

การผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยโดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462

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

นวกัทร นวกะคาม (Navapat Navakakam)^{1*}, *** ดร.ปรียา แก้วนารี (Dr.Preeya Kaewnaree)^{*,**}
เอมอร บัวศรี (Aimorn Buasri)^{**} วลัยยา มงคลสวัสดิ์ (Walaya Mongkolsawat)^{*,***}

บทคัดย่อ

น้ำอ้อยถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล โดย *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 โดยศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจนในการผลิตเอทานอล มีปัจจัยหลายปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาล ค่าพีเอช และแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสภาวะดังกล่าว จะใช้ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 6°Brix ค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 5 และปริมาณ DAP 4 g/L หมักในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้เอทานอลสูงที่สุด 23.51 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำอ้อยได้

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 sugar cane juice.

คำสำคัญ: คลอสทริเดียม การผลิตเอทานอล น้ำอ้อย

Keywords: Clostridium, Ethanol production, Sugarcane juice

¹Correspondent author: navapatn_naja@hotmail.com

*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หน่วยวิจัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

***ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

บทนำ

พลังงานถูกนำมาใช้เพื่อดำรงชีพของมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็นภายในบ้านพักอาศัยอาคาร ร้านค้า โรงงาน รวมถึงการเดินทางแล้วใช้พลังงานทั้งสิ้นยืงนานวัน ความต้องการพลังงานทวีมากขึ้น นั้นหมายถึงพลังงานจะถูกนำมาจากแหล่งต่างๆ เพื่อตอบสนองการใช้พลังงาน ทั้งพลังงานจากดวงอาทิตย์และพลังงานจากภายในโลก ซึ่งพลังงานทั้งหมดที่มีอยู่ถูกจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามแหล่งที่มาคือ พลังงานหมุนเวียน (Renewable energy) ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังน้ำ พลังงานคลื่นในทะเลและพลังงานชีวมวล ส่วนพลังงานสิ้นเปลือง (Nonrenewable energy) ได้แก่ น้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติและพลังงานนิวเคลียร์ (แร่ยูเรเนียม) [1] เมื่อใช้หมดแล้วไม่สามารถสร้างขึ้นใหม่หรือหามาทดแทนโดยธรรมชาติได้ทันความต้องการในเวลาอันรวดเร็ว ต้องใช้เวลานานกว่าร้อยล้านปีที่จะสร้างขึ้นมาอีกได้และมีปริมาณจำกัด ในปัจจุบันมนุษย์จึงหันมาสนใจแหล่งพลังงานหมุนเวียนนำมาใช้ในกระบวนการผลิตชีวพลังงานมากขึ้น โดยเฉพาะแหล่งพลังงานชีวมวลที่มีปริมาณมากและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวฟ่างหวาน และอ้อย โดยเฉพาะอ้อยเป็นวัตถุดิบที่ปลูกมากในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย [2] สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิต เอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานทดแทนสามารถใช้แทนน้ำมันเบนซินได้ [3] อ้อยเมื่อนำมาหีบจะได้อ้อยดิบซึ่งมีส่วนของน้ำอ้อยหลักๆ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ดังนั้นจึงมีงานวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้กลุ่มของยีสต์ *Saccharomyces* sp. [3] Min และคณะได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอลโดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* IB4 โดยควบคุม pH จาก 4.9-7.0 ได้ ABE สูงสุด 24.6 g/L ได้เอทานอล 17.7 g/L ที่ pH 5.5 [4] สามีตรีและคณะได้ศึกษาการผลิต เอทานอลที่สภาวะอุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยโดยใช้เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 ใช้สูตรอาหารน้ำอ้อย

ที่มีการเติมเอทานอล 4% ผลิต เอทานอลที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียสที่ 40 องศาเซลเซียสผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด 6.78% (w/v) [5] ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งจะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เชื้อใช้ pH และปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อนำผลที่ได้จากการทำวิจัยไปใช้ผลิตเอทานอลต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของน้ำตาล ค่าพีเอช และปริมาณไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอลของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462

วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meat medium (CMM)

อ้อยสายพันธุ์ฟิล 6607 ปลูกในเขตพื้นที่อำเภอหนองแสง จังหวัดอุดรธานี อายุ 10-12 เดือน

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักเอทานอล

2.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

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

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

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 ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 12 h เป็นเวลา 72 h เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 mL นำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และปริมาณเอทานอล (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

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 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ความเข้มข้น 5 N

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

2.1.4 การศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล

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

2. เติมหาล้าเชื้อจากข้อ 3.2.1.1 ลงในน้ำหมักที่เตรียมในข้อ 1) ปริมาตร 5 mL ในสถานะที่ไม่มีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C

3. ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 12 h เป็นเวลา 72 h เก็บตัวอย่างน้ำหมัก นำไป

วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

2.2 การวิเคราะห์

2.2.1 การวิเคราะห์ค่า pH [6]

การวัด pH เปรียบเทียบมาตรฐานเครื่อง พีเอชมิเตอร์ให้พร้อมก่อนจะวัดค่า pH ของสารละลายตัวอย่าง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่ทราบค่าแน่นอนจากนั้นนำสารละลายตัวอย่าง 50 mL วัดค่า pH

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

2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล [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 ชนิดเอฟไอดี (FID) ใช้อุณหภูมิ Column, Injector และ Detector 150 200 และ 240 °C ตามลำดับฉีดสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 % ปริมาตร 1 μL เข้าเครื่อง GC โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150 °C คงอุณหภูมินี้ไว้ 3 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิจาก 150 °C ต่อนาทีจนถึง 200 °C คงอุณหภูมินี้ไว้ 5 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิจาก 200 °C ต่อนาที จนถึง 240 °C คงอุณหภูมินี้ไว้ 20 นาที ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 28 นาที สร้างเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเอทานอล จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่าง 1 μL เข้าเครื่อง GC ซึ่งใช้สภาวะเดียวกันกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณเอทานอลจากเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์ บันทึกผลการทดลอง

ผลและวิจารณ์ผล

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 พบ พบว่า การผลิตเอทานอล การใช้น้ำตาลทั้งหมดและใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1 ภาพที่ 1 และ 2 จะเห็นว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถผลิต เอทานอลได้เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ได้ปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 20.07, 20.07, 25.09, 10.04 และ 10.04 g/L ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 6 °Brix สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดคือ 23.51g/L ที่ 72 ชั่วโมง เมื่อติดตามการใช้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าปริมาณน้ำตาลลดลงตามเวลาในกระบวนการหมักและใช้น้ำตาลไป 380.92, 334.77, 258.46, 368.00 และ 457.85 g/L ตามลำดับ จาก เริ่มต้น 489.72, 475.57, 544.49 739.57 และ 775.26 g/L ตามลำดับ

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

2. ผลการศึกษาหา pH ที่เหมาะสมในกระบวนการเอทานอล

ผลการศึกษา pH ในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 6°Brix และปรับ pH 7 ระดับ คือ 4, 4.5, 5, 5.5, 6 6.5 และ 7 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12h เป็นเวลา 72 h นำมาศึกษาประสิทธิภาพการผลิต

เอทานอลการใช้น้ำตาลทั้งหมดและการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และติดตามเปลี่ยนแปลงเอทานอล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังภาพที่ 3 และ 4 เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณเอทานอล พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอล ได้ทุกสภาวะ pH ดังตารางที่ 2 คือ 14.11, 14.11, 23.51, 20.07, 20.07, 20.07 และ 15.05g/L ตามลำดับและพบว่าที่ 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

3. ผลการศึกษาหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล

ผลศึกษาปริมาณไนโตรเจนในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในน้ำอ้อยที่มีค่าความหวาน 6°Brix และค่า pH เท่ากับ 5 และปรับปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) 4 ระดับ คือ 1, 2, 3 และ 4 g/L เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน เท่ากับ 14.11, 14.11, 14.11 และ 23.51g/L ตามลำดับดังตารางที่ 3 และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมด ดังภาพที่ 5 และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ ดังภาพที่ 6

จากการศึกษานี้ไปใช้ในการผลิตเอทานอล ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลพบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาล 6°Brix สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 23.51 g/L ที่ 72 h น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไป 138.91 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 267.27 g/L และน้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไป 258.46 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 544.49 g/L ศึกษาค่า pH พบว่า ค่าความเป็น

กรด-ด่างที่เหมาะสมคือ pH 5 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 23.51 g/L ที่ 72 h น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไป 149.09 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 236.73 g/L และน้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไป 315.69 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 433.72 g/L และศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 4 g/L เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 23.51 g/L ที่ 72 h น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไป 75.64 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น 258.18 g/L และน้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไป 320.62 g/L จากเริ่มต้น 551.26 g/L

เมื่อพิจารณางานวิจัยของ Wenyan และคณะ [9] ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากน้ำตาลซูโครสและน้ำอ้อยโดยใช้ *C.acetobutylicum* JB200 ที่ทำให้กลายพันธุ์ เชื้อสามารถผลิตบิวทานอลได้ 16.5 g/L อะซิโตน 8.1 g/L และเอทานอล 75.9 g/L ในเวลา 47 ชั่วโมง Mohamed และคณะ [10] ศึกษาการผลิตอะซิโตนบิวทานอลเอทานอล โดยใช้อาหาร T6 โดยเชื้อสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* ATCC 824 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 16.16 g/L อะซิโตน 7.4 g/L และเอทานอล 0.51 g/L จะเห็นได้ว่าผลการวิจัยครั้งนี้สามารถผลิตเอทานอลที่สภาวะที่เหมาะสมได้ 23.51 g/L ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับงานวิจัยทั้ง 2 ซึ่งในงานวิจัยการผลิตเอทานอลจาก *C. acetobutylicum* จะต้องพัฒนาให้สามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้นเพื่อนำไปใช้ผลิตในระดับขนาดใหญ่ต่อไป

สรุปผล

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการผลิตเอทานอลนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอลคือ ความเข้มข้นของน้ำตาล ค่า pH และปริมาณไนโตรเจน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก คือ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 6 °Brix pH 5 และความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 4 g/L *C. acetobutylicum*

TISTR 1462 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด 23.51 g/L

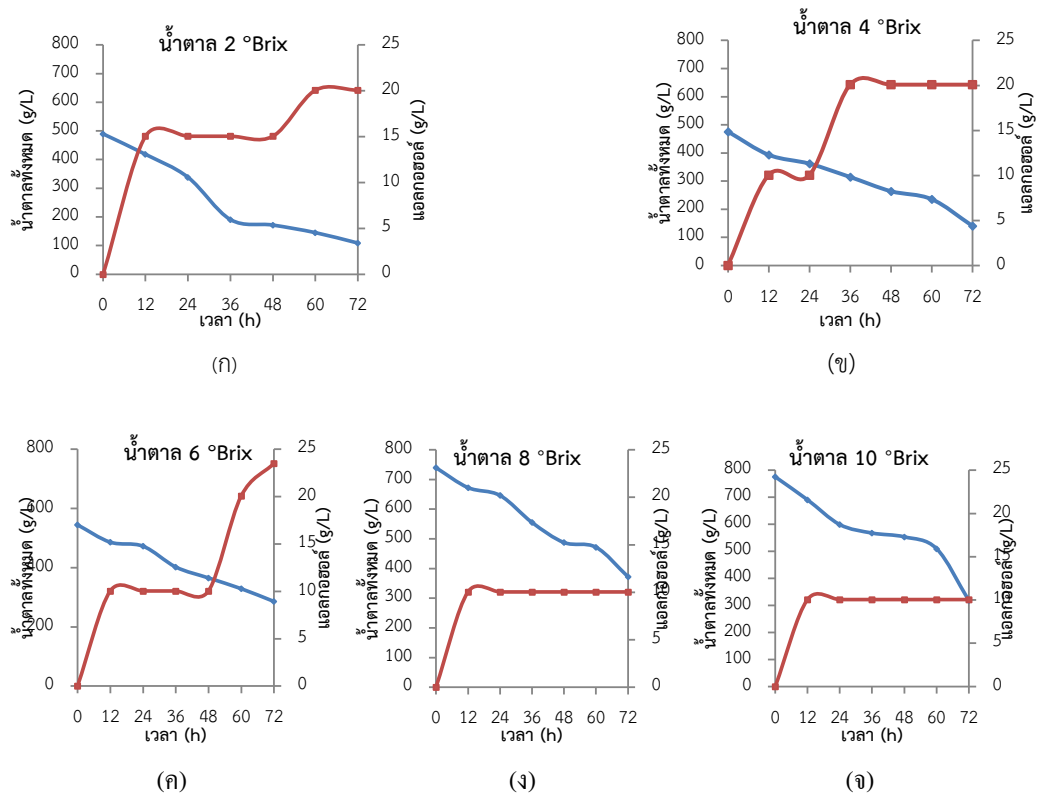
กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนวิจัยนี้ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในความอนุเคราะห์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. Energy Policy and Planning Office (EPPO). Energy Situation in Thailand. Bangkok: Ministry of Energy; 2013.
2. Kaewnaree P. 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*. 2014; 19: 98–108.
3. Kaewnaree P. The effect of catalyst to increase hydrolysis yield of sugar from sugarcane bagasse. *International Journal of Biosciences*. 2015; 6: 71–76.
4. Min Jiang, Jia-nan Chen, Ai-yong He, Hao Wu, Xiang-ping Kong, Jun-li Liu, Chun-yan Yin, Wu-fang Chen, Pan Enhanced acetone/butanol/ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH strategy. *Process Biochemistry*. Chen. 2014; 49: 1238–1244.
5. Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*. 2007; 98: 3367–3374.

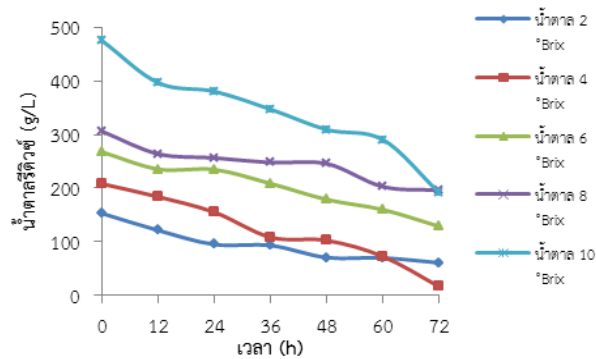
6. *Phupanna S.* Physical and Chemical Analysis of Water in Lum Huai Luang, Sang Khom District, Udon Thani Province. Udon Thani: Chemistry Program, Faculty of Education, Udon Thani Rajabhat University; 2003.
7. Laopaiboon P, Srivattana A. Analysis for the course in biotechnology. Khon Kaen: **Department of Biotechnology**, Faculty of Technology, Khon Kaen University; 1993.
8. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31: 426.
9. Wenyan Jang, Jingbo Zhao, Zhongqiang Wang, Shang-Tian Yang. Stable high-titer n-butanol production from sucrose and sugarcane juice by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in repeated batch fermentation. Bioresource Technology. 2014; 163, 172-179.
10. Mohamed HemidaAbd-Alla, Abdel-Naser Ahmed Zohri, Abdel-WahabElsadek El-Enany and Shimaa Mohamed Ali. Anaerobe. 2015; 32, 77-86.



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

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักเอทานอล ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 5 ระดับ

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



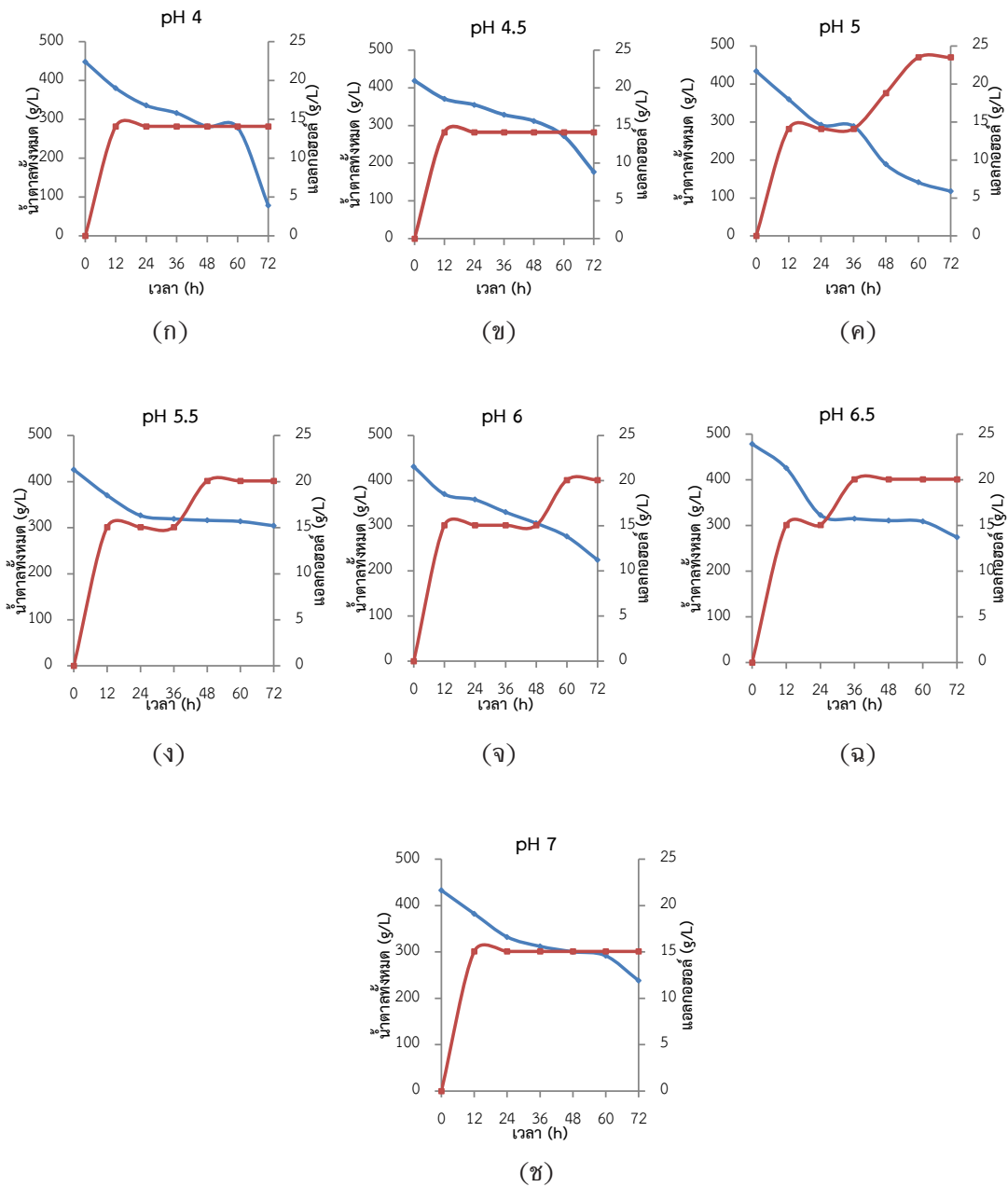
ภาพที่ 2 ผลการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ปริมาณน้ำตาล 2 4 6 8 และ 10 °Brix ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อย

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักเอทานอล ที่ pH 7 ระดับ

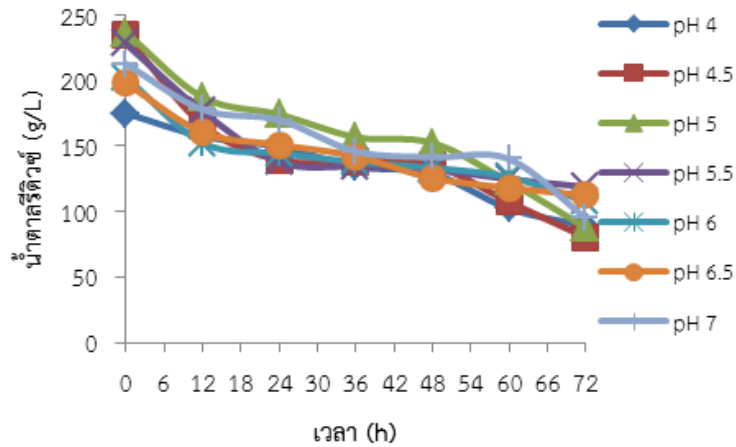
sample	Ethanol(g/L)	h
pH 4	14.11	12
pH 4.5	14.11	12
pH 5	23.51	72
pH 5.5	20.07	48
pH 6	20.07	60
pH 6.5	20.07	36
pH 7	15.05	12

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักเอทานอล ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน (DAP) 4 ระดับ

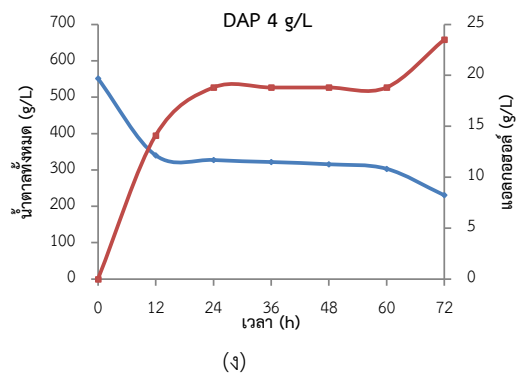
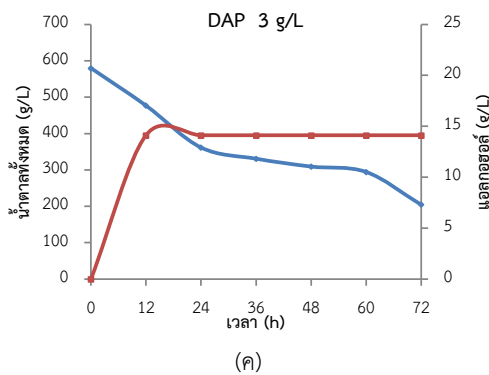
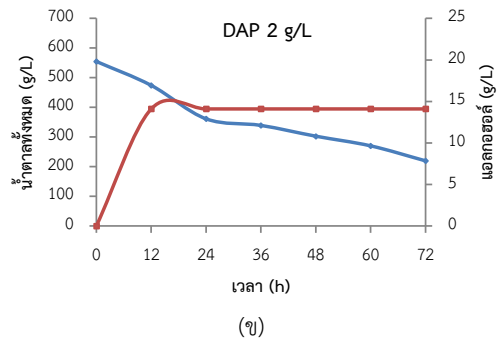
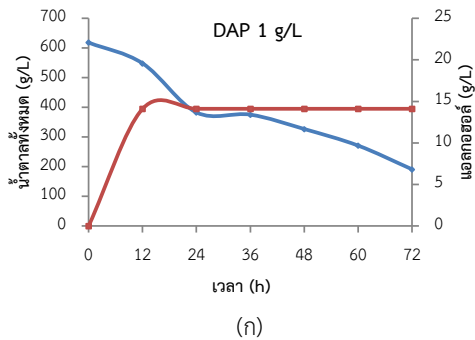
sample	Ethanol(g/L)	h
DAP 1 g/L	14.11	12
DAP 2 g/L	14.11	12
DAP 3 g/L	14.11	12
DAP 4 g/L	23.51	72



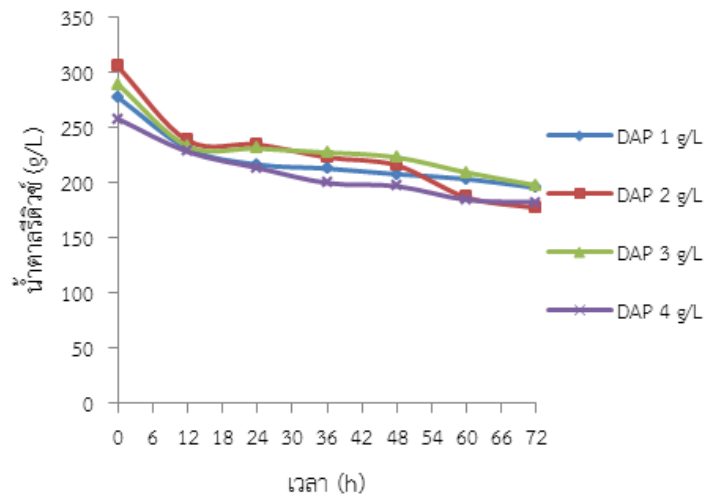
ภาพที่ 3 ผลการผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการเอทานอลจากน้ำอ้อย (ก) pH 4 (ข) pH 4.5 (ค) pH 5 (ง) pH 5.5 (จ) pH 6 (ฉ) pH 6.5 และ (ช) pH 7;
 ◆: น้ำตาล, ■: เอทานอล



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



ภาพที่ 5 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อย (ก) DAP 1 g/L (ข) DAP 2 g/L (ค) DAP 3 g/L และ (ง) DAP 4 g/L;
◆ : น้ำตาล : เอทานอล



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