



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการใช้ประโยชน์ *Spirodela polyrrhiza* ในการผลิตเอทานอล

Study of Ethanol Production from *Spirodela polyrrhiza*

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
TP
593
๙๘13๓

เลขหมู่.....130285

เอกสารนี้เป็นของหอสมุดกลาง สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

วันที่เดือน ปี ๕2 ๒๕๕7

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อผู้อื่น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b.12597831

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาการใช้ประโยชน์ *Spirodela polyrrhiza* ในการผลิตเอธานอล
แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 260,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2556

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

บทคัดย่อ

Spirodela polyrrhiza หรือ “แหวนเปิดใหญ่” เป้าการศึกษาเบื้องต้นได้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากพืชชนิดนี้ในการผลิตไบโอเอธานอลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทางเลือก งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ alpha-amylase ในการย่อยสลายแป้งที่สะสมใน *S. polyrrhiza* ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซิงค์ และครอบคลุมไปถึงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ และปริมาณเอธานอลจาก *Spirodela polyrrhiza* 3 สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน ได้แก่สายพันธุ์ลาดกระบัง1, ลาดกระบัง2 และลาดกระบัง3 ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ได้จากการย่อยสลาย โดยพบว่าในช่วงระยะเวลา 24 วัน พืชสายพันธุ์ ลาดกระบัง1 และลาดกระบัง3 มีอัตราการเจริญเติบโตในแง่ของน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และพื้นที่ใบสูงกว่าสายพันธุ์ลาดกระบัง2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเอนไซม์ alpha-amylase เพื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์ pullulanase และ amyloglucosidase แสดงให้เห็นว่าการใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงให้ค่าเฉลี่ยของน้ำตาลรีดิวซิงค์สูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ในพืชทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ลาดกระบัง1 ลาดกระบัง2 และลาดกระบัง3 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์เฉลี่ยเท่ากับ 27.68 ± 0.59 , 29.63 ± 0.50 และ 13.49 ± 0.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ตามอย่างไรก็ดีผู้วิจัยพบว่าเมื่อนำผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายแป้งของพืชทั้งสามสายพันธุ์ไปใช้ในกระบวนการผลิตเอธานอลโดยการหมักร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 เป็นระยะเวลา 3 วัน พืชสายพันธุ์ลาดกระบัง3 ให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอธานอล 6.25 ± 0.08 กรัมต่อลิตร และสูงกว่าสายพันธุ์ลาดกระบัง 1 และลาดกระบัง2 งานวิจัยชิ้นนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของ *S. polyrrhiza* ในระดับสายพันธุ์มีผลต่อการเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ และปริมาณเอธานอลที่ได้

คำสำคัญ : *Spirodela polyrrhiza*, *Saccharomyces cerevisiae*, alpha-amylase, เอธานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Study of Ethanol Production from *Spirodela polyrrhiza*

Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana

Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Biology

ABSTRACT

Spirodela polyrrhiza, commonly known as duckweed, is a species of small aquatic flowering plants that can be found in local ponds. Previous studies have shown the possibility of utilizing duckweed as an alternative source for ethanol production. This study aims to investigate conditions for liquefaction using alpha-amylase as well as growth rates, reducing sugar contents and ethanol productivity of three different *S. polyrrhiza* strains Latkrabang1, Latkrabang2 and Latkrabang3. During the growth period of 24 days, the growth rate of strains Latkrabang1 and Latkrabang3 were significantly higher than that of strain Latkrabang2 as indicated by fresh weight, dry weight and the total frond area. Examination of conditions used for liquefaction showed that the best conditions yielding the highest reducing sugar content were 3 hours of digestion with alpha-amylase at 50°C, pH6. After liquefaction with alpha-amylase and saccharification with pullulanase and amyloglucosidase, the reducing sugar contents of plant strains Latkrabang1, Latkrabang2 and Latkrabang3 were 27.68±0.59, 29.63±0.50 and 13.49±0.42 g/L, respectively. However, the average ethanol content obtained from strain Latkrabang3 (6.25±0.08 g/L) was significantly higher than that from strain Latkrabang1 and Latkrabang2 after 3 days of fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain TISTR 5606. These results suggest that differences between *S. polyrrhiza* strains affect growth rate, reducing sugar content and ethanol production.

Keywords : *Spirodela polyrrhiza*, *Saccharomyces cerevisiae*, alpha-amylase, ethanol

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และนักศึกษาปริญญาโทของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยชิ้นนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการ liquefaction ด้วยเอนไซม์ alpha-amylase.....	16
4.4 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ได้จากพืชตัวอย่าง 3 สายพันธุ์	18
4.1 การผลิตเอธานอลจาก <i>S. polyrrhiza</i> โดยการหมักร่วมกับ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ TISTR 5606.....	19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	21
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	21
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	22
เอกสารอ้างอิง.....	23
ประวัตินักวิจัย.....	25



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1	11
4.1	14
4.2	17
4.3	20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	13
4.2	15
4.3	15
4.4	16
4.5	18
4.6	19
4.7	20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

นับแต่การเกิดขึ้นของการปฏิวัติอุตสาหกรรมในอดีตจนถึงปัจจุบัน ความสามารถในการผลิตและเทคโนโลยีในด้านต่างๆ ของมนุษย์ได้พัฒนาและก้าวหน้าไปเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคการคมนาคมขนส่งที่ช่วยให้ประชาชนสามารถเดินทางติดต่อสื่อสารกันได้อย่างทั่วถึง และการกระจายสินค้าทางการเกษตรเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปัจจัยหลักที่ผลักดันความก้าวหน้าในด้านการคมนาคมคือ เชื้อเพลิงปิโตรเลียม ได้แก่ เชื้อเพลิงปิโตรเลียมในรูปแบบน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลที่ใช้ในรถยนต์ รถบรรทุก และรถโดยสารประเภทต่างๆ อย่างไรก็ตามเนื่องจากเชื้อเพลิงชนิดดังกล่าวเป็นทรัพยากรประเภทใช้แล้วหมดสิ้นไป กอปรกับอัตราค่าการผลิตของประเทศผู้ผลิตเชื้อเพลิงดังกล่าวถูกปรับลดลง ราคาของเชื้อเพลิงชนิดนี้จึงถูกปรับสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมา ส่งผลให้เกิดปัญหาเงินเฟ้อและราคาสินค้าอุปโภคบริโภคถูกปรับให้สูงขึ้นตาม ปัญหาดังกล่าวสร้างความเดือดร้อนให้แก่ประชาชนผู้บริโภคเป็นอย่างมาก นอกจากนี้การเผาไหม้เชื้อเพลิงปิโตรเลียมโดยรถยนต์ยังเป็นแหล่งกำเนิดของคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งถูกจัดเป็นชนิดหนึ่งของก๊าซเรือนกระจกที่ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อนอันเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงและภัยพิบัติทางธรรมชาติที่มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการศึกษาการใช้พลังงานทางเลือกอื่นๆ เช่น พลังงานไฟฟ้าที่ผลิตจากพลังงานแสงอาทิตย์ การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันใช้แล้วในครัวเรือน รวมไปถึงการผสมเอทานอลลงไปเชื้อเพลิงปิโตรเลียมเพื่อลดปริมาณการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศและลดปริมาณการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกในเวลาเดียวกัน

เอทานอลจัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ซึ่งมีสูตร โครงสร้าง C_2H_5OH และสามารถผลิตได้โดยการใช้กระบวนการหมักน้ำตาลกับจุลินทรีย์ ในปัจจุบันได้มีการใช้งานเอทานอลกันอย่างกว้างขวาง โดยการผสมเอทานอลลงไปน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนต่างๆ เช่น น้ำมัน E10 ที่มีส่วนผสมของน้ำมันเบนซิน 90 เปอร์เซ็นต์ กับเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำมัน E20 ที่มีส่วนผสมของน้ำมันเบนซิน 80 เปอร์เซ็นต์ กับเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ (Mousdale, 2010) ด้วยเหตุนี้เองอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจึงเติบโตขึ้นเป็นอย่างมาก โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลได้มาจากพืชเศรษฐกิจในกลุ่มพืชที่ใช้เป็นอาหาร เช่น อ้อย ข้าวโพด มันสำปะหลัง เป็นต้น โดยน้ำตาลหรือแป้งที่สะสมอยู่ในส่วนต่างๆ ของพืชจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและป้อนเข้าสู่กระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล นอกจากนี้การศึกษาผลของฮอโมน และหน้าที่ของยีนต่างๆ ในระดับจีโนม (Genomics) ของพืชช่วยส่งเสริมให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการสะสมแป้งและน้ำตาลมากขึ้นซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในอีกทางหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Mousdale, 2010) อย่างไรก็ตามแม้ว่าเอธานอลจะมีข้อดีในแง่ของการอนุรักษ์พลังงานและสิ่งแวดล้อม ทว่าในปัจจุบันก็ยังคงมีข้อดกเถียงในสังคมเกี่ยวกับผลกระทบของกระบวนการผลิตเอธานอลต่อความมั่นคงทางอาหาร เนื่องจากวัตถุดิบพืชไร่ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอธานอลนั้นก็คือพืชและธัญพืชที่ใช้เป็นอาหารนั่นเอง ดังนั้นจึงมีความกังวลว่าหากความต้องการเอธานอลเพิ่มสูงยิ่งขึ้นในอนาคตอาจทำให้เกิดภาวะขาดแคลนพืชในกลุ่มดังกล่าวที่ใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านอาหารได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้มีความพยายามศึกษาชนิดแหล่งวัตถุดิบใหม่ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารมาใช้ในกระบวนการผลิตเอธานอล ตัวอย่างเช่น การใช้พืชชนิดอื่นๆ เป็นวัตถุดิบ หรือการผลิตเอธานอลจากเซลลูโลส (cellulosic ethanol) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของพืช เป็นต้น (Mousdale, 2010)

พืชในวงศ์ Lemnaceae ที่รู้จักกันทั่วไปว่าแห่น และไข่น้ำ (Duckweeds) เป็นพืชน้ำชนิดหนึ่งที่มีการกระจายและเจริญในพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยที่พบพืชชนิดต่างๆ ในวงศ์นี้ที่จัดอยู่ในสกุล *Spirodela*, *Lemna* และ *Wolffia* ได้แก่ แห่นเป็ดใหญ่ (*S. polyrrhiza*), แห่นเป็ดเล็ก (*L. minor*) และไข่น้ำ (*Wolffia* sp.) (Wang et al., 2010) (Les et al., 1997) พืชในวงศ์นี้มีความสำคัญในกระบวนการศึกษาทางวิทยาศาสตร์อย่างมาก โดยในอดีตได้ถูกนำมาใช้ศึกษาความรู้เกี่ยวกับกระบวนการทางชีววิทยาของพืช เช่น กลไกของกระบวนการชีวภาพ (biological clock) ในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองต่อโลหะหนักของพืชในวงศ์ Lemnaceae และการประยุกต์ใช้ในการดูดซับสารเคมีที่เป็นพิษในแหล่งน้ำ นอกจากนี้ *L. minor* ยังถูกนำมาใช้ในการเป็นแหล่งผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์อีกด้วย ในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการใช้พืชวงศ์ Lemnaceae ในกระบวนการผลิตเอธานอล เนื่องจากพืชวงศ์นี้เจริญเติบโตได้ง่ายและรวดเร็ว สารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตสามารถจัดหาได้จากน้ำทิ้งที่ได้จากการปศุสัตว์ เช่น การเลี้ยงสุกร ซึ่งน้ำทิ้งมีส่วนผสมของสารประกอบอินทรีย์กลุ่มไนโตรเจนและฟอสฟอรัสปริมาณมาก การศึกษาเบื้องต้นในต่างประเทศได้แสดงให้เห็นว่าในสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม *S. polyrrhiza* บางสายพันธุ์สามารถสะสมแป้งได้ถึง 45.8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงพืชในวงศ์นี้จะไม่มีผลในการแย่งพื้นที่เพาะปลูกของพืชที่ใช้เป็นอาหารอีกด้วย (Stomp & Cheng, 2009)

จากข้อมูลข้างต้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบอัตราการสะสมแป้งและปริมาณเอธานอลที่ผลิตได้จาก *S. polyrrhiza* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่พบในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศ การศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการพัฒนาเทคโนโลยีในด้านพลังงานทางเลือกจาก *S. polyrrhiza* ซึ่งมีศักยภาพที่จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและทดสอบปริมาณการสะสมแป้งของ *S. polyrrhiza* สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในประเทศไทย

1.2.2 เพื่อศึกษาและทดสอบ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการ liquefaction โดยการใช้เอนไซม์ α -amylase ร่วมกับการใช้เอนไซม์ pullulanase และ amyloglucosidase ในขั้นตอน saccharification

1.2.3 เพื่อศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของการผลิตเอธานอลโดยกระบวนการหมัก น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายโดยการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

สายพันธุ์ของ *S. polyrrhiza* อย่างน้อย 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้จะถูกเก็บรวบรวมจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศ ซึ่งสายพันธุ์ที่พบในประเทศนี้นับได้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติและมีการปรับตัวให้สามารถดำรงชีวิตได้อย่างเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย โดยพืชที่ใช้ในการทดลองจะถูกเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (axenic culture) เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการสะสมแป้งระหว่างสายพันธุ์ แป้งที่สกัดแยกออกมาได้จากพืชจะถูกนำมาเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโดยการใช้เอนไซม์สามชนิดคือ เอนไซม์ alpha-amylase, เอนไซม์ pullulanase และเอนไซม์ amyloglucosidase ซึ่งน้ำตาลที่ได้นี้จะถูกนำมาใช้ในกระบวนการหมักที่เกิดขึ้น โดยการทำงานของยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอธานอลซึ่งสามารถนำมาวัดปริมาณอัตราการผลิตได้โดยการใช้เครื่อง gas chromatography

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์ *S. polyrrhiza*

1.4.2 การเพาะเลี้ยง *S. polyrrhiza* ในสภาพปลอดเชื้อ

1.4.3 การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ *S. polyrrhiza* แต่ละสายพันธุ์

1.4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน liquefaction ด้วยเอนไซม์ alpha-amylase

1.4.5 การทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ของพืชสายพันธุ์ตัวอย่าง

1.4.6 การศึกษาระยะเวลาในการหมักด้วยยีสต์

1.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณเอธานอลด้วย Gas chromatography

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการวิจัยนี้ตั้งอยู่บนองค์ความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาในต่างประเทศที่แสดงให้เห็นถึงการสะสมแป้งในบางสายพันธุ์ของ *S. polyrhiza* อย่างไรก็ตามความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ต่างประเทศกับสายพันธุ์ท้องถิ่นที่พบในประเทศไทยอาจมีผลต่อปริมาณการสะสมแป้งได้เช่นกัน ดังนั้นแล้วโครงการวิจัยนี้จึงต้องการการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *S. polyrhiza* ที่พบในพื้นที่ต่างๆ ในประเทศเพื่อนำมาใช้พิจารณาถึงประโยชน์ในการผลิตเอธานอล โดยตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสายพันธุ์อาจจะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ชนิดและปริมาณการสะสมของแป้ง และปริมาณสารประกอบอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อกระบวนการหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถถูกนำไปใช้ในการศึกษา พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอธานอลจาก *S. polyrhiza* ต่อไปได้

1.6.2 การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ในแง่ของ อัตราการเจริญเติบโตและการสะสมแป้งจะให้ผลประโยชน์คือสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในงานวิจัยต่อยอดในอนาคต

1.6.3 ผลการศึกษาจะเป็นประโยชน์ต่อ หน่วยงานต่างๆ ซึ่งได้แก่ สถาบันวิจัย สถาบันศึกษาต่างๆ รวมไปถึงบริษัทเอกชนที่มีความสนใจในเทคโนโลยีการผลิตเอธานอลจากพืช

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัตถุดิบจากพืชพลังงานที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลสามารถถูกแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มด้วยกัน ได้แก่ 1) กลุ่มของวัตถุดิบที่ให้น้ำตาล เช่น อ้อย, sugar beet เป็นต้น 2) กลุ่มของวัตถุดิบที่มีอัตราการสะสมแป้ง ปริมาณสูง เช่น ข้าวโพด, มันสำปะหลัง, ข้าว เป็นต้น และ 3) กลุ่มของวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบหลักเป็น lignocelluloses เช่น หญ้า switchgrass, ลำต้นของอ้อยที่ผ่านการคั้นน้ำแล้ว เป็นต้น วัตถุดิบจากแต่ละกลุ่ม จำเป็นต้องผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อผลิตน้ำตาลที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ (fermentable sugars) (Mousdale, 2010) ซึ่งมีรายละเอียดปลีกย่อยที่แตกต่างกันออกไป แบ่งที่พบในวัตถุดิบกลุ่มที่ 2 จัดเป็นสารในกลุ่มโพลีเมอร์ที่มีหน่วยย่อยคือน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมกันอยู่ด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยทั่วไปแล้วแบ่งที่พบในพืชประกอบด้วยโพลีเมอร์สองชนิดได้แก่ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ข้อแตกต่างระหว่างโพลีเมอร์ทั้งสองชนิดนี้คืออะไมโลสมีลักษณะเป็นโพลีเมอร์สายยาว ไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา โมเลกุลของกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะ $\alpha(1,4)$ ในขณะที่อะไมโลเพคตินมีลักษณะคล้ายคลึงกับอะไมโลสแต่มีการแตกกิ่งก้านสาขาโดยการสร้างพันธะ $\alpha(1,6)$ ปลายหนึ่งของสายโพลีเมอร์ทั้งสองชนิดคือ ปลาย reducing ในขณะที่อีกปลายหนึ่งคือปลาย non-reducing ซึ่งลักษณะที่แตกต่างกันของปลายทั้งสองด้านของโพลีเมอร์นี้มีความสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยการใช้เอนไซม์ซึ่งจัดว่ามีข้อดีมากกว่าการย่อยสลายแป้งโดยการใช้กรด เนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งด้วยกรดนั้นเกิดขึ้นในสภาพอุณหภูมิสูงถึง 150°C ในขณะที่อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์นั้นสามารถทำได้ที่อุณหภูมิ 110°C จึงจัดว่าเป็นข้อดีในแง่ของการลดต้นทุนด้านพลังงานที่ใช้ในการผลิตอีกทางหนึ่ง (Cardona et al., 2010) เอนไซม์หลักที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายแป้ง ได้แก่ เอนไซม์ α -amylase และเอนไซม์ amyloglucosidase เอนไซม์ α -amylase แยกได้จากแบคทีเรียทนความร้อนสูงและมีความสามารถในการทำลายพันธะ $\alpha(1,4)$ ระหว่างน้ำตาลกลูโคสในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มได้ผลผลิตในรูปของ น้ำตาลมอลโตสและ น้ำตาลกลูโคส เอนไซม์ชนิดนี้มีความเหมาะสมในกระบวนการย่อยสลายแป้งเนื่องจากสามารถทนทานอุณหภูมิสูงในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ (pretreatment) ก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายแป้งโดยเอนไซม์ได้ เอนไซม์ amyloglucosidase สามารถย่อยสลายแป้งจากปลาย non-reducing ของโพลีเมอร์โดยการทำลายพันธะ $\alpha(1,4)$ ได้ ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส และเอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถทำลายพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่พบบริเวณกิ่งของอะไมโลเพคตินได้อีกด้วย นอกจากนี้ นอกจากเอนไซม์ 2 ชนิดข้างต้นแล้ว ยังมีเอนไซม์อื่นๆ ที่ถูกนำมาใช้เช่นกัน ได้แก่ เอนไซม์ β -

amylase ซึ่งสลายพันธะ $\alpha(1,4)$ จากปลาย non-reducing และเอนไซม์ pullulanase ที่สลายพันธะ $\alpha(1,6)$ (Cardona, *et al.*, 2010)

ข้าวโพดและมันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่มีการสะสมแป้งปริมาณสูงในเมล็ดข้าวโพดและหัวมันตามลำดับ ผลผลิตเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลในหลายประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีกำลังการผลิตข้าวโพดสูงที่สุดในโลก โดยในปี 2007 ประเทศสหรัฐอเมริกามีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดถึง 35.02 ล้านเฮกเตอร์ ที่กำลังผลิต 9.48 ตัน/เฮกเตอร์ คิดเป็นปริมาณการผลิตสูงถึงกว่า 331 ล้านตันในหนึ่งปี โดย 22.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณข้าวโพดที่ผลิตได้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล ส่วนที่เหลือถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านอื่นๆ เช่นการปศุสัตว์ อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น (Cardona, *et al.*, 2010) ในขณะที่มันสำปะหลังนั้นมีการเพาะปลูกเป็นจำนวนมากในประเทศในทวีปแอฟริกา, เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และ อเมริกาใต้ โดยจากข้อมูลในปี 2009 ประเทศไทยจัดเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังอันดับที่ 2 ของโลกโดยมีผลผลิตรวมกว่า 30 ล้านตัน (ที่มา: <http://faostat.fao.org>) อย่างไรก็ตามปริมาณความต้องการพืชเหล่านี้ในเชิงบริโภคและพลังงานก็เพิ่มสูงขึ้นอยู่ตลอดเวลาเช่นกัน สาเหตุเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของประชากรผนวกกับความต้องการทางด้านพลังงานที่มีสูงขึ้นอยู่ตลอดเวลา การนำพืชอาหารมาใช้ในการผลิตเอทานอลจึงอาจส่งผลกระทบต่อในแง่ของราคาอาหารที่จะเพิ่มสูงขึ้นตาม ดังนั้นแล้วจึงได้มีความพยายามในการนำพืชชนิดอื่นหรือชิ้นส่วนเหลือใช้ของพืชมาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเป็นทางเลือกของการผลิตเอทานอล เช่นงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันเทศด้วยกระบวนการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและการหมักอย่างต่อเนื่อง (simultaneous saccharification and fermentation; SSF) โดยแป้งที่สกัดได้จากมันเทศถูกนำมาย่อยเบื้องต้นโดยเอนไซม์ α -amylase จากนั้นจึงใส่เอนไซม์ glucoamylase และเชื้อยีสต์ลงไปเพื่อให้เกิดกระบวนการย่อยแป้งและการหมักอย่างต่อเนื่อง การศึกษานี้พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 16.6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Srichuwonga *et al.*, 2009)

switchgrass (*Panicum virgatum*) ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองท้องถิ่นของประเทศสหรัฐอเมริกาก็ถูกนำมาใช้ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจาก lignocellulose เนื่องจากพืชชนิดนี้เพาะปลูกได้ง่ายในสภาพดินและภูมิอากาศที่หลากหลาย ต้องการการดูแลน้อย ให้ผลผลิตสูงถึง 11.1 ตันต่อเฮกเตอร์ การศึกษาเบื้องต้นพบว่าสามารถผลิตเอทานอลจากพืชชนิดนี้ได้ด้วยวิธี SSF และ วิธี separate hydrolysis and fermentation (SHF) ได้ถึง 90.3 และ 91.4% ของปริมาณที่คาดว่าจะสามารถผลิตได้จากการคำนวณตามลำดับ (Chung *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารประกอบ lignocellulose มีความต้านทานต่อกระบวนการย่อยสลายสูง ดังนั้นกระบวนการเตรียมตัวอย่าง (pretreatment) ก่อนกระบวนการย่อยสลาย (hydrolysis) จึงมีความสำคัญอย่างมาก (Cardona, *et al.*, 2010) เช่น งานวิจัยที่ทำการศึกษาผลของการเตรียมตัวอย่าง switchgrass ต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำตาลที่แสดงให้เห็นว่าการเตรียมตัวอย่างด้วย 0.1% NaOH ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสามารถเพิ่มปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลที่ผลิตได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ถึง 3.78 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้บ่มด้วย NaOH และน้ำตาลที่ได้นี้สามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมัก (Xu et al., 2010)

พืชในวงศ์ Lemnaceae ก็เป็นพืชอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในการนำมาใช้ผลิตเอทานอล พืชหลายชนิดในวงศ์นี้ถูกพบแพร่กระจายโดยทั่วไปในประเทศไทย เช่น แหนเป็ดใหญ่ (*S. polyrrhiza*), แหนเป็ดเล็ก (*L. minor*) และไข่น้ำ (*Wolffia* sp.) พืชในวงศ์นี้จัดเป็นพืชมีดอก (Angiosperm) ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) โดยแบ่งเป็น 5 สกุล (genus) ซึ่งประกอบด้วยพืช 38 ชนิด (species) (Les, et al., 1997, Wang, et al., 2010) พืชในวงศ์นี้มีลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน โดยมีถิ่นที่อยู่อาศัยในน้ำ โครงสร้างของต้นพืชมีการวิวัฒนาการปรับเปลี่ยนและลดขนาดรูปร่างของส่วนต่างๆ ของพืชลงไปเป็นอย่างมาก โดยสร้างโครงสร้างที่มีความซับซ้อนน้อยลง พืชต้นหนึ่งประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายใบขนาดเล็กที่เรียกว่า frond ซึ่งอาจจัดได้ว่าเป็นทั้งส่วนของลำต้นและส่วนของใบ เนื่องทำหน้าที่สังเคราะห์แสง และสร้างดอกขนาดเล็กที่ใช้ในการสืบพันธุ์ ในส่วนของรากของพืชในวงศ์นี้นั้นมีความแตกต่างไปจากพืชมีดอกอื่นๆ รากของพืชในวงศ์ Lemnaceae ไม่มีการสร้างขนราก และไม่มีการแตกแขนง โดยหน้าที่หลักของรากคือช่วยในการทรงตัวของ frond บนผิวน้ำมากกว่าการลำเลียงน้ำไปยัง frond เหมือนอย่างรากที่พบในพืชวงศ์อื่นๆ การแพร่พันธุ์ของพืชในวงศ์ Lemnaceae นั้น โดยมากแล้วเกิดขึ้นได้ในแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการสร้างต้นลูก (daughter frond) ขึ้นที่บริเวณปลายของต้นแม่ (mother frond) ต้นลูกนี้จะเกาะติดอยู่กับต้นแม่และทำการสร้างต้นลูกต่อไป เกิดเป็นลักษณะของโคโลนีที่ประกอบด้วย frond จำนวนมากขึ้น นอกไปจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศข้างต้นแล้ว พืชในวงศ์นี้ถูกพบว่ามี การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเช่นกัน โดยมีการสร้างดอกขึ้นบน frond เมื่อเกสรตัวเมียได้รับการผสมแล้วจะเกิดการสร้างเมล็ดที่เจริญเป็นต้นใหม่ต่อไป อย่างไรก็ตาม การสร้างดอกนี้เกิดขึ้นเฉพาะในโอกาสและสภาพแวดล้อมที่จำเพาะเจาะจงเท่านั้น (Les, et al., 1997) ในส่วนของ *S. polyrrhiza* เองนั้นก็มีลักษณะเฉพาะบางประการที่แตกต่างจากพืชชนิดอื่นๆ ในวงศ์เดียวกันเช่น frond มีลักษณะรี สะสมสารประกอบกลุ่ม anthocyanin, glycoflavone และ O-flavone แต่ละ frond สามารถสร้างรากได้มากถึง 20 ราก และสามารถเจริญเติบโตมีความยาวได้ถึง 4 เซนติเมตร เป็นต้น (Les, et al., 1997)

พืชวงศ์ Lemnaceae จัดเป็นพืชที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ในสภาพที่ขาดอาหาร อุณหภูมิ และแสงมีความเหมาะสมสามารถเจริญครอบคลุมผิวน้ำของแหล่งน้ำได้อย่างรวดเร็ว (Stomp & Cheng, 2009) เมื่อรวมข้อดีนี้กับขนาดเล็กของพืชและการเลี้ยงดูที่ไม่ซับซ้อน ทำให้พืชวงศ์นี้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการศึกษาทางชีววิทยาด้านต่างๆ เช่น สรีรวิทยา ชีวเคมี เป็นต้น ในแง่ของการประยุกต์ใช้ประโยชน์ มีงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของพืชในวงศ์ Lemnaceae ในการนำมาใช้งานทางด้าน phytoremediation ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสารเคมีหรือโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำ โดยการใช้พืชน้ำเป็นตัวดูดซับสารพิษ เช่น การศึกษาในห้องปฏิบัติการที่แสดงให้เห็นว่า *L. minor* สามารถดูดซับไอออนของตะกั่วและนิกเกิลที่ผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ โดยดูดซับตะกั่วได้ร้อยละ 76 และนิกเกิลได้ร้อยละ 82 ของความเข้มข้นของไอออนโลหะเริ่มต้น (Axtell et al., 2003) ในอีกด้านหนึ่ง *S. oligorhiza* ถูกนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการดูดซับสารประกอบไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในน้ำเสียที่ได้จากการทำฟาร์มเลี้ยงหมู โดย *S. oligorhiza* สามารถดูดซับร้อยละ 83.7 ของปริมาณไนโตรเจน และร้อยละ 89.4 ของฟอสฟอรัสในน้ำที่มีส่วนผสมของน้ำเสียจากฟาร์มร้อยละ 6 (Xu & Shen, 2011) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการหมุนเวียนใช้ประโยชน์น้ำเสียของฟาร์มเลี้ยงสุกรในการผลิต *S. oligorhiza* พร้อมๆ กับการบำบัดน้ำ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของพืชชนิดนี้เมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นที่เกษตรกรจำเป็นต้องซื้อปุ๋ยเคมีมาใช้บำรุงพืช และการใช้ปุ๋ยเคมียังส่งผลให้เกิดปัญหาดินเสื่อมสภาพอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีบริษัทในต่างประเทศที่ใช้พืชในวงศ์นี้เพื่อผลิต โปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ที่มีประโยชน์ เนื่องจากข้อดีที่ว่าวงจรชีวิตมีความซับซ้อนน้อย พืชมีอัตราการเพิ่มจำนวนสูง ใช้พื้นที่ในการดูแลต่ำ ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในมนุษย์ และมีกระบวนการตกแต่งโมเลกุลโปรตีนที่ไม่พบในจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย เช่น บริษัท Lemnagene ในประเทศฝรั่งเศส (<http://www.lemnagene.com/>) และบริษัท Biolex ในประเทศสหรัฐอเมริกา (<http://www.biolex.com/>) เป็นต้น และในปัจจุบันลำดับพันธุกรรมในจีโนมของ *S. polyrrhiza* กำลังได้รับการถอดรหัสและถูกเผยแพร่ต่อวงการวิชาการ (<http://lemna.rutgers.edu/>) โครงการถอดรหัสจีโนมนี้จะช่วยให้นักพัฒนา วิจัย การปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งการใช้ประโยชน์จากพืชในวงศ์ Lemnaceae เป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในแง่ของการผลิตเอทานอลจากพืชในวงศ์ Lemnaceae ได้มีการทดลองเบื้องต้นในระดับภาคสนาม โดยการเพาะเลี้ยง *S. polyrrhiza* สายพันธุ์ที่มีการสะสมแป้งสูงในบ่อน้ำขนาด 300 ตารางเมตร ความลึก 0.6 เมตร โดยสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้จากน้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงสุกรที่อยู่ข้างเคียงซึ่งถูกสูบลงสู่บ่อเลี้ยง *S. polyrrhiza* อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีปริมาณของแอมโมเนียมของตัวที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร *S. polyrrhiza* ที่เจริญเติบโตขึ้นในบ่อถูกเก็บเกี่ยว 3 ครั้งต่อสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ต่อเนื่องกัน พืชที่ถูกเก็บเกี่ยวมาได้นำมาเพาะเลี้ยงต่อในบ่อน้ำที่มีส่วนผสมของเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 10 วันเพื่อกระตุ้นให้พืชมีการสะสมแป้ง จากนั้นพืชถูกนำไปตากแห้งเพื่อเข้าสู่กระบวนการสกัดและย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยการใช้น้ำเอนไซม์ α -amylase, amyloglucosidase และ pullulanase แล้วจึงเข้าสู่กระบวนการหมักโดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ ATCC 24859 เพื่อให้ได้เอทานอล ผลการวิจัยครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยง *S. polyrrhiza* ในน้ำเกลือความเข้มข้น 30 mM กระตุ้นให้ *S. polyrrhiza* สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบสะสมแป้งได้ 31 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เพิ่มขึ้นถึง 1.7 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำไม่ผสมเกลือ แป้งที่ได้นี้เมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายเป็นน้ำตาลและกระบวนการหมักแล้วให้ปริมาณเอทานอลโดยเฉลี่ย 94.7 เปอร์เซ็นต์ของค่าที่ได้จากการคำนวณตามทฤษฎี ซึ่งเมื่อนำปริมาณการผลิตที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณการผลิตเอทานอลจาก *S. polyrrhiza* ในสภาพแวดล้อมเหมือนกับที่ทำการทดลองพบว่าสามารถผลิตชีวมวลของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. polyrrhiza ได้มากถึง 3.35×10^4 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ ที่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นแป้งปริมาณ 9.42×10^3 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ และผลิตเอทานอลได้มากถึง 6.42×10^3 ลิตรต่อเฮกเตอร์ สูงกว่าปริมาณการผลิตเอทานอลจากข้าวโพดซึ่งมีอัตราการผลิตที่ 4.31×10^3 ลิตรต่อเฮกเตอร์ ในขณะเดียวกันการเพาะเลี้ยง *S. polyrrhiza* โดยการใช้ น้ำที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงสุกรก็เป็นประโยชน์ในเชิงของการบำบัดน้ำเสียอีกทางหนึ่งด้วย (Xu et al., 2011)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สายพันธุ์ *S. polyrrhiza*

เก็บรวบรวมสายพันธุ์ของ *S. polyrrhiza* ที่พบในแหล่งน้ำในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต และปริมาณเอทานอลที่สามารถผลิตได้จากแต่ละสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่เก็บได้มี 3 สายพันธุ์ได้แก่สายพันธุ์ลาดกระบัง1, ลาดกระบัง2 และลาดกระบัง3

3.2 การเพาะเลี้ยง *S. polyrrhiza* ในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิว (surface sterilization) ของพืชที่เก็บรวบรวมมาได้ โดยเตรียมสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10% และเติม Tween-20 ลงไป 2-3 หยด จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาแช่ในสารละลายดังกล่าวนาน 2-3 นาที แล้วย้ายตัวอย่างพืชลงในหลอดทดลองใหม่ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เขย่าหลอดเป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที ทำซ้ำ 5 ครั้ง แล้วจึงย้ายตัวอย่างพืชลงในอาหารสังเคราะห์สูตร Hoagland ที่มีวุ้น 0.7% จากนั้นทำการคัดเลือกต้นพืชที่เจริญขึ้นมาใหม่และปราศจากเชื้อเพื่อย้ายลงไปอาหารสังเคราะห์สูตร Hoagland ที่มีวุ้น 0.7% และน้ำตาล sucrose ความเข้มข้น 1% เพื่อขยายเพิ่มจำนวนต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อ

3.3 การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ *S. polyrrhiza* แต่ละสายพันธุ์

ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนต้นพืชในอาหารสังเคราะห์สูตรดังกล่าว จากนั้นทำการย้ายต้นพืชลงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร Hoagland ที่ผสมน้ำตาลซูโครส 1% โดยทำการเพาะเลี้ยงพืชในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 24 วัน ในขวดความสูง 9 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25°C ให้แสงเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 วัน โดยเก็บตัวอย่างพืชครั้งละ 3 ช้ำเพื่อนำมาวัดอัตราการเจริญเติบโตจากน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และพื้นที่ใบทั้งหมด

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน liquefaction ด้วยเอนไซม์ alpha-amylase

ทำการเพาะเลี้ยงพืชตัวอย่างสายพันธุ์ลาดกระบัง1 เป็นระยะเวลา 24 วัน จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาล้างน้ำให้สะอาดและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นทำการบดพืชให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการ liquefaction ด้วยเอนไซม์ alpha-amylase ทั้งหมด 12 สภาวะดังตารางที่ 3.1 โดยใช้ตัวอย่างพืชปริมาณ 0.25 กรัมร่วมกับเอนไซม์ alpha-amylase 3.75×10^2 ยูนิต ในสารละลาย acetate buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 สภาวะต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการ liquefaction ร่วมกับเอนไซม์ α -amylase

อุณหภูมิ	เวลา (ชั่วโมง)		1 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง
	pH			
37°C	pH 5		สภาวะที่ 1	สภาวะที่ 7
50°C	pH 5		สภาวะที่ 2	สภาวะที่ 8
90°C	pH 5		สภาวะที่ 3	สภาวะที่ 9
37°C	pH 6		สภาวะที่ 4	สภาวะที่ 10
50°C	pH 6		สภาวะที่ 5	สภาวะที่ 11
90°C	pH 6		สภาวะที่ 6	สภาวะที่ 12

ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ liquefaction ถูกนำมาเข้าสู่กระบวนการ saccharification โดยการปรับ pH ของสารละลายเป็น 4.5 แล้วเติมเอนไซม์ pullulanase ปริมาณ 50 ยูนิตลงไปที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์ปริมาณ 2.5×10^2 ยูนิตลงไปที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละสภาวะ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ด้วยวิธี DNS โดยการเติมสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที รอให้สารละลายเย็นแล้วจึงนำสารละลายตัวอย่างไปวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5 การทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ของพืชสายพันธุ์ตัวอย่าง

ทำการเพาะเลี้ยงพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร Hoagland เป็นเวลา 24 วัน แล้วทำการเก็บเกี่ยวตัวอย่างพืชเพื่อ ทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีข้างต้นและนำตัวอย่างพืชมาเข้าสู่กระบวนการ liquefaction ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้น แล้วจึงนำผลผลิตที่ได้เข้าสู่กระบวนการ saccharification ตามวิธีข้างต้น แล้วนำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ในตัวอย่างพืชทั้ง 3 สายพันธุ์โดยวิธี DNS

3.6 การศึกษาระยะเวลาในการหมักด้วยยีสต์

เพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 ในอาหารเหลว Yeast-Malt extract (YM; yeast extract 3 กรัม malt extract 3 กรัม peptone 5 กรัม glucose 10 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นเชื้อด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เติมเชื้อ ปริมาณ 3.6×10^9 ลงไปในผลผลิตที่ได้จากกระบวนการย่อยแป้งของพืชทั้งสามสายพันธุ์ที่ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในวันที่ 1 3 และ 5

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วย Gas chromatography

สารละลายที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ถูกนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography (Shimadzu 17A Chromatograph) โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้คือ DB-WAX ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดองค์ประกอบในสารตัวอย่างคือชนิด Flame ionization detector สารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตรถูกนำมาผสมกับสารละลาย 10% n-propanol แล้วนำสารผสมเข้าสู่เครื่อง gas chromatography เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป ผลที่ได้จะนำมาใช้ในการคำนวณอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อ n-propanol ซึ่งถูกนำมาคำนวณหาปริมาณร้อยละโดยปริมาตรของเอทานอลในสารละลายตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง ร้อยละ 12 (ปริมาตร/ปริมาตร) ค่าร้อยละของเอทานอลที่ได้สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณเอทานอลในสารละลายตัวอย่างโดยการใช้ค่าความหนาแน่นของเอทานอล (0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร) ร่วมในการคำนวณได้เป็นปริมาณ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บรวบรวมและเพาะเลี้ยงพืชตัวอย่างในสภาพปลอดเชื้อ

ตัวอย่างพืช *S. polyrrhiza* ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 3 สายพันธุ์ซึ่งเก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ต่างๆ ในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร พืชทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ได้แก่สายพันธุ์ ลาดกระบัง 1, ลาดกระบัง 2 และลาดกระบัง 3 พืชตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาได้มีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ ใบที่ลอยอยู่บนผิวน้ำเรียกว่า frond มีขนาดใหญ่รูปร่างค่อนข้างกลม ด้านหลังใบมีสีเขียวเข้ม ในขณะที่ด้านท้องใบมีสีแดงเข้ม และมีรากจำนวนมากอยู่ที่ทางด้านท้องใบ ลักษณะต่างๆ นี้แสดงให้เห็นว่าพืชตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาได้คือพืชในวงศ์ *Lemnaceae* ชนิด (species) *S. polyrrhiza* ตัวอย่างของพืชที่เก็บรวบรวมมาได้แสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 พืช *S. polyrrhiza* ที่เก็บรวบรวมมาใช้ในการศึกษา

พืชตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาได้นี้ถูกนำมาฟอกทำความสะอาดพื้นผิวด้วยสารละลาย hypochlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ที่ใส่ Tween-20 2-3 หยด เนื้อเยื่อพืชผ่านการทำความสะอาดพื้นผิวแล้วนำมาล้างในน้ำกลั่นมาเชื้อ 3 ครั้ง แล้วทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Hoagland ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

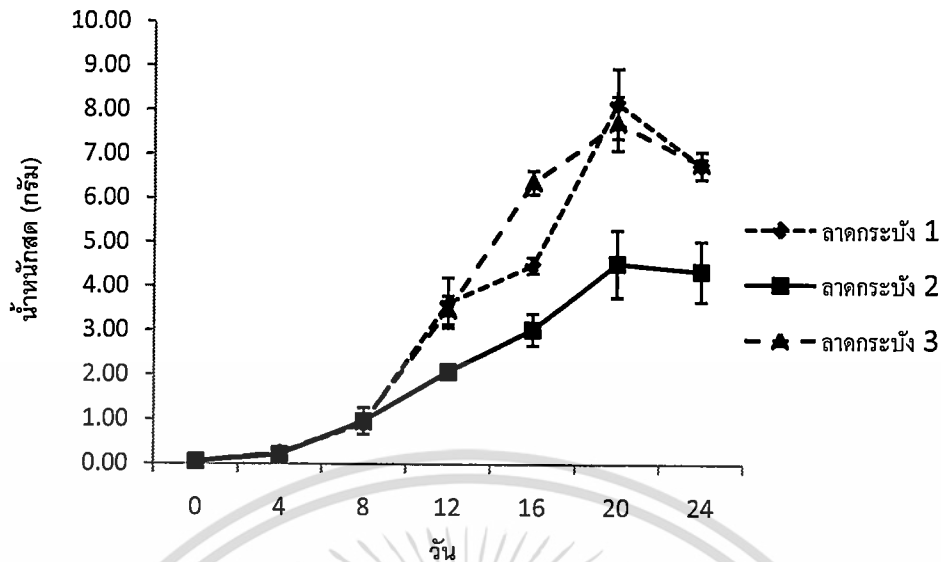
ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Hoagland

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
KNO_3	505.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	492.74
KH_2PO_4	136.09
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	820.45
H_3BO_3	2.86
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
ZnCl_2	0.11
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	27
Na_2EDTA	44.8

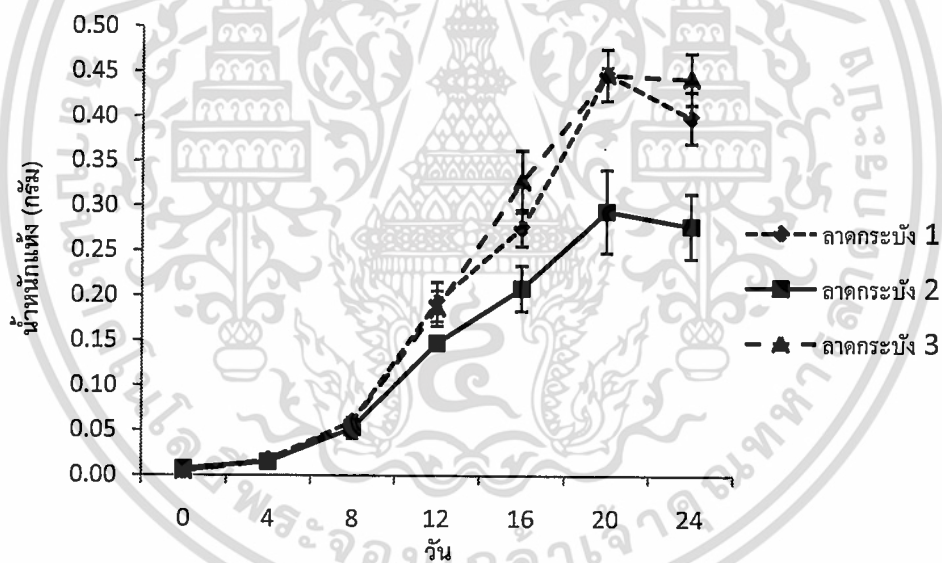
เนื้อเยื่อพืชที่เจริญเติบโตบนอาหาร Hoagland (pH 5.7) ที่เติมน้ำตาล sucrose ความเข้มข้น 1 % และปลอดเชื้อถูกนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากขึ้นเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไปคือการทดสอบเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 3 สายพันธุ์

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของพืชตัวอย่าง 3 สายพันธุ์

พืชตัวอย่างสายพันธุ์ลาดกระบัง 1, ลาดกระบัง 2 และลาดกระบัง 3 ถูกนำมาวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยทำการเพาะเลี้ยงพืช 5 ต้นในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8 ออนซ์ที่มีอาหารเหลวสังเคราะห์ Hoagland ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 วัน ทำการเก็บตัวอย่างพืชทั้งหมดในขวดมาบันทึกการเจริญเติบโตทุกๆ 4 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 3 ชั่ว ในการศึกษาครั้งนี้ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตจากน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และพื้นที่ใบทั้งหมด เมื่อนำผลที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญเติบโตได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.2 – 4.4

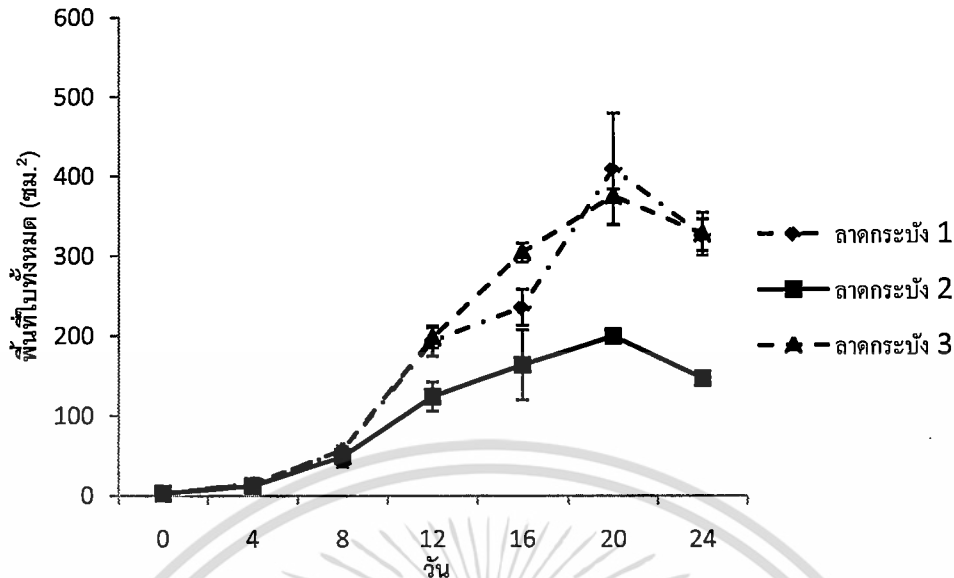


ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของ *S. polyrrhiza* ตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์ที่วัดจากน้ำหนักสด ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของตัวอย่าง 3 ซ้ำ (error bar = standard error of mean)



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของ *S. polyrrhiza* ตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์ที่วัดจากน้ำหนักแห้ง ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของตัวอย่าง 3 ซ้ำ (error bar = standard error of mean)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของ *S. polyrrhiza* ตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์โดยวัดจากพื้นที่ใบของพืช ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของตัวอย่าง 3 ซ้ำ (error bar = standard error of mean)

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของพืช *S. polyrrhiza* แสดงให้เห็นว่าพืชตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์มีช่วงระยะเวลาของการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันคือประมาณ 24 วัน โดยผลที่ได้จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจากน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และพื้นที่ใบทั้งหมดให้ผลสอดคล้องกันไปทิศทางเดียวกัน การเจริญเติบโตของพืชตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงระยะเวลา 4 วันแรกของการทดลอง และการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ Exponential phase ในช่วงวันที่ 4 ถึงวันที่ 20 และการเจริญเติบโตเริ่มเข้าสู่ระยะ Stationary phase ภายหลังจากวันที่ 20 เป็นต้นไป นอกจากนี้การศึกษ้อัตราการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ ยังแสดงให้เห็นอีกด้วยว่าพืชตัวอย่างสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 1 และสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 3 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน และสูงกว่าอัตราการเจริญเติบโตของพืชตัวอย่างสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 2 ด้วย ในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงนั้นสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 1 และสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 3 มีน้ำหนักสดมากกว่าสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 2 ประมาณ 1.5 เท่า ในส่วนของน้ำหนักแห้ง สายพันธุ์ลาดกระบ้ง 1 และสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 3 มีชีวมวลสูงกว่าสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 2 เท่ากับ 1.4 และ 1.6 เท่าตามลำดับ และในแง่ของพื้นที่ใบทั้งหมด สายพันธุ์ลาดกระบ้ง 1 และสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 3 มีชีวมวลสูงกว่าสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 2 เท่ากับ 2.2 เท่า

4.3 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการ liquefaction ด้วยเอนไซม์ alpha-amylase

จากการศึกษ้อัตราการเจริญเติบโตของพืชตัวอย่าง *S. polyrrhiza* ทั้ง 3 สายพันธุ์นั้นพบว่าสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 1 และ ลาดกระบ้ง 3 มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันและสูงกว่าสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 2 ดังนั้นจึงได้

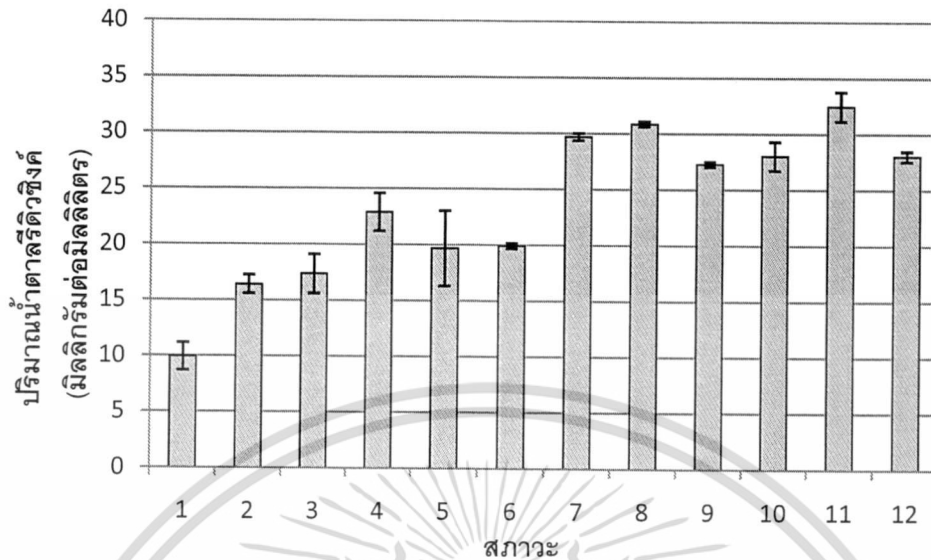
เลือกสายพันธุ์ลาดกระบัง 3 มาใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์ alpha-amylase โดยสภาวะที่ใช้ทดสอบได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (37°C, 50°C, 90°C) ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย Acetate buffer (pH5 และ pH6) และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง) ดังนั้นแล้วจึงมีสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์ alpha-amylase ที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 สภาวะ ดังตารางที่ 4.2 ปริมาณพืชตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งนี้คือ 0.25 กรัมในสารละลาย Acetate buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายแป้งเบื้องต้นด้วยเอนไซม์ alpha-amylase ถูกนำมาย่อยต่อโดยการใช้เอนไซม์ pullulanase โดยทำการปรับค่า pH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 4.5 และ ใช้ปริมาณเอนไซม์ pullulanase เท่ากับ 200 units ทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที จากนั้นทำการเติมเอนไซม์ amyloglucosidase ปริมาณเท่ากับ 80 units และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50°C นาน 4 ชั่วโมง ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จะเป็นน้ำตาลรีดิวซิงค์ ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซิงค์ในสารละลายได้ด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซิงค์ในสารละลายสามารถคำนวณได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส โดยได้ผลดังตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.5

ตารางที่ 4.2 สภาวะที่ใช้ในการย่อยแป้งใน *S. polyrhiza* สายพันธุ์ลาดกระบัง 3 โดยการใช้เอนไซม์ alpha-amylase ที่อุณหภูมิ pH และเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 สภาวะ ร่วมกับการย่อยสลายผลผลิตที่ได้ด้วยเอนไซม์ pullulanase และเอนไซม์ amyloglucosidase โดยวัดเป็นค่าปริมาณของน้ำตาลรีดิวซิงค์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

อุณหภูมิ	เวลา (ชั่วโมง) pH	1	3
37°C	pH 5	9.94 ± 1.24 (สภาวะที่1)	29.68 ± 0.31 (สภาวะที่7)
37°C	pH 6	16.39 ± 0.83 (สภาวะที่2)	30.84 ± 0.24 (สภาวะที่8)
50°C	pH 5	17.34 ± 1.75 (สภาวะที่3)	27.29 ± 0.23 (สภาวะที่9)
50°C	pH 6	22.89 ± 1.68 (สภาวะที่4)	28.02 ± 1.27 (สภาวะที่10)
90°C	pH 5	19.66 ± 3.37 (สภาวะที่5)	32.46 ± 1.31 (สภาวะที่11)
90°C	pH 6	19.91 ± 0.25 (สภาวะที่6)	28.02 ± 0.45 (สภาวะที่12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ได้จากการ liquefaction ของ *S. polyrrhiza* สายพันธุ์ลาดกระบัง 3 โดยการใช้อเอนไซม์ alpha-amylase ที่อุณหภูมิ pH และเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 สภาวะ (ตารางที่ 3.1) ร่วมกับการย่อยสลายผลผลิตที่ได้ด้วยเอนไซม์ pullulanase และเอนไซม์ amyloglucosidase (n = 3, error bar = standard error of mean)

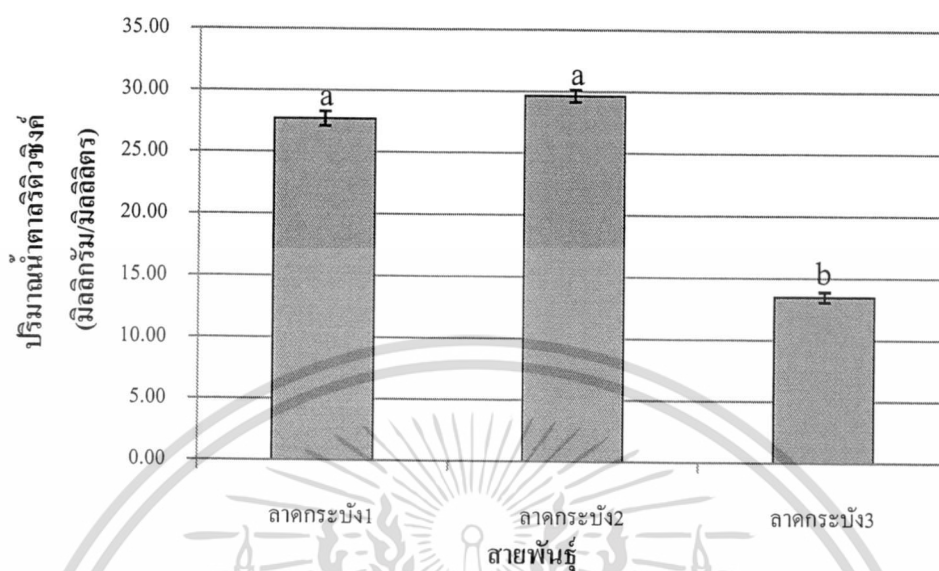
จากผลการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ในสารละลายที่ผ่านการย่อยพบว่าการใช้สภาวะการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ alpha-amylase ที่ 11 คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 3 ชั่วโมง ร่วมกับการใช้อเอนไซม์ pullulanase และเอนไซม์ amyloglucosidase ให้ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซิงค์เฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 32.46 ± 1.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ทดสอบอื่นๆ ดังนั้นแล้วสภาวะนี้จึงถูกเลือกนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซิงค์เพื่อทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตเอธานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ 5606 ต่อไป

4.4 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ได้จากพืชตัวอย่าง 3 สายพันธุ์

พืช *S. polyrrhiza* 3 สายพันธุ์ถูกนำมาเข้าสู่กระบวนการ liquefaction ด้วยเอนไซม์ alpha-amylase ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาเข้าสู่ขั้นตอน saccharification โดยการใช้อเอนไซม์ pullulanase และ amyloglucosidase ผลผลิตที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ด้วยวิธี DNS ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์แสดงให้เห็นว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชสายพันธุ์ลาดกระบัง1, ลาดกระบัง2 และลาดกระบัง3 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์เฉลี่ยเท่ากับ 27.68 ± 0.59 , 29.63 ± 0.50 และ 13.49 ± 0.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6)



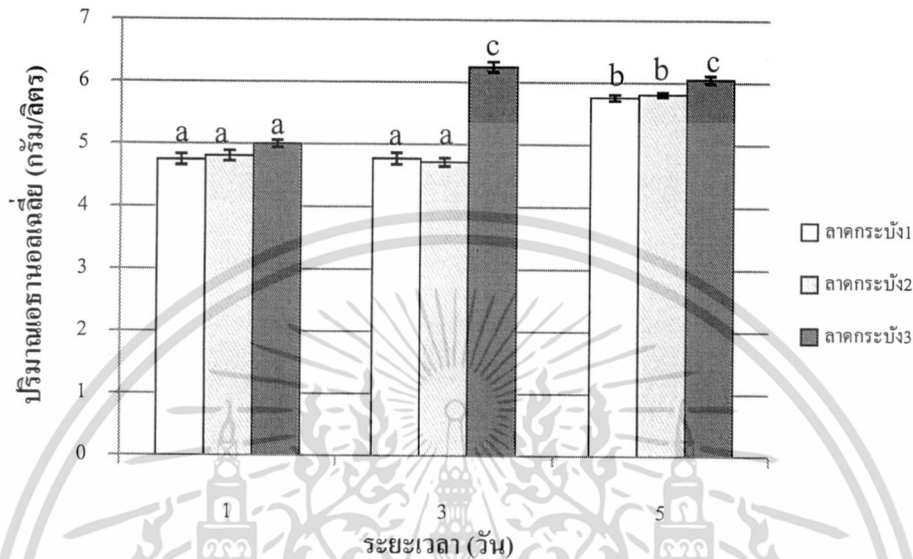
ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ได้จากการ liquefaction ของ *S. polyrrhiza* สายพันธุ์ลาดกระบัง 1, ลาดกระบัง2 และลาดกระบัง3 โดยการใช้เอนไซม์ alpha-amylase ร่วมกับกระบวนการ saccharification ด้วยเอนไซม์ pullulanase และเอนไซม์ amyloglucosidase ($n = 3$, error bar = standard error of mean) ตัวอักษร a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ด้วยตัวทดสอบ Duncan's test

4.5 การผลิตเอธานอลจาก *S. polyrrhiza* โดยการหมักร่วมกับ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606

ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ liquefaction และ saccharification ของ *S. polyrrhiza* ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยการใช้เอนไซม์ alpha-amylase, pullulanase และ amyloglucosidase ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตเอธานอลโดยการหมักร่วมกับ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 เป็นระยะเวลา 1 วัน, 3 วัน และ 5 วัน แล้วเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเอธานอลด้วยวิธี gas chromatography ได้ผลดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.6 จากการวิเคราะห์ปริมาณเอธานอลพบว่าการหมักน้ำตาลรีดิวซิงค์ด้วยยีสต์เป็นระยะเวลา 1 วัน ได้ผลผลิตเป็นเอธานอลจากสายพันธุ์ลาดกระบัง1, ลาดกระบัง2 และลาดกระบัง3 เท่ากับ 4.75 ± 0.09 , 4.81 ± 0.08 และ 5.00 ± 0.06 กรัม/ลิตร ตามลำดับ การหมักด้วยยีสต์เป็นระยะเวลา 3 วัน ได้ผลผลิตเป็นเอธานอลจากสายพันธุ์ลาดกระบัง1, ลาดกระบัง2 และลาดกระบัง3 เท่ากับ 4.77 ± 0.09 , 4.72 ± 0.07 และ 6.25 ± 0.08 กรัม/ลิตร ตามลำดับ การหมักด้วยยีสต์เป็นระยะเวลา 5 วัน ได้ผลผลิตเป็นเอธานอลจากสายพันธุ์ลาดกระบัง1, ลาดกระบัง2 และลาดกระบัง3 เท่ากับ 5.75 ± 0.05 , 5.81 ± 0.04 และ 6.05 ± 0.06 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างพืชสายพันธุ์ลาดกระบ้ง3 เป็นระยะเวลาสามวันให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอธานอลสูงกว่าการหมักที่ระยะเวลา 1 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่เวลา 5 วัน และตัวอย่างพืชสายพันธุ์นี้ให้ปริมาณเอธานอลสูงกว่าตัวอย่างพืชสายพันธุ์ลาดกระบ้ง1 และลาดกระบ้ง 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่4.3)



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณเอธานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซิงค์ของพืชตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR5606 เป็นระยะเวลา 1 วัน, 3 วัน และ 5 วัน ($n = 3$, error bar = standard error of mean) ตัวอักษร a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ด้วยตัวทดสอบ Duncan's test

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเอธานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซิงค์ของพืชตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR5606 เป็นระยะเวลา 1 วัน, 3 วัน และ 5 วัน ตัวอักษร a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ด้วยตัวทดสอบ Duncan's test

สายพันธุ์พืช	ปริมาณเอธานอล (กรัม/ลิตร±S.E.)		
	เวลาที่ใช้ในการหมัก		
	1 วัน	3 วัน	5 วัน
ลาดกระบ้ง1	4.75±0.09 ^a	4.77±0.09 ^a	5.75±0.05 ^b
ลาดกระบ้ง2	4.81±0.08 ^a	4.72±0.07 ^a	5.81±0.04 ^b
ลาดกระบ้ง3	5.00±0.06 ^a	6.25±0.08 ^c	6.05±0.06 ^c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยที่ได้จากโครงการวิจัยการใช้ประโยชน์ *S. polyrrhiza* ในการผลิตเอทานอลแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของพืชชนิดนี้ต่ออัตราการเจริญเติบโตทั้งในแง่ของน้ำหนักสด, น้ำหนักแห้ง และพื้นที่ใบทั้งหมด และยังมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ได้จากกระบวนการ liquefaction และ saccharification รวมไปถึงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซิงค์ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 ด้วย ผลการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของพืชสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 1, ลาดกระบ้ง 2 และลาดกระบ้ง 3 โดยการใช้น้ำหนักสด, น้ำหนักแห้ง และพื้นที่ใบทั้งหมด แสดงให้เห็นชัดเจนว่าพืชสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 1 และลาดกระบ้ง 3 เจริญเติบโตได้ดีกว่าสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 2 ในอาหารสังเคราะห์สูตร Hoagland ที่เติมน้ำตาล sucrose 1% ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

โดยทั่วไปแล้วการวัดอัตราการเจริญเติบโตของพืชสามารถทำได้หลายวิธี งานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าอัตราการเจริญเติบโตของพืชในวงศ์ *Lemnaceae* สามารถถูกนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียหรือใช้เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำได้ (Appenroth *et al.*, 2010, Axtell, *et al.*, 2003) หน่วยงาน Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) ใช้ค่าอัตราการเจริญเติบโตที่ได้จาก พื้นที่ใบทั้งหมด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารพิษในน้ำ (OECD, 2002) งานวิจัยครั้งนี้จึงสนับสนุนการวิเคราะห์การเจริญเติบโตจากค่าทั้ง 3 ค่าดังกล่าวเนื่องจากผลการวิเคราะห์การเจริญเติบโตจากพื้นที่ใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของ *S. polyrrhiza* ทั้ง 3 สายพันธุ์ให้ผลสอดคล้องกันไปทิศทางเดียวกัน

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการ liquefaction ด้วยการใช้เอนไซม์ alpha-amylase แสดงให้เห็นว่าการบ่มตัวอย่างพืชสายพันธุ์ลาดกระบ้ง 3 ร่วมกับเอนไซม์ alpha-amylase ในสารละลาย acetate buffer pH 6 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์สูงสุดจากสภาวะที่ทดสอบทั้งหมด 12 สภาวะ สาเหตุที่จำเป็นต้องทำการศึกษหาสภาวะที่เหมาะสมเนื่องจากเอนไซม์ alpha-amylase นั้นสามารถทำงานได้ในสภาวะที่หลากหลาย ปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เช่น อุณหภูมิ (Declerck *et al.*, 2003) และ pH (Calderon Santoyo *et al.*, 2003) เป็นต้น นอกจากนี้งานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเอทานอลจากพืชในวงศ์ *Lemnaceae* ก็มีการใช้สภาวะการทำ liquefaction ที่แตกต่างกันอีกด้วย (Ge *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ได้จากพืชตัวอย่างทั้งสามสายพันธุ์แสดงให้เห็นว่าพืชตัวอย่างสายพันธุ์ลาดกระบัง1 และลาดกระบัง2 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์สูงกว่าสายพันธุ์ลาดกระบัง3 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของสายพันธุ์พืชนอกจากจะส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตแล้วยังส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ได้จากกระบวนการ liquefaction อีกด้วย เมื่อนำตัวอย่างพืชทั้งสามสายพันธุ์มาหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR5606 แล้ว พบว่าระยะเวลาในการหมักที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดสำหรับพืชสายพันธุ์ลาดกระบัง1 และลาดกระบัง2 เท่ากับ 5 วันหรือ 120 ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์ลาดกระบัง3 ใช้ระยะเวลาเพียง 3 วันหรือ 72 ชั่วโมง ปริมาณของเอทานอลสูงสุดที่ได้จากการทดลองครั้งนี้คือ 6.25 กรัมต่อลิตร จากการใช้น้ำตาลรีดิวซิงค์เฉลี่ย 13.49 กรัม งานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตจาก *Lemna minor* และ *Landoltia punctata* มีค่าประมาณ 24.5 และ 30.8 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์เริ่มต้นที่ 50 และ 70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Chen *et al.*, 2012, Ge, *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างปริมาณเอทานอลกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์เริ่มต้นนั้นพบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยงานวิจัยครั้งนี้มีค่าสัดส่วนเท่ากับ 0.46 และค่าสัดส่วนของ *L. minor* และ *L. punctata* มีค่า 0.49 และ 0.44 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอทานอลเฉลี่ยที่ได้จากพืชสายพันธุ์ลาดกระบัง3 มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ลาดกระบัง1 และลาดกระบัง2 ในการหมักเป็นระยะเวลา 3 และ 5 วันด้วย ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ปัจจัยหนึ่งคือสายพันธุ์ของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่นำมาใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในแง่ของความจำเพาะเจาะจงระหว่างสายพันธุ์พืชและสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาใช้ในกระบวนการหมัก

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแป้งที่สะสมในพืช *S. polyrrhiza* ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถถูกเปลี่ยนมาเป็นเอทานอลได้ นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ยังแสดงให้เห็นถึงอัตราการเจริญเติบโตและการสะสมแป้งที่แตกต่างกันอีกด้วย ดังนั้นแล้วจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้พืชทั้งสามสายพันธุ์ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมการเจริญเติบโตและการสะสมแป้งเพื่อให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์พืชที่เหมาะสมมากขึ้นได้ ในส่วนของการผลิตเอทานอลนั้น การทดลองขั้นต่อไปสามารถทำได้ในแง่ของการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความเหมาะสมต่อสายพันธุ์พืชมากขึ้น รวมไปถึงการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

เอกสารอ้างอิง

- Appenroth, K. J., Krech, K., Keresztes, A., Fischer, W. & Koloczek, H.** (2010). Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere* 78, 216-223.
- Axtell, N. R., Sternberg, S. P. & Claussen, K.** (2003). Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. *Bioresour Technol* 89, 41-48.
- Calderon Santoyo, M., Loiseau, G., Rodriguez Sanoja, R. & Guyot, J. P.** (2003). Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and α -amylase production at pH 4.0. *International Journal of Food Microbiology* 80, 77-87.
- Cardona, C. A., Sanchez, O. J. & Gutierrez, L. F.** (2010). *Process synthesis for fuel ethanol production*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Chen, Q., Jin, Y., Zhang, G., Fang, Y., Xiao, Y. & Zhao, H.** (2012). Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase treatment. *Energies* 5, 3019-3032.
- Chung, Y. C., Bakalinsky, A. & Penner, M. H.** (2005). Enzymatic saccharification and fermentation of xylose-optimized dilute acid-treated lignocellulosics. *Appl Biochem Biotechnol* 121, 947-961.
- Declerck, N., Machius, M., Joyet, P., Wiegand, G., Huber, R. & Gaillardin, C.** (2003). Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase and modulation of its stability over a 50 degrees C temperature range. *Protein Eng* 16, 287-293.
- Ge, X., Zhang, N., Phillips, G. C. & Xu, J.** (2012). Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. *Bioresour Technol* 124, 485-488.
- Les, H. D., Landolt, E. & Crawford, D. J.** (1997). Systematics of the *Lemnaceae* (duckweeds): inferences from micromolecular and morphological data. *Plant Syst Evol* 204, 161-177.
- Mousdale, D. M.** (2010). *Introduction to biofuels*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- OECD** (2002). *Lemna sp. Growth Inhibitor test*. In OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD Publishing.
- Srichuwonga, S., Fujiwaraa, M., Wang, X., Seyamaa, T., Shiromaa, R., Arakanea, M., Mukojimab, N. & Tokuyasu, K.** (2009). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass Bioenergy* 33, 890-898.

- Stomp, A. M. & Cheng, J. J.** (2009). Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. *Clean: Soil Air Water* 37, 17-26.
- Wang, W., Wu, Y., Yan, Y., Ermakova, M., Kerstetter, R. & Messing, J.** (2010). DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biol* 10, 205.
- Xu, J., Cheng, J. J., Sharma-Shivappa, R. R. & Burns, J. C.** (2010). Sodium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Ethanol Production. *Energy Fuels* 24, 2113-2119.
- Xu, J., Cui, W., Cheng, J. J. & Stomp, A.-M.** (2011). Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosystems Engineering* 110, 67-72.
- Xu, J., Cui, W., Cheng, J. J. & Stomp, A. M.** (2011). Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosyst Eng*, 1-6.
- Xu, J. & Shen, G.** (2011). Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresour Technol* 102, 848-853.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สาขา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง

ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

โทรศัพท์ 0-2329-8400 ต่อ 3600

โทรสาร 0-329-8427

E-mail: kkchokch@kmitl.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีววิทยา	ม. เกษตรศาสตร์	2546
วท.ม.	พันธุศาสตร์	ม. เกษตรศาสตร์	2548
Ph.D.	Plant Biology	Rutgers University, USA	2553

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ พันธุศาสตร์ของพืชและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีววิทยาของพืชทั้งในเชิงพื้นฐานและเชิงประยุกต์ เช่น การทำลายพืชมืดเอ็นเอ การทำพันธุวิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ ในการถ่ายฝากยีน

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ ร่วมวิจัย ในแต่ละผลงานวิจัย

3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae (1 กุมภาพันธ์ 2555 - 31 มกราคม 2557; กองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

-การศึกษาการผลิตเฮอานอลจาก *Spirodela polyrrhiza* (1 ตุลาคม 2555 - 30 กันยายน 2556; ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556)

3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

Kittiwongwattana C., Lutz K., Clark M., Maliga, P. (2007) Plastid marker gene excision by the phi C31 phage sitespecific recombinase. *Plant Molecular Biology*. 64: 137-143

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานภาพ: ผู้ร่วมวิจัยระหว่างการศึกษาในระดับปริญญาเอก

Kittiwongwattana C. and Vuttipongchaikij S. (2013). Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata*. Maejo International Journal of Science and Technology. 7: 60-69. (impact factor = 0.456)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweed (*Lemna aequinoctialis*). International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology. (In press, impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). Biodiversity assessment of endophytic bacteria isolated from duckweed (*Lemna aequinoctialis*). Proceedings of the 3rd International Conference on Engineering, Applied Sciences, and Technology (ICEAST). (Accepted)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

3.4 งานวิจัย:

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ก.พ. 2555 - 31 ม.ค. 2557

-การศึกษาการผลิตเฮทานอลจาก *Spirodela polyrrhiza*

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ตุลาคม 2555 - 30 กันยายน 2556