สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟ โดย *Saccharomyces cerevisiae*

Optimization Conditions for Ethanol Production from Spent Coffee Ground by *Saccharomyces cerevisiae*

เบญจมาศ หนูแป้น[1] *และกนกรัตน์ ใสสอาด*[1*]

Benjamas Nupan[1] *and Kanokrat Saisa-ard*[1*]

รับบทความ 21 กันยายน 2566/ ปรับแก้ไข 14 พฤศจิกายน 2566/ ตอบรับบทความ 22 ธันวาคม 2566

Received: September 21, 2023/ Revised: November 14, 2023/ Accepted: December 22, 2023

บทคัดย่อ

กากกาแฟเป็นวัสดุเศษเหลือที่เกิดจากกระบวนการชงกาแฟผงด้วยน้ำร้อนหรือไอน้ำ โดยกากกาแฟส่วนใหญ่ถูกนำไปทิ้ง ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากกากกาแฟเป็นสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก จึงไม่สามารถปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมได้โดยตรง ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อลดกากของเสีย โดยนำกากกาแฟมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ทำการศึกษาวิธีการปรับสภาพกากกาแฟและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* จากการศึกษาพบว่ากากกาแฟมีองค์ประกอบของเซลลูโลสร้อยละ 41.78±4.66 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 28.02±3.38 ลิกนินร้อยละ 29.10±0.92 และเถ้าร้อยละ 1.10±0.01 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีความเหมาะสมในการเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ทำการปรับสภาพกากกาแฟด้วยวิธีการทางเคมีร่วมกับความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 13 ยูนิต ตามลำดับ พบว่าการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3.564±0.234 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ การใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยให้การผลิตเอทานอล อัตราการใช้สารตั้งต้นและอัตราการผลิตเท่ากับ 7.92±0.02 กรัมต่อลิตร 0.01±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.11±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นกากกาแฟสามารถนำมาใช้เป็นวัตุดิบทางเลือกในการผลิตพลังงานชีวภาพในอนาคตได้

คำสำคัญ : กากกาแฟ การปรับสภาพ ลิกโนเซลลูโลส เอทานอล *Saccharomyces cerevisiae*

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

*Corresponding author, E-mail: kanokrat.sai@sru.ac.th

Abstract

Spent coffee ground (SCG) is the solid residue obtained from brewing coffee powder with hot water or steam. SCG are usually disposed, cause an impact on the environment. Because of SCG is an organic matter which contains large amount of carbon, cannot discharged directly into the environment. Therefore, the objectives of this research are reduced solid waste. SCG was used as substrate for ethanol production. The pretreatment method of SCG and the optimization for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* were evaluated. The composition of SCG consists of cellulose 41.78±4.66 % w/w, hemicellulose 28.02±3.38 % w/w, lignin 29.01±0.92 % w/w and ash 1.10±0.01 % w/w, showed that SCG is suitable as substrate for ethanol production. SCG was pretreated by heat-chemical and hydrolyzed by 13 units cellulase enzyme, respectively. The results showed 1 % (v/v) H_2SO_4 for 30 min at 90 °C and hydrolyzed by cellulase which gave 3.564±0.234 g/L reducing sugar. After that the pretreated SGC was used as substrate for ethanol production by *S. cerevisiae.* The optimum conditions of ethanol production were 5 g/L ammonium phosphate as nitrogen source, at 28 °C, and 150 rpm for 72 h that gave the highest ethanol production, substrate consumption rate and ethanol yield were 7.92±0.02 g/L, 0.01±0.001 g/L/h and 0.11±0.001 g/L/h, respectively. Therefore, SCG can be uses as alternative material for bio-energy production in the future.

Keywords : Spent coffee ground, Pretreatment, Lignocellulose, Ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*

บทนำ

ปัจจุบันกาแฟเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ได้รับความนิยมในการบริโภคเป็นจำนวนมาก สังเกตได้จากอุตสาหกรรมเกี่ยวกับกาแฟที่มีการพัฒนาและเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทั้งในรูปแบบกาแฟสดและกาแฟสำเร็จรูป โดยกาแฟสดที่ชงจากกาแฟคั่วบดได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณของเสียในรูปกากกาแฟเพิ่มขึ้นไปด้วย จึงจำเป็นต้องมีการนำกากกาแฟมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในด้านสุขภาพและความงาม ด้านการเกษตร ได้แก่ ทำปุ๋ยสำหรับต้นไม้ (รพีพรรณ กองตูม, 2560) นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำกากกาแฟมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไขมันโดยสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล (Wong et al., 2022) แต่จากข้อจำกัดของการนำกากกาแฟไปใช้ประโยชน์ ทำให้กากกาแฟมีปริมาณค่อนข้างสูง เมื่อนำไปทิ้งจะทำให้เกิดขยะและมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นที่จะต้องนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากกาแฟ พบว่ามีส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 30-40 เซลล์โลสร้อยละ 8-15 ลิกนินร้อยละ 20-30 โปรตีนร้อยละ 13-17 ไขมันร้อยละ 7-21 และเถ้าร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจากองค์ประกอบดังกล่าวทำให้สามารถนำกากกาแฟมาใช้ประโยชน์เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น เอทานอลได้ (Bomfim et al., 2023; Battista et al., 2020; Kovalcik et al., 2018; Ballesteros et al., 2014)

เอทานอล (ethanol) สามารถใช้ประโยชน์ได้ในหลายรูปแบบ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินเรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่า ดีโซฮอล์ (desohol) หรือใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันให้กับเครื่องยนต์ เป็นต้น กระบวนการในการผลิตเอทานอลมี 2 วิธี คือ การสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และการผลิตจากจุลินทรีย์โดยอาศัยการหมัก (fermentation) ปัจจุบันเอทานอลที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะมาจากกระบวนการทางชีวภาพที่หมักน้ำตาลโดยใช้เชื้อยีสต์ เอทานอลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีมีปริมาณน้อยมาก โดยคิดเป็นประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทั้งหมด การผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพหรือการผลิตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลนั้น มีวัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง และลิกโนเซลลูโลส

งานวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะใช้กากกาแฟซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากธุรกิจร้านกาแฟสดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้อย่างมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน อีกทั้งเพื่อเป็นการลดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

- กากกาแฟ: เก็บรวบรวมจากร้านกาแฟสด (ร้านอะเมซอน) ในมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อำเภอเมืองสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยทำการเก็บรวบรวมกากกาแฟในช่วงเวลาตอนเย็น เป็นเวลา 7 วัน ใส่ในถุงพลาสติก นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักแห้งคงที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- จุลินทรีย์: *Saccharomyces cerevisiae* จากสาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

- อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture meidum): Yeast Malt medium ประกอบด้วยยีสต์สกัด 3 กรัม มอลต์สกัด 3 กรัม เพปโทน 5 กรัม กลูโคส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการวิจัย

1) ศึกษาองค์ประกอบของกากกาแฟ

นำกากกาแฟที่อบแห้งแล้วมาวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า (A.O.A.C., 1999)

2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพกากกาแฟด้วยสารเคมีร่วมกับความร้อนและการย่อยเซลลูโลสจากกากกาแฟด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำกากกาแฟที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณร้อยละ 10 น้ำหนักโดยปริมาตร ทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 2 และ 3 น้ำหนักโดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 45 และ 60 นาที นำกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ปริมาณกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพแล้วปริมาณร้อยละ 10 น้ำหนักโดยปริมาตร เติม 1 M ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 13 ยูนิต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยชุดควบคุมคือกากกาแฟที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ เลือกชุดการทดลองที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป (วนิดา ปานอุทัย และคณะ, 2553)

3) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพและการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวถ่ายโอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 10 หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต เอทานอล โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

3.1) ผลของแหล่งไนโตรเจน นำกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อ 2) เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ได้แก่ ยีสต์สกัด เพปโทน มอลต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมฟอสเฟต (ชุดควบคุมคือไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้การผลิตเอทานอลสูงสุด เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป

3.2) ผลของอุณหภูมิ นำกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อ 2) เติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 28 35 และ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เลือกอุณหภูมิที่ให้การผลิตเอทานอลสูงสุด เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป

3.3) ผลของอัตราการเขย่า นำกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อ 2) เติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.2) ศึกษาอัตราการเขย่าที่ 0 100 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เลือกอัตราการเขย่าที่ให้การผลิตเอทานอลสูงสุด

4) วิธีการวิเคราะห์

- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด โดยใช้วิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

- วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยใช้วิธี Dichromate assay (Manivannan et al., 2012)

5) วิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี one way ANOVA (analysis of variance) และ Duncan's multiple range tests ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0

6) การคำนวณ

- การเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (ΔS) = $[S_0] - [S_t]$
- การเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ (ΔP) = $[P_t] - [P_0]$

- อัตราการใช้สารตั้งต้น = $\Delta S/t$
- อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ = $(\Delta P)/t$

โดย [S] คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น
[P] คือ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์
0 คือ เวลาเริ่มต้น
t คือ เวลาต่าง ๆ

ผลการวิจัย

1) องค์ประกอบทางเคมีของกากกาแฟ

องค์ประกอบทางเคมีของกากกาแฟประกอบด้วย เซลลูโลสร้อยละ 41.78±4.66 โดยน้ำหนัก เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 28.02±3.38 โดยน้ำหนัก ลิกนินร้อยละ 29.10±0.92 โดยน้ำหนัก และเถ้าร้อยละ 1.10±0.01 โดยน้ำหนัก

2) สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพกากกาแฟด้วยสารเคมีร่วมกับความร้อนและการย่อยเซลลูโลสจากกากกาแฟด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพตัวอย่างด้วยสารเคมีร่วมกับความร้อนและทำการย่อยเซลลูโลสจากกากกาแฟด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีความแตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพอยู่ในช่วง 1.969±0.073 - 3.564±0.234 กรัมต่อลิตร การใช้กรดซัลฟิวริกในการปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกอยู่ในช่วง 2.067±0.255 – 3.564±0.23 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 1.969±0.073 - 2.573±0.049 กรัมต่อลิตร การปรับสภาพกากกาแฟด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 30 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3.564±0.234 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 45 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.317±0.350 กรัมต่อลิตร และการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 30 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.238±1.340 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) ดังนั้นจากการทดลองจึงเลือกใช้การปรับสภาพกากกาแฟด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่เวลา 30 นาที เนื่องจากให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด อีกทั้งใช้ปริมาณกรดซัลฟิวริกและเวลาในการปรับสภาพต่ำสุด

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

สารเคมี	สภาวะที่อุณหภูมิ 90 °C		น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
	ความเข้มข้น (ร้อยละ)	เวลา (นาที)	
NaOH	1	30	2.351±0.047^{c}
		45	2.428±0.168^{bc}
		60	2.357±0.112^{c}
	2	30	2.573±0.049^{b}
		45	2.460±0.075^{bc}
		60	2.151±0.093^{cd}
	3	30	1.969±0.073^{d}
		45	2.009±0.201^{d}
		60	2.106±0.039^{cd}
H_2SO_4	1	30	3.564±0.234^{a}
		45	3.317±0.350^{a}
		60	2.563±0.615^{bc}
	2	30	2.669±0.498^{b}
		45	2.306±0.388^{c}
		60	2.630±0.315^{b}
	3	30	3.238±1.340^{a}
		45	2.369±0.391^{c}
		60	2.067±0.255^{cd}
ชุดควบคุม	-	-	2.586±0.012^{b}

หมายเหตุ: a-d มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

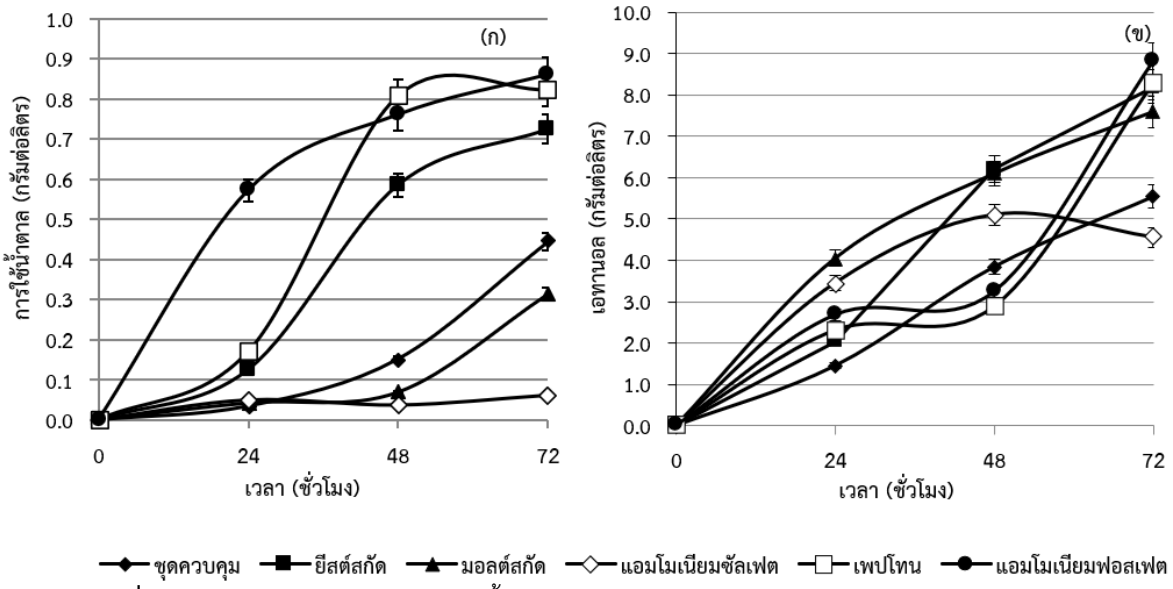
3) ปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

3.1) ผลของแหล่งไนโตรเจน

S. cerivisiae สามารถใช้น้ำตาลโดยมีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน แสดงในภาพที่ 1(ก) จากการทดลองพบว่ายีสต์มีการใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยการใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนมีการใช้น้ำตาลสูงสุด ค่าการใช้น้ำตาลที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.86±0.114 กรัมต่อลิตร การใช้เพปโทนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ค่าการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.82±0.038 และ 0.72±0.076 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเติมมอลต์สกัด ไม่มีการเติมไนโตรเจน และแอมโมเนียมซัลเฟต ให้ค่าการใช้น้ำตาลที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.32±0.010, 0.45±0.002 และ 0.06±0.002 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่าปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงเริ่มต้นในแหล่งไนโตรเจนทุกชนิดและชุดควบคุม แสดงในภาพที่ 1(ข) การเพิ่มขึ้นของเอทานอลสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณน้ำตาล

เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญและการผลิตเอทานอล



ภาพที่ 1 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (ก) และการผลิตเอทานอล (ข) โดย *S. cerevisiae*

ตารางที่ 2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟ โดย *S. cerevisiae* ที่เวลา 72 ชั่วโมง

แหล่งไนโตรเจน	การเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (ΔS) (กรัม/ลิตร)	การเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ (ΔP) (กรัม/ลิตร)	อัตราการใช้สารตั้งต้น (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)
ชุดควบคุม	0.445±0.002^{c}	5.55±0.003^{d}	0.006±0.000^{c}	0.077±0.000^{d}
ยีสต์สกัด	0.724±0.076^{b}	8.20±0.034^{b}	0.010±0.031^{b}	0.114±0.001^{b}
มอลล์สกัด	0.315±0.010^{c}	7.60±0.020^{c}	0.004±0.000^{c}	0.106±0.000^{c}
เพปโทน	0.822±0.038^{b}	8.30±0.006^{b}	0.011±0.002^{b}	0.115±0.002^{b}
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.062±0.002^{d}	4.55±0.033^{d}	0.001±0.000^{d}	0.063±0.001^{d}
แอมโมเนียมฟอสเฟต	0.860±0.114^{a}	8.83±0.024^{a}	0.012±0.004^{a}	0.123±0.001^{a}

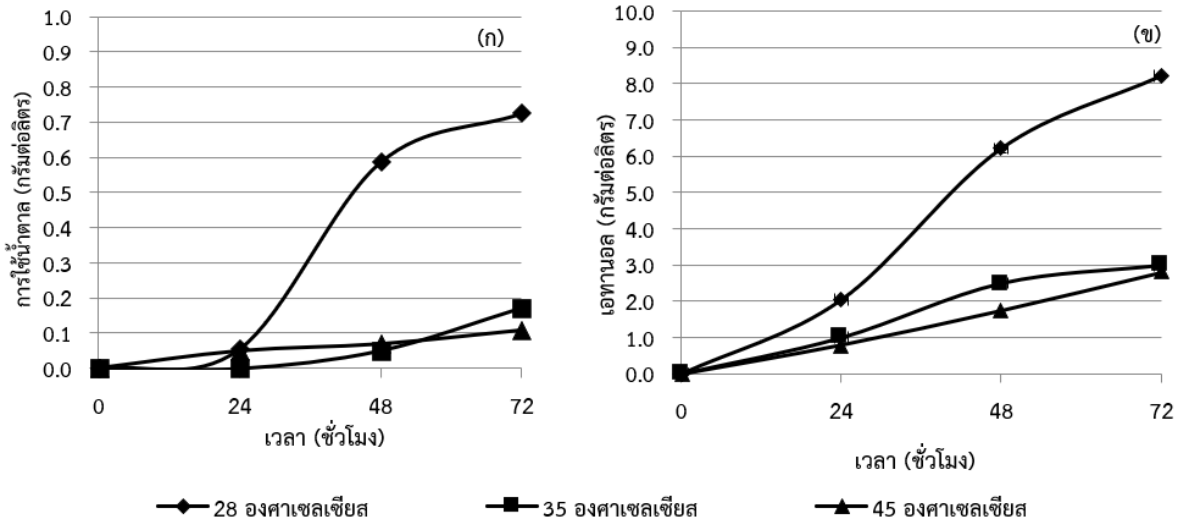
หมายเหตุ: a-d ในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 8.83±0.024 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน การใช้เพปโทนและยีสต์สกัด ให้การผลิตเอทานอลเท่ากับ 8.30±0.006 และ 8.20±0.034 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเติมมอลต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต และไม่มีการเติมไนโตรเจน ให้การผลิตเอทานอลเท่ากับ 7.60±0.020 4.55±0.033 และ 5.55±0.003 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสม เนื่องจากให้ค่าการใช้น้ำตาล การผลิตเอทานอล อัตราการใช้สารตั้งต้นและอัตราการผลิต ที่เวลา 72 ชั่วโมง สูงสุดเท่ากับ 0.86±0.114 กรัมต่อลิตร 8.83±0.024 กรัมต่อลิตร 0.012±0.004 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.123±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

3.2) ผลของอุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิต่อการใช้น้ำตาลของ *S. cerivisiae* แสดงในภาพที่ 2(ก) พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ค่าการใช้น้ำตาลสูงสุด โดยยีสต์มีการใช้น้ำตาลเพิ่มสูงหลังจากเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลา 72 ชั่วโมง ค่าการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.72±0.08 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ให้ค่าการใช้น้ำตาลสูงขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้ค่าการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.36±0.00 และ 0.11±0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงเริ่มต้นในทุกอุณหภูมิ แสดงในภาพที่ 2(ข) การเพิ่มขึ้นของเอทานอลสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณน้ำตาล เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญและการผลิตเอทานอล ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้การผลิตเอทานอล เท่ากับ 8.21±0.03

กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ให้การผลิตเอทานอลเท่ากับ 3.00±0.01 และ 2.80±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (ก) และการผลิตเอทานอล (ข) โดย *S. cerevisiae*

ตารางที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟ โดย *S. cerevisiae* ที่เวลา 72 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (ΔS) (กรัม/ลิตร)	การเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ (ΔP) (กรัม/ลิตร)	อัตราการใช้สารตั้งต้น (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)
28	0.72±0.08^{a}	8.21±0.03^{a}	0.010±0.00^{a}	0.110±0.00^{a}
35	0.36±0.00^{b}	3.00±0.01^{b}	0.005±0.00^{b}	0.042±0.00^{b}
45	0.11±0.05^{c}	2.80±0.01^{b}	0.002±0.00^{b}	0.039±0.00^{b}

หมายเหตุ: a-d ในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

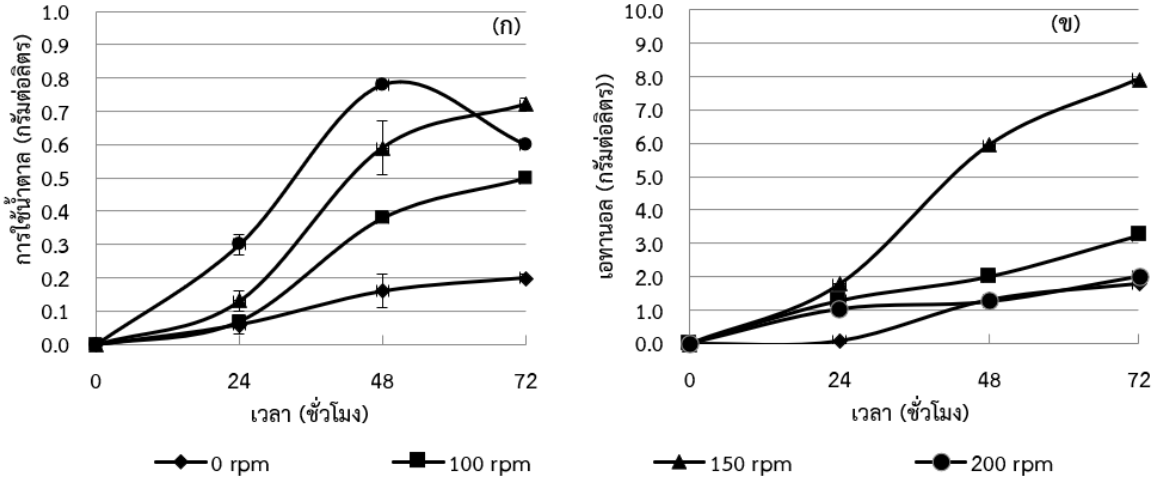
ตารางที่ 3 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28 องศาเซลเซียส ให้ค่าการใช้น้ำตาล การผลิตเอทานอล อัตราการใช้สารตั้งต้นและอัตราการผลิต ที่เวลา 72 ชั่วโมง สูงสุดเท่ากับ 0.72±0.08 กรัมต่อลิตร 8.21±0.03 กรัมต่อลิตร 0.01±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.11±0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

3.3) ผลของการเขย่า

ผลของการเขย่าต่อการใช้น้ำตาลของ *S. cerivisiae* แสดงในภาพที่ 3(ก) จากการทดลองพบว่าการใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วในการเขย่าเพิ่มขึ้น การเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ให้ค่าการใช้น้ำตาลสูงและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงเริ่มต้นจนถึง 48 ชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ ลดลงจนถึงเวลา 72 ชั่วโมง โดยให้การใช้น้ำตาลสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.78±0.02 กรัมต่อลิตร และ 0.60±0.01 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่การเขย่าที่ความเร็ว 100 และ 150 รอบต่อนาที และไม่มีการเขย่า มีการใช้น้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยให้ค่าการใช้น้ำตาลที่เวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.50±0.01 0.72±0.02 และ 0.20±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอลพบว่าปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงเริ่มต้นในทุกความเร็วรอบการเขย่า โดยการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แสดงในภาพที่ 3(ข) สำหรับการเขย่าที่ความเร็ว 0 100 และ 150 รอบต่อนาที พบว่าการเพิ่มขึ้นของเอทานอลสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณน้ำตาล เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญและการผลิตเอทานอล ในขณะที่การเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าการผลิตเอทานอลไม่สัมพันธ์กับการใช้น้ำตาล เนื่องจากให้การผลิตเอทานอลต่ำในขณะที่มีการใช้น้ำตาลสูง โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดโดยใช้การเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ให้การผลิตเอทานอลเท่ากับ

7.92±0.02 กรัมต่อลิตร การเขย่าที่ความเร็ว 100 200 รอบต่อนาที และไม่มีการเขย่า ให้การผลิตเอทานอล เท่ากับ 3.23±0.01 2.00±0.01 และ 1.78±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ผลของการเขย่าต่อการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (ก) และการผลิตเอทานอล (ข) โดย *S. cerevisiae*

ตารางที่ 4 ผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟ โดย *S. cerevisiae* ที่เวลา 72 ชั่วโมง

อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)	การเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (ΔS) (กรัม/ลิตร)	การเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ (ΔP) (กรัม/ลิตร)	อัตราการใช้สารตั้งต้น (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)
0	0.20±0.01^{c}	1.78±0.01^{c}	0.003±0.004^{c}	0.025±0.002^{c}
100	0.50±0.01^{b}	3.23±0.01^{b}	0.007±0.001^{b}	0.045±0.003^{b}
150	0.72±0.02^{a}	7.92±0.02^{a}	0.010±0.001^{a}	0.110±0.001^{a}
200	0.60±0.01^{b}	2.00±0.01^{c}	0.010±0.001^{a}	0.028±0.001^{c}

หมายเหตุ: a-c ในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4 ผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพโดย *S. cerevisiae* พบว่าอัตราเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ 150 รอบต่อนาที โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้ค่าการใช้น้ำตาล การผลิตเอทานอล อัตราการใช้สารตั้งต้น และอัตราการผลิตสูงสุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เท่ากับ 0.72±0.02 กรัมต่อลิตร 7.92±0.02 กรัมต่อลิตร 0.01±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.11±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ดังนั้นจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล พบว่าการใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้ค่าการใช้น้ำตาล การผลิตเอทานอล อัตราการใช้สารตั้งต้น และอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.72±0.02 กรัมต่อลิตร 7.92±0.02 กรัมต่อลิตร 0.01±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.11±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

อภิปรายผล

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากกาแฟที่นำมาศึกษามีองค์ประกอบที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Khenniche and Benissad-Aissani (2010) และ Boudrahem et al. (2011) โดยพบว่ากากกาแฟมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่ร้อยละ 25.39 และ 37.33 โดยน้ำหนักแห้ง Mussatto et al. (2011) รายงานว่ากากกาแฟมีองค์ประกอบของน้ำตาลร้อยละ 45.3 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 36.7 และเซลลูโลสร้อยละ 8.6 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ นอกจากนี้ Bomfim et al. (2023) รายงานว่ากากกาแฟมีส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 30-40 เซลลูโลสร้อยละ 8-15 ลิกนินร้อยละ 20-30 โปรตีนร้อยละ 13-17 ไขมันร้อยละ 7-21 และเถ้าร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวสามารถที่จะนำมาผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การใช้สารละลายกรดหรือด่าง เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ และสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลต่อไป

จากการศึกษาการปรับสภาพกากกาแฟด้วยสารเคมีร่วมกับความร้อน พบว่าการปรับสภาพด้วยกรดก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสให้ปริมาณน้ำตารีดิวซ์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การปรับสภาพด้วยด่างก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์นั้นให้ปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกับกากกาแฟที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ Zhang et al. (2020) รายงานว่าการปรับสภาพชีวมวลด้วยวิธีการทางเคมี ทางกายภาพหรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันส่งเสริมให้กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์และการหมักเกิดประสิทธิภาพดีขึ้น นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kwon et al. (2013) รายงานว่าการปรับสภาพกากกาแฟด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 และให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงขึ้น เนื่องจากการปรับสภาพมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนิน ซึ่งมีสมบัติไปห่อหุ้มหรือเคลือบโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินจึงเป็นเหมือนผนังป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัตถุดิบและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่าย การปรับสภาพโดยใช้กรดซัลฟิวริกมีกลไกเพื่อไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลชนิดอื่น ๆ และสลายน้ำตาลไซโลสให้กลายเป็นเฟอร์ฟูรอล (Jutakanoke et al., 2012) ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบการใช้กรดซัลฟิวริกได้รับความสนใจและศึกษากันมากและแพร่หลายที่สุด โดยใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดฟอสฟิวริกสำหรับการเปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ ตามด้วยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้เกิดเป็นกลูโคส ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยกรดมีปริมาณสูงกว่าการใช้ด่างประมาณ 3 เท่า อีกทั้งในงานวิจัยส่วนมากนิยมใช้กรดในการปรับสภาพเนื่องจากให้น้ำตาลเฮมิเซลลูโลสมาก รวมถึงการทำให้ความสามารถในการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสสูง โดยการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้มากกว่าเซลลูโลส ทำให้เหมาะสมต่อการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ต่อไป (นันทิกา คล้ายชม และคณะ, 2554) การใช้วิธีการทางเคมีควบคู่กับการใช้เอนไซม์จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเพิ่มสูงขึ้น และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลต่อไป (Sun and Cheng, 2002)

ไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* เนื่องจากยีสต์ต้องการไนโตรเจนในการเจริญ ไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการสร้างโปรตีนของเซลล์ ผนังเซลล์ของยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ Arrizon and Gschaedler (2002) พบว่าการเติมไนโตรเจนลงในถังหมักจะส่งผลดีในการเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอล และให้การใช้น้ำตาลในปริมาณสูงในระยะเวลานาน ซึ่งจะทำให้การหมักมีประสิทธิภาพสูงขึ้นและระยะเวลาการหมักลดลง จากรายงานของ Torija et al. (2003a) รายงานว่าในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดย *S. cerevisiae* มีผลพลอยได้ประเภทกรดอินทรีย์ เช่น กรดซัคซินิกและกรดอะซิติกเกิดขึ้น ทำให้ค่าพีเอชเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์ ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เช่น แอมโมเนียมฟอสเฟต ซึ่งมีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ จึงสามารถช่วยควบคุมค่าพีเอชในกระบวนการหมักไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมากนัก

S. cerevisiae เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเจริญอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส แต่ยีสต์ทนร้อนเป็นยีสต์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงมีผลทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ผิดปกติ ความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง สำหรับการหมักเอทานอลพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการระบวนการหมักจะสูงกว่าอุณหภูมิสำหรับการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส (Banat et al., 1998) นอกจากนี้มีรายงานว่าการเจริญของยีสต์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อาจเนื่องมากจากการสะสมของเอทานอลภายในเซลล์มีผลทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ (Nuanpeng et al., 2016; Torija et al., 2003b) Torija et al. (2003a) ศึกษาผลของอุณหภูมิ (15-35 องศาเซลเซียส) ต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ยีสต์ที่แตกต่างกันของ *S. cerevisiae* พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 10 และหลังจากชั่วโมงที่ 10 ยีสต์ยังคงมีความเจริญอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องมาจากอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ ยีสต์ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ และอาจใช้ผลิตภัณฑ์อื่นที่ยีสต์ผลิตขึ้นมาเป็นแหล่งอาหาร โดยได้ความเข้มข้นของเซลล์แห้งและเอทานอลสุดท้ายเฉลี่ยเท่ากับ 1.32 และ 3.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักมีผลต่อสรีรวิทยาของเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลต่อการใช้

น้ำตาลโดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการใช้น้ำตาลจะลดลง เนื่องจากการดูดซึมไนโตรเจนลดลง (Kittiratmai, 2003) นอกจากนี้ Mas et al. (2014) รายงานว่าเมื่ออุณหภูมิการหมักสูงขึ้นจะมีการสร้างสารเมแทบอไลต์อื่น ๆ เช่น กลีเซอรอล (glycerol) ซัคซิเนต (succinate) กรดอะซิติก (acetic acid) และอะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เพิ่มขึ้น ทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลง Lucero et al. (2000) พบว่าเชื้อยีสต์จะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำลงเมื่ออุณหภูมิการหมักสูงขึ้น เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงจะเกิดการสะสมเอทานอลในเซลล์มากขึ้นซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์และที่อุณหภูมิสูงทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (permeable membrane) เสียไป

จากการทดลองผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอลจากกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพโดย *S. cerevisiae* พบว่าอัตราเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ 150 รอบต่อนาที ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของกนกรัตน์ ใสสอาด และคณะ (2560) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกผลจาก (Nipa palm) โดย *S. cerevisiae* โดยศึกษาการเขย่าที่ 0 - 200 รอบต่อนาที พบว่ายีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่า โดยที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ให้การผลิตเอทานอลสูงสุด เนื่องจากการเขย่ามีผลทำให้สารอาหาร อากาศ และยีสต์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ส่งผลให้ยีสต์สามารถใช้สารตั้งต้นเพื่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ ในขณะที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ให้การผลิตเอทานอลลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพิ่มอัตราการเขย่ามีผลทำให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตและแตกหน่อโดยจะไม่ให้เอทานอลออกมาหรือให้ในปริมาณต่ำและมีคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้น ดังนั้นการหมักอย่างต่อเนื่องควรมีอากาศบ้างในระหว่างการหมัก เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ทดแทนเซลล์ที่ตายลงและยังพบว่าการให้อากาศเพียงเล็กน้อย จะทำให้มีการใช้กลูโคสได้มากขึ้นและช่วยให้ยีสต์สามารถทนต่อเอทานอลได้ดีอีกด้วย (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษากากกาแฟมีองค์ประกอบของเซลลูโลสร้อยละ 41.78±4.66 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 28.02±3.38 ลิกนินร้อยละ 29.10±0.92 และเถ้าร้อยละ 1.10±0.01 โดยน้ำหนักแห้ง นำกากกาแฟมาปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 13 ยูนิต ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3.564±0.234 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* โดยได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล คือ การใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และให้อัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยให้การผลิตเอทานอล อัตราการใช้สารตั้งต้น และอัตราการผลิตเท่ากับ 7.92±0.02 กรัมต่อลิตร, 0.01±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.11±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่าการใช้กากกาแฟเป็นวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตเอทานอลแม้ผลผลิตที่ได้อาจไม่สูงเท่ากับการผลิตทางการค้าในปัจจุบัน แต่เมื่อเทียบกับการใช้มันสำปะหลังหรือกากน้ำตาลที่เป็นวัตถุดิบหลัก พบว่าราคาเอทานอลมีแนวโน้มปรับเพิ่มขึ้นตามราคากากน้ำตาลนอกฤดูกาลหีบอ้อยเป็นสำคัญ โดยต้นทุนการผลิตเอทานอลขึ้นกับราคาวัตถุดิบเป็นหลัก เมื่อราคาวัตถุดิบเพิ่มขึ้นส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นด้วย ดังนั้นการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรหรือจากภาคอุตสาหกรรมจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ แต่ทั้งนี้อาจต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น เช่น ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ใสสอาด, เบญจมาศ หนูแป้น และกิตติมา คงทน. (2560). *การผลิตเอทานอลจากเส้นใยเปลือกผลจากโดย Saccharomyces cerevisiae.* รายงานวิจัยสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี.

นันทิกา คล้ายชม, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และอนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. (2554). การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากซังข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด. *วิศวกรรมสาร มก. 24(75)*, น. 91-102.

รพีพรรณ กองตูม. (2560). กากกาแฟ: มูลค่าเพิ่มและการใช้ประโยชน์. *ในการประชุมวิชาการระดับชาติ*

ราชภัฏหมู่บ้านจอมบึงวิจัย ครั้งที่ 5 (น. 362). ราชบุรี.

วนิดา ปานอุทัย, นิคม แหลมสัก, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตร และประมุข ภระกูลสุข สถิตย์. (2553). การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน. *ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48* (น. 392). กรุงเทพ: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร.

สาวิตรี ลิ่มทอง. (2549). *ยีสต์: ความหลากหลายทางเทคโนโลยีชีวภาพ.* กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Arrizon, J. and Gschaedler. A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Canadian Journal Microbiology, 48(11),* pp. 965-970.

Association of official analytical chemists. (1999). *Official methods of analysis.* The Association, D.C. Washington.

Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A. and Mussatto, S.I. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food Bioprocess Technology, 7*, pp. 3493–3503.

Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. and McHale, A.P. (1998). Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I: Yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14*, pp. 809-821.

Battista, F., Barampouti, E.M., Mai, S., Bolzonella, D., Malamis, D., Moustakas, K. and Loizidou, M. (2020). Added-value molecules recovery and biofuels production from spent coffee grounds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 131*, 110007. doi.org/10.1016/j.rser.2020.110007

Bomfim, A.S.C., Oliveira, D.M., Walling, E., Babin, A., Hersant, G., Vaneeckhaute, C., Dumont, M.J. and Rodrigue, D. (2023). Spent coffee grounds characterization and reuse in composting and soil amendment. *Waste*, *1,* pp. 2-20. doi.org/10.3390/waste1010002.

Boudrahem, F., Soualah, A. and Aissani-Benissad, F. (2011). Pb(II) and Cd(II) removal from aqueous solutions using activated carbon developed from coffee residue activated with phosphoric acid and zinc chloride. *Journal of Chemical & Engineeing Data, 56(5),* pp. 1946-1955.

Jutakanoke, R., Leepipatpiboon, N., Tolieng, V., Kitpreechavanich, V., Srinorakutara, T. and Akaracharanya, A. (2012). Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy, 39*, pp. 283-289.

Khenniche, L. and Benissad-Aissani, F. (2010). Adsorptive removal of phenol by coffee residue activated carbon and commercial activated carbon: equilibrium, kinetics, and thermodynamics. *Journal of Chemical & Engineering Data, 55(11),* pp. 4677-4686.

Kittiratmai, P. (2003). *Improvement of ethanol fermentation efficiency by flocculent yeast and repeated fedbatch.* (Masters thesis, Kasetsart University, Thailand.)

Kovalcik, A., Obruca, S. and Marova, I. (2018). Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioproducts Processing, 110*, pp. 104–119.

Kwon, E.E., Yi, H., and Jeon, Y.J. (2013). Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology*, *136*, pp. 475–480.

Lucero, P., Penalver, E., Moreno, E. and Lagunas, R. (2000). Internal trehalose protects

endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology, 66*(10), pp. 4456-4461.

Manivannan, A., Jayarani, P.H. and Narendhirakannan, R.T. (2012). Enhanced acid hydrolysis for bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) using fermenting yeast *Candida intermedia* NRRL *Y-981*. *Journal of Scientific and Industrial Research, 71(1)*, pp. 51-56.

Mas, A., Torija, M.J., Garcia-Parrilla, M.C. and Troncoso A. (2014). Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *The Science World Journal, 39*, pp. 46-57.

Miller, G. (1959). Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry, 31*, pp. 426-429.

Mussatto, S.I., Carneiro, L.M., Silva, J.P.A., Roberto, I.C. and Teixeira, J.A. (2011). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, *83(2)*, pp. 368-374.

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

Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of linocellulosic material for ethanol production: a review. *Bioresource Technology, 83(1)*, pp. 1-11.

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamon, J.M., Mas, A. and Rozes, N. (2003). Effects of fermentation temperature nd *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology, 85,* pp. 127-136.

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A. and Guillamoan J.M. (2003). Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: Study of their buffering capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(4),* pp. 916-922.

Wong, Y.Y., Rawindran, H., Lim, J. W., Tiong, Z. W., Liew, C. S., Lam, M. K., Kiatkittipong, W., Abdelfattah, E. A., Oh, W. D. and Ho, Y. C. (2022). Attached microalgae converting spent coffee ground into lipid for biodiesel production and sequestering atmospheric CO_2 simultaneously. *Algal Research, 66*, doi.org/10.1016/j.algal.2022.102780.

Zhang, J., Zhou, H., Liu, D. and Zhao, X. (2020). Chapter 2 – Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose. in book *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels* (pp. 17-65). Academic Press. doi.org/10.1016/C2017-0-03529-2.