษ์พงศ์ ป้อมปราณี [6] พบว่า โรคมันเทศที่เกิดความเสียหาย สามารถนำมาหมักเพื่อเข้าสู่กระบวนการการผลิตเอทานอลได้ โดยใช้เอนไซม์เพื่อปรับสภาพวัตถุดิบเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการย่อยแป้งให้เหลว และขั้นตอนที่ 2 เป็นการย่อยครั้งสุดท้ายหรือการทำให้หวานหรือเรียกว่า กระบวนการเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล (saccharification) เพื่อเข้าสู่การหมักโดยใช้เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 3.4 จะเห็นได้ว่าในการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยเอนไซม์มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ปฏิกิริยาที่ใช้นาน และมีราคาแพง

ดังนั้นงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้กรดซัลฟิวริก ซึ่งสามารถทำได้ง่าย และเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาสั้น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล หลังจากนั้นเข้าสู่กระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้เอทานอลใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างมันเทศคุณภาพต่ำ

เก็บตัวอย่างมันเทศคุณภาพต่ำ (โรคด้วงงวงมันเทศ) จากตลาดหัวอิฐ จ.นครศรีธรรมราช นำมาล้างดินออกให้สะอาด หั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า ขนาดชิ้นละ 1-2 cm นำไปเรียงบนถาดแสตนเลส แล้วนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 55°C (ความชื้นน้อยกว่า 8%) นำชิ้นมันเทศที่ได้มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด จากนั้นนำมาร่อนผ่านการคัดขนาดด้วยเครื่องคัดขนาดแบบตะแกรง (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 mm) [7]

2.2 การไฮโดรไลซีสมันเทศคุณภาพต่ำ

นำมันเทศคุณภาพต่ำ (ข้อ 1.1) จำนวน 25 g ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกปริมาตร 100 mL ความเข้มข้น 1% v/v นำไปให้ความร้อนด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in^2 เวลา 30 min ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) กรองของแข็งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 [8] นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS [9] และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-ซัลเฟต [10]

2.3 การศึกษาผลของเชื้อ (*S. cerevisiae* TISTR 5339, *Z. mobilis* TISTR 405 และเชื้อร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *Z. mobilis* TISTR 405) ในการหมักต่อการผลิตเอทานอล

นำมันเทศที่ผ่านการไฮโดรไลซีส (ข้อ 1.2) มาผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339, *Z. mobilis* TISTR 405 และเชื้อร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *Z. mobilis* TISTR 405 (10%v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Broth ในสภาวะ pH 5.5 และอุณหภูมิ 30°C เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 h เป็นเวลา 48 h วัดค่าพีเอช โดยใช้ pH meter น้ำหนักเซลล์แห้ง ด้วย drying method [11] ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS [9] วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วย vinometer และคำนวณค่าจลนพลศาสตร์ของการหมัก ($Y_{p/s}$, Q_p และ P)

2.4 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อการผลิตเอทานอล

นำมันเทศที่ผ่านการไฮโดรไลซีส (ข้อ 1.2) (10, 20 และ 30 g/L) มาผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ (ข้อ 1.3) (10%v/v) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Broth ในสภาวะ pH 5.5 และอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 h คำนวณค่าจลนพลศาสตร์ของการหมัก ($Y_{p/s}$, Q_p และ P)

2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจาก *S. cerevisiae* TISTR 5339

คัดเลือกปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข้อ 1.4) หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 (10%v/v) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยมีการกำหนดปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณเอทานอลไว้ 3 ปัจจัย ซึ่งระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1) ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำปัจจัยต่างๆ ไปกำหนดลำดับและออกแบบชุดการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ DESIGN-EXPERT version 10.0 ด้วยเทคนิควิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) แบบ Box-Behnken Design จะได้จำนวนชุดทดลองทั้งหมด 17 ชุด โดยมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ชุดการทดลอง จากนั้นทำการทดลองเอทานอลตามลำดับชุดการทดลองที่ออกแบบไว้ แล้วนำผลการผลิตได้จากการหมักด้วยสภาวะที่แตกต่างกันไปทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

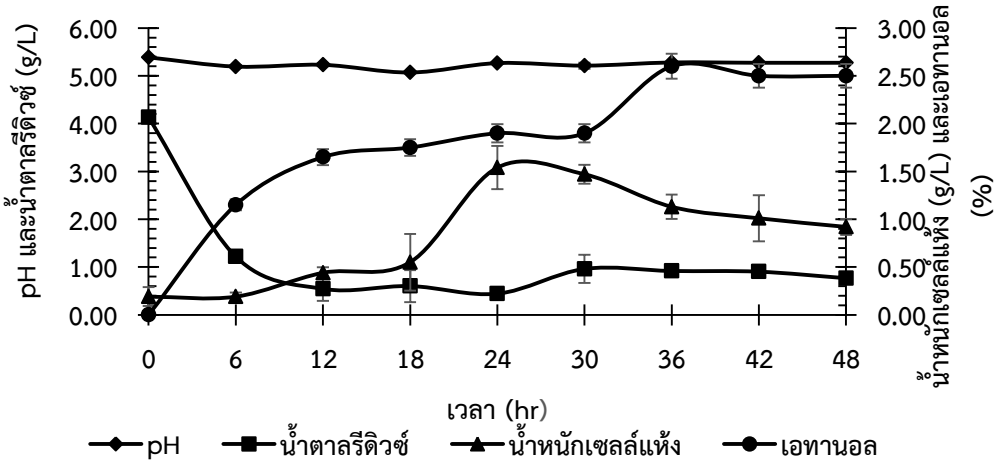
ปัจจัย	ระดับ		
	-1	0	+1
แอมโมเนียมซัลเฟต (X_1)	0.05	0.10	0.15
พีเอช (X_2)	4.5	5	5.5
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (X_3)	5.0	7.5	10.0

3. ผลการวิจัย

1. ผลการผลิตเอทานอลจากมันเทศด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339, *Z. mobilis* TISTR 405 และเชื้อร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *Z. mobilis* TISTR 405

1.1 เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339

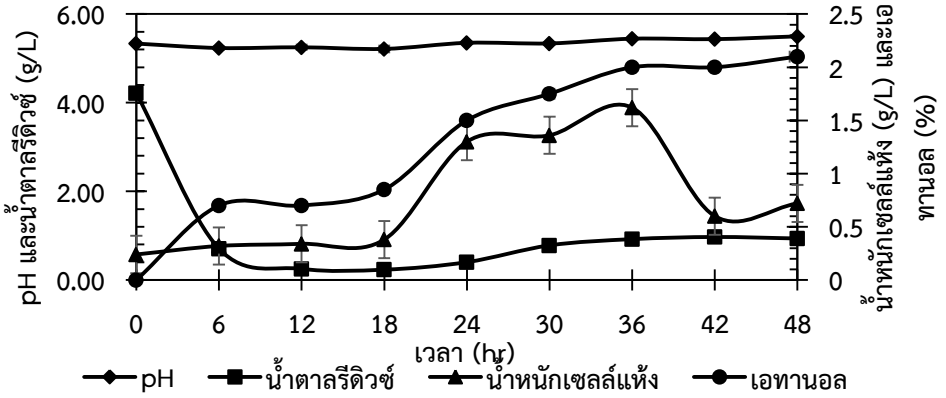
จากการใช้ความเข้มข้นของมันเทศผง 25% w/v ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1%v/v ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 390.99 g/L ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเหลว YPD หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 10%v/v อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 48 h เก็บตัวอย่างทุก 6 h พบว่า เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6 ส่งผลให้น้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงก็เริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไปและเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากมีการใช้แหล่งน้ำตาลในการสร้างมวลเซลล์ และผลิตภัณฑ์ส่งผลให้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 มีการเจริญเติบโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 2.6% หลังจากนั้นอัตราการเจริญเติบโตก็เริ่มลดลง ส่วนอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ก็ไม่มีผลการเปลี่ยนแปลงมากนัก และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ค่าพีเอชเท่ากับ 5.27 ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากมันเทศคุณภาพต่ำที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% v/v ด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121ºC นาน 30 min ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยเชื้อ *S. cervisiae* TISTR 5339

1.2 เชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405

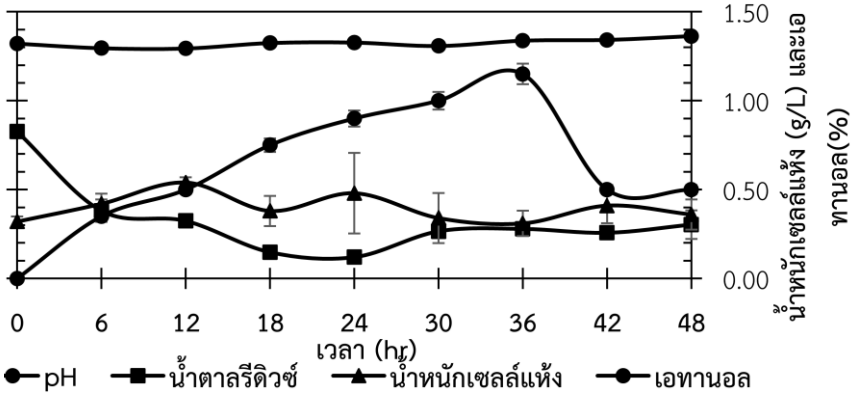
จากการทดลองโดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยมันเทศผง 25% w/v ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1%v/v ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 390.99 g/L ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเหลว YPD นำไปหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Z. mobilis* TISTR 405 พบว่า มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 2 ส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นระดับน้ำตาลมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และเริ่มมีค่าคงที่เพราะอาหารและแหล่งคาร์บอนเริ่มหมดส่งผลทำให้เซลล์ไม่เจริญเติบโต และมวลเซลล์เพิ่มขึ้นชั่วโมงที่ 18 จนเริ่มคงที่ชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นชั่วโมงที่ 42 ก็เริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 48 และการผลิตเอทานอลของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไปและที่เวลา 36 ชั่วโมงสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 2% และเริ่มคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างก็ไม่มีผลการเปลี่ยนแปลงมากนัก ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากมันเทศคุณภาพต่ำที่ผ่านการ ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1%v/v ด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 min ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405

1.3 เชื้อร่วมระหว่าง *Z. mobilis* TISTR 405 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339

จากการทดลองโดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการย่อยมันเทศผง 25% w/v ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 390.99 g/L ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเหลว YPD นำไปหมักด้วยเชื้อร่วมระหว่าง *Z. mobilis* TISTR 405 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 พบว่า การใช้น้ำตาลรีดิวซ์เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากมีการใช้มวลเซลล์ในการเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอลของเชื้อหลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 48 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 1.8% ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากมันเทศคุณภาพต่ำที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% v/v ด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C 30 min ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยเชื้อร่วมระหว่าง *Z. mobilis* TISTR 405 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339

2.ค่าจลนพลศาสตร์การหมักเอทานอลจากมันเทศคุณภาพต่ำ

ผลการทดลอง พบว่า แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่าเนื่องจากความเข้มข้นเอทานอลและองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำหมักในทุกๆ สภาวะเริ่มคงที่ที่ 36 h โดยการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *S cerevisiae* TISTR 5339 ให้ค่า *P*, $Y_{p/s}$ และ Q_p สูงสุด เท่ากับ 26.00±0.71 g/L 8.1±0.55 g เอทานอล/g น้ำตาลที่ใช้ และ 0.72±0.04 g/L/h ตามลำดับ รองลงมาคือเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405 และเชื้อร่วมตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 เพื่อเป็นตัวแทนสำหรับผลิตเอทานอล โดยศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นปัจจัยต่อไป

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากมันเทศคุณภาพต่ำโดยเชื้อจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* TISTR 5339, *Z. mobilis* TISTR 405 และเชื้อร่วมระหว่าง *Z. mobilis* TISTR 405 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339

สายพันธุ์เชื้อ	*P* (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/L)	Q_p (g/L/h)	t (h)
S. cerevisiae TISTR 5339	26.00±0.71	8.1±0.55	0.72±0.04	36
Z. mobilis TISTR 405	20.00±0.00	6.08±0.10	0.56±0.00	36
เชื้อร่วม *S.cerevisiae*TISTR และ *Z. mobilis* TISTR 405	11.50±1.06	5.30±1.38	0.32±0.06	36

3. การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลโดยคัดเลือกปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 10, 20 และ 30 g/L เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับผลิตเอทานอล โดยมีสภาวะการหมักเป็นดังนี้ เติมเชื้อ *S.cerevisiae* TISTR 5339 10%v/v อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 48 h สภาวะไร้อากาศ เก็บตัวอย่างทุก 6 h พีเอชเริ่มต้นมีค่า 5.5 คำนวณค่าประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่ 36 h ของการหมัก พบว่า การผลิตเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5339 สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ 20 g/L ให้ผลได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 20.06±3.38 รองลงมาคือ ผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 g/L ผลได้เอทานอลเท่ากับ 7.59±0.57 และต่ำสุดที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 g/L ส่วนอัตราการผลิตเอทานอลของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้ง 3 ระดับก็ไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นจึงคัดเลือกปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล ที่ 20 g/L สำหรับเป็นตัวแทนเพื่อการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลต่อไป

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากมันเทศคุณภาพต่ำที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่างกัน โดยเชื้อจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* TISTR 5339

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	*P* (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/L)	Q_p (g/L/h)	t (h)
10	28.44±0.00	7.59±0.57	0.79±0.00	36
20	30.81±1.12	20.06±3.38	0.86±0.03	36
30	37.92±0.00	3.04±0.22	1.05±0.00	36

4.สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

นำน้ำตาลรีดิวซ์ 20 g/L หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 เพื่อเป็นตัวแทนในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยมีการกำหนดปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณเอทานอลไว้ 3 ปัจจัย และออกแบบชุดการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ DESIGN-EXPERT version 10 ด้วยเทคนิควิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) แบบ Box-Behnken Design

จากนั้นทำการทดลองเอทานอลตามลำดับชุดการทดลองที่ออกแบบไว้ แล้วนำผลการผลิตได้จากการหมักด้วยสภาวะที่แตกต่างกันไป ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากมันเทศคุณภาพต่ำโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ด้วยระเบียบวิธีพื้นผิวตอบสนอง

การทดลอง	ตัวแปรต้น			น้ำตาลรีดิวซ์ (Y_1) (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (Y_2) (%)
	แอมโมเนียมซัลเฟต (X_1) (%w/v)	พีเอช (X_2)	เชื้อเริ่มต้น (X_3) (%w/v)		
1	0.05	4.5	7.5	9.11	5.43
2	0.05	5.5	7.5	7.43	10.33
3	0.15	4.5	7.5	5.47	5.00
4	0.15	5.5	7.5	5.99	9.77
5	0.1	4.5	5	7.32	5.17
6	0.1	5.5	5	6.06	8.23
7	0.1	4.5	10	5.39	6.43
8	0.1	5.5	10	7.45	6.83
9	0.05	5	5	7.59	7.00
10	0.15	5	5	7.01	9.00
11	0.05	5	10	6.29	7.97
12	0.15	5	10	7.34	6.50
13	0.1	5	7.5	7.18	6.00
14	0.1	5	7.5	6.91	6.23
15	0.1	5	7.5	6.72	7.83
16	0.1	5	7.5	6.68	5.67
17	0.1	5	7.5	6.67	8.23

จากการประมวลผลด้วยเทคนิควิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) แบบ Box-Behnken Design พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% พีเอช 5.5 และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 6.64 g/L และผลิตเอทานอลได้ 9.06%

4. สรุปและอภิปรายผล

มันเทศคุณภาพต่ำเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริก (1% v/v, อุณหภูมิ 121°C, นาน 30 min) หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5339, *Z. mobilis* TISTR 405 และเชื้อร่วม *Z. mobilis* TISTR 405 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 เชื้อแต่ละสายพันธ์สามารถผลิตเอทานอลได้โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 (10% v/v, pH 5.5, อุณหภูมิ 30°C, นาน 48 h) สามารถผลิตเอทานอลได้มีประสิทธิภาพสูงสุด (5.00%) สอดคล้องกับการศึกษาของ กนกวรรณ [12] พบว่า การผลิตเอทานอลจากมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว ยีสต์สายพันธ์ที่เหมาะสม คือ *S. carlsbergensis* TISTR 5018 และมีผลใกล้เคียงกับการใช้ยีสต์สายพันธ์ *S. cerevisiae*

TISTR 5088 อธิบายได้ว่ายีสต์ในกลุ่มจีนัส Sacharomyces เป็นยีสต์ที่มีสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ดีและมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูง [13] รองลงมาเป็นการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405 สามารถผลิตเอทานอลได้มีประสิทธิภาพสูงสุด (2.00%) และน้อยสุดเป็นการผลิตเอทานอลจากเชื้อร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5339 กับ *Z. mobilis* TISTR 405 (1.80%) สอดคล้องกับการศึกษาของเบญจวรรณ [14] ผลิตเอทานอลด้วยการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* และ *Z. mobilis* โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากชานอ้อย พบว่า เชื้อที่สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดคือ *S.cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ 0.76% รองลงมาคือเชื้อ *Z.mobilis* สามารถผลิตเอทานอล ได้ 0.60% ส่วนกระบวนการหมักแบบใช้เชื้อทั้ง 2 ชนิดผสมกันสามารถผลิตเอทานอลได้ต่ำที่สุด คือ 0.36%

สภาวะที่เหมาะสมของเอทานอลด้วยระเบียบวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) แบบ Box-Benhken design ด้วยปัจจัยศึกษาของแอมโมเนียมซัลเฟต (0.05-0.15%) พีเอช (4.5-5.5) และปริมาณเชื้อเริ่มต้น (5-10%) จะได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% พีเอช 5.5 และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% มีน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 6.64 g/L และผลิตเอทานอลได้ 9.06% โดยในกระบวนการหมักด้วยยีสต์นั้นธาตุไนโตรเจนนั้นจัดวามีความสำคัญตอองคประกอบของเซลลยีสต การเลือกใชความเขมขนของไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญตอเซลล์ ค่า pH ในช่วง 4.5-6.5 ยีสต์สามารถเจริญได้ หากอาหารมีสภาพความเป็นกรดสูงหรือประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิตริก และกรดแลคติกอาจจะส่งผลกระทบให้เกิดการยับยั้งการเจริ ญของยีสต์โดย pH ที่เหมาะสมจะส่งผลต่อความสามารถในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ การรักษาสมดุลของประจุภายในเซลล์และยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียด้วย ส่วนปริมาณเชื้อเริ่มจะมีผลต่อการเจริญของยีสต์เช่นกัน เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูงจะทำให้อัตราการเจริญของยีสต์สูง โดยรายงานการศึกษาของ Swain et al [15] ศึกษาการผลิตเอทานอลชีวภาพจากแป้งมันเทศด้วยเชื้อร่วมระหว่าง *Trichoderma* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมักแบบ solid-state พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2%, pH 5.0, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10%, อุณหภูมิ 30°C นาน 72 h มีผลผลิตเอทานอลสูงสุด 2.8 g/kg substrate/h และผลได้เอทานอลเท่ากับ 47 g/100g sugar consumed และการศึกษาของธันวดี [16] ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมด้วยยีสต์และแบคทีเรีย พบว่า สูตรอาหารที่ใช้น้ำอัดลมหมดอายุที่เจือจางให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C อัตราการเขย่า 100 rpm นาน 48 h ด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 9.02 g/L

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราชที่สนับสนุนงบประมาณ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัย และทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยประเภททุนบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2560

6. เอกสารอ้างอิง

[1] กรองแก้ว เลาหลิดานนท์, 2555, “น้ำมันดีเซลล์สังเคราะห์เชื้อเพลิงใหม่ทดแทนน้ำมันดีเซล หนึ่งในพลังงานทางเลือกของประเทศไทย,” วารสารพลังงานทางเลือก, 27: 25 – 32.

[2] ณีรนุช ควรเชิดชู, สุจิตรา วงเกษมจิตต์, 2550, “การผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงผสมเอทธานอล,” วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[3] Srichuwong, S., Orikasa, T., Matsuki, J., Shiina, T., Kobayashi, T., Tokuyasu, K., 2012, “Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production,” 39: 120 – 127.

[4] Zhang, P., Chen, C., Shen, Y., Ding, T., Ma, D., Hua, Z., Sun, D. 2013, “Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production,” Bioresource Technology, 128: 835 - 838.

[5] วิภาภรณ์ วรรณธนาเลิศ, 2546, “ความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำยาง ความลึกของการลงหัวในมันเทศ (Ipomoea batatas Lamk.) สายพันธุ์ต่างๆ กับการเข้าทำลายของด้วงงวงมันเทศ (*Cylas formicarius F.*),” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

[6] พิทักษ์พงศ์ ป้อมปราณี, 2552, “การผลิตเอทานอลจากมันเทศเหลือทิ้ง,” วารสารวิชาการราชภัฏตะวันตก, ฉบับ ที่ 1, (4): 5 - 12.

[7] Lareo, C., Ferrari, M.D., Guigou, M., Fajardo, L., Larnaudie, V., Ramirez, B., Martinez-Garreiro, J, 2013, “Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation,” SpringerPlus, 2: 1 – 11.

[8] ปริญญพันธุ์ เพชรจรัส, เมทินี วสุนธราวัฒน์, อรรจนา ด้วงแพง, 2555, “การศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยมันเส้นด้วยสารเคมี,” วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, ฉบับที่ 42 (พิเศษ): 37 – 40.

[9] Miller, G.L, 1959, “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar,” Analytical Chemistry, 31: 426 – 428.

[10] Dubois, M., Gilles, KA., Hamilton, JK., Rebers, PA., Smith, F, 1956, “Colormetric method for determination of sugars and related substances,” Analytical Chemistry, 28: 350-356.

[11] Dermlim, W., Prasetsan, P., Doelle, HW., 1999, “Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella sp*,” Applied Microbial and Biotechnology, 52: 698-703.

[12] กนกวรรณ แสงสุวรรณ, 2557, “การผลิตเอทานอลจากมันเทศโดย *Saccharomyces carlbergenesis* TISTR 5018,” วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

[13] สุวิมล กีรติพิบูล, 2546, “จุลินทรีย์กับการควบคุมลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม,” กรุงเทพมหานคร: ชัยเจริญ.

[14] เบญจวรรณ ถวิลรักษ์, 2556, “การผลิตเอทานอลด้วยการหมักด้วยเชื้อ Saccharomyces cerevisiae และ Zymomonas mobilis โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากซานอ้อย,” วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

[15] Swain, MR., Mishra, J., Thatoi, H, 2013, “Bioethanol production from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) flour using co-culture of Trichoderma sp. And Saccharomyces cerevisiae in solid-state fermentation,” Brazilian Archives of Biology and Technology, 56: 171-179.

[16] ธันวดี เตชะภัทรวรกุล สุขสาโรจน์, 2551, “ความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์และแบคทีเรีย,” รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์