

การผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยโดยใช้เชื้อ

Clostridium acetobutylicum TISTR 1462

Ethanol production from sugarcane juice by *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462

นวกัทร นวกะคาม^{1,3*} ปรียา แก้วนารี^{1,2} เอมอร บัวศรี² และ วลัยยา มงคลสวัสดิ์^{1,3}

¹Renewable Energy Research Unit, UdonThani Rajabhat University, Thailand,

²Department of Biotechnology, Faculty of Technology, UdonThani Rajabhat University, Thailand

³Department of Biology, Faculty of Science, UdonThani Rajabhat University, Thailand

Email : navapatn_naja@hotmail.com*

บทคัดย่อ

บทความนี้ศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 จากน้ำอ้อยเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ซึ่งในการผลิตเอทานอลนี้มีอยู่หลายปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาล ค่าพีเอช และแหล่งไนโตรเจน ซึ่งปัจจัยดังกล่าวใช้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือ ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 6 °Brix ค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 5 และปริมาณ DAP 4 g/L หมักในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะได้เอทานอลสูงที่สุด 23.51 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 จากน้ำอ้อยสามารถผลิตเอทานอลได้

คำหลัก:

คลอสทริเดียม การผลิตเอทานอล น้ำอ้อย

Abstract

Sugarcane juice was used as substrate for ethanol production by *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462. *C. acetobutylicum* TISTR 1462 was studied on growth and ethanol production under anaerobic conditions. Various fermentation conditions (sugar concentration, initial pH and nitrogen) were evaluated for ethanol production. It was found that the optimum condition for producing ethanol was at sugar concentration 6°Brix, pH 5 and DAP 4 g/L for 72 h under anaerobic fermentation, giving the greatest amount of ethanol of 23.51 g/L. The results indicate that *C. acetobutylicum* TISTR 1462 can produce ethanol by sugarcane juice.



(Keywords:)

Clostridium, ethanol production, sugarcane juice

1. บทนำ

พลังงานถูกนำมาใช้เพื่อดำรงชีพของมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็นภายในบ้านพักอาศัย อาคาร ร้านค้า โรงงานรวมถึงการเดินทางล้วนแล้วใช้พลังงานทั้งสิ้น ยิ่งนานวันความต้องการพลังงานทวีมากขึ้น นั่นหมายถึงพลังงานจะถูกนำมาจากแหล่งต่างๆ เพื่อตอบสนองการใช้พลังงานทั้งพลังงานจากดวงอาทิตย์ และพลังงานจากภายในโลกซึ่งพลังงานทั้งหมดที่มีอยู่ถูกจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามแหล่งที่มา คือ พลังงานหมุนเวียน (Renewable energy) ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังน้ำ พลังงานคลื่น ในทะเลและพลังงานชีวมวล ส่วนพลังงานสิ้นเปลือง (Nonrenewable energy) ได้แก่ น้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ และพลังงานนิวเคลียร์ (แร่ยูเรเนียม)

[1] เมื่อใช้หมดแล้วไม่สามารถสร้างขึ้นมาใหม่หรือหามาทดแทนโดยธรรมชาติได้ทันความต้องการในเวลาอันรวดเร็ว ต้องใช้เวลานานกว่าร้อยล้านปีที่จะสร้างขึ้นมาอีกได้ และมีปริมาณจำกัด ในปัจจุบันมนุษย์จึงหันมาสนใจนำแหล่งพลังงานหมุนเวียนมาใช้ในกระบวนการผลิตชีวมวลมากขึ้น โดยเฉพาะแหล่งพลังงานชีวมวลที่มีปริมาณมาก และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวฟ่างหวาน และอ้อย โดยเฉพาะอ้อยเป็นวัตถุดิบที่ปลูกมากในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

[2] สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเอทานอลซึ่งเป็นพลังงานทดแทนสามารถใช้แทนน้ำมันเบนซินได้

[3] อ้อยเมื่อนำมาหีบจะได้ส่วนของน้ำอ้อยหลักๆ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยหลายเรื่องที่ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้กลุ่มของยีสต์ *Saccharomyces* sp. Min และคณะ [3] ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอลโดยใช้ *Clostridium acetobutylicum* IB4 ซึ่งควบคุม pH จาก 4.9-7.0 ได้ ABE สูงสุด 24.6 g/L ได้เอทานอล 17.7 g/L ที่ pH 5.5

สาวิตรีและคณะ [4] ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลที่สภาวะอุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยโดยใช้ *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 ใช้สูตรอาหารน้ำอ้อยที่มีการเติมเอทานอล 4% ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 40 องศาเซลเซียส ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด 6.78%(w/v)

[5] ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งจะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เชื้อใช้ pH และปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อนำผลที่ได้จากการทำวิจัยไปใช้ผลิตเอทานอลต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของน้ำตาล ค่าพีเอช และปริมาณไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอลของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462



3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ C. acetobutylicum TISTR 1462 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meat medium (CMM)

อ้อยสายพันธุ์ฟิล 6607 ปลูกในเขตพื้นที่อำเภอหนองแสง จังหวัดอุดรธานี อายุ 10-12 เดือน

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักเอทานอล

3.2.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

1. นำ C. acetobutylicum TISTR 1462 เลี้ยงในอาหาร Cooked Meat Medium (CMM) ปริมาตร 10 mL ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่ออาหาร CMM มีลักษณะขุ่นจึงนำไปเลี้ยงในอาหาร (TGY) ในข้อที่ 2.

2. เตรียมอาหาร Tryptone-Glucose-Yeast Extract (TGY) ปริมาตร 50 mL นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1. เติมน้ำในอาหาร TGY เลี้ยงในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.2.1.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล

1. เตรียมน้ำหมักปริมาตร 60 mL และปรับความเข้มข้นของน้ำตาลให้ได้ 5 ระดับ คือ 2 4 6 8 และ 10 °Brix

2. นำน้ำหมักที่เตรียมได้มาหมักโดยใช้ C. acetobutylicum TISTR 1462 ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 mL นำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และปริมาณเอทานอล (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2.1.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล

1. เตรียมน้ำหมักปริมาตร 60 mL และปรับ pH ให้ได้ 7 ระดับ คือ 4 4.5 5 5.5 6 6.5 และ 7 ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Ca (OH)₂) ความเข้มข้น 5 N

2. นำน้ำหมักที่เตรียมได้มาหมักโดยใช้ C. acetobutylicum TISTR 1462 ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 mL นำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และปริมาณเอทานอล (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2.1.4 การศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล

1. เลือกความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอลจากข้อ 3.2.1.2 pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1.3 และเติมแหล่งไนโตรเจนคือ Diammonium phosphate (DAP) เป็น 4 ระดับ 1 2 3 และ 4 g/L ใช้เตรียมน้ำหมักปริมาตร 60 mL

2. เติมน้ำจากข้อ 3.2.1.1 ลงในน้ำหมักที่เตรียมในข้อ 1) ปริมาตร 5 mL ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C

3. ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.3 การวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์ค่า pH [6]

1. การวัด pH

เปรียบเทียบมาตรฐานเครื่องพีเอชมิเตอร์ให้พร้อมก่อนจะวัดค่า pH ของสารละลายตัวอย่าง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์

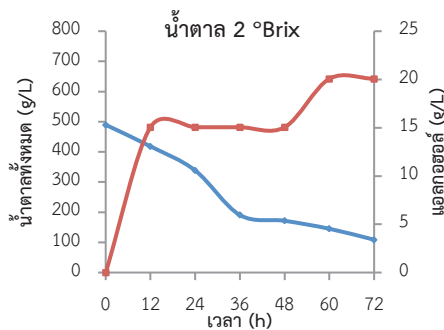


มาตรฐานที่ทราบค่าแน่นอน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่าง 50 mL วัดค่า pH

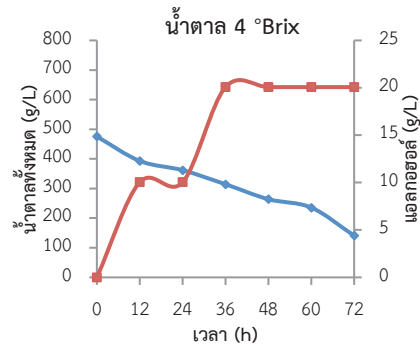
3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric total sugar [7] น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid [8]

3.3.3 วิเคราะห์ปริมาณ เอทานอล[8] ใช้เครื่อง GC ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น GC-2014 และ Auto sampler 8200 บริษัท Bara Scientific จากประเทศญี่ปุ่น มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm ความยาว 30 m และความหนาของสารเคลือบ 0.5 μm , ใช้ Detector ชนิดเฟฟไอดี (FID) ใช้อุณหภูมิ Column, Injector และ Detector 150 200 และ 240 $^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ ชีดสารละลายมาตรฐาน

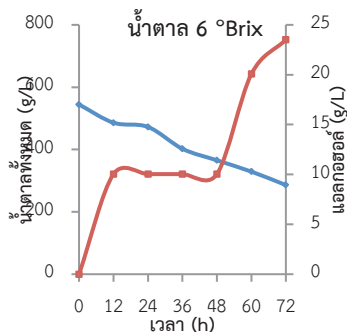
เอทานอลความเข้มข้น 0.1 0.2 0.30.4 และ 0.5 % ปริมาตร 1 μL เข้าเครื่อง GC โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150 $^{\circ}\text{C}$ คงอุณหภูมินี้ไว้ 3 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิจาก 150 $^{\circ}\text{C}$ ต่อมาที่จนถึง 200 $^{\circ}\text{C}$ คงอุณหภูมินี้ไว้ 5 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิจาก 200 $^{\circ}\text{C}$ ต่อมาที่ จนถึง 240 $^{\circ}\text{C}$ คงอุณหภูมินี้ไว้ 20 นาที ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 28 นาที สร้างเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเอทานอล จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่าง 1 μL เข้าเครื่อง GC ซึ่งใช้สภาวะเดียวกันกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณเอทานอลจากเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน แอลกอฮอล์ บันทึกผลการทดลอง



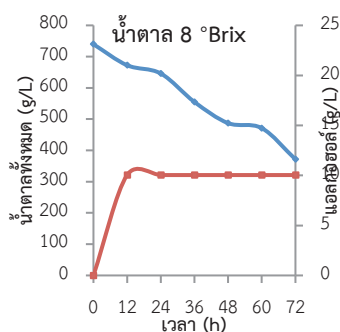
1.



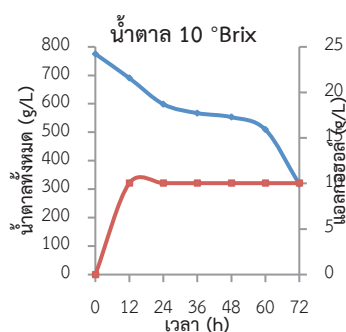
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

ภาพที่ 1 ผลการผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการเอทานอลจากน้ำตาล น้ำตาล (ก) 2°Brix , (ข) น้ำตาล 4°Brix , (ค) น้ำตาล 6°Brix ,(ง) น้ำตาล 8°Brix และ (จ) น้ำตาล 10°Brix;

◆ : น้ำตาล, ■ : เอทานอล



4. ผลและวิจารณ์ผล

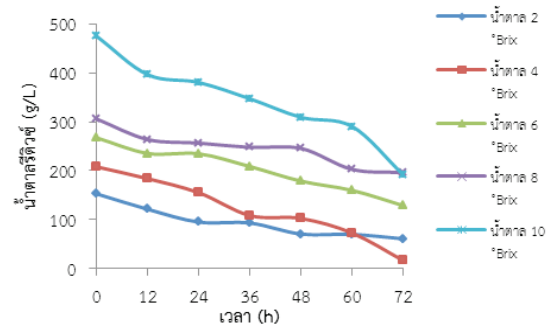
4.1 ผลการศึกษาหาปริมาณของน้ำตาลที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล

ผลศึกษาปริมาณของน้ำตาลในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 หมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 5 ระดับ คือ 2, 4, 6, 8 และ 10 °Brix เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า การผลิตเอทานอล การใช้น้ำตาลทั้งหมด และใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1 ภาพที่ 1 และ 2 จะเห็นว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ได้ปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 20.07 20.07 23.51 10.04 และ 10.04 g/L ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักเอทานอล ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล

samples	Ethanol(g/L)	h
น้ำตาล 2 °Brix	20.07	60
น้ำตาล 4 °Brix	20.07	36
น้ำตาล 6 °Brix	23.51	72
น้ำตาล 8 °Brix	10.04	12
น้ำตาล 10 °Brix	10.04	12

และที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 6 °Brix สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดคือ 23.51g/L ที่ 72 ชั่วโมง เมื่อติดตามการใช้น้ำตาลทั้งหมด พบว่าปริมาณน้ำตาลลดลงตามเวลาในกระบวนการหมัก และใช้น้ำตาลไป 380.92 334.77 258.46 368.00 และ 457.85 g/L ตามลำดับ จากเริ่มต้น 489.72 475.57 544.49 739.57 และ 775.26 g/L ตามลำดับ



ภาพที่ 2 ผลการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ปริมาณน้ำตาล 2 4 6 8 และ 10 °Brix ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อย

เมื่อติดตามการใช้น้ำตาลรีดิวซ์พบว่าใช้น้ำตาลไป 92.07 191.78 138.91 109.82 และ 283.64 g/L ตามลำดับ จากเริ่มต้น 152.62 207.82 267.27 305.82 และ 474.91 g/L ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการผลิตแอลกอฮอล์สามารถผลิตได้โดยใช้น้ำตาลจากน้ำอ้อยในกระบวนการหมัก จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณของน้ำตาลที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตแอลกอฮอล์

4.2 ผลการศึกษาหา pH ที่เหมาะสมในกระบวนการเอทานอล

ผลการศึกษา pH ในกระบวนการหมักเอทานอลในโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 6 °Brix และปรับ pH 7 ระดับ คือ 4 4.5 5 5.5 6 6.5 และ 7 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลการใช้น้ำตาลทั้งหมดและการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และติดตามเปลี่ยนแปลงเอทานอล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังภาพที่ 3 และ 4 เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณเอทานอลพบว่า เชื้อสามารถผลิตเอทานอล ได้ทุกสภาวะ pH ดังตารางที่ 2 คือ 14.11

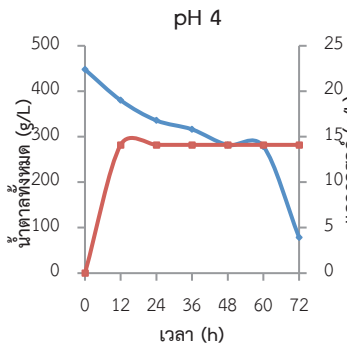


14.1123.51 20.07 20.07 20.07 และ 15.05g/L
ตามลำดับ

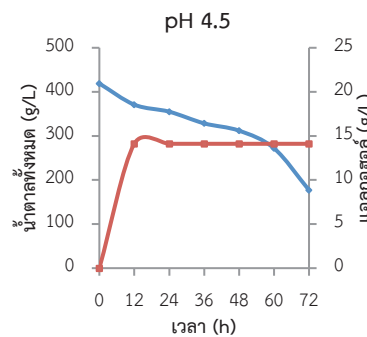
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักเอทานอล ที่ pH 7 ระดับ

sample	Ethanol(g/L)	h
pH 4	14.11	12
pH 4.5	14.11	12
pH 5	23.51	72
pH 5.5	20.07	48
pH 6	20.07	60
pH 6.5	20.07	36
pH 7	15.05	12

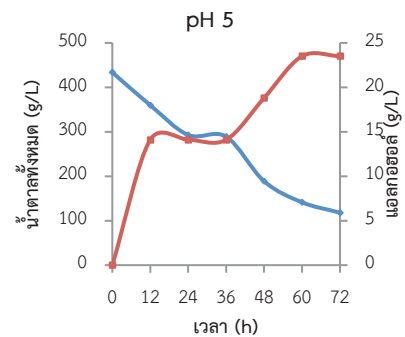
และพบว่าที่ pH 5 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 23.51 g/L เมื่อติดตามการใช้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าน้ำตาลถูกใช้ไป 369.23 241.85 315.69 121.23 206.77 204.31 และ 194.46 g/L ตามลำดับจากเริ่มต้น 447.88 418.95 85.82 154.18 149.09 109.09 94.55 85.82 และ 212.73 g/L ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าที่ pH 5 คือสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล



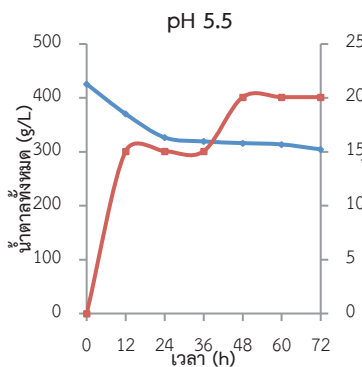
(ก)



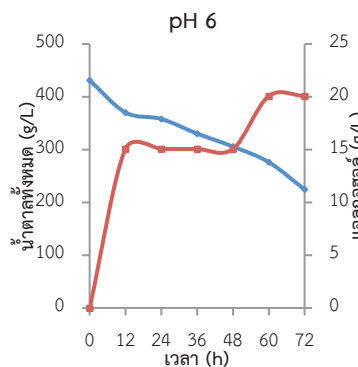
(ข)



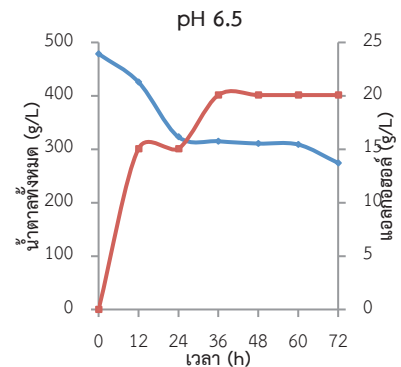
(ค)



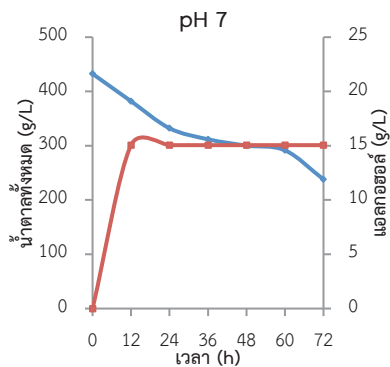
(ง)



(จ)



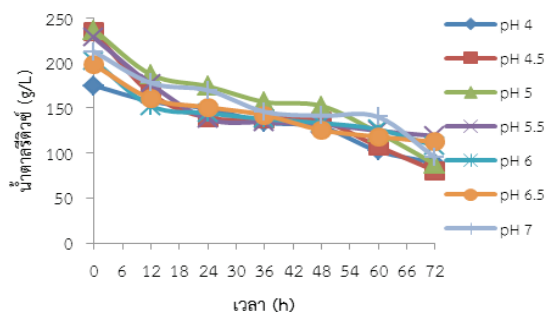
(ฉ)



(ข)

ภาพที่ 3 ผลการผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ใน กระบวนการเอทานอลจากน้ำอ้อย (ก) pH 4, (ข) pH 4.5, (ค) pH 5, (ง) pH 5.5, (จ) pH 6, (ฉ) pH 6.5 และ (ช) pH 7;

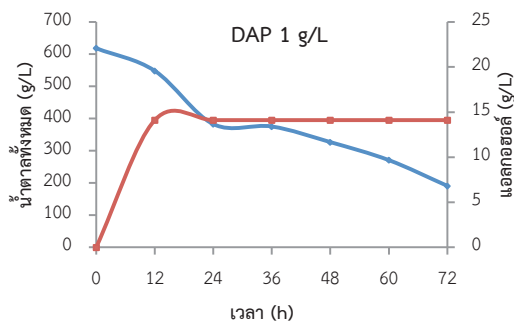
◆: น้ำตาล, ■: เอทานอล



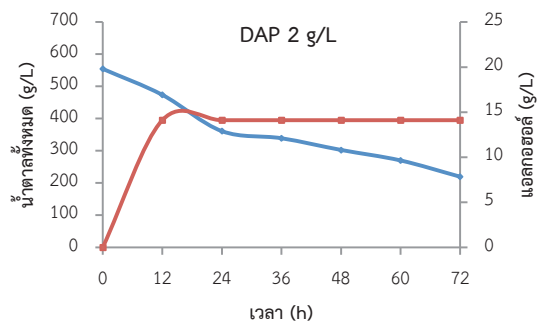
ภาพที่ 4 ผลการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ pH 4 4.5 5 5.5 6 6.5 และ 7 ใน กระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อย

4.3 ผลการศึกษาหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล

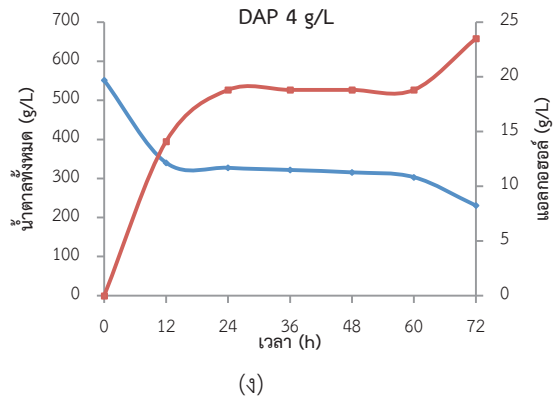
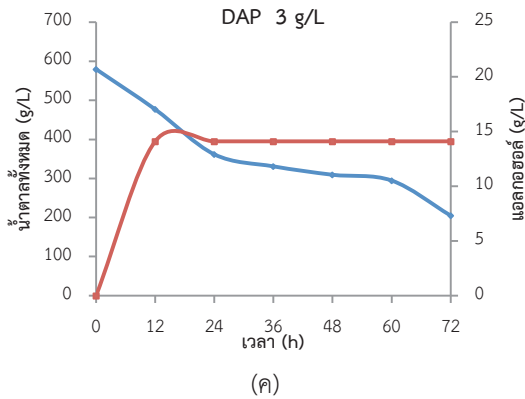
ผลศึกษาปริมาณไนโตรเจนในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ใน น้ำอ้อยที่มีค่าความหวาน 6 °Brix และค่า pH เท่ากับ 5 และปรับปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) 4 ระดับ คือ 1 2 3 และ



(ก)



(ข)

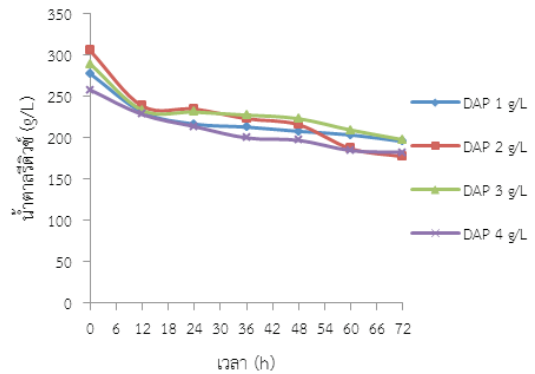


ภาพที่ 5 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการผลิต

ประมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน เท่ากับ 14.11 14.11 14.11 และ 23.51 g/L ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมด ดังภาพที่ 5 และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ ดังภาพที่ 6

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักเอทานอล ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน (DAP) 4 ระดับ

sample	Ethanol(g/L)	h
DAP 1 g/L	14.11	12
DAP 2 g/L	14.11	12
DAP 3 g/L	14.11	12
DAP 4 g/L	23.51	72



ภาพที่ 6 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ปริมาณ DAP 1 2 3 และ 4 g/L ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อย

ผลจากการศึกษานี้ได้นำไปใช้ในการผลิตเอทานอล โดยศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาล 6 ° Brix สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 23.51 g/L ที่ 72 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไป 138.91 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 267.27 g/L และน้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไป 258.46 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 544.49 g/L จากการศึกษาค่า pH พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ pH 5 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 23.51 g/L ที่ 72 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้

ไป 149.09 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 236.73 g/L และ น้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไป 315.69 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 433.72 g/L และศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนพบว่า การเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 4 g/L เชื้อสามารถ ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 23.51 g/L ที่ 72 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไป 75.64 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 258.18 g/L และน้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไป 320.62 g/L จากเริ่มต้น 551.26 g/L

เมื่อพิจารณางานวิจัยของ Wenyan และคณะ [9] ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากน้ำตาลซูโครสและ น้ำอ้อยโดยใช้ *C. acetobutylicum* JB200 ที่ทำให้ กลายพันธุ์ เพื่อสามารถผลิตบิวทานอลได้ 16.5 g/L อะซิโตน 8.1 g/L และเอทานอล 75.9 g/L ในเวลา 47 ชั่วโมง Mohamed และคณะ [10] ศึกษาการผลิต อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล โดยใช้อาหาร T6 โดย เชื้อสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* ATCC 824 สามารถ ผลิตบิวทานอลได้ 16.16 g/L อะซิโตน 7.4 g/L และ เอทานอล 0.51 g/L จะเห็นได้ว่าผลการวิจัยครั้งนี้ สามารถผลิตเอทานอลที่สภาวะที่เหมาะสมได้ 23.51 g/L ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับงานวิจัยทั้ง 2 ซึ่งในงานวิจัยการ ผลิตเอทานอลจาก *C. acetobutylicum* จะต้องพัฒนา ให้สามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้นเพื่อนำไปใช้ผลิต ในระดับขนาดใหญ่ต่อไป

5. สรุปผล

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล จากน้ำอ้อยโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการผลิตเอทานอลนี้ได้ศึกษาสภาวะ ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล คือ ความ เข้มข้นของน้ำตาล ค่า pH และปริมาณไนโตรเจน พบ

ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก คือ ที่ความเข้มข้น ของน้ำตาลเริ่มต้น 6 °Brix pH 5 และความเข้มข้นของ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 4 g/L *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด 23.51 g/L

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัย ราชภัฏอุดรธานี และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่ง ชาติ ที่สนับสนุนทุนวิจัยนี้ ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ กลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในความอนุเคราะห์ เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ

7. เอกสารอ้างอิง

- [1] สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน (2556) สถานการณ์พลังงานไทย กระทรวงพลังงาน.
- [2] Kaewnaree P. (2014) A two step sequential treatment of ethanol distillation bottom liquid by bacterial fermentation and subsequent *Chlorella vulgaris* culture under continuous illumination of various lights. *KKU Research Journal*. 19, pp.98-108.
- [3] Kaewnaree P. (2015) The effect of catalyst to increase hydrolysis yield of sugar from sugarcane bagasse. *International Journal of Biosciences*. 6, pp. 71-76.
- [4] Min J., Chen AY., He H., Wu X.P., Kong J.L., Liu C.Y., Yin W.F., Chen and Pan C. (2014). Enhanced acetone/butanol/ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH strategy. *Process Biochemistry*. 49, pp. 1238-1244.



[5] Savitree Limtong, Chutima Sringiew and Wichien Yongmanitchai (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*. 98, 3367-3374.

[6] สุรเดช ภูพันธ์. (2546). การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำในลำห้วยหลวงในเขตอำเภอสร้างคอม จังหวัดอุดรธานี. โปรแกรมวิชาเคมี คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

[7] พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และ อลิศรา ศรีวัฒนา. (2536). วิธีวิเคราะห์สำหรับงานปฏิบัติการในกระบวนวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. ขอนแก่น: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

[8] Miller G.L. (1959) "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.*, Vol. 31, pp. 426.

[9] Wenyan J., Jingbo Z., Zhongqiang W. and Shang-T.Y. (2014). Stable high-titer n-butanol production from sucrose and sugarcane juice by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in repeated batch fermentation. *Bioresource Technology* 163, pp. 172-179.

[10] Mohamed H.A, Abdel-Naser A.Z, Abdel-Wahab Elsadek.E and Shimaa Mohamed A. (2015). *Anaerobe* 32, pp.77-86.