สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด

Optimal Condition for Ethanol Production by Two Strains of Microorganisms

โดย

อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
TP
248
.A5
ว3267
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 32380
วัน, เดือน, ปี 19 เม.ย. 2542

23 ต.ค. 2542

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการอยู่ร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ เชื้อรากับเชื้อยีสต์ โดยเชื้อราที่ใช้ในการศึกษา มี 3 ชนิด คือ *Rhizopus oryzae* ATTC 56536, *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 และ *Aspergillus awamori* Nakazawa เชื้อยีสต์มี 2 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATTC 26192 ต่อการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง จากการทดลองพบว่าการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยการตรึงเซลล์ในเจลแคลเซียมอัลจิเนต เป็นระบบที่ผลิตเอทานอลได้สูงสุด เป็นปริมาณ 59 กรัมต่อลิตร ในเวลา 36 ชั่วโมง โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 และแหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 1

Abstracts

Co-existing of 2 strains of microorganism for ethanol production from cassava strach was studied. Three types of mold (*Rhizopus* **oryzae** ATTC 56536, *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 and *Aspergillus awamori* Nakazawa) were co-existed with two types of yeast (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC and และ *Schizosaccharomyces pombe* ATTC 26192) in pairs and the ethanol yield was measured. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4098 and *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 were co-immobilized in calcium alginate gel, produced the highest ethanol production system with 59 g/l ethanol yield with the fermentation time of 36 hr using 2% cassava starch as carbon source and 1% yeast extract as nitrogen source.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้สำเร็จลุล่วงลงได้ ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้งบประมาณสนับสนุนโครงงานวิจัยงบประมาณประจำปี 2541 เรื่องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ได้จัดการ และอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ และธุรการระหว่างการทดลอง

ผู้วิจัย

สิงหาคม 2541

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม 3

รูปที่ 2 แสดงวิถีทางการผลิตเอทานอล 5

รูปที่ 3 แสดงการผลิตเอทานอลจากการอยู่ร่วมกันของยีสต์และเชื้อรา 9

รูปที่ 4 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ โดยระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 1 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ร้อยละ 0..5 16

รูปที่ 5 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ โดยระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 2 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ร้อยละ 0..5 17

รูปที่ 6 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ โดยระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 1 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ร้อยละ 1 17

รูปที่ 7 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ โดยระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 2 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ร้อยละ 1 18

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้
ในระบบเซลล์อิสระกับระบบตรึงเซลล์ 15
ตารางที่ 2 แสดงความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตเอทานอล 18
ตารางที่ 3 แสดงผลของความเร็วรอบที่มีต่อการผลิตเอทานอล 19

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่มาการวิจัย

เอทานอลเป็นสารที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งการใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ ไวน์ เป็นต้น หรือการใช้เป็นตัวทำละลายในการทำแลคเกอร์ สี น้ำหอม และสารปรุงแต่งต่างๆ และเนื่องจากประเทศไทศไทยเป็นประเทศที่เศรษฐกิจที่ขึ้นกับการเกษตรกรรม ซึ่งผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สำคัญ ที่สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ เช่น แป้งมันสำปะหลัง ซังข้าวโพด เป็นต้น เนื่องจากวัตถุดิบดังกล่าวเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย และมีราคาถูก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาระบบของการอยู่ร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ ยีสต์ กับเชื้อรา ในรูปของเซลล์อิสระ และในรูปของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อหาระบบที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อจุลินทรีย์หนึ่งสามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังให้เป็นกลูโคส เพื่อที่เชื้อจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง จะสามารถนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบระบบของการอยู่ร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด ในรูปของเซลล์อิสระ และในรูปของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อทั้งสอง เพื่อการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง
2. เพื่อศึกษาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมกับระบบ เพื่อการผลิตเอทานอล
3. เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน ทั้งในรูปของไนโตรเจนอินทรีย์ และไนโตรเจน อนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล
4. เพื่อศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล
5. เพื่อศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย มีราคาถูก และมีมากในท้องถิ่น จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดแทนการใช้น้ำตาล ซึ่งมีราคาที่แพงกว่า
2. สามารถเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณผลผลิตที่สูงกว่าแบบเก่าที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งเป็นการใช้เซลล์เพียงตัวเดียว เนื่องจากการตรึงเซลล์จะสามารถทำให้นำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ตรวจเอกสาร
2. การศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอทานอล
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล
4. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล
5. สรุปผลและจัดทำรายงาน

บทที่ 2

เอทานอลและการตรึงเซลล์เพื่อผลิตเอทานอล

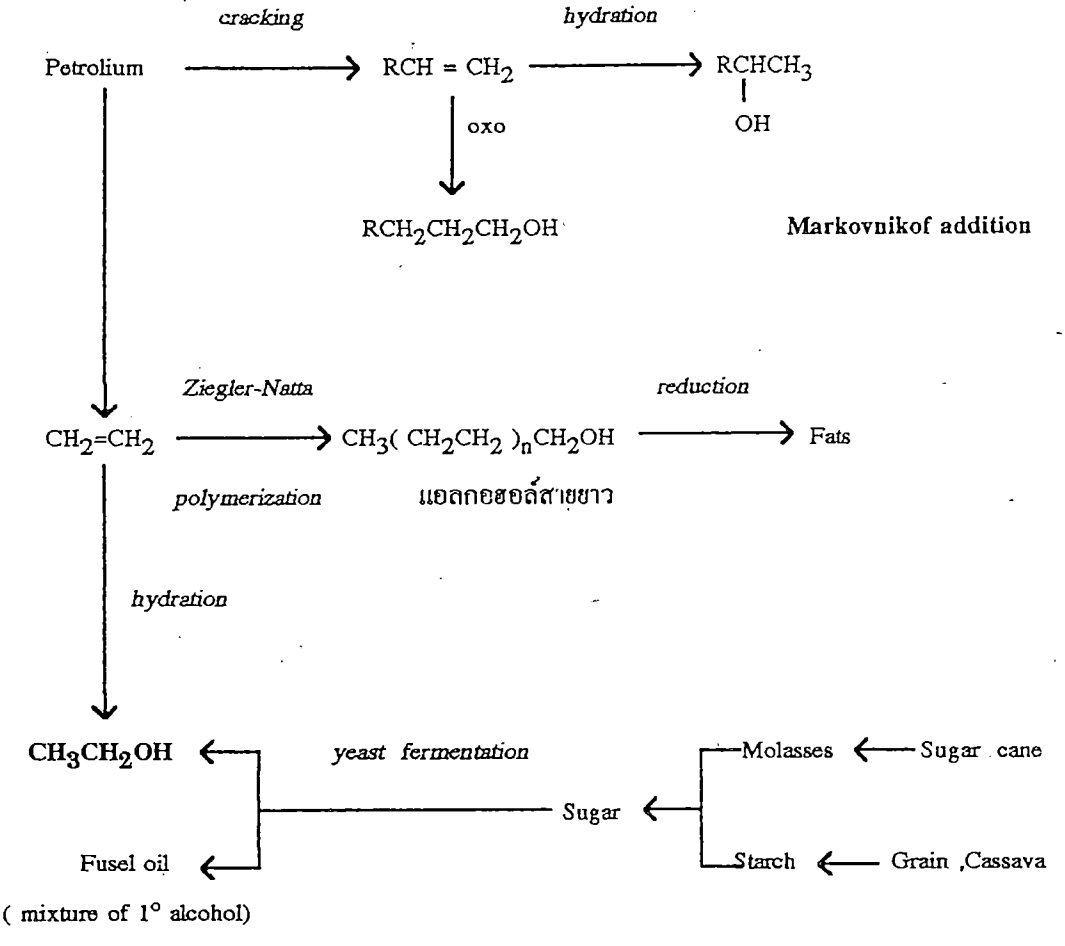
เอทานอลมีสูตรทางเคมี คือ CH_3CH_2OH ซึ่งเป็นคุณสมบัติต่างๆดังนี้ 1. จุดหลอมเหลว -115 องศาเซลเซียส

2. จุดเดือด 78.3 องศาเซลเซียส

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมสามารถ ทำได้ 3 ทาง

1. การไฮเดรชันสารพวกอัลคีน ซึ่งได้จากการเกิด cracking ของปิโตรเลียม
2. การออกซิเดชันที่เกิดจากอัลคีน
3. การหมักคาร์โบไฮเดรต

ซึ่งแผนภาพการผลิตเอทานอล โดยทั่วไปในระดับอุตสาหกรรม แสดงได้ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม

การใช้ประโยชน์จากเอทานอล

1. การใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทต่างๆ
2. การใช้เป็นตัวทำละลายต่างๆ ในอุตสาหกรรมการทำแลคเกอร์ น้ำมันวานิช สี น้ำหอม และสารปรุงแต่งต่างๆ
3. การใช้เป็นตัวกลางในปฏิกิริยาเคมีต่างๆ
4. การใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง

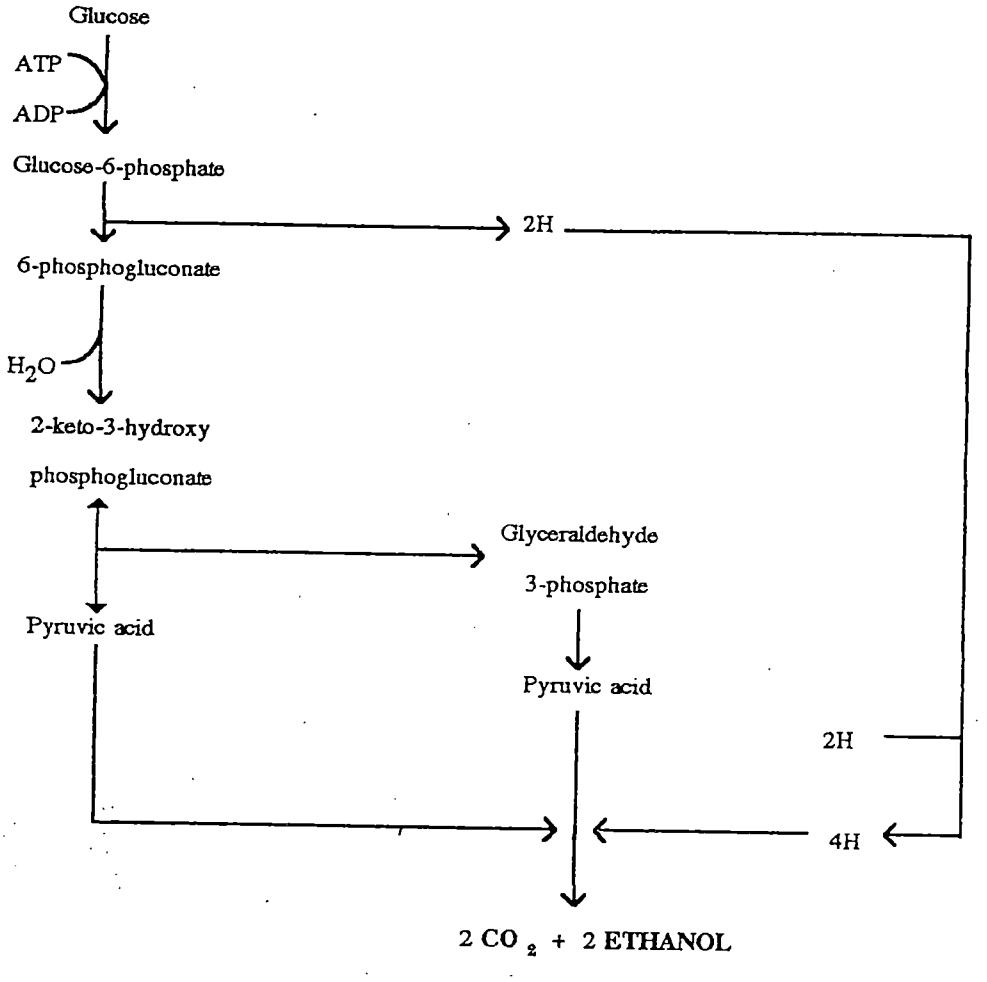
การผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นั้น จะเป็นการใช้ยีสต์เพื่อการผลิต โดยกลไกของการผลิตเอทานอลนั้น พบว่าในสภาพที่มีออกซิเจน ยีสต์จะใช้กลูโคสเพื่อสร้างพลังงาน ผลผลิตที่ได้ จะเป็น น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงาน ซึ่งอยู่ในรูปของ ATP และจะเรียกกระบวนการนี้ว่า การหายใจ ดังแสดงดังสมการที่ 1

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6H_2O + 6CO_2 + 38\ ATP \qquad \text{สมการที่ 1}$$

ส่วนในสภาพที่ไร้ออกซิเจน ยีสต์จะสามารถเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงาน ซึ่งอยู่ในรูปของ ATP แต่พลังงานที่ได้จะน้อยกว่าการหายใจมาก เพราะพลังงานส่วนใหญ่จะเก็บอยู่ในโมเลกุลของเอทานอล ซึ่งยีสต์ไม่สามารถนำพลังงานในส่วนนี้ไปใช้ได้ ปรากฏการณ์นี้ เรียกว่า การหมักเอทานอล ดังแสดงดังสมการที่ 2

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2\ ATP + 2\ CO_2 \qquad \text{สมการที่ 2}$$

จากสมการเคมี ที่แสดงการหายใจและการหมักเอทานอลข้างต้นนี้ เป็นเพียงการสรุปผลที่ได้มา ในรายละเอียดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้น แสดงได้ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงวิถีทางการผลิตเอทานอล

จากสมการที่แสดงปฏิกิริยาการหมักเอทานอลนั้น กลูโคส 1 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 2 โมเลกุล ซึ่งเมื่อคิดในแง่ของน้ำหมักแล้ว กลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอล 0.511 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดในทางทฤษฎี แต่ในการหมักโดยทั่วไปแล้ว จะพบว่าปริมาณของผลผลิตที่ได้นั้นจะมีค่าที่ไม่สูงไปกว่านี้ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อื่นๆ นอกเหนือจากเอทานอล เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนต และ ฟิวเซลออย เป็นต้น นอกจากนี้ ยีสต์ยังต้องการใช้กลูโคสในการสร้างเซลล์ และการสร้างพลังงาน เพื่อการดำรงชีวิตของเซลล์อีกด้วย ดดยทั่วไปแล้วยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรุคโตส กาแลกโตส และแมนโนส เป็นต้น ซึ่งเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวจำพวกเฮกเซน และยังใช้น้ำตาลเชิงซ้อนบางชนิด เช่น ซูโครส และแรฟฟีโนส แต่ส่วนใหญ่จะไม่ใช้น้ำตาลพวกเพนโตส เช่น ไซโลส ยกเว้นยีสต์บางชนิด เช่น Candida utilis และ Pachysolen tanrophilus สำหรับแป้งและเซลลูโลสนั้น ยีสต์ไม่สามารถใช้ได้โดยตรง เนื่องจากยีสต์ไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสารประกอบโมเลกุลใหญ่เหล่านี้ได้ ดังนั้นในการหมักเอทานอล โดยการใช้วัตถุดิบประเภทแป้ง และเซลลูโลส จะต้องมีการย่อยสารประกอบเหล่านี้ ให้เป็นน้ำตาลเสียก่อน เพื่อให้ยีสต์สามารถนำเอาไปใช้ได้ การเลือกใช้ชนิดของยีสต์เพื่อการผลิตเอทานอล มักขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้หมัก เช่น เอทานอลที่หมักจากแป้ง และน้ำตาล นิยมใช้ *Saccharomyces cerevisiae* รองลงมาจะเป็น *Saccharomyces elipsoideus* ถ้าเป็นวัตถุดิบจำพวกหางนม ที่แยกเอาโปรตีนออกแล้ว จะใช้ *Candida pseudotropicalis* และถ้าเป็นการใช้น้ำเสียจากโรงงานกระดาษ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้มักเป็น *Candida utilis*

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

1. ความเข้มข้นของน้ำตาล

กรณีที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมีมากกว่า ร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยปรกติในกระบวนการหมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 18 โดยปริมาตร เพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปได้โดยปกติ และให้เอทานอลในปริมาณที่สูงได้

2. ความเข้มข้นของเอทานอล

ปริมาณเอทานอลที่ผลิตมากขึ้น จะมีผลทำให้การหมักช้าลง และเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่า ร้อยละ 18 โดยปริมาตรต่อปริมาตรแล้ว จะมีผลต่อการหยุดการทำงานของยีสต์

3. คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน

คาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของยีสต์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายเอากาซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นแล้ว จะมีผลทำให้อัตราเร็วของการหมักที่เกิดขึ้นจะช้าลงหรือเกือบจะไม่เกิดขึ้น

4. ออกซิเจน

ออกซิเจนจะถูกใช้ไปในการเจริญเติบโต และการแตกหน่อในกระบวนการหายใจ เพื่อทำให้เกิดพลังงานในการดำเนินชีวิต ซึ่งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของยีสต์ในที่มีออกซิเจน จะไม่มีการผลิตเอทานอล แต่จะมีเพียงกาซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้นเท่านั้น

5. ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน

ความเป็นกรด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราบางชนิดได้ โดยทั่วไปยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วง พีเอช 3-5 ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการเจริญของยีสต์และอัตราการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลของสารเร่งการเจริญเติบโต ชนิดของโลหะ อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง เป็นต้น

ในส่วนของการตรึงเซลล์ สำหรับการผลิตเอทานอลนั้น มีได้ 3 ลักษณะ คือ วิธีการยึดติดกับพาหะ การเชื่อมโยงกับแบบไขว้ และวิธีกักเซลล์ ในที่นี้จะกล่าวแต่เฉพาะการตรึงเซลล์ โดยการใช้แคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งจัดเป็นการกักเซลล์ ที่อาศัยหลักการให้เซลล์เข้าไปอยู่ในชั้นของพอลิเมอร์ที่แข็ง ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญดังนี้

1. การผสมกันของสารละลายของเซลล์ และสารละลายพอลิเมอร์เข้าด้วยกัน
2. เม็ดเจลต้องมีลักษณะที่อ่อน ไม่มีส่วนที่เป็นพิษและเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้
3. เม็ดเจลจะต้องมีความคงตัวที่ดี
4. ขนาดของรูพรุนจะต้องมีขนาดใหญ่ เพื่อที่จะให้อาหารผ่านเข้าไป และผลผลิตออกมาได้ และยังต้องมีขนาดเล็กพอที่จะไม่ให้เซลล์สามารถหลุดลอดออกมาได้

อัลจิเนตเป็นพอลิแซคคาไรด์ พวกไกลคูโรแนนที่มีโครงสร้างที่เป็นร่างแห ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ประกอบด้วยส่วนของกรด D-mannuronic (M) และกรด L-gluronic (G) เชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4 ไกลโคไซด์ โดยที่โมโนวาเลนต์ของอัลจิเนต จะสามารถละลายน้ำได้ ในขณะที่พอลีวาเลนต์แคทอิออนของอัลจิเนต เช่น แคลเซียมอิออน จะทำให้เกิดการไขว้ประสานของพอลีเมอร์เกิดเป็นเจลที่ไม่ละลายน้ำ และไม่ว่องไวต่อ

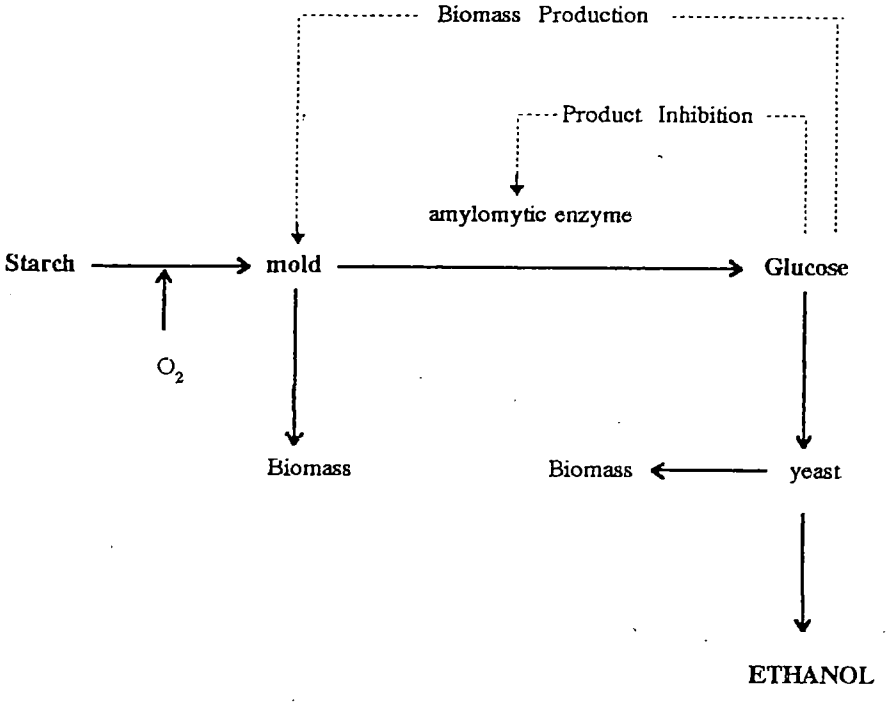
ปฏิกิริยาทางชีวเคมี และขนาดกับจำนวนรูที่มีในเม็ดเจลนั้น จะขึ้นอยู่กับชนิดของอิออนที่ใช้ และลักษณะตามธรรมชาติของอัลจิเนตที่ใช้ ในการทดลองนี้เป็นการตรึงยีสต์และเชื้อราด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งทั้งยีสต์และเชื้อรา จะมีขนาดที่ใหญ่กว่าขนาดของรูเจล ทำให้ถูกกักไว้ให้อยู่ภายในเจล แต่น้ำตาลและเอทานอลจะสามารถซึมผ่านเข้าออกได้ เนื่องจากมีขนาดที่เล็กกว่า การตรึงเซลล์จะทำได้โดยการหยดส่วนผสมของโซเดียมอัลจิเนตกับเซลล์แขวนลอยลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งสารที่ใช้จะมีราคาถูก ทำให้สามารถใช้ในปริมาณมากได้ คุณสมบัติในการแพร่ และขนาด จำนวนรูที่มีนั้น จะขึ้นกับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ถ้าความเข้มข้นต่ำ จะทำให้สารที่มีมวลโมเลกุลสูงผ่านได้ ซึ่งขึ้นกับชนิดของอัลจิเนตที่ใช้ด้วย ส่วนคุณสมบัติทางกลศาสตร์ของแคลเซียมอัลจิเนต คือ สามารถยืดหยุ่นได้ เนื่องจากขนาดและรูปร่างที่เป็นทรงกลมและสามารถใช้ความดันต่ำในการบรรจุใส่คอลัมน์ได้ ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ใช้กันมาก ทั้งเพื่อการผลิตเอทานอล (Kurosawa และคณะ,1988) การผลิตกรดแลกติก (Kurosawa และคณะ, 1988) การผลิตเพนนิซิลิน (Abdel-Halim และคณะ, 1988) เป็นต้น

ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำหลังนั้น จะประกอบไปด้วย

1. การย่อยสลายแป้ง เพื่อเปลี่ยนเป็นกลูโคส เป็นขั้นตอนที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์เหล่านี้ เช่น เชื้อรา ในกระบวนการดังกล่าวนี้จะเป็นกระบวนการที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจน

2. การหมักกลูโคสให้ได้เป็นเอทานอล โดยพบว่า กลูโคส 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ 2 โมเลกุล โดยอาศัยการทำงานของยีสต์ ซึ่งขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอนที่ไม่ต้องการออกซิเจน

สำหรับการตรึงเซลล์ร่วมของยีสต์กับเชื้อราในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อการผลิตเอทานอลนั้น พบว่า เชื้อราจะเจริญอยู่บริเวณผิวของเม็ดเจล อันเนื่องมาจากความต้องการออกซิเจนในการเจริญ และการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลกลูโคสนั้น ต้องอาศัยสภาวะที่มีอากาศ ส่วนยีสต์จะเจริญอยู่ในส่วนด้านในของเนื้อเจล อันเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลนั้น ต้องอาศัยสภาวะที่ไม่มีอากาศ แผนผังการผลิตเอทานอลจากการอยู่ร่วมกันของยีสต์และเชื้อรา แสดงได้ดังรูปที่ 2



รูปที่ 3 แสดงการผลิตเอทานอลจากการอยู่ร่วมกันของยีสต์และเชื้อรา

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์

หลอดทดลอง

บีกเกอร์

ขวดรูปชมพู่

แท่งแก้วคนสาร

ปิเปต

จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

กรวยแก้ว

ช้อนตักสาร

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ขวดแบน

หม้อนึ่งความดัน

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี

กล้องจุลทรรศน์

เครื่องเขย่า

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องชั่ง

เครื่องกวน

โถอบแห้ง

เครื่องอบความร้อน

สารเคมี

กรดซัลฟูริก

เอทานอล 99%

เมทานอล 99%

โซเดียมอัลจิเนต

แคลเซียมคลอไรด์

คอปเปอร์รีเอเจนต์

ทวีน 80

4. การศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอทานอล

การศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันของเซลล์จุลนทรีย์แบบอิสระ และแบบตรึงเซลล์ ที่มีต่อการผลิตเอทานอล โดยระบบของเซลล์ที่อยู่ร่วมกันที่ศึกษา มีดังนี้

S1A1 : *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Rhizopus oryzae* ATCC 56536

S1A2 : *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491

S1A3 : *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus awamori* Nakazawa

S2A1 : *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 26192 กับ *Rhizopus oryzae* ATCC 56536

S2A2 : *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 26192 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491

S2A3 : *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 26192 กับ *Aspergillus awamori* Nakazawa

ในกรณีของระบบตรึงเซลล์นั้น ดัดแปลงจากวิธีของ Tanaka และคณะ (1985) โดยการปิเปตสารละลายแขวนลอยของสปอร์ และเซลล์ยีสต์ ใส่ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 ผสมให้เข้ากัน แล้วใช้ปั๊มดูดสารละลายดังกล่าวผ่านสายยางที่มีปลายเข็มขนาด 0.8 x 38 มิลลิเมตร (sterile disposable terumo needle) ด้วยความเร็ว 125 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีการกวนอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลแข็งตัว โดยเม็ดเจลที่ได้ จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ล้างเม็ดเจลที่ได้ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และเก็บเม็ดเจลไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อการผลิตเอทานอล ประกอบด้วย พอลีเปปโตนร้อยละ 0.5 สารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.2 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 เฟอรัสซัลเฟตร้อยละ 0.001 แคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.2 และแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และพีเอช ทุกๆ 12 ชั่วโมง

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

5.1 การศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 4 คัดเลือกระบบที่เหมาะสมที่สุดในการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด ในระบบเซลล์อิสระและระบบเซลล์ตรึงรูป ในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง โดยการผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นร้อยละ 1 และร้อยละ 2

5.2 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 5.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ทั้งไนโตรเจนอินทรีย์ และไนโตรเจนอนินทรีย์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และร้อยละ 0.5 ตามลำดับ

แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง มี 3 แหล่ง คือ

แอมโมเนียมไนเตรต

แอมโมเนียมซัลเฟต

แอมโมเนียมซิเตรต

แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง มี 3 แหล่ง คือ

เปปโตน

สารสกัดจากยีสต์

ทริปโตน

5.3 การศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 5.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยการแปรผันความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ที่ 5 6 และ 7 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

5.4 การศึกษาความเร็วเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 5.3 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยการผันแปรความเร็วรอบที่ใช้ เป็น 150 250 และ 300 รอบต่อนาที เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

6. การวิเคราะห์

6.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi Nelson

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล จะประกอบด้วย คอลัมน์ประเภทแลกเปลี่ยนประจุบวก ION-300 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิลิตร ยาว 300 มิลลิเมตร) สารละลายตัวพาที่ใช้ คือ สารละลายกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้นเป็น 0.005 นอร์มัล โดยมีอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 70 องศาเซลเซียส ตรวจวัดปริมาณของเอทานอลภายหลังที่แยกผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลท ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และใช้ความไวของเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 0.02 AUFS

6.3 การวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง โดยการใช้พีเอชมิเตอร์

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในระบบเซลล์อิสระ กับระบบตรึงเซลล์ ในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

จากการเปรียบเทียบการอยู่ร่วมกันระหว่างยีสต์และเชื้อรา ในระบบเซลล์อิสระเพื่อการผลิตเอทานอล ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าในระบบเซลล์อิสระ (S1A2) เป็นระบบที่ให้ปริมาณเอทานอลได้ศสูงสุดเป็น 30 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง ในขณะที่ระบบตรึงเซลล์เป็นระบบที่ให้ปริมาณเอทานอลได้สูงสุด 42 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการถ่ายเทมวลสารที่เกิดขึ้นในเม็ดเจล จึงทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในระบบตรึงเซลล์ ใช้เวลาในการหมักที่ยาวนานกว่าในระบบเซลล์อิสระ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ ในระบบเซลล์อิสระกับระบบตรึงเซลล์

ระบบ	ปริมาณเอทานอลสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	
	ระบบเซลล์อิสระ*	ระบบตรึงเซลล์**
S1A1	17	14
S1A2	30	42
S1A3	19	17
S2A1	18	8
S2A2	23	23
S2A3	14	19

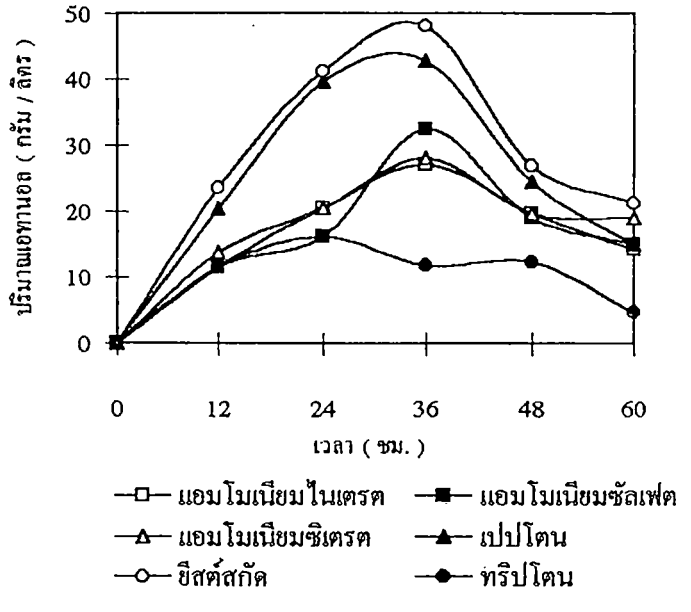
หมายเหตุ * ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง

** ชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง

4.2 การศึกษาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

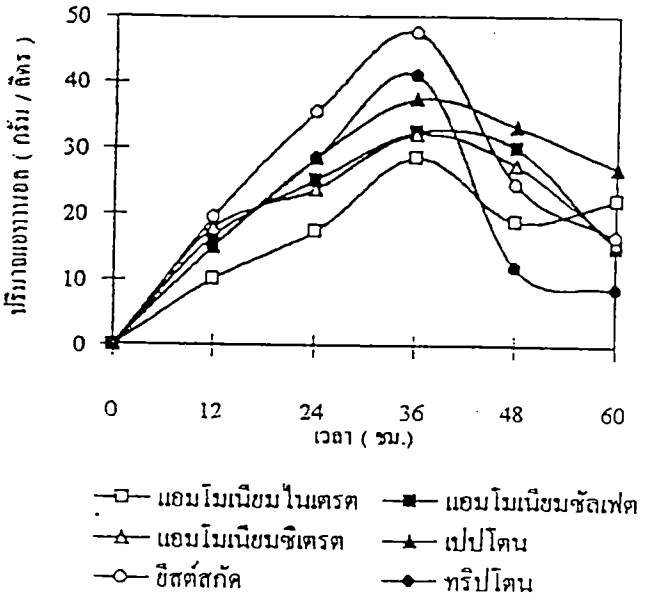
เมื่อนำระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 มาศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังและชนิดกับปริมาณของ แหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล โดยการวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล และผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็น ร้อยละ 1 และ ร้อยละ 2 กับผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้งไนโตรเจนอินทีรย์ และไนโตรเจนอนินทรีย์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 ถึงรูปที่ 7 พบว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล โดยระบบที่เหมาะสมดังกล่าวจะมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 และสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 ซึ่งระบบดังกล่าวนี้ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ 53 กรัมต่อลิตร ในเวลา 36 ชั่วโมงของการหมัก

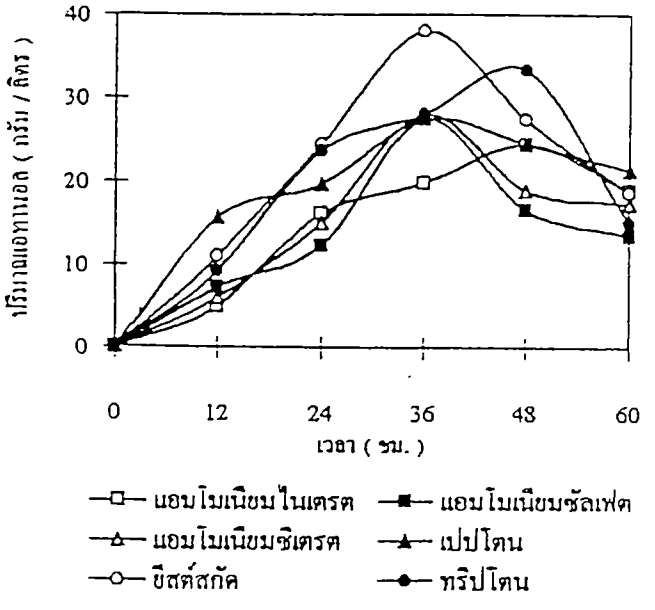


รูปที่ 1 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ โดยระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 1 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ร้อยละ 0..5

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

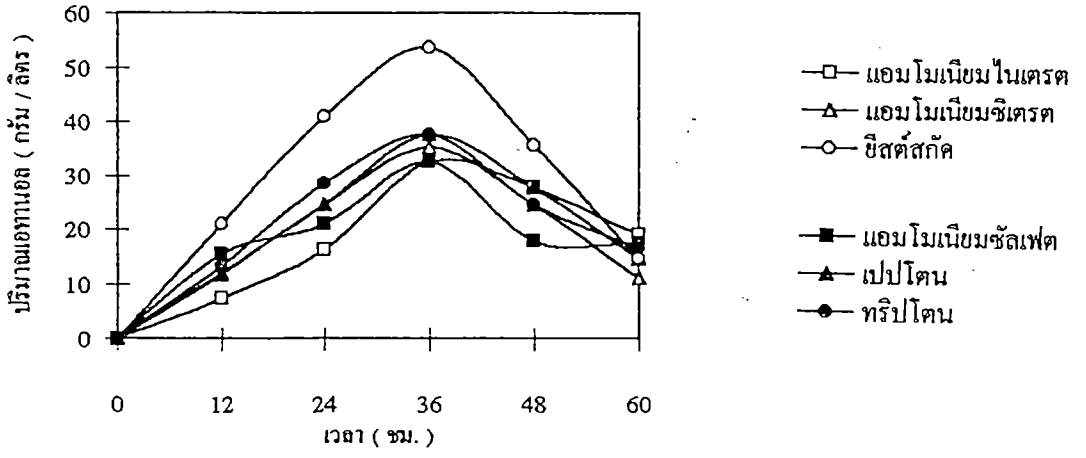


รูปที่ 5 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ โดยระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 2 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ร้อยละ 0..5



รูปที่ 6 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ โดยระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 1 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ร้อยละ 1.0

32380



รูปที่ 7 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ โดยระบบตรึงเซลล์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 40982 กับ *Aspergillus oryzae* ATCC 11491 โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 2 และปริมาณไนโตรเจนชนิดต่าง ร้อยละ 1.0

4.3. การศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

จากผลการปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่าเป็น 5 6 และ 7 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล จะเป็นสภาวะที่มีการปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้เป็น 6 โดยเชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ 56 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตเอทานอล

พีเอชเริ่มต้น	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
5	36	54
6	36	56
7	36	47

4.4 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

เมื่อผันแปรความเร็วรอบที่ใช้เป็น 150 250 และ 300 รอบต่อนาที จากผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 พบว่า ความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที เป็นความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล โดยปริมาณเอทานอลที่เชื้อผลิตได้เป็น 59 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 3 แสดงผลของความเร็วรอบที่มีต่อการผลิตเอทานอล

ความเร็ว (รอบต่อนาที)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
150	36	48
250	36	59
300	36	54

หมายเหตุ เวลา (ชั่วโมง) เป็นเวลาที่ผลิตเอทานอลได้สูงสุด

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ตลอดจนความเป็นกรดด่างเริ่มต้น และความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล โดยการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ 2 ชนิด จากผลการทดลองพบว่า การอยู่ร่วมกันของเชื้อ Saccharomyces cerevisiae ATCC 40982 และ Aspergillus oryzae ATCC 11491 ที่อยู่ร่วมกันในรูปของการตรึงเซลล์ในเจลแคลเซียมอัลจิเนต เป็นระบบที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าการอยู่ในระบบอิสระ และในระบบดังกล่าวเชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 59 กรัมต่อลิตร ในเวลา 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็น ร้อยละ 2 สารสกัดจากยีสต์เป็นร้อยละ 1 กับมีการปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ ให้เท่ากับ 6 และให้ความเร็วรอบที่ใช้เป็น 250 รอบต่อนาที

ในการปรับปรุงระบบที่ได้นี้ อาจทำโดยการนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ในการหมักในครั้งต่อไป ทั้งนี้เพื่อศึกษาความคงตัว และความสามารถของการผลิตเอทานอล หรือการนำมาใช้ในรูปของการหมักแบบต่อเนื่อง

ภาคผนวก

1. Yeast Malt Agar (YM)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย

กลูโคส	ร้อยละ 1.0
เปปโตน	ร้อยละ 0.5
สารสกัดจากยีสต์	ร้อยละ 0.3
มอลท์สกัด	ร้อยละ 0.3
อะการ์	ร้อยละ 1.5

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Preculture Medium

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเตรียมเซลล์ยีสต์ เพื่อนำไปตรึงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย

กลูโคส	ร้อยละ 2.0
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	ร้อยละ 0.8
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	ร้อยละ 0.4
แอมโมเนียมซัลเฟต	ร้อยละ 0.4
สารสกัดจากยีสต์	ร้อยละ 0.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Production Medium

เป็นอาหารที่ประกอบด้วย

พอลีเปปโตน	ร้อยละ 0.5
สารสกัดจากยีสต์	ร้อยละ 0.2
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	ร้อยละ 0.1
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	ร้อยละ 0.1
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	ร้อยละ 0.001
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	ร้อยละ 0.2
แป้งมันสำปะหลัง	ร้อยละ 2.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

บรรณานุกรม

Abdel-Halim M., El-Sayed M., and Rehm H.J . 1988 . Morphology of *Penicillium chrysogenum* Strains Immobilized in Calcium Alginate Beads and in Penicillin Fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24. 89-94.

Apiluktivongsa P., Yoshida T and Takuchi H. 1981. Conversion of Starch to Ethanol by Co-immobilized Yeast and Glucoamylase in Alginate Gel. **Annual Report of ICME.** 44, 287-299.

Aroma D.K., Mukerji K.G. and Marth E. H. 1991. Handbook of Applied Micrology. Vol 3, Marcel Dekker Inc.

Bonner J and Varner J.E. 1965. Plant Chemistry, Academic Press.

Frazier W.C. and Westhoff D C. 1988. Food Microbiology, McGraw Hill Book Company.

Hideo T., Noboru N., and Hiroshi M. 1986 . Ethanol Production from Starch by a Co-immobilized Mixed Culture System of *Aspergillus awamori* and *Zymononas mobilis* . **Biotechnol. Bioeng.** 28, 1761-1768.

Hideo T., Matsumura M., and Veliky L.A. 1984 . Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-alginate Gel Beads, **Biotechnol. Bioeng.** 26, 53-58.

Kurosawa H., Ishikawa H., and Tanaka H. 1988 : L-Lactic acid Production from Starch by Co-immobilized Mixed Culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis.* **Biotechnol. Bioeng** .31, 183-187.

Kurosawa H., Ishikawa H., and Tanaka H. 1989 : Ethanol Production from Strach a Coimmobilized Mixed Culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus Saccharomyces cerevisiae* . **Biotechnol. Bioeng** .33, 716-723.

Moo-Young, M., Lamptey, J., and Robinson, C.W.1980 : Immobilization of Yeast Cells on Various Supports for Ethanol Production . **Biotechnol. Lett.** , no. 12, 541-548.

Sang-Wo L, Tomoharu E., Ying-Chun L, and Hideo T . 1993 .Co-immobilization of Three Strains of Microorganisms and Its Application Ethanol Production from Raw Starch Under Unsterile Condition. **J. Ferment. Bioeng,** no.1, 36-42.

Tanaka H., Kurosawa H., and Murakami H.H., 1986. Ethanol Production from by a Co-immobilized Mixed Culture System of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis* . **Biotechnol. Bioeng** . no 28, 1761-1768.