สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจีเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ

Optimization of ethanol fermentation from sweet sorghum juice using cell immobilization on alginate-loofah reinforcement

สุนันท์ นวลเพ็ง[1*], นฤมล แก้วอินทร์[1], ปริญญพันธุ์ เพชรจรัส[1], กษมา ชารีโคตร[2] และ สุชีรา เหล่าเจริญ[1]

Sunan Nuanpeng [1*], Narumol Kaew-in [2], Parinyaphan Pechcharat [1], Kasama Chareekhot [2], and Sucheera Laocharoen [1]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

[2]สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

[1] Biotechnology Department, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University

[2] Food technology and Nutrition Department, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University

*Email: sunan.nu@udru.ac.th

Received: Jane 10, 2023; Revised: November 28, 2023; Accepted: December 04, 2023

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 เซลล์ตรึงรูปบนอัลจีเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Benhken design โดยมี 3 ปัจจัยประกอบด้วย ปริมาณเซลล์ตรึง 5, 10 และ 15% (w/v) ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 180 240 และ 300 g/L และปริมาณกากเซลล์ยีสต์ 4, 8 และ 12 g/L โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.70×10^6 cells/mL ผลการศึกษาพบว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือความเข้มข้นของน้ำตาล 280 g/L ต่อ ปริมาณเซลล์ตรึง 5% (w/v) สามารถผลิตเอทานอลได้ 98.84± 0.02 g/L อัตราผลผลิตเอทานอล 1.17± 0.02 g/L.h ระยะเวลาในการหมัก 84 h การศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะซ้ำ ภายใต้สภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 280 (g/L) ปริมาณเซลล์ตรึง 5% (w/v) ทำการหมักทั้งหมด 4 กะ ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด และผลผลิตเอทานอลโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ 94.84 ± 2.02 กรัม/ลิตร และ 1.17 ± 0.02 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ คือปริมาณความเข้มข้นน้ำตาล 280 (g/L) และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตภายใต้สภาวะการหมักแบบกะซ้ำ คือปริมาณน้ำตาลความเข้มข้น 280 (g/L) ปริมาณเซลล์ตรึง 5% (w/v) สามารถผลิตเอทานอลได้ เท่ากับ 98.84± 2.02 g/L และ 1.17 ± 0.02 g/L ตามลำดับ

คำสำคัญ : ข้าวฟ่างหวาน, เซลล์ตรึงรูป, การหมักแบบกะซ้ำ, ใยบวบ

Abstract

The objective of this study was to investigate the optimum conditions for ethanol production from sweet sorghum juice (SSJ) using *Saccharomyces cerevisiae* strain TISTR 5048 cells immobilized on alginate-loofah reinforced (ALM). Box-Benhken design experimental method with 3 factors as follows, immobilized cell content of 5, 10 and 15% (w/v), initial sugar concentrations of 180, 240 and 300 g/L, and dried spent

yeast of 4, 8 and 12 g/L with an initial cell concentration of 8.70×10^6 cells/ml was investigated. Under the optimum condition of sugar concentration of 280 g/L, 5% (w/v) of ALM, ethanol concentration was 98.84 ± 0.02 g/L, the productivity was 1.17 ± 0.02 g/L.h, and the fermentation duration was 84 h. A repeated batch was performed under the conditions of 280 (g/L) sugar concentration, 5% (w/v) of ALM and 4 fermentation batches. The maximum ethanol concentration and volumetric ethanol productivity obtained using ALM under the optimal conditions were 94.84 ± 2.02 g/L and 1.17 ± 0.02 g/L.h, respectively. Its conclude that the optimum conditions for batch fermentation of ALM was the sugar concentration of 280 (g/L) and the optimum conditions for ethanol production by repeated batch with ALM was 280 (g/L) of sugar concentration, 5% (w/v) of ALM, achieved ethanol concentration of 98.84 ± 2.02 g/L and productivity of 1.17 ± 0.02 g/L.

Keywords : Sweet sorghum, Immobilized cells, Repeated batch fermentation, Loofah

1. บทนำ

เอทานอลเป็นหนึ่งในแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงทางเลือกที่มีศักยภาพสูง เนื่องจากเป็นพลังงานสะอาด สามารถผลิตใหม่ได้ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม [1–3] เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิด เช่น วัสดุที่ทำจากน้ำตาล (เช่น อ้อย กากน้ำตาล กากน้ำตาลหัวบีท) วัสดุที่ทำจากแป้ง (เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด มันฝรั่ง) และวัสดุที่ทำจากลิกโนเซลลูโลส (เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ต้นข้าวโพด หญ้าเปลือกสับปะรด) นอกจาก อ้อยและมันสำปะหลังแล้ว ข้าวฟ่างหวาน (Sweet sorghum: *Sorghum bicolor* (L.) Moench) เป็นหนึ่งในพืชพลังงานทางเลือกที่มีแนวโน้มดีที่สุดสำหรับการผลิตเอทานอลเชิงอุตสาหกรรมในประเทศไทย [4–6] ถือเป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่มีศักยภาพสูงสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลเพราะมีระดับของน้ำตาลที่หมักได้ เช่น ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส และมวลชีวภาพสีเขียวที่ให้ผลผลิตสูง [7]

การผลิตเอทานอลทางอุตสาหกรรมโดยทั่วไปใช้ระบบเซลล์อิสระ ซึ่งมีข้อเสียหลายประการ เช่น ต้นทุนการดำเนินงานสูง และผลผลิตเอทานอลต่ำ [8] เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล จึงมีการใช้การตรึงเซลล์รูปซึ่งมีข้อดีหลายประการ เช่น ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์สูง และกิจกรรมการหมัก เพิ่มอัตราการดูดซับสารตั้งต้น เพิ่มผลผลิตและผลผลิตเอทานอล สามารถใช้ได้นานและความเสถียรของเซลล์ ความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ มีความทนทานต่อสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูง ลดการยับยั้งผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย การปกป้องเซลล์จากสารยับยั้ง การเก็บเกี่ยวผลผลิตภัณฑ์ได้ง่าย และต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด [9–13] เทคนิคต่างๆ สำหรับการตรึงเซลล์ เช่น การดูดซับ การกักขัง การเชื่อมโยงข้าม พันธะโควาเลนต์ และการห่อหุ้ม [12] ในบรรดาเทคนิคเหล่านี้ การตรึงเซลล์บนแคลเซียมอัลจิเนต ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเตรียมได้ง่าย ราคาไม่แพง และไม่เป็นพิษ [14] อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อเสียบางประการ เช่น เจล การเสื่อมสภาพ ความแข็งแรงต่ำ และข้อจำกัดในการถ่ายเทมวล [10,13] นอกจากนี้ อุปกรณ์ที่ซับซ้อนในการเตรียมเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต อาจทำให้ต้นทุนการผลิตสูงได้ [15] ใยบวบซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสจากบวบ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลลูโลส (60%) เฮมิเซลลูโลส (30%) และลิกนิน (10%) [16] ถือเป็นหนึ่งในสารพาตามธรรมชาติที่มีศักยภาพสำหรับการตรึงเซลล์ในการผลิตเอทานอลทางอุตสาหกรรม ใยบวบมีข้อดีหลายประการ เช่น ต้นทุนต่ำ ความอุดมสมบูรณ์ ความเสถียรทางเคมี ความพรุนสูง พื้นที่ผิวสูง และไม่เป็นพิษ [17] Ganguly และคณะ รายงานว่าโครงสร้างและรูปร่างของใยบวบยังคงไม่เปลี่ยนแปลงภายใต้สภาวะ pH ต่างๆ (1.1–14) และคงตัวในอุณหภูมิสูงแม้จะนึ่งซ้ำหลายครั้งที่ 121°C เป็นเวลา 20–40 min ใยบวบเหมาะสำหรับการยึดเกาะของเซลล์เนื่องจากประกอบด้วยโครงตาข่ายที่มีรูพรุนสูง [11]

แม้ว่าจะมีงานวิจัยที่เกี่ยวศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ตรึง [11,13,18-19] แต่พบว่าการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปภายในเมทริกซ์อัลจิเนตใยบวบยังมีไม่มากนัก รวมทั้งการประยุกต์ใช้กับวัตถุดิบที่เป็นข้าวฟ่างหวานยังไม่มีการศึกษา ดังนั้น การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงรูปเสริมแรงด้วยใยบวบ เพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำข้าวฟ่างหวาน และการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติแบบ Box-Benhken design จึงนำมาทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ยังตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้เซลล์ตรึงรูปบนอัลจีเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ เพื่อดูความคงตัวและการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ตรึงรูปนี้

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 สายพันธุ์ยีสต์ การเตรียมเซลล์และวัตถุดิบ

สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ คือ *S. cerevisiae* TISTR 5048 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เตรียมอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 mL ลงในฟลาสก์ขนาด 250 mL เขี่ยเชื้อลงไป 1 ลูป และนำไปทำการเพาะเลี้ยงในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C อัตราการกวน 150 rpm เป็นเวลา 18 h จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 30 mL ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 300 mL บ่มที่ 30 °C อัตราการกวน 150 rpm เป็นเวลา 18 h จากนั้นนำเชื้อไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 min เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v)

น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเข้มข้น (75 °Bx) ที่ได้จากภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลในการศึกษานี้ และถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จนกระทั่งใช้งาน

2.2 การตรึงเซลล์

ใยบวบที่ใช้ในงานนี้ซื้อมาจากตลาดท้องถิ่น จังหวัดอุดรธานี ถูกตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ที่มีขนาด 15×15×5 mm นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C เป็นเวลา 15 min เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ ถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2% (w/v) ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ 2×10^8 cells/mL เซลล์ตรึงถูกแช่อยู่ในสารละลายเซลล์อัลจิเนต จากนั้นนำชิ้นใยบวบแช่ลงในสารละลายเซลล์อัลจิเนต และนำไปจุ่มลงในสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ และกวนเบา ๆ เป็นเวลา 15 min นำเซลล์ตรึงไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อกำจัดไอออน Ca^{2+} ส่วนเกินและเซลล์ที่ไม่ได้ติดอยู่ออกก่อนที่จะนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล

2.3 การผลิตเอทานอลโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ โดยวิธีออกแบบการทดลองแบบ Box-Benhken design

วิธีออกแบบการทดลองแบบ Box-Benhken design โดยใช้โปรแกรม Design-Expert 7.0 Demo version (STATEASE Inc., Minneapolis, USA) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล สำหรับปัจจัยที่ใช้ในการวางแผนการทดลองมี 3 ปัจจัย ประกอบด้วย ปริมาณเซลล์ตรึง 5, 10 และ 15% (w/v) ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 180, 240 และ 300 g/L และปริมาณกากเซลล์ยีสต์ 4 8 และ 12 g/L ซึ่งแผนการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แผนการทดลองโดยวิธีการทดลองแบบ Box-Benhken design

Run	A: Cell % (w/v)	B: Sugar (g/L)	C: Dried cell yeast (g/L)
1	15.00	240.00	4.00
2	10.00	240.00	8.00
3	10.00	240.00	8.00
4	5.00	180.00	8.00
5	5.00	300.00	8.00
6	15.00	300.00	8.00
7	10.00	300.00	12.00
8	5.00	240.00	4.00
9	5.00	240.00	12.00
10	15.00	240.00	12.00
11	10.00	180.00	4.00
12	10.00	240.00	8.00
13	10.00	180.00	12.00
14	10.00	240.00	8.00
15	15.00	180.00	8.00
16	10.00	300.00	4.00
17	10.00	240.00	8.00

เตรียมอาหารสูตรผลิตเอทานอลที่มีน้ำข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น

180, 240 และ 300 g/L จากนั้นบรรจุอาหารในปริมาตร 150 mL ลงในฟลากส์ขนาด 250 mL ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 ºC เป็นเวลา 28 min ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมเซลล์ตรึงรูปลงไปประมาณ 5, 10 และ 15 % (w/v) ปิดฟลาสก์ด้วย Air lock ที่นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิ 30 ºC ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 h เป็นเวลา 84 h ตามตารางแผนการทดลองโดยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Benhken design นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอลในแต่ละสภาวะของการเพาะเลี้ยง

2.4 การผลิตเอทานอลในการหมักแบบกะซ้ำจากน้ำข้าวฟ่างหวานโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจีเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ

บรรจุอาหารสูตรผลิตเอทานอลที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน (EP medium) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการหมักแบบกะ ปริมาตร 150 mL ลงในฟลากส์ขนาด 250 mL ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 ºC เป็นเวลา 28 min ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมเซลล์ตรึงรูปปริมาณ 5 % (w/v) นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิ 30 ºC ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักเป็นเวลาทุก 12 h เป็นเวลา 84 h เมื่อการหมักสิ้นสุด ถ่ายน้ำหมักออก ทำการล้างเซลล์ตรึงรูปโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอดไรด์ 0.85 % (w/v) ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นถ่ายเซลล์ตรึงรูปปริมาณ 5% (w/v) ทำการหมักในกะต่อไป จนครบจำนวน 4 กะ และนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด และความเข้มข้นเอทานอล

2.5 วิธีการวิเคราะห์

วิธีการหาจำนวนเซลล์ของยีสต์ที่มีชีวิตโดยวิธีการนับโดยตรงโดยใช้ Hemacytometer และย้อมด้วยเมทิลีนบลูสำหรับเซลล์ตรึง นำเซลล์ตรึง 10 กรัม นำมาละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต 0.05 M ตามที่อธิบายโดย Bangrak et al. [13] การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้การย้อมด้วยเมทิลีนบลูตามที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ การวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอล โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography) GC-2014 บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น ก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซพาหะ อุณหภูมิตำแหน่งที่ฉีดสาร (Injector) 150 ºC คอลัมน์ (Column): Rtx-Wax ของบริษัท Restex ความยาว 30 m ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 mm อุณหภูมิของตัวตรวจวัด (Detector) 180 ºC สถาวะในการวิเคราะห์ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 ºC เป็นเวลา 1 min หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 ºC/min จนถึงอุณหภูมิ 70 ºC

3. ผลการทดลอง

3.1 การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจีเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 2) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 180 g/L สามารถผลิตเอทานอลได้อยู่ในช่วง 48.00 - 62.00 g/L และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 240 g/L พบว่า สามารถผลิตเอทานอลอยู่ในช่วง 50.80–74.58 g/L เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงขึ้นเป็น 300 g/L พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้อยู่ในช่วง 59.38-80.90 g/L จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลมีผลต่อความเข้มข้นของเอทานอล โดยพบว่าเมื่อน้ำตาลเริ่มต้นสูงขึ้น ความเข้มข้นของเอทานอลก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตาม สอดคล้องกับรายงานของ Laopaiboon et al. [20] พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 18°Bx เป็น 24°Bx ทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 73.57 g/L เป็น 100.37 g/L เนื่องจากเป็นการเพิ่มซับเสรตในการเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล

เมื่อพิจารณาผลของปริมาณกากเซลล์ยีสต์ พบว่าปริมาณกากเซลล์ยีสต์ 4 g/L สามารถผลิตเอทานอลได้อยู่ในช่วง 52.34- 72.30 g/L และเมื่อเพิ่มปริมาณกากเซลล์ยีสต์เป็น 8 g/L พบว่า สามารถผลิตเอทานอลอยู่ในช่วง 48.00–80.00 g/L เมื่อเพิ่มปริมาณกากเซลล์ยีสต์เป็น 12 g/L พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้อยู่ในช่วง 56.00-80.90 g/L จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณกากเซลล์ยีสต์มีผลต่อความเข้มข้นของเอทานอล โดยพบว่าเมื่อปริมาณกากเซลล์ยีสต์สูงขึ้น ความเข้มข้นของเอทานอลก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตาม อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาผลของปริมาณกากเซลล์ยีสต์ร่วมกับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น

จะให้สอดคล้องกัน คือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณกากเซลล์ยีสต์ สามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sridee et al. [21] การเติมกากเซลล์ยีสต์ สามารถเพิ่มการผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ

run	A: cell % (w/v)	B: sugar (g/ L)	C: Dried cell yeast (g/L)	D: Ethanol Conc. (g/L)
1	15.00	240.00	4.00	52.34
2	10.00	240.00	8.00	51.90
3	10.00	240.00	8.00	58.48
4	5.00	180.00	8.00	62.00
5	5.00	300.00	8.00	80.00
6	15.00	300.00	8.00	59.38
7	10.00	300.00	12.00	80.90
8	5.00	240.00	4.00	68.96
9	5.00	240.00	12.00	63.40
10	15.00	240.00	12.00	74.58
11	10.00	180.00	4.00	60.28
12	10.00	240.00	8.00	50.80
13	10.00	180.00	12.00	56.00
14	10.00	240.00	8.00	63.84
15	15.00	180.00	8.00	48.00
16	10.00	300.00	4.00	72.30
17	10.00	240.00	8.00	58.00

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสามารถนำค่าสัมประสิทธิ์พารามิเตอร์แต่ละสภาวะการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญนำมาสร้างสมการเพื่อใช้ในการพยากรณ์ความเข้มข้นของเอทานอล (ตารางที่ 3) จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล ต่อปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล มี 3 ปัจจัย ซึ่งได้แก่ ปริมาณเซลล์ตรึง (%) น้ำตาลเริ่มต้น (g/L) ปริมาณกากเซลล์ยีสต์ (g/L) จากสภาวะการผลิตที่แตกต่างกันได้ และค่าสัมประสิทธิ์การหาค่าสัมประสิทธิ์ค่อนข้างสูง (R^2) ของการถดถอยของแบบจำลองข้างต้น (0.9545) บ่งชี้ว่า 95.45% ของความเข้มข้นของเอทานอลสามารถอธิบายได้ด้วยแบบจำลองที่สร้างขึ้น

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเอทานอล ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตเสริมด้วยแรงในใยบวบ

	Sum of Square	df	Mean Square	F value	P value Prob>F
Model	2982.40	9	331.38	3.73	0.0484
A-inoculum	187.70	1	187.70	2.11	0.1896
B-sugar conc.	1052.26	1	1052.2	11.83	0.0108
C-DSY	941.78	1	941.78	10.59	0.0140
AB	7.29	1	7.29	0.082	0.7829
AC	40.64	1	40.64	0.46	0.5207
BC	5.88	1	5.88	0.066	0.8044
A^2	45.56	1	45.56	0.51	0.4973
B^2	704.54	1	704.54	7.92	0.0260
C^2	22.80	1	22.80	0.26	0.6281
Residual	622.40	7	88.91		
Pure Error	100.50	4	25.13		
Cor Total	3604.80	16			

$$Y= +56.60-5.01A + 8.29B + 2.63C - 1.66AB +6.95AC +3.22BC +1.60A^2 + 4.15B^2 + 6.62C^2 \quad (1)$$

เมื่อ Y = ความเข้มข้นของเอทานอล g/L

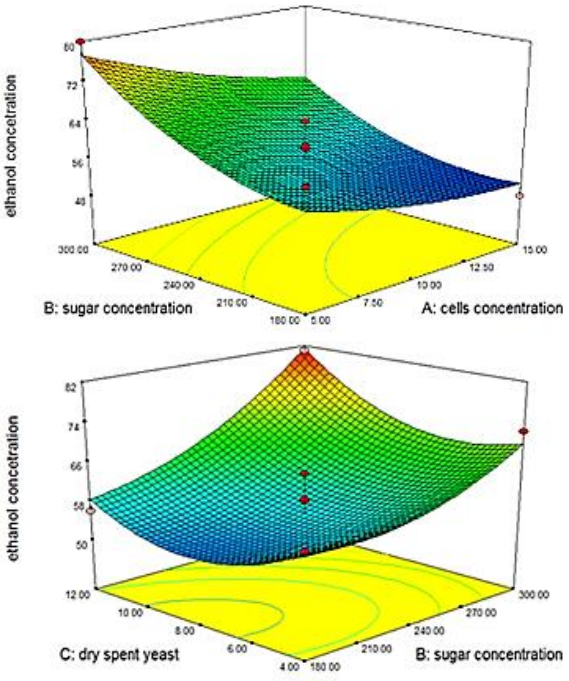
A = ปริมาณเซลล์ตรึง (%)

B = น้ำตาลเริ่มต้น (g/L)

C = ปริมาณกากเซลล์ยีสต์ (g/L)

ภาพสามมิติของพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงผลของพารามิเตอร์ต่างๆ ต่อปริมาณเอทานอล โดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ (รูปที่ 1) พบว่าปริมาณเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 280 g/L และปริมาณเซลล์ตรึง 5% (w/v) ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 72 g/L ในขณะที่ ปริมาณเซลล์

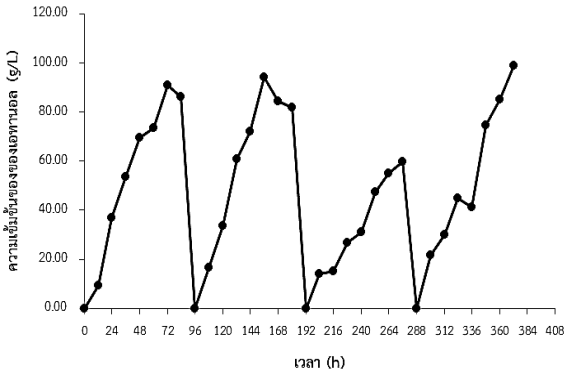
ตรึง และปริมาณกากเซลล์ยีสต์ ไม่มีผลต่อความเข้มข้นเอทานอล



รูปที่ 1 ภาพสามมิติของพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงผลของพารามิเตอร์ ต่อปริมาณเอทานอล โดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจีเนตเสริมแรงด้วยใยบวบ

3.2 การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตที่เสริมแรงด้วยใยบวบแบบกะซ้ำ

การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยการหมักแบบกะซ้ำจำนวน 4 รอบ โดยใช้เซลล์ตรึงของ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ผลของการผลิตเอทานอลแบบกะซ้ำโดยเซลล์ตรึงรูป แสดงในรูปที่ 2 โดยความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 280 g/L ผลการศึกษาพบว่า กะที่ 1 และ 2 สามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นของเอทานอล และอัตราผลผลิต เท่ากับ 86.06± 0.24 g/L อัตราการผลิต 1.02± 0.04 g/L.h และ 81.94±0.04 g/L อัตราการผลิต 0.97±0.04 g/L.h ตามลำดับ และกะที่ 4 ได้ความเข้มข้นของเอทานอล เท่ากับ 98.10± 2.02 g/L อัตราการผลิต 1.17± 0.02 g/L.h ในระยะเวลา การหมัก 84 h การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Ogbonna et al. [15] รายงานว่าเซลล์ที่ตรึงบนฟองน้ำใยบวบมีความเสถียรหลังจากการหมักกะซ้ำได้มากกว่า 35 รอบ และการผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่องมากกว่า 500 h โดยใช้ซูโครสหรือกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ



รูปที่ 2 ปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักเอทานอลแบบกะซ้ำ จำนวน 4 รอบ จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตที่เสริมแรงด้วยใยบวบ

ผลจากการวิเคราะห์การศึกษาการหมักเอทานอลแบบกะ และแบบกะซ้ำจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตที่เสริมแรงด้วยใยบวบ พบว่าในการหมักแบบกะ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 280 g/L ปริมาณเซลล์ตรึง 5% (w/v) สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 98.84± 2.02 g/L อัตราผลผลิต 1.17± 0.02 g/L.h ในขณะที่การหมักแบบกะซ้ำ พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ทั้งหมดจำนวน 4 รอบมีความแตกต่างกัน ซึ่งในการหมักกะที่ 1 สามารถผลิตเอทานอลเท่ากับ 86.06± 0.04 g/L อัตราผลผลิต 1.02± 0.02 g/L.h ระยะเวลาในการหมัก 84 h และในกะที่ 2 และ 3 ปริมาณเอทานอลมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงสุดในกะที่ 4 มีความเข้มข้นของเอทานอลคือ 98.84± 2.02 g/L อัตราผลผลิต 1.17± 0.02 g/L.h เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ Rattanapan et al. [22] ศึกษาการผลิตเอทานอลจากการตรึงเซลล์โดยใช้รังไหมเป็นตัวพยุง โดย *S. cerevisiae* M30 ในการหมักแบบกะได้เอทานอลสูงสุด 98.84 g/L ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 280 g/L ซึ่งสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ 11.5 % ในขณะที่การหมักแบบกึ่งกะ พบว่าเซลล์ตรึงยังคงมีความคงตัว เมื่อทำการหมักจำนวน 4 รอบ โดยได้เอทานอล 88.1–77.6 g/L ในการหมักแบบต่อเนื่องได้อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด 19.0 g/L.h ความเข้มข้น 52.8 g/L ที่อัตราการเจือจาง 0.36 h^{-1} แสดงให้เห็นชัดว่าการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตที่เสริมแรงด้วยใยบวบ สามารถผลิตเอทานอลได้ดีกับการใช้วัสดุตรึงเซลล์อื่นๆ

4. บทสรุป

การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยการตรึงเซลล์รูปบนอัลจีเนตเสริมด้วยแรงในใยบวบ การหมักแบบกะ สภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 280 g/L ต่อ ปริมาณเซลล์ตรึง 5% (w/v) สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 98.84± 0.02 g/L อัตราผลผลิตเอทานอล 1.17± 0.02 g/L.h ระยะเวลาในการหมัก 84 h และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยเซลล์ตรึงรูปบนอัลจิเนตเสริมด้วยแรงในใยบวบ ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะซ้ำ คือ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 280 (g/L) ปริมาณเซลล์ตรึง 5% (w/v) สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 98.84± 2.02 g/L และ 1.17 ± 0.02 g/L ตามลำดับ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจศิลป์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน สายพันธุ์ มข. 40 เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้เอทานอลจากโครงการวิจัยการผลิตเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนจากข้าวฟ่างหวาน

6. เอกสารอ้างอิง

[1] A.E. Farrell, R.J. Plevin, B.T. Turner, A.D. Jones, M. O'Hare and D.M. Kammen, "Ethanol can contribute to energy and environmental goals," *Science*, vol. 311, pp. 506–508, 2006.

[2] J. Hill, E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky and D. Tiffany, "Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels," *Proc Natl Acad Sci* USA. vol. 30, pp.11206–11210, 2006.

[3] J. Yan and Lin T, "Biofuels in Asia," *Appl Energy*, vol. 86, Vol. S1–S10, 2009.

[4] L. Laopaiboon, S. Nuanpeng, P. Srinophakun, P. Klanrit and P. Laopaiboon, "Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations," *Bioresour Technol*, vol. 18, pp. 4176–4182, 2009.

[5] S. Nuanpeng, S. Thanonkeo, M. Yamada and P. Thanonkeo, "Ethanol production from sweet sorghum juice at high temperature using a newly isolated thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU Y-53," *Energies*, vol. 9, pp. 253-273, 2016.

[6] S. Nuanpeng, L. Laopaiboon, P. Srinophakun, P. Klanrit, P. Jaisil and P. Laopaiboon, "Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: batch, repeated-batch and scale up fermentation," *Electron J Biotechnol*, vol. 14, pp.1–12, 2011.

[7] L. Wang, Z. Luo and A. Shahbazi, "Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (Sorghum bicolor) bagasse using response surface methodology," *Ind Crops Prod*., vol. 42, pp.280–291, 2013.

[8] F. Shen, Y. Zeng, S. Deng, and R. Liu, "Bioethanol production from sweet sorghum stalk juice with immobilized yeast," *Process Environ Sci*, vol. 11, pp.782–789, 2011.

[9] Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I.M. Banat, R. Marchant and A.A. Koutinas, "Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review," *Food Microbiol*, vol. 21, pp.377–397, 2004.

[10] G. Najafpour, H. Younesi and K.S.K. Ismail, "Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*," *Bioresour Technol*, vol. 92, pp. 251–260, 2004.

[11] M. Phisalaphong, R. Budiraharjo, P. Bangrak, J. Mongkolkajit, and S. Limtong, "Alginate-loofa as carrier matrix for ethanol production," *J Biosci Bioeng*, Vol. 104, pp. 214–217, 2007.

[12] F. Ghorbani, H. Younesi, A.E. Sari, G. Najafpour, "Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells

reactor by *Saccharomyces cerevisiae*," *Renew Energy*, vol. 36, pp. 503–509, 2011.

[13] P. Bangrak, S. Limtong and M. Phisalaphong, "Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carriers," *Braz J Microbiol*, vol. 42, pp.676–684, 2011.

[14] S. Behera, R.C. Mohanty and R.C. Ray, "Ethanol production from mahula (Madhuca latifolia L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffa cylindrica* L. sponge discs," *Appl Energy*, vol. 88, pp. 212–215, 2011.

[15] J.C. Ogbonna, Y.C. Liu, Y.K. Liu and H. Tanaka, "Loofa (Luffa cylindrica) sponge as a carrier for microbial cell immobilization," *J Ferment Bioeng*, vol. 78, pp. 437–442, 1994.

[16] I.O. Mazali and O.L. Alves, "Morphosynthesis: high fidelity inorganic replica of the fibrous network of loofa sponge (*Luffa cylindrical*)," *Ann Braz Acad Sci*, vol. 77, pp. 25–31, 2005.

[17] R. Ganguly, P. Dwivedi and R.P. Singh, "Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2 - 10," *Bioresour Technol*, vol. 98, pp. 1246–1251, 2007.

[18] J.C. Ogbonna, J. Mashima and H. Tanaka, "Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor," *Bioresour Technol*, vol. 76, pp. 1–8, 2001.

[19] A. Eiadpum, S. Limtong and M. Phisalaphong, "High-temperature ethanol fermentation by immobilized coculture of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*," *J Biosci Bioeng*, vol. 3, pp. 325–329, 2012.

[20] L. Laopaiboon, P. Thanonkeo, P, Jaisil and P. Laopaiboon, "Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*," *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 23, pp. 1497–1501, 2007.

[21] W. Sridee, L. Laopaiboon, P. Jaisil and· P. Laopaiboon, "The use of dried spent yeast as a low-cost nitrogen supplement in ethanol fermentation from sweet sorghum juice under very high gravity conditions," *Electron. J. Biotechnol*., vol. 14, 2011.

[22] A. Rattanapan, S. Limtong and M. Phisalaphong, "Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons," *Appl Energy*., vol. 88, pp. 4400–4404, 2012.