สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp.

Enhancement of Bioethanol Production from Agricultural Residues by using *Trichoderma* sp.

นายชลอ จารุสุทธิรักษ์

RCH
ช 232ก
2554

เลขหมู่........
เลขทะเบียน 137314
วัน เดือน ปี 22 ต.ค. 2558

.b 12623271
.i ....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2554

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร ด้วย เชื้อ *Trichoderma sp.*	
แหล่งเงิน	เงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2554 ⁄	
ประจำปีงบประมาณ	2554	จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี	ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2553 ถึง 30 กันยายน 2554
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลอ จารุสุทธิรักษ์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์	

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการปรับสภาพแกลบและรำหยาบเบื้องต้นด้วยวิธีทางเคมี กายภาพและชีวภาพโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยการนำแกลบและรำหยาบไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแกลบและรำหยาบไปย่อยสลายด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยแปรค่าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ของเชื้อราเป็น 10^5, 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาการหมัก 0-5 วัน จากนั้นนำมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) ผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp. มีค่าเท่ากับ 4.18, 4.79 และ 5.06 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์เป็น 10^5, 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยที่สารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและใช้เวลาการหมักเร็วที่สุดคือ 3 วัน การขยายขนาดการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย เชื้อ *Trichoderma* sp. พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 4.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบ จากนั้นนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มาผ่านกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเวลา 4 วัน พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ 1 กรัม ให้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ย 0.375 กรัมต่อกรัมกลูโคส คิดเป็น 1.09 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบ

คำสำคัญ : แกลบ, เชื้อราไตรโคเดอร์มา, น้ำตาลรีดิวซ์, ไบโอเอทานอล, รำหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Enhancement of Bioethanol Production from Agricultural Residues by using *Trichoderma sp.*

Researcher: Assistant Professor Dr. Chalor Jarusutthirak

Faculty: Science **Department:** Chemistry

ABSTRACT

This research studied pretreatment of rice husk and maize bran by a combination of chemical, physical, and biological treatment using *Trichoderma sp.* to improve the efficiency of bioethanol production from agricultural residues. Firstly, rice husk and maize bran were boiled in sodium hydroxide solution at a temperature of 85 °C for 1 hour. Then the components were digested by *Trichoderma* sp. to produce reducing sugar. The concentration of spore solution was varied at 10^5, 10^6, and 10^7 spore/ml, whereas the digestion time was varied in a range of 0-5 days. The reducing sugar was measured by Dinitrosalisylic (DNS) method. The results showed that reducing sugar produced by *Trichoderma* sp. were found to be 4.18, 4.79, and 5.06 mg/g of rice husk at the spore concentrations of 10^5, 10^6, and 10^7 spore/ml, respectively. With the spore concentration of 10^7 spore/ml at 3 days of digestion, reducing sugar was produced at a maximum yield. The result from up-scaled reactor showed that reducing sugar was produced in the amount of 4.33 mg/g of rice husk. The reducing sugar was simultaneously fermented by *Saccharomyces cerevisiae* for 4 days in a process of bioethanol production. The result showed that 1 gram of reducing sugar yielded 0.375 gram of ethanol, equivalent to 1.09 mg per gram of rice husk.

Keywords : rice husk, *Trichoderma* sp., reducing sugar, bioethanol, maize bran

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน เงินงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ของสาขาวิชาเคมีและสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลอ จารุสุทธิรักษ์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข

กิตติกรรมประกาศ ค

สารบัญ ง

สารบัญตาราง ฉ

สารบัญภาพ ช

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 รำหยาบและแกลบ 5

2.2 การปรับสภาพเบื้องต้นของวัตถุดิบ 9

2.3 เอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา 10

2.4 เชื้อ *Trichoderma* sp. ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 13

2.5 กระบวนการผลิตเอทานอล 14

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 17

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 18

3.1 สารเคมี 18

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 18

3.3 วิธีการทดลอง 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย 27

4.1 ลักษณะทางกายภาพของรำหยาบและแกลบที่ได้รับการบำบัดเบื้องต้น 26

4.2 ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยรำหยาบและแกลบด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp. 28

4.3 การศึกษาระยะเวลาและความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแกลบด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp. 28

4.4 การขยายขนาดการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแกลบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp 30

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*. 30

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 32

5.1 สรุปผลการวิจัย 32

5.2 ข้อเสนอแนะ 32

เอกสารอ้างอิง 33

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี 36

ภาคผนวก ข เครื่องมือวิเคราะห์และวิธีการวิเคราะห์ 38

ภาคผนวก ค ผลการทดลอง 42

ภาคผนวก ง ตัวอย่างการคำนวณ 51

ประวัตินักวิจัย 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 เครื่องมือและ/หรือวิธีการ ที่ใช้ในวิเคราะห์พารามิเตอร์ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (ก) แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส และ (ข) แสดงพันธะระหว่างสายเซลลูโลสในชั้นเดียวกันและระหว่างชั้น 6

2.2 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส 8

2.3 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน 8

2.4 ลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส 11

2.5 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส 12

2.6 ลักษณะเชื้อ *Trichoderma sp.* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 14

2.7 กลไกการผลิตเอทานอล 14

2.8 การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลโดยการหมักของยีสต์ 15

2.9 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส 16

2.10 การหมักเอทานอลจากแป้ง 16

3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย 23

3.2 ภาพแสดงรายละเอียดถังหมักวัสดุ 24

4.1 ลักษณะทางกายภาพของรำหยาบ 26

4.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่ระยะเวลาการหมักรำหยาบและแกลบที่ 1-5 วัน 27

4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากแกลบและรำหยาบเมื่อใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อไตรโคเดอร์มาที่มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร 28

4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักแกลบด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่างๆ กัน 29

4.5 ปริมาณการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแกลบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. 30

4.6 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากน้ำตาลเปรียบเทียบระหว่างทฤษฎีและการทดลอง 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วิกฤตการณ์การขาดแคลนพลังงานนับวันยิ่งทวีความรุนแรงมากขึ้น ทั้งนี้เกิดจากความต้องการใช้พลังงานที่เพิ่มสูงขึ้นอยู่ตลอดเวลาทั้งในภาคประชาชน ธุรกิจ อุตสาหกรรม และการขนส่ง ดังนั้นเพื่อป้องกันและบรรเทาปัญหาดังกล่าว การใช้พลังงานทดแทน อาทิ เช่น แสงอาทิตย์ พลังลม พลังน้ำ ก๊าซชีวภาพ และไบโอเอทานอล เป็นต้น จึงเป็นสิ่งจำเป็นและควรได้รับการพัฒนาเพื่อการนำมาใช้อย่างเหมาะสม

ไบโอเอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ กำลังได้รับความนิยมในการนำมาใช้เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งโดยเฉพาะการผสมในน้ำมันเชื้อเพลิง เนื่องจากเป็นสารที่มีค่าร้อยละของออกซิเจนในโมเลกุลสูง ทำให้เกิดการสันดาปของเครื่องยนต์ได้เป็นอย่างดี ลดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสาเหตุของมลพิษทางอากาศ (Sanchez และ Cardona, 2008) นอกจากนี้ไบโอเอทานอลยังสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีอยู่ในประเทศ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด และอ้อย เป็นต้น นับเป็นการลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ ลดการผูกขาดของประเทศผู้ผลิตน้ำมันและการขาดดุลทางการค้า อีกทั้งยังเป็นการสร้างอาชีพ เสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรของประเทศได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอ-เอทานอล ยังมีประโยชน์ด้านการเป็นอาหารสำหรับบริโภคทั้งภายในประเทศและการส่งออก จึงมีการกำหนดสัดส่วนการใช้ประโยชน์ของวัตถุดิบดังกล่าวเพื่อป้องกันภาวะการขาดแคลนอาหารในอนาคต เป็นผลให้วัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลถูกจำกัด ดังนั้นหากมีการประยุกต์ใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ไม่มีประโยชน์ในด้านการบริโภคแล้วก็จะเป็นหนทางในการพัฒนาการใช้ไบโอเอทานอลเพื่อเป็นพลังงานทดแทนได้อย่างยั่งยืน

สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรมที่ประชากรส่วนใหญ่นิยมบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก จึงทำให้มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจากโรงสีข้าว คือ รำละเอียด รำหยาบและแกลบ ซึ่งรำละเอียดยังมีประโยชน์สามารถนำไปใช้เป็นในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น น้ำมันพืชได้ ส่วนรำหยาบและแกลบ แม้จะมีการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์ ทำถ่านอัดแท่ง หรือใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวมวล แต่มูลค่าของวัสดุเหลือใช้ยังมีค่าต่ำ หากมีการพัฒนาสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลได้แล้ว จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรนั้นๆ ได้ จากการศึกษาพบว่า ในโมเลกุลของรำหยาบและแกลบ ประกอบด้วยสารลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นองค์ประกอบ หากสามารถเปลี่ยนรูปสารอินทรีย์ดังกล่าวในรำหยาบและแกลบ ไปเป็นน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอเอทานอล จะทำให้สามารถผลิตไบโอเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากโมเลกุลของ สารลิกโนเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ยาก ดังนั้นในการผลิตไบโอเอทานอลด้วยกระบวนการหมักจากรำหยาบและแกลบจึงต้องทำการบำบัดเบื้องต้นก่อนซึ่งโดยทั่วไปใช้วิธีทางกายภาพ ทางเคมี หรือทางชีวภาพ วิธีการบำบัดทางกายภาพ เช่น การบดเป็นการลดขนาดของรำหยาบและแกลบให้มีขนาดเล็กลงเพื่อให้เส้นใยที่ประกอบด้วยไมโครไฟบริล (microfibril) ส่วนที่เป็นผลึกแตกออกและการต้มเป็นการเพิ่มพื้นที่ของรำหยาบและแกลบ ทำให้เอนไซม์ทำการย่อยสลายได้ง่ายขึ้น วิธีการบำบัดทางเคมี เช่น การใช้กรดในการย่อยสลายโครงสร้างของเซลลูโลสในส่วนที่เป็นโครงผลึก (crystalline) แยกออกจากกัน ส่วนการใช้ด่างเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของรำหยาบและแกลบเช่นกันโดยใช้ร่วมกับการต้ม สำหรับวิธีทางชีวภาพที่ย่อยสลายเซลลูโลส อาจทำได้โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากโปรโตซัว แบคทีเรีย หรือเชื้อรา เป็นต้น โดยการย่อยสลายเซลลูโลสทางชีวภาพนี้ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์อีกทั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรงและอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่สิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงต่ำกว่าและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (พิรุฬห์พร, 2550) เชื้อราในกลุ่ม *Trichoderma sp.* เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินตามธรรมชาติ อาศัยเศษซากอินทรียวัตถุในธรรมชาติโดยทั่วไปสำหรับการเจริญเติบโตสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Trichoderma sp.* นั้น มีการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสในโครงสร้างของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Zhang และ Cai, 2008) ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลได้ต่อไป

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลจากรำหยาบและแกลบ โดยการบำบัดเบื้องต้นด้วยการย่อยสลายเซลลูโลสในรำหยาบและแกลบด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพร่วมกับวิธีทางชีวภาพ ด้วยเชื้อ *Trichoderma sp.* โดยศึกษาปัจจัยที่มีผล ได้แก่ อัตราส่วนของวัสดุทางการเกษตรต่อปริมาณเชื้อ ระยะเวลาในการย่อยสลาย ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายจะถูกนำไปทดสอบการผลิตไบโอเอทานอลในระดับห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส ผลของการศึกษาวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์และการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร คือ รำหยาบและแกลบ ในการผลิตไบโอเอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานทดแทนอีกทางเลือกหนึ่งในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการบำบัดเบื้องต้นในการย่อยสลายเซลลูโลสในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ รำหยาบและแกลบ โดยวิธีชีวภาพด้วยเชื้อ *Trichoderma sp.*ร่วมกับวิธีทางเคมีและกายภาพ
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากรำหยาบและแกลบที่ผ่านการบำบัดเบื้องต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล คือ รำหยาบและแกลบ ซึ่งได้จากโรงสีข้าว
2. ศึกษากระบวนการบำบัดเบื้องต้นโดยวิธีทางเคมีและทางกายภาพ คือ การต้มในสภาวะด่างร่วมกับวิธีการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเชื้อ *Trichoderma sp.*ที่อยู่ในรูปสารละลายสปอร์
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดเบื้องต้น ได้แก่ ระยะเวลาการหมัก โดยแปรค่าที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน และ ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ แปรค่าที่ 10^5, 10^6, และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
4. ศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดเบื้องต้นโดยการวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)
5. ศึกษาวิธีการแปรรูปน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อผลิตเป็นไบโอเอทานอล ด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยควบคุมปัจจัยในการผลิตไบโอเอทานอล ได้แก่ค่าพีเอชที่ 5 และอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อหมัก ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น
6. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตไบโอเอทานอล โดยการวัดปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง GC-FID

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อ *Trichoderma sp.*

1) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ รำหยาบและแกลบ จากโรงสีข้าว

2) การเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma sp.*และการเตรียมสารละลายสปอร์

ทำการคัดแยก (Isolation) เชื้อ *Trichoderma sp.* และเตรียมเชื้อ *Trichoderma sp.* ในรูปสารละลายสปอร์ เพื่อการนำมาใช้งาน

3) การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อ *Trichoderma sp.*

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการบำบัดเบื้องต้นทางกายภาพและเคมี ร่วมกับการบำบัดทางชีวภาพด้วยเชื้อ *Trichoderma sp.* เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

- การบำบัดเบื้องต้นทางกายภาพและเคมี โดยการเติม 2% NaOH ปริมาตร 40 มล. และต้มที่อุณหภูมิ 85°ซ เป็นเวลา 1 ชม.

- การบำบัดทางชีวภาพ โดยเติมเชื้อ *Trichoderma sp.* ในรูปสารละลายสปอร์ 3 มล.ต่อปริมาณวัตถุดิบ 5 กรัม

โดยมีขั้นตอนการดำเนินการ ดังนี้

- ชั่งตัวอย่างวัสดุทางการเกษตร ได้แก่ รำหยาบ หรือ แกลบ ปริมาณ 5 กรัมใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งค่าพีเอชของน้ำล้างมีค่าพีเอชเป็น 7 นำตัวอย่างที่ล้างใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

- เติม 1 M HCl จนกระทั่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 (Zhang และ Cai 2008) ปิดด้วยจุกสำลีและหุ้มปากขวดด้วยถุงพลาสติกอีกครั้ง

- นำขวดรูปชมพู่ทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 บาร์ เป็นเวลา 45 นาที

- เติมเชื้อ *Trichoderma sp.* ในรูปสารละลายสปอร์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในชุดทดลอง และ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในชุดแบลงค์ ปิดด้วยจุกสำลีตั้งทิ้งไว้ในตู้ปลอดเชื้อและทำการหมักทิ้งที่อุณหภูมิห้องในตู้บ่ม โดยแปรค่าระยะเวลาหมักเป็น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน

- นำตัวอย่างรำหยาบหรือแกลบที่ผ่านการหมักมากรอง โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 5 นาทีจากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และกรวยบุชเนอร์เพื่อนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

2. การขยายขนาดกำลังการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณมากเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอเอทานอลสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป โดยวิธีการบำบัดเบื้องต้นที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *Trichoderma sp.* ได้จากขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว

3. การศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์

ทำการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคส โดยทำการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ปัจจัยควบคุม คือ ค่าพีเอช 5.5 และ อุณหภูมิ 30°ซ (Palmqvist และคณะ, 1996)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงแนวทางในการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกที่ใช้ผสมในน้ำมันเบนซินและเป็นการแก้ปัญหาโลกร้อน
2. เป็นการลดปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและเป็นการเพิ่มมูลค่าของรำหยาบและแกลบ
3. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยมาขยายขนาดการผลิต เพื่อนำไปสู่การผลิตในภาคอุตสาหกรรม
4. สามารถนำงานวิจัยที่เกิดขึ้นไปใช้ประโยชน์กับภาคเกษตรกรรม และภาคอื่นๆที่เกี่ยวข้องได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รำหยาบและแกลบ

รำหยาบได้จากการขัดผิวเมล็ดข้าวกล้องมีส่วนผสมของแกลบปนอยู่ ทำให้คุณค่าต่ำกว่ารำละเอียดเพราะมีเยื่อใยสูงและมีแร่ซิลิกาปนในแกลบมาก รำเป็นส่วนผสมของเพอริคาร์บ (pericarp) อะลิวโรนเลเยอร์ (aleuron layer) เยอร์ม (germ) และบางส่วนของเอนโดสเปอร์ม (endosperm) ของเมล็ด รำหยาบมีโปรตีนประมาณ 8 – 10 เปอร์เซ็นต์ ไขมันประมาณ 7 – 8 เปอร์เซ็นต์ รำมีไขมันสูงจึงไม่ควรเก็บรำไว้นานเกิน 15 – 20 วัน เพราะจะมีกลิ่นจากการหืน รำข้าวที่ได้จากการสีข้าวเก่ามีความชื้นต่ำทำให้เก็บได้นานกว่ารำข้าวใหม่ที่มีความชื้นสูงเชื้อราขึ้นง่ายและเหม็นหืนเร็ว รำข้าวมีคุณค่าทางอาหารสูงได้แก่ โปรตีน ไขมัน ใยอาหาร เถ้า วิตามิน และเกลือแร่ต่างๆ สำหรับรำหยาบยังไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างจริงจังแต่พบว่ารำหยาบมีสารอินทรีย์อยู่ในปริมาณมาก มีศักยภาพในการนำไปเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพหรือเอทานอลได้

แกลบคือส่วนเปลือกแข็งหุ้มเมล็ดข้าว ได้จากกระบวนการกะเทาะเปลือกข้าวเปลือก ให้เป็นข้าวกล้อง จากการสำรวจ โดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในปีหนึ่งๆ มีปริมาณแกลบสูงถึงประมาณ 5,878.14 พันตัน ซึ่งในปัจจุบันนี้แกลบถูกนำไปใช้ประโยชน์เป็นปุ๋ย วัสดุปูรองนอนในโรงเรือนเลี้ยงสัตว์ และเชื้อเพลิงสำหรับการผลิตกระแสไฟฟ้า

2.1.1 ลักษณะทางกายภาพและสัณฐานวิทยา

รำหยาบเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างแกลบและรำละเอียดที่ได้หลังจากการสีข้าว ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาลอ่อนลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายปิดเป็นรูปทรงรีที่มีแกนตามยาวเป็นแนวสมมาตร มีความยาวอยู่ในช่วง 6-10 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-2.5 มิลลิเมตรมีน้ำหนักประมาณ 22.5-25.2% ของข้าวเปลือก ความหนาของผนังเซลล์ประมาณ 0.1 มิลลิเมตร และมีความหนาแน่น (bulk density) โดยประมาณ 0.148 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เนื่องจากที่ผิวด้านนอกของรำหยาบมีซิลิกาผสมอยู่เป็นปริมาณสูงทำให้รำหยาบมีคุณสมบัติแตกหักง่าย ซิลิกาในรำหยาบเมื่อเทียบความแข็งตามโมห์สเกล (Mohs scale) มีความแข็งเท่ากับ 5.5 ถึง 6.5 (วนิดา, 2551)

แกลบมีขนาดเล็ก ยาวไม่เกิน 5 มม. และหนาไม่เกิน 2 มม. สีเหลือง แกลบได้มาจากการสีข้าวเปลือก ซึ่งต้องมีความชื้นไม่เกิน 15% ดังนั้นความชื้นของแกลบจึงไม่เกิน 15% ผิวนอกของแกลบมีลักษณะเป็นเซลล์รูปเหลี่ยม ซึ่งมีความเข้มข้นของซิลิกาสูง ถูกปิดทับด้วยคิวติเคิล (Cuticle) หนา และมีขนสั้นๆ อยู่บนผิว ภายในประกอบด้วยเส้นใยและเซลล์ที่ประกอบด้วยเส้นใยต่างๆ ชั้นกลางมีปริมาณซิลิกาอยู่ต่ำกว่าชั้นนอก โดยอาจสรุปโครงสร้างเนื้อเยื่อได้ดังนี้

- ผนังเซลล์ด้านนอกประกอบด้วยเซลล์ลักษณะเป็นปุ่มที่มีซิลิกาอยู่สูง
- สเคอร์เรนไคมา (Sclerenchyma) มีผนังเซลล์หนามาก ทำให้มีความแข็งแรงทนทานมากประกอบด้วยเส้นใยต่างๆ อันประกอบด้วย ลิกนิน และซิลิกา
- พาเรนไคมา (Parenchyma) เป็นเซลล์ ลักษณะคล้ายฟองน้ำมีรูพรุนและมีรูปร่างแตกต่างกัน
- ผนังชั้นในประกอบด้วยเส้นใยที่มีจุดศูนย์กลางร่วมกัน (สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย, 2546)

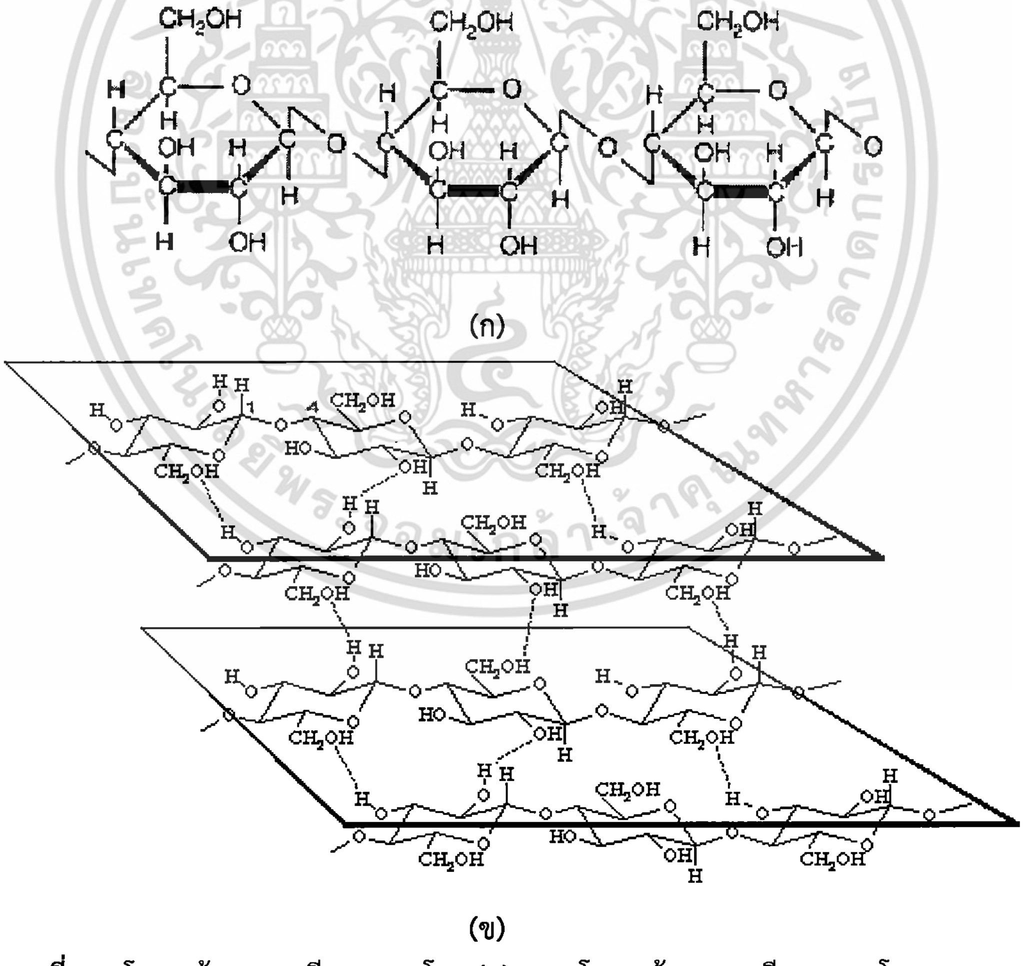
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 องค์ประกอบของรำหยาบและแกลบ

องค์ประกอบของรำหยาบและแกลบจะแตกต่างกันไปตามแหล่งเพาะปลูก แต่ส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์จำพวกเซลลูโลส ลิกนิน และส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ ซึ่งมีซิลิกา (SiO_2) เป็นองค์ประกอบหลัก และสิ่งปนเปื้อน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์พบว่าประกอบด้วย คาร์บอน ร้อยละ 51.2 ไฮโดรเจน ร้อยละ 6.9 และออกซิเจน ร้อยละ 41.9 โดยน้ำหนัก ปริมาณสารอินทรีย์ประกอบด้วย ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ได้แก่ เซลลูโลส 32.7%, เฮมิเซลลูโลส 20.5%, ลิกนิน 21.8%, ซิลิกา 15.1%, ส่วนที่ละลายน้ำได้ 2.8% และ ความชื้น 7.5% (วรนันต์, 2549)

ก. เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ชนิดหนึ่งที่ไม่มีกิ่งก้านสาขา ยาวถึง 2,000 – 10,000 หน่วยกลูโคส ประกอบหน่วยที่ซ้ำๆกันของ β-D-Anhydroglucopyranose สูตรอย่างง่ายของเซลลูโลสคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n เป็นจำนวนหน่วยของกลูโคสโมโนเมอร์ในสายโซ่พอลิเมอร์ ซึ่งปกติ n มีค่าตั้งแต่ 30 – 300 หน่วยกลูโคส ทำให้เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50,000 – 500,000 โดยมีพันธะที่เชื่อมต่อแต่ละหน่วยคือ β-1,4-Glycoside Linkage ระหว่าง C_1 และ C_4 ต่อกันเป็นสายตรง โครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลส ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (ก) แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส และ (ข) แสดงพันธะระหว่างสายเซลลูโลสในชั้นเดียวกันและระหว่างชั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงขนานกันเป็นมัด เนื่องจากในแต่ละสายโซ่โมเลกุลประกอบด้วย Intermolecular Hydrogen Bond ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนบน C_3 กับ อะตอมออกซิเจนบนวงไพราโนส (C_5) แต่ละสายโซ่โมเลกุลจะเชื่อมกันด้วย Inter-chain Hydrogen Bond ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนในหมู่ไฮดรอกซีบน C_6 และอะตอมออกซิเจนในหมู่ไฮดรอกซีบน C_3 (เทียมใจ, 2539)

เซลลูโลสมีลักษณะการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลสองแบบ คือ

1. ลักษณะผลึก (Crystalline) มีการจัดเรียงตัวกันเป็นระเบียบโซ่โมเลกุลอยู่รวมกันเป็นเส้นยาวขนานไปตามความยาวของเส้นใย
2. ลักษณะกึ่งผลึก (Semi-crystalline) โมเลกุลบางตอนเรียงตัวกันดี บางตอนเปิดเป็นช่องว่างเกี่ยวพันกันไปมาไม่เป็นระเบียบ เรียกว่า Amorphous ยึดอยู่ด้วยกัน

สมบัติทางเคมีของเซลลูโลส

เมื่อเซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารเคมีบางชนิดจะเกิดปฏิกิริยาง่ายๆดังนี้

- ปฏิกิริยาที่ทำให้เซลลูโลสพองตัวและกระจายตัวโดยไม่ทำให้เซลลูโลสยาวขึ้นหรือเปลี่ยนโครงสร้างของเซลลูโลสในเส้นใย
- ปฏิกิริยาที่ทำให้ความยาวของสายโซ่เซลลูโลสเปลี่ยนเพราะเสื่อมสภาพ
- ปฏิกิริยาที่ทำให้หมู่ไฮดรอกซี (-OH) เปลี่ยนเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ ได้ง่าย ทำให้เกิดอนุพันธ์ของเซลลูโลสต่างๆ เช่น Viscose, Rayon, Cellophane, Cellulose Acetate, Cellulose Propionate, Cellulose Nitrate และ Amidoximate Cellulose เป็นต้น

ปฏิกิริยาทั้งสามชนิดนี้มักจะเกิดร่วมกันเสมอ นอกจากนี้สมบัติทั่วไปของเซลลูโลส คือทนต่อด่างแต่ไม่ทนต่อกรดเข้มข้น เผาไหม้ในอากาศโดยไม่มีกลิ่นเหม็นและเซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซีสามหมู่ในแต่ละหน่วยย่อยทำให้มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนบวกกับไฮโดรเจนไอออนได้ดี

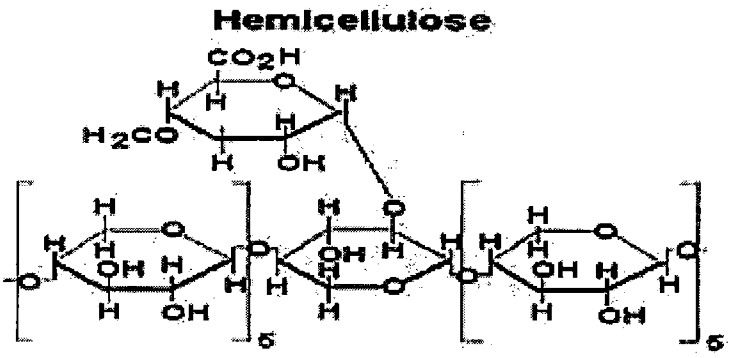
สมบัติทางกายภาพของเซลลูโลส

- จุดหลอมเหลวเท่ากับ 260 – 270 องศาเซลเซียส
- การละลายเซลลูโลสสามารถละลายได้ในกรดแก่ ได้แก่ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 60 – 65% โดยน้ำหนัก กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นมากกว่า 40% โดยน้ำหนัก กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 83% โดยน้ำหนัก

ข. เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นร่วมกับพวกเซลลูโลสแต่จะอยู่ในรูปอสัณฐานที่มีลักษณะการจัดเรียงตัวของอะตอมทางเคมีต่างกับพวกเซลลูโลสและมีมวลต่ำกว่าเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosaccharide) ชนิดต่างๆ ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปเป็นจำนวน 100 โมเลกุลที่มีคุณสมบัติในการละลายเหมือนกันคือ ละลายได้ในสารละลายด่าง น้ำตาลเชิงเดี่ยวนี้แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ เพนโทแซนส์ (pentosans) และ เฮกโซแซนส์ที่ไม่ใช่เซลลูโลส (non cellulose hexosans) น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสคือ ดี-ไซแลนส์ (D-xylans) และ ดี-กลูโค-ดีแมนแนนส์ (D-gluco-D-mannans) และมีไซด์เชนส์เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น แอล-อะราบิโนส (L-arabinoses) จากภาพที่ 2.2 จะเห็นได้ว่าโครงสร้างส่วนใหญ่คล้ายกับพวกเซลลูโลสยกเว้นพวก พอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสจะประกอบด้วยหน่วยย่อย 50 – 200 หน่วย และต่อกันแบบกิ่งก้านสาขามากกว่าแบบเส้นตรง (ประทุม, 2540)

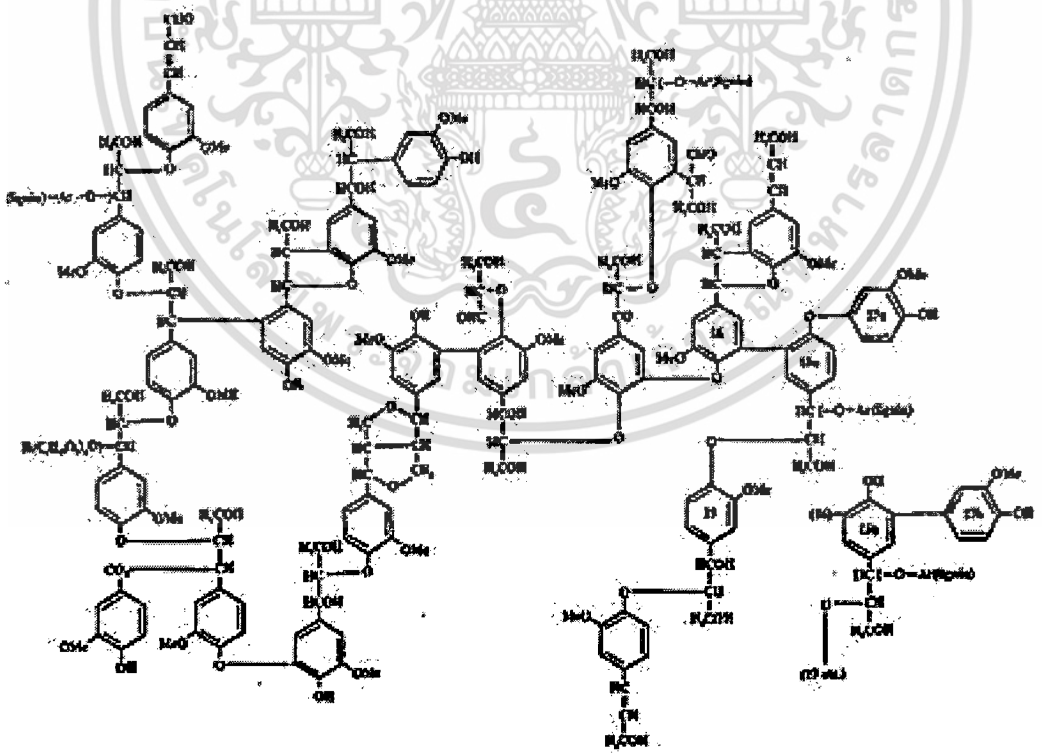
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส
ที่มา: ปรีชา, 2528

ค. ลิกนิน

ลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของพืช ที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่รวมกับเซลลูโลส ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่น ประกอบด้วยโครงสร้างอะโรมาติกของหน่วยฟีนิลโพรเพนที่เชื่อมต่อกันด้วยคาร์บอนสายตรง (Aliphatic chain) ดังภาพที่ 2.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่าลิกนินมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเป็นผนังเซลล์ของพืชซึ่งช่วยในการยึดและการเพิ่มความแข็งแรงของเซลล์พืช นอกจากนี้ลิกนินยังอยู่ในรูปอสัณฐานเช่นเดียวกับพวกเฮมิเซลลูโลส (Boerjan, 2003)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน
ที่มา: ปรีชา, 2528

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การปรับสภาพเบื้องต้นของวัตถุดิบ (Pretreatment)

การปรับสภาพเบื้องต้นของวัตถุดิบ (Pretreatment) โดยทั่วไปแบ่งเป็น 4 วิธีการดังนี้

2.2.1 วิธีการทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

1. การลดขนาดของสารโดยวิธีบดและโม่บด

เป็นการบดผลึก (Crystalline) ของเส้นใยที่ประกอบด้วยไมโครไฟบริลจำนวนมากซึ่งในแต่ละไมโครไฟบริลนั้นประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline Region) ให้แตกออกเพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้นรวมทั้งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น

2. กระบวนการใช้ไอน้ำความดันสูงทำให้เส้นใยแตก (Steam Explosion Process)

หลักการ คือ การทำให้วัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบนั้นอิ่มตัวด้วยไอน้ำภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูงและลดความดันลงทันที ทำให้น้ำระเหยอย่างรวดเร็วซึ่งจะทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน เป็นการเพิ่มขนาดเพื่อให้เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยา ความชื้นและอุณหภูมิสูงจะทำให้พืชปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นกรดอะซิติก ทำให้เกิดการกระตุ้นการย่อยสลายของเฮมิเซลลูโลสให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลเพนโตสบางส่วนจะกลายเป็นเฟอฟูรัลรวมทั้งน้ำตาลเฮกโซสบางส่วนเปลี่ยนเป็นไฮดรอกซิล เมทซิล เฟอฟูรัล วิธีนี้จึงจะเป็นผลร่วมของทั้งทางกายภาพและเคมี

2.2.2 วิธีการทางเคมี (Chemical Pretreatment)

ในการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีนี้จะละลายส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลลูโลสและเตรียมสู่ขั้นตอน acid hydrolysis หรือ enzymatic hydrolysis สารเคมีที่นิยมใช้มีดังนี้ คือ กรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารออกซิแดนต์

1) การใช้กรด (Acid Pretreatment)

เมื่อใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟูริก จะทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา

2) การใช้ด่าง (Alkaline Pretreatment)

เมื่อใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีผลทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสละลายออกมา รวมทั้งทำให้เกิดการพองตัว (Swelling) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ

3) การใช้สารออกซิแดนต์

สารเคมีที่ใช้ได้แก่ SO_2 ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ที่สามารถกำจัดลิกนิน เช่น $NaClO_2$, KB_2O_2, KIO_3 และ SO_3 โดยจะมีผลต่อการละลายของลิกนิน แต่วิธีการนี้จะทำให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมขึ้น โดยจะเกิดสาร Lignosulphonate ขึ้น ซึ่งไม่สามารถใช้ในการหมักได้เลยจึงถูกกำจัดออกจากระบบ เป็นปัญหาเดียวกับในอุตสาหกรรม Sulphite Pulping

2.2.3 วิธีการทางเคมีกายภาพ (Physico-Chemical Pretreatment)

วิธีนี้เป็นการปรับสภาพร่วมกันระหว่าง วิธีทางกายภาพ และ วิธีทางเคมี โดยวิธีการนี้เป็นการใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิสูงร่วมกับความดันและการใช้กรดหรือด่าง การปรับสภาพโดยใช้ไอน้ำเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการย่อยคาร์โบไฮเดรตและเซลลูโลสที่มีอยู่ในวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ ซึ่งการปรับสภาพด้วยวิธีนี้จะช่วยให้เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลส และละลายส่วนที่เป็นเฮมิ-เซลลูโลสไปในน้ำ โดยทำลายพันธะ glycosidic linkage แล้วปล่อยเฮมิเซลลูโลสไปในสารละลายโดยไม่ส่งผลต่อส่วนเซลลูโลส ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพการย่อย การปรับสภาพนี้สามารถใช้ในการประเมินค่าการละลายของเฮมิเซลลูโลส และความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยเซลลูโลส ซึ่งการปรับสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะไม่เปลี่ยนแปลงทั้งองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของวัตถุดิบ แต่จะช่วยให้อัตราการย่อยมีเพิ่มมากขึ้น

2.2.4 วิธีการทางชีวภาพ (Biological Pretreatment)

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ β-1,4-glucosidic ภายใต้โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสในธรรมชาติให้เป็นสายยาวและได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส วัสดุเซลลูโลสตามธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดการสลายตัวจากการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งพบทั่วไปในจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากในเชื้อรา เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะ (specificity) ต่อซับสเตรทหนึ่งๆ เท่านั้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีความบริสุทธิ์สูง

การใช้เชื้อรา *Trichoderma reesei* และ *Penicillium funiculosum* เป็นเชื้อราในตระกูล White Rot ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาทำการย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นกลูโคสได้ ส่วน *Sporatrichum pulverulentum* ซึ่งเป็น Cellulase–Less mutant ของเชื้อรา White Rot เช่นกันจะย่อยสลายเฉพาะลิกนินและเฮมิเซลลูโลสเท่านั้นและจะไม่ใช้เซลลูโลส (Rajeev, 2008)

2.3 เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา

2.3.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ *Trichoderma sp.* จากการศึกษาระบบเอนไซม์เซลลูเลสของรา ทำให้ทราบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ (Multicomponent enzyme) ประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน (ฉัตรชัย, 2548) ได้แก่

1) endoglucanase หรือ endo–β–1,4–glucanohydrolase ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลายขั้นตอนมาก่อน หรือย่อยสลายพวกสาร swollen soluble ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ และยังย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (Reducing end) ของสายโซ่เซลลูโลส แต่ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสธรรมชาติ โดยเอนไซม์จะตัดพันธะเบตา–1,4 (β–1,4–linkage) ภายในสายเซลลูโลสตรงบริเวณที่เป็นโครงสร้างอสัณฐานอย่างสุ่มทำให้ความยาวของเซลลูโลสสั้นลงอย่างรวดเร็วบริเวณปลายทางของสายเซลลูโลสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จะมีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย คือ โอลิโกเซลลูโลส เซลโลไบโอสและกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก

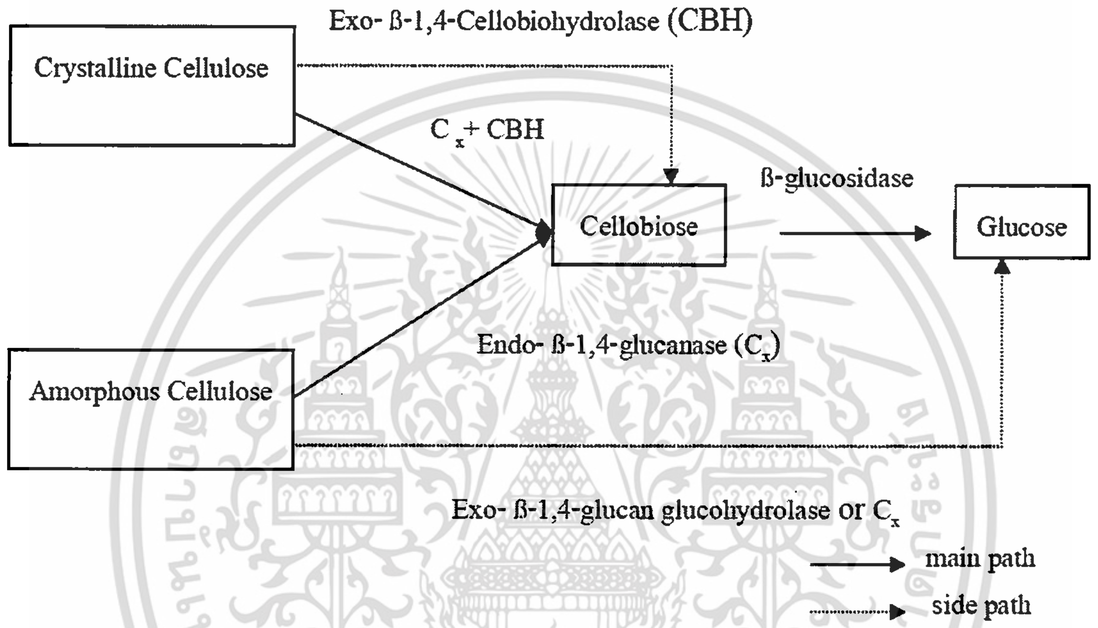
2) exoglicanase หรือ exo–β–1,4–glucanohydrolase ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกเซลลูโลส ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดขึ้นจากปลายด้านที่ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ของสายเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอส

3) cellobiase หรือ β–Glucosidase เป็นตัวเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส โดยทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสเป็นกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 กลไกในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

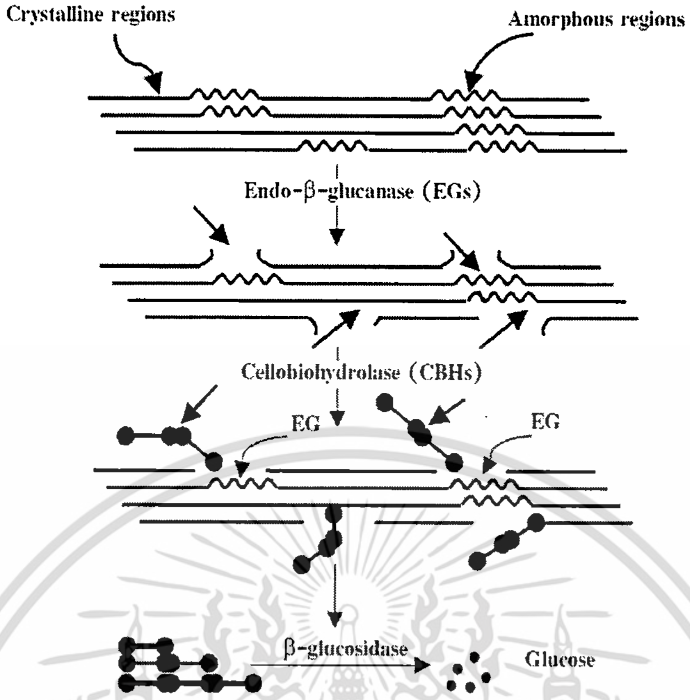
กลไกของการย่อยสลายเซลลูโลสเริ่มต้นโดยเอนไซม์เซลลูเลสเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสซึ่งเป็นสับสเตรท โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) จะสลายโครงสร้างเซลลูโลสส่วนที่เป็น amorphous แต่จะทำปฏิกิริยาได้น้อยในส่วนของเซลลูโลสที่เป็น crystalline จากนั้นเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) จะช่วยสลายโครงสร้างเซลลูโลสให้กลายเป็นเซลลูไบโอสซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุลและเอนไซม์เซลโลไบเอส (β–Glucosidase) จะย่อยเซลโลไบโอสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส ดังแสดงในภาพที่ 2.4 และ 2.5



ภาพที่ 2.4 ลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา : Gharpuray, 1983

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเอ็นไซม์ β-glucosidase ถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้มีผลยับยั้งต่อเนื่อง คือทำให้มีการสะสมของ เซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส
ที่มา : Tamaru, 1990

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ก) อุณหภูมิ (Temperature)

อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า “ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (Optimum temperature)” เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (Denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เซลลูเลส จะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส

ข) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชค่าหนึ่งเรียกว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ณ จุดที่ พีเอชมีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์จะลดลง เอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอชระหว่าง 5.0 ถึง 9.0 ความเข้มข้นของซับสเตรท (Substrate) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรท อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และลดช้าลงเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทสูงขึ้น จนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยา จะไม่เพิ่มขึ้นอีก

ค) ปริมาณเอนไซม์

เมื่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงจุดสูงสุด พบว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะมีค่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

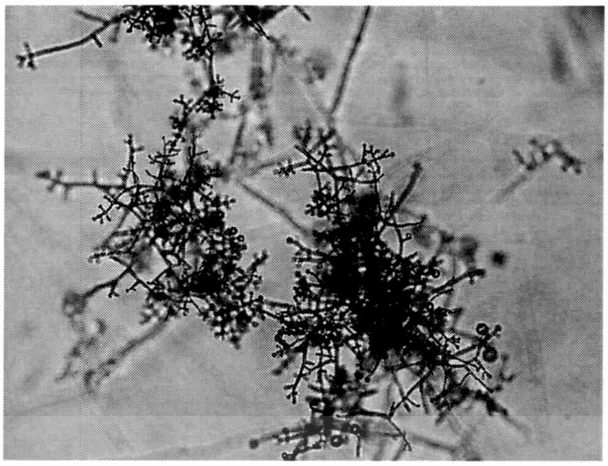
ง) ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme Inhibitor)

เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกระบวนการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะ ของเอนไซม์ต่อซับสเตรท และลักษณะของ Functional group ที่บริเวณ Active site ทำให้เข้าใจและสามารถ ควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้

2.4 เชื้อ *Trichoderma sp.* ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อ *Trichoderma sp.* เป็นเชื้อราชั้นสูงที่จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina และมี teliomorphs อยู่ใน subdivision Ascomycotiana คือ Hypocreales vinosa เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินและเศษซากอินทรียวัตถุธรรมชาติ เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เชื้อ *Trichoderma sp.* มีการสร้างเส้นใยสีขาวได้รวดเร็วและสร้างส่วนที่ขยายพันธุ์ที่เรียกว่าสปอร์ ซึ่งเกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สร้างสปอร์ได้จำนวนมาก รวมกันเป็นกลุ่มมีสีเขียว สามารถมีชีวิตรอดในสภาพธรรมชาติได้ดี ซึ่งอาศัยอาหารจากอินทรียวัตถุเศษซากพืชและเชื้อโรค การเจริญบนอาหารเริ่มแรกโคโลนีไม่มีสี (translucent) หรือสีขาวใส (watery white) เจริญแบบราบติดอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาโคโลนีจะมีลักษณะเป็นปุยฝ้าย (watery floccose) หรือเป็นกระจุกแน่น มีสีเขียว (green) หรือขาวล้วน (pure white) หรือเป็นลักษณะต่างๆในโคโลนีเดียวกัน เส้นใย (mycelium) ของเชื้อรา *Trichoderma sp.* ไม่มีผนังกั้นเซลล์แต่เป็นผนังเส้นใยเรียบมีการแตกกิ่งก้านมากมาย พบว่าการสร้างคลามายโดสปอร์ (chlamydospore) จะขึ้นทั้งระหว่างเส้นใยและปลายเส้นใย ส่วนใหญ่พบที่ระหว่างเส้นใยมากกว่าปลายเส้นใย ซึ่งสร้างจากเส้นใยที่แตกกิ่งออกมาสั้นๆ รูปร่างกลม (globose) หรือรูปกระสวย (elliposoid) ไม่มีสี ผนังเรียบ และพบ conidiophores มีการแตกกิ่งก้านมากมาย รวมกันเป็นปุยอย่างหลวมๆ หรือหนาแน่น และโดยทั่วไปบริเวณที่มีการสร้างสปอร์มีลักษณะเป็นวงรอบๆ (ring-like zone) หรือเกิดเดี่ยวๆ ไม่เป็นระเบียบบนเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อจากส่วนแกนกลางของก้าน conidiophore จะแตกกิ่งก้านด้านข้าง (side branch) จำนวนมาก มีขนาดสั้นๆ ซึ่งมีทั้งที่ออกมาเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่มจนถึง 3 อัน และสร้างต่อไปเรื่อยๆ มีขนาดเล็กลง (small side branch) และทำมุมกว้างกับแกนกลาง ทำให้เห็นลักษณะการแตกกิ่งคล้ายลักษณะของต้นสน ที่ปลายกิ่งก้านแต่ละอันเป็นที่เกิดของ phialide ซึ่งมีรูปร่างแบบขวดชมพู่หรือพินโบว์ลิ่ง บางครั้งยาวรีอย่างลูกแพร์จนถึงรูปไข่ โดยทั่วไปมีฐานแคบ บริเวณกลางๆ พองกว่าและด้านปลายค่อยๆ แคบลง จนถึงปลายคอเป็นรูปกรวย (conical neck) หรือค่อนข้างเป็นรูปทรงกระบอก หรือเกิดห่างสลับกันไปไม่เป็นระเบียบหรือเกิดเป็นคู่อยู่ตรงข้ามกัน (เกรียงศักดิ์, 2546) ดังภาพที่ 2.6

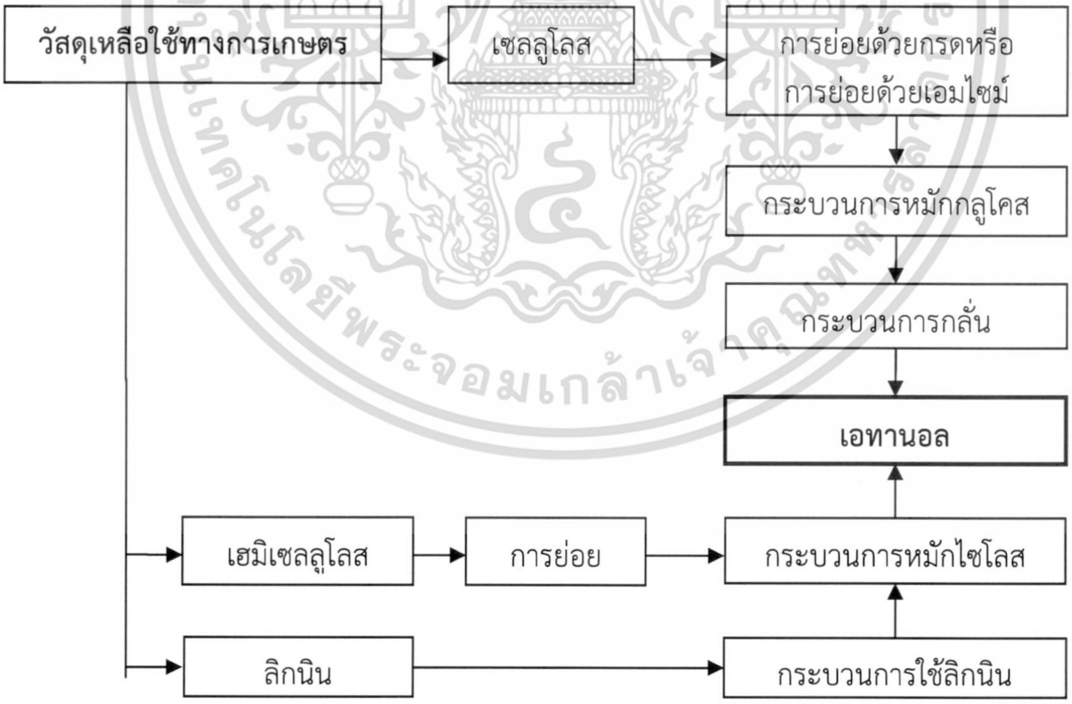
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.6 ลักษณะเชื้อ *Trichoderma sp.* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มา : Keisotyo, 2006

2.5 กระบวนการผลิตเอทานอล

เอทานอล หรือ Ethyl Alcohol เป็นแอลกอฮอล์ที่แปรรูปมาจากพืชจำพวกแป้ง และน้ำตาล รวมทั้งเซลลูโลสและ เฮมิเซลลูโลส โดยผ่านกระบวนการหมัก (Fermentation) วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ ผลิตเอทานอลมีอยู่ด้วยกันหลากหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด มันสำปะหลัง ฯลฯ ดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กลไกการผลิตเอทานอล
ที่มา : ฉัตรชัย, 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 กระบวนการหมัก

ในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักอาศัยกระบวนการทำงานของเชื้อยีสต์โดย เชื้อยีสต์นั้นจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลผ่านกระบวนการที่เรียกว่า ไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งตามทฤษฎีแล้วในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 51.11 กรัมและคาร์บอนไดออกไซด์ 48.89 กรัม นอกจากนั้นยังมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้นอีก 28.7 กิโลแคลอรี (kcal) แสดงดังภาพที่ 2.8

	$C_6H_{12}O_6$ + ยีสต์ ⟶	$2C_2H_5OH$ +	$2CO_2$ + 28.7 Kcal
	(กลูโคส)	(เอทานอล)	(คาร์บอนไดออกไซด์)
	180 กรัม	2x46 กรัม	2x44 กรัม
คิดเป็นร้อยละ	100 กรัม	51.11 กรัม	48.89 กรัม

ภาพที่ 2.8 การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลโดยการหมักของยีสต์
ที่มา : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร, 2549

วัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบสามารถนำมาใช้ในการหมักเอทานอลโดยวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล 2) วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และอื่นๆ และ 3) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic material) ที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เช่น ฟางข้าว กากอ้อย และซังข้าวโพด เป็นต้น

1) การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบประเภทน้ำตาลที่ใช้การผลิตเอทานอล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และบีทน้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ประกอบด้วย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสนั้นมีขั้นตอนดังนี้ คือ ขั้นแรกน้ำตาลซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสอย่างละโมเลกุล จากนั้นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสจะถูกยีสต์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 4 โมเลกุล ดังภาพที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 4C_2H_5OH + 4CO_2$$

(ซูโครส)	(น้ำ)	(กลูโคส)	(ฟรุกโทส)		
342 กรัม	18 กรัม	180 กรัม	180 กรัม	4x46 กรัม	4x44 กรัม
คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับน้ำตาลซูโครส				0.5380 กรัม	0.5146 กรัม

ภาพที่ 2.9 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส

2) การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้งที่ใช้ในการผลิต ได้แก่ มันสำปะหลัง (ทั้งหัวมันสด และมันเส้น) ข้าวโพด ข้าว และเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นต้น โดยแป้งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำแป้งมาผ่านกระบวนการย่อย (Hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลได้ โดยปัจจุบันจะนิยมย่อยแป้งด้วยเอนไซม์มากกว่ากรด เนื่องจากสามารถควบคุมการย่อยได้ง่ายกว่าและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากกว่าการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์จะประกอบด้วยการย่อย 2 ครั้ง ดังแสดงในดังภาพที่ 2.10

- การย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (Liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (α-amylase) ย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าเด็กทรินซ์ (Dextrin)
- การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายหรือการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (Saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคอะมิเลส (Glucoamylase) ย่อยเด็กทรินซ์ที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส ให้ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งยีสต์สามารถใช้หมักเป็นเอทานอลได้ โดยกระบวนการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

$$H(C_6H_{10}O_5)OH \xrightarrow[\text{น้ำ}]{\text{อะมิโลไลติกเอนไซม์}} nC_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 2nC_2H_5OH + 2nCO_2$$

(แป้ง)	(กลูโคส)	(เอทานอล)	
162 กรัม (มอนอเมอร์)	180 กรัม	2x46 กรัม	2x44 กรัม
คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง		0.5679 กรัมต่อกรัม	

ภาพที่ 2.10 การหมักเอทานอลจากแป้ง

3) การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด และเศษไม้ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบที่เป็น เซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึกมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ลักษณะเป็นเส้นใยเหนียว ไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และอะราบิโนส (Arabinose) เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุกาญจน์ (2554) ได้ทำการศึกษาเชื้อรากลุ่ม white rot ได้แก่ *Aspergillus carbonarius, A. ficuum, A. flavus, A. foetidus, A.fumigates, A. japonicas, A. niger A. tubingensis, Trichoderma atroviride, T. hamatum, T. harzianum* และ *T. viride* ที่เลี้ยงบนอาหาร Fahraeus agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ตัดขนาด 0.5 เซนติเมตรจำนวน 15 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลว Fahraeus broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม 2 เปอร์เซ็นต์น้ำต้มฟาง ปั่นเหวี่ยงที่ 200 รอบต่อนาที บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน จากการศึกษาพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ peroxidase, laccase และ xylanase และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส หลังจากบ่มนาน 2 วัน ได้ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ *T. viride* และ *T. hamatum* มีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 4.54, 3.93 และ 3.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สุวิดา และคณะ(2552) ได้ทำการศึกษาผลของการปรับสภาพรำหยาบเบื้องต้นทางกายภาพเคมีและชีวภาพ เพื่อนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ โดยการนำรำหยาบ 5 กรัม ต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มัล แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างรำหยาบต่อเชื้อ *Trichoderma* sp. ในรูปสารละลายสปอร์ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ผลปรากฏว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของรำหยาบและสารละลายสปอร์คือ รำหยาบ 5 กรัมต่อสารละลายสปอร์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 4 วัน โดยมีความเข้มข้นเชื้อราไตรโคเดอร์มาในรูปสารละลายสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรพบว่าให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 7.55 มิลลิกรัมต่อกรัมของรำหยาบและใช้ผลิตก๊าซชีวภาพได้เท่ากับ 61.6 มิลลิลิตรต่อวัน

เกษร รัตนพันธ์ (2550) ได้ทำการศึกษาการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เพื่อการผลิตเอทานอลการศึกษานี้ศึกษาถึงการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสิกซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 3 ชนิด คือ ชานอ้อย ชานข้าวฟ่างหวานและซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสทางการค้า 2 ผลิตภัณฑ์ คือ Cellubrix L และ Celluclast 1.5L โดยในการศึกษาสภาวะการย่อยใช้ชานอ้อย เป็นวัตถุดิบตัวอย่างในการศึกษา ก่อนขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ วัตถุดิบจะผ่านการกำจัดลิกนิน จากนั้นเป็นการเปรียบเทียบการย่อยวัตถุดิบในตัวอย่าง (ชานอ้อย) ที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อย เฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ โดยการย่อยเฮมิเซลลูโลสเป็นการย่อยโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 0.5 % โดยปริมาตร ที่ 120 องศาเซลเซียส 180 นาที ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลห้าคาร์บอน(C-5) ได้จากการย่อยดังกล่าวเป็น 16.1 และ 8.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปัจจัยที่ศึกษาในการย่อยด้วยเอนไซม์ คือ เอนไซม์ pH และเวลาที่ใช้ย่อย โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ของ 3 ปัจจัย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยโดยใช้เอนไซม์แต่ละชนิด อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองและผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแสดงว่าเอนไซม์ Cellubrix L มีความสามารถย่อยชานอ้อยได้ดีกว่า Celluclast 1.5L โดยชานอ้อยที่จะใช้เอนไซม์ย่อยนั้นไม่จำเป็นต้องผ่านการย่อยด้วยกรดอ่อนเพื่อย่อยเฮมิเซลลูโลสออกก่อน นอกจากนี้ผลยังบ่งชี้อีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
137314

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ โดยอุณหภูมิที่แสดงแนวโน้มการย่อยชานอ้อยเพื่อให้ได้น้ำตาลสูงคือ ช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส และออกแบบการทดลองแบบ CCD 2 ปัจจัย พบว่าปริมาณเอนไซม์เป็นปัจจัยสำคัญต่อการย่อยอีกปัจจัยหนึ่งโดยการเพิ่มปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยอย่างชัดเจน ดังนั้นในการย่อยวัสดุทั้ง 3 ชนิด คือ ชานอ้อย ชานข้าวฟ่างหวานและซังข้าวโพดในการทดลองสุดท้ายจึงใช้ปริมาณเอนไซม์สูง (200 ไมโครลิตร) โดยย่อยที่ pH 5.0 และแปรผันอุณหภูมิช่วง 35-58 องศาเซลเซียส ผลการย่อยพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ย่อยได้อยู่ในช่วงประมาณ 5-10 กรัมต่อลิตร

ศิริพงษ์ และคณะ (2548) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ปอสา (Paper Mulberry) เป็นวัสดุหมักด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ในกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง การทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับเชื้อยีสต์ โดยที่เอนไซม์เซลลูเลสจะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นวัสดุหมักให้เป็นน้ำตาลจากนั้นยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นเอทานอลต่อเนื่องไปจนสิ้นสุดกระบวนการ พบว่าเชื้อรา ไอโซเลต D2 สามารถผลิตเอนไซม์ β-glucosidase ได้ 0.3044, 0.3122 และ 0.3228 U/ml ที่อุณหภูมิ 40 45 และ 50 °C ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Trichoderma reesei* QM 9414 ที่อุณหภูมิเดียวกัน และผลการผลิตเอทานอลโดยใช้ปอสาเป็นวัสดุหมักเทียบกับการใช้ microcrystalline cellulose ด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติร่วมกับยีสต์ *Candida krusei* NBRC1664 พบว่าให้ผลผลิตเอทานอลเพียง 0.0328% (0.0109 g/g) และ 0.0298% (0.0099 g/g) ตามลำดับ แต่เมื่อเปลี่ยนมาใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *T. reesei* QM9414 ร่วมกับยีสต์ *C. krusei* NBRC1664 โดยใช้วัสดุหมักแบบเดียวกันสามารถผลิตเอทานอลสูงขึ้นถึง 1.3766% (0.4588 g/g) จากปอสา และ 1.6282% (0.5427 g/g) จาก microcrystalline cellulose จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Trichoderma reesei* QM9414 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Penicillium* sp. ทั้งที่ใช้ปอสาและ microcrystalline cellulose เป็นวัสดุหมัก นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าเซลลูโลสของปอสานั้นสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุหมักเพื่อการผลิตเอทานอลได้เทียบเท่ากับการใช้ microcrystalline cellulose ที่มีราคาสูงกว่า

ณัฐกานต์ และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษา อิทธิพลของสาร Osmoprotectants ต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลโดย *Zymomonas mobilis* ถึงผลกระทบของอุณหภูมิสูง เอทานอล น้ำตาล และเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงๆ ที่มีต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* รวมทั้งเพื่อศึกษาถึงผลของการเติมสาร osmoprotectants บางชนิดคือ sorbitol ที่มีต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม จากผลการศึกษาพบว่า ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง หรือที่ความเข้มข้นของเอทานอล น้ำตาล และเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง มีผลทำให้การเจริญและประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบการเจริญและการผลิตเอทานอลในชุดการทดลองควบคุมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ อย่างไรก็ตามพบว่า เมื่อมีการเติมสาร sorbitol และ mannitol ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อในความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ การเจริญและประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติมสารเหล่านี้ลงไป และเมื่อวิเคราะห์แถบโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบว่า แถบโปรตีนที่แยกสกัดได้จากเชื้อที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมแต่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมสาร sorbitol และ mannitol ลงไป แถบโปรตีนไม่มีความแตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนที่แยกสกัดได้จากเซลล์ในชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสาร sorbitol และ mannitol มีบทบาทสำคัญในการช่วยป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น

จิรกานต์ และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง โดยใช้เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล พบว่าวิธีการปรับสภาพวิธีที่ดีที่สุด คือ การแช่เหง้ามันสำปะหลังในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะได้ตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่มีเซลลูโลสประกอบอยู่ 96.46 % เฮมิเซลลูโลส 1.85% และ ลิกนิน 1.69 % จากเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี ซึ่งมีส่วนประกอบคือ เซลลูโลส 82.14% เฮมิเซลลูโลส 11.41% และลิกนิน 6.45% ตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่ได้ นำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 4.079 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการย่อย 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 8.30 กรัมต่อลิตร และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 21.62% เมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยมาเลี้ยงเชื้อ *Zymomonas mobilis* strain TISTR 405 สายพันธุ์เดียวกับ ATCC 10988 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือมีน้ำตาลรีดิวซ์ 25 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่าพีเอช ให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อคือที่ 5.0 เมื่อทำการหมักในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จะได้เอทานอล 10.60 กรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์เป็น 69.84% ค่าผลได้ของเซลล์จากสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโต ($Y_{x/s}$) 0.14 กรัมต่อกรัม ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร ($Y_{x/s}$) 0.68 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตเอทานอล 0.30 กรัมต่อลิตร/ชม.

มาโนช และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ได้ทดลองเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ แอลฟาอะไมเลส และอะไมโลกลูโคซิเดส ในระดับขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร ทำการศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรีย *Z. mobilis* และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอล แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ และการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ พบว่าแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลคือแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 สำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าพีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ได้ของเอทานอลเท่ากับ 0.463 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ ใช้เกลือ NH_4Cl ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดคือ 0.419 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ พบว่าการใช้ความเร็วรอบของใบกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.444 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป และการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 0.412 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป สำหรับการผลิตเอทานอลในสภาวะค่าพีเอชคงที่เท่ากับ 5.5 จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.481 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป ในขณะที่การหมักแบบกึ่งกะ พบว่าการเติมน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง จะให้เอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 71.70 กรัมต่อลิตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

1. สารละลายทวีน 80
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกรดวิเคราะห์
3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เกรดวิเคราะห์
4. 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก เกรดวิเคราะห์
5. โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต เกรดวิเคราะห์
6. โซเดียมไบคาร์บอเนต เกรดวิเคราะห์
7. แอมโมเนียมคลอไรด์ เกรดวิเคราะห์

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น B-3100S บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-254 บริษัท Denver Instrument Company ประเทศเยอรมัน
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Temperature Shaker) รุ่น WNB 22 ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมัน
4. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น gallenkamp บริษัท ไทยโพลีเมดิค จำกัด ประเทศไทย
5. เครื่องกรองลดความดัน รุ่น A-35 บริษัท Tokyorikakai จำกัด ประเทศญี่ปุ่น
6. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) รุ่น T60 ยี่ห้อ PG Instrument Limited
7. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น 827 ยี่ห้อ Metrohm ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
8. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ (TOC) รุ่น TOC-VCPH บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
9. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) รุ่น CP-3800 บริษัท Varian จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น Tomy SS 325 บริษัท Hirayama Manufacturing
    Corporation HV-50, ประเทศญี่ปุ่น
11. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น HS123 บริษัท International Scientific Supply HS123, ประเทศไทย
12. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น Plus II บริษัท Gallenkamp, ประเทศอังกฤษ
13. ตู้อบ (Oven) รุ่น ISOTEMP บริษัท Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30 บริษัท ท๊อป ออฟ มายด์ จำกัด ประเทศญี่ปุ่น
15. กระดาษกรอง 0.45 ไมครอน ยี่ห้อ ADVANTEC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

ในการทดลองการผลิตเอทานอลจากแกลบและรำหยาบโดยการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยกระบวนการทางเคมี กายภาพ และเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีขั้นตอนการดำเนินการวิจัยดังแสดงในภาพที่ 3.1 และมีรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงาน ดังต่อไปนี้

3.3.1 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในการทดลองคือ รำหยาบและแกลบจากโรงสีข้าวแห่งหนึ่งในจังหวัดสิงห์บุรี

3.3.2 เชื้อ *Trichoderma* sp.

เชื้อ *Trichoderma* sp. จากกรมวิทยาศาสตร์บริการ โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจากสาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และทำการเตรียมสารละลายสปอร์โดยทำการสับเชื้อลงขวดที่บรรจุอาหาร PDA ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเติมสารละลายทวีน 80 ลงไปและขูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสปอร์ออกมา (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก-1)

3.3.3 ขั้นตอนการบำบัดเบื้องต้น

1. ชั่งวัสดุหมัก (แกลบ) ปริมาณ 10 กรัมใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่

- ชุดทดลอง คือ วัสดุหมักต้มกับ 2% NaOH และเติมเชื้อ *Trichoderma* sp. ในรูปสารละลายสปอร์ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

- แบลงค์ คือ วัสดุหมักต้มกับน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสและไม่เติมเชื้อ *Trichoderma* sp. โดยแต่ละชุดการทดลองมีทั้งหมด 3 ขวด คือที่ระยะเวลาการหมัก 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน

2. นำวัสดุหมักชุดทดลองเติม 2% NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 85°C เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Zhang และ Cai, 2008) และนำวัสดุหมักชุดแบลงค์ต้มกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในสภาวะเดียวกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็น

3. ล้างวัสดุหมักด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งค่าพีเอชของน้ำล้างมีค่าเท่ากับ 7 นำวัสดุหมักที่ล้างใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

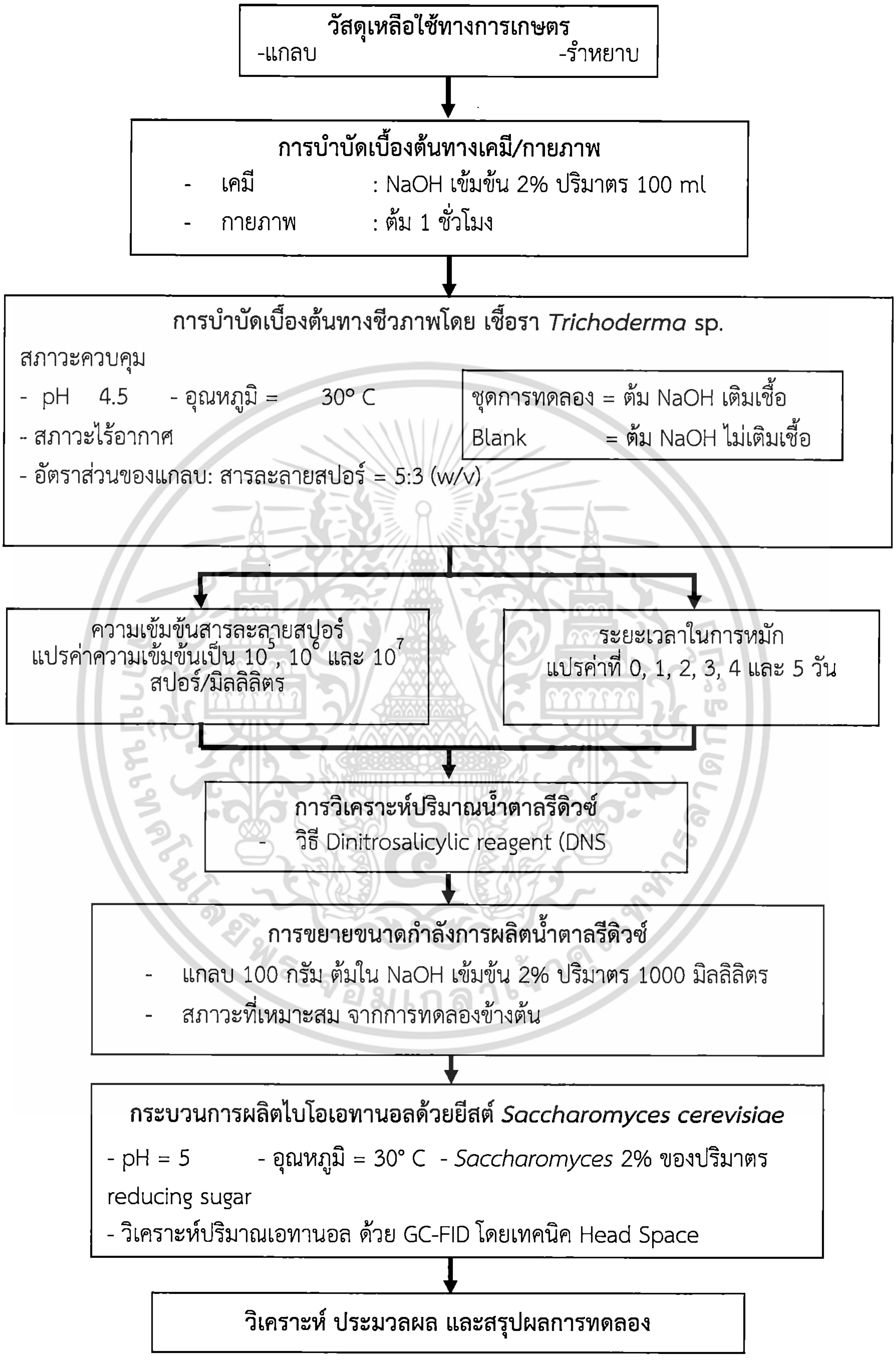
4. เติม 1 M HCl จนกระทั่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 (Zhang และ Cai, 2008) ปิดด้วยจุกสำลีและหุ้มปากขวดด้วยถุงพลาสติกอีกครั้ง

5. นำชุดทดลองและแบลงค์ทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 บาร์ เป็นเวลา 20 นาที

6. เติมเชื้อ *Trichoderma* sp. ในรูปสารละลายสปอร์ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 มิลลิลิตร ลงในชุดทดลอง ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนระหว่างวัสดุหมักต่อสารละลายสปอร์ เท่ากับ 5 : 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปิดด้วยจุกสำลีและทำการหมักในตู้บ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (สุวิดาและคณะ, 2552)

7. นำวัสดุหมักที่ผ่านการหมักมากรองทุกวันตามระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 120 มิลลิลิตรนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 5 นาทีจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่กรองได้ไปตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (ดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ข-1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-7 โดยแปรค่าเชื้อความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ของเชื้อ *Trichoderma* sp. เป็น 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

9. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-8 อีก 1 ครั้ง

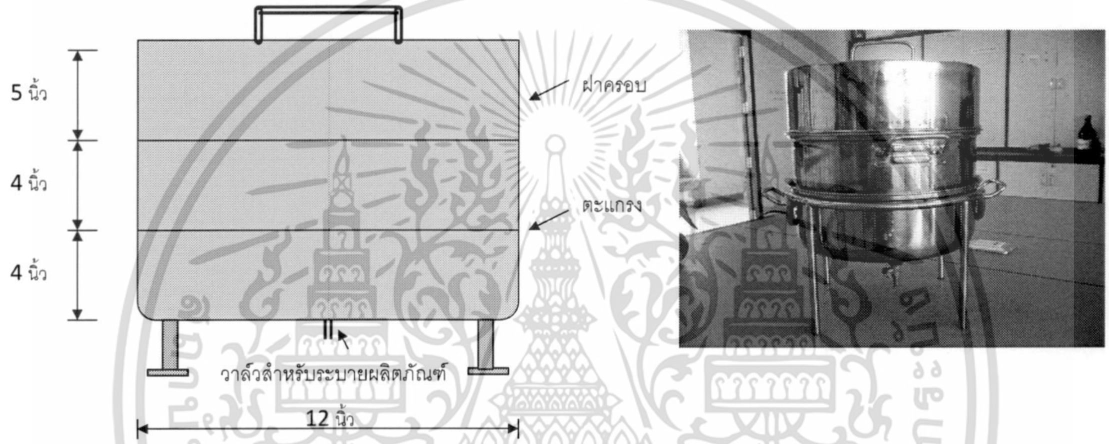
10. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-9 ซ้ำอีกครั้งโดยเปลี่ยนวัตถุดิบจากแกลบเป็นรำหยาบ และใช้สารละลายสปอร์เฉพาะความเข้มข้นที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.3.4 การขยายขนาดกำลังการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp.

1. จัดเตรียมถังหมัก ซึ่งทำจากอลูมิเนียม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว สูง 4 นิ้ว มีฝาปิด ถังหมักแบ่งเป็นชั้น 2 ชั้น (ดังภาพที่ 3.2) ได้แก่

ชั้นที่ 1 สำหรับรับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักด้วย เชื้อรา *Trichoderma* sp.

ชั้นที่ 2 มีตะแกรงลวดสำหรับใส่วัสดุหมัก และสารละลายสปอร์ของเชื้อรา



ภาพที่ 3.2 ภาพแสดงรายละเอียดถังหมักวัสดุ

2. ชั่งวัสดุหมักปริมาณ 100 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ต้มกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 2% ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. กรองแยกวัสดุหมักออก ล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บตัวอย่างสารละลาย NaOH ที่ผ่านการต้มแล้ว นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (ดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ข-1)

4. ฉีดพ่นเชื้อ *Trichoderma* sp. ในรูปสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้นตามความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้น ในปริมาตรซึ่งคิดเป็นสัดส่วนระหว่างวัสดุหมักต่อสารละลายสปอร์ เท่ากับ 5 : 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปิดฝาครอบและทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลองข้างต้น

5. ล้างวัสดุหมักด้วยน้ำกลั่น เก็บตัวอย่างน้ำล้างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (ดูรายละเอียดที่ภาคผนวก ข-1)

6. ฉีดพ่นน้ำเพื่อรักษาความชื้นของวัสดุหมัก และทำการเก็บตัวอย่างน้ำตาลรีดิวซ์ วันที่ 3, 7, และ 14 เพื่อทำการทดสอบว่าวัสดุหมักและเชื้อรายังคงสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้อย่างต่อเนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การผลิตไบโอเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5596 จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

1. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Yeast Peptone Dextrose (YPD) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บนเครื่อง เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตร 270 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงจากนั้น นำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ (inoculum) ของการหมักเอทานอลต่อไป (วนิดา, 2551)

2. การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์โดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

1. นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการบำบัดเบื้องต้นจำนวน 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง

- ชุดทดลอง คือน้ำตาลรีดิวซ์ 100 มิลลิลิตร เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
- ชุดควบคุม 1 คือน้ำตาลกลูโคส 18 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- ชุดควบคุม 2 คือน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นเท่ากับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากชุดทดลองที่หมักด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp.
- แบลงค์ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ไม่มีการเติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

2. ปรับพีเอชด้วยโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์จน พีเอชเท่ากับ 5

3. เติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในรูปสารละลายที่มี OD = 0.5 จำนวน 2 มิลลิลิตรลงในชุดการทดลองซึ่งคิดเป็น 2% ของน้ำตาลรีดิวซ์ (Verma, et al. 2000) โดยทำการทดลองในตู้ปลอดเชื้อ และทำการหมักที่อุณหภูมิห้องในตู้บ่มเชื้อ

4.เก็บตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ดังแสดงในภาคผนวก ข-2 (ยุทธศักดิ์, 2551)

5.ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-4 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

3.3.5 พารามิเตอร์ที่ทำการวิเคราะห์

พารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดลองมีการใช้เครื่องมือหรือวิธีการดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและ/หรือวิธีการ ที่ใช้ในวิเคราะห์พารามิเตอร์

พารามิเตอร์	เครื่องมือ/วิธีการ	อ้างอิง	หมายเหตุ
น้ำตาลรีดิวซ์	Miller/DNS	สุรีย์ (2546)	ภาคผนวก ข-1
เอทานอล	Gas chromatography/FID	ยุทธศักดิ์ (2551)	ภาคผนวก ข-2
pH	pH meter	อรทัย (2543)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ลักษณะทางกายภาพของรำหยาบและแกลบที่ได้รับการบำบัดเบื้องต้น

ผลจากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของรำหยาบและแกลบที่ได้รับการบำบัดเบื้องต้นโดยการนำรำหยาบและแกลบต้มกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าแกลบและรำหยาบที่เห็นมีลักษณะเปื่อยและยุ่ย จากการทดลองของสุวิดา และคณะ (2552) พบว่าการบำบัดรำหยาบเบื้องต้นทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับรำหยาบที่ยังไม่ได้รับการบำบัดเบื้องต้น เนื่องจากรำหยาบที่ยังไม่ได้รับการบำบัดเบื้องต้นนั้นยังคงสภาพของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินอยู่ ซึ่งการบำบัดเบื้องต้นนั้นทำให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าไปสลายพันธะในสารตั้งต้นดังกล่าวให้กลายเป็นเซลลูโลส อีกทั้งการต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ยังเป็นการใช้ความร้อนจากการต้มเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสลายพันธะให้เร็วขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะของรำหยาบนั้นมีความยุ่ยและละเอียดมากขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4.1

(ก) รำหยาบและแกลบ (ข) รำหยาบและแกลบที่ต้มกับ NaOH

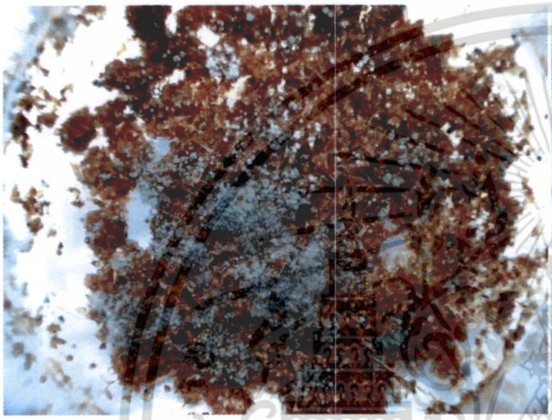
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของรำหยาบ

หลังจากที่แกลบและรำหยาบได้ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นแล้ว ถูกนำมาเติมเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน เชื้อรา *Trichoderma* sp. เริ่มทำการสร้างโคโลนี และสังเกตเห็นเส้นใยสีขาวได้ในวันที่ 2 ต่อมาในวันที่ 3-5 เชื้อรา *Trichoderma* sp. เริ่มทำการสร้างสปอร์ ซึ่งสังเกตเห็นสปอร์ที่เจริญบนรำหยาบและแกลบที่เป็นสีเขียว ดังภาพที่ 4.2

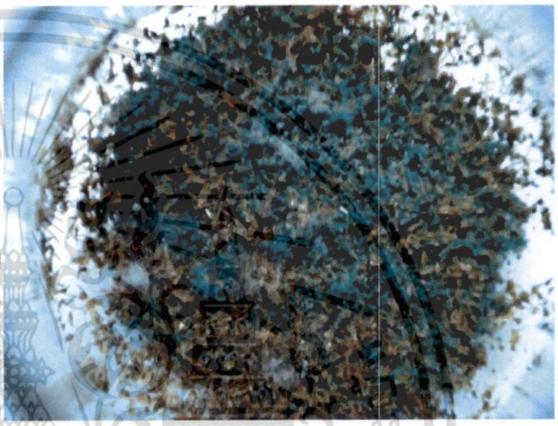
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) 1 วัน

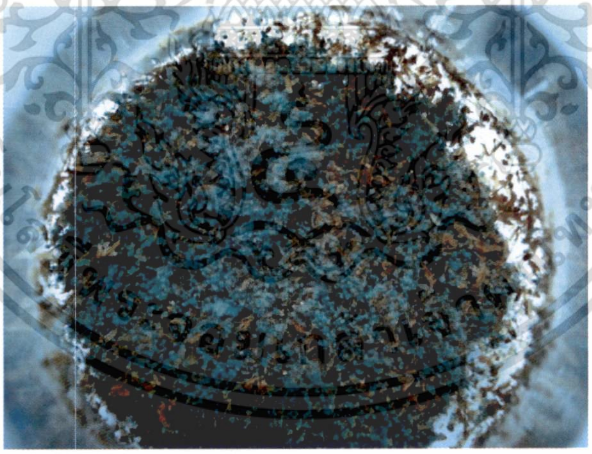
(ข) 2 วัน



(ค) 3 วัน



(ง) 4 วัน



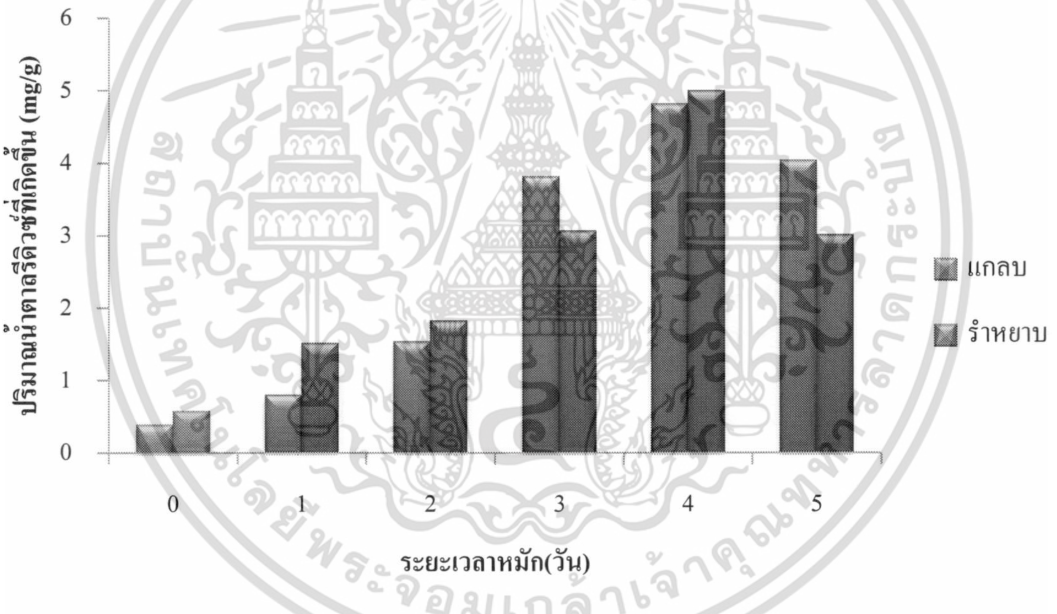
(จ) 5 วัน

ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่ระยะเวลาการหมักรำหยาบและแกลบที่ 1-5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยรำหยาบและแกลบด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp.

จากผลการศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้รำหยาบและแกลบที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้นด้วยความร้อนและสารเคมีมาเติมสารละลายสปอร์ของเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วนแกลบต่อปริมาณสปอร์ 5:3 โดยคิดเป็นสัดส่วนของน้ำหนัก(กรัม) ต่อปริมาตร(มิลลิลิตร) (สุวิดา และคณะ, 2552) ผลปรากฏว่ารำหยาบสามารถผลิตน้ำตาลปริมาณรีดิวซ์ได้มากกว่าแกลบไม่มากนัก (ดังภาพที่ 4.3) เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ในการกรองขณะล้างโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าขนาดของรำหยาบทำให้รำหยาบเกิดการสูญหายระหว่างการล้างน้ำ ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของรำหยาบมีปริมาณไม่แตกต่างจากแกลบ ในการทดลองขั้นต่อไปจึงได้ทำการเลือกใช้แกลบ เพราะแกลบใช้เวลาในการกรองด้วยเครื่องกรองลดความดันน้อยกว่าและยังเกิดการสูญหายขณะล้างน้อยกว่าอีกด้วยเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป



ภาพที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากแกลบและรำหยาบเมื่อใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อไตรโคเดอร์มาที่มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

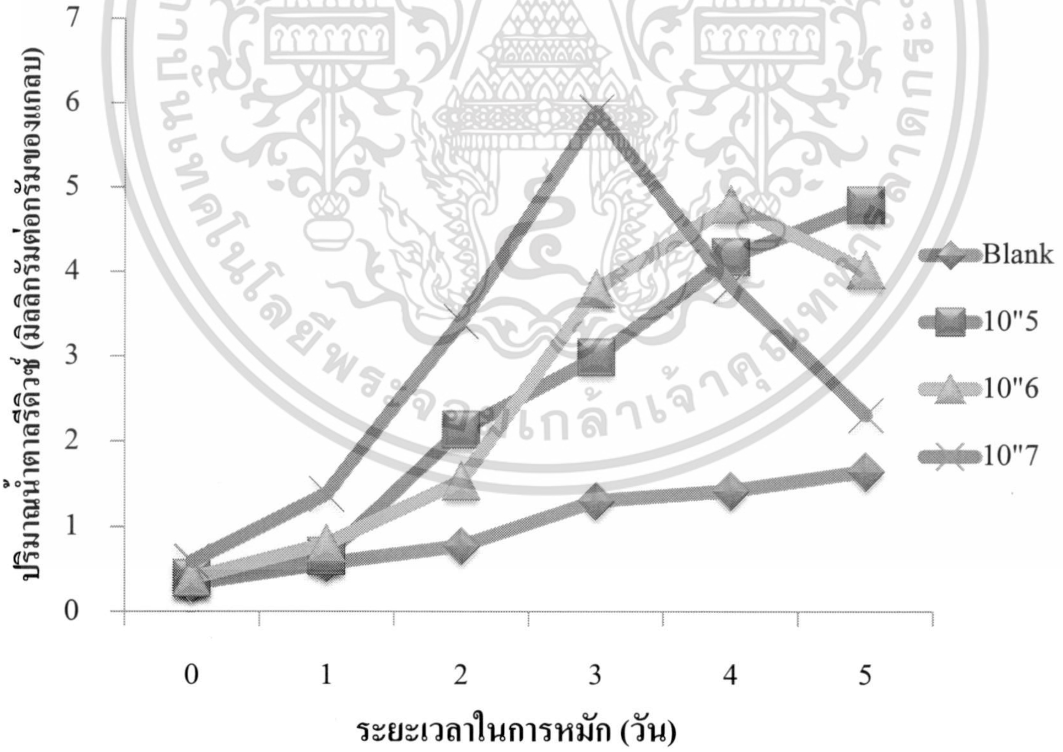
4.3 การศึกษาระยะเวลาและความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแกลบ ด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp.

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักแกลบเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแกลบ(กรัม) ต่อปริมาตรของสารละลายสปอร์(มิลลิลิตร) คือ 5 : 3 (สุวิดา และคณะ, 2552) โดยแปรค่าระยะเวลาการหมักเป็น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน และค่าความเข้มข้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายสปอร์เป็น 10^5, 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรทั้งนี้ควบคุมความชื้นให้มีค่าเท่ากันในทุกการทดลอง พบว่าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการหมักในวันที่ 0-2 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเข้าสู่วันที่ 3 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และในวันที่ 5 ของการหมักมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นมากที่สุด ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3 (ดูรายละเอียด ดังตารางที่ ค-1 ภาคผนวก ค) เมื่อแปรค่าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าระยะเวลาในการหมักที่ให้ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ วันที่ 4 ของการหมัก ส่วนวันที่ 5 นั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.4 (รายละเอียดแสดงดังตารางที่ ค-2 ภาคผนวก ค) สำหรับความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เห็นได้ว่าระยะเวลาในการหมักที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคือในวันที่ 3 และลดลงในวันที่ 4 และ 5 ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.4 (ดูรายละเอียด ดังตารางที่ ค-3 ภาคผนวก ค) ที่เป็นเช่นนี้ เพราะว่าเชื้อ *Trichoderma* sp. สามารถนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ และน้ำตาลรีดิวซ์นั้นอยู่ในโครงสร้างที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าเซลลูโลสในรำหยาบซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุวิดา และคณะ (2552)

จากการทดลองสังเกตเห็นได้ว่าชุดแบลงค์ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในปริมาณน้อย ทั้งนี้อาจเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อรา *Trichoderma* sp. หรือเชื้อในธรรมชาติที่สามารถย่อยแกลบได้เช่นเดียวกับเชื้อรา *Trichoderma* sp.



ภาพที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักแกลบด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่างๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การขยายขนาดการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแกลบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ในการศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในระดับขยายขนาดโดยใส่แกลบที่ผ่านการต้มด้วยโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ปริมาณ 100 กรัม ลงในถังหมัก และฉีดพ่นสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงในแกลบ ในอัตราส่วนระหว่างแกลบและสารละลายสปอร์เท่ากับ 5:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อครบ 3, 7 และ14 วัน ทำการล้างน้ำตาลรีดิวซ์ออกจากแกลบด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำล้างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่า ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในวันที่ 3 มีค่าเท่ากับ 4.30±0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบ และเมื่อทำการหมักต่อเนื่องจนถึง 7 และ 14 วัน พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเป็น 4.31±0.05 และ 4.35±0.35 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแกลบยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ต้องทำการควบคุมระดับความชื้นให้แก่ระบบเพื่อให้เชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถผลิตเอ็นไซม์เพื่อการย่อยเซลลูโลสได้อย่างต่อเนื่อง

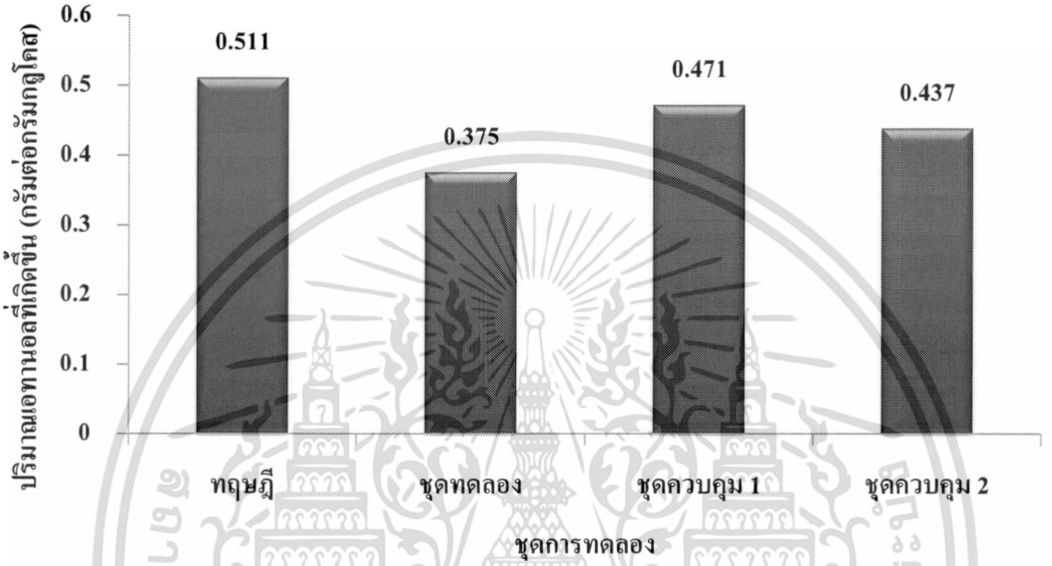
ภาพที่ 4.5 ปริมาณการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแกลบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp.

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

ในการทดสอบความสามารถในการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ได้แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด คือ ชุดควบคุม 1, ชุดควบคุม 2 และชุดทดลอง เปรียบเทียบกับค่าปริมาณไบโอเอทานอลที่ผลิตได้ตามทฤษฎี พบว่าชุดควบคุม 1 ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นวัตถุดิบโดยมีความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตรคิดเป็น 1 โมลต่อลิตร สามารถผลิตไบโอเอทานอลได้ 0.471 กรัมต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป ชุดควบคุม 2 ใช้น้ำตาลกลูโคสความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นเริ่มต้น 0.375 กรัมต่อลิตรซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลอง เมื่อผ่านการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ไบโอเอทานอลเท่ากับ 0.437 กรัมต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส ส่วนชุดทดลองใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักแกลบและปรับสภาพเบื้องต้นพบว่าสามารถผลิตไบโอเอทานอลได้เท่ากับ 0.375 กรัมต่อกรัมกลูโคส คิดเป็น 1.09 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบซึ่งเมื่อพิจารณาตามทฤษฎีพบว่า น้ำตาลกลูโคส 1 กรัม สามารถผลิตเป็นไบโอเอทานอลได้ 0.511 กรัมต่อกรัมกลูโคส แสดงดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากน้ำตาลเปรียบเทียบระหว่างทฤษฎีและการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าไบโอเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดควบคุม 1 มีค่าน้อยกว่าปริมาณไบโอ-เอทานอลที่ควรได้ตามทฤษฎี ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดเนื่องจากปัจจัยควบคุมระหว่างการทดลองนั้นไม่เป็นไปตามทฤษฎีทั้งหมด เช่น ปริมาณสารอาหาร สภาพด่าง และ C:N ratio เป็นต้น หรืออาจเกิดจากที่ยีสต์ใช้ในการสร้างเซลล์ (สาวิตรี, 2549)

เมื่อพิจารณาปริมาณไบโอเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดควบคุม 1 พบว่ามีค่ามากกว่าชุดควบคุม 2 แม้ว่าจะใช้สารตั้งต้นประเภทเดียวกัน คือน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสาเหตุเกิดจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในชุดควบคุม 1 มีค่ามากกว่าชุดควบคุม 2 ทำให้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าและสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่า

ไบโอเอทานอลที่ได้จากการทดลองพบว่ามีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม 2 แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ไม่ได้ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำตาลรีดิวซ์นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ หรืออาจเกิดจากองค์ประกอบของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นไม่ได้ประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว แต่ยังมีน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซสประกอบอยู่ด้วย ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปใช้ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. จากการทดลองผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากแกลบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. พบว่า ปริมาณสารละลายสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 3 วัน ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 5.89 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบ

3. การขยายขนาดการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยเพิ่มปริมาณแกลบเป็น 100 กรัม ในสภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เฉลี่ย 4.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบ

4. การศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ให้ปริมาณเอทานอลเฉลี่ย 0.375 กรัมต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ซึ่งคิดเป็น 1.09 มิลลิกรัมต่อกรัมของแกลบ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ก่อนนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการทดลองไปผลิตไบโอเอทานอล ควรนำไปผ่านการฆ่าเชื้อก่อน เพื่อไม่ให้มีเชื้อรา *Trichoderma* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง

2. ควรทำการศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอื่นๆ ที่สามารถผลิตเอทานอล เช่น เม็ดและเปลือกผลไม้ ฟางข้าว วัชพืชต่างๆ เป็นต้น

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ แสงศรีคำ. 2546. **การใช้เชื้อรา *trichoderma* sp. ร่วมกับเชื้อรา *gliocladium* sp. เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินโดยชีววิธี**. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เกษร รัตนพันธ์. 2550. **“การย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสิกด้วยเอนไซม์เพื่อการผลิตเอทานอล”**. ปริญญาวิทยาศาสตรบันฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ฉัตรชัย ไกรสรพงษ์. 2548. **“การผลิตเอทานอลจากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร”**. กรมพลังงานทหาร และ บริษัท ล็อกซเล่ย์ จำกัด (มหาชน)

ชัชชลัยย์ สมิทธ์อิษฎ์. 2545. **“การผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดโดยกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้อากาศแบบสองขั้นตอน”**. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณัฐกานต์ ถมปัด. 2547. **“อิทธิพลของสาร Osmoprotectants ต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลโดย *Zymomonas mobilis*”**. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เทียมใจ คมกฤส. 2539. **กายวิภาคของพฤกษ์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธาตรี จีราพันธุ์. 2543. **อาหารและการให้อาหารสัตว์.** นครสวรรค์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครสวรรค์.

ปรีชา เกียรติกระจาย. 2528. เคมีของเนื้อไม้. ภาควิชาวนผลิตภัณฑ์ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประทุม พุทธิวนิช, พิมพาภรณ์ ไตรณรงค์สกุล. 2540. “ใยอาหาร สารที่ไม่มีคุณค่า แต่น่าสนใจ”. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ** 45 (145): 26-32.

พิศมัย เจนวนิชปัญจกุล, “คุยเฟื่องเรื่องวิทย์”, **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, ปีที่ 20 ฉบับที่ 3, 2548, 12-16.

ยุทธศักดิ์ สุบการี. 2551. **“สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยใช้วิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)”**. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลาราชนครินทร์

วรนันต์ นาคบรรพต และไพทิพย์ ธีรเวชญาณ. 2549. **“การพัฒนาแกลบเพื่อใช้เป็นตัวดูดซับในการเก็บกลับนิกเกิลจากน้ำล้างชิ้นงานในอุตสาหกรรมการชุบโลหะ”**. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วนิดา ปานอุทัย, นิคม แหลมสัก, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา และ ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. 2553. **“การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน”**. ปริญญาวิทยาศาสตรบันฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริพงษ์ เปรมจิต. 2548. **“การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงและการหมักเอทานอลจากปอสา”.** ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. 2549. **การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า**. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย. 2546. **พลังงานชีวมวล**. สืบค้นจาก : http://www. teenet.tei.or.th/. เข้าถึงเมื่อวันที่ 16 กันยายน 2553.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. กรุงเทพ: ภาควิชาจุล-ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิริลักษณ์ เจียรากร. 2553. **ซิลิกาจากแกลบ**. สืบค้นจาก : http://nanotec.nano-thailand.com/๒๐๑๐/๐๙/๒๗/ซิลิกาจากแกลบ. เข้าถึงเมื่อวันที่ 16 กันยายน 2553

สุภาภรณ์ ปิติพงษ์. 2551. ข้าวความลับของสุขภาพ. หน้า 43-47. **หนังสือข้าว**. กรุงเทพฯ. ปรมัตถ์การพิมพ์.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2546. “การเตรียมอาหาร PDA”. หน้า 164. ใน **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร**. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุวิดา ศิวะพิรุฬห์เทพ, พงศกร ไชยบุญมา และ ลันตา กิจพิทยาฤทธิ์, 2552. **“การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *Trichoderma* sp. จากรำหยาบเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ”**. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อรทัย ชวาลภาฤทธิ์ . 2543. **คู่มือวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย.** กรุงเทพฯ : วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณี คงดี. 2551. **เส้นใยธรรมชาติ**. สืบค้นจาก : http://www.ap.mju.ac. th/data _s ilo /jarya/ 4556.pdf. เข้าถึงเมื่อวันที่ 17 กันยายน 2553.

Boerjan,W. Ralph, J. and Baucher, M. (2003). "Lignin bios". **Ann. Rev. Plant Biol 54**: 519–549.

Gharpuray, M.M. Fan, L.T. and Lee, Y.H. 1983. Caustic pretreatment study for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *In:* **Symp. Food Feed and Chemicals from Wood and Agricultural Residues. 18th National AGS Meeting Kansas City,** September 12–17, Academic Press, pp. 369–389.

Hemmers, O. Guillemin, R. Kanter, E.P. Krassig, B. Lindle, D.W. Southworth, S.H. Wehlitz, R. Baker, J. Hudson, A. Lotrakul, M. Rolles, D. Stolte, W.C. Tran, I.C. Wolska, A. Yu, S.W. Amusia, M.Ya. Cheng, K.T. Chernysheva, L.V. Johnson, W.R. and Manson, S.T. “Dramatic nondipole effects in low enery photoionization: Experimental and theoretical study of Xe 5s”. **Physical Review Letters.** 91(5);530021-530024

Jekle, M. 2005. “Gas Chromatography Determination of Ethanol in Wine by Head-Space Gas Chromatography”. Department of Agro-Industry, **Faculty of Food and Agricultural Technology,** Pibulsongkram Rajabhat University.

Keisotyo. 2005. [Online] *Trichoderma* sp. Available:
http://ja.wikipedia.org/wiki/AB:Trichoderma_sp_young_conidiophore.jpg
Accessed date: 15 September 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Leonowicz, A. Matuszewska, A. Luterek, J. Ziegenhagen, D. Wojtas-Wasilewska, M. Nam-Seok, C. Hofrichter, M. and Rogalski, J. 1999. "Biodegradation of Lignin by white rot fungi" : review. **Fungal genet. Biol**. 27 : 175-185.

Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Anal. Chem.,** 31: 426, 1959.

Sukumaran, R.K. Singhania. R.R. Matthew, G. M. and Pandey, A. 2009, "Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production".**Renewable Energy** 34:2, 421-424.

Verma, G. Nigam, P. Singh, D. Chaudhary, K. 2000. "Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae*". **Bioresour. Technol**. 21: 261-266.

Zhang, Q.Z. and Cai, W.M. 2008. "Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3". **Biomass Bioenergy**, 57: 323-336.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-1 การเตรียมอาหาร PDA

ส่วนประกอบ

Potato dextrose broth (PDB)	24	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง PDB 24 กรัม เติม Agar 18 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำเข้าไปอบด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 1 นาทีจนสารละลายใส แบ่งใส่ขวดแบนขวดละ 20 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 5.6 ± 0.2 จากนั้นนำขวดแบนวางทิ้งไว้ให้เย็นเป็นมุม 60 องศา เพื่อให้สารละลายแข็งและอยู่ในลักษณะที่ต้องการ

1. การเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* sp. และการเตรียมสารละลายสปอร์

นำอาหาร PDA มาเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma sp.* บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการเตรียมสารละลายสปอร์โดยนำสปอร์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผสมสารละลายทวีน 80 นำเชื้อไปตรวจวัดจำนวนสปอร์

2. การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยการใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

1. เตรียมสารละลายสปอร์ โดยนำสปอร์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรที่ผสมสารละลายทวีน 80 0.2 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ (ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์) ดูดมา 1-2 หยด และหยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อให้สปอร์กระจายตัว
3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า
4. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยหารด้วย จำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับและนำไปคูณด้วยค่า 4×10^6 จะได้ปริมาณสปอร์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เครื่องมือวิเคราะห์และวิธีการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

1. การเตรียมสาร

1. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

- ชั่งกลูโคส 1.0000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

2. เตรียม Dinitrosalicylic reagent หรือ DNS reagent

- ชั่งกรด 3,5 – ไดไตรโตซาลิไซลิก (3,5 – Dinitrosalicylic acid) 10 กรัมในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากันจนกระทั่งได้สารละลายใส เติมโซเดียมโพแทสเซียมทราเทรตลงไปทีละน้อยจนครบ 200 กรัมและปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3. เตรียมสารละลาย 2 M NaOH

- ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 16 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

- เติมปริมาณสารละลายที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานดังตารางที่ ก-1

ตารางที่ ก-1 ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

หลอดที่	ปริมาณการเติมสารละลาย		
	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	DNS reagent (มิลลิลตร)
Blank	-	1.00	3.00
1	0.20	-	3.00
2	0.40	-	3.00
3	0.60	-	3.00
4	0.80	-	3.00
5	1.00	-	3.00

- นำหลอดทดลองทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นทันที
- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตรทุกหลอดทดลอง
- เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- นำข้อมูลไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติม DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นทันที
- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง
- เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- นำข้อมูลไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล (Jekel, 2005)

วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี(GC) โดยใช้ Headspace ในการฉีดตัวอย่างเข้าไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column	: DB-WAX (Agilent J&W GC Column)
Column description	: ท่อเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 0.53 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร
Column temperature	: 120 องศาเซลเซียส (15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 120 องศาเซลเซียส)
Inject temperature	: 250 องศาเซลเซียส
Detector	: FID (Flame-Ionized detector)
Carrier gas, flow rate	: Helium อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที
Pressure	: 6 psi

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้ โพรพานอล (n-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard)
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้ผสมโพรพานอลในอัตราส่วนดังนี้

น้ำหนักเอทานอล(g)	น้ำหนักโพรพานอล(g)	น้ำหนักน้ำกลั่น(g)
1	5	9
3	5	7
5	5	5

4. ใส่สารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร วางเซปตัม (septum) ที่ปากขวดโดยคว่ำด้านเทฟลอน (Teflon) ลงติดปากขวด จากนั้นจึงปิดด้วยฝาอะลูมิเนียม
5. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลใช้เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟี (HS-GC)โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-17A Chromatograph, Shimadzu)
6. ใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent J&W GC Column)ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 1 ไมครอน อุณหภูมิของคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัววัด (detector) ชนิด FID โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 150 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นพาหะโดยมีความดันคอลัมน์เท่ากับ 6 psi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-1 การวัดปริมาณน้ำตาลจากแกลบในสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ (วัน)	ตัวอย่าง (ชุด)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			dilution factor	ความเข้มข้นของน้ำตาล (มก./ก.น้ำหนักแห้ง)			
		#1	#2	#3		#1	#2	#3	ค่าเฉลี่ย
0	ชุดทดลอง	0.010	0.009	0.008	2	0.441	0.397	0.353	0.397
	ชุดแบลงค์	0.014	0.018	0.013	1	0.309	0.397	0.287	0.330
1	ชุดทดลอง	0.014	0.011	0.019	2	0.618	0.458	0.838	0.647
	ชุดแบลงค์	0.028	0.024	0.025	1	0.618	0.529	0.551	0.566
2	ชุดทดลอง	0.048	0.043	0.054	2	2.118	1.897	2.382	2.132
	ชุดแบลงค์	0.035	0.038	0.032	1	0.772	0.838	0.706	0.772
3	ชุดทดลอง	0.061	0.074	0.068	2	2.691	3.264	3.000	2.985
	ชุดแบลงค์	0.059	0.061	0.057	1	1.301	1.346	1.257	1.301
4	ชุดทดลอง	0.091	0.104	0.089	2	4.015	4.588	3.926	4.176
	ชุดแบลงค์	0.064	0.064	0.065	1	1.411	1.411	1.434	1.419
5	ชุดทดลอง	0.102	0.119	0.105	2	4.500	5.250	4.632	4.794
	ชุดแบลงค์	0.073	0.072	0.079	1	1.610	1.588	1.743	1.647

สมการของกราฟมาตรฐาน $y = 0.541x$

*หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ แกลบที่ต้มด้วย 2% NaOHและเติมเชื้อ *Trichoderma sp.*ที่มีความเข้มข้น 10^5สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดแบลงค์ คือ แกลบที่ต้มด้วย 2% NaOHและไม่เติมเชื้อ *Trichoderma sp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 การวัดปริมาณน้ำตาลจากแกลบในสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ (วัน)	ตัวอย่าง (ชุด)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			dilution factor	ความเข้มข้นของน้ำตาล (มก./ก.น้ำหนักแห้ง)			
		#1	#2	#3		#1	#2	#3	ค่าเฉลี่ย
0	ชุดทดลอง	0.011	0.007	0.009	2	0.485	0.309	0.397	0.397
	ชุดแบลงค์	0.014	0.018	0.013	1	0.309	0.397	0.287	0.330
1	ชุดทดลอง	0.017	0.021	0.016	2	0.750	0.927	0.706	0.794
	ชุดแบลงค์	0.028	0.024	0.025	1	0.618	0.529	0.551	0.566
2	ชุดทดลอง	0.037	0.029	0.038	2	1.623	1.279	1.676	1.529
	ชุดแบลงค์	0.035	0.038	0.032	1	0.772	0.838	0.706	0.722
3	ชุดทดลอง	0.084	0.081	0.093	2	3.706	3.574	4.103	3.794
	ชุดแบลงค์	0.059	0.061	0.057	1	1.301	1.346	1.257	1.301
4	ชุดทดลอง	0.104	0.113	0.109	2	4.588	4.985	4.809	4.794
	ชุดแบลงค์	0.064	0.064	0.065	1	1.411	1.411	1.434	1.419
5	ชุดทดลอง	0.097	0.091	0.085	2	4.279	4.015	3.750	4.015
	ชุดแบลงค์	0.073	0.072	0.079	1	1.610	1.588	1.743	1.647

สมการของกราฟมาตรฐาน $y = 0.541x$

*หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ แกลบที่ต้มด้วย 2% NaOHและเติมเชื้อ *Trichoderma sp.*ที่มีความเข้มข้น 10^6สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดแบลงค์ คือ แกลบที่ต้มด้วย 2% NaOHและไม่เติมเชื้อ *Trichoderma sp.*

ตารางที่ ค-3 การวัดปริมาณน้ำตาลจากแกลบในสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ (วัน)	ตัวอย่าง (ชุด)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			dilution factor	ความเข้มข้นของน้ำตาล (มก./ก.น้ำหนักแห้ง)			
		#1	#2	#3		#1	#2	#3	ค่าเฉลี่ย
0	ชุดทดลอง	0.013	0.016	0.011	2	0.574	0.706	0.485	0.588
	ชุดแบลงค์	0.014	0.018	0.013	1	0.309	0.397	0.287	0.330
1	ชุดทดลอง	0.037	0.026	0.031	2	1.632	1.147	1.367	1.382
	ชุดแบลงค์	0.028	0.024	0.025	1	0.618	0.529	0.551	0.566
2	ชุดทดลอง	0.067	0.073	0.092	2	2.956	3.220	4.059	3.412
	ชุดแบลงค์	0.035	0.038	0.032	1	0.772	0.838	0.706	0.722
3	ชุดทดลอง	0.129	0.135	0.137	2	5.691	5.956	6.044	5.897
	ชุดแบลงค์	0.059	0.061	0.057	1	1.301	1.346	1.257	1.301
4	ชุดทดลอง	0.084	0.092	0.085	2	3.706	4.059	3.750	3.838
	ชุดแบลงค์	0.064	0.064	0.065	1	1.411	1.411	1.434	1.419
5	ชุดทดลอง	0.052	0.054	0.051	2	2.294	2.382	2.250	2.309
	ชุดแบลงค์	0.073	0.072	0.079	1	1.610	1.588	1.743	1.647

สมการของกราฟมาตรฐาน $y = 0.5911x$

*หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ แกลบที่ต้มด้วย 2% NaOHและเติมเชื้อ *Trichoderma sp.*ที่มีความเข้มข้น 10^7สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดแบลงค์ คือ แกลบที่ต้มด้วย 2% NaOHและไม่เติมเชื้อ *Trichoderma sp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-4 การวัดปริมาณน้ำตาลจากรำหยาบในสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ (วัน)	ตัวอย่าง (ชุด)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			dilution factor	ความเข้มข้นของน้ำตาล (มก./ก.น้ำหนักแห้ง)			
		#1	#2	#3		#1	#2	#3	ค่าเฉลี่ย
0	ชุดทดลอง	0.012	0.016	0.015	2	0.529	0.706	0.661	0.632
	ชุดแบลงค์	0.019	0.020	0.017	1	0.419	0.441	0.375	0.412
1	ชุดทดลอง	0.036	0.037	0.039	2	1.588	1.632	1.721	1.647
	ชุดแบลงค์	0.028	0.031	0.031	1	0.618	0.634	0.634	0.662
2	ชุดทดลอง	0.043	0.046	0.046	2	1.897	2.029	2.029	1.985
	ชุดแบลงค์	0.043	0.054	0.049	1	0.949	1.191	1.081	1.074
3	ชุดทดลอง	0.071	0.075	0.081	2	3.132	3.309	3.574	3.338
	ชุดแบลงค์	0.067	0.072	0.078	1	1.478	1.588	1.721	1.596
4	ชุดทดลอง	0.124	0.119	0.127	2	5.470	5.250	5.603	5.441
	ชุดแบลงค์	0.075	0.074	0.083	1	1.654	1.632	1.831	1.706
5	ชุดทดลอง	0.074	0.070	0.079	2	3.265	3.088	3.485	3.279
	ชุดแบลงค์	0.091	0.084	0.084	1	2.007	1.853	1.853	1.904

สมการของกราฟมาตรฐาน $y = 0.5911x$

*หมายเหตุ ชุดทดลอง คือ รำหยาบที่ต้มด้วย 2% NaOHและเติมเชื้อ *Trichoderma sp.*ที่มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดแบลงค์ คือ รำหยาบที่ต้มด้วย 2% NaOHและไม่เติมเชื้อ *Trichoderma sp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-5 การวัดปริมาณน้ำตาลจากแกลบในการขยายขนาดการผลิต

ตัวอย่างที่ (วัน)	ตัวอย่าง (ชุด)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			dilution factor	ความเข้มข้นของน้ำตาล (มก./ก.น้ำหนักแห้ง)				
		#1	#2	#3		#1	#2	#3	ค่าเฉลี่ย	SD
3	ชุดทดลอง[1]	0.107	0.099	0.105	1	4.39	4.17	4.34	4.30	0.113
7	ชุดทดลอง[1]	0.103	0.106	0.104	1	4.27	4.36	4.31	4.31	0.048
14	ชุดทดลอง[2]	0.054	0.048	0.059	1	4.37	3.99	4.68	4.35	0.349

สมการของกราฟมาตรฐาน [1] $y = 0.3696x - 0.0555$

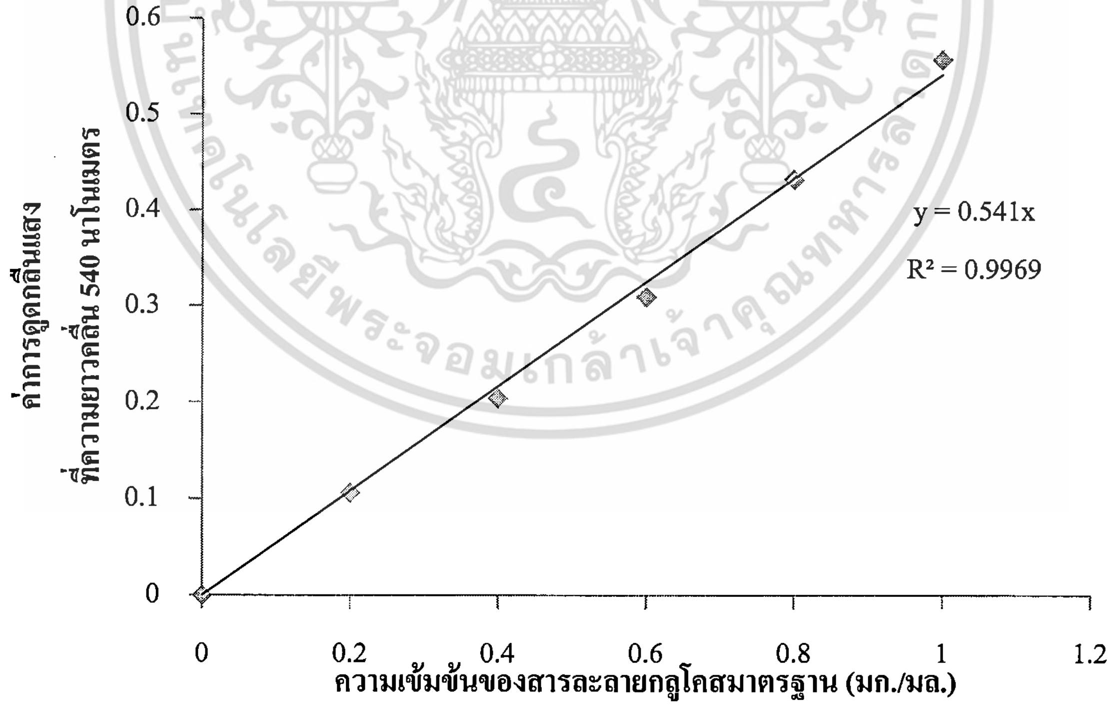
[2] $y = 0.2x - 0.042$

*หมายเหตุ ตัวอย่าง แกลบที่ต้มด้วย 2% NaOHและเติมเชื้อ *Trichoderma sp.*ที่มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-6 ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
0	0.000	0.000	0.000
0.2	0.106	0.113	0.115
0.4	0.204	0.245	0.249
0.6	0.309	0.364	0.363
0.8	0.432	0.473	0.481
1.0	0.557	0.583	0.659
สมการ	y = 0.541x	y = 0.541x	y = 0.541x

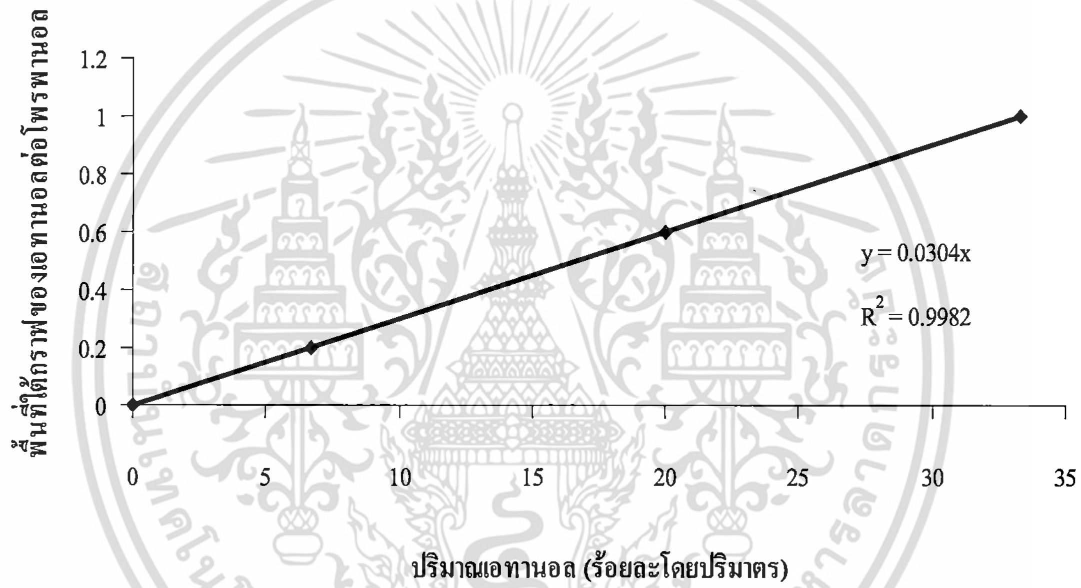


ภาพที่ ค-1 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของการหาความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-7 ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลจากอัตราส่วนเอทานอลต่อโพรพานอล

พื้นที่อัตราส่วนเอทานอลต่อโพรพานอล	ความเข้มข้นเอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)
0	0.000
0.2	0.067
0.6	0.200
1.0	0.333



ภาพที่ ค-2 กราฟแสดงปริมาณเอทานอลจากอัตราส่วนระหว่างเอทานอลกับโพรพานอลด้วย GC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-8 พารามิเตอร์ต่างๆ ที่ทำการวิเคราะห์ก่อนและหลังผลิตไบโอเอทานอล

ตัวอย่าง	ก่อนผลิตไบโอเอทานอล			หลังผลิตไบโอเอทานอล			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอล	**ปริมาณเอทานอล (mg/ml)	ปริมาณเอทานอล (g/ g of glucose)
	ค่า Abs	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มแรก* (mg/ml)	ค่า pH	ค่า Abs	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ* (mg/ml)	ค่า pH				
ชุดทดลอง	0.251	0.40	4.5	0.012	0.019	4.2	0.381	0.0006	0.15	0.40
ชุดทดลองซ้ำ	0.218	0.35	4.5	0.007	0.004	4.3	0.346	0.0005	0.12	0.35
Blank	0.251	0.44	4.5	0.247	0.39	4.6	0.06	0.0001	0.02	0.02
Blank(ซ้ำ)	0.218	0.40	4.5	0.214	0.34	4.5	0.06	0.0001	0.02	0.02
ชุดควบคุม 1	-	180	4.5	0.644	1.02	4.3	178.98	0.0293	7.607	0.448
ชุดควบคุม 1 (ซ้ำ)	-	180	4.5	0.593	0.95	4.5	179.05	0.0323	8.406	0.493
ชุดควบคุม 2	-	0.375	4.5	0.013	0.02	4.4	0.355	0.0007	0.153	0.431
ชุดควบคุม 2 (ซ้ำ)	-	0.375	4.5	0.017	0.03	4.4	0.345	0.0007	0.153	0.443

หมายเหตุ *สมการที่ใช้ในการคำนวณน้ำตาลรีดิวซ์ $y = 0.6292x$

**สมการที่ใช้ในการคำนวณปริมาณเอทานอล $y = 0.0304$

ชุดทดลอง คือ น้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลองเติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Blank คือ น้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลองไม่เติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ชุดควบคุม 1 คือ กลูโคส 18 กรัมใส่ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรเติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (ปริมาณน้ำตาลกลูโคสคิดเป็น 0.1 โมล)

ชุดควบคุม 2 คือ กลูโคส 0.0375 กรัมใส่ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรเติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (ปริมาณน้ำตาลกลูโคสใกล้เคียงกับชุดการทดลอง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

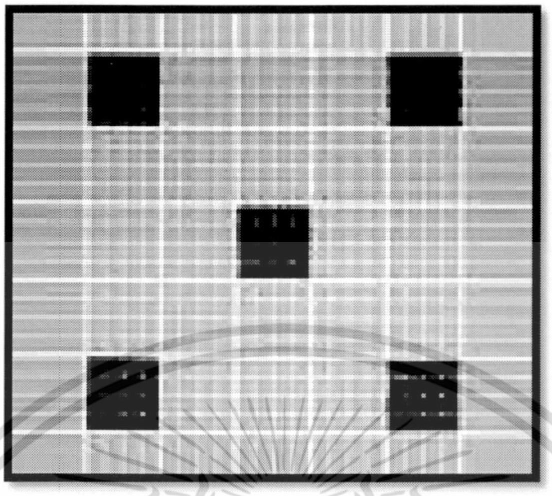
ภาคผนวก ง

ตัวอย่างการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง-1 การนับจำนวนสปอร์และการเตรียมสารละลายสปอร์

1) แสดงการนับจำนวนสปอร์ภายในฮีมาไซโตมิเตอร์จำนวน 5 ช่องใหญ่คือ ช่องบนซ้าย ช่องบนขวา ช่องล่างขวา ช่องล่างซ้ายและตรงกลาง ดังแสดงในรูป ง-1



ภาพที่ ง-1 ฮีมาไซโตมิเตอร์

จำนวนสปอร์ที่นับได้คือ ช่องบนซ้าย = 37

ช่องบนขวา = 20

ช่องล่างขวา = 36

ช่องล่างซ้าย = 25

ตรงกลาง = 41

จำนวนจุลินทรีย์คือ $\frac{37+20+36+25+41}{5}$ = 31.80 สปอร์

ดังนั้นปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรมีจุลินทรีย์ = $31.8 \times 4 \times 10^{6}$

$= 1.27 \times 10^{9}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2). แสดงการคำนวณในการเตรียมสารละลายสปอร์

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

แทนค่า (1.27×10^{9} สปอร์ต่อมิลลิลิตร)(V1) = (10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร)(200 มิลลิลิตร)

V_1 = (10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร)(200 มิลลิลิตร) / (1.27×10^{9} สปอร์ต่อมิลลิลิตร)

V_1 = 1.57×10^{-1} มิลลิลิตร

= 157 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง-2 ความเข้มข้นและปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์

1) การคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากการวิเคราะห์การเทียบสี เช่น ชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.010, 0.009 และ 0.008 ตามลำดับ

จากกราฟได้สมการ y = 0.541x

แทน y = 0.010 (ครั้งที่ 1)

$$x = \frac{0.010}{0.541}$$

= 0.03

แทน y = 0.009 (ครั้งที่ 2)

$$x = \frac{0.009}{0.541}$$

= 0.03

แทน y = 0.008 (ครั้งที่ 3)

$$x = \frac{0.008}{0.541}$$

= 0.02

ดังนั้นค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ย คือ $\frac{0.03+0.03+0.02}{3}$ = 0.03 มก./มล.

2) การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

น้ำหนักแกลบของชุดการทดลองของสารละลายสปอร์เข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร = 10 กรัม

ค่าความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ย ตัวอย่างที่ 0 (วัน) คือ 0.03 มก./มล.

ปริมาตรน้ำตาลทั้งหมดของชุดการทดลอง คือ 120 มิลลิลิตร

ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น $= \frac{(0.03 \text{ มก./มล.})(120 \text{ มิลลิลิตร})}{10 \text{ กรัม}}$

= 0.39 มิลลิกรัมต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง-3 การคำนวณปริมาณเอทานอล

จากชุดทดลองอ้างอิง สามารถอ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟจาก โครมาโทรแกรมได้เท่ากับ 0.205 ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 18 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จากสมการ $y = 0.0304x$

$$x = \frac{y}{0.0304}$$

$$x = \frac{0.0293}{0.0303}$$

$x = 0.96$ (%v/v)

ความหนาแน่นของเอทานอลเท่ากับ 0.789 g/ml

$x = 0.96 \times 0.789$

$x = 0.7607$ (%w/v)

$x = 0.7607$ g/100ml

$x = 7.607$ mg/ml

ถ้าหาความเข้มข้นของเอทานอลของน้ำตาลกลูโคสในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมกลูโคสหาได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของเอทานอล (mg/g กลูโคส)} = \frac{X\left(\frac{mg}{ml}\right) \times \text{ปริมาณเอทานอลทั้งหมด}(ml)}{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป }(g)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลอ จารุสุทธิรักษ์

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ. (เกียรตินิยม)	สาธารณสุขศาสตร์ (อาชีวอนามัย)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2533
M.Sc.	Environmental Engineering	Asian Institute of Technology	2538
Ph.D.	Environmental Engineering	University of Colorado at Boulder	2545

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ

- เทคโนโลยีบำบัดน้ำและน้ำเสีย
- เทคโนโลยีเมมเบรน
- การจัดการของเสียและขยะอันตราย

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2537	ทุนการศึกษา: ระดับปริญญาโท	Asian Development Bank
2540	ทุนการศึกษา: ทุนพัฒนาอาจารย์	รัฐบาลไทย
2547	ทุนพัฒนาศักยภาพอาจารย์รุ่นใหม่	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
2548	ทุนพัฒนาศักยภาพอาจารย์รุ่นใหม่	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
2548	ทุนวิจัย	สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน
2549	ทุนวิจัย	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2549	ทุนวิจัย	คณะวิทยาศาสตร์ สจล.
2552	ทุนวิจัย	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

1. Her, N., Amy, G., **Jarusutthirak, C.** (2000) Seasonal variations of nanofiltration (NF) foulants: identification and control, *Desalination*, 132:143-160.

2. **Jarusutthirak, C.,** and Amy, G.L. (2000) Influence of wastewater secondary effluent on NF and UF membrane filtration, *ACS Division of Environmental Chemistry, Preprints*, 40:2:289-291.

3. **Jarusutthirak, C.,** and Amy, G. (2001) Membrane filtration of wastewater effluents for reuse: effluent organic matter rejection and fouling. *Water Science and Technology*. 43:10:225-232.

4. **Jarusutthirak, C.,** Amy, G., and Crouè, J-P. (2002) Fouling characteristics of wastewater effluent organic matter (EfOM) isolates on NF and UF membranes, *Desalination*, 145:247-255.

5. **Jarusutthirak, C.**, Amy, G., and Foss, D. (2003) Potable reuse of wastewater effluent through an integrated soil aquifer treatment (SAT) - membrane system, *Water Supply*, 3:3:25–33.

6. **Jarusutthirak, C.** and Amy, G. (2006) Role of soluble microbial products (SMP) in membrane fouling and flux decline. *Environ. Sci. Technol.*, 40:3:969-974.

7. **Jarusutthirak, C.**, Mattaraj, S., and Jiraratananon, R. (2007) Influence of inorganic scalants and natural organic matter on nanofiltration membrane fouling, *J. Membr. Sci.*, 287:138-145.

8. **Jarusutthirak, C.,** and Amy, G. (2007) Understanding soluble microbial products (SMP) as a component of effluent organic matter (EfOM), *Wat. Res.,* 41:2787-2793.

9. **Jarusutthirak, C.**, Mattaraj, S., and Jiraratananon, R. (2007) Factors affecting nanofiltration performances in natural organic matter rejection and flux decline, *Sep. Pur. Technol.*, 58:1:68-75.

10. Mattaraj, S., **Jarusutthirak, C.**, and Jiraratananon, R. (2008) A combined osmotic pressure and cake filtration model for crossflow nanofiltration of natural organic matter, *J. Membr. Sci.*, 332:2:475-483.

11. Mattaraj, S., **Jarusutthirak, C.**, Charoensuk, C., and Jiraratananon, R. (2011) A combined pore blockage, osmotic pressure, and cake filtration model for crossflow nanofiltration of natural organic matter and inorganic salts, *Desalination*, 274:1-3:182-191.

12. **Jarusutthirak, C.,** Sangsawang, K., Mattaraj, S., and Jiraratananon, R. (2012) Treatment of formaldehyde-containing wastewater using membrane bioreactor, *J.Env.Eng.*, 138:3:265-271.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเสนอผลงานวิชาการ

1. Muttamara, S., Visvanathan, C., and **Jarusutthirak, C.** (1997) Ozonation of textile dyeing waste in combination with chemical treatment, *International Ozone Association - Wasser Berlin Conference*, April 21-23, 1997, Berlin, Germany.
2. **Jarusutthirak, C.,** and Amy, G.L. (2000) Influence of wastewater secondary effluent on NF and UF membrane filtration, *220th ACS National Meeting*, August 20-24, 2000, Washington, D.C.
3. **Jarusutthirak, C.,** Amy, G. (2000), Membrane Filtration of Wastewater Effluents for Reuse: Natural Organic Matter Rejection and Fouling. *Proceedings First World Water Congress of the International Water Association*, Paris, France, 268-275.
4. **Jarusutthirak, C.**, Amy, G.L., Drewes, J., and Fox, P. (2002) Wastewater effluent organic matter (EfOM): rejection by, and fouling of, nanofiltration and ultrafiltration membranes, *Proceedings International Water Association (IWA) Conference*, April 2002, Melbourne, Australia.
5. **Jarusutthirak, C.,** Amy, G.L., and Foss D.W. (2002) Integrated soil aquifer treatment (SAT) - membrane system for potable reuse, *Proceedings International Water Association (IWA) Conference*, April 2002, Melbourne, Australia.
6. **Jarusutthirak, C.**, Mattaraj, S., Jiraratananon, R., Charoensuk, C., Decha, J., and Hongtong, P. (2004) Reverse Osmosis (RO) in Removal of Natural Organic Matter (NOM) from Surface Water, *Proceedings the 1st KMITL International Conference on Science and Technology for Sustainable Development*, August 2004, Bangkok, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้