รายงานการวิจัย
เรื่อง

ผลของอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) และความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไบโอบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

Effect of synthetic medium (P2 medium) and yeast extract concentrations on biobutanol production from sugarcane molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2561)

รายงานการวิจัย
เรื่อง

ผลของอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) และความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไบโอบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

Effect of synthetic medium (P2 medium) and yeast extract concentrations on biobutanol production from sugarcane molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2561)

รายงานการวิจัย
เรื่อง

ผลของอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) และความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไบโอบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

Effect of synthetic medium (P2 medium) and yeast extract concentrations on biobutanol production from sugarcane molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2561)

รายงานการวิจัย
เรื่อง

ผลของอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) และความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไบโอบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

Effect of synthetic medium (P2 medium) and yeast extract concentrations on biobutanol production from sugarcane molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2561)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เนื่องจากปัญหาราคาน้ำมันที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาและมีแนวโน้มสูงขึ้น ประกอบกับแหล่งพลังงานปัจจุบันที่เป็นแหล่งพลังงานจากฟอสซิลมีอยู่ในปริมาณจำกัด อาจจะทำให้ในอนาคตอาจเกิดปัญหาการขาดแคลนพลังงานได้ ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนในแบบรูปอื่นๆ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อนำมาใช้ทดแทนหรือลดปริมาณการใช้น้ำมันปิโตรเลียม (Sun and Liu, 2010) พลังงานทางเลือกมีอยู่หลายชนิด เช่น เอทานอล ไฮโดรเจน และ มีเทน เป็นต้น และพลังงานทางเลือกอีกชนิดหนึ่งที่มีการเริ่มการศึกษากันอย่างแพร่หลายก็คือบิวทานอล (butanol) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกในอนาคตอันใกล้นี้ บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถผลิตได้จากกระบวนการทางเคมีและใช้แบคทีเรียการผลิต ข้อดีของบิวทานอลคือ บิวทานอลสามารถผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงได้ดีกว่าเอทานอล และมีความดันไอต่ำกว่า ในปริมาณที่เท่ากันกับเอทานอล บิวทานอลสามารถขับเคลื่อนรถยนต์ได้ไกลกว่า อีกทั้งการใช้บิวทานอลไม่จำเป็นต้องปรับแปลงเครื่องยนต์ นอกจากนี้บิวทานอลมีความสะดวกในการเก็บและการขนส่ง เพราะสามารถขนส่งบิวทานอลได้ทางท่อโดยตรงและมีคุณสมบัติไม่ดูดน้ำ ทำให้มีฤทธิ์กัดกร่อนท่อส่งน้อย (Shen and Liao, 2008; Al-Shorgani et al., 2011; Al-Shorgani et al., 2012) ข้อดีอีกประการของบิวทานอลคือ ช่วยลดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ชั้นบรรยากาศซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน ด้วยเหตุนี้บิวทานอลจึงมีความเหมาะสมในการนำมาผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงมากกว่าเอทานอล (Al-Shorgani et al., 2011; Al-Shorgani et al., 2012) จากประโยชน์ที่ได้กล่าวมานี้บิวทานอลยังสามารถใช้เป็นตัวทำละลาย ตัวสกัด หรือสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมได้ เช่น อุตสาหกรรมเรซิน (resin) อุตสาหกรรมการทำพลาสติก และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เกิดความสนใจในการผลิตบิวทานอลเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมมากขึ้น

ในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงเฉพาะบิวทานอลที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย โดยบิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมัก ที่เรียกว่า กระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (acetone-butanol-ethanol, ABE) กระบวนการหมักบิวทานอลเกิดขึ้นโดย clostridia ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) ไม่ใช้อากาศ (obligate anaerobic) สามารถสร้างสปอร์ได้ (Maddox et al., 1995; Lee et al., 2008; Patakova et al., 2013) การผลิตบิวทานอลโดยแบคทีเรีย สามารถใช้วัสดุทางการเกษตรหรือของเสียจากอุตสาหกรรมทางชีวภาพเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ ส่วนใหญ่มักใช้วัตถุดิบตั้งต้นที่มีน้ำตาลมาใช้ในการผลิต เนื่องจากไม่ต้องมีการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนนำวัตถุดิบมาใช้ในการผลิต (Ezeji et al., 2004) อย่างไรก็ตามวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (ไฮโดรไลซีส) ก็สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลได้ วัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถนำมาผลิตบิวทานอลได้ เช่น หางนม (Maddox et al., 1995) มันสำปะหลัง (Gutierrez et al., 1998) corn steep liquor (Qureshi and Blaschek, 1999) แป้งข้าวโพด (Ezeji et al., 2004)

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กากน้ำตาล (Ni et al., 2012) ฟางข้าว (Ranjan et al., 2013) และ น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน (Sirisantimethakom et al., 2004) เป็นต้น

กากน้ำตาลมีมากในประเทศไทย และมีน้ำตาลที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการบำบัดก่อน (pretreatment) เป็นผลพลอยได้หลักของโรงงานผลิตน้ำตาล สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลได้รายงานว่าในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยมีผลผลิตกากน้ำตาลประมาณ 3,610,000 ตัน ราคากากน้ำตาลเฉลี่ยอยู่ที่ 3.60 บาทต่อกิโลกรัม (Office of the cane and sugar board, 2014) กากน้ำตาลสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมปุ๋ย สุรา และผงชูรส เป็นต้น และส่วนที่เหลืออาจนำไปราดถนน หรือไม่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ (Office of the cane and sugar board, 2014) จากข้อมูลดังกล่าวกากน้ำตาลจึงน่าจะเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการนำมาผลิตบิวทานอล

แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต และผลิตเอบีอีเชื้อแบคทีเรีย (Isar และ Rangaswamy, 2012) โดย Isar และ Rangaswamy (2012) พบว่าเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน แบคทีเรียจะสามารถผลิตบิวทานอลได้ต่างกัน ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อ น้ำแช่ข้าวโพด ทริปโตน ไดแอมโมเนียไฮโดรเจนฟอสเฟส และแอมโมเนียมซัลเฟส เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตบิวทานอลจากอาหารสังเคราะห์ (anaerobic sugar medium) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน *C. beijerinckii* ATCC 10132 สามารถผลิตบิวทานอลได้ต่างกัน จากผลการทดลองสรุปได้ว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจน และระดับความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อการผลิตบิวทานอล

เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลสูงสุดและลดต้นทุนในการผลิตบิวทานอล ในการศึกษาครั้งนี้จะเน้นศึกษาผลของการเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร P2 medium และความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้น (สารสกัดจากยีสต์) ต่อการผลิตบิวทานอลโดยการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับต่อยอดในการพัฒนากระบวนการหมักบิวทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของสารอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) ต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ศึกษาผลของสารอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) ต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461 โดยการเปรียบเทียบการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมและไม่เติมสารอาหารจาก P2 medium

1.3.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (1 ถึง 5 กรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

1.3.3 ศึกษาการผลิตบิวทานอลอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) ในระบบการหมักแบบกะ โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461 เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (control)

1.4 สมมติฐานการวิจัย

ในปัจจุบันการผลิตบิวทานอลยังมีค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง โดยปกติการผลิตบิวทานอลจากวัตถุดิบต่างๆ จะมีการเติมสารอาหารจาก P2 medium ร่วมด้วย ซึ่งองค์ประกอบของ P2 medium ค่อนข้างซับซ้อนและราคาแพง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตบิวทานอลโดยไม่มีการเติมสารอาหารจาก P2 medium หรือมีการเติมสารอาหารเพียงแหล่งไนโตรเจนเพื่อให้จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งคาดว่าถ้าสามารถลดการเติมสารอาหารหรือเติมเพียงแหล่งไนโตรเจนได้ ก็จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตบิวทานอล และคาดว่าข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้เป็นประโยชน์ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย/(นิยามศัพท์เฉพาะ)

1.5.1 P2 medium คือ อาหารสังเคราะห์ที่ใช้สำหรับผลิตบิวทานอล

1.5.2 เอบีอี (ABE) คือ ผลรวมของอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ที่ผลิตขึ้นระหว่างการหมัก

1.5.3 *Clostridium* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ (Patakova et al., 2013) จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) สามารถสร้างสปอร์ (spore-forming) และเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria)

1.5.4 กากน้ำตาล (Molasses) เป็นของเหลวสีดำที่เหนียวข้น ซึ่งไม่สามารถจะตกผลึกน้ำตาลได้อีก เป็นเนื้อของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายปนอยู่ในน้ำอ้อย ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท และสารเคมี

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบผลของสารอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) ต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

1.6.2 ทราบผลของความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

1.6.3 ได้ข้อมูลพื้นฐานทางวิชาการในการผลิตบิวทานอลโดยใช้ *C. beijerinckii* TISTR 1461 จากกากน้ำตาลในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตบิวทานอลในระดับขยายส่วนหรือโรงงานอุตสาหกรรมในอนาคต

1.6.4 ข้อมูลและงานวิจัยที่ได้สามารถเสนอผลงานระดับนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี RAJABHAT DHONBURI UNIVERSITY

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

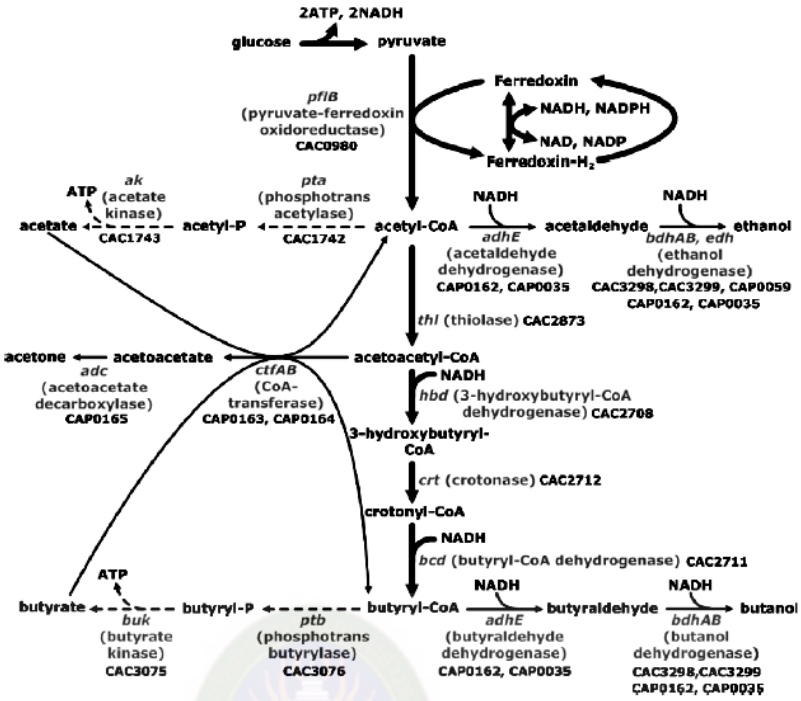
2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตบิวทานอล

จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Clostridium* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ (Patakova et al., 2013) จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) สามารถสร้างสปอร์ (spore-forming) และเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) จุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium* ที่ใช้ในการผลิตบิวทานอล ได้แก่ *C. beijerinckii* (Areesirisuk et al., 2010; Wanga and Blaschek, 2011), *C. acetobutylicum* (Yousheng et al., 2011; Wal et al., 2013), *C. Saccharoperbutylacetonicum* (Al-Shorgani et al., 2011) และ *C. pasteurianum* (Ahn et al., 2011) เป็นต้น ซึ่งความสามารถในการผลิตบิวทานอลของ *Clostridium* ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น สารอาหาร วัตถุดิบที่ใช้ สภาวะแวดล้อมในการหมัก และกระบวนการที่ใช้ในการหมัก (Tashiro et al., 2005; Al-Shorgani et al., 2011; Isar and Rangaswamy, 2012)

2.2 การผลิตบิวทานอล

ในกระบวนการหมักสามารถผลิตบิวทานอลได้จากกระบวนการที่เรียกว่า กระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล หรือ เอบีอี (acetone butanol ethanol, ABE fermentation) ดังแสดงในภาพที่ 2.1 โดยการเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดบิวไทริก และกรดอะซิติก ในขั้นตอนที่เรียกว่า acidogenesis phase ขั้นตอนการผลิตกรดส่วนใหญ่เกิดขึ้นในช่วงของการเจริญของแบคทีเรีย (exponential growth phase) จนถึงช่วงที่เซลล์เจริญได้เต็มที่ หรือเรียกว่าช่วง clostridia form ซึ่งเซลล์แบคทีเรียจะมีรูปร่างเป็นท่อน (Hartmanis and Gatenbeck, 1984) จากนั้นกรดบิวไทริกจะเปลี่ยนเป็นบิวทานอล และกรดอะซิติกจะเปลี่ยนเป็นอะซีโตนต่อในขั้นตอนที่เรียกว่า solventogenesis phase ซึ่งเกิดในช่วงที่เซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนจาก clostridia form เข้าสู่ช่วงที่กำลังสร้างสปอร์ (forespores) ในขั้นตอนนี้รูปร่างเซลล์แบคทีเรียจะมีลักษณะแตกต่างจากช่วงแรก โดยเริ่มมี forespores เกิดขึ้น (Eversloh and Bahl, 2011) เอนไซม์ที่สำคัญในขั้นตอนนี้ คือ CoA-transferase จะเปลี่ยนจาก butyrate เป็น butyryl-CoA และ acetate เป็น acetyl-CoA จากนั้น butyraldehyde dehydrogenase และ butanol dehydrogenase จะเปลี่ยน butyryl-CoA เป็น butyradehyde และบิวทานอล ตามลำดับ และ thiolase, CoA-transferase และ acetoacetate decarboxylase จะเปลี่ยน acetyl-CoA, acetoacetyl-CoA, acetoacetate และอะซีโตน ตามลำดับ เกิดผลพลอยได้อื่นคือ เอทานอล โดยเอนไซม์ acetaldehyde dehydrogenase และ ethanol dehydrogenase (ภาพที่ 2.1)

สถาบันวิทยบริการ
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 2.1 วิถีการผลิตบิวทานอลของ *C. acetobutylicum* (ATP:adenosine triphosphate, NAD: nicotina mide adenine dinucleotide, NADH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADPH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) (Lee et al., 2008)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

การใช้น้ำตาลเริ่มต้นในการหมักที่ต่างกันส่งผลให้ได้บิวทานอลที่แตกต่างกัน โดยรายงานวิจัยของ Al-Shorgani และคณะ (2011) พบว่าการใช้น้ำตาลเริ่มต้นที่ 20 กรัมต่อลิตร ในการผลิตบิวทานอลจากอาหารสังเคราะห์ที่และมีการเติมกรดบิวไทริกที่ 10 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ได้บิวทานอลและเอบีอี 12.99 และ 15.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Areesirisuk และคณะ (2010) ใช้น้ำตาลเริ่มต้นที่ 60 กรัมต่อลิตร ในการผลิตบิวทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานด้วย *C. beijerinckii* JCM1390 ภายใต้สภาวะนี้ได้บิวทานอลและเอบีอี 7.29 และ 8.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ Lu และคณะ (2012) ใช้น้ำตาลเริ่มต้นที่ 80 กรัมต่อลิตร ในการผลิตบิวทานอลจาก cassava bagasse hydrolysate ด้วย C. *acetobutylicum* JB200 โดยได้บิวทานอลและเอบีอี 9.71 และ 15.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้ว แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต และผลิตเอบีอีเชื้อแบคทีเรีย (Isar และ Rangaswamy, 2012) โดย Isar และ Rangaswamy (2012) พบว่าเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน แบคทีเรียจะสามารถผลิตบิวทานอลได้ต่างกัน โดยเมื่อใช้เปปโตน ยีสต์แอ็กแทรกซ์ บีฟแอ็กแทรกซ์ น้ำแช่ข้าวโพด ทริปโตน ไดแอมโมเนียไฮโดรเจนฟอสเฟส และแอมโมเนียมซัลเฟส 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ในอาหารสังเคราะห์ (anaerobic sugar medium) ที่มีน้ำตาลกลูโคส

เริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร *C. beijerinckii* ATCC 10132 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 4.4, 4.0, 4.8, 1.0, 3.8, 1.6 และ 1.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบีฟแอ็กแทรกซ์เป็น 50 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้เพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิตได้ 7.9 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจน และระดับความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อการผลิตบิวทานอล นอกจากนี้ยังพบว่าธาตุเหล็กเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเปลี่ยนไพรูเวทเป็นอะซิติลโคเอ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ ferredoxin oxidoreductase iron-sulfur protein (Kim et al., 1988) เมื่อ *C. acetobutylicum* สูญเสีย megaplasmid pSOLl มีผลทำให้สูญเสียความสามารถในการผลิตเอบีอีในระหว่างการหมัก ซึ่งสามารถป้องกันได้โดยการหมักภายใต้สภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด (Ezeji et al., 2005) ในขณะที่ Chen และ Blaschek (1999) พบว่าการเกิด degeneration ใน *C. Beijerinckii* BA101 สามารถป้องกันได้โดยการเติมโซเดียมอะซิเตต นอกจากนี้ Bryant และ Blaschek (1988) พบว่าการเติมฟอสเฟต 6.5 มิลลิโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเพิ่มการเจริญและการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตของ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ซึ่งทำให้สามารถเพิ่มการผลิตบิวทานอลได้ โดยสามารถผลิตบิวทานอลในอาหารสังเคราะห์ (TGY medium) ได้ 7.9 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Al-Shorgani et al. (2011) รายงานว่าการเติมกรดบิวไทริก 10 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลของ *C. Saccharoperbutyl acetonicum* N1-4 เพิ่มขึ้น (12.99 กรัมต่อลิตร) จากที่ไม่ได้มีการเติมกรดบิวไทริก (1.90 กรัมต่อลิตร) โดยกรดบิวไทริกสามารถเปลี่ยนเป็นบิวทานอลได้โดยตรง อย่างไรก็ตามเมื่อเติมกรดบิวไทริกมากกว่า 15 กรัมต่อลิตร ความสามารถในการการผลิตบิวทานอล และการเจริญของเชื้อจะลดลง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
Mahasarakham Rajabhat University

2.4 กากน้ำตาล

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นของเหลวสีดำที่เหนียวข้น ซึ่งไม่สามารถจะตกผลึกน้ำตาลได้อีก เป็นเนื้อของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายปนอยู่ในน้ำอ้อย ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท และสารเคมี เช่น ปูนขาว ซึ่งใช้ในการตกตะกอนให้น้ำอ้อยใสส่วนประกอบของกากน้ำตาลจะไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับพันธุ์อ้อยและกรรมวิธีการผลิต แต่ส่วนมากพบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท และน้ำ ปัจจุบันนี้โรงงานน้ำตาลที่ทันสมัยมีความสามารถในการสกัดน้ำตาลออกจากกากน้ำตาลได้มากขึ้นแต่ก็ยังมีหลงเหลืออยู่ เพราะการสกัดออกทั้งหมดจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่สูญเสียไปกับกากน้ำตาลซึ่งเป็นการสูญเสียค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการสูญเสียแบบอื่น (นฤมล, 2549)

2.4.1 กากน้ำตาลมี 3 ชนิด ได้แก่

(1) Blackstrap molasses หรือ Final molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาล ร้อยละ 50-60 การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้น้ำตาลประเภทนี้เป็นวัตถุดิบ

(2) Refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ปริมาณน้ำตาลร้อยละ 48

(3) Highest molasses หรือ Invert molasses คือ กากน้ำตาลที่ไม่ใช่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล แต่ได้จากการนำบางส่วนของน้ำอ้อยไปแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหย ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 77

2.4.2 การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล

(1) การใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงแบคทีเรีย (Keller, 1967)

(2) การใช้กากน้ำตาลมาเป็นมาเป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งใช้ในการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ บิวธิลแอลกอฮอล์ อะซีโตน กรดซิตริก กลีเซอรอล และยีสต์ เอทิลแอลกอฮอล์ใช้ทำกรดอะซิติกเอธีลอีเธอร์ เป็นต้น

(3) การใช้กากน้ำตาลในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมทำสุราอุตสาหกรรมการทำผงชูรสอุตสาหกรรมการทำยีสต์อุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรคบางอย่างอุตสาหกรรมการทำน้ำปลาและซีอิ๊ว (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2553)

(4) การใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งวิตามินบีจำนวนมากมาใช้หรือผลิตเป็นอาหารสัตว์ (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2553)

(5) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาพลาเทนซิส ซีเอ็มยู 2 ด้วยน้ำกากส่าเหล้า (กากน้ำตาล) ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงน้ำวน

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตบิวทานอล

Clostridium เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ (Patakova et al., 2013) จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) สามารถสร้างสปอร์ (spore-forming) และเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic bacteria) จุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium* ที่ใช้ในการผลิตบิวทานอล ได้แก่ *C. beijerinckii* (Areesirisuk et al., 2010; Wanga and Blaschek, 2011),*C. acetobutylicum* (Yousheng et al., 2011; Wal et al., 2013), *C. Saccharoperbutylacetonicum* (Al-Shorgani et al., 2011) และ *C. pasteurianum* (Ahn et al., 2011) เป็นต้น ซึ่งความสามารถในการผลิตบิวทานอลของ *Clostridium* ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น สารอาหาร วัตถุดิบที่ใช้ สภาวะแวดล้อมในการหมัก และกระบวนการที่ใช้ในการหมัก (Tashiro et al., 2005; Al-Shorgani et al., 2011; Isar and Rangaswamy, 2012)

2.5.2 การผลิตบิวทานอล

ในกระบวนการหมักสามารถผลิตบิวทานอลได้จากกระบวนการที่เรียกว่ากระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล หรือ เอบีอี (acetone butanol ethanol, ABE fermentation) โดยการเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทคาร์โบไฮเดรทให้เป็นกรดบิวไทริก และกรดอะซิติกในขั้นตอนที่เรียกว่า acidogenesis phase ขั้นตอนการผลิตกรดส่วนใหญ่เกิดขึ้นในช่วงของการเจริญ

ของแบคทีเรีย (exponential growth phase) จนถึงช่วงที่เซลล์เจริญได้เต็มที่ หรือเรียกว่าช่วง clostridia from ซึ่งเซลล์แบคทีเรียจะมีรูปร่างเป็นท่อน (Hartmanis and Gatenbeck, 1984) จากนั้นกรดบิวไทริกจะเปลี่ยนเป็นบิวทานอล และกรดอะซีติกจะเปลี่ยนเป็นอะซีโตนต่อในขั้นตอนที่เรียกว่า solventogenesis phase ซึ่งเกิดในช่วงที่เซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนจาก clostridia from เข้าสู่ช่วงที่กำลังสร้างสปอร์ (forespores) ในขั้นตอนนี้รูปร่างเซลล์แบคทีเรียจะมีลักษณะแตกต่างจากช่วงแรก โดยเริ่มมี forespores เกิดขึ้น (Eversloh and Bahl, 2011) เอนไซม์ที่สำคัญในขั้นตอนนี้คือ CoA-transferase จะเปลี่ยนจาก butyrate เป็น butyryl-CoA และ acetate เป็น acetyl-CoA จากนั้น butyraldehyde dehydrogenase และ butanol dehydrogenase จะเปลี่ยน butyryl-CoA เป็น butyradehyde และบิวทานอล ตามลำดับ และ thiolase, CoA-transferase และ acetoacetate decarboxylase จะเปลี่ยน acetyl-CoA, acetoacetyl-CoA, acetoacetate และอะซิโตน ตามลำดับ เกิดผลพลอยได้อื่นคือ เอทานอล โดยเอนไซม์ acetaldehyde dehydrogenase และ ethanol dehydrogenase

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

การใช้น้ำตาลเริ่มต้นในการหมักที่ต่างกันส่งผลให้ได้บิวทานอลที่แตกต่างกัน โดยรายงานวิจัยของ Al-Shorgani และคณะ (2011) พบว่าการใช้น้ำตาลเริ่มต้นที่ 20 กรัมต่อลิตร ในการผลิตบิวทานอลจากอาหารสังเคราะห์ที่และมีการเติมกรดบิวไทริกที่ 10 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ได้บิวทานอลและเอบีอี 12.99 และ 15.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Areesirisuk และคณะ (2010) ใช้น้ำตาลเริ่มต้นที่ 60 กรัมต่อลิตร ในการผลิตบิวทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานด้วย *C. beijerinckii* JCM1390 ภายใต้สภาวะนี้ได้บิวทานอลและเอบีอี 7.29 และ 8.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ Lu และคณะ (2012) ใช้น้ำตาลเริ่มต้นที่ 80 กรัมต่อลิตร ในการผลิตบิวทานอลจาก cassava bagasse hydrolysate ด้วย C. *acetobutylicum* JB200 โดยได้บิวทานอลและเอบีอี 9.71 และ 15.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้ว แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต และผลิตเอบีอี ของเชื้อแบคทีเรีย (Isar และ Rangaswamy, 2012) โดย Isar และ Rangaswamy (2012) พบว่าเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน แบคทีเรียจะสามารถผลิตบิวทานอลได้ต่างกัน โดยเมื่อใช้เปปโตน ยีสต์แอ็กแทรกซ์ บีฟแอ็กแทรกซ์ น้ำแช่ข้าวโพด ทริปโตน ไดแอมโมเนียไฮโดรเจนฟอสเฟส และแอมโมเนียมซัลเฟส 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ในอาหารสังเคราะห์ (anaerobic sugar medium) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร *C. beijerinckii* ATCC 10132 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 4.4, 4.0, 4.8, 1.0, 3.8, 1.6 และ 1.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบีฟแอ็กแทรกซ์เป็น 50 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้เพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิตได้ 7.9 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจน และระดับความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อการผลิตบิวทานอล นอกจากนี้ยังพบว่าธาตุเหล็กเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเปลี่ยนไพรูเวทเป็นอะซิติลโคเอ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ ferredoxin oxidoreductase iron-sulfur protein (Kim et al., 1988) เมื่อ *C. acetobutylicum* สูญเสีย megaplasmid pSOLl มีผลทำให้สูญเสียความสามารถในการผลิตเอบีอีในระหว่างการหมัก ซึ่งสามารถป้องกันได้โดยการหมักภายใต้สภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด

(Ezeji et al., 2005) ในขณะที่ Chen และ Blaschek (1999) พบว่าการเกิด degeneration ใน *C. Beijerinckii* BA101 สามารถป้องกันได้โดยการเติมโซเดียมอะซิเตต นอกจากนี้ Bryant และ Blaschek (1988) พบว่าการเติมฟอสเฟต 6.5 มิลลิโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเพิ่มการเจริญและการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตของ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ซึ่งทำให้สามารถเพิ่มการผลิตบิวทานอลได้ โดยสามารถผลิตบิวทานอลในอาหารสังเคราะห์ (TGY medium) ได้ 7.9 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Al-Shorgani et al. (2011) รายงานว่าการเติมกรดบิวไทริก 10 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลของ *C. Saccharoperbutyl acetonicum* N1-4 เพิ่มขึ้น (12.99 กรัมต่อลิตร) จากที่ไม่ได้มีการเติมกรดบิวไทริก (1.90 กรัมต่อลิตร) โดยกรดบิวไทริกสามารถเปลี่ยนเป็นบิวทานอลได้โดยตรง อย่างไรก็ตามเมื่อเติมกรดบิวไทริกมากกว่า 15 กรัมต่อลิตร ความสามารถในการการผลิตบิวทานอลและการเจริญของเชื้อจะลดลง

2.5.4 การศึกษาการผลิตบิวทานอล

Areesirisuk et al. (2010) หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เอบีอี และกรดโดยใช้เครื่อง gas chromatography ผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ มีดังนี้ อุณหภูมิตำแหน่งฉีด (injector) และตัวตรวจวัด (detector, FID) ที่ 220 และ 230 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส คงที่ไว้ 10 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที คงอุณหภูมิที่ 180 องศาเซลเซียสไว้ 20 นาที และใช้ไอโซบิวทานอลเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) นอกจากนี้ Areesirisuk et al. (2010) ยังได้ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดย *C. beijerincckii* JCM 1390 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และที่พีเอชเริ่มต้นของการหมักเท่ากับ 6.0 ผลการทดลองพบว่า *C. beijerincckii* JCM 1390 สามารถผลิตบิวทานอลและเอบีอีได้ 7.56 และ 8.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลได้ของบิวทานอล 0.33 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้

Yousheng et al. (2011) ศึกษาการเติมยีสต์แอ็กแทรกซ์ ไดแอมโมเนียมซัลเฟต โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต เฟอรัสซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต และแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล จากลำต้นข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก โดย *C. acetobutyricum* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมพีเอชที่ 7 เพื่อคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล โดยใช้วิธี Plackett & Burman design ผลการทดลองพบว่า มีเพียงแคลเซียมคาร์บอเนตเท่านั้นที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอลจากลำต้นข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยกรด เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของแคลเซียมคาร์บอเนต อุณหภูมิ และระยะเวลาการหมัก ต่อการผลิตบิวทานอลจากลำต้นข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยกรด โดยใช้ RSM ในการออกแบบการทดลอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอลคือ แคลเซียมคาร์บอเนต 5.04 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาการหมัก 70 ชั่วโมง ซึ่งที่สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตบิวทานอลได้ 6.20 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Al-Shorgani et al. (2011) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตบิวทานอลใน Phosphate-free nitrogen medium โดย *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ในการทดลองได้เติมกรดบิวไทริก 0-15 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ 0-20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นของการหมัก 6.2 และอุณหภูมิในการหมัก 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า การเติมกรดบิวไทริก 10 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้ 12.99 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สภาวะที่ไม่มีการเติมกรดบิวไทริกและมีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ได้บิวทานอลเพียง 1.90 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่ากรดบิวไทริกสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตบิวทานอลได้

Al-Shorgani et al. (2012) ศึกษาสารตั้งต้น 5 ชนิด (กลูโคส ไซโลส ไซแลน คาร์บอกซิล-เมททิล-เซลลูโลส และแป้งสาคู) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสังเคราะห์ 2 ชนิด (P2 medium และ tryptone-yeast extract-acetate medium, TYA) โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิตบิวทานอล โดย *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ผลการทดลองพบว่า แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตบิวทานอลคือ กลูโคส โดยสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ใน P2 medium ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลและเอบีอีได้ 4.86 และ 6.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อใช้ TYA medium สามารถผลิตบิวทานอลและเอบีอีได้ 4.33 และ 6.252 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม (10-60 กรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตบิวทานอลในอาหารสังเคราะห์ (TYA) พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลคือ 50 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตบิวทานอลได้ 8.69 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 60 กรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียผลิตบิวทานอลได้ลดลง โดยมีค่าเท่ากับ 7.99 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของความเข้มข้นบิวทานอลต่อการเจริญของ *C. saccharo perbutylacetonicum* N1-4 โดยการเติมบิวทานอล 0-35 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารสังเคราะห์ (TYA) ที่ใช้สำหรับผลิตบิวทานอล ผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียลดลงเมื่อความเข้มข้นของบิวทานอลเพิ่มขึ้น และไม่พบการเจริญเมื่อเติมบิวทานอลมากกว่า 15 กรัมต่อลิตรลงในน้ำหมัก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *C. saccharo perbutylacetonicum* N1-4 สามารถทนความเข้มข้นของบิวทานอลได้ไม่เกิน 15 กรัมต่อลิตร

Ni et al. (2012) ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดย *C. saccharobutylicum* DSM 13864 ผลการทดลอง พบว่าในกระบวนการหมักบิวทานอลแบบกะ สามารถผลิตบิวทานอลและเอบีอีได้ 13.40 และ 19.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และได้ผลได้และอัตราผลผลิตของเอบีอี 0.33 และ 0.50 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่กระบวนการหมักบิวทานอลแบบ two-stage semicontinuous ที่ใช้ระยะเวลาในการหมักทั้งสิ้น 205 ชั่วโมง สามารถเพิ่มอัตราผลผลิตของเอบีอีได้ โดยให้อัตราผลผลิตของเอบีอีสูงสุด 1.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ความเข้มข้นเอบีอีเฉลี่ย 15.27 กรัมต่อลิตร

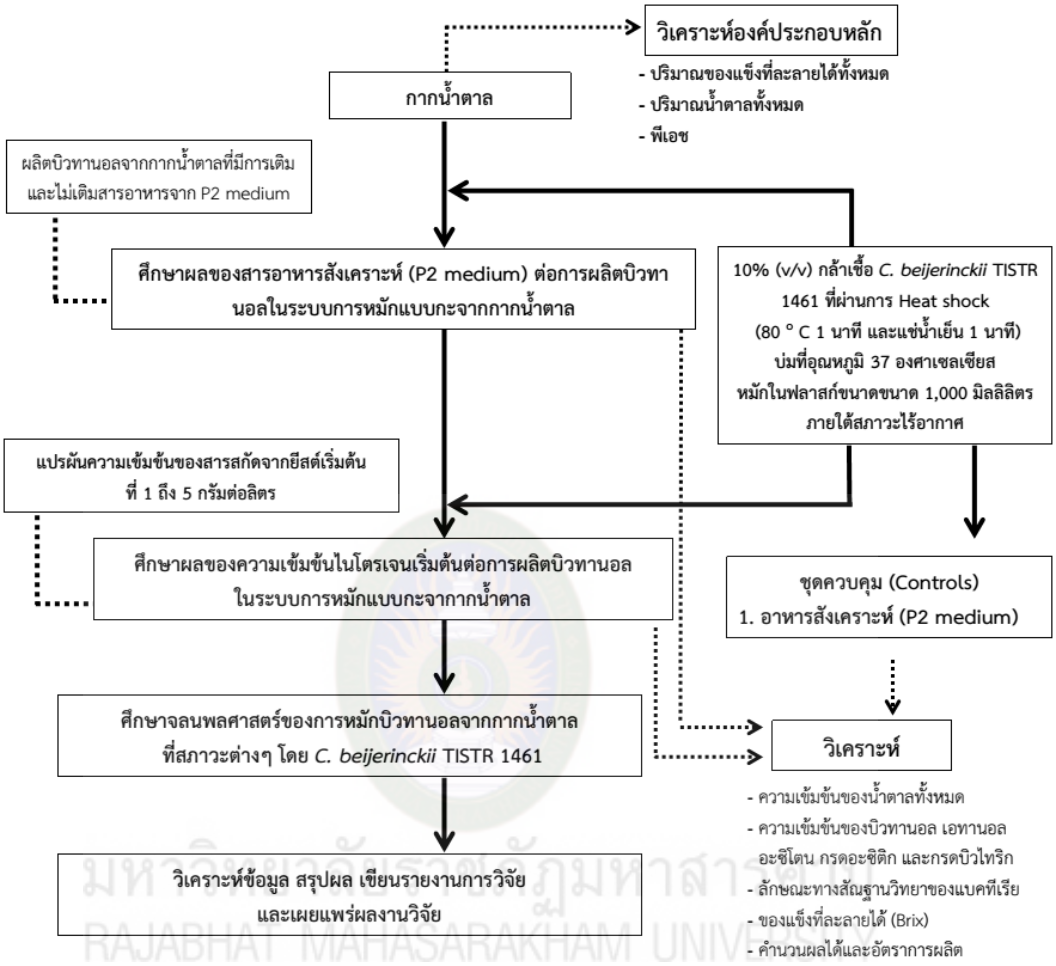
Wechgama et al. (2017a) ได้ศึกษาผลของการกระตุ้นสปอร์ 3 วิธี คือ microwave shock, ultrasonic shock และ heat shock พบว่าวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นสปอร์ *Clostridium* sp. เพื่อใช้

เป็นกล้าเชื้อในการผลิตบิวทานอล เมื่อประเมินประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลของ *Clostridium* spp. 4 สายพันธุ์ คือ *C. beijerinckii* JCM 1390, *C. acetobutyricum* JCM 7829, *C. beijerinckii* TISTR 1461 และ *C. beijerinckii* TISTR 1462 ในอาหาร P2 medium ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า *C. beijerinckii* TISTR 1461 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด (10.41 กรัมต่อลิตร) จากนั้นใช้วัตถุดิบทางการเกษตร 3 ชนิด คือ น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน น้ำอ้อย และกากน้ำตาล ที่มีน้ำตาลทั้งหมด 60 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารในการผลิตบิวทานอลโดย *C. beijerinckii* TISTR 1461 ผลการทดลองพบว่าได้บิวทานอล 1.40, 4.37 และ 7.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเมื่อเติมสารอาหารใน P2 medium (ยกเว้นกลูโคส) ลงในกากน้ำตาล จะได้บิวทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 11.48 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ากากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพสูงสุดในการใช้ผลิตบิวทานอล

Wechgama et al. (2017b) ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลโดย *C. beijerinckii* TISTR 1461 โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของพารามิเตอร์หลัก 3 พารามิเตอร์ คือ พีเอชเริ่มต้น (5.5, 6.5 และ 7.5) น้ำตาล (40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร) และยูเรีย (0.27, 0.81 และ 1.35 กรัมต่อลิตร) โดยใช้ L_9 (3^4) orthogonal array design ในการออกแบบการทดลอง ทำการหมักในขวดฝาเกลียวขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ พีเอชเริ่มต้น 6.5 น้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 0.81 กรัมต่อลิตร โดยลำดับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของบิวทานอลและเอบีอีคือ พีเอชเริ่มต้น น้ำตาล และยูเรีย ตามลำดับ โดยที่สภาวะที่เหมาะสมได้ความเข้มข้นบิวทานอลและเอบีอี 12.23 และ 16.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้กากน้ำตาลที่ไม่เติมสารอาหารได้ความเข้มข้นของบิวทานอลและเอบีอี 7.45 และ 13.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการหมักภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร อัตราการกวนที่ 100 รอบต่อนาที พบว่าได้บิวทานอล (12.55 กรัมต่อลิตร) ใกล้เคียงกับที่สภาวะนิ่ง แต่ระยะเวลาการหมักลดลงจาก 60 ชั่วโมง เหลือ 48 ชั่วโมง เมื่อต่อระบบ gas stripping เข้ากับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าได้บิวทานอล (14.13 กรัมต่อลิตร) อัตราผลผลิตบิวทานอล (0.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และการใช้น้ำตาล (ร้อยละ 91) เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 10 ถึง 14 เมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่ใช้ gas stripping

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.6 กรอบแนวคิดในการวิจัย



ภาพที่ 2.2 แผนผังการทำการวิจัย

ในปัจจุบันการผลิตบิวทานอลมีปัญหาหลายประการที่ทำให้ผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้นต่ำ ปัญหาที่พบ เช่น ปริมาณไนโตรเจนของวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลแตกต่างกัน ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ อีกทั้งปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมก็ขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ของ *Clostridium* ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการศึกษาปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดยแผนผังการทำการวิจัยดังภาพที่ 2.2 และคาดว่าข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้เป็นประโยชน์ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ที่	ชื่อสาร	ผลิตโดย	ความบริสุทธิ์ (ร้อยละ)	ประเทศ
1	กรดบิวไทริก (butyric acid)	ฟูก้า (Fluka)	99.5	สวิตเซอร์แลนด์
2	กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (ρ-aminobenzoic acid)	ซิกมา (Sigma)	98	สหรัฐอเมริกา
3	กรดออโธ-ฟอสฟอริค (ortho-phosphoric acid)	ฟูก้า	99	สวิตเซอร์แลนด์
4	กรดอะซิติก (acetic acid)	ซิกมา	99	สหรัฐอเมริกา
5	กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)	ฟูก้า	37	สวิตเซอร์แลนด์
6	กลูโคส (glucose)	บีดีเอช (BDH)	98	อังกฤษ
7	คุกมีทมีเดียม (cooked meat medium)	อ๊อกซอยด์ (Oxoid)		อังกฤษ
8	โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	ฟูก้า	99	สวิตเซอร์แลนด์
9	โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)	ฟูก้า	98	สวิตเซอร์แลนด์
10	ไทอะมีน (thiamine)	แลปเคม (Labchem)		สหรัฐอเมริกา
11	ทริฟโตน (tryptone)	อ๊อกซอยด์		อังกฤษ
12	บิวทานอล (butanol)	ฟูก้า	99	สวิตเซอร์แลนด์
13	ไบโอติน (biotin)	ฟูก้า		สวิตเซอร์แลนด์
14	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate)	ฟูก้า	99.5	สวิตเซอร์แลนด์
15	โพรพานอล (Propanol)	ฟูก้า	99.5	สวิตเซอร์แลนด์
16	เฟอรัสซัลเฟต-เฮปต้าไฮเดรต (ferrous sulfate heptahydrate)	ฟูก้า		สวิตเซอร์แลนด์
17	แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปต้าไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate)	ฟูก้า	99.5	สวิตเซอร์แลนด์
18	แมงกานีสซัลเฟต-เฮปต้าไฮเดรต (manganese sulfate heptahydrate)	ฟูก้า	99	สวิตเซอร์แลนด์
19	เรนินฟอส คอสทริเดียม มีเดียม (reinforced clostridial agar medium)	เมอร์ก (Merck)		เยอรมันนี
19	ยีสต์เอกแทร็กซ์ (yeast extract)	อ๊อกซอยด์		อังกฤษ
21	อะซีโตน (acetone)	เมอร์ก (Merck)	99	เยอรมันนี
22	เอทานอล (ethanol)	ฟูก้า	99.5	สวิตเซอร์แลนด์
23	แอมโมเนียมอะซิเตท (ammonium acetate)	ฟูก้า	99	สวิตเซอร์แลนด์
24	ไอโซบิวทานอล (isobutanol)	ฟูก้า	99	สวิตเซอร์แลนด์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2 อุปกรณ์

(1) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC)

รุ่น GC-2014 ของบริษัทชิมัดซึ (Shimadzu) ประเทศญี่ปุ่น ต่อกับตัวตรวจวัดชนิดเอฟไอดี (flame ionization detector, FID) ของบริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

(2) เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูงหรือเครื่องเอช พี แอล ซี (High performance liquid chromatography, HPLC) ประกอบด้วย

1) ปั๊ม LC-10 AD ของบริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

2) เครื่องฉีดตัวอย่าง (6-port injector) รุ่น 7725 ของบริษัทรีโอไดน์ (Rheodyne) ประเทศสหรัฐอเมริกา

3) ตัวตรวจวัด SPD-10A ของบริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

4) ตัวตรวจวัด RID-10A ของบริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

5) เครื่องประมวลผลรุ่น C-R7 Ae plus Chromatopac ของบริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

(3) สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

(4) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S บริษัทซาโตเรียส ประเทศสหรัฐอเมริกา

(5) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BP3100S บริษัทซาโตเรียส ประเทศสหรัฐอเมริกา

(6) คิวเวต (cuvette) แบบควอตซ์ (quartz) บริษัทเฮลล์มา ประเทศออสเตรเลีย

(7) เข็มฉีดสารสำหรับเครื่องเอช พี แอล ซี (syringe for HPLC) ขนาด 100 ไมโครลิตร บริษัทเอสจีอี (SGE) ประเทศออสเตรเลีย

(8) เข็มฉีดสารสำหรับเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (syringe for GC) ขนาด 5 ไมโครลิตร บริษัทเอสจีอี ประเทศออสเตรเลีย

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.3 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ *C. beijerinckii* TISTR 1461 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.4.1 รวบรวมเอกสาร วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

รวบรวม และศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล ในหนังสือ วารสาร งานวิจัยระดับชาติ และนานาชาติ รวมทั้งเอกสารที่เกี่ยวข้องต่างๆ

3.4.2 วางแผนการดำเนินงานวิจัย เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ต้องใช้ในงานวิจัย

เตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัย

3.4.3 การเตรียมวัตถุดิบและวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล

วัตถุดิบที่นำมาศึกษาคือ กากน้ำตาล จากโรงงานน้ำตาลมิตรผลภูเวียง จังหวัดขอนแก่น โดยกากน้ำตาลจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง จากนั้นนำกากน้ำตาลที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ดังนี้ วิเคราะห์องค์ประกอบหลักทางเคมี ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand-held refractometer ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric method ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส โดยวิธี HPLC และพีเอช โดย pH meter

3.4.4 การเตรียมสปอร์ของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 สำหรับใช้ในการทดลอง

นำเชื้อที่สั่งซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยมาทำการตัดออกจากหลอดแอมพลู เทสารละลายคุกมีทมีเดียม (cooked meat medium, CMM) ไปชะผงเชื้อลงในหลอด จากนั้นถ่ายสารแขวนลอยของเซลล์ลงในขวดอาหารที่ภายในบรรจุด้วยสารละลาย CMM บ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายให้สภาวะไร้อากาศ เลี้ยงเชื้อไปจนกว่าจะสังเกตถึงการเปลี่ยนแปลงจากสปอร์เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตแล้ว จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารสังเคราะห์ (reinforced clostridia medium, RCM) บ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายให้สภาวะไร้อากาศ เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เลี้ยงไปจนเชื้อทั้งหมดเข้าสู่สภาวะสปอร์ จึงนำ RCM ไปปั่นเวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 นำเซลล์ที่ได้ล้างได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้สปอร์เริ่มต้น $1X10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.5 ศึกษาผลของการเติมสารอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) ต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

นำสารละลายสปอร์ 1 มิลลิลิตร ($1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มากระตุ้นสปอร์ด้วยอ่างความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (Wechgama et al., 2015) แล้วนำมาจุ่มลงในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (Areesirisuk et al., 2010) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ที่ผ่านการกระตุ้นลงใน CMM 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง (Wechgama et al., 2015) จนสังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นถ่ายสารละลายเซลล์จำนวน 2.25 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TGY 45 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง (Wechgama et al., 2015) ซึ่งจะใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักต่อไป

องค์ประกอบของ CMM: 1 กรัม กลูโคส 0.08 กรัม และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (Qureshi et al., 1999)

องค์ประกอบของ TGY: สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร ทริฟโตน 5 กรัมต่อลิตร กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร) (Qureshi et al., 1999)

ชุดการทดลองที่ 1 เตรียมกากน้ำตาลปริมาตร 750 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ 40 กรัมต่อลิตร เติมสารอาหารตามสูตร P2 medium ได้แก่

สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร Stock solution A (ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมอะซีเตท 2.2 กรัมต่อลิตร) Stock solution B (กรดพารา-อะมิโน-เบนโซอิก 0.001 กรัมต่อลิตร ไทเอมีน 0.001 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.00001 กรัมต่อลิตร) และ Stock solution C (แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปต้าไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต-เฮปต้าไฮเดรต 0.01 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัลเฟต-เฮปต้าไฮเดรต 0.01 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร)

ชุดการทดลองที่ 2 เตรียมกากน้ำตาลปริมาตร 750 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ 40 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมสารอาหารตามสูตร P2 medium

ทั้ง 2 ชุดการทดลองปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 จากนั้นนำน้ำหมักไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Areesirisuk et al., 2010) พ่นด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์ผ่านชุดกรองอากาศ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากน้ำหมัก และทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 30 นาที ถ่ายกล้าเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ร้อยละ 5 โดยปริมาตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระหว่างการหมักเก็บตัวอย่างเพื่อ

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol Sulfuric acid (Mecozzi et al., 2005)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Zoecklien et al., 1995)
- พีเอช
- ความเข้มข้นของบิวทานอล เอทานอล อะซิโตน กรดอะซิติก และกรดบิวไทริก โดยวิธี GC (gas chroma tography) (ดัดแปลงจาก Areesirisuk et al., 2010)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.4.6 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

นำสารละลายสปอร์ 1 มิลลิลิตร ($1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มากระตุ้นสปอร์ด้วยอ่างความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 นาที (Wechgama et al., 2015) แล้วนำมา จุ่มลงในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (Areesirisuk et al., 2010) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ที่ผ่านการกระตุ้นลงใน CMM 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง (Wechgama et al., 2015) จนสังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นถ่ายสารละลายเซลล์จำนวน 2.25 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TGY 45 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง (Wechgama et al., 2015) ซึ่งจะใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักต่อไป

เตรียมกากน้ำตาลปริมาตร 750 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เนื่องจากวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอลโดย *C. beijerinckii* TISTR 1461 ดังนั้นกากน้ำตาลในการทดลองนี้จึงแปรผันค่าสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นเป็น 5 ชุดการ

ทดลอง ได้แก่ความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำน้ำหมักไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Areesirisuk et al., 2010) พ่นด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์ผ่านชุดกรองอากาศ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากน้ำหมัก และทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 30 นาที ถ่ายกล้าเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ร้อยละ 5 โดยปริมาตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระหว่างการหมักเก็บตัวอย่าง

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol Sulfuric acid (Mecozzi et al., 2005)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Zoecklien et al., 1995)
- พีเอช
- ความเข้มข้นของบิวทานอล เอทานอล อะซิโตน กรดอะซิติก และกรดบิวไทริก โดยวิธี GC (gas chroma tography) (ดัดแปลงจาก Areesirisuk et al., 2010)

3.4.7 ศึกษาการผลิตบิวทานอลอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (control)

นำสารละลายสปอร์ 1 มิลลิลิตร ($1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มากระตุ้นสปอร์ด้วยอ่างความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 นาที (Wechgama et al., 2015) แล้วนำมาจุ่มลงในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (Areesirisuk et al., 2010) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ที่ผ่านการกระตุ้นลงใน CMM 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง (Wechgama et al., 2015) จนสังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นถ่ายสารละลายเซลล์จำนวน 2.25 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TGY 45 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง (Wechgama et al., 2015) ซึ่งจะใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักต่อไป

เตรียมน้ำหมัก (P2 medium) ซึ่งเป็นอาหารสังเคราะห์สำหรับผลิตเอบีอี (Qureshi et al., 1999) ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร (ชุดควบคุมที่ 1) ซึ่งน้ำหมักประกอบด้วยกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร เติม Stock solution A Stock solution B และ Stock solution C เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ผ่านมา ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.5 จากนั้นนำน้ำหมักไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Areesirisuk et al., 2007) พ่นด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์ผ่านชุดกรองอากาศ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากน้ำหมัก และทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 30 นาที ถ่ายกล้าเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระหว่างการหมักเก็บตัวอย่าง

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol Sulfuric acid (Mecozzi et al., 2005)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Zoecklien et al., 1995)

- พีเอช
- ความเข้มข้นของบิวทานอล เอทานอล อะซิโตน กรดอะซิติก และกรดบิวไทริกโดยวิธี GC (gas chroma tography) (ดัดแปลงจาก Areesirisuk et al., 2010)

3.4.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ที่สภาวะการหมักต่างๆ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ที่สภาวะต่างๆ ในรูปของความเข้มข้น ผลได้ และอัตราผลผลิตของบิวทานอล พร้อมผลได้และอัตราผลผลิตของผลิตภัณฑ์ต่างๆ (อะซีโตน เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวไทริก) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตบิวทานอลของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ที่สภาวะการหมักต่างๆ

วิธีคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญของการผลิตบิวทานอล แสดงดังต่อไปนี้

1) ผลได้ของบิวทานอล ($Y_{B/S}$)

$$\text{ผลได้บิวทานอล (กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้)} = \frac{\text{ความเข้มข้นบิวทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

2) อัตราผลผลิตบิวทานอล (Q_B)

$$\text{อัตราผลผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)} = \frac{\text{ความเข้มข้นบิวทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ระยะเวลาของการหมัก (ชั่วโมง)}}$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM RAJABHAT UNIVERSITY

3.4.9 สรุปผล เขียนรายงานฉบับสมบูรณ์ และเสนอผลงาน/ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

3.5 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

3.5.1 สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

3.5.2 ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.5.3 ห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีการหมัก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์

3.6 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ตารางที่ 3.2 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ปี	กิจกรรม	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
1	1. รวบรวมเอกสาร วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	X	X	X									
	2. วางแผนการดำเนินงานวิจัย เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ต้องใช้ในงานวิจัย		X	X									
	3. การเตรียมวัตถุดิบและวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล		X	X									
	4. เตรียมสปอร์ของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 สำหรับใช้ในการทดลอง		X	X									
	5. ศึกษาผลของสารอาหารสังเคราะห์ต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461				X	X							
	6. ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461						X	X					
	7. ศึกษาการผลิตบิวทานอลอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) ในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461 เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (control)								X	X			
	8. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ที่สภาวะการหมักต่างๆ										X		
	9. สรุปผล เขียนรายงานฉบับสมบูรณ์และเสนอผลงาน/ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติ/นานาชาติ											X	X

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 เตรียมวัตถุดิบและวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล

วัตถุดิบที่นำมาศึกษาคือ กากน้ำตาล จากโรงงานน้ำตาลมิตรผลภูเวียง จังหวัดขอนแก่น โดยกากน้ำตาลจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง จากนั้นนำกากน้ำตาลที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ดังนี้ วิเคราะห์องค์ประกอบหลักทางเคมี ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand-held refractometer ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric method ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาล ฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส โดยวิธี HPLC และพีเอช โดย pH meter ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.1

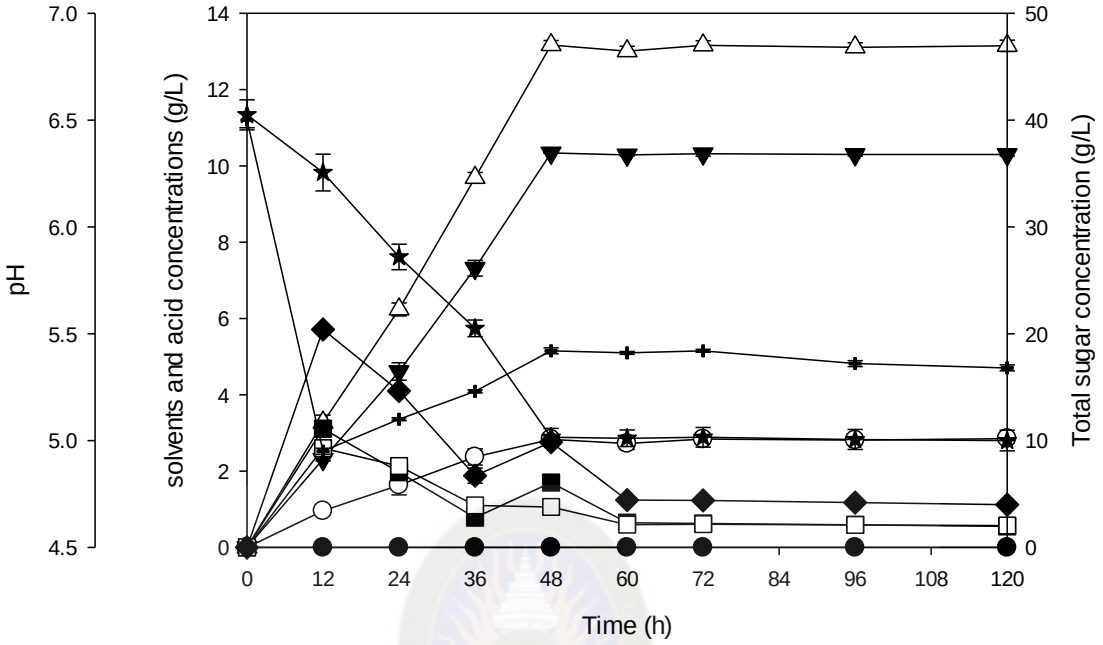
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล

องค์ประกอบ	ผลการวิเคราะห์
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด	75 ^{o}Brix
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	590 กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	120.10 กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส	100.70 กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลซูโคส	356.30 กรัมต่อลิตร
พีเอช (ที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร)	5.14

จากผลการวิเคราะห์พบว่า กากน้ำตาลมีประมาณน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 590 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ในการหมักได้ (fermentable sugar) เช่น กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส (ตารางที่ 4.1) ประมาณ 120 101 และ 356 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีค่าพีเอชหลังจากเจือจางความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 40 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 5.14 ดังนั้นกากน้ำตาลที่นำมาทำการทดลองนี้น่าที่จะมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตบิวทานอล แต่อย่างไรก็ตามควรจะมีการวิเคราะห์หาประมาณแร่ธาตุ สารอาหาร และองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ในกากน้ำตาลเพิ่มเติม

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.2 ศึกษาผลของการเติมสารอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) ต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461



ภาพที่ 4.1 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมสารอาหารสังเคราะห์ (P medium) โดยเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461 (อะซีโตน (○), บิวทานอล (▼), เอทานอล (●), เอบีอี (△), กรดอะซิติก (■), กรดบิวไทริก (□), กรดโดยรวม (◆), pH (✚) และ น้ำตาลทั้งหมด (★)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

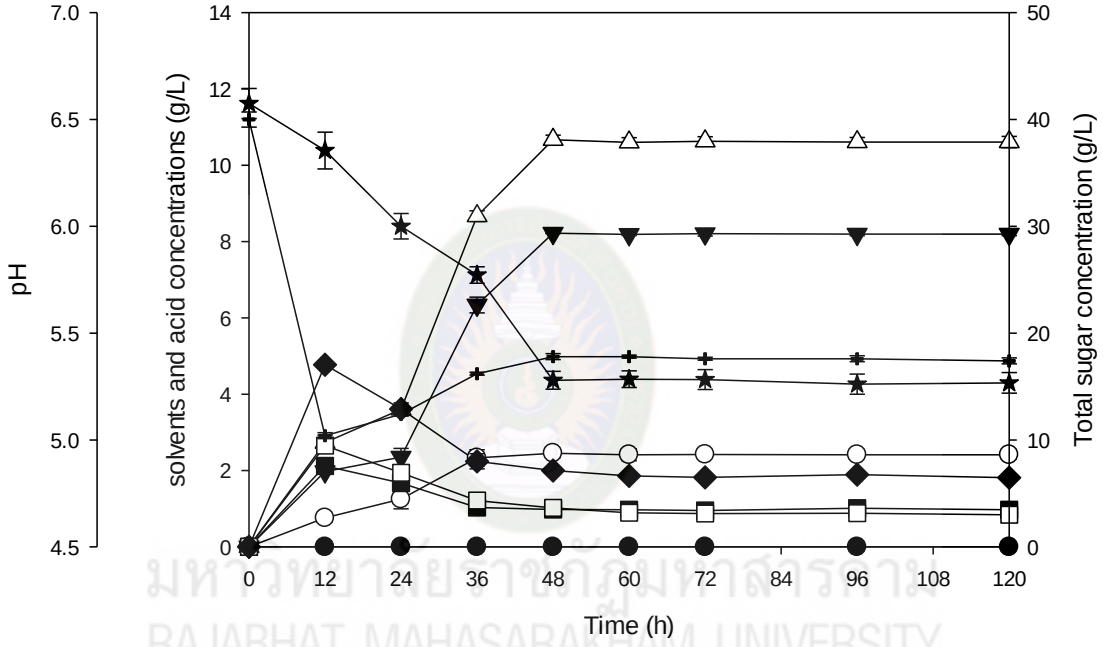
ผลการทดลองชุดที่ 1 (กากน้ำตาลที่มีการเติมสารอาหารสังเคราะห์) พบว่าค่าพีเอชจะลดลงจาก 6.50 จนถึง 4.95 ที่การหมัก 12 ชั่วโมง สอดคล้องกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักในช่วงนี้ที่มีการผลิตกรดอะซิติก และกรดบิวไทริก เรียกกระบวนการหมักในช่วงนี้ว่า “ช่วงการผลิตกรด (acidogenesis phase)” จากนั้นค่า พีเอช จะเริ่มเพิ่มขึ้นจนถึง 5.42 ที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.1) และในช่วงระหว่างนี้การหมักจะมีการผลิตตัวทำละลายได้แก่ อะซีโตน และบิวทานอล เรียกกระบวนการหมักในช่วงนี้ว่า “ช่วงการผลิตตัวทำละลาย (solventogenesis phase)” จากรูปแบบการหมักนี้พบว่าในสภาวะการหมักนี้มีรูปแบบการหมักครบทั้งช่วงการผลิตกรด (acidogenesis phase) และช่วงการผลิตตัวทำละลาย (solventogenesis phase) (Al-Shorgani et al., 2012)

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจะลดลงจาก 40.50 กรัมต่อลิตร เหลือ 10.30 กรัมต่อลิตร เมื่อการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง สภาวะนี้มีการใช้น้ำตาลไปทั้งสิ้น 30.20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 74.57 ของน้ำตาลทั้งหมด (ภาพที่ 4.1)

กรดอะซิติก กรดบิวไทริก และปริมาณกรดโดยรวม จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างการหมัก 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงการผลิตกรด (acidogenesis phase) และจากนั้นจะลดลงเพราะกรดที่ผลิตขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายซึ่งจะเข้าสู่ช่วงการผลิตตัวทำละลาย (solventogenesis phase) และเริ่มคงที่เมื่อทำการหมักที่

48-120 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกสุดท้ายเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวไทริกสุดท้ายเท่ากับ 1.16 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดโดยรวมสุดท้ายเท่ากับ 2.66 กรัมต่อลิตร

ภายใต้สภาวะการหมักนี้ความเข้มข้นของบิวทานอลและเอบีอีจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล และเอบีอี เท่ากับ 10.34 กรัมต่อลิตร และ 13.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนี้ให้ค่าผลได้ และอัตราการผลิตของบิวทานอลเท่ากับ 0.34 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป และ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าภายใต้สภาวะนี้ไม่พบเอทานอล ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ acetaldehyde dehydrogenase และ ethanol dehydrogenase ไม่ทำงาน



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.2 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461 (อะซีโตน (○), บิวทานอล (▼), เอทานอล (●), เอบีอี (△), กรดอะซิติก (■), กรดบิวไทริก (□), กรดโดยรวม (◆), pH (✚) และ น้ำตาลทั้งหมด (★)

ผลการทดลองชุดการทดลองที่ 2 (กากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมสารอาหาร) พบว่าค่าพีเอชจะลดลงจาก 6.50 จนถึง 5.02 ที่ 12 ชั่วโมง สอดคล้องกับที่มีการผลิตกรดอะซิติก และกรดบิวไทริก จากนั้นค่าพีเอช จะเริ่มเพิ่มขึ้นจนถึง 5.29 ที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.2) และในช่วงระหว่างนี้การหมักจะมีการผลิตตัวทำละลายได้แก่ อะซีโตน และบิวทานอล ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจะลดลงจาก 41.50 กรัมต่อลิตร เหลือ 15.58 กรัมต่อลิตร เมื่อการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง สภาวะนี้มีการใช้น้ำตาลไปทั้งสิ้น 25.91 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 63.11 ของน้ำตาลทั้งหมด (ภาพที่ 4.2)

กรดอะซิติก กรดบิวไทริก และปริมาณกรดโดยรวม จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างการหมัก 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงการผลิตกรด (acidogenesis phase) และจากนั้นจะลดลงเพราะกรดที่ผลิตขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายซึ่งจะเข้าสู่ช่วงการผลิตตัวทำละลาย (solventogenesis phase) และเริ่มคงที่ในการหมักที่ 60-

120 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกสุดท้ายเท่ากับ 0.98 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวไทริกสุดท้ายเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดโดยรวมสุดท้ายเท่ากับ 2.00 กรัมต่อลิตร

ภายใต้สภาวะการหมักนี้ความเข้มข้นของบิวทานอลและเอบีอีจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล และเอบีอี เท่ากับ 8.22 กรัมต่อลิตร และ 10.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนี้ให้ค่าผลได้ และอัตราการผลิตของบิวทานอลเท่ากับ 0.32 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป และ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) นอกจากนี้พบว่าภายใต้สภาวะนี้ไม่พบเอทานอลเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1

เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมและไม่เติมสารอาหารสังเคราะห์ พบว่ากากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมสารอาหารสังเคราะห์สามารถผลิตบิวทานอล (8.22 กรัมต่อลิตร) ได้ต่ำกว่ากากน้ำตาลที่มีการเติมสารอาหารสังเคราะห์ (10.34 กรัมต่อลิตร) เล็กน้อย อีกทั้งยังให้ค่าผลได้และอัตราการผลิตบิวทานอลใกล้เคียงกัน ดังนั้นเพื่อลดค่าใช้จ่ายและต้นทุนการผลิตบิทานอล กากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมสารอาหารจึงถูกคัดเลือกเพื่อนำมาทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

ในการทดลองนี้นำสปอร์ *C. beijerinckii* TISTR 1461 มา heat shock ด้วยความร้อน 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็น 0 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นเตรียมกล้าเชื้อโดยเติมสปอร์ (ร้อยละ 5 โดยปริมาตร) ที่ผ่านการ heat shock แล้วลงในอาหาร CMM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จนสังเกตเห็นการเจริญเติบโต จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ (ร้อยละ 5 โดยปริมาตร) ลงในอาหาร TGY บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป เตรียมน้ำกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอบีอีในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ให้ความเริ่มต้นของน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร แปรผันความข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีการเติมสารอาหารอื่นเพิ่ม จากนั้นนำน้ำหมักไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พ่นด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์ผ่านชุดกรองอากาศ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากน้ำหมัก และทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 30 นาที ถ่ายกล้าเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ ร้อยละ 5 โดยปริมาตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระหว่างการหมักเก็บตัวอย่างวิเคราะห์

จากผลการทดลองพบว่า สภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าพีเอชจะลดลงจาก 6.51 จนถึง 5.00 ที่ 12 ชั่วโมง สอดคล้องกับที่มีการผลิตกรดอะซิติก และกรดบิวไทริก จากนั้นค่าพีเอชจะเริ่มเพิ่มขึ้นจนถึง 5.25 ที่ 48 ชั่วโมง และในช่วงระหว่างนี้การหมักจะมีการผลิตตัวทำละลายได้แก่ อะซีโตน และบิวทานอล เมื่อการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง สภาวะนี้มีการใช้น้ำตาลไปทั้งสิ้น 26.87 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) คิดเป็นร้อยละ 67.18 ของน้ำตาลทั้งหมด กรดอะซิติก กรดบิวไทริก และปริมาณกรดโดยรวม จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 12 ชั่วโมง และจากนั้นจะลดลง และเริ่มคงที่ โดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกสุดท้ายเท่ากับ 1.33 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวไทริกสุดท้ายเท่ากับ 1.54 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดโดยรวมสุดท้ายเท่ากับ 2.87 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) ภายใต้สภาวะการหมักนี้ความเข้มข้นของบิวทานอลและเอบีอีจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล และเอบีอี เท่ากับ 6.91 กรัมต่อลิตร และ 9.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการหมัก 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนี้ให้ค่าผลได้ และอัตราการผลิตของบิวทานอลเท่ากับ 0.26 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป

และ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) นอกจากนี้พบว่าภายใต้สภาวะนี้มีการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.2 การผลิตเอบีอีจากกากน้ำตาลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 1-5 กรัมต่อลิตรโดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

ผลการทดลอง*	ความเข้มข้นของสารสสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)				
	1	2	3	4	5
อะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	2.11±0.24[a]	2.87±0.28[b]	3.17±0.11[b]	3.05±0.29[b]	3.11±0.36[b]
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	6.91±0.31[a]	8.22±0.24[b]	10.57±0.41[c]	10.48±0.68[c]	10.39±0.52[c]
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	0.25±0.21[a]	0.53±0.11[b]	0.99±0.26[c]	1.03±0.32[c]	0.96±0.09[c]
เอบีอี (กรัมต่อลิตร)	9.27±0.56[a]	11.62±0.34[b]	14.73±0.31[c]	14.56±0.16[c]	14.46±0.42[c]
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	1.33±0.15[a]	1.54±0.04[a]	1.87±0.19[b]	2.54±0.29[c]	2.33±0.13[c]
กรดบิวไทริก (กรัมต่อลิตร)	1.54±0.17[a]	1.37±0.27[a]	1.28±0.20[a]	1.31±0.08[a]	1.28±0.22[a]
กรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	2.87±0.22[a]	2.91±0.20[a]	3.15±0.13[a]	3.85±0.36[b]	3.61±0.50[b]
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	26.87±1.24[a]	28.90±0.81[a]	32.44±0.39[ab]	32.04±0.18[ab]	30.12±1.24[a]
ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	0.26	0.28	0.33	0.33	0.34
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.14	0.17	0.22	0.22	0.22

* The experiments were performed in triplicate and the results were expressed as mean ± SD.

[a, b ad c] Means followed by the same letter within the same row are not significantly different using Duncan's multiple range test at the level of 0.05

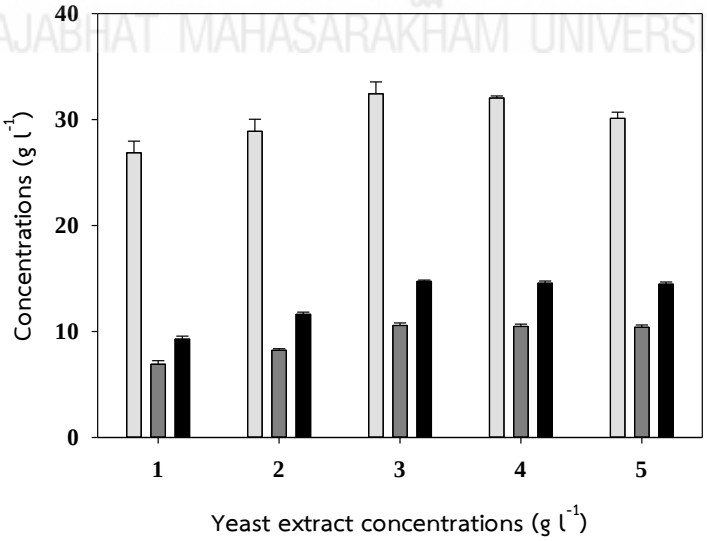
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ในสภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร จะมีลักษณะการผลิตคล้ายกับสภาวะที่มีสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้น 1 กรัมต่อลิตร คือพีเอชจะลดลงจาก 6.49 จนถึง 4.97 ที่ 12 ชั่วโมง สอดคล้องกับกรดอะซิติก และกรดบิวไทริกที่เพิ่มขึ้น จากนั้นค่าพีเอชจะเริ่มเพิ่มขึ้นจนถึง 5.28 ที่ 48 ชั่วโมง และในช่วงระหว่างนี้การหมักจะมีการผลิตตัวทำละลายได้แก่ อะซีโตน เอทานอล และบิวทานอล เมื่อการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง สภาวะนี้มีการใช้น้ำตาลไปทั้งสิ้น 28.90 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) คิดเป็นร้อยละ 72.25 ของน้ำตาลทั้งหมด โดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกสุดท้ายเท่ากับ 1.54 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวไทริกสุดท้ายเท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดโดยรวมสุดท้ายเท่ากับ 2.91 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล และเอบีอี เท่ากับ 8.22 กรัมต่อลิตร และ 11.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนี้ให้ค่าผลได้ และอัตราการผลิตของบิวทานอลเท่ากับ 0.28 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป และ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ผลการทดลองในสภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร คือ พีเอชจะลดลงจาก 6.52 จนถึง 4.90 ที่ 12 ชั่วโมง พร้อมกับการผลิตกรดอะซิติก และกรดบิวไทริกจากนั้นค่าพีเอชจะเริ่มเพิ่มขึ้นจนถึง 5.35 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 48 และมีการผลิตตัวทำละลายได้แก่ อะซีโตน เอทานอล และบิวทานอลขึ้น เมื่อการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง สภาวะนี้มีการใช้น้ำตาลไปทั้งสิ้น 32.44 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) คิดเป็นร้อยละ 81.10 ของน้ำตาลทั้งหมด โดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกสุดท้ายเท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวไทริกสุดท้ายเท่ากับ 1.28 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดโดยรวมสุดท้ายเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล และเอบีอี เท่ากับ 10.57 กรัมต่อลิตร และ 14.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง การหมักภายใต้สภาวะนี้ให้ค่าผลได้ และอัตราการผลิตของบิวทานอลเท่ากับ 0.33 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป และ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ขณะที่ผลการทดลองในสภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 4 และ 5 กรัมต่อลิตร จะมีรูปแบบการผลิตเอบีอีคล้ายกับสภาวะที่มีสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 3 กรัมต่อลิตร โดยพีเอชจะลดลงในช่วง 12 ชั่วโมง พร้อมกับการผลิตกรดอะซิติก และกรดบิวไทริกจากนั้นค่าพีเอชจะเริ่มเพิ่มขึ้นจนถึง 48 ชั่วโมง และมีการผลิตตัวทำละลายได้แก่อะซีโตน เอทานอล และบิวทานอล ระหว่าง 3.05-3.11 กรัมต่อลิตร 0.96-1.03 กรัมต่อลิตร และ 10.39-10.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลาการหมักผ่าน 48 ชั่วโมง ทั้ง 2 สภาวะนี้มีการใช้น้ำตาลไปทั้งสิ้น 30.12-32.04 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) คิดเป็นร้อยละ 75.30-80.10 ของน้ำตาลทั้งหมด โดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกสุดท้ายระหว่าง 2.33–2.54 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวไทริกสุดท้ายเท่ากับ 1.28–1.31 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดโดยรวมสุดท้ายเท่ากับ 3.61-3.85 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล และเอบีอี เท่ากับ 10.39-10.48 กรัมต่อลิตร และ 14.46-56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมงก ภายใต้สภาวะนี้ให้ค่าผลได้ และอัตราการผลิตของบิวทานอลเท่ากับ 0.33-0.34 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป และ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบการผลิตเอบีอีจากอาหารกากน้ำตาลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นโดย *C. beijerinckii* TISTR 1461 (□; ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป, ▒; บิวทานอล และ ■; เอบีอี)

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์จาก 1 ถึง 3 กรัมต่อลิตร จะส่งผลให้การใช้น้ำตาล ปริมาณบิวทานอล และเอบีอี สูงขึ้น (ภาพที่ 4.3) โดยสภาวะการหมักที่มีสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 3 กรัมต่อลิตรจะให้ร้อยละของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป บิวทานอล และเอบีอี สูงสุดเท่ากับ 81.10 10.57 และ 14.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ส่งผลให้มีผลได้และอัตราการผลิตบิวทานอลเท่ากับ 0.33 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป และ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามสภาวะการหมักที่มีสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 4 และ 5 กรัมต่อลิตรนั้น ให้ร้อยละของน้ำตาลที่ใช้ไป ปริมาณบิวทานอล และเอบีอีใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.3) อาจเนื่องมาจากในสภาวะการที่มีสารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไนโตรเจนที่เชื่อสามารถใช้ได้เพียงพอแล้ว

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

ในการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมและไม่เติมสารอาหารสังเคราะห์ พบว่ากากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมสารอาหารสังเคราะห์สามารถผลิตบิวทานอล (8.22 กรัมต่อลิตร) ได้ต่ำกว่ากากน้ำตาลที่มีการเติมสารอาหารสังเคราะห์ (10.34 กรัมต่อลิตร) เล็กน้อย อีกทั้งยังให้ค่าผลได้และอัตราการผลิตบิวทานอลใกล้เคียงกัน อาจเนื่องมาจากกากน้ำตาลอาจมีสารอาหารอื่นที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ในการเจริญเติบโตผสมอยู่ด้วย (Wechgama et al., 2017) ดังนั้นการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมสารอาหารจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการลดค่าใช้จ่ายและต้นทุนการผลิตบิวทานอลได้

การทดลองแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ที่ 1-5 กรัมต่อลิตร ในกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตรนั้น ผลการทดลองพบว่าทุกสภาวะให้ความเข้มข้นของบิวทานอลในช่วง 6.91-10.57 กรัมต่อลิตร ขณะเดียวกันให้ค่าผลได้และอัตราการผลิตบิวทานอลในช่วง 0.26-0.34 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป และ 0.14-0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์จาก 1-3 กรัมต่อลิตร จะส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461 การใช้น้ำตาล ปริมาณบิวทานอล และเอบีอี สูงขึ้น โดยสภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 3 กรัมต่อลิตรจะให้ค่าของร้อยละปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป บิวทานอล และเอบีอี สูงสุด เท่ากับ 81.10 10.57 และ 14.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ส่งผลให้มีผลได้และอัตราการผลิตบิวทานอลเท่ากับ 0.33 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป และ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามสภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 4 และ 5 กรัมต่อลิตรนั้นให้ร้อยละของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ปริมาณบิวทานอล และเอบีอีใกล้เคียงกัน อาจเนื่องมาจากในสภาวะการหมักที่มีสารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไนโตรเจนที่เชื้อสามารถใช้ได้เพียงพอแล้ว (Wechgama et al., 2017) จึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มสารสกัดจากยีสต์เกิน 3 กรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตบิวทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2553. กากน้ำตาล. **วารสารน้ำตาล.** 3 (6).

นฤมล โตอ่อน. 2549. **ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

Al-Shorgani, N. K. N., Kalil, M. S. and Yusoff, W. M. W. (2011). The effect of different carbon sources on biobutanol production using *Clostridium saccharoperbutyl acetonicum* N1-4. **Biotechnology**. 10 (3): 280-285.

Al-Shorgani, N. K. N., Ali, E., Kalil, M. S. and Yusoff, W. M. W. (2012). Bioconversion of butyric Acid to Butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) in a limited nutrient medium. **Bioenergy Research**. 5: 287-293.

Ahn, J. H., Sang, B. I. and Um, Y. (2011). Butanol production from thin stillage using *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology**. 102: 4934-4937.

Areesirisuk, A., Laopaiboon, L., Khongsay, N. and Laopaiboon, P. (2010). Improvement of gas chromatographic analysis for organic acids and solvents in acetone-butanol-ethanol fermentation from sweet sorghum juice. **African Journal of Biotechnology**. 9: 6422-6429.

Bryant, D. L. and Blaschek, H. P. (1988). Buffering as a means for increasing growth and butanol production by *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 3: 49-55.

Chen, C. K. and Blaschek, H. P. (1999). Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BAlO1. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 52: 170-173.

Dürre, P. (2008). Fermentative butanol production. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1125: 353-362.

Eversloh, T. U. T and Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. **Current Opinion in Biotechnology**. 22: 634–647.

Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P. (2004). Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: Butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. **Journal of Biotechnology.** 115: 179-187.

Ezeji, T. C., Karcher, P. M., Qureshi, N. and Blaschek, H. P. (2005). Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Clostridium beijerinckii fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 27: 207-214.

Gutierrez, N. A., Maddox, I. S., Schuster, K. C., Swoboda, H. and Gapes, J. R. (1998). Strain comparison and medium preparation for the acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process using a substrate of potato. **Bioresource Technology.** 66: 263-265.

Hartmanis, M. and Gatenbeck, S. (1984). Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 47: 1277-1283.

Isar, J. and Rangaswamy, V. (2012). Improved n-butanol production by solvent tolerant *Clostridium beijerinckii.* **Biomass and Bioenergy**. 37: 9-15.

Keller, G.A. 1967. Molasses. **Encyclopedia of Chemical Technology.** 2nd ed. volume 13.

Kim, J., Bajpai, R. and Lannotti, E. (1988). Redox potential in acetone-butanol fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 18: 175-186.

Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J. and Jung, K. S. (2008). Fermentative Butanol Production by Clostridia. **Biotechnology and Bioengineering.** 101: 209-227.

Lu, C., Zhao, J., Yang, S. T. and Wei, D. (2012). Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping. **Bioresource Technology.** 104: 380–387.

Maddox, I. S., Qureshi, N. and Roberts-Thomson, K. (1995). Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrate using clostridium acetobutylicum in an integrated fermentation-product removal process. **Process Biochemistry**. 30: 209-215.

Mecozzi, M. (2005). Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 79: 84-90.

Ni, Y., Wang, Y. and Sun, Z. (2012). Butanol production from cane molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: batch and semi-continuous termentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 166 (8): 1896-1907.

Office of the Cane and Sugar Board. (2014). Status of sugarcane and sugar in Thailand 2014. http://www.ocsb.go.th/th/cms/detail.php?ID=5351&SystemModuleKey = country. (accessed16.07.15.)

Patakova, P., Linhova, M., Rychtera, M., Paulova, L. and Melzoch, K. (2013). Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia:

Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. **Biotechnology Advances**. 31: 58–67.

Qureshi, N. and Blaschek, H. P. (1999). Butanol recovery from model solution/ fermentation broth by pervaporation: Evaluation of membrane performance. **Biomass and Bioenergy.** 17: 175-184.

Ranjan, A., Khanna, S. and Moholkar, V. S. (2013). Feasibility of rice straw as alternate substrate for biobutanol production. **Applied Energy**. 103: 32–38.

Shen, C. R. and Liao, J. C. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. **Metabolic Engineering.** 10: 312-320.

Sirisantimathakom, L., Laopaiboon, L. and Laopaiboon, P. (2004). Improvement of butanol production from sweet sorghum juice by *Clostridium beijerinckii* using an orthogonal array design. **Industrial Crops and Products.** 79: 287–294.

Sun, Z. and Liu, S. (2010). Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridia acetobutylicum* ATCC824. **Biomass and Bioenergy**. 39: 39-47.

Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G. and Sonomoto, K. (2005). High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. **Journal of Biotechnology.** 120: 197-206.

Wal, H. V. D., Sperber, B. L. H. M., Houweling-Tan, B., Bakker, R. R. C., Brandenburg, W. and Lopez-Contreras. A. M. (2013). Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. **Bioresource Technology**. 128: 431–437.

Wanga, Y. and Blaschek, H. P. (2011). Optimization of butanol production from tropical maize stalk juice by fermentation with *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. **Bioresource Technology.** 102: 9985–9990.

Wechgama, K. (2015). **Biobutanol Production from Agricultural Raw Materials by *Clostridium* spp**. Doctor of Philosophy Thesis in Biotechnology, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Wechgama, K., Laopaiboon, L. and Laopaiboon, P. (2017a). Biobutanol Production from Agricultural Raw Materials by *Clostridium* spp. **Chiang Mai Journal Science.** 44 (2): 394-405.

Wechgama, K., Laopaiboon, L. and Laopaiboon, P. (2017b). Enhancement of batch butanol production from sugarcane molasses using nitrogen supplementation integrated with gas stripping for product recovery. **Industrial Crops and Products.** 95: 216-226.

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

YouSheng, L., Jing, W., XuMing, W. and XiaoHong, S. (2011). Optimization of butanol production from corn straw hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* using response surface method. **Chinese Science Bulletin**. 56: 1422–1428.

Zoecklien, B., Fugelsang, K., Gump, B. and Nury, F. (1995). *Laboratory procedures.* **In: Wine analysis and production.** New York: Chapman & Mall.

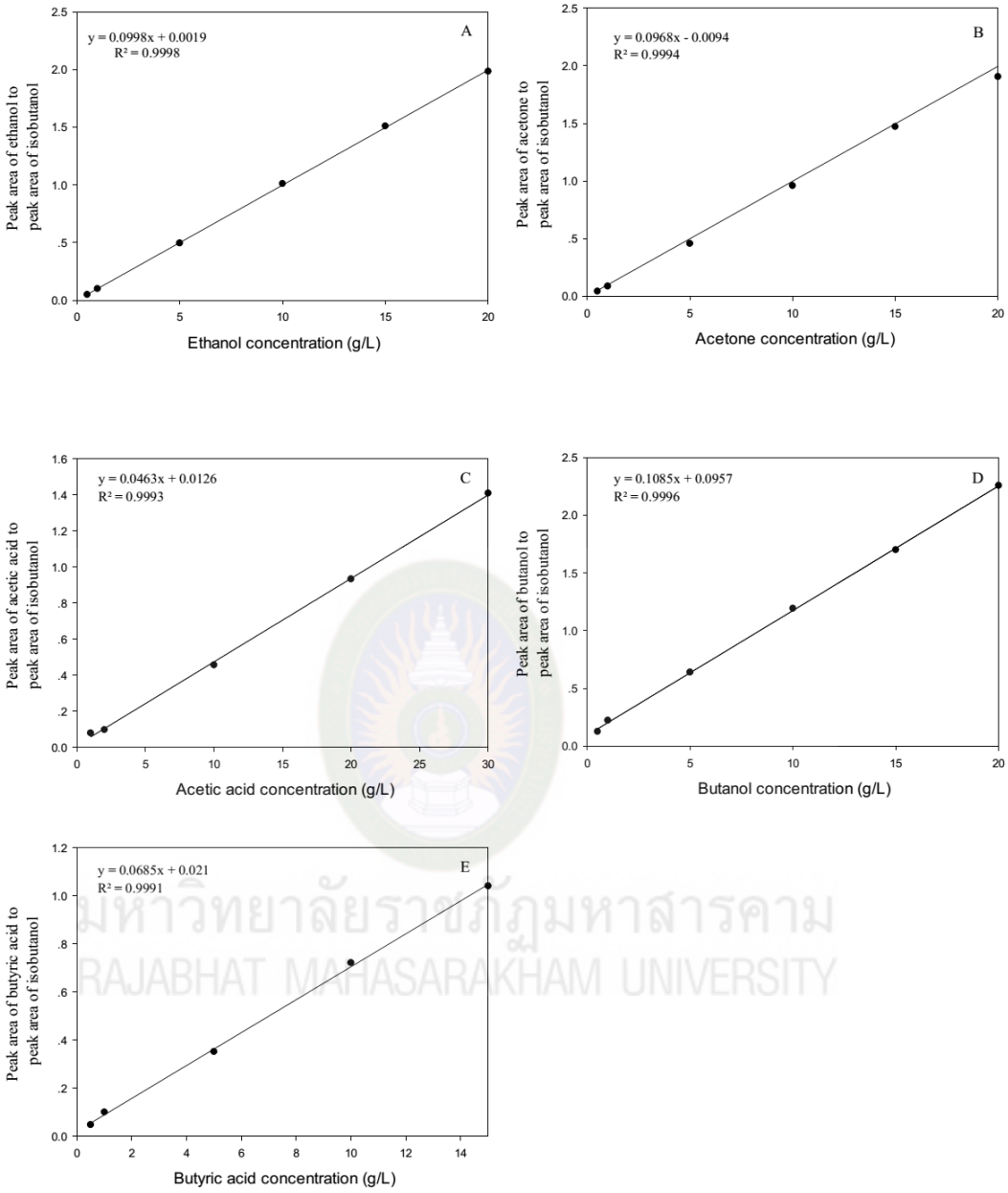
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

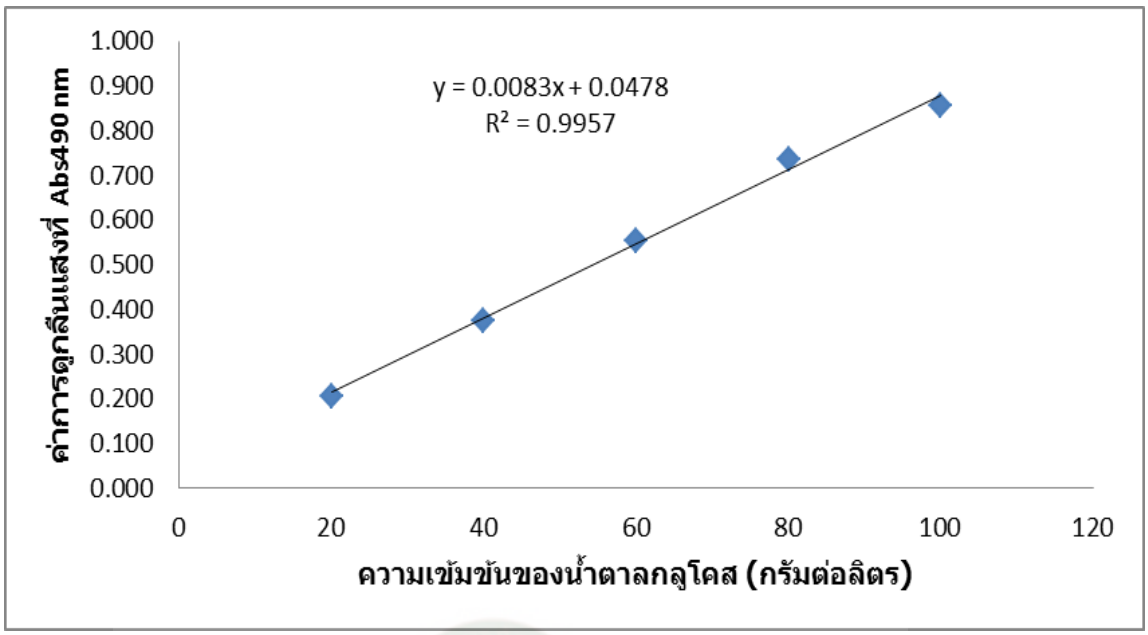
ภาคผนวก ก
กราฟสารละลายมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ ก.1 กราฟสารละลายมาตรฐาน; เอทานอล (A), อะซีโตน (B), กรดอะซิติก (C), บิวทานอล (D) และ กรดบิวไทริก (E) (Wechgama et al., 2015)

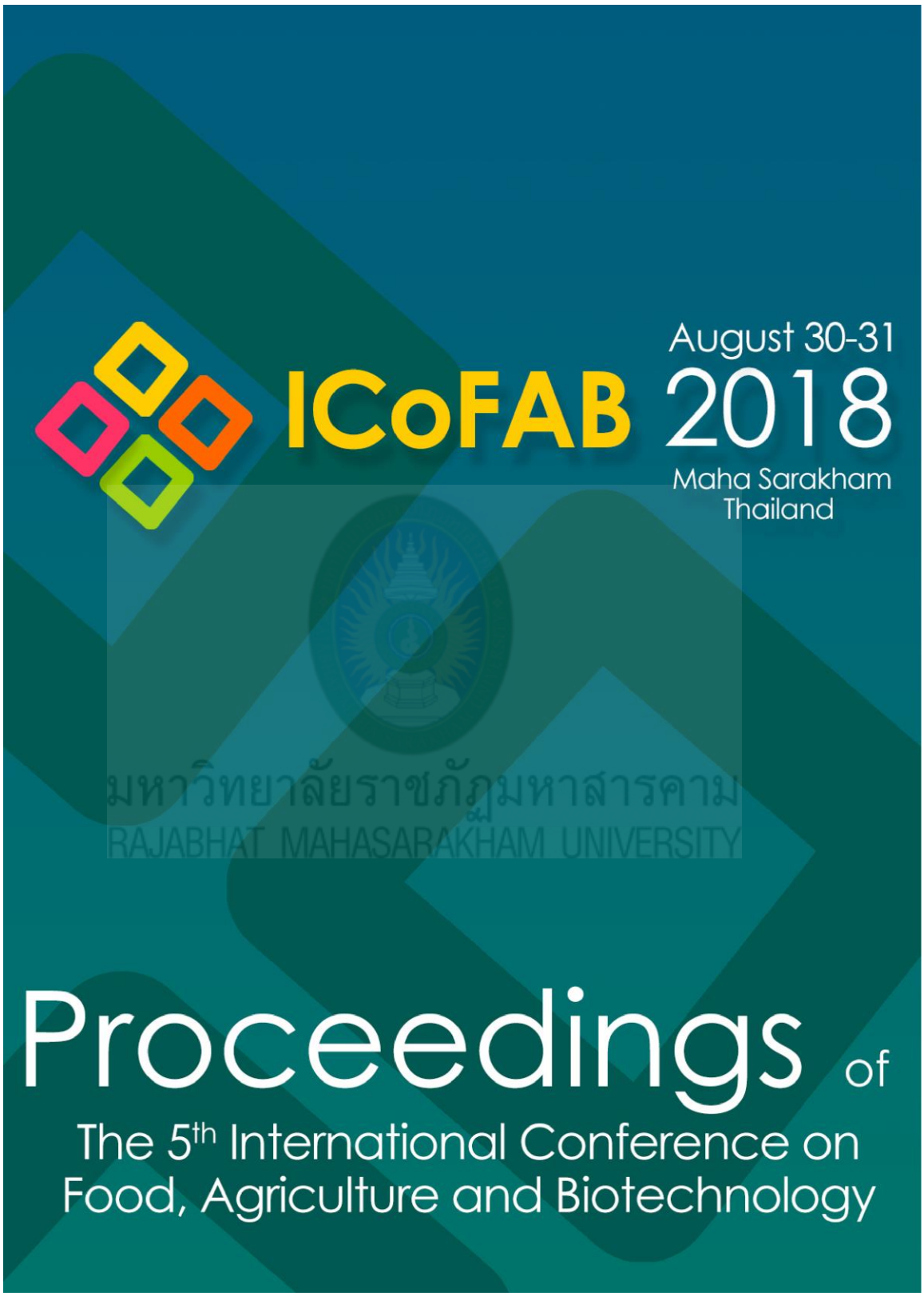


ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ข
การนำเสนอผลงาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY


ICoFAB
August 30-31
2018
Maha Sarakham
Thailand
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY
Proceedings of
The 5th International Conference on
Food, Agriculture and Biotechnology

Content

Abstracts: **Page**

6: Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pasteurized Mulberry Leaf Tea Mixed Soymilk Powder and Its Correlation with Different Antioxidant Assay ……..…….. 184

Jintana Sangsopha

7: Butanol Production from Molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 under Different Yeast Extract Concentration Conditions ……..…….. 185

Kanlayani Charoensopharat

8: Optimization of Process Variables for Pulsed Vacuum Osmotic Dehydration of Model Food Cubes ……..…….. 186

Kulab Sitttisuanjik

9: The Antioxidant Capacities of Ethanolic Extract from Traditional Herbs in Sahatsakhan District, Kalasin Province ……..…… 187

Kwanyuen Leamsamrong

10: Effects of Different Phosphorus Forms on Phosphorus Absorption and Utilization of Maize in Red Soil ……..…… 188

Lian-Ya Zhang

11: Oleic Acid and Palmitic Acid Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in HepG2 Model …..…….. 189

Nadta Sukkasem

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ICoFAB2018
International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology

Butanol Production from Molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 under Different Yeast Extract Concentration Conditions

Kanlayani Charoensopharat[1]*, Kitipong Wechgama[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Science and Technology,
Rajabhat Maha Sarakham University, Thailand
[2]Rajamangala University of Technology Isan, Muang, Nakhon Ratchasima, Thailand
**Corresponding author's e-mail*: Chkanlayani@gmail.com

DOI:10.14457/MSU.res.2018.4

Abstract:

This study aimed to investigate the effect of yeast extract concentrations (1-5 g l^{-1}) for butanol production from sugarcane molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461. The molasses without nutrient supplementation containing 60 g l^{-1} of total sugar and varied yeast extract concentrations at 1-5 g l^{-1} were used as butanol production media. The fermentation was carried out in a 1-L bottle with a working volume of 750 ml at 37 °C and an initial pH of 6.5 under anaerobic condition. The results showed that butanol and ABE concentration increased with increasing of yeast extract concentration at 1-3 g l^{-1}. However, the butanol concentration was slightly different at the yeast extract concentration between 4 and 5 g l^{-1} (10.48 and 10.39 g l^{-1}) in the media. The highest butanol and ABE concentrations were obtained at 10.57 g l^{-1}, and 14.73 g l^{-1}, respectively when adding 3 g l^{-1} yeast extract. However, the results also showed the butanol yield and butanol productivity at 0.33 and 0.22 g l^{-1} h^{-1}, respectively. This condition enhanced the butanol concentration, yield and productivity when compared with the control medium.

Keywords: *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461, butanol, molasses, yeast extract

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกัลยาณี เจริญโสภารัตน์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss KANLAYANI CHAROENSOPHARAT
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000
   โทรศัพท์มือถือ 08-9937-4714
   e-mail: Chkanlayani@gmail.com
4. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษาที่สำเร็จการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
ปริญญาเอก	ปร.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2558
ปริญญาโท	วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2549
ปริญญาตรี	วท.บ. (เกียรตินิยม อันดับ 2)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	2546

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
   - เทคโนโลยีการหมัก
   - เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม
   - เทคโนโลยีทางด้านพืช

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-การคัดแยกเชื้อยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้านที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล ได้รับการจัดสรรทุนอุดหนุนวิจัยงบประมาณรายได้ (บกศ.) ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

-ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการผลิตบิวทานอลโดย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ได้รับการจัดสรรทุนอุดหนุนวิจัยงบประมาณรายได้ (บกศ.) ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

-การคัดแยกเชื้อยีสต์ทนร้อน และผลของปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล ได้รับการจัดสรรทุนอุดหนุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

- ผลของค่าพีเอชและความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ได้รับการจัดสรรทุนอุดหนุนวิจัยงบประมาณรายได้ (บกศ.) ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Charoensopharat, K. and Wechgama, K. 2019. Effect of initial cell, yeast extract and sugar concentrations on ethanol production from molasses by thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* RMU Y-10. Asia-Pacific Journal of Science and Technology 24 (2) APRIL – JUNE 2019: In Press.

Charoensopharat, **K.,** Thanonkeo**, P.,** Thanonkeo, S. and Yamada, M. 2015. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at high temperature by newly isolated thermotolerant inulin utilizing yeast *Kluyveromyces marxianus* using consolidated bioprocessing. Antonie van Leeuwenhoek. 108: 173-190.

Charoensopharat, **K.,** Thummabenjapone, P., Sirithorn, P. and Thammasirirak, S. 2008. Antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. No. 87. African Journal of Biotechnology. 7(9): 1362-1368.

Charoensopharat, **K.,** Aukkanit, N. Thanonkeo, S., Saksirirat, W., Thanonkeo, P. and Akiyama, K. 2007. Target disruption of a G protein α subunit gene results in reduced growth and pathogenicity in *Rhizoctonia solani*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 345-351.

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์ และ กิติพงษ์ เวชกามา. 2562. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดโดยยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* RMU Y-10 โดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบ Orthogonal Array Design. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 13 (2): In Press.

Charoensopharat, K. and Wechgama, K. 2018. Isolation and Selection of Newly Thermotolerant Yeast from Edible Local Fruits for Ethanol Production from Cassava Starch. Prawarun Agricultural Journal. 15 (SUPPL.1): 29-39.

<u>การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ</u>

Charoensopharat, K. and Wechgama, K. 2018. Butanol production from molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 under different yeast extract concentration conditions. lnternational Conference on Food, Agriculture and Biotechnology (lCoFAB) 2018, August 30th-31st, 2018, Siam Tara Palace Hotel, Mahasarakham, Thailand.

Wechgama, K., Chunchom, S., Yodsing, N., Worrachottiyanon, W. and **Charoensopharat, K.** 2018. Influence of Urea on Butanol Production from Sugarcane Juice by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461. lnternational Conference on Food, Agriculture and Biotechnology (lCoFAB) 2018, August 30th-31st, 2018, Siam Tara Palace Hotel, Mahasarakham, Thailand.

Saraphirom, P., Namsena, P. and **Charoensopharat, K.** 2018. Optimization of mineral and vitamin supplementation on hydrogen production from sugarcane bagasses by mixed cultures using central composite design. International Forum-Agriculture, Biology, and Life Science (IFABL 2018), April 6th-8th, 2018, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.

Charoensopharat, K. 2017. Isolation and selection of newly thermotolerant yeast from edible local fruits for ethanol production from cassava starch. The 7th International Conference on Sciences and Social Science (ICSSS 2017), January 11-12, 2017, Rajabhat Maha Sarakham University, Maha Sarakham, Thailand.

Charoensopharat, K. 2017. Isolation and selection of thermotolerant yeasts for bioethanol production from sugarcane molasses. The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. November 23th-25th, 2017, Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand.

Charoensopharat, K. 2017. Biobutanol production from molasses by *Clostridium beijerinkii* TISTR 1461 under different initial pH values and sugar concentrations. Abstract: The 7th International Conference on Fermentation and Technology for value added agricultual products and the 12th Asian biohydrogen & biorefinery symposium with joint session from JSPS-NRCT new core to core programma. July 25th-28th, 2017, Pullman, Khon Kaen, Thailand.

Charoensopharat, K., Salarat, B. and Mahaphon, P. 2017. Optimization of initial cells, yeast extract and sugar concentration for ethanol production from molasses at high temperature by thermotolerant yeast RMU Y-10. Proceeding: The 7th International Conference on Fermentation and Technology for value added agricultual products and the 12th Asian biohydrogen & biorefinery symposium

with joint session from JSPS-NRCT new core to core programma. July 25th-28th, 2017, Pullman, Khon Kaen, Thailand.

Charoensopharat, K., Sirisantimethakom, K., Sirisantimethakom, L. and Kitipong Wechgama. 2016. Production of Biobutanol under Different Types and Concentrations of Initial Sugar from P2 Medium by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461. Proceeding: The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. November 28th-30th, 2016, The Empress Hotel, Chaing Mai, Thailand.

Charoensopharat, **K.,** Wechgama, K. and Chumroenphat, T. 2015. Analysis of vitamin C content of edible flowers from Maha Sarakham province in Northeasthern Thailand. Abstract: The 6th International Conference on Fermentation and Technology for value added agricultual products. July 29th-31st, 2015, Centara Hotel & convention cetre, Khon Kaen, Thailand. (The Second Place Poster Presentation Award)

Charoensopharat, K., Chumroenphat, T. and Thanonkeo, P. 2015. Isolation and screening of thermotolerant yeasts for ethanol production from edible local fruits in Thailand. Abstract: International Conference on Environment and Renewable energy. May 20th-21nd, 2015, Grand Hotel Wien, Vienna, Austria.

Charoensopharat, K., Thanonkeo, S., Yamada, M. and Thanonkeo, P. 2013. The batch ethanol production from Jerusalem artichoke juice by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DBKKU Y-102. An abstract published in The Proceeding of Abstract of The 5th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agriculture Products, 21st-23rd August 2013, Centara Hotel and Convention Centre, Khon Kean, Thailand.

Charoensopharat, K., Thanonkeo, S. and Thanonkeo, P. 2012. Bioethanol production from Jerusalem artichoke tubers juice by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DBKKU Y-102. An abstract published in The Proceeding of Abstract of The 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Innovative Biotechnology for a Green world and Beyond, 16th – 21st September, 2012, EXCO, Daegu, Korea.

Charoensopharat, K., Thanonkeo, S., Yamada, M. and Thanonkeo, P. 2011. Selection of thermotolerant yeasts for bioethanol production from Jerusalem artichoke juice. An abstract published in The proceeding of Abstract of The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agriculture Products, 29th -31st August 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Charoensopharat, **K.,** Thanonkeo, S. and Thanonkeo, P. 2010. Isolation and characterization of thermotolerant yeasts for bioethanol production from Jerusalem artichoke. An abstract published in the proceeding of The 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 14th-18th September 2010, Palacongressi, Rimini, Italy.

Charoensopharat, **K.,** Lunprom, S., Aukkanit, n., Saksirirat, W., Thanonkeo, S., Akiyama, K. and Thanonkeo, P. 2007. Target disruption of a G protein alpha subunit gene and its affect on growth and pathogenicity in *Rhizoctonia solani*. Proceeding of The 6th Asian Crop Science Association Conference and the 2nd International Conference on Rice for the Future. 5-9 November 2007, Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand.

Charoensopharat, **K.,** Lunprom, S., Aukkanit, N., Saksirirat, W., Thanonkeo S. and Thanonkeo, P. 2005. Biological function of G protein beta subunit gene in *Rhizoctonia solani.* Abstract: International Conference on BioThailand 2005: TSB Annual Meeting: International Biotechnology; The Era of Bionanotechnology. November 2nd-5th, 2005, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

<u>การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับชาติ</u>

Charoensopharat, K., Khampoongern, P., Kongkaew, S., Wechgama, K. and Chumroenphat, T. 2016. Phenolic compounds and flavonoids content of some edible flowers in Maha Sarakham province. An abstract published in the proceeding of The 10th Botanical Conference of Thailand, 16th-18th June 2016, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.

Charoensopharat, K., Thanonkeo, S. and Thanonkeo, P. 2012. Isolation and characterization of thermotolerant yeast capable of producing bioethanol from Jerusalem artichoke juice (*Helianthus tuberosus* L.). An abstract published in the proceeding of Commission on Education Congress V: University Staff Development Consortium, 14th -16th November 2012, The Ambassador City Jomtien, Pattaya, Thailand.

Charoensopharat, **K.,** Thanonkeo, S. and Thanonkeo, P. 2009. Isolation of thermotolerant yeast for ethanol production from Jerusalem artichoke. An abstract published in the proceeding of Commission on Education Congress II: University Staff Development Consortium, 27th-29th August 2009, Dusit Thani Pattaya, Pattaya, Thailand.

รางวัลที่ได้รับ

1. การนำเสนองานวิจัยแบบโปสเตอร์ยอดเยี่ยม ลำดับที่ 2 ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Charoensopharat, K., Wechgama, K. and Chumroenphat, T. 2015. Analysis of vitamin C content of edible flowers from Maha Sarakham province in Northeasthern Thailand. Abstract: The 6th International Conference on Fermentation and Technology for value added agricultual products. July 29th-31st, 2015, Centara Hotel & convention cetre, Khon Kaen, Thailand.

2. เกียรติบัตรเหรียญเงิน จากการประกวดโครงงานวิจัยระดับอุดมศึกษา จำนวน 2 รางวัล

(ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัย)

ภลิตา ศรีสมบัติ, สิตานัน ม่วงเพชร, สุพัตรา พันเทศ. 2560. การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิสูงโดยใช้เชื้อยีสต์ทนร้อน RMU Y-10. การประกวดโครงงานวิจัยระดับอุดมศึกษา. 30, พฤษภาคม, 2560, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, ธัญบุรี, ประเทศไทย.

บุญถิน สารรัตน์, ปวีณา มหาพล, พงษ์ศกร สีสมพา. 2560. ปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อยีสต์ทนร้อน RMU Y-10. การประกวดโครงงานวิจัยระดับอุดมศึกษา. 30, พฤษภาคม, 2560, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, ธัญบุรี, ประเทศไทย.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ทั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีการหมัก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ สำหรับสถานที่และสนับสนุนอุปกรณ์บางชนิดเพื่อทำการวิจัย

ขอบคุณคุณธีระพันธ์ จำเริญพัฒน์ สำหรับเทคนิคการวิเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง สุดท้ายขอขอบคุณ ดร.กิติพงษ์ เวชกามา สำหรับคำแนะนำในเรื่องการผลิตบิวทานอล

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์
มีนาคม 2562

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

หัวข้อวิจัย ผลของอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) และความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไบโอบิวทานอลจากกากน้ำตาลโดย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

ผู้ดำเนินการวิจัย กัลยาณี เจริญโสภารัตน์

หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ปี พ.ศ. 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) และความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไบโอบิวทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 โดยกากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมสารอาหารและมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 40 กรัมต่อลิตร ที่มีแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ระหว่าง 1-5 กรัมต่อลิตร ถูกใช้เป็นอาหารสำหรับการผลิตบิวทานอล ทำการหมัก 750 มิลลิลิตร ในขวดหมักขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของบิวทานอลและอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์จาก 1-3 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของบิวทานอลมีความแตกต่างกับสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เพียงเล็กน้อย (10.48 และ 10.39 กรัมต่อลิตร) ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอลและเอบีอีถูกตรวจพบในสภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ที่ 3 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 10.57 และ 14.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สภาวะดังกล่าวให้ค่าผลได้และอัตราการผลิตบิวทานอลเท่ากับ 0.33 และ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากการทดลองสรุปได้ว่าสภาวะการหมักดังกล่าวสามารถเพิ่มความเข้มข้นของบิวทานอล ผลได้และอัตราการผลิตบิวทานอล

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Research Title	Effect of synthetic medium (P2 medium) and yeast extract concentrations on biobutanol production from sugarcane molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461
Researcher	Kanlayani Charoensopharat
Organization	Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University
Year	2019

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of yeast extract concentrations on butanol production from sugarcane molasses by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461. The molasses without nutrient supplementation containing 40 g l^{-1} of total sugar and varied yeast extract concentrations at 1-5 g l^{-1} were used as butanol production media. The fermentation was carried out in a 1-l bottle with a working volume of 750 ml at 37 ^{o}C and an initial pH of 6.5 under anaerobic condition. The results showed that butanol and acetone butanol and ethanol (ABE) concentration increased with increasing of yeast extract concentration at 1-3 g l^{-1}. The butanol concentration was slightly different at the yeast extract concentration between 4 and 5 g l^{-1} (10.48 and 10.39 g l^{-1}) in the media. The highest butanol and ABE concentrations were 10.57 g l^{-1}, and 14.73 g l^{-1}, when 3 g l^{-1} yeast extract was added. The fermentation under the optimal condition revealed that the butanol yield and butanol productivity were 0.33 and 0.22 g l^{-1} h^{-1}, respectively. The results demonstrated that the optimal condition could improve butanol concentration, yield and productivity.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตการศึกษางานวิจัย 2
1.4 สมมติฐานของการศึกษางานวิจัย 3
1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย 3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตบิวทานอล 4
2.2 การผลิตบิวทานอล 4
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก 5
2.4 กากน้ำตาล 6
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
2.6 กรอบแนวคิดในการวิจัย 12

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 13
3.1 วัสดุและสารเคมี 13
3.2 อุปกรณ์ 14
3.3 จุลินทรีย์ 14
3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย 14
3.5 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล 18
3.6 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย 19

บทที่ 4 วิธีดำเนินการวิจัย 20
4.1 เตรียมวัตถุดิบและวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล 20

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ศึกษาผลของการเติมสารอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) ต่อการผลิตบิวทานอลในระบบการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461.....21
4.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้น ต่อการผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบกะ จากกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461.....23

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....27
5.1 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล.....27
5.2 ข้อเสนอแนะ 27

บรรณานุกรม.....28
บรรณานุกรมภาษาไทย.....28
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ.....28

ภาคผนวก.....32
ภาคผนวก ก กราฟสารละลายผลิตภัณฑ์มาตรฐาน.....33
ภาคผนวก ข การนำเสนอผลงาน.....36

ประวัติผู้วิจัย.....40

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....13
3.2 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย.....19
4.1 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล.....20
4.2 การผลิตเอบีอีจากกากน้ำตาลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของ
สารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่ 1-5 กรัมต่อลิตรโดย *C. beijerinckii* TISTR 1461.....24

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 วิถีการผลิตบิวทานอลของ *C. Acetobutylicum*.....5
(ATP:adenosine triphosphate, NAD: nicotina mide adenine dinucleotide,
NADH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADPH:
reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate).....5
2.2 แผนผังการทำการวิจัย.....12
4.1 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมสารอาหารสังเคราะห์
(P2 medium) โดยเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461.....21
4.2 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาล
(P2 medium) โดยเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461.....22
4.3 เปรียบเทียบการผลิตเอบีอีจากอาหารกากน้ำตาลที่มีการแปรผัน
ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสตเริ่มต้นโดย *C. beijerinckii* TISTR 1461.....25
ก.1 กราฟสารละลายมาตรฐาน.....34
ก.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส.....35

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY