รายงานการวิจัย

การปรับสภาพและย่อยฟางข้าวด้วยคลื่นไมโครเวฟและหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis*.

Microwave Pretreatment and Hydrolysis for Bioethanol Production from Rice Straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการวิจัย การปรับสภาพและย่อยฟางข้าวด้วยคลื่นไมโครเวฟและหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis*.

แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน) เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2560
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2560

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาล **เพน**โตส และสามารถนำมาย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อผลิตเป็นไบโอเอทานอลได้ การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ พบว่า การใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 23.33 ± 1.80 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* 5806 พบว่า เชื้อทั้งสองชนิดผลิตเอทานอลได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก คือ 4.70 ± 0.01 และ 4.37 ± 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักพบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล 0.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่ *P. stipitis* 5806 มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล 0.18 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

คำสำคัญ : ฟางข้าว ไบโอเอทานอล *S. cerevisiae* *P. stipitis*

Research Title Microwave Pretreatment and Hydrolysis for Bioethanol Production from Rice Straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*

Researcher Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Department of Biology, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

Rice straw is one of the abundant lignocellulosic biomass. It contains hexoses and pentoses sugar. Rice straw can utilize to produce reducing sugars for bioethanol production. This study has been made to carry out microwave pretreatment. The result found that microwave pretreatment at 240 W for 2 minutes with 5% sodium hydroxide (w/v) produced high level of reducing sugars (23.33 ± 1.80 g/L). In addition, the ethanol production by *S. cerevisiae* TISTR 5088 and *P. stipitis* TISTR 5806 can produced the highest ethanol concentration at 24 hour (4.70 ± 0.01, 4.37 ± 0.17 g/L) and the kinetic production showed the efficiency ethanol production of *S. cerevisiae* TISTR 5088 was 0.20 $gL^{-1}h^{-1}$ and *P. stipitis* TISTR 5806 was 0.18 $gL^{-1}h^{-1}$.

Keyword : Rice straw, Bioethanol, *S. cerevisiae*, *P. stipitis*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบรายได้คณะฯ ประจำปีงบประมาณ 2560

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ไบโอเอทานอล	5
2.2 ชีวมวล	6
2.3 วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	7
2.4 กระบวนการปรับสภาพ (Pretreatment) วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	7
2.5 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล	9
2.6 คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ *Pichia stipitis*	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	13
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	13
3.2 สารเคมี	13
3.3 อุปกรณ์	13
3.4 ขั้นตอนการดำเนินการ	14
3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง	14
3.4.2 การปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ (Pretreatment)	14
3.4.3 การศึกษาการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (Enzymatic Hydrolysis)	15
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส (ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ในส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	15
3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส)	15
3.4.6 กระบวนการหมัก (Fermentation)	16
3.4.7 การวิเคราะห์ผล	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	19
4.1 ผลการศึกษากำลังไฟที่เหมาะสมในการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับสภาพฟางข้าว	19
4.2 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับสภาพฟางข้าว	20
4.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟในการปรับสภาพฟางข้าว	20
4.4 ผลการศึกษาปริมาณลิกโนเซลลูโลส (ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส) ในฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและปรับสภาพ	21
4.5 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส) ในส่วนของเหลวของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	22
4.6 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอล	22
4.6.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟและย่อยด้วยเอนไซม์	22
4.6.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟและย่อยด้วยเอนไซม์ มีการเติมสารอาหารในไฮโดรไลเสทที่ได้	26
4.6.3 ผลการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากไฮโดรไลเสทส่วนกากหลังผ่านการปรับสภาพฟางข้าวโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟต่างๆ และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	19
4.2	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากไฮโดรไลเสทส่วนกากหลังผ่านการปรับสภาพฟางข้าวโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ที่เวลาต่างๆ และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	20
4.3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากไฮโดรไลเสทส่วนกากหลังผ่านการปรับสภาพฟางข้าวโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	21
4.4	ปริมาณลิกโนเซลลูโลโลสในฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที	22
4.5	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในส่วนของเหลวของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500	22
4.6	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ	23
4.7	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 ในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500	25

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.8	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้เชื้อ S. cerevisiae TISTR 5088 ในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 มีการเติมสารอาหาร	27
4.9	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 ในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 มีการเติมสารอาหาร	28
4.10	ค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลจากไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยฟางข้าวด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 กำลังไฟ 240 วัตต์เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806	30

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	เซลล์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*	10
2.2	เซลล์ของเชื้อ *Zymomonas mobilis*	11
2.3	เซลล์ของเชื้อ *Pichia stipitis*	12
4.1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้งและระดับพีเอช ในระหว่างกระบวนการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	24
4.2	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้งและระดับพีเอช ในระหว่างกระบวนการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	25
4.3	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	26
4.4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้งและระดับพีเอช ในระหว่างกระบวนการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 มีการเติมสารอาหารหมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	27
4.5	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้งและระดับพีเอช ในระหว่างกระบวนการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 และเติมสารอาหารโดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง	29
4.6	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่เติมสารอาหารที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 เป็นเวลา60 ชั่วโมง	29

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันความมั่นคงทางพลังงาน การเปลี่ยนแปลงทางสภาพอากาศ และปัญหาสิ่งแวดล้อมทั่วโลกทำให้เกิดความต้องการพลังงานทดแทนเพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงแทนปิโตรเลียม จึงก่อให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อทดแทนปิโตรเลียม หรือที่เรียกว่า เชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพเหลวชนิดหนึ่งที่ไม่เพียงแต่จะลดปัญหามูลค่าของราคาน้ำมันที่นำเข้าแต่ยังช่วยลดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน เนื่องจากมี O_2 ประกอบอยู่ในปริมาณสูง (Huang และคณะ, 2008) และเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาดและเผาไหม้ได้สมบูรณ์ ลดการปล่อยก๊าซต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะโลกร้อนสู่ชั้นบรรยากาศได้

ในปัจจุบัน สามารถผลิตเอทานอลได้จากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง เช่น อ้อย ข้าวโพด มันสำปะหลัง หรือวัตถุดิบอื่นๆ สำหรับในประเทศไทย วัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทางเกษตรกรรม โดยเฉพาะการปลูกข้าว เมื่อถึงฤดูการเก็บเกี่ยวข้าว ภายหลังการเก็บเกี่ยวจะสังเกตได้ว่าทุ่งนาที่เคยมีสีเขียว กลับเหลือเพียงแค่ฟางแห้งและตอซังเท่านั้น ซึ่งฟางข้าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นประโยชน์ได้อย่างมากมาย เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์ ทำปุ๋ยหมัก หรือใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ

ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลในลักษณะที่เป็นไปได้จริงทางเศรษฐกิจ โดยฟางข้าวประกอบไปด้วย เซลลูโลสร้อยละ 32-47, เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 19-27 และลิกนินร้อยละ 5-24 ซึ่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในฟางข้าวสามารถถูกย่อยไปเป็นน้ำตาล 2 ชนิด โดยการใช้สารเคมีและเอนไซม์ (Maiorella, 1983) เพื่อให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเปลี่ยนเป็นเอทานอล

จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลคือ เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่สามารถใช้น้ำตาลคาร์บอนหกอะตอมจากเซลลูโลสเพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ นอกจากนี้ ยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ หรือใช้ในการทำขนมปัง ข้อดีของยีสต์ชนิดนี้ คือ สามารถทนต่อแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงได้ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของการที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอมจากเฮมิเซลลูโลสในการหมักเอทานอลได้ จึงทำให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้ค่อนข้างต่ำ ต่อมาได้มีการศึกษาค้นพบเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอมให้เป็นเอทานอลที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งยีสต์ชนิดนั้น คือ *Pichia stipitis* แต่ข้อจำกัดของยีสต์ชนิดนี้ คือ มีความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอลล์ได้ต่ำ ซึ่งเอทานอลที่มีความเข้มข้นมากกว่า 30 ถึง 35 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการทำงานของยีสต์ชนิดนี้ (Laplace และคณะ, 1991)

เอทานอลสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย ส่วนใหญ่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นหรือตัวทำละลายในการผลิตเครื่องสำอาง น้ำหอม ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ หรือล้างแผล เช่น แอลกอฮอลล์ร้อยละ 75 ใช้ผสมหรือใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอลล์ต่างๆ ในด้านพลังงานเอทานอลนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้เลยหรือผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อเพิ่มค่าออกเทนในอัตราส่วนต่างๆ

เช่น น้ำมันแก๊สโซฮอล์ E10 หมายถึง มีแอลกอฮอล์ 1 ส่วน ในน้ำมันเบนซิน 9 ส่วน และ E20 หมายถึง มีแอลกอฮอล์ 2 ส่วน น้ำมันเบนซิน 8 ส่วน สำหรับในประเทศบราซิลมีการนำเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 100 หรือ E100 มาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์ได้โดยไม่ต้องผสมกับน้ำมันเบนซิน ซึ่งการนำเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพแทนการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลสามารถช่วยลดปัญหาการปล่อยก๊าซต่างๆ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะโลกร้อนได้

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพในการนำฟางข้าวที่มีในประเทศไทยมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอลโดยการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 *และ Pichia stipitis* TISTR 5806 รวมทั้งศึกษาจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ
2) ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของฟางข้าวโดยเปรียบเทียบการใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และ *Pichia stipitis* TISTR 5806 รวมทั้งศึกษาจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาการปรับสภาพของฟางข้าวโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ จากนั้นทำการกรองและนำส่วนของไฮโดรไลเสทส่วนกากไปใช้ในกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และ *Pichia stipitis* TISTR 5806 รวมทั้งศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

14.1 วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 การเตรียมตัวอย่าง

นำฟางข้าวมาตัดให้มีขนาดเล็ก และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 2 วัน จนแห้ง จากนั้นนำไปปั่นให้เป็นผงละเอียด เก็บไว้ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นที่ 2 การปรับสภาพ (Pretreatment) โดยการใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ

2.1 ศึกษากำลังไฟของคลื่นไมโครเวฟที่เหมาะสมในการปรับสภาพ

นำผงฟางข้าว 10 กรัม เติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนฟางข้าวต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 : 10) นำมาให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟต่างๆ ดังนี้ 80 240 และ 400 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางแยกส่วนของเหลวและกากออกจากกัน นำส่วนกากล้างด้วยน้ำสะอาด จนน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง จากนั้นนำส่วนกากอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมงจนแห้ง และนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับเอนไซม์ β - glucosidase บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกกำลังไฟที่ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำผงฟางข้าว 10 กรัม เติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น ร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนฟางข้าวต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 : 10) ให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 2.1 ทำการแปรผันเวลาที่ใช้คลื่นไมโครเวฟ ดังนี้ 1 2 และ 3 นาที กรองแยกส่วนของเหลวกับกากออกจากกันโดยใช้ผ้าขาวบาง นำส่วนกากมาล้างด้วยน้ำสะอาด จนน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง นำกากฟางข้าวไปอบตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จนแห้ง นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกเวลาที่เหมาะสมที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3 ศึกษาความเข้มข้นของด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟในการปรับสภาพ

นำผงฟางข้าว 10 กรัม เติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยแปรผันความเข้มข้น ดังนี้ ร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนฟางข้าวต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 : 10) จากนั้นให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 2.1 และใช้เวลาเหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในหัวข้อ 2.2 จากนั้นกรองแยกส่วนของเหลวกับกากออกจากกันโดยใช้ผ้าขางบาง นำส่วนกากล้างด้วยน้ำสะอาด จนน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จนแห้ง นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงมาใช้ในการหมัก

ขั้นที่ 3 การศึกษาการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500

นำไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟจำนวน 10 กรัม เติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของฟางข้าว เติมอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5 ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

ขั้นที่ 4 ศึกษากระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis*

4.1 การเตรียมหัวเชื้อ *S. cerevisiae*

ถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เจริญบนอาหาร YPD ซึ่งประกอบด้วยยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เปปโทน 20 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.0 ลงในอาหาร YPD broth เลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ โดยวางในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก (Yadav และคณะ, 2011)

4.2 การเตรียมหัวเชื้อ *P. stipitis*

ถ่ายเชื้อ *P. stipitis* ที่เจริญบนอาหาร MGYP (ประกอบด้วยมอลต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เปปโทน 20 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ไซโลส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.0) ลงในอาหาร MGYP broth ซึ่งน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศโดยวางในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก

4.3 กระบวนการหมักโดยเชื้อ *S.cerevisiae* และ *P.stipitis*

4.3.1 การหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae*

นำไฮโดรไลเสทที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์ เติมสารอาหารต่างๆ ดังนี้ ยีสต์สกัด เปปโทน แอมโมเนียมคลอไรด์ KH_2PO_4 ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.5H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, $FeCl_3.H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.05 ปรับพีเอชเป็น 5.5 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Pasha และคณะ, 2007) ทำให้เย็นเติมหัวเชื้อของ *S.cerevisiae* TISTR 5088 ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 4.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร หมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง รวมทั้งค่าพีเอชของน้ำหมัก

4.3.2 การหมักโดยเชื้อ *P. stipitis*

ทำการหมักเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.3.1 โดยใช้เชื้อ *P. stipitis* หมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้างต้น

ขั้นที่ 5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ขั้นที่ 6 สรุปผลการทดลองและการจัดทำรายงาน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว มาใช้ให้เป็นประโยชน์ โดยนำมาผลิตเป็นไบโอเอทานอลซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่สะอาดและช่วยลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังช่วยลดการนำเข้าเชื้อเพลิงประเภทน้ำมันดิบจากต่างประเทศได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอเอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือที่เรียกอีกชื่อว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) คือ สารอินทรีย์มีสูตรทางเคมี C_2H_5OH เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย (กนกวรรณ, 2547) มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง (เอทานอลบริสุทธ์ร้อยละ 99.8 มี ค่าออกเทนสูงถึง 113) โดยเอทานอลสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้ผลิตอาหาร หรือส่วนผสมของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิง เป็นต้น (เบญจมาภรณ์, 2553)

เอทานอลสามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยมีเอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมี โดยใช้พืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ (รัชพลและคณะ, 2556) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยมและมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีความพยายามพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสสูง เช่น ฟางข้าว ขี้เลื่อย หญ้า เป็นต้น (เบญจมาภรณ์, 2553)

การผลิตเอทานอลจากพืชผลทางการเกษตรมี 2 กระบวนการหลัก คือ กระบวนการหมัก (Fermentation) และกระบวนการกลั่น (Distillation) โดยกระบวนการหมัก หมายถึง ขั้นตอนการใช้ยีสต์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ หรือ เอทานอล ส่วนกระบวนการกลั่นคือ การนำเอทานอลที่ได้จากการหมักไปกลั่นที่ความดันบรรยากาศ จะทำให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 95.6 โดยปริมาตร แต่ถ้านำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง ต้องใช้เทคนิคอื่นๆ ช่วยแยกน้ำออกอีกครั้ง เพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร ซึ่งเรียกว่าเอทานอลบริสุทธิ์ (Absolute Alcohol) หรือ เอทานอลไร้น้ำ (Anhydrous Alcohol) (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557) สำหรับเอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่นำไปใช้ผสมน้ำมัน (Fuel Alcohol) ซึ่งสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 รูปแบบ คือ

1. เอทานอลร้อยละ 95 ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง เพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ใช้ได้กับเครื่องยนต์ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง บราซิลเป็นประเทศแรกที่มีการศึกษาวิจัยและเริ่มใช้เอทานอลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงตั้งแต่ปี 2516 สำหรับในเครื่องยนต์ดีเซลสามารถใช้เอทานอลบริสุทธ์ร้อยละ 95 ผสมในน้ำมันดีเซลเรียกว่า ดีโซฮอล์ (Diesohol) ในอัตราส่วนร้อยละ 15 และเพิ่มสารปรับปรุงคุณสมบัติบางตัวในปริมาณร้อยละ 1-2

2. เอทานอลร้อยละ 99.5 ผสมในน้ำมันเบนซินซึ่งจะเรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) โดยทั่วไปใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินอัตราส่วนร้อยละ 10 ในลักษณะของสารเติมแต่งเพื่อปรับปรุงค่าออกเทนของน้ำมันเบนซิน ซึ่งสามารถนำมาใช้งานกับเครื่องยนต์โดยทั่วไป ไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ ซึ่งบราซิลก็ใช้เอทานอลผสมในน้ำมันเบนซินที่อัตราส่วนร้อยละ 22

3. สารเคมีเพิ่มออกเทนแก่เครื่องยนต์ โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอลมาเป็นสาร ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่ง MTBE เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ (สำนักวิจัยเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, 2551) โดยค่าออกเทนจะเพิ่มขึ้นตามค่าสัดส่วนของเอทานอลที่ผสมในน้ำมันเบนซิน และเอทานอลนั้นยังช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่ไร้สารมลพิษ เช่น ซัลเฟอร์และมีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก ดังนั้นเมื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์จึงเกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่าเชื้อเพลิงทั่วไป ระบบเครื่องยนต์ที่ใช้เอทานอลจึงสะอาดกว่าเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซินหรือดีเซล

2.2 ชีวมวล

ชีวมวล คือ สารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งกักเก็บพลังงานจากธรรมชาติและสามารถนำมาใช้ผลิตพลังงานได้ ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้ได้มาจากพืชและสัตว์ต่างๆ เช่น เศษไม้ ขยะ และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การใช้ชีวมวลเพื่อทำให้ได้พลังงานอาจทำได้โดยนำมาเผาไหม้เพื่อนำพลังงานความร้อนที่ได้ไปใช้ในกระบวนการผลิตไฟฟ้าทดแทน เนื่องจากพลังงานจากฟอสซิลซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดและอาจหมดลงได้ โดยชีวมวลมีแหล่งที่มาต่างๆ กัน เช่น พืชผลทางการเกษตร เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ไม้และเศษไม้ หรือของเหลือจากอุตสาหกรรมและชุมชน (บูรณะศักดิ์, 2552) ตัวอย่างเช่น ชานอ้อยที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย กากมันสำปะหลังที่ได้จากการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ซังข้าวโพดที่ได้จากการสีข้าวโพดเพื่อนำเมล็ดออก เป็นต้น ซึ่งชีวมวลสามารถนำไปแปรรูปเป็นพลังงานในรูปแบบต่างๆได้ โดยเรียกพลังงานที่ได้จากชีวมวลชนิดต่างๆว่า “พลังงานชีวมวล” โดยกระบวนการแปรรูปชีวมวลไปเป็นพลังงานรูปแบบต่างๆ (สุพจน์ และคณะ, 2554) มีดังนี้

1. **การเผาไหม้โดยตรง (combustion)** คือ การนำชีวมวลมาเผา จะได้ความร้อนออกมาตามค่าความร้อนของชีวมวลแต่ละชนิด ซึ่งความร้อนที่ได้จากการเผาสามารถนำไปใช้ในการผลิตไอน้ำที่มีอุณหภูมิและความดันสูง และไอน้ำนี้จะถูกนำไปขับกังหันไอน้ำเพื่อผลิตไฟฟ้าต่อไป ตัวอย่างชีวมวลประเภทนี้ คือ เศษวัสดุทางการเกษตร และเศษไม้

2. **การผลิตก๊าซ (gasification)** เป็นกระบวนการเปลี่ยนเชื้อเพลิงแข็งหรือชีวมวลให้เป็นแก๊สเชื้อเพลิง เรียกว่า แก๊สชีวภาพ (biogas) ซึ่งมีองค์ประกอบของแก๊สมีเทน ไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ และสามารถนำไปใช้กับกังหันแก๊ส (gas turbine)

3. **การหมัก (fermentation)** เป็นการนำชีวมวลมาหมักด้วยแบคทีเรียในสภาวะไร้อากาศ โดยชีวมวลจะถูกย่อยสลายและแตกตัวเกิดเป็นแก๊สชีวภาพ (biogas) ที่มีแก๊สมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งแก๊สมีเทนสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์สำหรับผลิตกระแสไฟฟ้า

4. การผลิตเชื้อเพลิงเหลวจากพืช มีกระบวนการผลิตดังนี้

4.1 กระบวนการทางชีวภาพ โดยการย่อยสลายแป้ง น้ำตาล และเซลลูโลสจากพืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ให้เป็นเอทานอล เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์เบนซิน

4.2 กระบวนการทางฟิสิกส์และเคมี โดยการสกัดน้ำมันจากพืชน้ำมัน และนำน้ำมันที่ได้ไปผ่านกระบวนการ transesterification เพื่อนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซล (biodiesel)

4.3 กระบวนการใช้ความร้อนสูง เช่น กระบวนการไพโรไลสิส เมื่อเผาวัสดุทางการเกษตรในสภาวะไร้อากาศ จะเกิดการสลายตัวเกิดเป็นเชื้อเพลิงในรูปของเหลวและแก๊สผสม

2.3 วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ หรือวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) เป็นวัสดุที่มีอยู่ในธรรมชาติ ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินอยู่ภายในโครงสร้างของผนังเซลล์ (Lee และคณะ, 2008) โดยทั่วไปเป็นวัสดุที่เหลือตกค้างอยู่ในไร่นาหลังการเก็บเกี่ยว จำพวกส่วนของใบ ลำต้น และราก ตัวอย่างเช่น กากซานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด วัสดุเหลือทิ้งจากไม้ เป็นต้น ซึ่งวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเหล่านี้สามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนในรูปแบบเอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (รัชพล, 2558) การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล จำเป็นต้องนำมาผ่านขั้นตอนการปรับสภาพ (Pretreatment) เพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส ส่งผลให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ สามารถย่อยวัสดุได้ง่ายขึ้น และในส่วนของขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) เป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลในรูปแบบของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส เป็นต้น และขั้นตอนสุดท้ายคือ กระบวนการหมัก (Fermentation) เป็นขั้นตอนการนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพและการย่อยให้ได้เป็นน้ำตาล จากนั้นจึงใช้จุลทรีย์ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้เชื้อยีสต์ทำการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (รัชพลและคณะ, 2556)

2.4 กระบวนการปรับสภาพ (Pretreatment) วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนคุณสมบัติทางกายภาพคือ ทำให้ชั้นแมทริกซ์ของวัสดุลิกโนเซลลูโลสถูกทำลาย ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสให้สามารถทำงานได้ง่ายขึ้น ซึ่งกระบวนการปรับสภาพมีความสำคัญในการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความพรุนให้มากขึ้น โดยกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีหลักๆ (รัชพลและคณะ, 2556) ดังนี้

1. วิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment)

1.1 การใช้แรงทางกล (Mechanical communition) เป็นวิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลง โดยสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ การเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการลดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น ความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้น ซึ่งปกติขนาดของเศษวัตถุดิบจะทำให้มีขนาดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร (Sun และ Cheng, 2002)

1.2 การไพโรไลซิส (Pyrolysis) เป็นวิธีการอบที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ให้วัตถุดิบกลายสภาพเป็นแก๊สหรือของแข็ง แต่กระบวนการจะทำได้ช้าและการระเหยจะต่ำถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ

1.3 การใช้ความร้อน (Thermal heat treatment) เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลลูโลส ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะใช้อุณหภูมิมากกว่า 150-180 องศาเซลเซียส แต่ต้องทำให้วัสดุมีขนาดที่เล็กลงก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการย่อยวัตถุดิบทางความร้อน

2. วิธีการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

เป็นวิธีการที่ใช้จุลินทรีย์ในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสและยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ ซึ่งในการใช้จุลินทรีย์ในการปรับสภาพจะย่อยลิกนินรวมทั้งย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วย ส่วนเซลลูโลสจะถูกย่อยได้น้อยมาก เนื่องจากเซลลูโลสมีความต้านทานในการถูกจุลินทรีย์ย่อยได้มากกว่าส่วนอื่นๆ ของลิกโนเซลลูโลส ซึ่งในการปรับสภาพวิธีนี้จะใช้จุลินทรีย์ Brown, White, และ soft-rot fungi ในการปรับสภาพ

3. วิธีการทางเคมี (Chemical pretreatment)

3.1 การทำปฏิกิริยากับโอโซน (Ozonolysis) โอโซนเป็นตัวออกซิแดนซ์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถทำให้เกิดการแตกตัวของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุพวกฟางข้าวได้ วิธีนี้มีจุดเด่นคือ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินออกได้ดี ไม่มีสารพิษที่จะไปยับยั้งการทำปฏิกิริยาในส่วนต่างๆ และกระบวนการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ผลเสียของวิธีนี้คือ ต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงมาก (Sun และ Cheng, 2002)

3.2 การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ด่าง (Alkali pretreatment) การใช้ด่างในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีผลต่อวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส และผลของด่างที่ใช้ในกระบวนการแปลงสภาพจะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุนั้นด้วย (McMillan, 1994) โดยกลไกการทำงานของด่างนั้นจะไปเพิ่มการพองตัวภายในโมเลกุลของไซแลนในเฮมิเซลลูโลส และความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นเมื่อทำการกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อภายใน การใช้ด่างเจือจางในวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายใน เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยาทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส ลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ และสามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน อย่างไรก็ตาม การใช้ด่างเพื่อปรับสภาพมักจะไม่มีผลต่อวัสดุพวกไม้เนื้ออ่อนเท่าไม้เนื้อแข็ง โดยด่างที่นิยมใช้ในการแยกลิกนินได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Kim และคณะ, 2008)

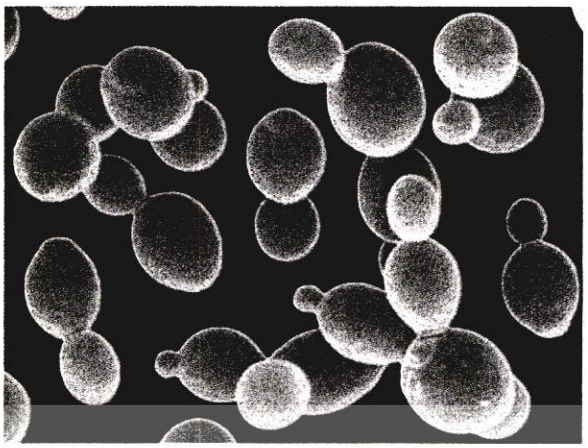
3.3 การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้กรด (Acid pretreatment) กระบวนการปรับสภาพโดยการใช้กรดนั้นมีจุดประสงค์เพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัสดุชีวมวล ชนิดของกรดที่นำมาปรับสภาพมีมากมายหลายประเภท ได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก ไนตริก หรือ ฟอสฟอริก ซึ่งในกระบวนการแปลงสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจางเพื่อเพิ่มการทำงานของกระบวนการไฮโดรไลซีส (Palmqvist และ Hahn-Hagerdal, 2002)

4. วิธีทางกายภาพร่วมกับทางเคมี (Physicochemical pretreatment)

เป็นการใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การใช้สารละลายเบสเจือจางและความร้อนภายใต้ความดันสูงในการปรับสภาพ ซึ่งประสิทธิภาพการย่อยสลายนั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายเบสและความร้อนที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงเพียงอย่างเดียว พบว่า อัตราการย่อยสลายลดลงเมื่อความร้อนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของน้ำตาลที่เกิดขึ้นเปลี่ยนเป็นสารประเภทเฟอร์ฟูรัล ฟอร์มัลดีไฮด์หรือกรดฟอร์มิก เป็นต้น ซึ่งเป็นตัวขัดขวางขั้นตอนการย่อยสลาย ชนิดของสารละลายเบสเจือจางที่นิยมใช้กัน เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุด สามารถกำจัดลิกนินได้ดี เนื่องจาก โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเบสแก่ ซึ่งในบางครั้งโซเดียมไฮดรอกไซด์ไม่ได้กำจัดลิกนินออกไปเพียงอย่างเดียว แต่อาจทำลายเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสบางส่วนออกไปด้วย ดังนั้น การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิและ เวลาที่เหมาะสมกับพืชชนิดนั้น ๆ ผลผลิตที่ได้จึงจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด (Wang และคณะ, 2010) เบสอีกชนิดหนึ่ง คือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ไม่น้อยไปกว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่เนื่องจากแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นเบสอ่อน จึงต้องใช้เวลาในการกำจัดลิกนินนานกว่าเล็กน้อย แต่ปัญหาที่พบจากการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์คือ การกำจัดลิกนินออกไม่หมด และอาจมีกลิ่นของแก๊สแอมโมเนียที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายลิกนิน (Gupta และ Lee, 2010) และโซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้น้อยที่สุด แต่เป็นสารที่กำจัดลิกนินได้ดีที่สุด โดยโซเดียมซัลไฟด์จะมีความจำเพาะกับลิกนินเท่านั้น ซึ่งไม่มีผลต่อเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส และสาเหตุที่ไม่นิยมใช้โซเดียมซัลไฟด์อาจเนื่องมาจากกลิ่นของแก๊สไข่เน่าที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายลิกนิน แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีการใช้โซเดียมซัลไฟด์ในระดับอุตสาหกรรมที่จำเป็นต้องกำจัดลิกนินออกเท่านั้น เช่น อุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษในหลายบริษัท เป็นต้น

2.5 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปจำเป็นต้องอาศัยยีสต์ในกระบวนการหมักเอทานอล และยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสายพันธุ์หลักที่เกี่ยวข้อง และมีความสำคัญในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก *S. cerevisiae* เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มีความทนต่อเอทานอลและให้ผลผลิตเอทานอลปริมาณสูง (วราวุฒิ, 2538)



รูปที่ 2.1 เซลล์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*
ที่มา : http://scientistlive.com/content/19429 สืบค้นวันที่ 28 เม.ย. 2558

ซึ่งการทำงานของยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล เกิดขึ้นในระดับเซลล์และมีการปลดปล่อยเอทานอลออกมาภายนอกเซลล์ตามทฤษฎีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้เอทานอลร้อยละ 51.1 และส่วนที่เหลือร้อยละ 48.9 เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการที่ (1)

$$(C_6H_{12}O_5)n + n\,H_2O \rightarrow n\,C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2n\,CH_3CH_2OH + 2n\,CO_2 \text{ ----- (1)}$$

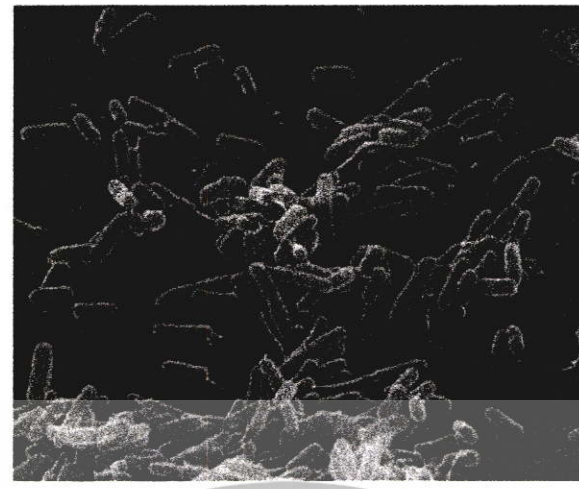
(แป้ง) (น้ำตาล) (เอทานอล)

ในทางปฏิบัติมีน้ำตาลประมาณร้อยละ 95 เท่านั้นที่เปลี่ยนเป็นเอทานอล ส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างสารอื่นได้แก่ อะซิตัลดีไฮด์ร้อยละ 0-0.03 กรดอะซิติกร้อยละ 0.05-0.25 กลีเซอรีนร้อยละ 2.50-3.60 กรดแลกติกร้อยละ 0-0.20 กรดซักซินิกร้อยละ 0.50-0.77 และฟูเซลออยล์ร้อยละ 0.25-0.50 (วรลักษณ์, 2556) ในการทำงานของยีสต์ในการหมักเอทานอลจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ โดยยีสต์จะใช้กลูโคสส่วนใหญ่ในการผลิตเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์และได้พลังงานในรูป ATP ซึ่งขั้นตอนนี้ เรียกว่า ethanol fermentataion ดังสมการที่ (2) ส่วนในสภาพที่มีออกซิเจน ยีสต์จะใช้กลูโคสส่วนใหญ่ในการเจริญและผลิตเซลล์ได้พลังงานในรูป ATP ขั้นตอนนี้เรียกว่า respiration ดังสมการที่ (3)

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + CO_2 + (2ATP) \text{ ----- (2)}$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 6H_2O + 6CO_2 + (38ATP) \text{ ----- (3)}$$

นอกจากจะใช้ยีสต์ในการผลิตเอทานอลแล้วยังสามารถใช้แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้สูงกว่ายีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม



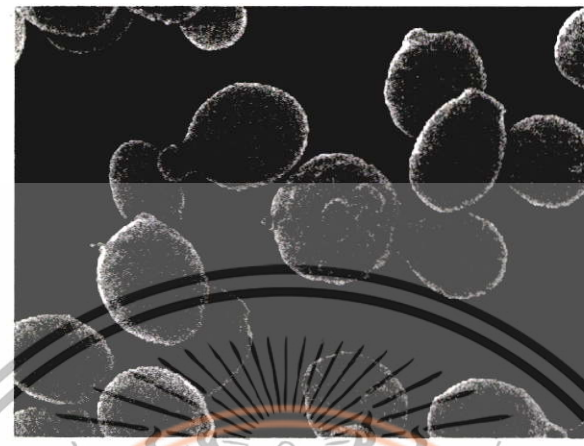
รูปที่ 2.2 เซลล์ของเชื้อ *Zymomonas mobilis*
ที่มา : http://aragec.com/zymomonas.html สืบค้นวันที่ 28 เม.ย. 2558

เมื่อทำการเปรียบเทียบจุลินทรีย์สองชนิดนี้ พบว่า *Z. mobilis* ให้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) สูงกว่า และ ผลผลิตเซลล์ (biomass yield) ต่ำกว่ายีสต์ มีอัตราการใช้น้ำตาลจำเพาะ (specific glucose consumption rate) และอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะ (specific ethanol production rate) สูงกว่ายีสต์ประมาณ 3 - 4 เท่า *Z. mobilis* สามารถให้ปริมาณผลิตผล (ethanol productivity) สูงถึง 120 - 200 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในกระบวนการหมักต่อเนื่องแบบดึงเซลล์ย้อนกลับ (cell recyclesystem) ขณะที่ยีสต์ให้ปริมาณผลิตผลเพียง 30 - 40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ *Z. mobilis* สามารถทนต่อเอทานอลได้สูงถึงร้อยละ 16 โดยปริมาตร ซึ่งยีสต์สามารถทนได้สูงเพียงร้อยละ 12 โดยปริมาตร แต่สำหรับการการนำ *Z. mobilis* ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม พบว่า ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก เนื่องจาก *Z. mobilis* ใช้น้ำตาลได้จำกัดเพียง 3 ชนิดเท่านั้น คือ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส นอกจากนี้ในการเจริญของ *Z. mobilis* ยังต้องการสารอาหารที่มีความซับซ้อนสูง เพราะจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสังเคราะห์แบบง่าย กล่าวคือ *Z. mobilis* ต้องการแหล่งไนโตรเจนทั้งในรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจน รวมถึงกรดอะมิโน แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ โดยเฉพาะ calcium pantothenate สารอาหารต่างๆ เหล่านี้มีอยู่ใน yeast extract และ peptone ซึ่งเป็นแหล่งอาหารดั้งเดิมที่ใช้เลี้ยง *Z. mobilis* แต่ yeast extract เป็นสารสกัดที่มีราคาสูง สามารถใช้ได้ในระดับการทดลองเท่านั้น จึงเป็นข้อจำกัดในการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้ *Z. mobilis* ในระดับอุตสาหกรรม (สุดารัตน์ และคณะ, 2547)

2.6 คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ *Pichia stipitis*

เนื่องจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีข้อจำกัดในการใช้น้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอมที่ได้จากเฮมิเซลลูโลส (ประเวทย์ และคณะ, 2552) แต่มียีสต์บางชนิด เช่น *Pichia stipitis* เป็นยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลจากไซโลส น้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอมได้ และ *Pichia Stipitis* ไม่สามารถทน

ต่อปริมาณแอลกอฮอล์สูงได้ รวมถึงสารพิษต่างๆ ที่อาจจะปนเปื้อนเข้ามาจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร (อภิชญา และคณะ, 2558) ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีปริมาณไม่เพียงพอที่จะนำไปพัฒนาหรือเพิ่มระดับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม



รูปที่ 2.3 เซลล์ของเชื้อ *Pichia stipitis*

ที่มา : http://www.contracosta.edu สืบค้นวันที่ 28 เม.ย. 2558

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806

3.2 สารเคมี

3.2.1 Glucose หรือ Dextrose
3.2.2 Agar
3.2.3 Yeast extract
3.2.4 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)
3.2.5 Sodium hydroxide
3.2.6 Absolute ethyl alcohol (C_2H_5OH)
3.2.7 เอนไซม์ ACCELLERASE 1500
3.2.8 Acetic acid
3.2.9 Sodium acetate
3.2.10 Peptone
3.2.11 Ammonium chloride (NH_4Cl)
3.2.12 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
3.2.13 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)
3.2.14 Manganese sulfate pentahydrate ($MnSO_4.5H_2O$)
3.2.15 Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)
3.2.16 Zinc sulphate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) รุ่น GC-17A ยี่ห้อ Shimadzu
3.3.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench) รุ่น BVT123 ยี่ห้อ Issco
3.3.3 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Polar1000/Orbit1900 ยี่ห้อ Contherm/Labnet
3.3.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge) รุ่น Z383K ยี่ห้อ Hermle
3.3.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Helios Gramma ยี่ห้อ Thermo Electron Corporation
3.3.6 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น Starter 3000 ยี่ห้อ Ohaus
3.3.7 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG5002 ยี่ห้อ Mettler Toledo
3.3.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น SI-234 ยี่ห้อ Denver Instrument
3.3.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น WNB 45 ยี่ห้อ Memmert
3.3.10 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น ES-315 ยี่ห้อ Tomy

3.3.11 ตู้อบแห้ง (Hot Air Oven) รุ่น Modell 600 ยี่ห้อ Memmert

3.3.12 ตู้เย็น

3.3.13 โถดูดความชื้น (Desiccator)

3.3.14 เครื่องแก้ว (ฟลากส์ หลอดทดลอง กรวย บีกเกอร์ ฯลฯ)

3.3.15 อุปกรณ์วัดปริมาตร (ปิเปต ไมโครปิเปต กระบอกตวง ฯลฯ)

3.3.16 ลวดเขี่ยเชื้อ

3.3.17 จุกยางปิดฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.3.18 หลอดเก็บตัวอย่าง

3.4 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัดฟางข้าวให้มีขนาดเล็ก และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1-2 วัน จนแห้ง จากนั้นปั่นฟางข้าวพอหยาบเพื่อให้มีขนาดเล็กลง ให้ได้น้ำหนักแห้งประมาณ 3 กิโลกรัม เก็บฟางข้าวในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ (Pretreatment)

ก่อนกระบวนการหมัก เนื่องจากวัสดุที่นำมาใช้เป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส จึงต้องทำการปรับสภาพให้เหมาะสมก่อนนำไปใช้ในกระบวนการหมัก โดยแบ่งเป็น 3 กระบวนการ ดังนี้

3.4.2.1 ศึกษากำลังไฟที่เหมาะสมในการปรับสภาพ

นำฟางข้าวที่ได้จากการปั่นจำนวน 10 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วนฟางข้าวต่อสารละลาย 1:10) จากนั้นทำการให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟต่างๆ ดังนี้ 80 240 400 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการกรองแยกส่วนของเหลวกับกากออกจากกัน โดยใช้ผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำส่วนกากมาล้างด้วยน้ำสะอาด จนน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง จากนั้นนำกากฟางข้าวไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนแห้ง นำมาบดให้ละเอียด และนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงและนำส่วนของเหลวที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS (Miller, 1959) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกกำลังไฟที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.2.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำฟางข้าวที่ได้จากการปั่นจำนวน 10 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ควาเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วนฟางข้าวต่อสารละลาย 1:10) จากนั้นทำการให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ กำลังไฟที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.2.1 ทำการแปรผันเวลาในการใช้คลื่นไมโครเวฟ ดังนี้ 1 1.5 2 และ 2.5 นาที กรองแยกส่วนของเหลวกับกากออกจากกัน โดยใช้ผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำส่วนกากมาล้างด้วยน้ำสะอาด จนน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนแห้ง นำมาบดให้ละเอียด และนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงและนำของเหลวที่ได้มา

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS (Miller, 1959) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกเวลาที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟในการปรับสภาพ

นำฟางข้าวที่ได้จากการปั่นจำนวน 10 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ซึ่งทำการแปรผันความเข้มข้น ดังนี้ ร้อยละ 1 2 และ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วนฟางข้าวต่อสารละลาย 1:10) จากนั้นให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.2.1 และใช้เวลาที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.2.2 จากนั้นทำการกรองแยกส่วนของเหลวกับกากออกจากกัน โดยใช้ผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำส่วนกากมาล้างด้วยน้ำสะอาด จนน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนแห้ง นำมาบดให้ละเอียด และนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงและนำของเหลวที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS (Miller, 1959) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงมาใช้ในการศึกษาต่อในกระบวนการหมัก

3.4.3 การศึกษาการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (Enzymatic Hydrolysis)

นำตัวอย่างฟางข้าวส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟจำนวน 10 กรัม เติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของฟางข้าว เติมอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5 ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำของเหลวส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส (ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส) ในส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ

นำฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ และอบแห้ง ส่งวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส (ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส) โดยทำการวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF) และ Acid Detergent Lignin (ADL) (Van Soest และคณะ, 1991) ที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส)

นำตัวอย่างของไฮโดรไลเสทของเหลวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น และไฮโดรไลเสทส่วนของเหลวผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟและย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ส่งวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4.6 ศึกษากระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และ *Pichia stipitis* TISTR 5806

3.4.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เจริญบนอาหาร YPD (ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เปปโทน 20 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 25 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.0) ลงในอาหาร YPD broth ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ โดยวางในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก (Yadav และคณะ, 2011)

3.4.6.2 การเตรียมหัวเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806

ถ่ายเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 ที่เจริญบนอาหาร MGYP (ประกอบด้วย มอลต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เปปโทน 20 กรัมต่อลิตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ไซโลส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 25 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.0) ลงในอาหาร MGYP broth ซึ่งมีน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศโดยวางในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก (Yadav และคณะ, 2011)

3.4.6.3 กระบวนการหมักโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และ *Pichia stipitis* TISTR 5806

3.4.6.3.1 การหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088

นำไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ปรับพีเอชเป็น 5.5 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที (Pasha และคณะ, 2007) ทำให้อาหารเย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.4.6.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร หมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้ง รวมทั้งค่าพีเอช

3.4.6.3.2 การหมักโดยเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806

ทำการหมักเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.4.6.3.1 โดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806

3.4.6.4 กระบวนการหมักโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และ *Pichia stipitis* TISTR 5806 ที่เติมสารอาหารในไฮโดรไลเสท

3.4.6.4.1 การหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เติมสารอาหารในไฮโดรไลเสท

นำไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ เติมสารอาหารต่างๆ ดังนี้ ยีสต์สกัด เปปโทน แอมโมเนียมคลอไรด์ KH_2PO_4 ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.5H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.05 ปรับพีเอชเป็น 5.5 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที (Pasha และคณะ, 2007) ทำให้อาหารเย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อของ *S. cerevisiae*

ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.4.6.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร หมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้ง รวมทั้งค่าพีเอช

3.4.6.4.2 การหมักโดยเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 ที่เติมสารอาหารในไฮโดรไลเสท

ทำการหมักเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.4.6.4.1 โดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806

3.4.7 การวิเคราะห์ผล

3.4.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

การทำกราฟมาตรฐาน โดยนำกลูโคสมาตรฐานไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปใส่ในดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบแห้ง 0.1 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 100 200 400 600 800 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และเติมสารละลายดีเอ็น (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และรอให้เย็น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของกลูโคส

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างน้ำหมักที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำของเหลวส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางที่เหมาะสม และทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS) เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

3.4.7.2 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 8 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวส่วนใสวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ส่วนตะกอนเซลล์ที่ได้นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาใส่ในโถดูดความชื้น (Desiccator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อปริมาตรตัวอย่างน้ำหมัก 8 มิลลิลิตร และเปรียบเทียบในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.4.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

นำของเหลวส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดเป็นชนิด Flame Ionization Detector (FID)

3.4.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

นำของเหลวส่วนใสที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ BP-800

Ca^{++} (24267) เส้นผ่านศูนย์กลาง 300 x 7.8 มิลลิเมตร ตัวตรวจวัดชนิด refractive index detector (RI Detector) อุณหภูมิภายในตัวตรวจวัด 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

3.4.7.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษากำลังไฟที่เหมาะสมในการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับสภาพฟางข้าว

จากการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟต่างๆ ดังนี้ 80 240 และ 400 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของฟางข้าวและทำการย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการศึกษาพบว่า กำลังไฟ 80 วัตต์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดเท่ากับ 17.88 ± 3.39 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กำลังไฟ 240 วัตต์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 22.56 ± 3.19 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้กำลังไฟ 400 วัตต์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 27.41 ± 5.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่กำลังไฟ 400 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้กำลังไฟ 240 วัตต์ แสดงดังตารางที่ 4.1 ดังนั้น จึงเลือกกำลังไฟ 240 วัตต์มาใช้ในการศึกษาต่อไป การศึกษาของ Azuma และคณะ (1984), Ooshima และคณะ (1984) กล่าวว่าการใช้รังสีไมโครเวฟเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยชีวมวล Palav และ Seetharaman (2006) พบว่า โมเลกุลที่มีขั้ว เช่น น้ำหรือไอออน จะดูดซับพลังงานของคลื่นไมโครเวฟและเปลี่ยนเป็นกระแสไฟฟ้า ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วนั้นเป็นสาเหตุให้โมเลกุลเกิดการเสียดสีกันและเกิดการปล่อยความร้อนออกมาและทำลายพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุลของสาร และจากการศึกษาของ Toledano และคณะ (2010) พบว่า การปรับสภาพด้วยด่างเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อนและมีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในกระบวนการย่อย ซึ่งการปรับสภาพโดยวิธีนี้จะช่วยเพิ่มปริมาณของเซลลูโลสและความพรุนในวัตถุดิบ

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากไฮโดรไลเสทส่วนกากหลังผ่านการปรับสภาพฟางข้าวโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟต่างๆ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

กำลังไฟที่ใช้ในการปรับสภาพ (วัตต์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
80	17.88 ± 3.39^{b}
240	22.56 ± 3.19^{ab}
400	27.41 ± 5.14^{a}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.2 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับสภาพฟางข้าว

จากการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลาดังนี้ 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 นาที นำส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของฟางข้าว และทำการย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ จากการศึกษาพบว่า เวลา 1 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 16.88 ± 1.66 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เวลา 1.5 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 18.17 ± 0.73 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เวลา 2 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.56 ± 1.25 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้เวลา 2.5 นาทีให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 24.54 ± 0.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่กำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2.5 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้เวลา 2.0 นาที ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.2 จึงเลือกเวลา 2 นาทีมาใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากไฮโดรไลเสทส่วนกากหลังผ่านการปรับสภาพฟางข้าวโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ ที่เวลาต่างๆ และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
1.0	16.88 ± 1.66[b]
1.5	18.17 ± 0.73[b]
2.0	23.56 ± 1.25[a]
2.5	24.54 ± 0.22[a]

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟในการปรับสภาพฟางข้าว

จากการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ดังนี้ ร้อยละ 1.0 2.0 และ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของฟางข้าวและทำการย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1.0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 15.33 ± 0.91 กรัมต่อลิตร ความ

เข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2.0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20.58 ± 0.22 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 23.33 ± 1.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.3 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1.0 และ 2.0 ดังนั้น จึงเลือกสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 มาใช้ปรับสภาพฟางข้าวในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากไฮโดรไลเสทส่วนกากหลังผ่านการปรับสภาพฟางข้าวโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
1.0	15.33 ± 0.91^{c}
2.0	20.58 ± 0.22^{b}
5.0	23.33 ± 1.80^{a}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.4 ผลการศึกษาปริมาณลิกโนเซลลูโลส (ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส) ในฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและปรับสภาพ

จากการนำฟางข้าวอบแห้งและฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 น้ำหนักโดยปริมาตร ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และนำส่วนของฟางข้าวที่กรองได้มาล้างด้วยน้ำสะอาดจนน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง นำกากฟางข้าวไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส พบว่า ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ปริมาณลิกนิน 3.59 เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 43.84 19.92 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ให้ปริมาณลิกนิน 3.32 เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 60.66 20.74 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.4 ซึ่งการทดลองของ Singh และคณะ (2010) พบว่าในฟางข้าวมีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 38 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 26 และลิกนิน ร้อยละ 7 ซึ่งปริมาณองค์ประกอบที่แตกต่างกันในตัวอย่างของฟางข้าวเนื่องมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ ภูมิประเทศ ฤดูกาล สารอาหารในแหล่งน้ำและเวลาในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน และจากการศึกษาเพิ่มเติมของ Ma และคณะ (2009) พบว่าในฟางข้าวมีปริมาณ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินร้อยละ 33.4 16.2 2.1 ตามลำดับ เมื่อทำการปรับสภาพโดยใช้ไมโครเวฟกำลังไฟ 680 วัตต์ เป็นเวลา 24 นาที พบว่า เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมี

ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 41.8 และ 23.6 ตามลำดับ ในทางกลับกันลิกนินมีปริมาณเหลือร้อยละ 1.9 ซึ่งการเพิ่มขึ้นของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และการลดลงของลิกนินแสดงให้เห็นถึงการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟจะทำลายโครงสร้างของลิกนินและเพิ่มพื้นที่ผิวของเซลลูโลส

ตารางที่ 4.4 ปริมาณลิกโนเซลลูโลโลสในฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที

ตัวอย่างฟางข้าว	ลิกนิน (ร้อยละ)	เซลลูโลส (ร้อยละ)	เฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ)
ฟางข้าวไม่ผ่านการปรับสภาพ	3.59	43.84	19.92
ฟางข้าวผ่านการปรับสภาพ	3.32	60.66	20.74

4.5 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส) ในส่วนน้ำของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ

จากการนำฟางข้าวปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นแทนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0 และปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 นำส่วนของเหลวส่งวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ได้แก่ กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 0.72 เป็นกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนสร้อยละ 0.60 0.12 และ 0.00 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.5 สำหรับตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 2.67 เป็นกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนสร้อยละ 1.47 0.55 และ 0.65 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในส่วนน้ำของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ) โดยปริมาตร	น้ำตาลทั้งหมด (ร้อยละ)	กลูโคส (ร้อยละ)	ไซโลส (ร้อยละ)	อะราบิโนส (ร้อยละ)
0.0*	0.72	0.60	0.12	0.00
5.0	2.67	1.47	0.55	0.65

หมายเหตุ :* ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0

4.6 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอล

4.6.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพ

ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟและย่อยด้วยเอนไซม์

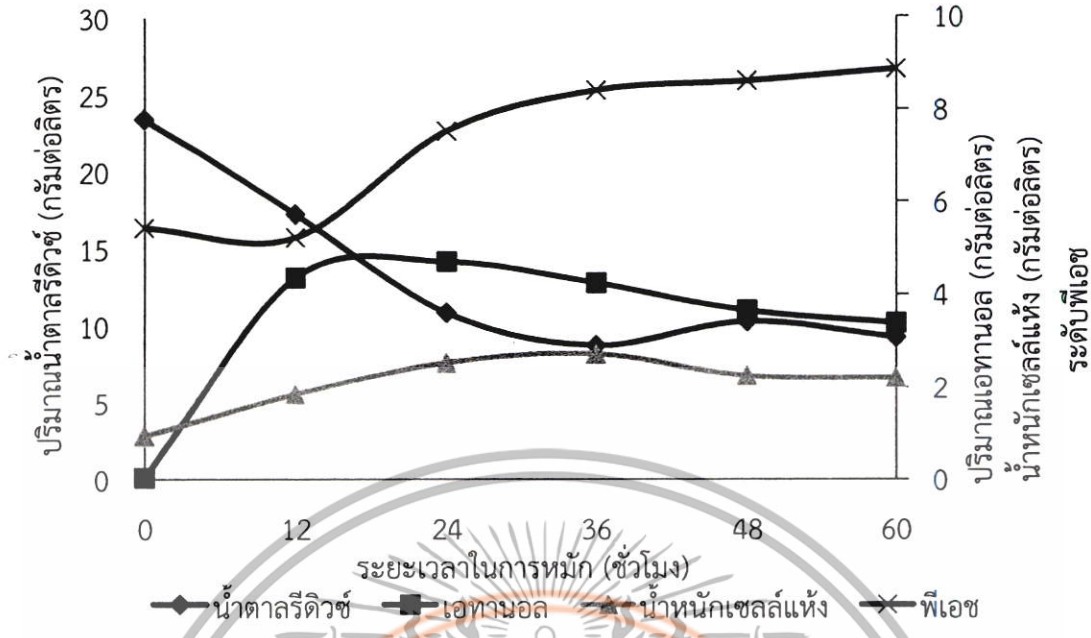
การศึกษากระบวนการหมักโดยในไฮโดรไลเสทส่วนกาก ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีและนำมาหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลและค่าพีเอชของน้ำหมัก ส่วนตะกอนเซลล์นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง จากการศึกษาพบว่า ไฮโดรไลเสทส่วนกากที่หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีการเจริญของเชื้อสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.71 ± 0.06 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจะลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในไฮโดรไลเสทเท่ากับ 23.33 ± 1.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 9.22 ± 1.33 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 0-12 โดยปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 4.70 ± 0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเอทานอลสูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับปริมาณเอทานอลที่ชั่วโมงที่ 0 12 36 48 และ 60 ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ระดับพีเอช
0	23.33 ± 1.80^{a}	0.92 ± 0.03^{e}	0.02 ± 0.00^{d}	5.43 ± 0.00^{e}
12	17.17 ± 1.40^{b}	1.83 ± 0.13^{d}	4.35 ± 0.14^{b}	5.22 ± 0.02^{f}
24	10.80 ± 0.74^{c}	2.52 ± 0.08^{b}	4.70 ± 0.01^{a}	7.52 ± 0.04^{d}
36	8.70 ± 0.63^{c}	2.71 ± 0.06^{a}	4.24 ± 0.08^{b}	8.40 ± 0.00^{c}
48	10.23 ± 0.18^{c}	2.24 ± 0.00^{c}	3.65 ± 0.32^{c}	8.60 ± 0.01^{b}
60	9.22 ± 1.33^{c}	2.20 ± 0.01^{c}	3.38 ± 0.07^{c}	8.86 ± 0.04^{a}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



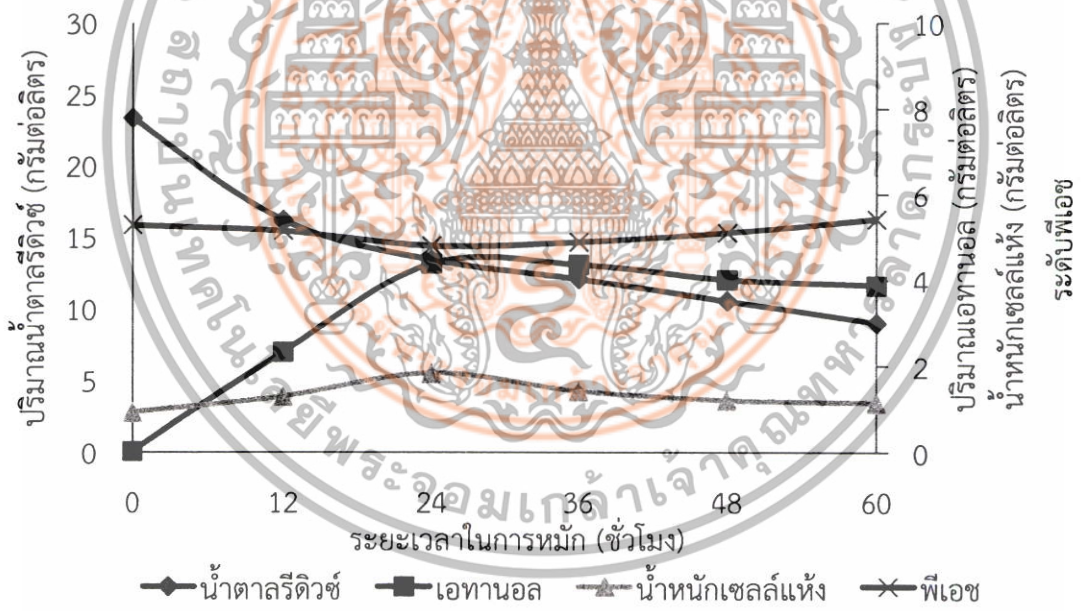
รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และระดับพีเอช ในระหว่างกระบวนการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

ไฮโดรไลเสทส่วนกากที่หมักด้วยเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 มีการเจริญของเชื้อสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.83 ± 0.04 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในไฮโดรไลเสทเท่ากับ 23.33 ± 1.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 12 และลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 8.99 ± 0.95 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 0-24 โดยปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 4.37 ± 0.17 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลค่อนข้างคงที่และลดลงเล็กน้อย เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ชั่วโมงที่ 24 และ 36 มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 ในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ระดับพีเอช
0	23.33 ± 1.80^{a}	0.93 ± 0.05^{e}	0.02 ± 0.00^{d}	5.27 ± 0.00^{a}
12	16.16 ± 0.35^{b}	1.30 ± 0.04^{bc}	2.32 ± 0.00^{c}	5.13 ± 0.00^{ab}
24	13.38 ± 1.00^{c}	1.83 ± 0.08^{a}	4.37 ± 0.17^{a}	4.78 ± 0.02^{d}
36	12.04 ± 0.45^{c}	1.42 ± 0.13^{b}	4.35 ± 0.23^{a}	4.87 ± 0.01^{d}
48	10.52 ± 0.45^{cd}	1.21 ± 0.00^{cd}	4.00 ± 0.01^{b}	5.09 ± 0.03^{b}
60	8.99 ± 0.95^{d}	1.15 ± 0.04^{d}	3.37 ± 0.12^{b}	5.41 ± 0.23^{a}

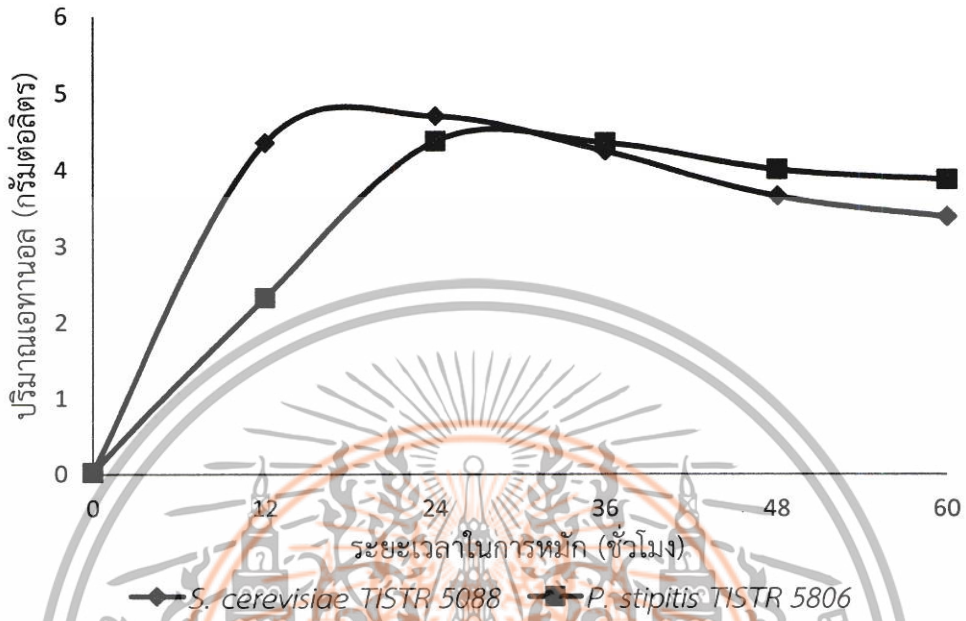
หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และระดับพีเอช ในระหว่างกระบวนการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

จากการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 พบว่า เชื้อ *S.cerevisiae* TISTR 5088 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงกว่าเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 ดังแสดงในรูป 4.3 และ

จากการศึกษาเพิ่มเติมของ Yadav และคณะ (2011) พบว่า เชื้อ *S. cerivisiae* จะไม่สามารถใช้น้ำตาลเพนโตสเพื่อผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่ยีสต์บางชนิด เช่น *P. stipitis* จะสามารถใช้น้ำตาลเพนโตสและน้ำตาลเฮกโซสที่สำคัญได้ แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถทนต่อเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงได้



รูปที่ 4.3 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

4.6.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพด้วย

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟและย่อยด้วยเอนไซม์ มีการเติมสารอาหารในไฮโดรไลเสทที่ได้

การศึกษากระบวนการหมักโดยนำไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้มาเติมสารอาหารต่างๆ ดังนี้ ยีสต์สกัด เปปโทน แอมโมเนียมคลอไรด์ KH_2PO_4 ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) $MgSO_4.7H_2O$ $MnSO_4.5H_2O$ $CaCl_2.2H_2O$ $FeCl_3.H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.05 ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีและนำมาหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลและค่าพีเอชของน้ำหมัก ส่วนตะกอนเซลล์นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง จากการศึกษาพบว่า ไฮโดรไลเสทส่วนกากที่หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีการเจริญของเชื้อสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 60 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.31 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในไฮโดรไลเสทเท่ากับ 23.33 ± 1.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นปริมาณ

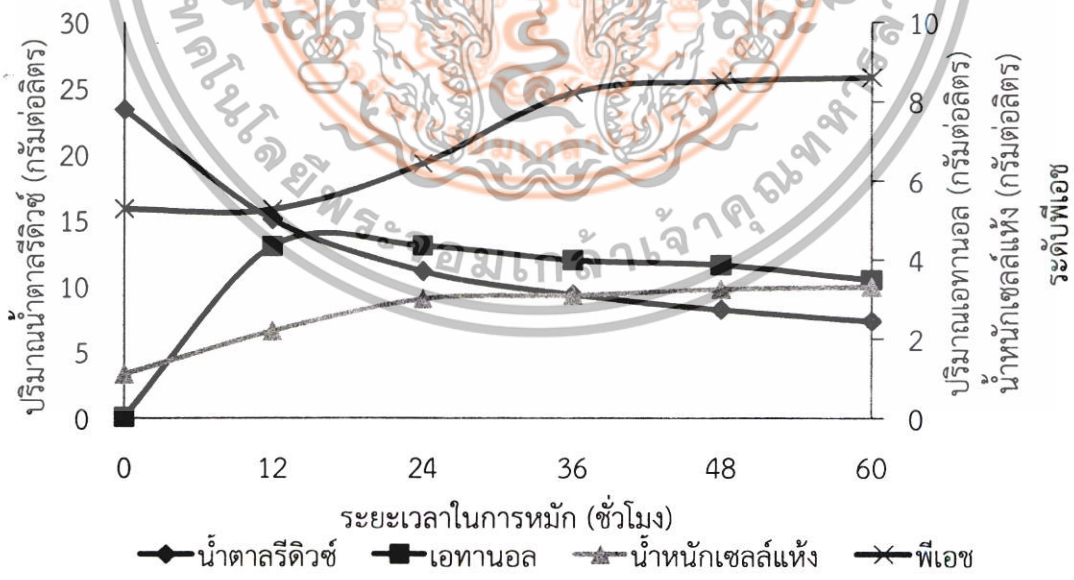
น้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 7.30 ± 0.35 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 0-24 โดยปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 4.34 ± 0.06 กรัมต่อลิตร เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระยะเวลาการหมักชั่วโมง 12 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่แตกต่างทางสถิติที่ชั่วโมง 36 48 และ 60 อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.8 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 มีการเติมสารอาหาร

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ระดับพีเอช
0	23.33 ± 1.80^{a}	1.09 ± 0.00^{e}	0.02 ± 0.00^{d}	5.27 ± 0.00^{a}
12	15.02 ± 0.35^{b}	2.19 ± 0.13^{d}	4.33 ± 0.11^{a}	5.26 ± 0.00^{d}
24	11.10 ± 0.27^{c}	3.00 ± 0.10^{c}	4.34 ± 0.06^{a}	6.42 ± 0.05^{c}
36	9.33 ± 0.55^{cd}	3.09 ± 0.01^{bc}	3.98 ± 0.25^{b}	8.20 ± 0.06^{b}
48	8.17 ± 0.30^{de}	3.25 ± 0.05^{ab}	3.86 ± 0.34^{b}	8.50 ± 0.02^{a}
60	7.30 ± 0.35^{e}	3.31 ± 0.16^{a}	3.49 ± 0.11^{c}	8.60 ± 0.02^{a}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และระดับพีเอช ในระหว่างกระบวนการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 มีการเติมสารอาหาร หมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

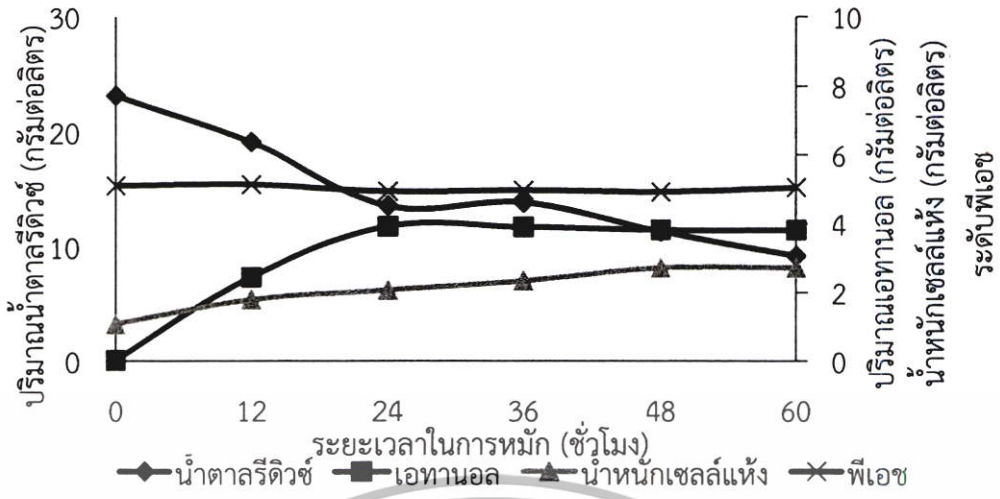
ไฮโดรไลเสทส่วนกากที่หมักด้วยเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 มีการเจริญของเชื้อสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.71 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในไฮโดรไลเสทเท่ากับ 23.16 ± 1.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 9.18 ± 0.85 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 0-24 โดยปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 3.92 ± 0.31 กรัมต่อลิตร เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ชั่วโมงที่ 24 36 48 และ 60 มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.5

จากการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่า เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดคือ 4.34 ± 0.06 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 ขณที่ *P. stipitis* TISTR 5806 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 3.92 ± 0.31 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูป 4.6

ตารางที่ 4.9 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 ในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 มีการเติมสารอาหาร

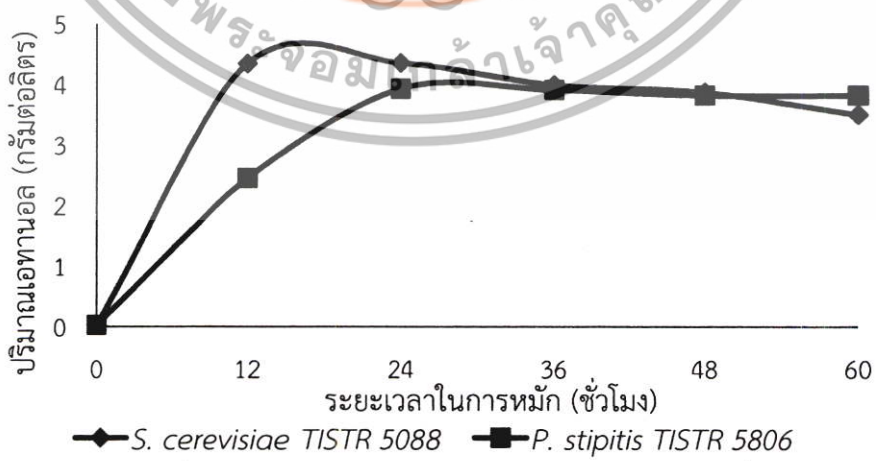
ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ระดับพีเอช
0	23.16 ± 1.80^{a}	1.07 ± 0.05^{e}	0.02 ± 0.00^{c}	5.10 ± 0.01^{a}
12	19.11 ± 0.52^{b}	1.78 ± 0.04^{d}	2.44 ± 0.11^{b}	5.13 ± 0.01^{a}
24	13.53 ± 1.43^{c}	2.06 ± 0.08^{c}	3.92 ± 0.31^{a}	4.93 ± 0.00^{cd}
36	13.83 ± 0.50^{c}	2.33 ± 0.01^{b}	3.90 ± 0.08^{a}	4.96 ± 0.02^{c}
48	11.30 ± 1.16^{d}	2.71 ± 0.07^{a}	3.81 ± 0.62^{a}	4.91 ± 0.01^{d}
60	9.18 ± 0.85^{e}	2.71 ± 0.05^{a}	3.81 ± 0.02^{a}	5.04 ± 0.01^{b}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และระดับพีเอช ในระหว่างกระบวนการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 และเติมสารอาหาร โดยใช้เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

จากการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังไฟ 240 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ที่เติมสารอาหาร พบว่า เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงกว่าเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารอาหารและไม่เติมสารอาหารในไฮโดรไลเสทที่ได้ พบว่า จากการหมักทั้งสองเชื้อ การเติมอาหารในไฮโดรไลเสททำให้เชื้อทั้งสอง มีการเจริญได้มากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากน้ำหนักแห้งของเซลล์จะเพิ่มขึ้น แต่ไม่ได้ทำให้ปริมาณ เอทานอลเพิ่มขึ้นนั้นแสดงว่าทั้ง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 ใช้สารอาหารที่เติมลงในไฮโดรไลเสทเพื่อการเจริญเติบโตมากกว่าใช้ในการผลิตเอทานอล



รูปที่ 4.6 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่เติมสารอาหารที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

4.6.3 ผลการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลในไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806

จากการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักในไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอลในอาหารไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 โดยคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลจากไฮโดรไลเสทส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยฟางข้าวด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 กำลังไฟ 240 วัตต์เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806

ค่าจลนพลศาสตร์	ไฮโดรไลเซทส่วนของกากจากการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์			
	S. cerevisiae TISTR 5088		*P. stipitis* TISTR 5806	
	ไม่เติมสารอาหาร	เติมสารอาหาร	ไม่เติมสารอาหาร	เติมสารอาหาร
$Y_{x/s}$	0.15	0.13	0.05	0.18
$Y_{p/s}$	0.38	0.36	0.46	0.42
Q_x	0.08	0.09	0.03	0.06
Q_p	0.20	0.18	0.18	0.16

หมายเหตุ : $Y_{x/s}$ คือ ค่าผลได้ของมวลชีวภาพต่อสับสเตรท (กรัมต่อกรัม)
$Y_{p/s}$ คือ ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรท (กรัมต่อกรัม)
Q_x คือ อัตราการผลิตมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
Q_p คือ อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟพบว่า การปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้กำลังไฟ 240 วัตต์ ร่วมกับการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 นาทีให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง

เมื่อนำไฮโดรไลเสทส่วนกากของฟางข้าวที่ปรับสภาพในสภาวะที่เหมาะสมย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไฮโดรไลเสทของของเหลวมาหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 ในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่า เชื้อทั้งสองชนิดผลิตเอทานอลได้สูงในชั่วโมงที่ 24 ของการหมักโดย *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 ผลิตเอทานอลได้ 4.70 ± 0.01 และ 4.37 ± 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง เมื่อนำไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เติมสารอาหารและหมักในสภาวะเดียวกัน พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *P. stipitis* TISTR 5806 ผลิตเอทานอลได้ 4.34 ± 0.06 และ 3.92 ± 0.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 24 ของการหมักเช่นกัน

เมื่อศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักจากทั้งสองเชื้อ พบว่า กระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีอัตราการผลิตของผลิตภัณฑ์ (Q_p) 0.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่เชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806 มีอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ 0.18 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่ปรับสภาพโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับคลื่นไมโครเวฟสูงกว่าเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5806

5.2 ข้อเสนอแนะ

การปรับสภาพทางกายภาพเบื้องต้นของฟางข้าวโดยใช้วิธีการบด ควรบดให้มีขนาดเล็กที่สุดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น และควรแปรผันความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เพิ่มขึ้นในอัตราที่เท่ากัน เช่น ร้อยละ 1 2 3 4 และ 5 ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในร้อยละที่สูงขึ้นจนได้ข้อมูลที่คงที่ สำหรับการย่อยฟางข้าวโดยใช้เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ควรมีการศึกษาวิธีอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ศึกษาการย่อยโดยใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยให้เพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ แก้วแกมเสือ. 2547. “การศึกษาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักกากน้ำตาลในโรงงาน บริษัท แสงโสม จำกัด จ. กาญจนบุรี.” สารนิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. คู่มือการพัฒนาและการลงทุนผลิตพลังงานทดแทน. กรุงเทพฯ.

บูรณะศักดิ์ มาดหมาย. 2552. “การนำเทคโนโลยีพลังงานชีวมวลมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปพลังงาน.” วารสารส่งเสริมเทคโนโลยี. 203 : 60-65.

เบญจมาภรณ์ สุขสมัย. 2553. “ปัจจัยที่มีผลต่อโครงสร้างราคาของเอทานอลในประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์การจัดการมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์, จิรศักดิ์ คงเกียรติชจร, ปิยรัตน์ บุญแสวง และธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2552. การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. รายงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2558. “กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส.” วารสารวิชาการ Veridian E-Journal SU. 2(1) : 143-157.

รัชพล พะวงศ์รัตน์, มาลินี อันภักดี และสุทธิเดช ปรีชารัมย์. 2556. “การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน.” วารสารวิชาการ Veridian E-Journal KU. 6(2) : 1025-1036.

วรลักษณ์ คงจินดามุณี. 2556. “การผลิตเอทานอลจากแกนข้าวโพด.” วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอ เอส พริ้นติ้ง.

สุดารัตน์ ตรีเพชรกุล, วศิมน เรืองเล็ก, ยุวพิน ด่านดุสิตวานิช. 2547. “การพัฒนากระบวนการผลิตเอธานอลจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร (ระยะที่ 1-2).” สำนักงานวิจัยนวัตกรรมและพันธมิตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สุพจน์ เกิดมี, รังสรรค์ เพ็งพัด, เสาวนิตย์ แดงทองดี, พิณทิพย์ แก้วแกมทอง และไพฑูรย์ บานเย็นงาม. 2554. “พัฒนาการใช้ พลังงานก๊าซชีวภาพจากมูลสัตว์และเศษวัสดุทางการเกษตร” สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. 3-4.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. 2551. การศึกษาผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจไทยจากการใช้มันสำปะหลังเพื่อใช้ผลิตพลังงานทดแทน. กรุงเทพฯ.

อภิชญา จันทร์มั่น, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, และกิติพงษ์ รัตนาภรณ์. 2558. “การหมักเอทานอล ด้วยยีสต์ Saccharomyces cerevisiae Sc90 และ การหมักด้วยจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีกลูโคสและไซโลส.” กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

Azuma, J.I., Tanaka, F. and Koshijima, T. 1984. "Enhancement of enzymatic susceptibility of lignocellulosic wastes by microwave radiation." J. Ferment. Technol. 62(4) : 377–384.

Buranov, A.U. and Mazza, G. 2008. "Lignin in straw of herbaceous crops." Ind. Crops Prod. 28 : 237–259.

Haghighi Mood, S. Hossein Golfeshan, A. Tabatabaei, M. Salehi Jouzani, G. Najafi, G.H. Gholami, M. and Ardjmand, M. 2013. "Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment." Renewable Sustainable Energy Rev. 27 : 77–93.

Huang, H.J. Ramaswamy, S. Tschirner, U.W. Ramarao, B.V. 2008. "A review of separation technologies in current and future biorefineries." Sep. Purif. Technol. 62 : 1–21.

Ju, X. Engelhard, M. and Zhang, X. 2013. "An advanced understanding of the specific effects of xylan and surface lignin contents on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass." Bioresour Technol. 132 : 137–145.

Kim, T.H. Taylor, F. and Hicks, K.B. 2008. "Bioethanol Production from Barley Hull Using SSA (Soaking in Aqueous Ammonia) Pretreatment." Bioresour Technol. 99 : 5694-5702.

Ko, J. K. Ximenes, E. Kim, Y. and Ladisch, M.R. 2015. "Adsorption of enzyme on to lignins of liquid hot water pretreated hardwoods." Biotechnol. Bioeng. 112 : 447–456.

Laplace, J. M. Delgenes, J. P. and Molleta, R. 1991. "Combined alchoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: process considerations in relation to ethanol tolerance." Biotechnol. Lett. 13 : 445–450.

Lee, J.S. Parameswaran, B. Lee, J.P. and Park, S.C. 2008. "Recent Developments of Key Technologies on Cellulosic Ethanol Production." J. Sci. Ind. Res. 67 : 865-873.

Lu, Y.P. Yang, B. Gregg, D. Saddler, J.N. and Mansfield, S.D. 2002. "Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues." Appl Biochem Biotechnol. 98 : 641–654.

Ma, H. Liu, W.W. Chen, X. Wu Y.J. and Yu, Z.L. 2009. "Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment." Bioresour Technol. 100 : 1279-1284.

McMillan, J.D. 1994. "Pretreatment of lignocellulosic biomass." In: Himmel, M.E. Baker, J.O. Overend, R.P. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, DC. 292–324.

Maiorella, B.I. 1983. "Ethanol industrial chemicals." Biochem. Fuels, 861–914.

Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Anal. Chem. 31 : 426–428.

Nakagame, S. Chandra, R.P. and Saddler, J.N. 2010. "The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis." Biotechnol Bioeng. 105 : 871–879.

Ooshima, H. Aso, K. Harano, Y. and Yamamoto, T. 1984. "Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic-hydrolysis." Biotechnol. Lett. 6 : 289–294.

Palav, T. and Seetharaman, K. 2006. "Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating." Carbohy Pol. 65(3) : 364–370.

Palmqvist, E. Hahn-Hägerdal, B. 2002. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates, inhibition and detoxification. Bioresour Technol. 74 : 17–24.

Rahikainen, J.L. Evans, J.D. Mikander, S. Kalliola, A. Puranen, T. Tamminen, T. Marjamaa, K. and Kruus, K. 2013. "Cellulase–lignin interactions—The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding." Enzyme Microb Technol. 53 : 315–321.

Rahikainen, J.L. Martin-Sampedro, R. Heikkinen, H. Rovio, S. Marjamaa, K. Tamminen, T. Rojas, O.J. Kruus, K. 2013. "Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption" Bioresour Technol. 133 : 270–278.

Singh, A. Singh, N. Bishnoi, N.R. 2010. "Enzymatic hydrolysis of chemically pretreated rice straw by two indigenous fungal strains: a comparative study." J. Sci. Ind. Res. 69 : 232–237.

Sluiter, A. Hames, B. Ruiz, R. Scarlata, C. Sluiter, J. Templeton, D. and Crocker, D. 2008. "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass" laboratory analytical procedure. Technical Report NREL/TP- 510-42618.

Sun, Y. and Cheng, J. 2002. "Hydroloysis of lignocellulosic materials for bioethanol production: review." Bioresour. Technol. 83: 1-11.

Toledano, A. García, A. Mondragon, I. and Labidi, J. 2010. "Lignin separation and fractionation by ultra filtration." Sep Purif Technol. 71 : 38–43.

Van Soest, J. Robertson, B. and Lewis, B.A. 1991. "Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in reaction to animal nutrition" J. Dairy. Sci. 74 : 3583–3597.

Yadav, K.S. Naseeruddin, S. Prashanthi, G.S. Sateesh, L. and Rao, L.V. 2011. "Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of Saccharomyces cerevisiae and *Pichia stipitis*" Bioresour Technol. 102 : 6473-6478.

Yun, L. Benkun, Q. Jianquan, L. and Yinhua W. 2016. "Effect of alkali lignins with different molecular weights from alkali pretreated rice straw hydrolyzate on enzymatic hydrolysis" Bioresour Technol. 200 : 272-278.