

การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายกรดและด่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล
โดยการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต



อภิสร่า แซ่จันท์

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมพลังงานทดแทน

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2560

การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายกรดและด่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล
โดยการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมพลังงานทดแทน
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายกรดและด่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล
โดยการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต

อภิสร่า แซ่จันท์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมพลังงานทดแทน

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(อาจารย์ ดร.ณัฐธิดา สุขเกษม)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(Dr.Rameshprabu Ramaraj)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธเนศ ไชยชนะ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สราวุธ พลวงษ์ศรี)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ชื่อเรื่อง	การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายกรดและด่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต
ชื่อผู้เขียน	นางสาวอภิสร่า แซ่จันทร์
ชื่อปริญญา	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมพลังงานทดแทน
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร.ณัฐธัญญา สุขเกษม

บทคัดย่อ

ฟางข้าวเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เหลือทิ้งทางการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล เนื่องจากวัสดุเหล่านี้หาได้ง่าย ราคาถูก และมีศักยภาพในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพฟางข้าว เพื่อเพิ่มการผลิตน้ำตาลจากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ ซึ่งองค์ประกอบของฟางข้าวที่ใช้ประกอบด้วยเซลลูโลส 43.21% เฮมิเซลลูโลส 23.00% และลิกนิน 4.30% ในการศึกษาจะเปรียบเทียบการปรับสภาพฟางข้าวในกรดอะซิติก และกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% (v/v) โดยผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 120 min ด้วยตู้อบลมร้อน และที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ความดันไอน้ำ พบว่า การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ความดันไอน้ำ ให้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 20.11 g/L น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 9.50 g/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 3.70 และ 4.21 g/L ตามลำดับ จากนั้นศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวที่ผ่านกรดในสภาวะต่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น คือ 5, 10, 15 และ 20% (w/v) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ความดันไอน้ำ พบว่า โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) ให้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 40.61 g/L น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.11 g/L ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 20.10 และ 0.15 g/L ตามลำดับ โดยหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่าง พบว่า เซลลูโลสเพิ่มขึ้นสูงถึง 90.92% ขณะที่ลิกนินลดลงเหลือ 1.83% จากนั้นนำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส *Trichoderma reesei* มีปริมาณการไหลเอนไซม์เท่ากับ 20 FPU/g_{substrate} ที่อุณหภูมิ 42 °C อัตราการเขย่า 200 rpm เวลา 16 hrs พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดหลังการย่อยด้วยเอนไซม์เท่ากับ 202.11 g/L ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลที่ได้มากกว่า 29.94 เท่าของฟางข้าว

ที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ ทั้งนี้ หลังจากการศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* บนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่า การตรึงรูปเซลล์ยีสต์ด้วยเทคนิค Adsorption บนฟางข้าวปริมาณ 3 g ที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 24 hrs ให้ผลการเกาะติดของเซลล์ดีที่สุดใน โดยมีจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงเท่ากับ 2.97×10^7 cell/ml จากนั้นทำการหมักเอทานอลแบบ repeated batch เทียบกับการหมักเอทานอลแบบอิสระ ที่จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1.8×10^6 cell/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 24 hrs พบว่า การหมักเอทานอลแบบ repeated batch ที่ใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปสามารถหมักซ้ำเป็นจำนวน 11 รอบ มีความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นเฉลี่ยโดยรวม 14.23% (v/v) คิดเป็นผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.56 g/g และจำนวนเซลล์ยีสต์ที่เหลือหลังการหมักเอทานอลเฉลี่ยโดยรวม 1.90×10^7 cell/ml จากการประเมินต้นทุนเบื้องต้น พบว่า การผลิตเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารกรดและด่าง จะส่งผลในเชิงเศรษฐศาสตร์ที่คุ้มค่ากว่าการผลิตเอทานอลแบบเซลล์อิสระ เนื่องจากสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตของส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้เตรียมในการหมักเอทานอล และเมื่อประเมินปริมาณชีวมวลของฟางข้าวในประเทศไทย พบว่า ประเทศไทยจะมีศักยภาพในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวได้ประมาณ 24.54 ล้านลิตรต่อวัน ซึ่งมีปริมาณมากพอและเป็นไปตามที่คาดการณ์สำหรับแผนพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกใน พ.ศ. 2558 – 2579 ดังนั้น การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยเทคนิคการตรึงรูปเซลล์ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาต่อยอดเพื่อเพิ่มผลได้ในการผลิตเอทานอล สำหรับพัฒนาพลังงานทดแทนที่ยั่งยืนในประเทศไทย

Title	PRETREATMENT OF RICE STRAW WITH ACID AND ALKALINE TO ENHANCE ENZYMATIC SACCHARIFICATION FOR ETHANOL PRODUCTION BY SEPARATION HYDROLYSIS AND FERMENTATION
Author	Miss Apisara Saejun
Degree	Master of Engineering in Renewable Energy Engineering
Advisor Committee Chairperson	Dr. Natthanicha Sukasem

ABSTRACT

Rice straw is a lignocellulosic from agriculture waste, which is interesting to be used as a raw material for ethanol production. Since these materials are plentiful, cost effective and source of sugar, they can be used to produce sugar as substrate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. The aim of this research were selection of pretreatment conditions of rice straw and enhancing sugar production from rice straw with enzymatic hydrolysis. The composition of rice straw before pretreatment contains cellulose 43.21%, hemicellulose 23.00% and lignin 4.30%. The study was carried out to compare two acid pretreatments, acetic acid and sulfuric acid were used 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0% (v/v) of both acid at 120 °C for 120 min by hot air oven and at 121 °C, 15 lb/in² for 15 min by autoclave. The results showed that the rice straw pretreatment with 2.5% (v/v) of sulfuric acid by autoclave produced the highest amount of total sugars and reducing sugars showing 20.11 g/L of total sugar and reducing sugar 9.50 g/L. These had glucose and xylose at 3.70 and 4.21 g/L respective. After that, pretreated rice straw at 2.5% (v/v) of sulfuric acid were used for alkaline pretreatment by using sodium hydroxide, calcium hydroxide and sodium chloride at of 5, 10, 15 and 20% (w/v) at 121 °C, 15 lb/in² for 15 min by autoclave. Sodium hydroxide pretreatment at 15% (w/v) showed the highest sugar amount when compared with other alkaline solutions. The pretreatment gave total sugar

concentration at 40.61 g/L and reducing sugar at 20.11 g/L. These were gave glucose and xylose at 20.10 and 0.15 g/L respective. After that the composition of two steps pretreated rice straw result of cellulose increased 90.29% and lignin decreased 1.83%. After that the optimum condition of rice straw pretreatment with the commercial enzyme cellulase is at 20 FPU/g_{substrate} hydrolyzed at 42 °C, 200 rpm for 16 hrs. The results showed total sugar was 202.11 g/L, which was 29.94 times more than untreated rice straw. After determining the optimal condition for immobilization of *S. cerevisiae* on pretreated rice straw, the result showed that immobilization of yeast cell on the pretreated rice straw of 3 g at 37 °C for 24 hrs exhibited the ability to promote cell binding up to 2.97×10^7 cell/ml. After that the ethanol production by yeast cells immobilized compared with free cell at initial infection of 1.8×10^6 cell/ml incubation at 37 °C for 24 hrs showed that the Immobilized yeast cells can be reused 11 times by repeated batch fermentation and higher ethanol concentration than free cells fermentation for the same length of time. Repeated batch fermentation was 14.23% (v/v) or ethanol yield 0.56 g/g and the remaining yeast cells averaged 1.90×10^7 cell/ml. However, from preliminary cost estimates based on fermentation showed that the production of ethanol by yeast cells immobilized on rice straw pretreatment is economically more worthwhile to produce ethanol than the free cells. Because it can reduce the cost of microorganism production that is used in ethanol fermentation with the estimated quantity of rice straw found in Thailand, it has the potential to produced ethanol from rice straw about 24.54 million-liters per day. Which is according to the expectations of the Alternative Energy and Alternative Energy Developmet Plan for 2015- 2036. Therefore, the production of ethanol from rice straw by using immobilized cells can be applied and developed to increase the production of ethanol for sustainable alternative energy in Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย เนื่องจากการสนับสนุนและความร่วมมือเป็นอย่างดีจากบุคคลหลายๆ ท่าน ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ณัฐต์ฉิชา สุขเกษม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก พร้อมกับอาจารย์ Dr. Rameshprabu Ramaraj และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธเนศ ไชยชนะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา อีกทั้งยังช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. วิจิตรา สิงห์ศิริบุญธรรม ซึ่งให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ (IQS) และศูนย์วิจัยพลังงาน วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่คอยเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดสอบคุณสมบัติด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านรวมถึงบุคคลากร วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่พร้อมให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจจนทำให้สำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเงินทุนงานวิจัย วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ภายใต้ "โครงการการผลิตและพัฒนาศักยภาพบัณฑิตทางด้านพลังงานทดแทน ในประเทศอาเซียนสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา"

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย จากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน (สนพ.) ภายใต้ "โครงการสนับสนุนทุนวิจัยแก่นักศึกษาระดับอุดมศึกษา ปีงบประมาณ 2558"

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวแซ่จันทร์ ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

อภิสร่า แซ่จันทร์

ตุลาคม 2560

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ค
ABSTRACT.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญตารางผนวก.....	ฐ
สารบัญภาพผนวก.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มา.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
ขอบเขตการศึกษา.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร.....	5
ฟางข้าว.....	5
การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส.....	9
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
บทที่ 3 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	24
วัตถุดิบ.....	24
อุปกรณ์.....	25
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	33

ผลการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว	33
ผลการย่อยสลายฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	40
ผลการผลิตเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
ผลการประเมินต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว.....	43
ผลการประเมินศักยภาพการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว	44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	45
สรุปผลการวิจัย.....	45
ข้อเสนอแนะ	46
ภาคผนวก.....	47
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ และกราฟมาตรฐาน	48
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง.....	58
ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อ	62
ภาคผนวก ง ข้อมูลทางสถิติ	65
ภาคผนวก จ การเผยแพร่ผลงานวิจัย	73
บรรณานุกรม.....	86
ประวัติผู้วิจัย.....	93

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ส่วนประกอบทางเคมีของฟางข้าว	5
2 จุดเด่นและจุดด้อยแต่ละวิธีการปรับสภาพ.....	10
3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาวะในขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตเอทานอล	14
4 สมบัติทางกายภาพและเคมีของเอทานอล	16
5 สารที่ได้จากการผลิตเอทานอลโดยยีสต์	17
6 การเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ.....	19
7 ผลการวิเคราะห์เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กับปริมาณกลูโคส ไซโลส และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด	35
8 ผลการวิเคราะห์เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กับปริมาณกลูโคส ไซโลส และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายต่าง	37
9 องค์ประกอบฟางข้าวก่อนและหลังปรับสภาพ ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in ² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ.....	39
10 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากฟางข้าวโดยการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	40
11 ค่าพารามิเตอร์ ที่ได้จากการหมักแบบด้วยเซลล์อิสระ และการหมักแบบ repeated batch ในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h	42
12 ต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นวัสดุตั้งรูปเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้กระบวนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต.....	43
13 ปริมาณชีวมวล (ฟางข้าว) ในประเทศไทย	44

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะโครงสร้างพีชลิกโนเซลลูโลส.....	6
2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	7
3 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส	7
4 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน.....	8
5 โครงสร้างเส้นใยพีชก่อนและหลังการปรับสภาพ.....	9
6 ลักษณะปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส.....	14
7 ลักษณะเซลล์ของ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
8 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ.....	22
9 ฟางข้าวหลังการลดขนาด	24
10 ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า	24
11 ฟางข้าวในสารละลายกรดอะซิดิก และกรดซัลฟูริก ที่ใช้ปรับสภาพ	26
12 ฟางข้าวในสารละลายต่างๆที่ใช้ปรับสภาพ.....	27
13 การย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	27
14 เชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> สำหรับตรึงรูปเซลล์ และหมักเอทานอล.....	28
15 น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าเพื่อหมักเอทานอล	29
16 การศึกษาผลของฟางข้าวที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	29
17 การหมักเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	30
18 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	32
19 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดอะซิดิก และกรดซัลฟูริกที่ ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 120 °C เวลา 120 min ด้วยตู้อบลมร้อน และอุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in ² เวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ.....	34

ภาพที่	หน้า
20 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด 2.5% (v/v) ร่วมกับสารละลายต่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in ² เป็นเวลา 15 min ด้วย หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ.....	36
21 ลักษณะฟางข้าว (ก) ก่อนการปรับสภาพ, (ข) หลังการปรับสภาพด้วยกรด และ (ค) หลัง การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดร่วมกับต่าง ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in ² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ.....	38
22 ลักษณะพื้นผิวของฟางข้าว (ก) ก่อนปรับสภาพ, (ข) หลังปรับสภาพด้วยกรด, (ค) หลังปรับ สภาพด้วยสารละลายกรดร่วมกับต่าง และ (ง) หลังการย่อยด้วยเอนไซม์.....	39
23 จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงบนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ.....	41



สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวกที่	หน้า
1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Phenol sulfuric.....	49
2 ค่าการดูดกลืนแสงน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Somogyi-Nelson	52
3 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสและไซโลส ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี o-Toluidine.....	53
4 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Dichomate.....	55
5 การเตรียมสารละลายโซเดียมซิติเรทบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ	64
6 การศึกษารูปแบบการให้ความร้อนต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าวใน สภาวะกรด.....	66
7 การศึกษาชนิดกรดต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว	67
8 การศึกษาความเข้มข้นกรดต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว	69
9 การศึกษาชนิดสารละลายต่างต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว	70
10 การศึกษาความเข้มข้นสารละลายต่างต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว .	71
11 ผลการหมักเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ.....	72

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวกที่	หน้า
1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (น้ำตาลทั้งหมด).....	50
2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (น้ำตาลรีดิวซ์).....	52
3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี o-Toluidine	54
4 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส โดยวิธี o-Toluidine	54
5 กราฟมาตรฐานเอทานอล โดยวิธี Dichomate.....	56
6 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของฟางข้าวก่อนการปรับสภาพ.....	59
7 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของฟางข้าวหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 2.5% (v/v) ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in ² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ.....	60
8 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของฟางข้าวหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 2.5% (v/v) ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15% (w/v) ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in ² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ.....	61

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มา

พลังงานเป็นปัจจัยที่สำคัญในการตอบสนองความต้องการขั้นพื้นฐานของประชาชน และเป็นปัจจัยการผลิตที่สำคัญในภาคธุรกิจและอุตสาหกรรมด้วย รัฐบาลจึงต้องมีการจัดหาพลังงานให้มีปริมาณที่เพียงพอ มีราคาที่เหมาะสม และมีคุณภาพที่ดีสอดคล้องกับความต้องการของผู้ใช้ เนื่องจากอัตราการใช้พลังงานภายในประเทศมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้ต้องพึ่งพาพลังงานจากต่างประเทศ อย่างเช่น น้ำมันเชื้อเพลิงที่มีการนำเข้าปริมาณ 5,365 ล้านลิตร ทำให้สูญเสียเงินตราต่างประเทศในการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นมูลค่า 97,809 ล้านบาท (สำนักบริการธุรกิจและการสำรองน้ำมันเชื้อเพลิง กรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2557) เพราะฉะนั้น เพื่อให้มั่นใจว่าภายในอนาคตประเทศไทยจะมีพลังงานเพียงพอต่อความต้องการใช้ และลดความเสี่ยงในการพึ่งพาพลังงานฟอสซิลจากต่างประเทศที่มีราคาสูงและหาได้ยาก จึงเริ่มมองหาแนวทางการพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนจากพืชหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สามารถหาได้ง่าย ราคาถูก และมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนที่น่าสนใจ เพราะนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ รวมถึงการนำไปผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิง ทำให้สามารถช่วยลดมูลค่าการนำเข้าน้ำมันได้ สำหรับประเทศไทยการผลิตเอทานอลจะใช้วัตถุดิบหลักได้แก่ อ้อย และมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชอาหารทำให้มีความกังวลว่าวัตถุดิบดังกล่าวอาจมีอัตราการผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้พลังงานในอนาคต อีกทั้งการนำพืชอาหารมาใช้ผลิตเอทานอลยังส่งผลให้ราคาอาหารและสินค้าภายในประเทศปรับตัวสูงขึ้น ในปัจจุบัน การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจึงมุ่งเน้นไปที่วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นเศษวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากพืชและเนื้องด้วยประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวนมาก โดยเฉพาะฟางข้าวที่มีปริมาณสูงถึง 26.9 ล้านตันต่อปี (สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ, 2556) เกษตรกรจะใช้วิธีการเผาเพื่อกำจัดและทำลายทิ้ง ซึ่งหากเผาทิ้งจะสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 27×10^6 kgCO₂ (หมอดิน, 2557) ทำให้เกิดมลภาวะที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมทั้งทางดิน น้ำ และอากาศ (กลุ่มระบบงานวิจัย กองแผนงาน ร่วมกับกลุ่มวิจัยและพัฒนาอินทรีย์วัตถุเพื่อการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน, 2555) ดังนั้น การนำฟางข้าวที่เป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดจากการเปลี่ยนน้ำตาลจากเซลลูโลสเป็นเอทานอล จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อลดความเป็นผลึกภายใน

โครงสร้างพร้อมกำจัดองค์ประกอบของลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ทำให้ปริมาณของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น และช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ง่ายขึ้น โดยวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพสามารถลดค่าใช้จ่ายสำหรับการใช้เอนไซม์ถึง 33% ของต้นทุนการผลิตเอทานอลทั้งหมด (Ibrahim, 2012) ในขณะที่วัตถุดิบไม่ทำการปรับสภาพจะมีค่าใช้จ่ายสำหรับเอนไซม์ถึง 25% ของต้นทุนการผลิตเอทานอลทั้งหมด (Brodeur et al., 2011) อย่างไรก็ตาม กระบวนการปรับสภาพมีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล วิธีการปรับสภาพสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีหลัก คือ วิธีทางกายภาพ ชีวภาพเคมี และกายภาพร่วมกับทางเคมี ซึ่งแต่ละวิธีมีจุดเด่นและจุดด้อยของเทคนิคการปรับสภาพที่ส่งผลต่อองค์ประกอบวัตถุดิบแตกต่างกัน (สุภาวดี, 2557) จึงทำให้ต้องมีการศึกษาคัดเลือกวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมเพื่อช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตเอทานอล

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารเคมีร่วมกับความร้อน เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายกรด ได้แก่ กรดอะซิติก และกรดซัลฟิวริก และสารละลายต่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา โดยผลิตเอทานอลด้วยเทคนิคการตรึงรูปเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* บนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ โดยใช้กระบวนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต (Separation hydrolysis and fermentation, SHF) เพื่อเป็นแนวทางหรือเทคนิคทางเลือกสำหรับพัฒนาการผลิตเอทานอลในเชิงพาณิชย์ของเชื้อเพลิงไทย ภายในอนาคต นอกจากนี้ ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของฟางข้าวเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกแทนการใช้มันสำปะหลัง อ้อย หรือกากน้ำตาล อีกทั้ง ยังเป็นแนวทางให้กับชุมชนในการประยุกต์ใช้กับภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อสร้างแหล่งพลังงานขึ้นมาใช้เอง และอาจช่วยทำให้เกิดการพึ่งพาตนเองทางด้านพลังงานของประเทศได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกชนิดของสารปรับสภาพฟางข้าวที่เหมาะสม สำหรับย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว โดยใช้กระบวนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต (Separation hydrolysis and fermentation, SHF)

ขอบเขตการศึกษา

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว ดังนี้

1. นำฟางข้าวขนาดประมาณ 2.5-3 cm ทำการปรับสภาพที่อัตราส่วนพืช 1 g ต่อสารละลาย 20 ml โดยการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพฟางข้าว มีดังนี้

1.1 การปรับสภาพด้วยกรด ได้แก่ กรดซัลฟิวริก และกรดอะซิติก ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5, และ 5.0% (v/v) และทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C ด้วยตู้อบลมร้อน เป็นเวลา 120 min และที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันบรรยากาศ 15 lb/in² ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ เป็นเวลา 15 min จากนั้นคัดเลือกวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากผลปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และความเข้มข้นน้ำตาลที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการปรับสภาพในสภาวะต่าง

1.2 นำฟางข้าวตามข้อ 1.1 ปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% (w/v) จากนั้นทำการคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของด่างที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากผลปริมาณเซลลูโลส และความเข้มข้นน้ำตาลที่เกิดขึ้น เพื่อทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

1.3 นำฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้วตามข้อ 1.1 และ 1.2 มาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei*

2. วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากฟางข้าวก่อน และหลังการปรับสภาพ เช่น ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และความเข้มข้นน้ำตาลที่เกิดขึ้น ได้แก่ น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวิซ์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส

3. ทำการผลิตเอทานอลด้วยเทคนิคการตรึงรูปเซลล์ *S. cerevisiae* บนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ โดยใช้กระบวนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต (Separation hydrolysis and fermentation, SHF)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ด้านการอนุรักษ์พลังงานและพลังงานทดแทน

1.1 เป็นการใช้ประโยชน์จากการนำฟางข้าว ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต

1.2 การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่เหลือทิ้งในแปลงข้าว โดยเลือกใช้วิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างที่หาง่าย ราคาถูก สำหรับประยุกต์ใช้ในระดับชุมชน

2. ทางเศรษฐกิจ

2.1 สร้างรายได้ให้กับชาวเกษตรกรในการเพิ่มมูลค่าฟางข้าว เนื่องจากนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเป็นพลังงานเชื้อเพลิงเพื่อทดแทนการใช้ฟอสซิล

2.2 สนับสนุนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแทนการใช้วัตถุดิบที่เป็นพืชอาหาร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด เป็นต้น

3. ด้านสังคม

3.1 เป็นการส่งเสริมให้คนในชุมชนตระหนักถึงปัญหามลพิษจากหมอกควันที่เกิดจากการเผาวัสดุเหลือทิ้งในแปลงข้าว เพื่อให้ชุมชนพึ่งตนเองได้ และสร้างคุณภาพชีวิตที่ดีให้แก่ชุมชน

4. ทางด้านสิ่งแวดล้อม

4.1 ลดปัญหามลพิษทางดิน น้ำ และอากาศ ที่เกิดจากการเผาไหม้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในแปลงข้าวที่เป็นการสร้างมลภาวะให้กับสิ่งแวดล้อม

5. ทางวิชาการ

5.1 นำวิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลจากชีวมวลหรือวัตถุดิบชนิดอื่น เพื่อประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ สำหรับลดต้นทุนการใช้เอนไซม์

5.2 นำเทคนิคการตรึงรูปเซลล์ที่ได้ไปพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลและเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอล เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

ฟางข้าว

ฟางข้าว เป็นผลพลอยได้หรือวัสดุเหลือทิ้งจากภาคอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่ได้จากลำต้นแห้งของธัญพืชหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวสาลี ฟางข้าวบาร์เลย์ ฟางข้าวโอ๊ต เป็นต้น ซึ่งเป็นเศษวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากการทำนามีปริมาณสูงถึง 26.9 ล้านตันต่อปี (สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ, 2556) โดยทั่วไปฟางข้าว คือ พืชชีวมวลที่จัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ เซลลูโลส 32-47% เฮมิเซลลูโลส 19-27% และลิกนิน 5-24% นอกจากนี้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ยังมีองค์ประกอบอื่นอยู่ในผนังเซลล์ของพืชดังตารางที่ 1 (Yoswathana et al., 2010)

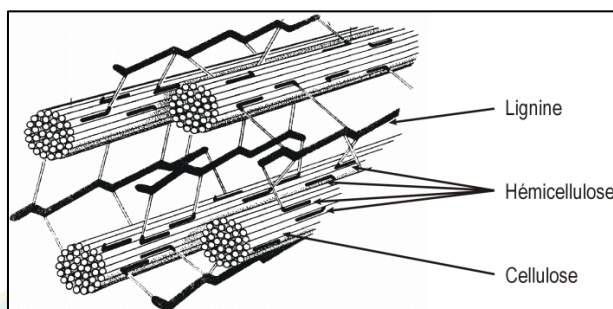
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมีของฟางข้าว

ส่วนประกอบทางเคมีของฟางข้าว (%wt)	
โปรตีน	3.7-9.5
ไขมัน	-
เยื่อใย	-
แป้งและน้ำตาล	-
เซลลูโลส	32.0-47.0
เฮมิเซลลูโลส	19.0-27.0
ลิกนิน	5.0-24.0
เถ้า	16.0-23.0
ซิลิกา	14.0-19.0

ที่มา: Yoswathana et al. (2010)

โดยพืชชีวมวลแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ไม่เท่ากัน จะขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของไม้ ซึ่งพืชที่มีลิกนินมากจะมีความแข็งแรงสูง และไม้ที่มีอายุมากจะมีปริมาณลิกนินมาก (Bharathi, 2006) ในการจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

จะเป็นดังภาพที่ 1 เซลลูโลสแต่ละโมเลกุลจะเกิดการรวมตัวเป็นมัด (Cellulose bundles) โดยมีเฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างเซลลูโลสกับลิกนินเข้าไว้ด้วยกัน จึงทำให้เส้นใยภายในผนังเซลล์มีความแข็งแรง

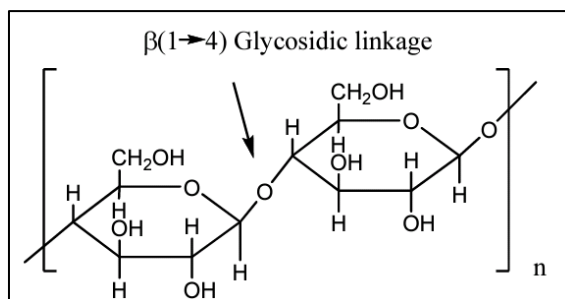


ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างพีซิกโนเซลลูโลส

ที่มา: Gnansounou (2010)

1. เซลลูโลส

เป็นสารพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลที่ต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบ $\beta(1-4)$ -glycosidic ดังภาพที่ 2 สายพอลิเมอร์แต่ละสายจะเรียงขนานกันและสร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อกัน ซึ่งอาจจะสูงถึง 3 พันธะต่อหน่วยกลูโคส แต่เมื่อรวมกันหลายสายจะเรียกว่า ไมโครไฟบริล (Microfibril) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบโครงผลึกสามมิติ ส่วนที่เป็นเซลลูโลสโครงสร้างแบบผลึก (Crystalline) จะมีความคงทนต่อเอนไซม์และกรดมาก ส่วนที่ไม่ได้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนแต่มีการจัดเรียงตัวแบบสุ่มจะเรียกว่า เซลลูโลสแบบหลวม (Amorphous) (Johnathan E., 2007) โดยทั่วไปเซลลูโลสในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นเซลลูโลสแบบผลึกหรือโครงสร้างแบบระเบียบ ซึ่งเรียงแน่นเป็นมัดไมโครไฟบริล มีความแข็งแรงและไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ใด ๆ เซลลูโลสจะพบในบริเวณผนังเซลล์ของพืชประมาณ 40-50% จะไม่ละลายน้ำ และในตัวทำลายอินทรีย์หรือสารละลายต่างอ่อน แต่จะละลายในกรดและต่างแก่ ในการปรับสภาพเพื่อทำลายโครงสร้างจะต้องใช้กรดเข้มข้นและอุณหภูมิสูง (พรเทพ, 2538) และเมื่อย่อยสลายโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์จะได้เซลลูลไบโอส ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์

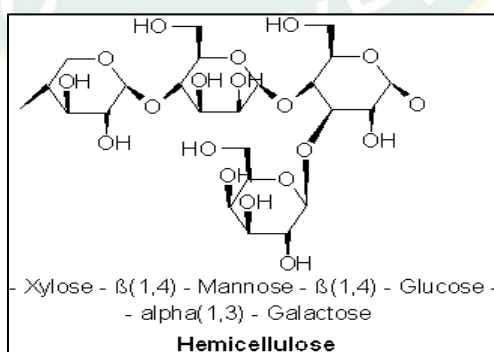


ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา: อภิศรา (ม.ป.ป.)

2. เฮมิเซลลูโลส

เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซคคาไรด์ (Amorphous polymeric carbohydrate) พบมากในพวงไม้ใบกว้างและพวกพืชตระกูลหญ้า ดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นอินทรีย์สารในเนื้อเยื่อของพืชที่พบมากเป็นอันดับสองรองมาจากเซลลูโลสและมักรวมอยู่กับลิกนิน โดยส่วนใหญ่จะพบในผนังเซลล์ประมาณ 20-30% เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 หรือ 6 โมเลกุล น้ำตาลที่ประกอบอยู่ในเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ ไซโลส อะราบิโนส กลูโคส กาแลกโตส และแมนโนส ซึ่งชนิดของน้ำตาลและปริมาณที่พบจะขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งของพืช (รัชพล, 2558) เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจาง ที่อุณหภูมิสูง และสามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% (w/v) (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2555)

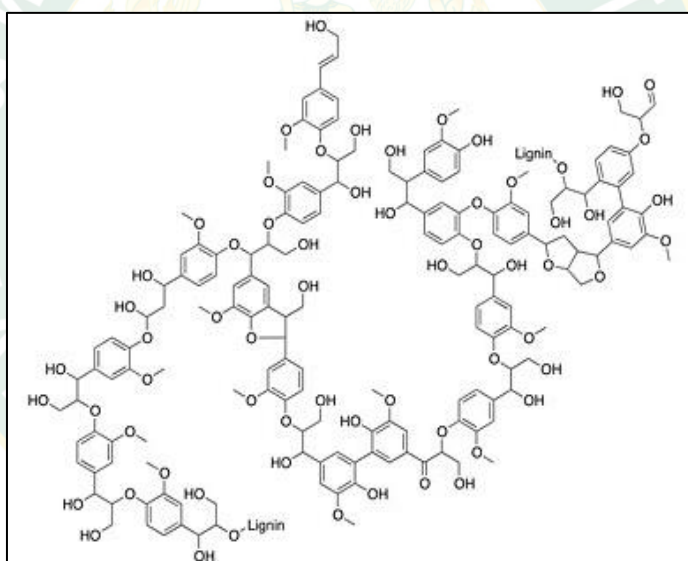


ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Gibson (2013)

3. ลิกนิน

เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืชรองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิด ซึ่งเป็นสารอะโรมาติกดั่งภาพที่ 4 ลิกนินไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่นและไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ บางชนิด เช่น ในเมทานอลหรือเอทานอลที่ร้อน และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น โดยในไม้ใบแคบจะมีลิกนินอยู่ประมาณ 26-32% และไม้ใบกว้างจะมีลิกนินอยู่ประมาณ 20-28% ซึ่งลิกนิน จะพบได้ในส่วนผนังเซลล์ชั้นที่สอง และ middle lamella ของพืชชั้นสูง โมเลกุลของลิกนินจะแทรก อยู่ในช่องว่างระหว่าง cellulose fibrils และเฮมิเซลลูโลสจะทำหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรงโดยการเชื่อมระหว่างเซลลูโลสและลิกนินในผนังเซลล์เข้าไว้ด้วยกัน จึงทำให้โครงสร้างของลิกนิน มีความต้านทานต่อจุลินทรีย์ ส่งผลให้จุลินทรีย์ต้องใช้เวลาในการเข้าทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลาย โครงสร้าง (พชรภณ, 2556)



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน

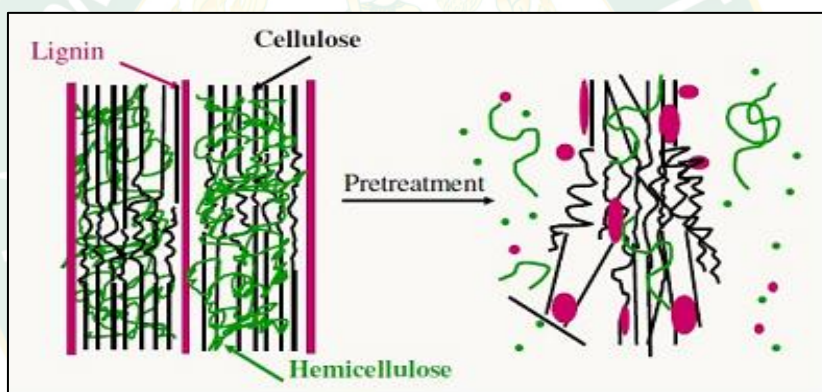
ที่มา: Gregg (n.d.)

การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

1. การปรับสภาพ (Pretreatment)

เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนโครงสร้างหรือกำจัดเอมิเซลลูโลสและลิกนิน ที่เป็นอุปสรรคต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ โดยการปรับสภาพมีจุดประสงค์เพื่อลดความเป็นผลึกของเอมิเซลลูโลส ทำให้โครงสร้างที่เป็นระเบียบของเซลลูโลสและลิกนินที่ติดอยู่แตกออกจากกัน ดังภาพที่ 5 สามารถทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น และเปลี่ยนเป็นน้ำตาล สำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล (Devendra, et al., 2015) ดังนั้น การผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสจำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เอนไซม์เพิ่มสามารถในการผลิตน้ำตาลได้สูงขึ้น



ภาพที่ 5 โครงสร้างเส้นใยพืชก่อนและหลังการปรับสภาพ

ที่มา: Mosier et al. (2005)

วิธีการปรับสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธีหลัก (Zheng, Pan, & Zhang, 2009) คือ

1.1 วิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment)

เป็นวิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลง เพื่อทำการลดขนาดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ และการเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกและเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยามากขึ้น โดยจะขึ้นอยู่กับชนิด สัดส่วน และคุณสมบัติของพืช

1.2 วิธีการทางเคมี (Chemical pretreatment)

เป็นการใช้สารละลายกรดและด่าง โดยการใช้กรดจะเพิ่มความสามารถในการย่อยเอมิเซลลูโลส เนื่องจากเอมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส ชนิดของกรดที่นำมา

ปรับสภาพ ได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก หรือฟอสฟอริก ขณะที่การใช้ต่างจะสามารถเพิ่มการละลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน โดยต่างที่นิยมใช้ในการแยกลิกนิน ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

1.3 วิธีทางกายภาพร่วมกับทางเคมี (Physico-chemical pretreatment)

เป็นวิธีใช้ทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำ และการระเบิดด้วยแอมโมเนีย ซึ่งมีผลทำให้เกิดการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ดี เนื่องจากความร้อนส่งผลทำให้ความเข้มข้นของกรดเพิ่มมากขึ้น จึงสามารถลดความเป็นผลึกของเฮมิเซลลูโลสที่เชื่อมระหว่างเซลลูโลสทำให้เพิ่มการเข้าถึงของเอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลได้ง่ายขึ้น

1.4 วิธีการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

เป็นการปรับสภาพที่ใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเชื้อราทั้งชนิดที่เป็น white-rot, brown-rot และชนิด soft-rot สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ดี ส่วนชนิดที่เป็น brown-rot จะสามารถย่อยสลายพวกเซลลูโลส ขณะที่ white-rot และ soft-rot จะเข้าย่อยสลายพวกลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ส่วนเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ cellulases, glucuronidase, acetylsterase, feruloylsterase, xylanase, laccase, lignin peroxidase และ manganese peroxidase เป็นต้น

โดยวิธีการปรับสภาพดังกล่าวข้างต้น มีผลต่อโครงสร้างเซลลูโลสต่างกัน จึงทำให้แต่ละวิธีมีจุดเด่นจุดด้อยแตกต่างกันดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จุดเด่นและจุดด้อยแต่ละวิธีการปรับสภาพ

วิธีการปรับสภาพ	จุดเด่น	จุดด้อย
วิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment)	<ul style="list-style-type: none"> - เพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ - ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส - ไม่ต้องใช้สารเคมี 	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่สามารถกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส - ใช้พลังงานสูง - ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่น ๆ
วิธีการทางเคมี (Chemical pretreatment)	<ul style="list-style-type: none"> - กำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน - เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลส - เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไป 	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 2 (ต่อ)

วิธีการปรับสภาพ	จุดเด่น	จุดด้อย
วิธีการกายภาพร่วมกับทางเคมี (Physico-chemical pretreatment)	<ul style="list-style-type: none"> - กำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน - ช่วยเพิ่มอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาล - ประสิทธิภาพสูง ใช้พลังงานต่ำ 	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นพิษต่อสภาวะสิ่งแวดล้อม - ต้องใช้สารเคมี - มีสภาวะรุนแรง
วิธีการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่ต้องใช้สารเคมี - ใช้พลังงานต่ำ - เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม 	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้เวลานาน

ที่มา: Ibrahim (2012)

วิธีการปรับสภาพที่ทางกายภาพและทางเคมี เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ เนื่องจากความร้อนมีผลต่อความเข้มข้นของสารเคมีในการปรับสภาพของวัตถุดิบ พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้น ชนิดของสารละลาย และความร้อนที่เพิ่มขึ้น อีกทั้ง การใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันจะส่งผลให้การแตกตัวของน้ำตาลเพิ่มขึ้น และอาจเกิดการเปลี่ยนไปเป็นสารประเภทฟูเฟอรอล สารฟอร์มัลดีไฮด์หรือกรดฟอร์มิก เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะความดันที่สูง ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (Hsu et al., 2010) จากงานวิจัยที่ผ่านอย่างในงานวิจัยของ

Szczodrak (1988) ทำการเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพทางกายภาพและทางเคมีของฟางข้าวสาธิตร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200 °C เป็นเวลา 10 min พบว่า การปรับสภาพฟางข้าวสาธิตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 8% (w/v) สามารถกำจัดลิกนินในฟางข้าวสาธิตสูงกว่า 5.4% ของฟางข้าวสาธิตที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

Okeke (1995) ศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 M ที่อุณหภูมิ 115 °C เป็นเวลา 10 min พบว่า การปรับสภาพสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น 53%

ศุภกิจ และคณะ (2538) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพฟางข้าวพันธุ์ กข 23 ที่บดลดขนาดของฟางเท่ากับ 2.0 mm ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% (w/v) เป็นเวลา 30 min ที่อุณหภูมิ 121 °C พบว่า กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v)

เหมาะสมที่สุดในการย่อยเฮมิเซลลูโลส โดยสารละลายที่ได้มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 11.97 g/L

Xu et. al. (2010) ได้ทำการปรับสภาพพื้สาวิตซ์ด้วยปูนขาว หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 50 °C พบว่า ปูนขาวจำนวน 0.1 g เวลา 24 h ให้ผลดีที่สุด โดยมีผลได้ของกลูโคส ไซโลส และผลรวมน้ำตาลรีดิวซ์ คือ 239.6, 127.2, and 433.4 mg/g และเมื่อเทียบกับที่ไม่ผ่านการปรับสภาพผลได้เป็น 3.15, 5.78, and 3.61 mg/g ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การปรับสภาพด้วยปูนขาว มีผลต่อการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งสามารถนำไปปรับปรุงเพื่อเพิ่มการย่อยของเอนไซม์ นันทิกา และคณะ (2554) น้ำตาลรีดิวซ์จากขางข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิส ด้วยกรด พบว่า เฮมิเซลลูโลส 25.42 เซลลูโลส 58.23 และลิกนิน 14.95%wt หลังทำการปรับสภาพ ขางข้าวฟ่างหวานด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10% (w/w) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 25 min เพื่อกำจัดลิกนิน พบว่า มีปริมาณของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 90.37 %wt ขณะที่ปริมาณของ เฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลงเป็น 5.97 และ 3.56%wt ตามลำดับ

Kang et. al. (2013) ศึกษาผลของเกลืออนินทรีย์ในการปรับสภาพพื้สาวิตซ์ด้วยแอมโมเนียม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์ โดยการปรับสภาพพื้สาวิตซ์ด้วย NaCl, KCl, CaCl₂, ZnCl₂, และ FeCl₃ ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) อุณหภูมิ 200 °C เวลา 15 min พบว่า FeCl₃ สามารถลดละลายเฮมิเซลลูโลสได้ 100% และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงถึง 71.6% โดยมีการประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ตามลำดับต่อไปนี้ FeCl₃ > ZnCl₂ > CaCl₂ > KCl > NaCl

อัปเดตลาตีฟ และคณะ (2557) ทำการปรับสภาพเปลือกกล้วยด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ อัตราส่วนเปลือกกล้วย 1 kg ต่อ 0.09 kg ในปริมาตร 3 L โดยใช้กรดอ่อนอินทรีย์ คือ น้ำส้มสายชู หรือกรดอะซิติกแทนการใช้ จากนั้นนำเปลือกกล้วยที่ผ่านการปรับสภาพย่อยด้วยสารละลาย น้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติก พบว่า การย่อยสลายเปลือกกล้วยด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.74% (v/v) ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 40 min ให้ผลผลิตปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 7.043 g/L

Banerjee et. al. (2016) ได้ทำการปรับสภาพพื้สาวิตซ์ร่วมกับก้านมัสตาร์ด (MSS) โดยใช้ เกลือแกงหรือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.1-5 N ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 60 min และนำมาเปรียบเทียบกับปรับสภาพด้วยน้ำร้อน พบว่า โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 N สามารถกำจัดลิกนินถึง 26%wt ซึ่งใกล้เคียงกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่นิยมนำมาใช้ปรับสภาพ ขณะที่ พื้สาวิตซ์ร่วมกับก้านมัสตาร์ด (MSS) ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพสามารถกำจัดลิกนินได้ 16%wt ดังนั้น การใช้โซเดียมคลอไรด์ปรับสภาพพื้สาวิตซ์ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนในการผลิตเอทานอล จากพื้สาวิตซ์ประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีราคาที่ถูกและไม่เป็นพิษเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วย สารละลายต่างๆ

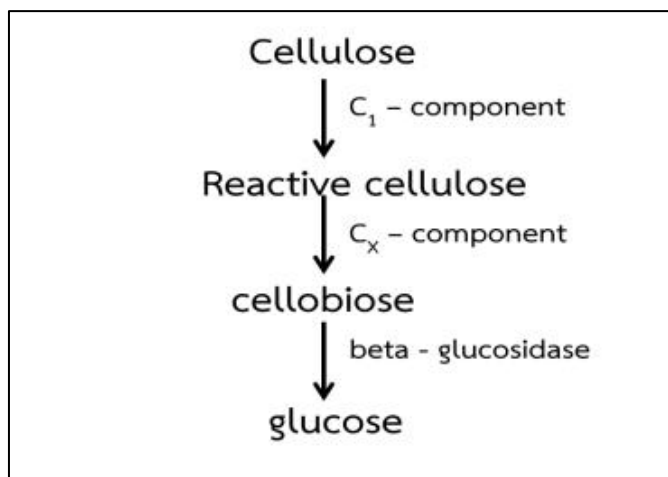
2. การย่อยหรือการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

เป็นการเปลี่ยนโครงสร้างเหล่านี้ให้อยู่ในรูปน้ำตาลสามารถทำได้โดยการย่อย ซึ่งการย่อยเป็นกระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส สำหรับในงานวิจัยนี้ได้เลือกวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ เนื่องจากการย่อยด้วยกรดเครื่องมือที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อน และปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรด มีผลทำให้กลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นอาจมีสารประกอบที่เป็นพิษซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ส่วนการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงและไม่รุนแรง ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง อีกทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ก็ไม่จำเป็นต้องเป็นอุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อนอย่างเช่นการย่อยด้วยกรด นอกจากนี้ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Remil, 2014)

การย่อยด้วยเอนไซม์ เอนไซม์จะทำปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อเปลี่ยนผลผลิตได้เป็นน้ำตาลกลูโคส เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) พบในจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากในพวกเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งที่นิยมนำมาใช้ คือ เซลลูเลสได้จาก *Trichoderma viride* ภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็น *Trichoderma reessi* (พักตร์ประไพ, 2546)

2.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ $\beta(1-4)$ -glycosidic ภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูเลสให้ผลผลิตสุดท้าย คือ น้ำตาลกลูโคส จำเป็นต้องอาศัยระบบเอนไซม์เซลลูเลสที่มีองค์ประกอบ (Component) แตกต่างกัน เอนไซม์เซลลูเลสมีองค์ประกอบหน้าที่แตกต่างกัน 2 องค์ประกอบ คือ C_1 -component เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโครงสร้างเซลลูเลสที่มีอยู่ในธรรมชาติ (native cellulose) ให้เกิดเป็นโครงสร้างที่ง่ายต่อการย่อยสลาย (Reactive cellulose) ต่อไป และ C_x -component คือ ส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย reactive cellulose ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการย่อย reactive cellulose คือ สารประกอบ cellobiose ซึ่งละลายน้ำได้และจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ทั้งนี้ยังมีองค์ประกอบของเอนไซม์ส่วนที่สาม คือ beta - glucosidase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ cellobiose ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ลักษณะของปฏิกิริยาดังภาพที่ 6 (พรเทพ, 2538)



ภาพที่ 6 ลักษณะปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา: พรเทพ (2538)

จากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า เซลลูเลส เป็นไกลโคโปรตีนประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต มีสมบัติละลายน้ำได้ดี โดยทั่วไป เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 °C ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้ เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูง คงทนต่อค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.8 ถึง 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ 4 °C (Fernando et al., 2005)

จากการศึกษางานวิจัยดังตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า คุณสมบัติทางด้านอุณหภูมิ และ pH ของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า ที่นำมาใช้มีผลต่อน้ำตาลกลูโคสและการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาวะในขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตเอทานอล

งานวิจัย	การผลิตเอทานอล	กลูโคส	เอทานอล
Xia et al. (2013)	ผักตบชวา ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 1% (v/v) ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส <i>T.reesei</i> ที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH 5	-	-
ยุทธศักดิ์ (2551)	เส้นใยปาล์ม ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% (w/v)		

ตารางที่ 3 (ต่อ)

งานวิจัย	การผลิตเอทานอล	กลูโคส	เอทานอล
ยุทธศักดิ์ (2551)	ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 6 FPU และเบต้ากลูโคซิเดส 3 IU ที่อุณหภูมิ 50 °C และ pH 5 หมักด้วย <i>S. cerevisiae</i> 10%(v/v) ที่อุณหภูมิ 35 °C	11.21 g/L	0.38 g/L
Abedinifar et al. (2009)	ฟางข้าว ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 5% (v/v) ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 15 FPU ที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH 5 หมักด้วย <i>S. cerevisiae</i>	0.718 g/g	0.41 g/g
Ma et al. (2009)	ฟางข้าว ปรับสภาพด้วยไมโครเวฟ 800 W, 2.45 GHz ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส <i>T.reesei</i> ที่อุณหภูมิ 50 °C และ pH 4.8	-	-
Belal (2013)	ฟางข้าว ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 1% (v/v) และอัลตราซาวนด์ ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส <i>T.reesei</i> 0.495 U ที่อุณหภูมิ 50 °C และ pH 4.8 หมักด้วย <i>S. cerevisiae</i> ที่อุณหภูมิ 30 °C	-	11 g/L
Farzad et al. (2013)	ฟางข้าว ปรับสภาพด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์ 12% (w/v) ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส <i>T.reesei</i> 25 FPU และเบต้ากลูโคซิเดส 50 IU ที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH 4.8 หมักด้วย <i>S. cerevisiae</i> ที่อุณหภูมิ 37 °C	163.5 g/kg	1.2 g ethanol

3. การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก

3.1 เอทานอลและการผลิตเอทานอล

เอทานอล (Ethanol หรือ Ethyl Alcohol) คือแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีสูตรโมเลกุล $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ หรือ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ดังตารางที่ 4 คุณสมบัติติดไฟง่าย มีความไว และค่าออกเทนสูง ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นไฮดรอกซิล ตรีเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ใช้ผลิตอาหารและเครื่องดื่ม ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมยา การผลิตเครื่องสำอาง และใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ เป็นต้น (วิโรจน์, 2553)

ตารางที่ 4 สมบัติทางกายภาพและเคมีของเอทานอล

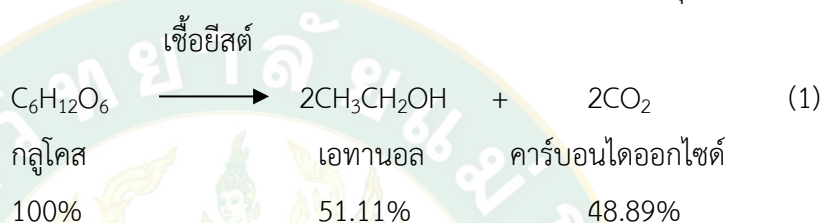
สถานะ	ของเหลว
สี	ใส ไม่มีสี
กลิ่น	เฉพาะตัว
น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	46.07
จุดเดือด ($^{\circ}\text{C}$)	78.4
จุดหลอมเหลว/จุดเยือกแข็ง ($^{\circ}\text{C}$)	-114.3
ความถ่วงจำเพาะ (g/cm^3)	0.789
ความหนาแน่นไอ	1.6
ความหนืด (cP)	1.41
ความดันไอ (mmHg)	43 (ที่ 20°C)
ความสามารถในการละลายน้ำ (g/100 mL)	ละลายน้ำได้ดี

ที่มา: วิโรจน์ (2553)

ปัจจุบันมีการนำเอทานอลใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ โดยนำเอทานอลที่เป็นแอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ตั้งแต่ 95% ไปผสมกับน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่างๆ ตามการเลือกใช้ของแต่ละประเทศ ซึ่งหากผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 10% จะเรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) ถ้าผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 15% เรียกว่า ดีโซฮอล์ (Diesohol) ซึ่งใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน เนื่องจากเอทานอลมีค่าออกเทนสูง โดยค่าออกเทนจะเพิ่มขึ้นตามค่าสัดส่วนของเอทานอลที่ผสมในน้ำมันเบนซิน (อาคม, 2556)

การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปมีอยู่ 2 วิธี คือ วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เป็นกระบวนการทางเคมีที่ใช้เอทิลีนจากปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ โดยเอทานอลที่ผลิตได้จะไม่สามารถนำมาบริโภค ส่วนวิธีการหมัก เป็นกระบวนการผลิตเอทานอล โดยใช้จุลินทรีย์จำพวกยีสต์หมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนกับวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการหมักเอทานอล คือ *Saccharomyces cerevisiae* เพราะสายพันธุ์ชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย

ตามทฤษฎีการหมักเอทานอลโดยใช้น้ำตาลกลูโคส ถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100% ยีสต์จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 51.11% และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.89% ดังสมการที่ 1 (สิริวุทธิ, 2552)



แต่ในทางปฏิบัติการผลิตเอทานอลจะเกิดสามารถเกิดเป็นสารประกอบอื่นๆ ที่ได้จากการหมักของยีสต์ ดังตารางที่ 5

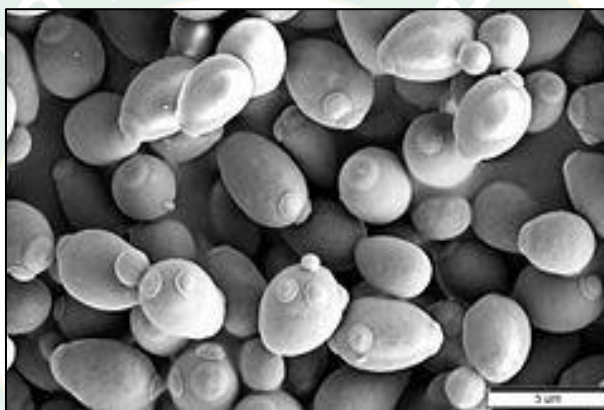
ตารางที่ 5 สารที่ได้จากการผลิตเอทานอลโดยยีสต์

สารที่ได้จากการผลิตเอทานอลโดยยีสต์	ความเข้มข้น (%)
เอทานอล (Ethanol)	48.40
คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide)	46.50
แอสีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde)	0.00-0.03
กรดอะซิติก (Acetic acid)	0.05-0.25
กลีเซอรอล (Glycerol)	2.50-3.60
กรดแลคติก (Lactic acid)	0.00-0.20
กรดซัคซิเนต (Succinic acid)	0.50-0.77
ฟูเซลออยล์ (Fusel oil)	0.25-0.50
เฟอร์ฟูรัล (Furfural)	(เล็กน้อย)

ที่มา: ชุตินา (2548)

3.2 ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล คือ เชื้อยีสต์ โดยเฉพาะพวก *S. cerevisiae* โดยบางชนิดสามารถหมักเอทานอลได้สูงถึง 20% บางชนิดหมักเอทานอลได้เพียง 2-3% ซึ่งยีสต์เป็นรากกลุ่มหนึ่งที่มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี สามเหลี่ยม รีและปลายด้ายหนึ่งแหลม ทรงกระบอกที่มีปลายมน รูปร่างแบบมะนาว ดังภาพที่ 7 ในการเลือกใช้จุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ อย่างกรณี *Zymomonas mobilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงแต่มีชีวมวลต่ำ และมีความทนต่อความเข้มข้นเอทานอลต่ำ ดังนั้น เมื่อคำนึงถึงแง่เศรษฐศาสตร์โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจะนิยมใช้ *S. cerevisiae* ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย (อนุสิษฐ์, 2554)



ภาพที่ 7 ลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา: Arroyo et al. (2009)

3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และการผลิตเอทานอล

3.3.1 ความเข้มข้นของน้ำตาล

แหล่งคาร์บอนที่ยีสต์ใช้ได้ดี ได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาลสูงกว่า 15% (w/v) ทำให้การหมักเอทานอลของยีสต์ลดลง ดังนั้น การใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* มาหมักในสภาวะเช่นนี้ จึงมีผลทำให้อัตราการหมักเล็ดต่ำลง ดังตารางที่ 6 คือ เมื่อกลูโคสมีความเข้มข้นสูงขึ้น อัตราการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* ลดต่ำลง

ตารางที่ 6 การเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ

กลูโคส (g/L)	อัตราการเจริญ (mg/ml.h)	การหมัก (mol _{ethanol} /ml.h)	ผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (%)
100	0.33	54.0	93.5
200	0.24	52.7	66.4
300	0.11	42.5	59.0
400	0.03	14.2	23.6

ที่มา: Panchal (1990)

3.3.2 อุณหภูมิ

ยีสต์แต่ละชนิดเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกมีโซไฟล์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 35-47 °C (สาวิตรี, 2540) ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่ยีสต์จะไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °C

3.3.3 ออกซิเจน

ในการเจริญเติบโตของยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้โครงสร้างที่เป็นไขมันมีเสถียรภาพ และเพื่อรักษาสภาพของกระบวนการต่าง ๆ ขณะที่การเอทานอลจะไม่ใช้ออกซิเจน เนื่องจากออกซิเจนมีผลทำให้การผลิตเอทานอลลดลง

3.3.4 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

ยีสต์สามารถเจริญได้ค่อนข้างดีที่ pH ระหว่าง 3.6-6.0 แต่ pH ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 สำหรับ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลควรมีค่าเท่ากับ 5.0 (Reed & Nagodawithana, 1991)

3.3.5 สารอาหารและโคแฟกเตอร์

สารอาหารบางอย่างอาจไม่เพียงพอสำหรับการหมัก ซึ่งรวมถึงแหล่งไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แอมโมเนียมไอออน วิตามิน เกลือแร่ แร่ธาตุต่างๆ เช่น สังกะสี ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แคลเซียม ซึ่งสารอาหารที่มีความจำเป็นมีดังนี้ (Rose & Harrison, 1970)

3.3.5.1 ไนโตรเจน

เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น นับว่าเป็นส่วนสำคัญที่กระตุ้นการหมักหรือการผลิต

เอทานอล โดยในตัวของยีสต์จะมีปริมาณไนโตรเจนประมาณ 10%wt ซึ่งยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถใช้แอมโมเนียมไอออนได้ เนื่องจากแอมโมเนียมไอออนจัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ

3.3.5.2 ฟอสฟอรัส

ปกติใส่ในรูปของฟอสเฟต ซึ่งเป็นไอออนิกแพคเตอร์ จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ แต่ความเข้มข้นไม่ควรเกิน 4% ของน้ำหนักแห้ง

3.3.5.3 ซัลเฟอร์

ปกติในอุตสาหกรรมใช้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส และความเข้มข้นโดยทั่วไปไม่ควรเกิน 1%wt

3.3.5.4 แร่ธาตุอาหารอื่นๆ

เป็นแร่ธาตุที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยน้อยกว่า 100 ppm ความต้องการแร่ธาตุของยีสต์ค่อนข้างหลากหลาย โดยเฉพาะพวกที่เป็นประจุบวก ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง และเหล็ก สารเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาหรืออยู่ในสถานะที่เสถียร

3.3.6 ความเข้มข้นเอทานอล

ในสภาพที่มีเอทานอลสูงการเจริญและการหมักยีสต์จะถูกยับยั้งเพราะเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์เมื่อเอทานอลมากกว่า 1% โดยน้ำหนักมีผลทำให้การเจริญลดลง และจะหยุดลงเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8% ซึ่งต่อจากนั้นจะเป็นการหมักเอทานอลจนถึงเอทานอลความเข้มข้น 14% โดยน้ำหนัก การที่ยีสต์ไม่เจริญทำให้อัตราการหมักลดลงด้วย *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนเอทานอลมากที่สุด

4. เทคนิคการตรึงเซลล์

4.1 การตรึงเซลล์

4.1.1 ความหมายของการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ได้ดัดแปลงมาจากการตรึงเอนไซม์ โดยเป็นการจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยที่เซลล์จุลินทรีย์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง โดยสภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นอาจจะกำลังเจริญหรือกำลังพักตัว

4.1.2 วิธีการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ คือ การยึดหรือเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์ไว้กับวัสดุตรึงรูป ดังภาพที่ 8 วิธีการตรึงเซลล์สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 วิธี (Kok & Hasirci, 2000) ดังนี้

4.1.2.1 การยึดติดผิวทางกายภาพและยึดติดด้วยประจุ (Physical adsorption and Ionic binding)

วิธีนี้เป็น การดูดหรือยึดเซลล์จุลินทรีย์ที่ผิวของวัสดุตั้งรูป วัสดุตั้งรูปที่นิยมใช้ในวิธีนี้ได้แก่ แผ่นพลาสติกที่มีรูพรุน วัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติ เป็นต้น วิธีนี้มีโอกาสเกิดผลกระทบในแง่ลบต่อเซลล์น้อยเนื่องจากเป็นกระบวนการทางกายภาพ แต่ความคงทนในการยึดเกาะ หรือดูดซับของเซลล์บนวัสดุตั้งรูปก็น้อยเช่นกัน เทคนิคนี้มีการใช้อย่างแพร่หลายในงานทางสิ่งแวดล้อม เช่น การบำบัดน้ำเสียด้วยระบบการกรองแบบชีวภาพ (Trickling filter) เป็นต้น

4.1.2.2. การยึดติดด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding)

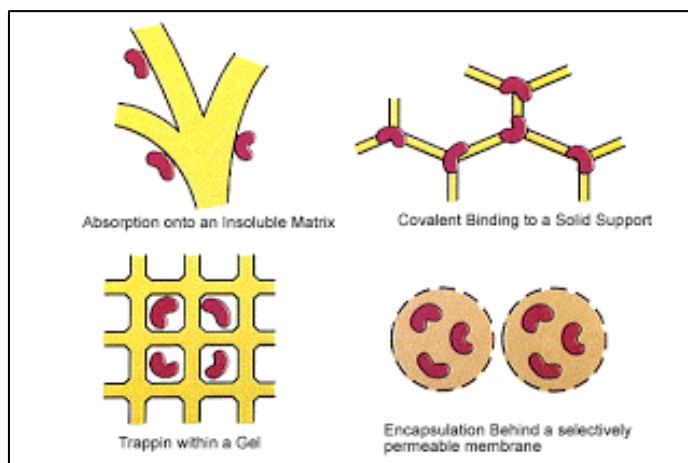
วิธีนี้เป็นกระบวนการสร้างพันธะระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับวัสดุตั้งรูป มีพันธะที่แข็งแรงส่งผลให้เซลล์มีความเสถียรสูง แต่มีข้อเสียสำหรับวัสดุตั้งรูปในกลุ่มนี้จำเป็นต้องเร่งสภาพก่อนการใช้งาน

4.1.2.3 การเชื่อมแบบไขว้ (Cross-linking)

เป็นการใช้สารเคมีเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าไว้ด้วยกัน โดยใช้สารเคมีประเภทพวก glutaraldehyde toluene การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะใช้ปฏิกิริยาที่ต่างกัน ได้แก่ การเชื่อมเซลล์กับสารตัวกลาง การดูดเกาะเซลล์ที่ผิวหน้าสารยึดเกาะ และการเชื่อมเซลล์กับเซลล์ หรือการกักเซลล์ไว้ในสารที่มีรูพรุน ซึ่งวิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากกระบวนการตรึงรูปสามารถส่งผลเสียต่อจุลินทรีย์

4.1.2.4 การดักติด (Entrapment)

วิธีนี้เป็น การดักติดจุลินทรีย์ด้วยวัสดุตั้งรูป ประเภทสารพอลิเมอร์ หรือแผ่นเมมเบรน ซึ่งวิธีนี้แตกต่างจากวิธีอื่นข้างต้น โดยจุลินทรีย์ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาโดยตรงกับวัสดุตั้งรูป แต่จุลินทรีย์จะถูกดักติดอยู่ในวัสดุ ดังนั้น จึงสามารถประยุกต์ใช้งานได้ทั้งจุลินทรีย์และสารโปรตีนชนิดอื่นอื่นๆ วัสดุที่นิยมใช้ในการตรึงรูปประกอบด้วยพอลิเมอร์จากธรรมชาติและสังเคราะห์ เช่น สารประกอบอัลจีเนต สารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในงานหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น



ภาพที่ 8 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ

ที่มา: Adams (2009)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันเอทานอลมีบทบาทสำคัญในการใช้เป็นพลังงานทดแทน และประเทศไทยมีความต้องการเอทานอลเพิ่มมากขึ้น จากการรายงานการใช้เอทานอลในปี 2014 พบว่า มีการใช้เอทานอลเฉลี่ย 3.2 ล้านลิตรต่อวัน และคาดว่าในปี 2021 จะมีการใช้มากถึง 9 ล้านลิตรต่อวัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2558) ทำให้มีความต้องการเอทานอลเพิ่มมากขึ้น จึงมีการศึกษาพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอล เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตและความเข้มข้นเอทานอล โดยกระบวนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต (Separation hydrolysis and fermentation, SHF) จะมีขั้นตอนการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำน้ำตาลที่ได้มาทำการหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลด้วยยีสต์หรือจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ อย่างเช่นในงานวิจัยของ

ผ่องศรี และคณะ (2551) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์เอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักฟางข้าวในอาหารเหลวด้วย *T. reesei* RMUTT01 ในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย *S. cerevisiae* RIT02 โดยเปรียบเทียบกับหมักเอทานอลจากกากมันสำปะหลังแบบรวมปฏิกิริยา (Simultaneous saccharification fermentation, SSF) และแบบแยกกระบวนการผลิต (Separate enzymatic hydrolysis and fermentation, SHF) พบว่า ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการใช้เอนไซม์เซลลูเลส 4% (w/v) ที่ pH 5 และอุณหภูมิห้อง (28 °C) สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 6 g/L ซึ่งการหมักเอทานอลแบบ SSF ใช้เวลาหมักเท่ากับ 4 วัน

สามารถผลิตเอทานอลมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 2 g/L ขณะที่การหมักแบบ SHF ใช้เวลาหมักเท่ากับ 5 วัน มีความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดประมาณ 2.7 g/L

Saha and Cotta (2008) ทำการหมักเอทานอลจากแกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยปูนขาวที่อัตราส่วนแกลบ 1 g ต่อปูนขาว 100 mg ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 1 h จากนั้นนําย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 0.15 ml/g substrate pH 5 อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 72 h และทำการหมักด้วย recombinant *E. coli* สายพันธุ์ FBR5 เมื่อเปรียบเทียบการหมักแบบ SHF และแบบ SSF พบว่า การหมักแบบ SHF ใช้เวลาหมัก 16 h มีความเข้มข้นของเอทานอล 9.8 ± 0.5 g/L ขณะที่การหมักแบบ SSF ใช้เวลา 53 h มีความเข้มข้นสูงเอทานอลถึง 11.0 ± 1.0 g/L

ชนิษฐา และคณะ (2558) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่า การตรึงรูปเซลล์บนลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ 1 g ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 180 min มีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์สูงสุดเท่ากับ $7.48 \pm 0.07 \times 10^8$ cell/g substrate ที่ระยะเวลาการหมัก 15 h สามารถผลิตเอทานอลที่ให้ความเข้มข้นสูงถึง 9.98 ± 0.19 g/L คิดเป็นอัตราการผลิตเอทานอล 0.67 ± 0.01 g/L.h และประสิทธิภาพการหมัก $91.49 \pm 2.40\%$ ซึ่งการหมักด้วยเซลล์ตรึงรูปนี้สามารถทำการหมักซ้ำได้อย่างน้อย 3 ครั้ง ซึ่งมีประสิทธิภาพการหมักเฉลี่ยสูงกว่า 50%

Edita et al. (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* บนแกลบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่า แกลบปริมาณ 2.5 g ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 h มีประสิทธิภาพการตรึงเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.9×10^7 cell/ml จากนั้นทำการหมักเอทานอลเป็นเวลา 48 h พบว่า มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเท่ากับ 62.7% โดยสูงกว่าการหมักด้วยเซลล์อิสระ 0.23 เท่า

Pongthep et al. (2012) ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ *S. cerevisiae* NP 01 บนฟางข้าวฟางหวานด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ โดยศึกษาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นตั้งแต่ 5×10^7 ถึง 2×10^8 cells/ml เพื่อผลิตเอทานอล พบว่า ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 1.0×10^8 cells/ml เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ซึ่งทำการหมักบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 230 g/L สามารถผลิตเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงเท่ากับ 99.28 ± 3.53 g/L

บทที่ 3

วัตถุดิบ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ

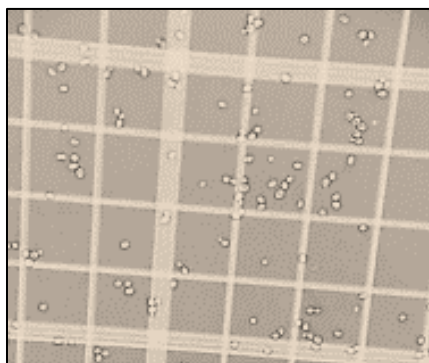
ฟางข้าว ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นฟางข้าวจากพื้นที่ทางการเกษตร อำเภอแม่อรม จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย (18°56'29"N, 98°53'12"E) นำมาตากแดดให้แห้ง และทำการลดขนาดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดประมาณขนาดประมาณ 2.5-3 cm ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ฟางข้าวหลังการลดขนาด

2. เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการหมักเอทานอล คือ *Saccharomyces cerevisiae* เพราะสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

1. เครื่องปั่น (Blender)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electronic balance)
5. เครื่องแก้ว (Glasswaer)
6. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)
7. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
8. ชุดกรองสารด้วยเครื่องปั๊มอากาศ (Suction pump)
9. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
10. ตู้แช่เย็น (Refrigerator)
11. ตู้บ่มเพาะแบบเขย่า (Incubator shaker)
12. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
14. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
15. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
16. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว

1.1 การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายกรด

นำฟางข้าวที่บดจำนวน 1 g มาปรับสภาพด้วยกรดกรดอะซิติก และกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% (v/v) อัตราส่วนพีช 1 g ต่อสารละลาย 20 ml ดังภาพที่ 11 แล้วนำไปปรับสภาพที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 120 min ด้วยตู้อบลมร้อน และที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ด้วยวิธี น้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois et al., 1956) น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธี somogyi-nelson (Nelson, 1994) และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ด้วยวิธี o-Toluidine (Jesse, 1970) ดังแสดงในภาคผนวก ก

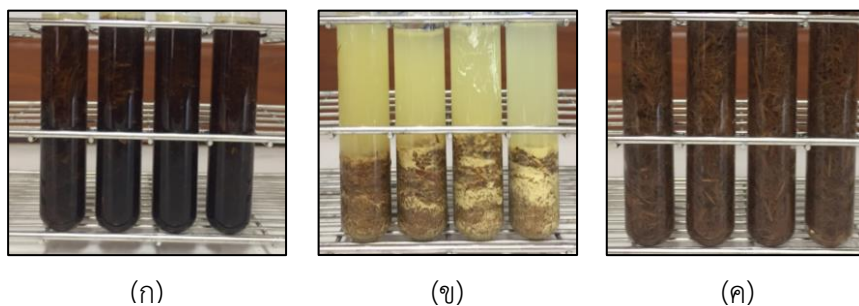
เพื่อนำผลปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้มาเปรียบเทียบ สำหรับคัดเลือกวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสม ก่อนทำการปรับสภาพฟางข้าวในสารละลายต่าง



ภาพที่ 11 ฟางข้าวในสารละลายกรดอะซิกติก และกรดซัลฟูริก ที่ใช้ปรับสภาพ

1.2 การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายต่าง

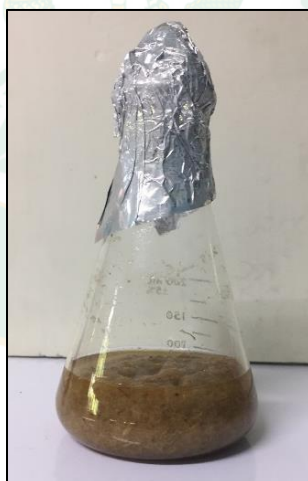
นำของแข็ง ซึ่งเป็นกากของฟางข้าวที่ได้คัดเลือกจากการปรับตามข้อที่ 1.1 ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เท่ากับ 7 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 24 h เก็บฟางข้าวที่อบแห้ง และนำมาปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% (w/v) อัตราส่วนฟาง 1 g ต่อสารละลาย 20 ml ดังภาพที่ 12 จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ด้วยวิธี น้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois et al., 1956) น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธี somogyi-nelson (Nelson, 1994) และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ด้วยวิธี o-Toluidine (Jesse, 1970) ดังแสดงในภาคผนวก ก เพื่อนำผลปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้มาเปรียบเทียบ เพื่อทำการคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของต่าง จากนั้นนำฟางข้าวทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei*



ภาพที่ 12 การปรับสภาพฟางข้าวในสารละลายต่างที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-20% (w/v)
 (ก) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (ข) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (ค) โซเดียมคลอไรด์

2. การย่อยสลายฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำฟางข้าวที่ได้คัดเลือกจากการปรับสภาพตามข้อที่ 1.2 มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยการค้ำที่ปริมาณการโหลดเอนไซม์ 20 FPU/g_{substrate} โดยใช้ปริมาณฟางข้าวเท่ากับ 5 g ใน 0.05 M โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (pH 4.8) ปริมาตรทั้งหมด 100 ml ดังภาพที่ 13 และนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 min ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C อัตราการเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 16 h จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกสารละลายส่วนใส มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด



ภาพที่ 13 การย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

นำเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง YMA (Yeast malt extract agar) ดังแสดงในภาคผนวก ค ทำการเชี่ยยีสต์จำนวน 1 colony ลงในอาหารเหลว YM (Yeast malt extract medium) ปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย กลูโคสปริมาณเท่ากับ 10 g/L เพปโตนปริมาณเท่ากับ

5 g/L มอลต์สกัดปริมาณเท่ากับ 3 g/L และยีสต์สกัดปริมาณเท่ากับ 3 g/L จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 5 และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 min หลังจากนั้นนำไปทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 18 h ดังภาพที่ 14 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการตรึงเซลล์ยีสต์ สำหรับหมักเอทานอล



ภาพที่ 14 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สำหรับตรึงรูปเซลล์และหมักเอทานอล

4. การเตรียมน้ำหมัก

นำฟางข้าวที่ย่อยน้ำตาลที่ได้จากข้อที่ 2 ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็วรอบ 4,200 rpm เป็นเวลา 20 min ดัดแปลงจาก (Belal, 2013) เพื่อแยกส่วนใสที่เป็นสารละลาย สำหรับทำการหมักเอทานอล โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200 g/L ปริมาณที่ใช้ในการหมักเอทานอล เท่ากับ 100 ml จากนั้นเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 5 g/L ยีสต์สกัดปริมาณเท่ากับ 3 g/L โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณเท่ากับ 2 g/L และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตปริมาณ เท่ากับ 1 g/L และปรับ pH เท่ากับ 5 หลังจากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 min



ภาพที่ 15 น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

5. การหมักเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

5.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* บนฟางข้าว ที่ผ่านการปรับสภาพ

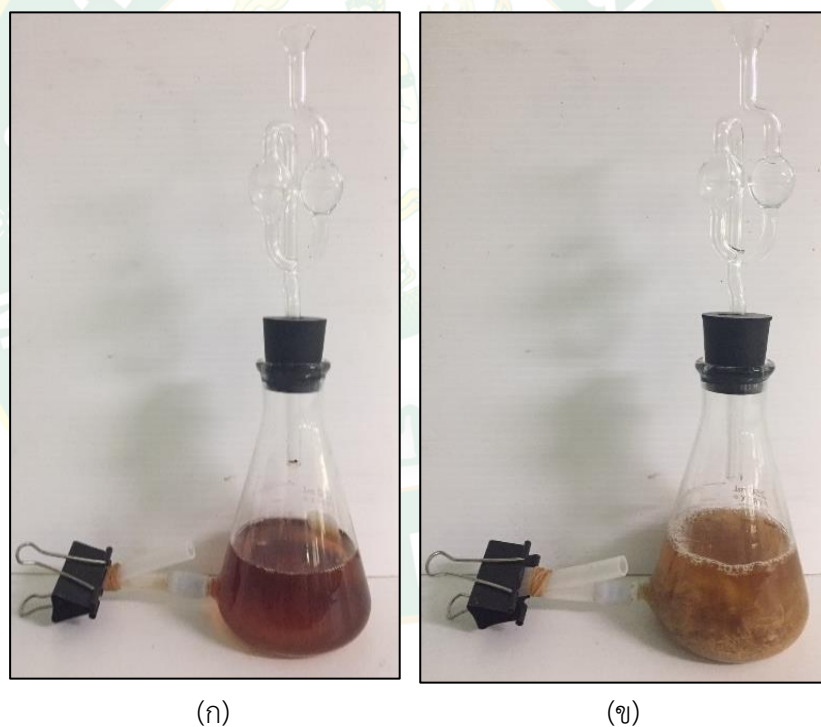
นำเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1.8×10^6 cell/ml ทำการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตรเท่ากับ 100 ml ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 min โดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพตามข้อที่ 1.2 ที่ปริมาณเท่ากับ 1, 2, 3 และ 4 g เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ดังภาพที่ 16 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 h และทำการนับจำนวนเซลล์อิสระที่เหลืออยู่ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ เพื่อคำนวณจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึง



ภาพที่ 16 การศึกษาปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

5.2 การหมักเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

นำส่วนสารละลายที่เป็นน้ำหมักตามข้อที่ 4 ปริมาตรเท่ากับ 100 ml เติมลงในฟลasks ที่มี การตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* บนฟางข้างที่ผ่านการปรับสภาพ ทำการหมักบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h ด้วยระบบ Air locked เพื่อป้องกันอากาศเข้าภายในฟลask ระหว่างการหมัก เอทานอล โดยเปรียบเทียบกับหมักด้วยเซลล์อิสระ ดังภาพที่ 17 ซึ่งการหมักเอทานอลด้วย การตรึงรูปเซลล์ยีสต์จะทำการหมักแบบ repeated batch โดยในรอบต่อไปของการหมักจะทำการ เก็บสารละลายน้ำหมักของเอทานอล เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลด้วยวิธี Dichomate (Seo et al., 2009) และผลได้การผลิตเอทานอล ดังแสดงในภาคผนวก ง ส่วนฟางข้างที่มีการตรึงรูป อยู่จะทำการล้างด้วยน้ำหมักตามข้อที่ 4 ปริมาตรเท่ากับ 25 ml จำนวน 2 ครั้ง ก่อนทำการเติมน้ำหมักสำหรับการหมักในแต่ละครั้ง



ภาพที่ 17 การหมักเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

(ก) ชุดควบคุม (เซลล์อิสระ)

(ข) เซลล์ตรึงรูปยีสต์ *S. cerevisiae*

7. การประเมินต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว

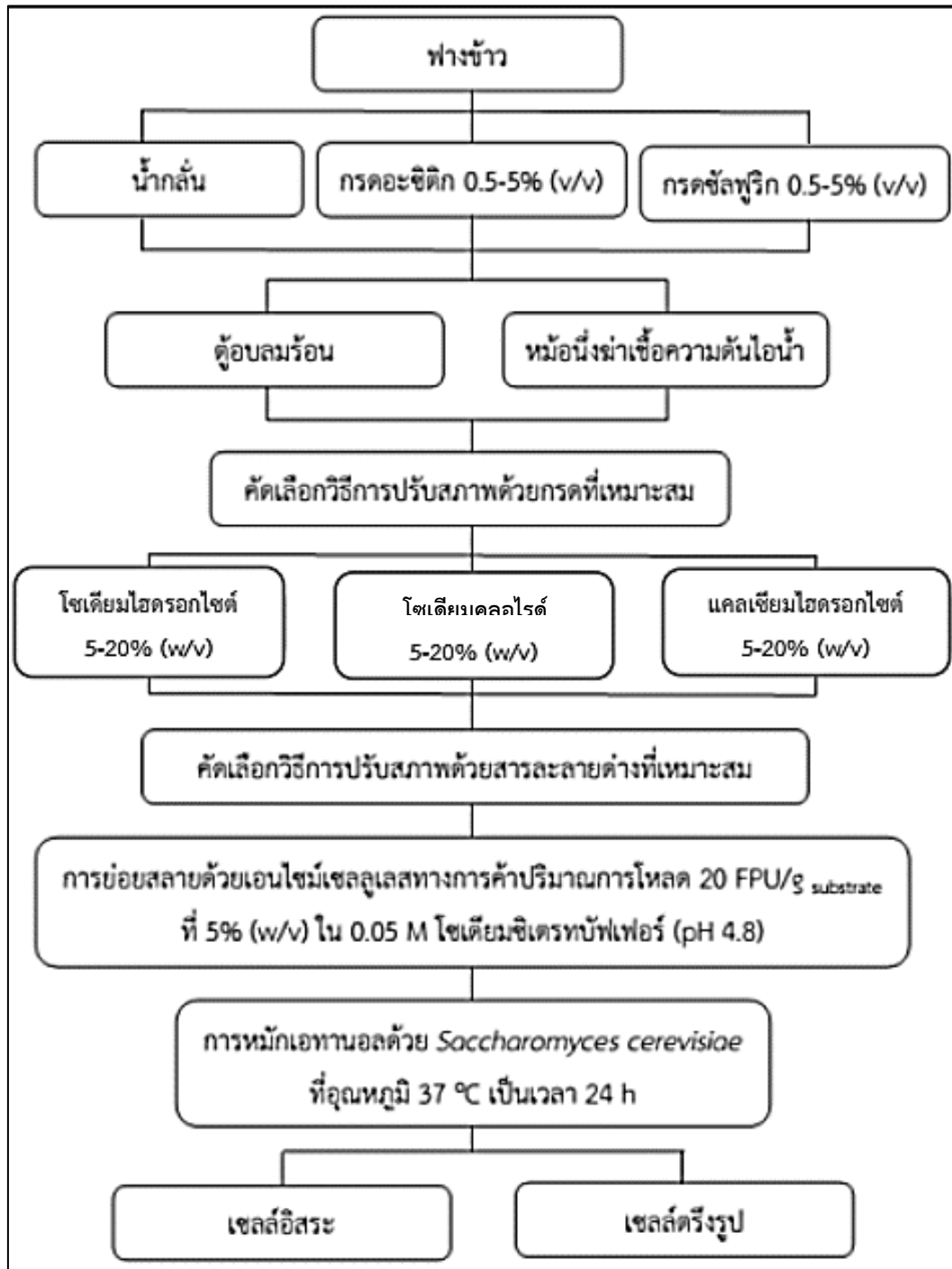
การประเมินต้นทุนจากการผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้ พิจารณาจากสภาวะที่ดีที่สุดของแต่ละขั้นตอน เพื่อนำมาทำการประเมินค่าใช้จ่ายจะประกอบด้วย ค่าสารเคมีในการปรับสภาพฟางข้าว ตามสภาวะที่คัดเลือก และค่าเอนไซม์เซลลูเลสสำหรับขั้นตอนการย่อย

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในแต่ละชุดการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับการรายงานผลการทดลองทางสถิติ จะรายงานด้วยการหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดลอง และใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วย One way Analysis of Variance (ANOVA) ดังแสดงในภาคผนวก ง



ภาพรวมสำหรับการดำเนินงานวิจัยจะประกอบด้วยขั้นตอนการปรับสภาพ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และการหมักเอทานอล ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว

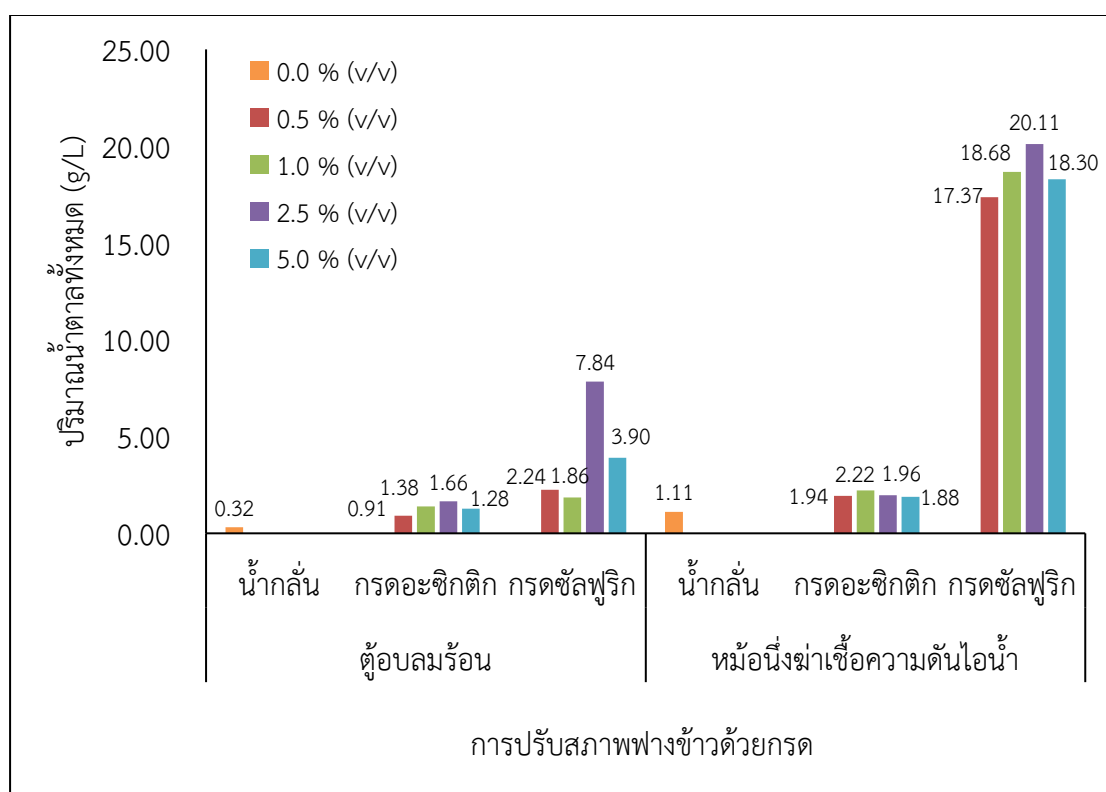
1. ผลการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวในสภาวะกรด

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้การปรับสภาพวิธีการทางเคมีร่วมกับความร้อน โดยการนำฟางข้าวมาปรับสภาพในสารละลายกรดอะซิติก และกรดซัลฟูริก ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% (v/v) พบว่า การให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ มีผลต่อการผลิตน้ำตาลสูงกว่าฟางข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยตู้อบลมร้อน เนื่องจากการใช้สารละลายกรดเจือจางและความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงในการปรับสภาพจะมีประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ดี ซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสแตกตัวออกจากกัน ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลดั่งสมการที่ 2 และสมการที่ 3 (วิทยา, 2553)



เมื่อพิจารณาชนิด และความเข้มข้นของกรด ที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ จะสังเกตเห็นว่า กรดซัลฟูริกมีผลต่อการลดความเป็นผลึกของเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าการใช้กรดอะซิติก ซึ่งสอดคล้องต่อผลความเข้มข้นของน้ำตาลที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาคผนวก ง เนื่องจากกรดซัลฟูริกเป็นกรดแก่ จึงมีความสามารถในการละลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่ากรดอะซิติกที่เป็นกรดอ่อน โดยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 2.5% (v/v) ให้ผลผลิตน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 20.11 g/L คิดเป็น 0.40 g/g dry plant ขณะที่การใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 5% (v/v) ผลผลิตน้ำตาลทั้งหมดที่เกิดขึ้นมีค่าลดลง ดังภาพที่ 19 ทั้งนี้เนื่องจากการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง มีผลทำให้ความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นจนมีมากเกินไป จึงส่งผลกระทบต่อการทำลายโครงสร้างของน้ำตาลทำให้สูญเสียโมเลกุลของน้ำตาลและเกิดเป็นสารประกอบชนิดอื่นที่เป็นพิษ ได้แก่ เพอร์ฟอรอล ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟอรอล และสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดจากการกำจัดน้ำของน้ำตาล จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้ลดลง (Rahman et al., 2006) ทั้งนี้ จากการวิเคราะห์หากกลูโคส ไซโลส และน้ำตาลรีดิวซ์ ดังตารางที่ 7 จะเห็นว่า ผลผลิตของไซโลสมีมากกว่ากลูโคส ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายกรดเจือจางมีผลในการละลายเฮมิเซลลูโลสได้ดี เพราะว่าเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม อย่างเช่น ไซโลส และอะราบิโนส เป็นต้น (ชัชชนันท์, 2557)

เพราะฉะนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด คือ การใช้กรดซัลฟูริก เข้มข้น 2.5% (v/v) ภายใต้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลสได้ดี ซึ่งเกิดเป็น ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ประกอบด้วยกลูโคสเท่ากับ 3.70 g/L ไซโลสเท่ากับ 4.21 g/L และน้ำตาลรีดิวซ์รีดิวซ์ เท่ากับ 9.50 g/L หรือคิดเป็น 0.19 g/g dry plant



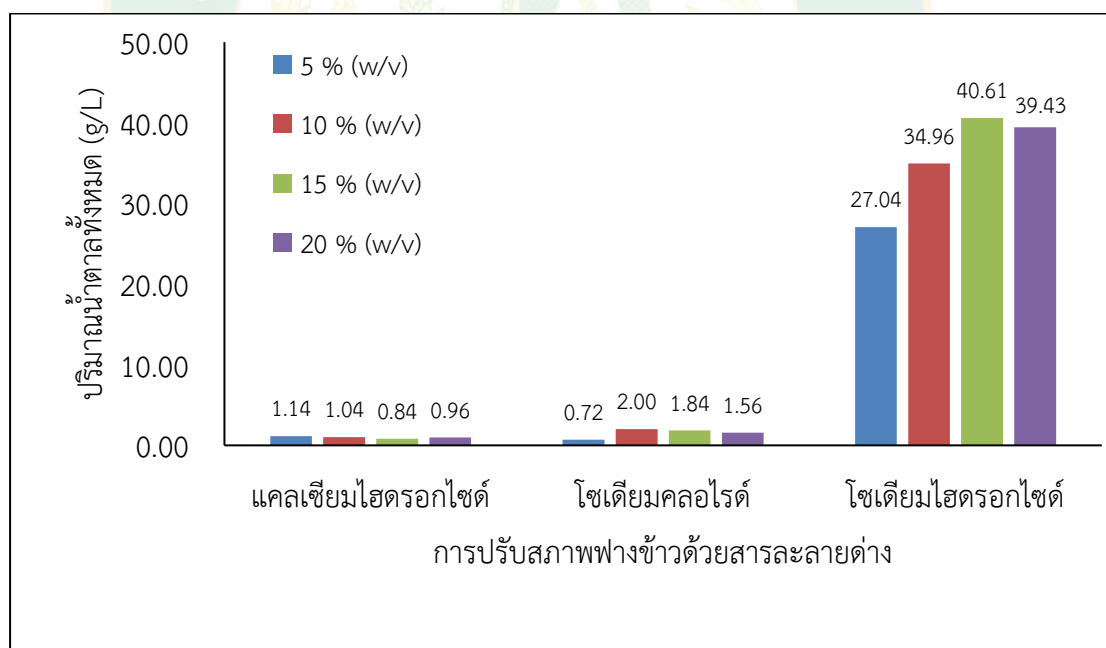
ภาพที่ 19 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดอะซิติก และกรดซัลฟูริก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 120 °C เวลา 120 min ด้วยตู้อบลมร้อน และอุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์เซลลูโลสแ เฮมิเซลลูโลส กักกลูโคส ไซโลส และน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด

การปรับสภาพ	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	กักกลูโคส (g/L)	ไซโลส (g/L)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)
ตูบลมร้อน					
น้ำกลั่น	45.91	24.29	0.09	0.09	0.01
กรดอะซิติก % (v/v)					
0.5	28.00	14.52	0.42	0.22	0.43
1.0	44.01	8.50	0.39	0.19	0.49
2.5	25.91	19.60	0.33	0.20	0.51
5.0	22.23	16.68	0.38	0.14	0.36
กรดซัลฟูริก % (v/v)					
0.5	38.17	15.77	0.81	1.18	0.56
1.0	31.59	10.88	0.67	0.86	0.68
2.5	54.79	9.74	0.70	0.44	0.70
5.0	50.30	12.39	0.30	0.16	0.38
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ					
น้ำกลั่น	45.80	18.92	0.91	0.28	0.43
กรดอะซิติก % (v/v)					
0.5	48.34	17.55	0.37	0.30	0.44
1.0	59.74	12.77	0.45	0.42	0.76
2.5	53.07	15.10	0.38	0.29	0.63
5.0	53.98	14.84	0.40	0.33	0.62
กรดซัลฟูริก % (v/v)					
0.5	56.58	2.41	3.06	3.06	6.94
1.0	58.73	0.63	3.43	2.92	8.33
2.5	70.85	0.49	3.70	4.21	9.50
5.0	68.84	2.29	3.54	3.70	8.42

2. ผลการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวในสภาวะต่าง

จากผลการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดตามสภาวะที่ได้คัดเลือกคือ การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ นำมาปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% (w/v) จาก การวิเคราะห์ พบว่า ผลปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายต่างแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15%v (w/v) จะให้ปริมาณน้ำตาลสูงที่สุด รองลงมาคือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% (w/v) และ แคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5% (w/v) จะให้ปริมาณน้ำตาลน้อยสุด ดังภาพที่ 20 และเมื่อพิจารณา ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15% (w/v) พบว่า ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 40.61 g/L หรือคิดเป็น 0.81 g/g dry plant ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเอทานอล จากฟางข้าวที่ปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 12% (w/v) ที่มีปริมาณน้ำตาล 0.64 g/g dry plant (Moridi et al., 2013)

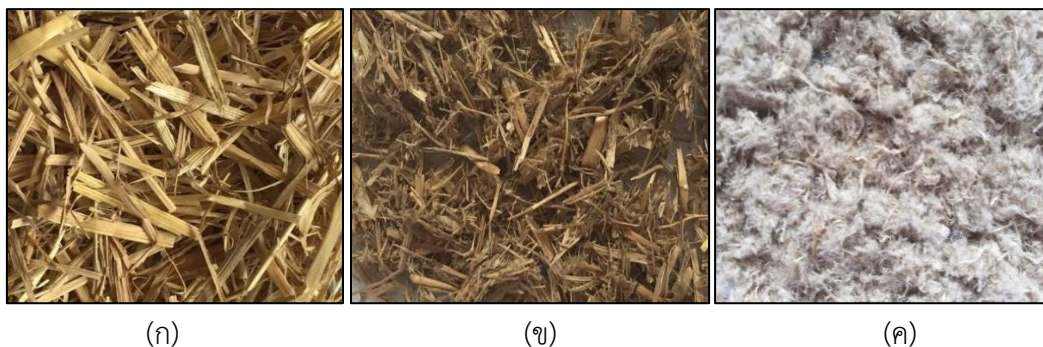


ภาพที่ 20 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด 2.5% (v/v) ร่วมกับสารละลายต่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์เซลลูโลส แอมีเซลลูโลส กับกลูโคส ไชโลส และน้ำตาลรีดิวิซ์ ที่เกิดจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายต่าง

การปรับสภาพ	เซลลูโลส (%)	แอมีเซลลูโลส (%)	กลูโคส (g/L)	ไชโลส (g/L)	น้ำตาลรีดิวิซ์ (g/L)
แคลเซียมไฮดรอกไซด์ % (w/v)					
5	68.39	0.22	0.36	0.20	0.92
10	67.62	0.25	0.32	0.17	0.88
15	68.21	0.35	0.22	0.13	0.85
20	67.94	0.35	0.19	0.13	0.85
โซเดียมคลอไรด์ % (w/v)					
5	45.71	0.45	0.26	0.04	0.34
10	49.32	0.19	0.36	0.04	0.49
15	44.42	0.43	0.29	0.05	0.42
20	29.59	0.20	0.17	0.11	0.34
โซเดียมไฮดรอกไซด์ % (w/v)					
5	73.14	0.41	12.44	1.66	19.26
10	75.75	0.38	18.15	0.21	20.36
15	90.14	0.19	20.10	0.15	23.11
20	84.65	0.40	9.13	0.12	11.81

จากการวิเคราะห์หาเซลลูโลส แอมีเซลลูโลส และปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ ดังตารางที่ 8 พบว่า แอมีเซลลูโลสมีปริมาณลดลง ในขณะที่สัดส่วนของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับสารละลายความเข้มข้นของกลูโคสและไชโลสที่เกิดขึ้น เนื่องจากสารละลายต่างสามารถกำจัดแอมีเซลลูโลสและลิกนินที่เกาะแทรกอยู่กับเซลลูโลส และยังช่วยเพิ่มพื้นผิวของเซลลูโลส (Ibrahim, 2012) ทั้งนี้ ภายหลังจากปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) จะเห็นว่า ฟางข้าวหลังการปรับสภาพมีลักษณะเป็นเส้นใยพองตัวที่มีความอ่อนนุ่ม และมีสีขาวขุ่น ดังภาพที่ 21



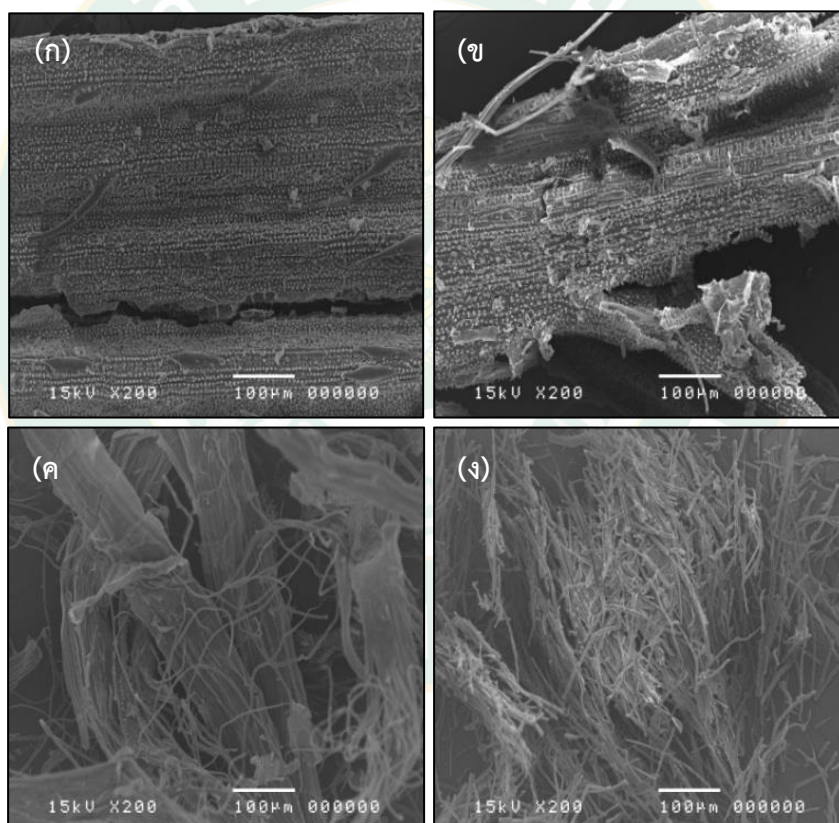
ภาพที่ 21 ลักษณะฟางข้าว (ก) ก่อนการปรับสภาพ, (ข) หลังการปรับสภาพด้วยกรด และ (ค) หลังการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดร่วมกับด่าง ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

จากการส่งวิเคราะห์ห้องค์ประกอบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยใช้วิธีการตาม Detergent method ดังตารางที่ 9 พบว่า ฟางข้าวหลังผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 2.5% (v/v) ไม่มีเหลืออยู่ และสัดส่วนของลิกนินเพิ่มขึ้นเท่ากับ 15.30%wt ขณะที่ฟางข้าวหลังผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) มีสัดส่วนเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 90.29%wt และลิกนินลดลงเท่ากับ 1.83%wt เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสถูกลดความเป็นผลึก จึงทำให้การจัดเรียงโครงสร้างไม่เป็นระเบียบ และเมื่อให้ความร้อนภายใต้ความดันสูงร่วมกับการใช้สารละลายกรดและด่างที่มีความเข้มข้นมากพอ เป็นผลทำให้สามารถดึงลิกนินออกจากเซลลูโลสทำให้เกิดการแตกพันธะออก จะส่งผลทำให้เอนไซม์ง่ายต่อการเข้าไปย่อยเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้น (Brodeur et al., 2011) โดยจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่เกิดได้จากลักษณะพื้นผิวของฟางข้าว ก่อนและหลังผ่านการปรับสภาพตามการคัดเลือกที่ได้จากภาพถ่ายอิเล็กตรอนไมโครกราฟ (Scanning Electron Microscope, SEM) ดังภาพที่ 22

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 2.5% (v/v) ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 15% (w/v) ภายใต้การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ เป็นวิธีการปรับสภาพฟางข้าวที่เหมาะสม

ตารางที่ 9 องค์ประกอบฟางข้าวก่อนและหลังปรับสภาพ ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

วิธีการปรับสภาพ	องค์ประกอบของฟางข้าว (%wt)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ก่อนปรับสภาพ	43.21	23.00	4.37
หลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v)	71.99	0.00	15.30
หลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (w/v)	90.29	0.00	1.83



ภาพที่ 22 ลักษณะพื้นผิวของฟางข้าว (ก) ก่อนปรับสภาพ, (ข) หลังปรับสภาพด้วยกรด, (ค) หลังปรับสภาพด้วยสารละลายกรดร่วมกับด่าง และ (ง) หลังการย่อยด้วยเอนไซม์

ผลการย่อยสลายฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำฟางข้าวที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและต่างตามการคัดเลือก โดยใช้ น้ำหนักฟางปริมาณเท่ากับ 5 g แซ่ในสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ปริมาตรเท่ากับ 100 ml และเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 20 FPU/g_{substrate} จากนั้นนำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 42°C อัตราการเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 16 h นำส่วนที่เป็นสารละลายมาวิเคราะห์ หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กลูโคส) ดังตารางที่ 10 พบว่า หลังการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ฟางข้าว ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 6.75 ขณะที่ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 202.11 g/L ซึ่งจะเห็นได้ว่า ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพมีความเข้มข้นน้ำตาลมากกว่าฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพถึง 29.94 เท่า เนื่องมาจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ส่งผลทำให้ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และช่วยเพิ่มพื้นที่ในการย่อยด้วยเอนไซม์มีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Remill et al., 2014)

ตารางที่ 10 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากฟางข้าวโดยการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

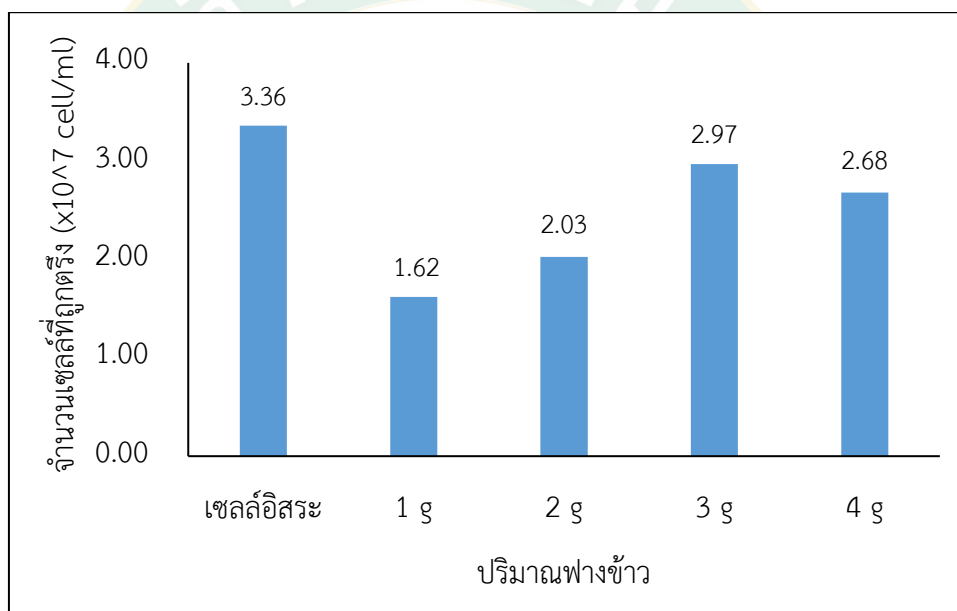
ตัวอย่าง	น้ำตาลทั้งหมด (g/L)	
	ก่อนย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	หลังย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส
ฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ	0.07	6.75
ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	0.93	202.11

จากภาพที่ 22 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวฟางข้าว จะเห็นว่า ก่อนการปรับสภาพฟางข้าว มีลักษณะผิวที่หยาบและจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ ซึ่งหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 2.5% (v/v) ผิวของฟางข้าวจะมีรอยแตกเป็นลักษณะฉีกหลุดออกตรงบริเวณขอบผิว และเมื่อหลังผ่านการปรับสภาพต่อด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 15% (w/v) มีผลทำให้การจัดเรียงโครงสร้างไม่เป็นระเบียบ โดยฟางข้าวจะเกิดการขยายตัวออกมาซึ่งจะเห็นเป็นลักษณะคล้ายเส้นใยที่กำลังฉีก ทั้งนี้เนื่องมาจากกลไกที่ผิวของฟางข้าวได้ถูกกำจัดออกไป ซึ่งเป็นผลดีสำหรับการทำงานของเอนไซม์ให้สามารถเข้าไปทำงานได้ง่ายขึ้น และเมื่อนำฟางข้าวมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ จะเห็นได้ว่า ฟางข้าวมีลักษณะคล้ายแท่งเส้นใยเล็กๆ ที่ขาดออกจากกัน และแตกแยกออกมาอย่างกระจัดกระจายอย่างไม่เป็นระเบียบ

ผลการผลิตเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* บนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ

จากการศึกษาปริมาณฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพจำนวน 1, 2, 3 และ 4 g พบว่า ฟางข้าวปริมาณเท่ากับ 3 g ส่งผลให้การเกาะติดของเซลล์ยีสต์ดีที่สุด ดังภาพที่ 23 และเมื่อเพิ่มปริมาณฟางข้าวที่ปริมาณเท่ากับ 4 g การยึดเกาะติดของเซลล์ยีสต์มีจำนวนลดลง ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากปริมาณของฟางข้าวที่เพิ่มมากเกินไปจะทำให้พื้นที่ของวัสดุตรึงมีมากกว่าจำนวนเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนย้ายและการเจริญเติบโตของยีสต์ (Edita et al., 2010)



ภาพที่ 23 จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงบนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ

2. ผลการหมักเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

การหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีความเข้มข้นประมาณ 200 g/L ปรับ pH เท่ากับ 5 แล้วทำการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพจำนวน 3 g ปริมาตร 100 ml มีเชื้อเริ่มต้น 1.8×10^6 cell/ml จากนั้นนำไปหมักที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h และทำการลงหมักเก็บตัวอย่างทุก 24 h ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและจำนวนของเซลล์ยีสต์ที่เหลือ ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่าพารามิเตอร์ ที่ได้จากการหมักแบบด้วยเซลล์อิสระ และการหมักแบบ repeated batch ในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h

การหมัก	ปริมาณเอทานอล (% v/v)	ผลได้เอทานอล (g/g)	กลูโคสที่เหลือ (g/L)	จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เหลือ (cell/ml)
เซลล์อิสระ	14.58	0.57±	15.77	3.73x10 ⁷
เซลล์ตรึงรูป				
1	16.70	0.65	13.06	1.18x10 ⁷
2	16.24	0.63	11.95	1.14x10 ⁷
3	16.28	0.64	11.02	1.13x10 ⁷
4	16.06	0.63	12.77	1.66x10 ⁷
5	14.74	0.58	16.25	1.99x10 ⁷
6	13.57	0.53	17.63	2.06x10 ⁷
7	13.35	0.52	17.74	2.11x10 ⁷
8	12.48	0.49	19.17	2.23x10 ⁷
9	12.50	0.49	19.42	2.38x10 ⁷
10	12.42	0.48	21.76	2.41x10 ⁷
11	12.17	0.48	21.02	2.58x10 ⁷
ค่าเฉลี่ย	14.23	0.56	16.53	1.90x10 ⁷

จากการหมักเอทานอลแบบ repeated batch จำนวน 11 ครั้ง พบว่า เอทานอลที่เกิดขึ้น มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 12.17 ถึง 16.70% (v/v) มีค่าเฉลี่ยโดยรวม 14.23% (v/v) คิดเป็นผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.56 g/g ซึ่งมีความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือเฉลี่ยโดยรวม 16.53 g/L และจำนวนเซลล์ยีสต์ที่เหลือเฉลี่ยโดยรวม 1.90x10⁷ cell/ml ทั้งนี้ เอทานอลที่เกิดขึ้นยังคงมีความเข้มข้นเอทานอลที่สูงและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับงานวิจัยที่หมักเอทานอลโดยใช้รากไม้คอร์กเป็นวัสดุตรึงรูปเซลล์สามารถทำการหมักเอทานอลได้จำนวน 10 ครั้ง มีความเข้มข้นเอทานอลเพียง 10.51±0.021% (v/v) (Tang et al., 2013) นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าการหมักเอทานอลในครั้งที่ 5 ถึงครั้งที่ 11 จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เหลือมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากฟางข้าวเกิดการเปื่อยจึงทำให้เซลล์ยีสต์ในฟางข้าวสามารถหลุดออกจากการยึดเกาะขณะที่ทำการล้าง เพื่อเติมน้ำหมักสำหรับหมักในแต่ละรอบถัดไป จึงส่งผลทำให้การผลผลิตเอทานอลลดลง (Pongthep et al., 2012) อย่างไรก็ตาม ในการหมักเอทานอลแบบ

repeated batch ยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับ การหมักเอทานอลแบบเซลล์อิสระ

ผลการประเมินต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว

สำหรับการประเมินต้นทุนจากการผลิตเอทานอล ในงานวิจัยนี้พิจารณาจากสภาวะที่ดีที่สุด ของแต่ละขั้นตอน เพื่อนำมาทำการประเมินค่าใช้จ่าย ซึ่งประกอบด้วย ค่าสารเคมีในการปรับสภาพ ฟางข้าวตามสภาวะที่คัดเลือก และค่าเอนไซม์เซลลูเลส ดังตารางที่ 1

ราคาสารเคมีที่ใช้มีดังนี้

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% ขนาด 2.5 L ราคา 475 บาท
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 99% ขนาด 1 kg ราคา 590 บาท
3. เอนไซม์เซลลูเลส *Trichoderma reesei* ขนาด 100 g ราคา 2,500 บาท

ตารางที่ 1 ต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นวัสดุตั้งรูปเซลล์ ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้กระบวนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต

รายการต้นทุน	หน่วย
กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% ที่ความเข้มข้น 2.5% (v/v) ใช้ 10.20 ml	1.94 bath
โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 99% ที่ความเข้มข้น 15% (w/v) ใช้ 60.60 g	35.75 bath
เอนไซม์เซลลูเลส 1.40 g	35.00 bath
ราคารวมต่อเอทานอลที่ผลิตได้ (เอทานอล 86.50 ml)	72.69 bath
ราคาต้นทุนการผลิตเอทานอล	0.84 bath/ml

จากการประเมินต้นทุนเบื้องต้นของการหมักสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณ 86.50 ml จากการใช้ปริมาณฟางข้าวเริ่มต้น 30 g พบว่า ราคาต้นทุนการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.84 bath/ml หรือ 840 bath/L ซึ่งเมื่อพิจารณาการหมักแบบ repeated batch ที่สามารถหมักเอทานอลซ้ำ เป็นจำนวน 11 ครั้ง จะมีความคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์กว่าการผลิตเอทานอลแบบเซลล์อิสระ เนื่องจากผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเทคนิคการตั้งรูปเซลล์สามารถเพิ่มความเข้มข้น เอทานอลที่เกิดขึ้น และยังช่วยลดต้นทุนในส่วนของจุลินทรีย์ที่ใช้เตรียมในกระบวนการผลิตเอทานอล

ผลการประเมินศักยภาพการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว

จากการวิเคราะห์ตามสมภาวะการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวปริมาณ 1 ตัน สามารถผลิตเอทานอลประมาณ 604.17 ลิตรต่อวัน เมื่อพิจารณาจากศักยภาพปริมาณฟางข้าวในประเทศ พบว่าปริมาณฟางข้าวที่เกิดขึ้นมีประมาณ 19 ล้านตัน โดยมีสัดส่วนการนำไปใช้ประโยชน์ 22% ส่วนที่ยังไม่มีการใช้ประโยชน์ 48% และถูกเผาทิ้งประมาณ 30% (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการความยั่งยืนด้านสิ่งแวดล้อมด้านเศรษฐกิจสังคมของการใช้ฟางข้าว สำหรับอาหารสัตว์ พลังงานและปุ๋ยในประเทศไทย, 2559) จากการประเมินศักยภาพการผลิตเอทานอลของฟางข้าวที่มีปริมาณคงเหลือ 9.12 ล้านตัน จะสามารถผลิตเอทานอลประมาณ 24.54 ล้านลิตรต่อวัน ดังตารางที่ 12 ซึ่งเอทานอลที่ผลิตได้มีปริมาณสูงกว่า 53.95% เมื่อเทียบตามแผนพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกที่คาดว่าจะในปี 2579 จะสามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 11.30 ล้านลิตรต่อวัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2558) เพราะฉะนั้น ฟางข้าวจึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอล และการผลิตเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจนำไปการประยุกต์ใช้และพัฒนาต่อยอดสำหรับเพิ่มผลได้ในการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 12 ปริมาณชีวมวล (ฟางข้าว) ในประเทศไทย

ฟางข้าว แต่ละภูมิภาค	พื้นที่ เก็บเกี่ยว (ไร่)	ปริมาณ ผลผลิต (ตัน/ไร่)	ปริมาณฟางข้าว ที่เกิดขึ้น (ตัน)	ปริมาณฟางข้าว ที่เหลือ (ตัน)*	ศักยภาพ การผลิตเอทานอล (พันลิตรต่อวัน)**
ภาคเหนือ	41,874	13,417,106	6,574,382	5,128,018	8,488
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	14,566	14,019,942	6,869,772	5,358,422	8,869
ภาคกลาง	196,451	5,210,976	2,553,378	1,991,635	3,296
ภาคตะวันตก	29,693	3,631,162	1,779,269	1,387,830	2,297
ภาคตะวันออก	105,649	1,848,101	905,569	706,344	1,169
ภาคใต้	4,883	659,709	323,257	252,141	417
รวมทั้งหมด	393,116	38,786,996	19,005,628	14,824,390	24,538

หมายเหตุ: * คือ สัดส่วนฟางข้าวที่ไม่มีการใช้ประโยชน์ 78%

** คือ เทียบจากปริมาณการผลิตเอทานอล 604.17 ลิตรต่อวัน (ฟางข้าวปริมาณ 1 ตัน)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะเห็นได้ว่า ฟางข้าวก่อนการปรับสภาพฟางข้าวประกอบด้วย เซลลูโลส 43.21% เฮมิเซลลูโลส 23.00% และลิกนิน 4.30% เมื่อนำฟางข้าวมาผ่านการปรับสภาพ ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ภายใต้การให้ความร้อนด้วยหม้อน้ำเชื่อมความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min พบว่า สารละลายกรดสามารถละลาย เฮมิเซลลูโลสส่งผลให้ปริมาณเซลลูโลสและลิกนินเพิ่มขึ้นเท่ากับ 71.99 และ 15.30%wt ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเฮมิเซลลูโลสมีการจัดเรียงโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบ และเมื่ออยู่ ภายใต้ความร้อนสูงและกรดที่มีความเข้มข้นมากพอเป็นผลทำให้สามารถทำให้ลิกนินแตกพันธะออก ทำให้มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20.11g/L หรือคิดเป็น 0.40 g/g _{dry plant} และน้ำตาลรีดิวิซ์ เท่ากับ 9.50 g/L หรือคิดเป็น 0.19 g/g _{dry plant} ซึ่งมีกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 3.70 g/L และ 4.21 g/L ตามลำดับ

จากนั้นทำการปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง พบว่า ฟางข้าวหลังผ่านการปรับสภาพด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) มีปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 90.29% และลิกนินลดลง เท่ากับ 1.83% เนื่องจากสารละลายต่างสามารถดึงลิกนินออกจากเซลลูโลส ทำให้เกิดการแตกพันธะ ออกจากกัน โดยให้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 40.61 g/L หรือคิดเป็น 0.81 g/g _{dry plant} และ น้ำตาลรีดิวิซ์เท่ากับ 23.11 g/L หรือคิดเป็น 0.46 g/g _{dry plant} ซึ่งมีกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 20.10 และ 0.15 g/L ตามลำดับ

หลังจากนั้นนำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและต่างดังกล่าวข้างต้น มาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส *Trichoderma reesei* มีกิจกรรมของเอนไซม์ 20 FPU/g _{substrate} ที่อุณหภูมิ 42 °C อัตราการเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 16 h พบว่า มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด เกิดขึ้นเท่ากับ 202.11 g/L โดยความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพมี มากกว่า 29.94 เท่าของฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

ต่อมาได้ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* บนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ ในปริมาณต่างๆ พบว่า ฟางข้าวปริมาณ 3 g ให้ผลการเกาะติดของเซลล์ดีที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์ ที่ถูกตรึงเท่ากับ 2.97×10^7 cell/ml จากนั้นทำการหมักเอทานอลด้วยวิธีการตรึงรูปเซลล์ยีสต์

บนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพเทียบกับการหมักด้วยเซลล์อิสระ ที่มีความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 1.8×10^6 cell/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h พบว่า การหมักเอทานอลด้วยวิธีการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพมีความเข้มข้นเอทานอลที่สูงกว่าการหมักแบบอิสระ โดยสามารถหมักซ้ำได้เป็นจำนวน 11 ครั้ง และมีความเข้มข้นเอทานอลเฉลี่ยโดยรวม 14.23% (v/v) คิดเป็นผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.56 g/g

จากการประเมินต้นทุนเบื้องต้น พบว่า ราคาต้นทุนการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.84 bath/ml ซึ่งเมื่อพิจารณาการหมักแบบ repeated batch ที่สามารถหมักเอทานอลซ้ำเป็นจำนวน 11 ครั้ง จะมีความคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์กว่าการผลิตเอทานอลแบบเซลล์อิสระ เนื่องจากผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเทคนิคการตรึงรูปเซลล์สามารถเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น และยังช่วยลดต้นทุนในส่วนของคุณสมบัติที่ใช้เตรียมในกระบวนการผลิตเอทานอล

และจากการประเมินศักยภาพการผลิตเอทานอลที่ปริมาณฟางข้าวคงเหลือ 9.12 ล้านตัน จะสามารถผลิตเอทานอลประมาณ 24.54 ล้านลิตรต่อวัน โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีปริมาณสูงกว่า 53.95% เมื่อเทียบตามแผนพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกที่คาดว่าในปี 2579 จะสามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 11.30 ล้านลิตรต่อวัน ดังนั้น การนำฟางข้าวมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยเทคนิคการตรึงรูปเซลล์ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจนำไปประยุกต์ใช้ และพัฒนาต่อยอดสำหรับเพิ่มผลได้ในการผลิตเอทานอล เพื่อพัฒนาพลังงานทดแทนที่ยั่งยืนสำหรับประเทศไทย

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถนำวิธีการปรับสภาพที่ได้ไปช่วยในการเตรียมวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลจากชีวมวลหรือวัตถุดิบชนิดอื่น
2. สามารถนำเทคนิคการตรึงรูปเซลล์ที่ได้ไปพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลในการต่อยอดสู่ระดับอุตสาหกรรม
3. ในกระบวนการผลิตเอทานอลควรรูปแบบมีวิธีการผลิตเอทานอลที่หลากหลาย
4. ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นนอกเหนือจากชนิด และความเข้มข้นของสารละลาย เพื่อเป็นแนวทางในการออกแบบระบบสำหรับการย่อยของเอนไซม์และการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์ และกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric (Dubois et al., 1956)

1. สารเคมี

1. สารละลายฟีนอล 5% (w/v) เตรียมโดยละลายฟีนอล 5 g ในน้ำกลั่น 100 ml
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% (v/v)

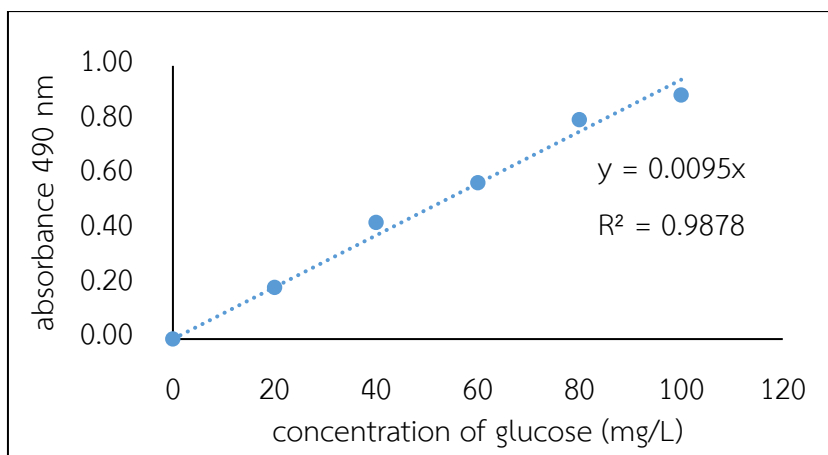
2. วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)
2. เติมสารละลายฟีนอล 1 ml ลงในหลอดทดลองข้อ 1.
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% (v/v) 5 ml ลงในสารผสมข้อ 2. ตั้งทิ้งไว้ 10 min จากนั้นนำไปเขย่าผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 min
4. นำตัวอย่างที่ทำการทดลองไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm เทียบกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง

3. การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ตารางผนวกที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Phenol sulfuric

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (mg/l)	ค่าการดูดกลืนแสง (490 nm)
0	0.0000
20	0.1894
40	0.4276
60	0.5719
80	0.8035
100	0.8935



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (น้ำตาลทั้งหมด)

4. การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

สามารถคำนวณได้โดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด คือ $y = 0.0095x$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความยาวคลื่น 490 nm
และ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (mg/L)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogi-Nelson (Nelson, 1994)

1. สารเคมี

1. Low-alkalinity reagent of Somogyi

สารละลาย A: เตรียมโดยชั่ง Na_2CO_3 25 g, Rochelle salt 25 g, anhydrous Na_2SO_4 200 g และ NaHCO_3 20 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 1,000 ml

สารละลาย B: เตรียมโดยชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.5 g ละลายในน้ำกลั่น 50 ml และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1-2 หยด

สารละลาย C: ผสมสารละลาย B ลงในสารละลาย A ที่อัตราส่วน 1:25 พร้อมคนให้เข้ากัน สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์แต่ละชุดการทดลอง

2. Arsenomolybdate reagent of Nelson

สารละลาย D: เตรียมโดยชั่ง $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 g ละลายในน้ำกลั่น 450 ml แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% (v/v) ลงไป 21 ml

สารละลาย E: เตรียมโดยชั่ง $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g ละลายในน้ำกลั่น 25 ml หลังจากนั้นนำสารละลาย E เติมลงในสารละลาย D แล้วทำการเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ml แล้วนำสารละลายผสมนี้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 h เก็บไว้ในขวดสีชา

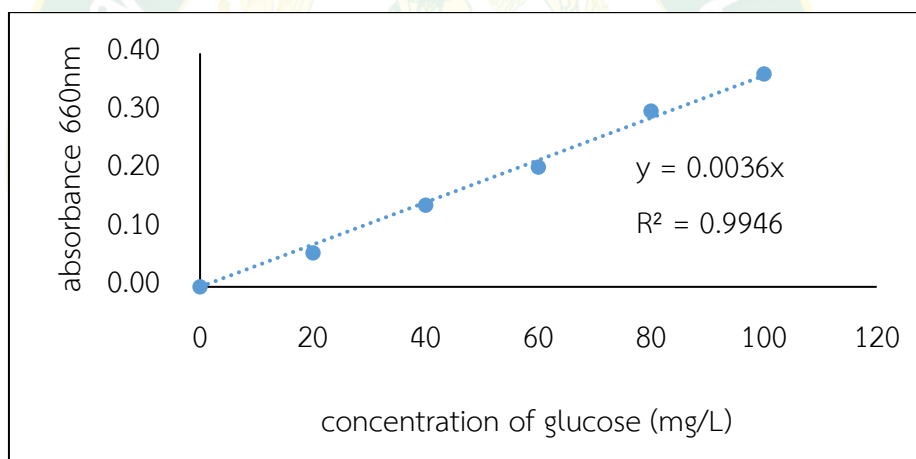
2. วิธีวิเคราะห์

- นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)
- เติมสารละลาย C 1 ml ลงในหลอดทดลองข้อ 1 แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 min
- เติม Arsenomolybdate reagent 1 ml ลงในสารผสมข้อ 2 ตั้งทิ้งไว้ 5 min แล้วเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ml จากนั้นนำไปเขย่าผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 min
- นำตัวอย่างที่ทำการทดลองไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm เทียบกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง

3. การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ตารางผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Somogyi-Nelson

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง (490 nm)
0	0.0000
20	0.0577
40	0.1397
60	0.2049
80	0.3009
100	0.3647



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (น้ำตาลรีดิวซ์)

4. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สามารถคำนวณได้โดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ คือ $y = 0.0036x$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความยาวคลื่น 660 nm และ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (mg/L)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลส โดยวิธี o-Toluidine (Jesse, 1970)

1. สารเคมี

1. สาร o-Toluidine เตรียมโดยชั่ง ไทโอยูเรีย 1.50 g ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 940 ml และผสมสาร o-toluidine ลงไป 60 ml จากนั้นนำไปเขย่าผสมให้เข้ากัน

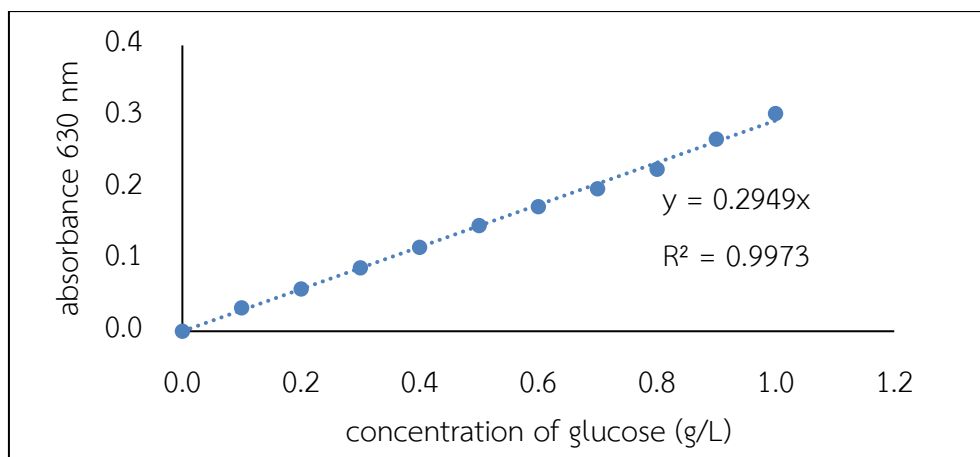
2. วิธีวิเคราะห์

- นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 ml ใส่ในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)
- เติมสาร o-Toluidine 5 ml ลงในหลอดทดลองข้อ 1 แล้วนำไปต้มเดือดในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 20 min และตั้งนำออกมาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 min
- นำตัวอย่างที่ทำการทดลองไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm และ 480 nm สำหรับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส ตามลำดับ โดยนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและไซโลสมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงนั้นๆ

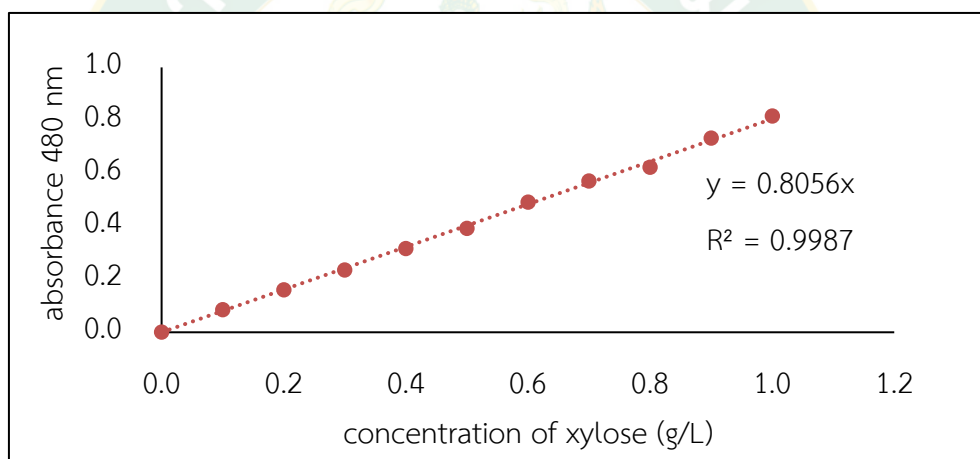
3. การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสและไซโลส

ตารางผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสและไซโลส ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี o-Toluidine

ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคส (630 nm)	ค่าการดูดกลืนแสงของไซโลส (480 nm)
0.0	0.0000	0.0000
0.1	0.0328	0.0850
0.2	0.0593	0.1604
0.3	0.0889	0.2353
0.4	0.1176	0.316
0.5	0.1478	0.3918
0.6	0.1745	0.4910
0.7	0.1996	0.5711
0.8	0.2266	0.6230
0.9	0.2690	0.7324
1.0	0.3047	0.8162



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี o-Toluidine



ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส โดยวิธี o-Toluidine

4. การคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลส

สามารถคำนวณได้โดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส คือ $y = 0.2949x$ และน้ำตาลไซโลส คือ $y = 0.8056x$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความยาวคลื่น 630 nm และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความยาวคลื่น 480 nm

และ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสและไซโลส (g/L) ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธี Dichomate (Seo et al., 2009)

1. สารเคมี

1. สาร Dichomate acid เตรียมโดยชั่ง $K_2Cr_2O_7$ 34 g ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 500 ml และเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ml จากนั้นนำไปเขย่าผสมให้เข้ากัน

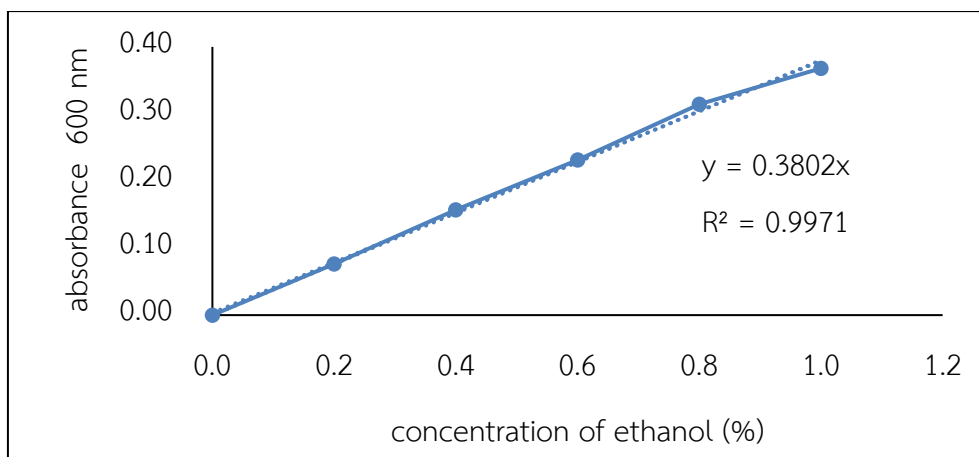
2. วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)
2. เติมสาร Dichomate acid 5 ml ลงในหลอดทดลองข้อ 1 และเติมน้ำกลั่น 4 ml จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ เป็นเวลา 20 min และตั้งนํ้าออกมามืดทิ้งไว้ประมาณ 10 min
3. นำตัวอย่างที่ทำการทดลองไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล

3. การสร้างกราฟมาตรฐานเอทานอล

ตารางผนวกที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Dichomate

ความเข้มข้นเอทานอล (%v/v)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 nm)
0.0	0.0000
0.2	0.0763
0.4	0.1567
0.6	0.2315
0.8	0.3146
1.0	0.3680



ภาพผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานเอทานอล โดยวิธี Dichomate

4. การคำนวณปริมาณเอทานอล

สามารถคำนวณได้โดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล คือ $y = 0.3802x$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความยาวคลื่น 600 nm
และ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอล (% v/v)

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดย Haemocytometer

1. วัสดุอุปกรณ์

1. Haemocytometer
2. Coverslip
3. Microscope

2. วิธีวิเคราะห์

1. ทำความสะอาดวัสดุอุปกรณ์ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์
2. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่าง โดยใช้ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ
3. ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางตะบับบริเวณช่องว่าง Haemocytometer แล้วปิดทับด้วย Coverslip ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
4. นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X นับจำนวนเซลล์ยีสต์จากช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ทั้งหมด 5 ช่อง โดยทำการนับเซลล์ที่คร่อมอยู่บนเส้นเฉพาะด้านบนและด้านข้างล่างของช่อง เพื่อป้องกันการสับสนที่จะเกิดขึ้น จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่มีอยู่ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ 1 ช่อง

3. การคำนวณปริมาณเซลล์ยีสต์

ขนาดความลึกของ Haemocytometer	=	0.1	mm
ขนาดพื้นที่ 1 ช่องใหญ่ของ Haemocytometer	=	0.2 x 0.2	mm
ปริมาตร 1 ช่องใหญ่ของ Haemocytometer	=	0.2 x 0.2 x 0.1	mm ³
	=	0.000004	cm ³
	=	4 x 10 ⁻⁶	ml

ปริมาณเซลล์ยีสต์ (cell/ml) = จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ใน 1 ช่องใหญ่ x (1/4) x 10⁶ x Dilution



ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการทดลอง

ข้อมูลองค์ประกอบของฟางข้าวก่อนและหลังการปรับสภาพตามสภาวะที่คัดเลือก

เลขที่..R5911/01.



รายงานผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์
ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มช.
Feeds Analysis Report
Animal Nutrition Laboratory, Dept. of Animal and Aquatic Sciences, Fac. of Agriculture, CMU.

นามผู้ส่งตัวอย่าง...วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้...ที่อยู่ 63 ม.4 ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290.....

วันรายงานผลวิเคราะห์ 17 พฤศจิกายน 2559

ส่วนประกอบตามสภาพตัวอย่าง (Composition, As fed basis)	ชื่อตัวอย่าง(Samples)	อ้างอิงวิธีวิเคราะห์
	ฟางข้าว (S5911/01)	
เซลลูโลส (Cellulose) %	43.21	Detergent method
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) %	23.00	Detergent method
ลิกนิน (Lignin) %	4.37	Detergent method

ผลวิเคราะห์นี้รับรองเฉพาะตัวอย่างวัตถุบดที่นำมาวิเคราะห์เท่านั้น ห้ามนำไปใช้เพื่อประกอบการโฆษณาใดๆ

พ. อ. ก.

(นางสาว พิมพ์ คำทวี)
ผู้วิเคราะห์

อ. อภิชาติ ศรีภัย

(นาย อภิชาติ ศรีภัย)
ผู้วิเคราะห์/ตรวจทาน

อ. อ. ก.

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อภิชาติ ศรีภัย)
หัวหน้าห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ส่งมาวิเคราะห์ จะเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1 เดือน หากมีปัญหาโปรดติดต่อกลับภายในเวลา 1 เดือนนับตั้งแต่วันที่ได้รับผลวิเคราะห์

blank let-out

ภาพผนวกที่ 6 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของฟางข้าวก่อนการปรับสภาพ

เลขที่..R6002/25..



รายงานผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์
ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มช.
Feeds Analysis Report
Animal Nutrition Laboratory. Dept. of Animal and Aquatic Sciences. Fac. of Agriculture, CMU.
นามผู้ส่งตัวอย่าง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อยู่ ...63 หมู่ 4 ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290.....

วันรายงานผลวิเคราะห์ 24 กุมภาพันธ์ 2560

ส่วนประกอบตามสภาพตัวอย่าง (Composition, Air dry basis)	ชื่อตัวอย่าง (Samples) S6002/19 ฟางอบแห้งที่ผ่านการปรับด้วย H ₂ SO ₄ Conc. 25%	อ้างอิงวิธีวิเคราะห์
เซลลูโลส (Cellulose) %	71.99	Detergent method
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) %	0	Detergent method
ลิกนิน (Lignin) %	15.30	Detergent method

ผลวิเคราะห์นี้รับรองเฉพาะตัวอย่างวัตถุบดที่นำมาวิเคราะห์เท่านั้น ห้ามนำไปใช้เพื่อประกอบการโฆษณาใดๆ



(นางสาว พิมพ์ คำทวี)
ผู้วิเคราะห์



(นาย อภิชาติ ศรีภัย)
ผู้วิเคราะห์/ตรวจทาน



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงษ์ศักดิ์ แก้ว)
หัวหน้าห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ส่งมาวิเคราะห์ จะเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1 เดือน หากมีปัญหาโปรดติดต่อกลับมายังในเวลา 1 เดือนนับตั้งแต่วันที่ได้รับผลวิเคราะห์

blank let-out

ภาพผนวกที่ 7 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของฟางข้าวหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 2.5% (v/v) ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

เลขที่..R6003/12..



รายงานผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์
ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มช.
Feeds Analysis Report
Animal Nutrition Laboratory. Dept. of Animal and Aquatic Sciences. Fac. of Agriculture, CMU.

นามผู้ส่งตัวอย่าง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อยู่ ...63 หมู่ 4 ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290.....

วันรายงานผลวิเคราะห์ 27 มีนาคม 2560

ส่วนประกอบตามสภาพตัวอย่าง (Composition, Air dry basis)	ชื่อตัวอย่าง (Samples) S6003/08 ฟางข้าวที่ปรับด้วย H ₂ SO ₄ Conc. 25% ร่วมกับ 15% NaOH ที่อุณหภูมิ 121°C, 15 min (Autoclave)	อ้างอิงวิธีวิเคราะห์
เซลลูโลส (Cellulose) %	90.29	Detergent method
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) %	0	Detergent method
ลิกนิน (Lignin) %	1.83	Detergent method

ผลวิเคราะห์นี้รับรองเฉพาะตัวอย่างวัตถุบดที่นำมาวิเคราะห์เท่านั้น ห้ามนำไปใช้เพื่อประกอบการโฆษณาใดๆ


 (นางสาว พิมพ์ คำทวี)
 ผู้วิเคราะห์


 (นาย อภิชาติ ศรีภัย)
 ผู้วิเคราะห์/ตรวจทาน


 27 มีนาคม 2560
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ศักดิ์ แก้ว)
 หัวหน้าห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ส่งมาวิเคราะห์ จะเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1 เดือน หากมีปัญหาโปรดติดต่อกลับภายในเวลา 1 เดือนนับตั้งแต่วันที่ได้รับผลวิเคราะห์

blank let-out

ภาพผนวกที่ 8 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของฟางข้าวหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 2.5% (v/v) ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15% (w/v) ภายใต้อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ



ภาคผนวก ค
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae*

1. Yeast Malt medium (YM)

Malt extract	3	g
Yeast extract	3	g
Peptone	5	g
Glucose	10	g
Distilled water	1,000	ml

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 5 กรณีอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น (Agar) 20 g แบ่งใส่ฟลasks 100 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min

2. Yeast Fermentation medium (YFM)

Yeast extract	6	g
Peptone	5	g
KH ₂ PO ₄	4	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	g
Glucose	150	g
Distilled water	1,000	ml

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 5 กรณีอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น (Agar) 20 g แบ่งใส่ฟลasks 100 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min

สารละลายบัฟเฟอร์

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการและปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml

สารละลาย A: 0.05 M citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot 7H_2O$ 10.51 g ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml)

สารละลาย B: 0.05 M sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 14.7 g ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml)

ตารางผนวกที่ 5 การเตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ

pH	สารละลาย A (ml)	สารละลาย B (ml)
3.0	46.5	3.5
3.2	43.7	6.3
3.4	40.0	10.0
3.6	37.0	13.0
3.8	35.0	15.0
4.0	33.0	17.0
4.2	31.5	18.5
4.4	28.0	22.0
4.6	25.5	24.5
4.8	23.0	27.0
5.0	20.5	29.5
5.2	18.0	32.0
5.4	16.0	34.0
5.6	13.7	36.3
5.8	11.8	38.2
6.0	9.5	40.5



ภาคผนวก ง
ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทางสถิติของการปรับสภาพฟางข้าวในสภาวะกรด

ตารางผนวกที่ 6 การศึกษารูปแบบการให้ความร้อนต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าวในสภาวะกรด

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Total	Between Groups	214.818	1	214.818	5.109	.038
Sugar	Within Groups	672.763	16	42.048		
	Total	887.581	17			
Reducing Sugar	Between Groups	56.498	1	56.498	6.639	.020
	Within Groups	136.164	16	8.510		
	Total	192.663	17			
Glucose	Between Groups	8.040	1	8.040	5.300	.035
	Within Groups	24.271	16	1.517		
	Total	32.311	17			
Xylose	Between Groups	8.201	1	8.201	6.583	.021
	Within Groups	19.934	16	1.246		
	Total	28.135	17			

ตารางผนวกที่ 7 การศึกษาชนิดกรดต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Total	Between Groups	430.099	2	215.049	7.051	.007
Sugar	Within Groups	457.483	15	30.499		
	Total	887.581	17			
Reducing	Between Groups	69.989	2	34.994	4.279	.034
Sugar	Within Groups	122.674	15	8.178		
	Total	192.663	17			
Glucose	Between Groups	14.735	2	7.368	6.288	.010
	Within Groups	17.576	15	1.172		
	Total	32.311	17			
Xylose	Between Groups	11.601	2	5.800	5.262	.019
	Within Groups	16.535	15	1.102		
	Total	28.135	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable							
(I) Acid	(J) Acid	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Total	DI	Acetic	-.93725	4.36598	.833	-10.2431	8.3686
		Sulfuric	-10.57100*	4.36598	.029	-19.8769	-1.2651
Sugar	Acetic	DI	.93725	4.36598	.833	-8.3686	10.2431
		Sulfuric	-9.63375*	2.76129	.003	-15.5193	-3.7482
	Sulfuric	DI	10.57100*	4.36598	.029	1.2651	19.8769
		Acetic	9.63375*	2.76129	.003	3.7482	15.5193

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable				Mean	Std.	Sig.	95% Confidence	
(I) Acid	(J) Acid	Difference	Error	Interval	Lower		Upper	
		(I-J)			Bound		Bound	
Reducing Sugar	DI	Acetic	-.28000	2.26085	.903	-5.0989	4.5389	
		Sulfuric	-4.18875	2.26085	.084	-9.0076	.6301	
	Acetic	DI	.28000	2.26085	.903	-4.5389	5.0989	
		Sulfuric	-3.90875*	1.42988	.015	-6.9565	-.8610	
	Sulfuric	DI	4.18875	2.26085	.084	-.6301	9.0076	
		Acetic	3.90875*	1.42988	.015	.8610	6.9565	
Glucose	DI	Acetic	-.07625	.85576	.930	-1.9003	1.7478	
		Sulfuric	-1.88125*	.85576	.044	-3.7053	-.0572	
	Acetic	DI	.07625	.85576	.930	-1.7478	1.9003	
		Sulfuric	-1.80500*	.54123	.005	-2.9586	-.6514	
	Sulfuric	DI	1.88125*	.85576	.044	.0572	3.7053	
		Acetic	1.80500*	.54123	.005	.6514	2.9586	
Xylose	DI	Acetic	.11000	.83002	.896	-1.6592	1.8792	
		Sulfuric	-1.52625	.83002	.086	-3.2954	.2429	
	Acetic	DI	-.11000	.83002	.896	-1.8792	1.6592	
		Sulfuric	-1.63625*	.52495	.007	-2.7552	-.5173	
	Sulfuric	DI	1.52625	.83002	.086	-.2429	3.2954	
		Acetic	1.63625*	.52495	.007	.5173	2.7552	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางผนวกที่ 8 การศึกษาความเข้มข้นกรดต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Total	Between Groups	70.705	4	17.676	.281	.885
Sugar	Within Groups	816.877	13	62.837		
	Total	887.581	17			
Reducing	Between Groups	10.014	4	2.503	.178	.946
Sugar	Within Groups	182.649	13	14.050		
	Total	192.663	17			
Glucose	Between Groups	1.809	4	.452	.193	.938
	Within Groups	30.502	13	2.346		
	Total	32.311	17			
Xylose	Between Groups	.932	4	.233	.111	.976
	Within Groups	27.203	13	2.093		
	Total	28.135	17			



ข้อมูลทางสถิติของการปรับสภาพฟางข้าวในสภาวะต่าง

ตารางผนวกที่ 9 การศึกษาชนิดสารละลายต่างต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Total	Between Groups	3128.282	2	1564.141	123.008	.000
Sugar	Within Groups	114.442	9	12.716		
	Total	3242.725	11			
Reducing	Between Groups	912.999	2	456.500	51.426	.000
Sugar	Within Groups	79.891	9	8.877		
	Total	992.891	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable

	(I) Alkaline	(J) Alkaline	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Total	NaOH	Ca ₂ OH	34.51500*	2.52149	.000	28.8110	40.2190
Sugar		NaCl	33.98000*	2.52149	.000	28.2760	39.6840
	Ca ₂ OH	NaOH	-34.51500*	2.52149	.000	-40.2190	-28.8110
		NaCl	-.53500	2.52149	.837	-6.2390	5.1690
	NaCl	NaOH	-33.98000*	2.52149	.000	-39.6840	-28.2760
		Ca ₂ OH	.53500	2.52149	.837	-5.1690	6.2390

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable

		Mean		Sig.	95% Confidence Interval		
(I) Alkaline	(J) Alkaline	Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound	
Reducing Sugar	NaOH	Ca ₂ OH	18.26000*	2.10675	.000	13.4942	23.0258
		NaCl	18.73750*	2.10675	.000	13.9717	23.5033
	Ca ₂ OH	NaOH	-18.26000*	2.10675	.000	-23.0258	-13.4942
		NaCl	.47750	2.10675	.826	-4.2883	5.2433
	NaCl	NaOH	-18.73750*	2.10675	.000	-23.5033	-13.9717
		Ca ₂ OH	-.47750	2.10675	.826	-5.2433	4.2883

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางผนวกที่ 10 การศึกษาความเข้มข้นสารละลายต่างต่อผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Total	Between Groups	42.131	3	14.044	.035	.991
Sugar	Within Groups	3200.594	8	400.074		
	Total	3242.725	11			
Reducing Sugar	Between Groups	27.234	3	9.078	.075	.972
	Within Groups	965.656	8	120.707		
	Total	992.891	11			

ข้อมูลทางสถิติของการหมักเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ

ตารางผนวกที่ 11 ผลการหมักเอทานอลด้วยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ethanol	Between Groups	.113	1	.113	.035	.856
	Within Groups	32.738	10	3.274		
	Total	32.851	11			
Glucose	Between Groups	.524	1	.524	.037	.852
	Within Groups	143.102	10	14.310		
	Total	143.626	11			





ภาคผนวก จ
การเผยแพร่ผลงานวิจัย

บทความทางวิชาการที่ 1

- ชื่อผู้แต่ง: อภิสรา แซ่จันทร์
ณัฐต์นิชา สุขเกษม
- ชื่อบทความ: การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดและด่างเพื่อผลิตเอทานอลโดย
Saccharomyces cerevisiae
Pretreatment of Rice Straw with Acid and Alkaline for Ethanol
Production by *Saccharomyces cerevisiae*
- ชื่อวารสาร: การประชุมวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 13
เล่มที่: หน้า 1191-1198 ระหว่างวันที่ 31 พฤษภาคม – 2 มิถุนายน 2560
ณ โรงแรม ดิเอ็มเพรส เชียงใหม่



E-NETT 13TH

การประชุมวิชาการ
เครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 13
 13TH CONFERENCE ON ENERGY NETWORK OF THAILAND
 “ Sustainable Energy Development for Community and Innovation ”

31 พ.ค. - 2 มิ.ย. 2560 ณ โรงแรม ดิเอ็มเพรส เชียงใหม่



**MAEJO
GO ECO
UNIVERSITY**

ITALTHAI
อินทไทย

STC
สตีลทองแปง
Steel Tongpan

cristalla
CCE Sugar Industry

SCB
ไทยพาณิชย์

จัดการประชุมโดย : วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ร่วมกับ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

www.e-nett.org Enett13.mju@gmail.com 053 875590 fax : 053 875599

บรรณาธิการ

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐฉา สุขงู๋
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิรัชย์ โธณวินทร์
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญยั้ง ปลั่งกลาง
4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริบุษ จินดารักษ์
5. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนศ โสยชนะ
6. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมชาย มณีวรรณ
7. ดร.นิกราน ทอมดวง
8. อ.กิตติกร สาสุจิตต์
9. นายสัมพันธ์ ธารารักษ์
10. นางสาวรุ่งตะวัน บันทะวงศ์

พิมพ์ครั้งที่ 1

- 25 พฤษภาคม 2560 จำนวน 400 แผ่น

ออกแบบและจัดทำโดย

- วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ดำเนินการจัดงานประชุมโดย

- วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี



การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดและด่างเพื่อผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae*
 Pretreatment of Rice Straw with Acid and Alkaline for Ethanol Production
 by *Saccharomyces cerevisiae*

อภิษฐา แซ่จันทร¹, และ ณัฐคดีชา สุขเกษม^{1*}

¹ วิทยาลัยสหกรณ์เกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 63 หมู่ 4 ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

*ผู้ติดต่อ: jowj.jag@gmail.com, เบอร์โทรศัพท์ 087-717-5810, เบอร์โทรสาร 0-533-3194

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ มุ่งศึกษาคัดเลือกสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพฟางข้าวซึ่งเป็นพืชลิกโนเซลลูโลสที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อให้ได้น้ำตาลที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเปรียบเทียบการปรับสภาพฟางข้าวทั้งในสภาวะกรดและด่าง การปรับสภาพด้วยกรดใช้กรดอะซิติก และกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% (w/v) ณ (1) อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 120 min ด้วยตู้อบลมร้อน และ (2) อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ พบว่า ฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยกรด ภายใต้ความชื้นควบคู่กับความดันไอน้ำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการให้ความร้อนเพียงอย่างเดียว โดยกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 2.22 g/l หรือ 0.044 g/g *DM* คิดเป็น 2.71% และให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.76 g/l หรือ 0.0015 g/g *DM* คิดเป็น 0.93% ในขณะที่กรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20.11g/l หรือ 0.402 g/g *DM* คิดเป็น 24.58% และน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 9.50 g/l หรือ 0.189 g/g *DM* คิดเป็น 11.61% ทั้งนี้ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด จึงนำมาศึกษาการปรับสภาพในสภาวะด่าง โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น คือ 5, 10, 15 และ 20% (w/v) ภายใต้อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min พบว่า การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) ให้ประสิทธิภาพการปรับสภาพดีที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้สารละลายด่างชนิดอื่นๆ โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 40.61 g/l หรือ 0.812 g/g *DM* คิดเป็น 49.63% และน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.11 g/l หรือ 0.462 g/g *DM* คิดเป็น 28.25% และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลด้วย *S. cerevisiae* ณ อุณหภูมิ 37±2°C พบว่า น้ำตาลที่ได้จากฟางข้าวมีประสิทธิภาพการหมักเอทานอลเท่ากับ 13.39% ขณะที่ประสิทธิภาพการหมักเอทานอล โดยใช้กลูโคส และซูโครส เท่ากับ 35.42 และ 34.47% ตามลำดับ

คำหลัก: ฟางข้าว ลิกโนเซลลูโลส การปรับสภาพด้วยกรดและด่าง เอทานอล

Abstract

The aims of research were the selection of pretreatment conditions of rice straw, which were lignocellulose material from agricultural waste, to produce sugars as substrate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. The comparison of acid and alkaline pretreatment were done. The acid pretreatment were performed by using 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0% (w/v) of both acetic acid and sulfuric acid under (1) 120°C for 120 min by hot air oven and (2) 121°C, 15 lb/in² for 15 min by autoclave. The results showed that the rice straw pretreatment by autoclave were produced high amount of total sugars and reducing sugars and they were higher than all both sugars from hot air oven. The 1% (v/v) of acetic acid gave 2.22 g/l of total sugar or 0.044 g/g *DM* or 2.71% and reducing sugar was 0.76 g/l or 0.0015 g/g *DM* or 0.93%. While at 2.5% (v/v) of sulfuric acid pretreatment showed 20.11g/l of total sugar or 0.402 g/g *DM* or 24.58% and reducing sugar 9.50 g/l or 0.189 g/g *DM* or 11.61%. Therefore, the rice straw pretreatment at 2.5% (v/v) of sulfuric acid were used for alkaline pretreatment by using sodium hydroxide, calcium hydroxide and sodium chloride at of 5, 10, 15 and 20% (w/v) under 121°C, 15 lb/in² for 15 min by autoclave. The sodium hydroxide pretreatment at 15% (w/v) showed highest efficiency of pretreatment when compared with other alkaline solutions. The pretreatment gave total sugar concentration at 40.61 g/l or 0.812 g/g *DM* or 49.63% and

reducing sugar was at 20.11 g/l or 0.462 g/g_{DM} or 28.25%. The ethanol production by *S. cerevisiae* at 37±2°C by using pretreated rice straw showed 13.39% of theoretical ethanol yield whereas ethanol productions by using glucose and sucrose as substrates were at 35.42 and 34.47%, of theoretical ethanol yield, respectively.

Keywords: Rice Straw, Lignocellulose, Acid and Alkaline Pretreatment, Ethanol

1. บทนำ

ปัจจุบัน โลกมีอัตราการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง สถานการณ์ของโลกในขณะนี้จึงหาทางออกด้วยการหาพลังงานใหม่ขึ้นมาทดแทน พลังงานจากพืชหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจึงเป็นทางเลือกที่ประเทศไทยมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งเอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่น่าสนใจสามารถนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพหรือสารเคมีแต่งน้ำมันเชื้อเพลิงได้ จากแผนการพัฒนาพลังงานทดแทน 20 ปี โดยภายในปี 2579 ประเทศไทยวางแผนเพื่อเป้าหมายในการเพิ่มผลผลิตเอทานอลเป็น 11.3 ล้านลิตรต่อวัน [1] สำหรับประเทศไทยการผลิตเอทานอลปัจจุบันใช้วัตถุดิบหลัก ได้แก่ อ้อย และมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชอาหารอาจมีอัตราการผลิตไม่เพียงพอต่ออัตราการใช้พลังงาน เพราะฉะนั้นการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอย่างฟางข้าวที่มีปริมาณเป็นจำนวนมากหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 26.9 ล้านตันต่อปี [2] โดยทั่วไปเกษตรกรมักใช้วิธีการเผาฟางข้าวสำหรับการกำจัดและทำลายทิ้ง จึงทำให้เกิดการสร้างปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เกิดมลภาวะที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมทั้งทางดิน น้ำ และอากาศ [3] ดังนั้น การนำฟางข้าวมาใช้ในการผลิตเอทานอล เพื่อเป็นการลดมลภาวะมลพิษทางอากาศที่เกิดจากการเผาไหม้และใช้ประโยชน์จากสารชีวมวลในด้านพลังงานให้มากที่สุด การนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้ในกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดจากการเปลี่ยนน้ำตาลจากเซลลูโลสให้เป็นเอทานอล จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสหรือรวมกำจัดองค์ประกอบของลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส จากการศึกษาพบว่า วิธีการปรับสภาพมีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพสำหรับการผลิตเอทานอล [4] โดยทั่วไปจะใช้สารละลายกรดและด่าง หรือเอนไซม์ร่วมกับความร้อนเพื่อเพิ่มผลผลิตของน้ำตาลสำหรับนำไปใช้ในการหมักเอทานอล ซึ่งได้จากการย่อยสลายของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส [5] อย่างไรก็ตาม วิจัยของขวัญสุภา [6] ที่นำวัสดุเหลือทิ้งอย่างขานอ้อยมาย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟิวริก 5.0% (v/v) ที่ อุณหภูมิ 140°C เป็นเวลา 180 min ได้น้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 11.43 g/l และในงานวิจัยของ Hsu T. และคณะ [7] ศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1% (v/v) ที่ อุณหภูมิ 160°C และ 180°C เป็นเวลา 5 min ผลผลิตน้ำตาลสูงถึง 83% โดยพบเป็นน้ำตาลไซโลสและกลูโคส นอกจากนี้ การปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการผลิตเอทานอลยังช่วยลด

ค่าใช้จ่ายสำหรับการใช้เอนไซม์ถึง 33% ของต้นทุนในการผลิตเอทานอลทั้งหมด [8] และยังพบว่าในงานวิจัยส่วนใหญ่มักนิยมใช้กรดในการไฮโดรไลส เนื่องจากทำได้ง่ายและใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาล้น [9] ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับความร้อน โดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดและด่างที่เหมาะสม ซึ่งเปรียบเทียบกับผลปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นเพื่อทำการหมักเอทานอลด้วยจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* สำหรับเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่อไป

2. วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

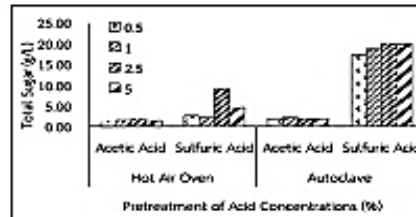
2.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ

เก็บฟางข้าวจากพื้นที่ทางการเกษตร อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย (18°56'29"N, 98°53'12"E) นำมาตากแดดให้แห้งและทำการลดขนาดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดประมาณ 2.5-3 cm จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบของฟางข้าว ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970)

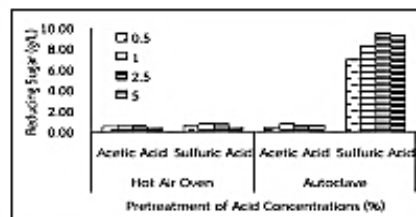
2.2 การปรับสภาพพืชในสภาวะกรด (Acid treatment)

นำฟางข้าวที่บดแล้วจำนวน 1 g มาทำการปรับสภาพด้วยกรดกรดอะซิติก และกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% (v/v) อัตราส่วนพืช 1 g ต่อสารละลาย 20 ml จากนั้นนำไปปรับสภาพ ณ (1) ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 120 min ด้วยตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) และ (2) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อปิ้งไอน้ำ (Autoclave) จากนั้นทำการกรองแยกส่วนระหว่างของแข็งกับของเหลวด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยนำส่วนของเหลวที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol Sulfuric Acid [10] และน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) ด้วยวิธี Somogyi-Nelson [11] เพื่อนำผลปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาเปรียบเทียบ สำหรับคัดเลือกวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมในการย่อยฟางข้าวก่อนทำการปรับสภาพพืชในสภาวะด่าง (Alkaline treatment) ต่อไป

การกำจัดน้ำของน้ำตาล จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ลดลง (15) ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพฟางข้าว คือ การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (w/v) โดยให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min



รูปที่ 1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดอะซิติกและกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 120°C เวลา 120 min ด้วยตู้อบลมร้อน และอุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ



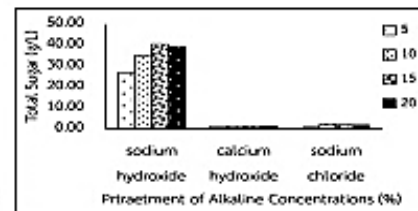
รูปที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดอะซิติกและกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 120°C เวลา 120 min ด้วยตู้อบลมร้อน และอุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ

3.3 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของต่างที่มีต่อกรั้งแครงหน้าตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว

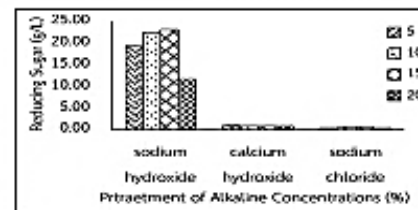
จากผลการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดตามสภาวะที่เหมาะสมในข้อที่ 3.2 นำมาปรับสภาพด้วยสารละลายต่างโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5, 10, 15 และ 20% (w/v) และทำการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ซึ่งจากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบชนิดของสารละลายต่าง พบว่า การย่อยสลายฟางข้าวด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด รองลงมาคือ โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ดังรูปที่ 3 และรูปที่ 4 โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 5% (w/v) และโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) มีปริมาณน้ำตาล

ทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 40.61, 1.14 และ 2.00 g/l ตามลำดับ และน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.11, 0.92 และ 0.49 g/l ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้ จะเห็นได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมของสารละลายต่างที่นำไปใช้ปรับสภาพคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 40.61 g/l ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moradi F. และคณะ [16] ที่ศึกษาการผลิตทานอลจากฟางข้าวที่ปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 12% (w/v) พบว่า ปริมาณน้ำตาลที่ได้เท่ากับ 0.64 g/g ของฟางข้าว และในงานวิจัยของ Rernit N. และคณะ [17] ที่ศึกษาชนิดของสารละลายต่างร่วมกับเอนไซม์ พบว่า ฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% (w/v) ร่วมกับเอนไซม์ โดยให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 55.48 g/l จะเห็นได้ว่า ผลปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการทดลองดังตารางที่ 2 มีค่าใกล้เคียงกันและยังสามารถช่วยคัดค่าใช้จ่ายสำหรับการใช้เอนไซม์เมื่อเทียบกับงานวิจัยดังกล่าว



รูปที่ 3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ร่วมกับสารละลายต่างที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เวลา 15 min



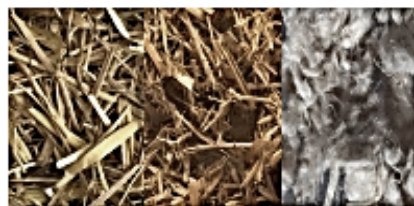
รูปที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ร่วมกับสารละลายต่างที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เวลา 15 min

ตารางที่ 2 ผลปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังการปรับสภาพฟางข้าวที่ได้คัดเลือกตามสภาวะที่เหมาะสม

Pretreatment of Rice Straw	Total Sugar		Sugar conversion (%)	Reducing Sugar		Sugar conversion (%)
	(g/l)	(g/g <i>DM</i>)		(g/l)	(g/g <i>DM</i>)	
Untreated	11.13	0.022	13.60	0.43	0.009	0.52
H ₂ SO ₄ 2.5% (v/v)	20.11	0.402	24.58	9.50	0.189	11.61
H ₂ SO ₄ 2.5% (v/v) + NaOH 15% (w/v)	40.61	0.812	49.63	23.11	0.462	28.25

3.4 ผลการศึกษาชนิด ความเข้มข้นของกรดและค่าที่มีต่อปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว

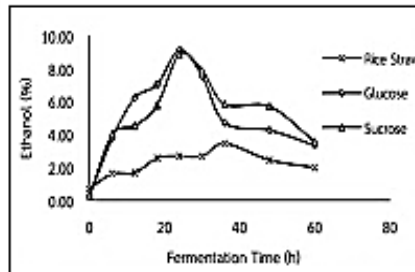
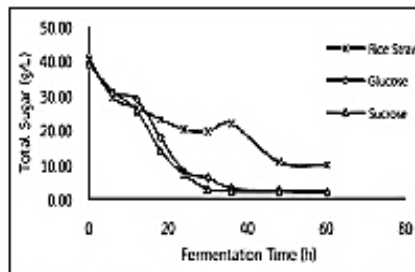
จากผลการปรับสภาพที่ได้คัดเลือกตามสภาวะที่เหมาะสมในข้อที่ 3.2 และข้อที่ 3.3 พบว่า ลักษณะฟางข้าวหลังจากการปรับสภาพดังรูปที่ 5 เมื่อเทียบกับฟางข้าวก่อนปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 0%wt ดังตารางที่ 1 เนื่องจากสภาวะสลายกรดจะส่งผลในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดี ในขณะที่สารละลายค่ามีผลต่อลิกนินและเพิ่มความสามารถในการพองตัวซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้แก่วัสดุคืบ [18] และเมื่อนำไปปรับสภาพร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) พบว่า ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 90.29%wt และปริมาณลิกนินลดลงเป็น 1.83%wt ดังตารางที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ นันทิกา และคณะ [19] ที่ทำการไฮโดรไลซิสฟางข้าวฟางหวานด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 121°C ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ พบว่ามีปริมาณของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 91.10 %wt ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลงเป็น 5.82 และ 2.97%wt ตามลำดับ เพราะฉะนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 15% (w/v) จึงมีเหมาะสมในการย่อยสลายฟางข้าว



รูปที่ 5 ลักษณะฟางข้าวก่อนปรับสภาพ (ก), หลังปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) (ข) และหลังปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) (ค) ให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เวลา 15 min

3.5 การหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae*

จากการศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าว ณ สภาวะที่คัดเลือก ตามข้อที่ 3.2 และข้อที่ 3.3 คือ การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (v/v) ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 15% (w/v) และให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ซึ่งให้ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 40 g/l พบว่า การใช้ น้ำตาลที่ได้จากฟางข้าวให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 3.47% (v/v) ณ ชั่วโมงที่ 36 และเมื่อเทียบกับปริมาณเอทานอลที่ได้จากกลูโคส และซูโครส พบว่า กลูโคส และซูโครส ณ ชั่วโมงที่ 24 ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 9.17 และ 8.93% (v/v) ตามลำดับ นอกจากนี้ยัง พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลกลูโคส และซูโครส มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ปริมาณเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพจะค่อยๆเพิ่มขึ้น และเร่งลดลงอย่างคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 48 ดังรูปที่ 6 และในรูปที่ 7 จะเห็นว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส จะลดลงอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 36 โดยมีปริมาณน้ำตาลเหลือเท่ากับ 3.15 และ 2.20 g/l ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากฟางข้าวจะลดลงเพียงเล็กน้อย ณ ชั่วโมงที่ 48 เหลือเท่ากับ 10.71 g/l ส่งผลให้ค่าของผลได้การผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.062 g/g คิดเป็นผลผลิตของเอทานอลเทียบกับค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 13.39% ดังตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถเจริญและผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้ดี ซึ่งยีสต์จะเจริญและผลิตเอทานอลได้น้อยเมื่อใช้น้ำตาลจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบฟางข้าวหลังการปรับสภาพ ดังตารางที่ 1 พบว่า ปริมาณเฮมิเซลลูโลสเกิดการสูญเสียในการปรับสภาพด้วยกรดและค่า โดยทั่วไปเฮมิเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (C₅) ได้แก่ ไโซส และอะราบีโนส [20]


 รูปที่ 6 ปริมาณเอทานอลที่ทำการหมัก ณ อุณหภูมิ $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ด้วย *Saccharomyces cerevisiae*

 รูปที่ 7 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างหมักเอทานอล ณ อุณหภูมิ $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ด้วย *Saccharomyces cerevisiae*

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจากฟางข้าวที่นำมาทำการหมัก ดังตารางที่ 3 พบว่า มีปริมาณกลูโคส และไซโลสเท่ากับ 11.55 และ 27.23 g/L ตามลำดับ ซึ่งในงานวิจัยของ อภิษฐา และคณะ (21) พบว่า การผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 โดยใช้แหล่งคาร์บอนระหว่างกลูโคสและไซโลส ยีสต์สามารถเจริญและผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้ดี ในขณะที่เจริญและผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสได้ต่ำ เนื่องจากมีข้อจำกัดในการใช้น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม แต่สามารถนำยีสต์ไปใช้ร่วมกับจุลินทรีย์อื่น เพื่อทำการเพิ่มผลผลิตเอทานอล อย่างเช่นงานวิจัย Sasaki K. และคณะ (22) ที่ทำการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว โดยใช้ *S. cerevisiae* ที่มีการคัดเลือกพันธุ์ให้ดูดซึมไซโลส พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 2.75 g/L และในงานวิจัย Aditiya H. และคณะ (23) ศึกษาการผลิตเอทานอลด้วย *S. cerevisiae* พบว่า ผลผลิตเอทานอลของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ร่วมกับไซเอนโซมเซลลูเลสที่ได้จาก *Tichoderma Reesii* ATCC 26921 มีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.1503% คิดเป็นผลผลิตเอทานอลเทียบกับค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 52.75% และ เมื่อเทียบกับผลผลิตเอทานอลของฟางข้าวที่ไม่ใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย พบว่า มีปริมาณเอทานอลเพียง 0.013% คิดเป็นผลผลิตเอทานอลเทียบกับค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 11.26% จะเห็นได้ว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยดังกล่าว

ตารางที่ 3 ผลผลิตเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จากการหมักฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5%(w/v) ร่วมกับไซเอนโซมเซลลูเลสเข้มข้น 15%(w/v) ณ อุณหภูมิ $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ด้วย *Saccharomyces cerevisiae*

Sample	Initial Sugar Concentration (g/L)			Sugar After Fermentation (g/L)	Ethanol Produced (g/L)	Ethanol Yield (g/g)	Fermentation efficiency (%)	Sugar Consumption (%)
	Total Sugar	Glucose	xylose					
Rice Straw	40	11.55	27.23	21.79	2.74	0.062	13.39	6.75
Glucose	40			8.11	7.24	0.181	35.42	18.48
Sucrose	40			7.15	7.01	0.175	34.47	17.61

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า ฟางข้าวมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอล ซึ่งผลการศึกษา พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดและค่า คือ การย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (w/v) ร่วมกับไซเอนโซมเซลลูเลสเข้มข้น 15% (w/v) ภายใต้อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 15 min ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เท่ากับ 40.61 g/L หรือ 0.812 g/g *DM* คิดเป็น 73.09% และน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.11 g/L หรือ 0.462 g/g *DM* คิดเป็น 41.59% และเมื่อนำไปทำการหมักเอทานอล พบว่า มีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 3.47% (w/v) ณ ชั่วโมงที่ 36 คิดเป็นผลผลิตเอทานอลเทียบกับค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 13.39% ดังนั้น จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจและสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล และพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อเพิ่มผลได้ในการผลิตเอทานอล

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนในการวิจัยจาก กองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน และเงินทุนจากวิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ นอกจากนี้ยังได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพลังงาน วิทยาลัยพลังงานทดแทน และสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ (QS) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับในงานวิจัย ดังขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, กระทรวงพลังงาน (2558). *แผนพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือก พ.ศ. 2558 – 2579 (Alternative Energy Development Plan: AEDP2015)*.
- [2] ทมอดิน สุพรรณบุรี (2557). *คอซึ่งสิ่งสี่ข้าวโกธสี่ตัว เกษตรกร การไกลจนคอซึ่งและเศษพืช หลังการเก็บเกี่ยว*, [ระบบออนไลน์], แหล่งที่มา <http://r01.idd.go.th/splv/>, เข้าดูเมื่อวันที่ 08/03/2560.
- [3] กลุ่มระบบงานวิจัย กองแผนงาน ร่วมกับกลุ่มวิจัยและพัฒนาอินทรีย์วัตถุเพื่อการเกษตรสำนักวิจัยและพัฒนาการจักรที่ดิน (2555). *การไกลจนคอซึ่งเพื่อปรับปรุงดินและเพิ่มผลผลิตข้าว*, [ระบบออนไลน์], แหล่งที่มา http://www.idd.go.th/menu_moc/POSTER/rice/rice.htm, เข้าดูเมื่อวันที่ 08/03/2560.
- [4] Binod, P., et al. (2010). Bioethanol production from rice straw: An overview, *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 4767–4774.
- [5] Mosier, N., et al. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, vol. 96(6), April 2005, pp. 673–686.
- [6] ชวีญสุภา อบุญอิน. (2549). การย่อยซังข้าวด้วยวิธีทางเคมี เพื่อการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- [7] Hsu, T., Guo, G., Chen, W. and Hwang, W. 2010. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol.*, vol 101, pp. 4907-4913.
- [8] Ibrahim, H. A. (2012). Pretreatment of straw for bioethanol production. *Energy Procedia*, vol. 14, pp. 542-551.
- [9] กุลมาวดี ฐานเจริญ (2555). การปรับสภาพฟางข้าว เพื่อผลิตไบโอเอทานอล โดยเชื้อ *Kluyveromyces marxianus*, *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร*, 10(2), กรกฎาคม-ธันวาคม 2558, หน้า 123-133.
- [10] Dubois, M., et al. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28 (3), March 1956, pp 350–356.
- [11] Nelson, N. (1994). A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 153, 1944, pp. 375-380.
- [12] Seo, H.B., et al. (2009). Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(2), Feb 2009, pp.285-292.
- [13] รัชพล ทเวงศ์รัตน์ (2558). กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส, *วารสารวิชาการ Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University*, 2(1), มกราคม-มิถุนายน 2558, หน้า 143-157.
- [14] พรวิภา ทอมมิตร, วรวิณี จุฬาลักษณ์นาค และ อรทัย ชาวภาณุทศ. (2555). การเพิ่มผลผลิตน้ำตาลจากซังข้าว โดยการย่อยสลายด้วยกระบวนการเปิดด้วยอินทรีย์ร่วมกับกรดอะซิติก, *การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9*, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม.
- [15] ชัยนันท์ นีวาหลวงษ์ และ เสถิม เรืองวิริยะชัย. (2012). การผลิตเซลลูโลสเอทานอลในประเทศไทย, *วารสารวิทยาศาสตร์ มช.*, 40(4), ตุลาคม-ธันวาคม 2555, หน้า 1073-1088.
- [16] Morik, F., et al. (2013). Improvement of acetone, butanol and ethanol production from rice straw by acid and alkaline pretreatments, *Fuel*, vol. 112, pp. 8–13.
- [17] Remil, N.A.M., Shah, U.K.M., Mohamad, R. and Abd-Aziz, S. (2014). Effect of chemical and thermal pretreatments on the enzymatic saccharification of rice straw for sugar production, *Bioresources*, vol. 9(1), pp. 510-522.
- [18] Thomas, W. J., and Yong-su, J. (2000). Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Advance in Applied Microbiology*, vol. 47, pp. 221 – 268.

[19] บันทึกรา คล้ายชม, เทียนจิตร ศรีนพคุณ และ อนุสิษฐ์ ณะทิพย์เมธา (2554). การผลิตน้ำตาลวีคิวซ์จากขางข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด, *วิศวกรรมสาร มก.*, 75(24), มกราคม - มีนาคม 2554, หน้า 91-102.

[20] Ayeni, A.O., Adeeyo, O.A., Oresgun, O.M. and Oladimeji T.M. (2015). Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of an economically viable method suitable for woody and non-woody biomass, *American Journal of Engineering Research (AJER)*, vol. 4(4), pp. 14-19.

[21] อภิษฐา จันทรมั่น, ลาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และ กิติพงษ์ รัตนารณณ์. (2558). การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc9D และ การหมักด้วย จุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ร่วมกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มี กลูโคสและไซโลส, *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53*, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัด กรุงเทพมหานคร.

[22] Sasaki, K., et al., Ethanol fermentation by xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae* using sugars in a rice straw liquid hydrolysate concentrated by nanofiltration, *Bioresource Technology*, vol. 147, pp. 84-88.

[23] Aditiya, H. B., Sing, K.P., Hanif, M. and Mahlia, T. M. I. (2015). Effect of acid pretreatment on enzymatic hydrolysis in bioethanol production from rice straw, *International Journal of Technology*, vol. 6(1), pp. 3-10.

การนำผลงานแพร่เผยภายในชุมชนหมู่บ้านวังป๋อง ตำบลเหมืองแก้ว อำเภอแมริม
จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับการนำงานสร้างสรรค์ไปใช้ประโยชน์

แบบฟอร์มหนังสือรับรองการนำงานสร้างสรรค์ไปใช้ประโยชน์

ส่วนที่ 1 รายละเอียดผู้นำผลงานไปใช้ประโยชน์

ข้าพเจ้า นายนิมิตร ขยัน
ตำแหน่ง ผู้ใหญ่บ้านหมู่บ้านวังป๋อง ตำบลเหมืองแก้ว
สังกัด อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่

ส่วนที่ 2 รายละเอียดงานสร้างสรรค์ที่นำไปใช้ประโยชน์

งานสร้างสรรค์ ผลงานวิทยานิพนธ์ เรื่อง การปรับสภาพทางข้าวด้วยสารละลายกรดและด่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ
ย่อยสลายด้วยเอนไซม์สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล โดยการหมักแบบแยกกระบวนการผลิต ในหัวข้อ
เกี่ยวกับ การใช้ประโยชน์จากฟางข้าว เพื่อผลิตเอทานอล โดย นางสาวอภิสร่า แซ่จันทร์ และอาจารย์ที่
ปรึกษา ดร.ณัฐดิษฐา สุขเกษม วิทยาลัยพลังงานทดแทนมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ส่วนที่ 3 รายละเอียดเกี่ยวกับการนำงานสร้างสรรค์ไปใช้ประโยชน์

3.1 ประเภทของการใช้ประโยชน์จากงานสร้างสรรค์ (โปรดระบุประเภทของการใช้ประโยชน์โดยใส่เครื่องหมาย ✓
ลงใน โดยสามารถตอบได้มากกว่า 1 ประเภท)

3.1.1 การใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ อธิบายลักษณะการนำไปใช้ประโยชน์

นำองค์ความรู้ที่ได้จากการเผยแพร่ไปนำเสนอต่อกลุ่มชาวบ้านในตำบลเหมืองแก้ว และตำบลใกล้เคียง
ได้รับความรู้และนำไปใช้เป็นต้นแบบผลิตพลังงานทดแทนเอทานอล

3.1.2 การใช้ประโยชน์ในเชิงสาธารณะ _____

3.1.3 การใช้ประโยชน์เชิงนโยบายหรือระดับประเทศ _____


3.1.4 การใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ _____

3.1.5 อื่น _____

3.2 ช่วงเวลาในการใช้ประโยชน์ เดือนพฤษภาคม 2560 เป็นต้นไป

3.3 กลุ่มเป้าหมาย/ผู้ได้รับประโยชน์จากงานดังกล่าว ได้แก่ ชุมชนหมู่บ้านวังป๋อง ต.เหมืองแก้ว อ.แมริม จ.เชียงใหม่

3.4 โปรดระบุถึงหลักฐานการนำไปใช้ประโยชน์ พร้อมแนบหลักฐานประกอบ (ถ้ามี)

ลงชื่อ  ผู้ใช้ผลงาน

(นายนิมิตร ขยัน)

ตำแหน่ง ผู้ใหญ่บ้านหมู่บ้าน

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลงชื่อ  ผู้บังคับบัญชาสูงสุดของหน่วยงาน

(นายนิมิตร ขยัน)

ตำแหน่ง ผู้ใหญ่บ้านหมู่บ้าน

วันที่ เดือน พ.ศ.

หมายเหตุ โปรดประทับตราหน่วยงานที่นำผลงานไปใช้ประโยชน์

บรรณานุกรม

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2555). **โครงการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสเชิงพาณิชย์**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://webkc.dede.go.th/webmax/sites/default/files/2.รายงานสรุปผู้บริหาร.pdf>. (3 กุมภาพันธ์ 2559).
- _____. (2558). **แผนพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือก พ.ศ. 2558-2579**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.dede.go.th/download/files/AEDP2015_Final_version.pdf. (3 กุมภาพันธ์ 2559).
- กลุ่มระบบงานวิจัย กองแผนงาน ร่วมกับกลุ่มวิจัยและพัฒนาอินทรีย์วัตถุเพื่อการเกษตรสำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน. (2555). **การไกล่เกลี่ยเพื่อปรับปรุงดินและเพิ่มผลผลิตข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ldd.go.th/menu_moc/POSTER/rice/rice.htm (8 มกราคม 2559).
- ชนิษฐา ฤกษ์อรุณ, สุรีย์มาศ อัจหาญ, อรวรรณ ชุณหชาติ, และรัชพล พะวงศรีรัตน์. (2558). ศักยภาพและการใช้ประโยชน์จากลำต้นแกล่นตะวันเพื่อเป็นวัสดุตั้งเซลล์ยีสต์. **วารสารเกษตรพระวรุณ**, 12(2), 106-113.
- ชุตินา ศรีจิว. (2548). **การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นันทิกา คล้ายชม, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, และอนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. (2554). การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากซางข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด. **วิศวกรรมสาร มก**, 24(75), 91-102.
- ผ่องศรี ศิวราศักดิ์, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, และสิทธิพันธ์ ท่อแก้ว. (2551). **การผลิตเอทานอลจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีสี สำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี: พชรภณ สนทอง. (2556). **การสลายลิกนินด้วยความร้อน**. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พรเทพ ถนนแก้ว. (2538). **ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรณารายณ์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พักประไพ ประจำเมือง. (2546). **การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ระดับโรงงานต้นแบบ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

- ยุทธศักดิ์ สุภการี. (2550). **สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยวิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ระวีวรรณ แก้วกล้า. (2538). **การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว**. วิทยานิพนธ์ปรัชญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัชพล พะวงค์รัตน์. (2558). **กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส**. วารสาร Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University, 2(1), 143-157.
- รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการความยั่งยืนด้านสิ่งแวดล้อมด้านเศรษฐกิจสังคมของการใช้ฟางข้าวสำหรับอาหารสัตว์ พลังงานและปุ๋ยในประเทศไทย. (2559). **การใช้ประโยชน์ของชีวมวลฟางข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://e-lib.dede.go.th/mm-data/BibA11228> รายงานฉบับสมบูรณ์.pdf (6 ตุลาคม 2560).
- วิทยา ปั่นสุวรรณ. (2553). **การผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากการระเบิดด้วยไอน้ำของทะเลสาบปลาปาล์มน้ำมัน**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิโรจน์ พุทธิวิถ. (2553). **เอทานอล**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://1.179.134.197/digital-school/science1_2_2/science2_1/more/ethanol_2.php. (6 ตุลาคม 2560).
- ศุภกิจ สอนประจักษ์, สุวิมล กิรติพิบูลย์, และสาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. (2538). **การผลิตน้ำตาลไซโลสจากฟางข้าว**. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33, 323-330.
- สำนักบริการธุรกิจและการสำรองน้ำมันเชื้อเพลิง กรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงานพลังงาน. (2557). **สรุปการจัดหาและการจำหน่ายน้ำมันเชื้อเพลิง**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.doeb.go.th>. (6 ตุลาคม 2560).
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2540). **อีสต์และอีสต์เทคโนโลยี**. ภาควิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ. (2556). **วิธีการจัดการฟางข้าวที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและประโยชน์ที่ได้รับ**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา wqm.pcd.go.th/water/images/agriculture/journal/2556/straw57.pdf (6 สิงหาคม 2560).
- สิริวุทธิ์ เสียมภักดี. (2552). **นวัตกรรมพลังงานทดแทนไทย เอทานอลจากอ้อยและมันสำปะหลัง สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.vcharkarn.com/varticle/38199> (6 สิงหาคม 2560).
- สุภาวดี ผลประเสริฐ. (2557). **การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล**. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22(5), 641-649.

- หมอดิน สุพรรณบุรี. (2557). **ต่อขังสิ่งล้าค่าใกล้ตัวเกษตรกร การไกล่เกลี่ยต่อขังและเศษพืช หลังการเก็บเกี่ยว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://r01.ldd.go.th/spb/Document%2059/Taiklobtorsaug.pdf> (6 สิงหาคม 2560).
- อนุสิษฐ์ ณะพิมพ์เมธา. (2554). **การผลิตเอทานอลและเอนไซม์โดยกระบวนการหมักจากผักตบชวา**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://research.rdi.ku.ac.th/forest/Project.aspx?ProjectNumber=5410151000&BudgetYear=2011>. (12 มกราคม 2559).
- อภิศรา. (ม.ป.ป.). **พอลิแซ็กคาไรด์โครงสร้าง**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://biomolecule.myreadyweb.com/home> (6 สิงหาคม 2560).
- อับดุลลาตีฟ ดอโรแม, และสินินาฏ จงคง. (2557). การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกกล้วยด้วยสารละลายน้ำส้มสายชู. **วิศวกรรมลาดกระบัง**, 31(1), 31-36.
- อาคม รามสุวรรณ. (2556). **ความรู้เรื่องเชื้อเพลิง E85**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.thairath.co.th/content/life/344731>. (6 สิงหาคม 2560).
- Abedinifar, S., Karimi, K., Khanahmadi, M., & Taherzadeh, M. J. (2009). Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, 33, 828-833.
- Adams, L. (2009). **ENZYME TECHNOLOGY**. [online]. Available <http://enzymetechnology.blogspot.com/2009/10/enzyme-technology.html> (3 August 2017).
- Ao, X., Jun, C., Wenlu, S., Cong, Y., Junhu, Z., & Cen, K. (2013). Enhancing enzymatic saccharification of water hyacinth through microwave heating with dilute acid pretreatment for biomass energy utilization. **Energy Procedia**, 6(1), 158-166.
- Arroyo, L. F., Orlic S, Q., A, & Barrio, E. (2009). **Saccharomyces cerevisiae**. [online]. Available https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae (12 January 2017).
- Banerjee, D., Mukherjee, S., Pal, S., & Khowala, S. (2016). Enhanced saccharification efficiency of lignocellulosic biomass of mustard stalk and straw by salt pretreatment. **Industrial Crops and Products**, 80, 42-49.
- Belal, E. B. (2013). Bioethanol production from rice straw residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44(1), 225-234.

- Bharathi, K. (2006). PRETREATMENT STUDIES OF RICEBRAN FOR THE EFFECTIVE PRODUCTION OF CELLULASE. **Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.**, 5(2), 1253-1264.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Res.**, 2011, 1-17.
- Devendra, P. M., Ankit, S., & Sangeeta, N. (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **Biotech.**, 5, 507-609.
- Dubois, M., et al. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28(3), 350-356.
- Edita, M., Dian, A., Sriramulu, G., Kyeong, E. K., Surn-Teh, B., Changshin, S., Don-Hee, P. (2010). IMMOBILIZATION OF *Saccharomyces cerevisiae* IN RICE HULLS FOR ETHANOL PRODUCTION. **MAKARA. TEKNOLOGI.**, 14(2), 61-64.
- Farooq Latif, & Rajoka, M. L. (2001). Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, 77(1), 57-63.
- Farzad, M., Hamid, A., Sabihe, S.-Z., Mohammad, R. E., & Keikhosro, K. (2013). Improvement of acetone, butanol and ethanol production from rice straw by acid and alkaline pretreatments. **Fuel**, 11(2), 8-13.
- Fernando W.G., Ramarathnam R., A.S., K., & S.C., S. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, 37(1), 955-964.
- Gibson, L. (2013). **Hemicelluloses**. [online]. Available <https://en.wikipedia.org/wiki/Hemicellulose> (3 August 2017).
- Gnansounou, E. (2010). **Bioethanol**. [online]. Available <http://bpe.epfl.ch/page-34012-en.html> (6 August 2017).
- Hsu, T. C., Guo, G. L., Chen, W. H., & Hwang, W. S. (2010). Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresour Technol**, 101(13), 4907-4913.

- Huan, M., Liu, W-W., Chen, X., Wu, Y-J., & Yu., Z.-L. (2009). Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. **Bioresource Technology**, 10(1), 1279-1284.
- Ibrahim, H. A.-H. (2012). Pretreatment of straw for bioethanol production. **Energy Procedia**, 14, 542-551.
- Jesse, F. G. (1970). Method for Simultaneous Direct Estimation of Glucose and Xylose in Serum. **CLINICAL CHEMISTRY**, 16(2), 85-91.
- Johnathan E. (2007). Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, 68, 235-241.
- Kang, K. E., Park, D. H., & Jeong, G. T. (2013). Effects of inorganic salts on pretreatment of Miscanthus straw. **Bioresource Technol**, 132, 160-165.
- Kok, F. N., & Hasirci, V. (2000). **In situ bioremediation of xenobiotics: immobilized biocatalysts in bioreactors**. In Wise, D.L., Trantolo, D.J., Cichon, E.J., Inyang, H.I., and Stottmeier U., New York: Marcel Dekker.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapfle, M., & Ladisch, M. R. (2005). Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technol**, 96, 673-686.
- Nelson, N. (1994). A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, 153(1), 375-380.
- Okeke, B. C., & Obi, S. K. C. (1995). SACCHARIFICATION OF AGRO-WASTE MATERIALS BY FUNGAL CELLULASES AND HEMICELLULASES **Bioresource Technology**, 51(1), 23-27.
- Panchal, C. J. (1990). **Yeast Strain Selection**. VetroGen Corporation, London, Ontario, Canada Marcel Dekker, INC., New York and Basel.
- Pongthep, A., Pattana, L., Prasit, J., & Lakkana, L. (2012). Repeated-Batch Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Sweet Sorghum Stalks. **Energies**, 5, 1215-1228.
- Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1991). **Yeast Technology**. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Reese, E. T., Levinson, H.S. (1952). A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganism. **Physid. Plantarum**, 5(1), 345-366.

- Rose, A. H., & Harrison, J. S. (1970). **Yeast technology (Vol. 3)**. London: Academic Press.
- Saha, B. C., & Cotta, M. A. (2008). Lime pretreatment enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, 32(10), 971-977.
- Seo, H. B., et al. . (2009). Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and Dichomate oxidation and its application to bioethanol production process. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 36(2), 285-292.
- Szczodrak, J. (1988). The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, 32(6), 771-776.
- Tang, P. D. P., & Le, V. V. M. (2013). Fermentation performance of free and immobilized yeast on cork (*Sonneratia caseolaris*) root – application of immobilized yeast to repeated batch ethanol fermentation. **IFRJ**, 20(4), 1813-1817.
- Xu, J., Cheng, J. J., Sharma-Shivappa, R. R., & Burns, J. C. (2010). Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. **Bioresour Technol**, 101(8), 2900-2903.
- Yoswathana, N., Phuriphapat, P., Treyawutthiwat, P., & Eshtiaghi, M. N. (2010). Bio-ethanol Production from Rice Straw. **Energy Rec. J**, 1(1), 26-31.
- Zheng, Y., Pan, Z., & Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **Int J Agric & Biol Eng**, 2(3), 51-68.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	อภิสร่า แซ่จันทร์	
เกิดเมื่อ	11 มิถุนายน 2535	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2558	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพลังงานทดแทน วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2554	มัธยมศึกษาตอนปลาย สายวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ โรงเรียนบางสะพานวิทยา จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

