รายงานการวิจัย

การปรับสภาพและการย่อยด้วยเอนไซม์ในการผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวาโดยเชื้อ *Candida shehatae*

Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis for Bioethanol Production from Water Hyacinth (Eichhornia crassipes) by *Candida shehatae*

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2558
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b00273611

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการวิจัย การปรับสภาพและการย่อยด้วยเอนไซม์ในการผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวาโดยเชื้อ *Candida shehatae*

แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน) เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2558

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

รศ.ดวงใจ โอชัยกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การปรับสภาพผักตบชวาด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตรร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที เหมาะสมต่อการย่อยผักตบชวา ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเซท 23.74 กรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0โดยปริมาตร ในการย่อยผักตบชวาและนำไฮโดรไลเซทส่วนน้ำที่ได้มากำจัดความเป็นพิษจากการปรับสภาพด้วยกรดตามวิธีของ Kumar และคณะ (2009) ซึ่งมีผลต่อการสูญเสียของน้ำตาลรีดิวซ์น้อย โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงเท่ากับร้อยละ 14.66 นำไฮโดรไลเซทส่วนกากมาวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ซึ่งการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตรเหมาะสมต่อการย่อยผักตบชวาซึ่งให้ปริมาณเซลลูโลสสูงร้อยละ 15.36 และปริมาณลิกนินลดลงเหลือร้อยละ 1.81 ตามลำดับ จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยไฮโดรไลเซทส่วนกากให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเซทส่วนกาก 5.78 กรัมต่อลิตร จากนั้นได้ทำการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 โดยใช้อาหาร 2 ชนิด คือ ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำ และไฮโดรไลเซทส่วนกากโดยการหมักในสภาวะให้อากาศใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นเปลี่ยนสภาวะมาหมักแบบไร้อากาศพบว่าช่วงแรกเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีแต่ไม่มีการสร้างผลิตภัณฑ์หรือสร้างในปริมาณน้อย เมื่อหมักในสภาวะไร้อากาศโดยในไฮโดรไลเซทส่วนน้ำหมักด้วย เชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 มีปริมาณเอทานอลสูงสุด 8.15 กรัมต่อลิตร ใน 36 ถึง 48 ชั่วโมง *C. shehatae* TISTR 5843 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล 0.1132

คำสำคัญ : *Candida shehatae* TISTR 5843, เอทานอล, เซลลูโลส, ผักตบชวา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis for Bioethanol Production from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by *Candida shehatae*

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

ABSTRACT

The effect of sulfuric acid in combination with heating at 121°C, 40 minutes for pretreatment on conversion of lignocellulose in water hyacinth (WH) was investigated. The highest reducing sugar content in acidic pretreatment (23.74g.l^{-1}) was observed in WH hydrolysate treated with 2.0% (v/v) H_2SO_4 solution. The acid WH hydrolysate was then detoxified. The results showed that the detoxification procedure following Kumar et al. (2009) reduced reducing sugar content. The loss of reducing sugar was 14.66%. The WH hydrolysate (sludge) was analyzed for lignocellulose (cellulose, hemicellulose and lignin).The sulfuric acid concentration of 2.0 % (v/v) was the most suitable to hydrolyze WH and it. which provide 15.36 % of the amount of cellulose and lignin content was reduced to 1.81%. The enzymatic hydrolysis of WH hydrolysate (sludge) using cellulose hadnearly no effect on increasing of reducing sugar 5.78 g.l^{-1}. The ethanol production by using *Canddida shehatae* TISTR 5843 was studied in 2 different conditions of WH hydrolysate (liquid) and WH hydrolysate (sludge). Arobic with the first 24 hours of fermentation using yeast inoculums in the WHhydrolysate (liquid) and WH hydrolysate (sluge). Cells were grown well after that change the condition to the anaerobic fermentation. However, there was no ethanol production or very little product quantities. Fermentation in anaerobic conditions in the WH hydrolysate (liquid) *C. shehatae* TISTR 5843 amount of ethanol highest 8.15 g.l^{-1} at 36 - 48 hours. Amount of ethanol obtained by the fermentation of *C. shehatae* TISTR 5843 WH hydrolysate (liquid) and WHhydrolysate (sludge) were nearly by *C. shehatae* TISTR 5843 effective in producing ethanol 0.1132.

Keywords : *Candida shehatae* TISTR 5843, ethanol, cellulose , water hyacinth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2558

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	4
1.5 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิดของโครงงานวิจัย	6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
2.1 เอทานอล	11
2.2 การผลิตเอทานอล	11
2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล	13
2.4 เชื้อยีสต์ในการผลิตเอทานอล	15
2.5 แหล่งชีวมวล	17
2.6 การปรับสภาพ	19
2.7 การย่อยหรือไฮโดรไลซิส	19
2.8 การลดความเป็นพิษในไฮโดรไลเซท ก่อนนำไปหมักเพื่อผลิตเอทานอล	20
2.9 เอนไซม์เซลลูเลส	20
2.10 ปัจจัยที่สำคัญต่อการหมักเอทานอล	25
2.11 การเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอล	26
2.12 ผักตบชวา	27
2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	33
3.1 วัตถุดิบ	33
3.2 เชื้อจุลินทรีย์	33
3.3 สารเคมี	33
3.4 อุปกรณ์	34
3.5 การเตรียมวัตถุดิบ	35
3.6 ศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาโดยการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ	35
3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในส่วนของกากผักตบชวา	35
3.8 การกำจัดความเป็นพิษจากการปรับสภาพด้วยกรด (Detoxification) ในส่วนไฮโดรไลเซทที่เป็นเหลว	38
3.9 ศึกษาการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843	39
3.10 ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักผักตบชวาโดยใช้เชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843	40
3.11 การวิเคราะห์	40
3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ	41
บทที่ 4 ผลการทดลอง	42
4.1 ผลการศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ	42
4.2 ผลการกำจัดความเป็นพิษจากการปรับสภาพด้วยกรด (Detoxification)	43
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ในส่วนกากผักตบชวา	45
4.4 ผลการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยไฮโดรไลเซทส่วนกากผักตบชวา	47
4.5 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843	47
บทที่ 5 สรุปและการวิจัยและข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล	14
2.2	แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์แต่ละสายพันธุ์	15
4.1	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการปรับสภาพผักตบชวาโดยการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ	43
4.2	ปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล และเฟอร์ฟูรอล ก่อนและหลังการกำจัดความเป็นพิษของผักตบชวา	45
4.3	ปริมาณลิกนิน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส หลังการปรับสภาพผักตบชวาด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ	46
4.4	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังการย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสของไฮโดรไลเซทส่วนกากผักตบชวา	47
4.5	ค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลในอาหาร 2 ชนิด คือ ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำและไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวาโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดง Ethanol straight-chain ประกอบด้วยโมเลกุลของ Hydroxyl (-OH) ที่ยึดเหนี่ยวกับอะตอมของคาร์บอน (C)	8
2.2 แสดงรูปเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae*	16
2.3 แสดงเซลล์ของเชื้อ*Candida shehatae*	16
2.4 แสดงรูปแสดงลักษณะของผักตบชวา	27
2.5 แสดงรูปแบบของกระบวนการหมักต่างๆ ในการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาดังนี้ (a) กระบวนการย่อยโดยเอนไซม์และเกิดกระบวนการหมักแบบ SSF (b) กระบวนการย่อยโดยเอนไซม์และเกิดกระบวนการหมักแบบ SHF	30
2.6 แสดงขั้นตอนการย่อย การกำจัดความเป็นพิษ และการเตรียมอาหารสำหรับหมัก	31
4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการปรับสภาพผักตบชวาโดยการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ	43
4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2	44
4.3 ปริมาณลิกโนเซลลูโลสของผักตบชวาหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ	46
4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการหมักไฮโดรไลเซทส่วนน้ำของผักตบชวาด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	48
4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการหมักไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวาด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการที่ทรัพยากรด้านปิโตรเลียมได้ลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ราคาน้ำมันในตลาดโลกมีความผันผวนและปรับตัวสูงขึ้น ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่ได้รับผลกระทบจากสภาวะน้ำมันแพงเพราะต้องสูญเสียเงินจำนวนมากในการนำเข้าเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ จึงทำให้มีการส่งเสริมหาพลังงานทดแทนมาใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากพลังงานหมุนเวียน (Renewable energy) ที่สามารถหาได้จากในท้องถิ่นซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือ พลังงานชีวมวล (Bio-energy) อีกทั้งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมดังนั้นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีจำนวนมากและราคาถูก โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ส่วนใหญ่จัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว กากชานอ้อย ซังข้าวโพด เป็นต้น

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) เป็นสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน ซึ่งผลิตได้จากการหมักน้ำตาลหรือแป้ง (Fermentations) และสามารถสังเคราะห์ได้จากอนุพันธ์ของสารปิโตรเลียม (Synthesis) โดยพบว่าร้อยละ 90 ได้มาจากกระบวนการหมัก ขั้นตอนหลักๆ ในการผลิตเอทานอลจะประกอบด้วย 4 ขั้นตอนคือ 1 การเตรียมวัตถุดิบ 2 การย่อยแป้ง 3 การเตรียมหัวเชื้อและการหมัก 4 การกลั่นเอทานอล สำหรับวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้ 3ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย บีทรูท กากน้ำตาลและผลไม้ ซึ่งวัตถุดิบประเภทนี้สามารถเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลได้โดยตรง วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลีและมันสำปะหลัง ซึ่งจะต้องถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลก่อนจะเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลและวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด ไม้เนื้ออ่อน หญ้าแฝก ผักตบชวา เป็นต้น การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ที่มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินเป็นองค์ประกอบ จะต้องผ่านการย่อยโดยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อนแล้วจึงนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล โดยทั่วไปเอทานอลจะผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง แต่เนื่องจากต้นทุนที่มีราคาสูงและวัตถุดิบประเภทแป้งสามารถนำไปผลิตเป็นสินค้าอื่นได้ เช่น นำไปเป็นอาหาร ซึ่งถือว่ามีประโยชน์มากกว่า สำหรับวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมีปริมาณมาก ราคาถูกและส่วนใหญ่เป็นของเหลือทิ้งซึ่งถ้าปล่อยไปตามธรรมชาติจะก่อให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อมจึงมีความสนใจที่จะผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบเหล่านี้

ผักตบชวา (Water Hyacinth) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms อยู่ในวงศ์ (Family) *Pontederiaceae* เป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบลุ่มน้ำอะเมซอนประเทศบราซิล สำหรับประเทศไทยผักตบชวาได้แพร่ระบาดอย่างรุนแรงในแถบที่ราบลุ่มภาคกลางโดยเฉพาะในที่ราบลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำท่าจีน ผักตบชวาเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเป็นวัชพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับแหล่งน้ำ เนื่องจากผักตบชวาเป็นพืชที่สามารถแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้กำจัดได้ยาก เป็นสาเหตุให้การไหลถ่ายเทของน้ำช้าลงและยังกีดขวางการคมนาคมทางน้ำอีกด้วย ปัญหาจากผักตบชวาต่อด้านต่างๆ เช่น ปัญหาต่อการชลประทาน การไฟฟ้าพลังงานน้ำ การประมง การกสิกรรมและการสาธารณสุข เป็นต้น จากเหตุผลดังกล่าวผักตบชวาส่งผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสียหลายด้านและก่อให้เกิดปัญหากับประเทศไทยมาอย่างต่อเนื่อง จึงมีแนวคิดที่จะนำผักตบชวามาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์เพื่อเป็นการลดต้นทุนและเป็นการกำจัดผักตบชวาได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการนำมาผลิตเป็นพลังงานทดแทนหรือไบโอเอทานอล ซึ่งผักตบชวามีองค์ประกอบของเซลลูโลส ร้อยละ 60 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 8 และลิกนินร้อยละ 17 ซึ่งพืชชนิดนี้เป็นแหล่งลิกโนเซลลูโลส สามารถนำมาผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อหมักเอทานอล น้ำตาลไซลิทอล กรดอินทรีย์และสารเคมีชนิดต่างๆ ได้ ซึ่งการที่จะได้น้ำตาลรีดิวซ์มาใช้ในการหมักเอทานอลจากผักตบชวาอาจจะใช้กรดหรือเอนไซม์ย่อยและการใช้เอนไซม์ย่อยจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้กรดย่อย ปัจจัยที่สำคัญในการผลิตไบโอเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส คือ เซลลูโลสและ เฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของวัตถุดิบประเภทนี้มีความสามารถในการละลายได้ต่ำซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยสลายเพื่อให้ได้น้ำตาลโดยโครงสร้างของสารเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่แข็งแรงซึ่งยากต่อการย่อยสลาย (Boudet et al., 2003) ดังนั้นการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทนี้จึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อที่จะให้โครงสร้างเหล่านี้ถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้น การปรับสภาพชีวมวลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพร่วมกับทางเคมี (Silverstein et al., 2007) การปรับสภาพทางกายภาพเป็นการเปลี่ยนโครงสร้างของสารชีวมวลโดยใช้วิธีทางกล ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนในการทำปฏิกิริยาของสารชีวมวลให้เพิ่มขึ้น ส่วนการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับทางเคมีเพื่อลดดีกรีของการเกิดผลึก (degree of crystallinity) และการโพลีเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (Binod et al., 2010) Harun และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาผลของการปรับสภาพผักตบชวาโดยวิธีทางกายภาพที่ส่งผลต่อการย่อยด้วยกรดเจือจาง พบว่า การใช้ไอน้ำ (steaming) ที่ 121 ± 3 องศาเซลเซียสและการต้มที่ 100 ±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ให้ปริมาณน้ำตาล 35.9 และ 52.4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ขณะที่ผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาล 24.69 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง การนำผักตบชวามา ultrasonication และให้ได้รับรังสี (irradiation) เป็นเวลา 20 นาที สามารถผลิตน้ำตาลได้ 132.96 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ขณะที่การนำตัวอย่างมาผ่านการ pulverized จะให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด คือ 155.13 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง

Ahmed และคณะ (2012) ศึกษาการปรับสภาพและการใช้เอนไซม์ย่อยผักตบชวาเพื่อให้เกิดน้ำตาล พบว่าการปรับสภาพโดยใช้ $NaClO_2$ ร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสกับการใช้กรดพาราซิติก (paracetic) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมซึ่งทำให้เกิดปริมาณลิกนินร้อยละ 2.56 เซลลูโลสร้อยละ 96.69 และเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 81.38 จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีการเปลี่ยนรูป (conversion) ของเซลลูโลสสูงที่สุดร้อยละ 80.8 และเกิดการย่อยเป็นน้ำตาลได้ร้อยละ 90 โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 200 FPU ต่อกรัมของสับสเตรท

การปรับสภาพโดยการใช้กรดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวา วิธีการเหล่านี้จะไปละลายสารพวกเฮมิเซลลูโลสและทำให้เซลลูโลสยังคงอยู่มากที่สุด (Nigam, 2002., Kumar et al., 2009) ถึงแม้ว่าการปรับสภาพด้วยกรดจะใช้พลังงานสูงและไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังคงนิยมใช้กัน (Sun and cheng, 2002., Mishima et al., 2006., Masami et al., 2008) แต่ผลจากการย่อยด้วยกรด ทำให้บางครั้งเกิดสารผลิตภัณฑ์บางชนิดที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเอทานอล การปรับสภาพทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ โดยจุลินทรีย์จะไปรบกวนหรือทำลายส่วนที่มีโครงสร้างของลิกนินและเฮมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลส วิธีการนี้ใช้พลังงานต่ำและเกิดในสภาวะที่ไม่รุนแรง (Yu et al., 2009) อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงความคุ้มทุนทางเศรษฐกิจ วิธีนี้ไม่ได้รับความนิยม เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายใช้เวลานานและมีการสูญเสียองค์ประกอบที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลลดลง จึงมีการนำเอาวิธีทางชีวภาพเหล่านี้มาใช้ร่วมกับการใช้สารเคมีเจือจาง ในการปรับสภาพผักตบชวาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) (Yu et al., 2010) ตัวอย่างเช่นการทดลองของ Ma และคณะ (2010) ศึกษาการปรับสภาพทางชีวภาพร่วมกับการใช้กรดอ่อนสำหรับนำมาย่อยด้วยเอนไซม์และผลิตเอทานอลจากผักตบชวา จากการศึกษาพบว่า การใช้กรดอ่อนร่วมกับการปรับสภาพทางชีวภาพโดยใช้เชื้อรา *Echinodontium taxodii* (white rot fungus) หรือการใช้ *Antrodia* sp 5898 (brown rot fungus) ร่วมกับกรดอ่อน การปรับสภาพร่วมกันระหว่างการใช้เชื้อ *E. taxodii* เป็นเวลา 10 วันและกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ร้อยละ 0.25 ให้ผลดีกว่าการปรับสภาพด้วยกรดอย่างเดียว ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเอนไซม์ร่วมกับการปรับสภาพโดยการใช้จุลินทรีย์ร่วมกับการใช้กรดจะเพิ่มขึ้น 1.13 ถึง 2.11 เท่าของการใช้กรดปรับสภาพในสภาวะเดียวกัน

จากการศึกษากระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมักโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าปริมาณ เอทานอลที่ได้จากการปรับสภาพร่วมกันดังกล่าวเท่ากับ 0.192 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.34 เท่าของการใช้กรดปรับสภาพเพียงอย่างเดียว ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.142 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จะเห็นได้ว่าการปรับสภาพโดยใช้วิธีทางชีวภาพร่วมกับการใช้กรดอ่อน สามารถนำมาปรับปรุงกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ได้

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้หมักจะต้องมีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ทั้งหมดที่มีและทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการหมักเอทานอล คือ *Saccharomyces cerevisiae* แต่เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทส ซึ่งมีอยู่ในวัตถุดิบประเภทนี้สูงประมาณร้อยละ 45 จุลินทรีย์ที่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสได้ คือ *Pichia stipitis, Candida shehatae* และ *Pachysolen tanophilus* ซึ่งเชื้อเหล่านี้เหมาะที่จะนำมาใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถหมักน้ำตาลไซโลสได้อย่างรวดเร็วและให้ปริมาณเอทานอลสูง (Domingues et al., 1993) โดยมีการทดลองของ Ashish และคณะ (2009) ซึ่งได้ศึกษาการเปลี่ยนรูปของสารลิกโนเซลลูโลสในผักตบชวาและนำเฮมิเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไปผลิตเอทานอลโดยใช้ *Pichia stipitis* จากการทดลองพบว่าการนำผักตบชวาที่ผ่านการย่อยด้วยกรดมาหมักเอทานอล น้ำตาลไซโลสร้อยละ 72.83 จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยมีผลผลิตของเอทานอลเท่ากับ 0.425 กรัมของผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของสับสเตรทและประสิทธิภาพการผลิตเท่ากับ 0.176 กรัมของผลิตภัณฑ์ต่อลิตรต่อชั่วโมง

Manivannan และคณะ (2012) ศึกษาการเพิ่มการย่อยด้วยกรดในการผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวาโดยใช้ *Candida intermedia* NRRL Y – 981 พบว่าในการศึกษานี้ใช้กระบวนการหมัก 2 ขั้นตอนคือ ใช้กรดในการย่อย โดยใช้กรดซัลฟูริกร้อยละ 10 และใช้เชื้อยีสต์ในการหมัก โดยใช้ *C.intermedia* ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่ได้จากการทดลอง มีค่า 0.21 กรัมต่อสับสเตรท และความสามารถในการผลิตเอทานอล 0.010 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่ได้จากการทำนาย โดยการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design มีค่า 0.23 กรัมต่อกรัม ซับสเตรท การวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสและปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงแม้ว่าผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากการทดลองนี้ค่อนข้างต่ำ แต่แสดงให้เห็นถึงความคุ้มทุนในเชิงเศรษฐกิจในการทำวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมาหมักเป็นเอทานอล

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวาโดยใช้เชื้อ *Candida shehatae* โดยศึกษาการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟริกความเข้มข้นต่างๆ และนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ จากนั้นนำมาหมักด้วย *C. shehatae* เพื่อผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก (Separated Hydrolysis and Fermentation, SHF) รวมทั้งศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ (kinetic) ของกระบวนการหมักเอทานอลของเชื้อนี้ มีการเปรียบเทียบการใช้ส่วนของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพ และส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพวัตถุดิบมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอลของเชื้อ *C. shehatae*

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการปรับสภาพ (pretreatment) ผักตบชวา โดยการใช้กรด H_2SO_4 ความเข้มข้นต่างๆ
2. นำส่วนกากผักตบชวาและส่วนของเหลวที่ได้จากการย่อยผักตบชวาลดความเป็นพิษ จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้
3. เปรียบเทียบการใช้ส่วนของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพและส่วนกากที่ได้จากการปรับสภาพมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล โดยเชื้อ *C. shehatae*
4. ศึกษาศักยภาพในการผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพและลดความเป็นพิษแล้วและย่อยให้ได้น้ำตาลที่สามารถหมักได้โดยใช้เชื้อ *Candida shehatae*

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาวิธีการปรับสภาพ (pretreatment) ผักตบชวาโดยการใช้กรดความความเข้มข้นต่างๆ ส่วนของเหลวที่ได้นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วนของกากผักตบชวานำมาวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จากนั้นนำส่วนของของเหลวผักตบชวากำจัดความเป็นพิษ สำหรับส่วนกากผักตบชวานำมากำจัดสารทำละลายออก จากนั้นนำมาทั้งส่วนของเหลวและกากผักตบชวาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และนำมาหมักด้วยเชื้อ *Candida shehatae* เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง รวมทั้งน้ำหนักแห้ง ศึกษาค่าทางจลนศาสตร์ของการหมักในส่วนของเหลวผักตบชวา และกากผักตบชวา

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 เก็บผักตบชวาจากแหล่งน้ำในเขตลาดกระบัง จากนั้นเตรียมตัวอย่างโดยนำมาล้างให้สะอาดและสับให้เป็นชิ้นเล็กๆขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร นำไปผึ่งแดดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำผักตบชวามาปั่นให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 0.8 มิลลิเมตรและเก็บไว้ในถุงพลาสติกโดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

ขั้นที่ 2 ศึกษาองค์ประกอบของผักตบชวา เช่น ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 3 ศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment) ผักตบชวาโดยวิธีการดังนี้

3.1 การใช้สารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) โดยนำผักตบชวา 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 0 2.0 2.5 3.0 และ 3.5 โดยปริมาตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทำให้เย็น นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกส่วนกากผักตบชวา และส่วนใสออกจากกัน ล้างกากผักตบชวาด้วยน้ำสะอาดหลายครั้งจน pH เป็นกลาง ส่วนของกากผักตบชวาที่ได้นำไปอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส ส่วนของเหลวใสที่ได้จากการกรองน้ำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (ดัดแปลงจาก Eshtiaghi และคณะ, 2012) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สำหรับกากผักตบชวานำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่ลดลง

คัดเลือกตามเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมในการนำมาปรับสภาพผักตบชวา โดยในส่วนกากของผักตบชวาจะพิจารณาที่ปริมาณลิกนินลดลงมากที่สุด สำหรับส่วนของเหลวที่ได้จากการย่อยจะพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีสูงสุดเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมมาใช้ในการศึกษาต่อไป

ขั้นที่ 4 กำจัดความเป็นพิษจากการปรับสภาพผักตบชวาในส่วนของเหลวใส(Detoxification) โดยวิธีของ Kumar และคณะ (2009) โดยนำของเหลวส่วนใสที่ได้จากการปรับสภาพ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและควบคุมที่ 100 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อลดความเข้มข้นของสารประกอบระเหยได้ เติมน้ำกลั่นร้อนเพื่อปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตรเช่นเดิม จากนั้นเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์พร้อมกับเติมโซเดียมซัลไฟต์ 0.1 กรัมต่อลิตร คนให้เข้ากันจนพีเอชของสารละลายเท่ากับ 10.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีแยกส่วนตะกอนทิ้ง ส่วนใสที่ได้นำไปปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 โดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 N. ของเหลวที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS ปริมาณ Furfural และ HMF โดยการฉีด HPLC เปรียบเทียบปริมาณ Furfural และ HMF ก่อนและหลังการกำจัดความเป็นพิษ

ขั้นที่ 5 การกำจัดสารตัวทำละลายออกจากกากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพ

โดยนำกากผักชวาที่ผ่านการปรับสภาพ นำมาแช่ในน้ำสะอาดจนกว่าสารตัวทำละลายหมด จากนั้นนำกากผักตบชวาอบให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปใช้

ขั้นที่ 6 นำส่วนกากผักตบชวาย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

1. นำกากผักตบชวาที่ผ่านการกำจัดสารทำละลายออก 200 มิลลิกรัม เติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 4.8 นำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกรองสูญญากาศ นำส่วนกากทิ้ง นำส่วนน้ำหลังการกรองมาปรับพีเอชเป็น 6.0 และนำมาหมักต่อไป

ขั้นที่ 7 ศึกษาการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843

7.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843 เขี่ยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 จำนวน 1 – 2 loop เลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง SXA (Sabouraud Xylose Agar) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อจากอาหาร SXA1 – 2 loop มาเลี้ยงในจานอาหาร SXA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เชื้อไปใช้ในกระบวนการหมักต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.2 กระบวนการหมัก แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นไฮโดรไลเซทที่เป็นของเหลว หลังจากกำจัดความเป็นพิษในไฮโดรไลเซทแล้ว นำส่วนที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษหมักด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 โดยหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้ง รวมทั้งค่าพีเอชของอาหารหมักจากนั้นหมักในสภาวะไร้อากาศโดยใช้จุก คอร์กปิดและบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ดังนั้นระยะเวลาการหมักทั้งหมดเป็น 72 ชั่วโมง) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้น

ส่วนที่ 2 เป็นไฮโดรไลเซทที่เป็นกากผักตบชวา หลังจากล้างทำความสะอาดเอาสารตัวทำละลายออกแล้ว นำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 150 ยูนิตต่อ 10 กรัม (โดยเอนไซม์ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ กรองสุญญากาศ นำส่วนกากทิ้ง นำส่วนน้ำหลังการกรองแบบสุญญากาศมาปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 6.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นนำมาหมักด้วยเชื้อ *C.shehatae* TISTR 5843 โดยหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้น จากนั้นหมักในสภาวะไร้อากาศโดยใช้จุกคอร์กปิดและบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ระยะเวลาการหมักทั้งหมดเป็น 72 ชั่วโมง) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้นเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก โดยใช้ส่วนน้ำและส่วนกากผักตบชวา

ขั้นที่ 8 ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักผักตบชวาโดยใช้เชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843

เมื่อ $Y_{x/s}$ คือ ค่าผลได้ของมวลชีวภาพต่อซับสเตรท

$Y_{p/s}$ คือ ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อซับเสตรท

$P_{x.batch}$ คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมงหรือค่า Productivity ของมวลชีวภาพ

$P_{p.batch}$ คือ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมงหรือค่า Productivity ของผลิตภัณฑ์

ขั้นที่ 9 สรุปผลการทดลองและจัดทำรายงาน

1.5 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิดของโครงงานวิจัย

Addel – Fattah และ Abdel – Naby (2011) ได้ศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาภายใต้สภาวะต่างๆ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaoH) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นด่าง (Alkaline H_2O_2) กรดเปอร์อะซิติก (Peracetic acid) และโซเดียมคลอไรท์ (Sodium chorite) การปรับสภาพโดยใช้โซเดียมคลอไรท์ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโดรเจนที่เป็นด่างและกรดเปอร์อะซิติก พบว่าการปรับสภาพโดยใช้โซเดียมคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และกรดเปอร์อะซิติกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้ได้ตัวอย่างที่เหมาะสมมากที่สุด สารลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากตัวอย่างนี้เท่ากับร้อยละ 2.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96.69 และ 81.38 ตามลำดับ และเมื่อนำตัวอย่างเดียวกันนี้ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 200 FPU ต่อกรัมซับสเตรท จะมีการเปลี่ยนรูปของเซลลูโลสมากที่สุด คือร้อยละ 80 และมีการย่อยให้ได้น้ำตาลร้อยละ 90

Mishima และคณะ (2007) ได้ศึกษาแบบแผนของการหมักและจุลินทรีย์ที่ใช้ในพืชน้ำ คือ ผักตบชวา และจอก (Water lettuce) ในการหมักเอทานอล พบว่าปริมาณน้ำตาลในจอกมีใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลในผักตบชวา ยกเว้นน้ำตาลอะราบิโนส (Arabinose) จอกมีปริมาณแป้งสูงกว่าเล็กน้อยแต่มีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสต่ำกว่า สายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ คือ *Saccharomyces cerevsiae* NBRC 2346 สามารถผลิตเอทานอลจากผักตบชวาได้ 14.4 กรัมต่อลิตร และจากจอกได้ 14.9 กรัมต่อลิตร นอกจานี้แบคทีเรียสายพันธุ์คอมบิแนนท์ *Escherichia coli* K011 สามารถผลิตเอทานอลจากผักตบชวาได้ 16.9 และจากจอกได้ 16.2 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบ SSF ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าการหมักแบบ SHF ค่าผลได้ของเอทานอลต่อหน่วยของน้ำหนักแห้งของผักตบชวาได้ 0.14 – 0.17 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งผักตบชวา และค่าผลได้ของเอทานอลต่อหน่วยของน้ำหนักของจอกได้ 0.15 – 0.16 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของจอก

Nigam (2002) ได้ศึกษาการใช้ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยกรดเป็นซับสเตรทในการผลิตไบโอเทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 โดยนำไฮโดรไลเสทมาให้ความร้อน และทำให้เป็นด่างจนพีเอชมีค่าเท่ากับ 10.0 ด้วยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พร้อมกับเติมโซเดียม ซัลไฟต์เพื่อเป็นการลดความเป็นพิษ (detoxified) ในไฮโดรไลทที่ไม่ได้ลดความเป็นพิษมีปริมาณน้ำตาล 20.15 $\pm$ 0.17 กรัมต่อลิตร และค่าผลได้ของเอทานอล (Yp/s) มีค่า 0.19 $\pm$ 0.003 กรัมเอทานอลต่อกรัมซับสเตรท เมื่อใช้ไฮโดรไลเสทที่ลดความเป็นพิษมาหมักทำให้มีปริมาณน้ำตาล 76.0 $\pm$ 0.32 กรัมต่อลิตร และค่าผลได้ของเอทานอลมีค่า 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมซับสเตรท การหมักจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อมีการให้อากาศที่อัตรา 0.02 วีวีเอ็ม อุณหภูมิ 30 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียม และค่าพีเอช 6.0 $\pm$ 0.2 อย่างไรก็ตามความสามารถในการผลิต (Qp) มีค่าน้อยกว่าการหมักในอาหารไฮโดรไลเสทสังเคราะห์

มัลลิกา (2550) ศึกษาการหมักเอทานอลในอาหารกลูโคสและไซโลสโดยเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843 ในระดับฟลาสก์ พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถเจริญได้ในสภาวะมีอากาศและผลิตเอทานอลในสภาวะไร้อากาศ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศ คือสภาวะเขย่าเพื่อให้มีการผลิตชีวมวลในอาหารที่มีไซโลส 10 กรัมต่อลิตร ก่อนที่จะเลี้ยงต่อในสภาวะไม่เขย่าเพื่อผลิตเอทานอลในอาหารไซโลส 20 กรัมต่อลิตร ทำให้เอทานอล 8.17 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้เอทานอล 0.40 กรัมต่อกรัมหรือร้อยละ 78 ของผลได้ตามทฤษฎี

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นการนำผักตบชวาซึ่งเป็นวัชพืชทางน้ำมาใช้ให้เป็นประโยชน์อีกทางหนึ่ง นอกจากจะนำมาผลิตอาหารสัตว์หรือถักทอเป็นงานประดิษฐ์ต่างๆ ให้ได้ไบโอเอทานอลซึ่งนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด ลดภาวะทางสิ่งแวดล้อม และลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศได้

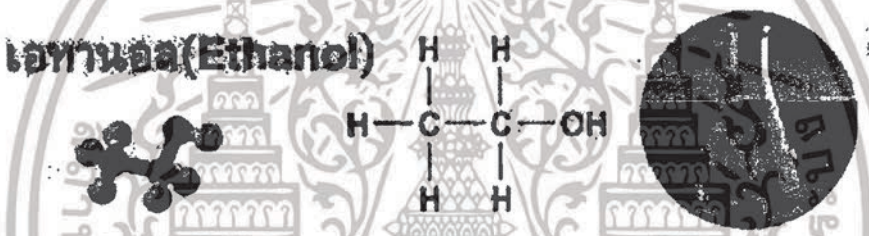
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (Knittel และ Smith, 2012)

2.1.1 เอทานอล

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีสูตรเคมี C_2H_5OH มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง (เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8 ค่าออกเทนสูงถึง 113) ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นไฮดรอกซิล ดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -114.1 องศาเซลเซียส จุดเดือด 78.5 องศาเซลเซียส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้ผลิตอาหาร และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิง เป็นต้น



รูปที่ 2.1 แสดง Ethanol straight-chain ประกอบด้วยโมเลกุลของ Hydroxyl (-OH) ที่ยึดเหนี่ยวกับอะตอมของคาร์บอน (C)

ที่มา http://water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37

2.1.2 คุณสมบัติของเอทานอล (วิโรจน์, 2553)

1. เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยได้จุดไฟติด มีพีเอชเป็นกลาง
2. มีจุดเดือดที่ 78 องศาเซลเซียส แต่สามารถระเหยได้แม้ที่อุณหภูมิต่ำ
3. สามารถผสมเข้ากันได้ดีกับน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ เช่น อีเทอร์คลอโรฟอร์ม
4. ให้พลังความร้อนประมาณ 12,800 บีทียูต่อปอนด์

2.1.3 ประเภทของเอทานอล (วิโรจน์, 2553)

1. เอทานอลที่ผลิตในท้องตลาดทั่วๆไปแบ่งเป็นประเภทได้ ดังนี้

Industrial Alcohol (96.5 ^{o}GL) ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมทั่วไป ฉะนั้นจึงนิยมเติมสารไพริดีน (Pyridine) ร้อยละ 0.5 ถึง 1หรือสารสีเมทธิวไวโอเลท (Methyl Violet) ร้อยละ 1/2000 เพื่อให้เกิดสีและไม่สามารถรับประทานได้โดยตรง

2. Denatured Spirit (88 ^{o}GL) เป็น Industrial Alcohol ที่ผลิตในประเทศที่กำหนดความเข้มข้นเป็นProof (176 Proof) มีการเติมสีเช่นเดียวกัน

3. Fine Alcohol (96.0 – 96.5 ^{o}GL) เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ที่ไม่ได้เติมแต่งใช้สำหรับอาหาร ยารักษาโรค และเครื่องสำอาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Absolute หรือ Anhydrous Alcohol (99.7 – 99.8 ^{O}GL) คือ เอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ หรือเรียกว่า เอทานอลบริสุทธิ์ (ในทางปฏิบัติใช้ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 โดยน้ำหนัก)

2.1.4 ประโยชน์จากเอทานอล (วิโรจน์, 2553)

1. ใช้เป็นตัวทำละลาย (Solvent) ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง ผลิตน้ำหอม และอื่นๆ

2. ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อโรค เช่น น้ำยาฆ่าเชื้อ

3. ใช้ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

4. ใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยนำเอทานอลกับน้ำมันเบนซิลออกเทน 91 ในอัตราส่วนเอทานอล 1 ส่วน กับน้ำมัน

2.1.5 การใช้เอทานอลในรูปของเชื้อเพลิงสำหรับยานพาหนะ (อาคม, 2556)

เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่นำไปใช้ผสมน้ำมัน (Fuel Alcohol) เป็นแอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ตั้งแต่ 95% โดยปริมาตร ซึ่งสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ใน 3 รูปแบบ คือ

แบบแรก เป็นเอทานอล 95% ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซิน และน้ำมันดีเซล ใช้ได้กับเครื่องยนต์ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง บราซิลเป็นประเทศแรกที่มีการศึกษาวิจัยและเริ่มใช้เอทานอลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงตั้งแต่ปี 2516 โดยผลิตเอทานอลจากอ้อย และกากน้ำตาล ยานพาหนะที่ใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงมีมากถึงประมาณร้อยละ 41 สำหรับในเครื่องยนต์ดีเซลสามารถใช้เอทานอลบริสุทธิ์ 95% ผสมในน้ำมันดีเซลเรียกว่า ดีโซฮอล์ (Diesohol) ในอัตราส่วนร้อยละ 15 และเพิ่มสารปรับปรุงคุณสมบัติบางตัวในปริมาณร้อยละ 1-2

แบบที่ 2 เอทานอลบริสุทธิ์ 99.5% โดยปริมาตร ผสมในน้ำมันเบนซินซึ่งจะเรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) โดยทั่วไปใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินอัตราส่วนร้อยละ 10 ในลักษณะของสารเติมแต่งเพื่อปรับปรุงค่าออกเทนของน้ำมันเบนซิน ซึ่งสามารถนำมาใช้งานกับเครื่องยนต์โดยทั่วไป ไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์แต่อย่างใด ซึ่งบราซิลก็ใช้เอทานอลผสมในน้ำมันเบนซินที่อัตราส่วนร้อยละ 2

แบบที่ 3 เป็นสารเคมีเพิ่มออกเทน (Octane) แก่เครื่องยนต์ โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอลมาเป็นสาร ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่ง MTBE เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ

ในต่างประเทศมีการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงมานานแล้วจากการรายงานของบริษัทบางจากปิโตรเลียม จำกัด (มหาชน) การผลิตเอทานอลของโลกมีมากกว่า 30,000 ล้านลิตรต่อปี บราซิลเป็นประเทศที่ผลิตและใช้เอทานอลมากที่สุดในโลก มีการใช้เอทานอลอย่างแพร่หลายตั้งแต่ปี 1975 ในปัจจุบันมีการผลิตเอทานอลรวม 13,000 ล้านลิตรต่อปี และนำไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่โดยใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงโดยตรงกับรถยนต์ที่ได้รับการปรับแต่งเครื่องยนต์แล้วมีประมาณ 4 ล้านคัน

2.1.6 ประโยชน์ที่ได้จากการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิง (สิริวุทธิ์, 2552)

การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิง สามารถทำได้หลายระดับ ตั้งแต่นำไปผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 10 : 90 เป็นน้ำมันแก๊สโซฮอล์ E10 จนถึง E100 ซึ่งเป็นการใช้เอทานอล 100% เป็นเชื้อเพลิง ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อประเทศชาติและประชาชนคนไทยมากมหาศาล ดังนี้

1. การใช้เอทานอลมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย ลดการใช้เชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดGreenhouse Effect ที่ทำให้อากาศโลกร้อนขึ้น ส่งผลกระทบต่อการเกษตรกรรม การละลายของน้ำแข็งขั้วโลก ระดับน้ำทะเลที่สูงขึ้น และการเกิดอุทกภัยบ่อยครั้งในพื้นที่ชายฝั่งทะเล

2. การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงจะทำให้ปริมาณก๊าซพิษในบรรยากาศลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การใช้เอทานอลที่ผลิตจากพืชผลการเกษตรช่วยลดการนำเข้า สร้างความมั่นคงทางด้านอาชีพและเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร

4. ทำให้เกิดการพัฒนาเทคโนโลยีทั้งในด้านการผลิตและการใช้ประโยชน์สร้างผลตอบแทนทางเศรษฐกิจให้กับประเทศ

2.1.7 อันตรายจากเอทานอลคุณภาพต่ำ จะมีสารปนเปื้อนที่เป็นอันตรายดังนี้ (สิริวุทธิ์, 2552)

1. แอลกอฮอลล์ที่มีโมเลกุลใหญ่หรือ Higher Alcohols ได้แก่Amylalcohol, Isobutyl alcohol และ 2-Phenyl ethanol สารเหล่านี้ เป็นสารกระตุ้นอาการแพ้ระคายเคืองระบบทางเดินหายใจ รบกวนระบบประสาท เพิ่มความดัน และทำให้ปวดศีรษะ

2. แอลดีไฮด์เป็นสารระคายเคืองเยื่อบุตา ทำให้น้ำตาไหล ระคายเคืองระบบทางเดินหายใจ เพิ่มความดัน ปวดศีรษะ คลื่นไส้อาเจียน และเป็นสารกระตุ้นอาการแพ้

3. สารฟูเซลออยล์ได้แก่แอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงๆ เช่น 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol,2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 3-pentanol และ 1-hexanol สารเหล่านี้เป็นสารกระตุ้นอาการแพ้เป็นสารเร่งการก่อมะเร็ง

2.1.8 สถานการณ์การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในโลก (สิริวุทธิ์, 2552)

ในต่างประเทศมีการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงมานานแล้วจากการรายงานของบริษัทบางจากปิโตรเลียมจำกัด (มหาชน) การผลิตเอทานอลของโลกมีมากกว่า 13,000 ล้านลิตรต่อปี

บราซิลเป็นประเทศที่ผลิตและใช้เอทานอลมากที่สุดในโลกมีการใช้เอทานอลอย่างแพร่หลายตั้งแต่ปี 1975 ในปัจจุบันมีการผลิตเอทานอลรวม 13,000 ล้านลิตรต่อปีและนำไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่โดยใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงโดยตรงกับรถยนต์ที่ได้รับการปรับแต่งเครื่องยนต์แล้วมีประมาณ 4 ล้านคันและใช้เอทานอลจำนวนร้อยละ 22 ผสมในน้ำมันเบนซินเพื่อใช้กับเครื่องยนต์ปกติประมาณ 12 ล้านคัน

สำหรับสหรัฐอเมริกาได้พัฒนาเชื้อเพลิงทดแทนตั้งแต่ปี 1979 มีการออกกฎหมายและมาตรการสนับสนุนด้านการลงทุนให้เงินกู้ดอกเบี้ยต่ำและช่วยเหลือทางด้านภาษีเพื่อเป็นแรงจูงใจทั้งผู้ผลิตและผู้ใช้หันมาให้ความนิยมเชื้อเพลิงทดแทนโดยเฉพาะเอทานอลมากยิ่งขึ้นมีปริมาณการผลิตรวม 7,000 ล้านลิตรต่อปีเป็นอันดับสองรองจากบราซิล

ประเทศสหภาพยุโรปได้ตั้งเป้าหมายให้สมาชิกใช้พลังงานทดแทนในอัตรา 12 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานทั้งหมดในปี 2010 ปัจจุบันมีปริมาณการผลิตรวม 2,000 ล้านลิตรต่อปีฝรั่งเศสเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดคาดว่าความต้องการใช้เอทานอลในยุโรปจะเพิ่มขึ้นเป็น12,000 ล้านลิตรต่อปีในอีก 10 ปีข้างหน้าทั้งนี้แม้ว่ากลุ่มประเทศสหภาพยุโรปจะกำหนดให้แต่ละประเทศใช้น้ำมันเชื้อเพลิงสูตรผสมเอทานอลแต่ปัจจุบันยังไม่ค่อยนิยมนำเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงมากนักมีเพียงประเทศฝรั่งเศสเท่านั้นที่เริ่มออกกฎหมายและมาตรการที่จำเป็นเพื่อสนับสนุนการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่มีสาร ETBE เป็นส่วนผสมส่วนประเทศสเปนสวีเดนและเนเธอร์แลนด์มีการใช้มาตรการกระตุ้นทางภาษี

เอเชียมีปริมาณการผลิตรวม 5,500 ล้านลิตรต่อปีโดยจีนเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดรองลงมาได้แก่อินเดียส่วนญี่ปุ่นและเกาหลีใต้เป็นผู้นำเข้ารายใหญ่การใช้เอทานอลในเอเชียส่วนใหญ่ใช้เพื่อการบริโภคส่วนออสเตรเลียมีปริมาณการผลิตรวม 110 ล้านลิตรต่อปี

ปัจจุบันการซื้อขายเอทานอลในตลาดโลกมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นมีปริมาณเอทานอลในตลาดโลกปีละประมาณ 3,500 - 4,000 ล้านลิตรและในอนาคตปริมาณการค้าในตลาดโลกจะขยายตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มมากขึ้นอีกเนื่องจากหลายประเทศมีนโยบายสนับสนุนให้มีการใช้เอทานอลในรูปของเชื้อเพลิงเพื่อเป็นการลดมลภาวะทางอากาศ

ประเทศที่มีการส่งออกมากที่สุดในทวีปอเมริกาคือบราซิลปีละ 1,000 ล้านลิตรโดยส่งไปยังตลาดในแถบยุโรปตะวันออกในยุโรปประเทศที่ส่งออกมากที่สุดคือฝรั่งเศสและประเทศในเอเชียที่ส่งออกมากที่สุดคือจีนในขณะที่ญี่ปุ่นเป็นประเทศผู้นำเข้ารายใหญ่ที่สุดของโลกปริมาณปีละ 450 ล้านลิตรต่อปี

2.1.9 สถานการณ์การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในประเทศไทย (สิริวุทธิ์, 2552)

แนวพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวด้านการนำพืชผลการเกษตรมาพัฒนาเป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนการใช้น้ำมันปิโตรเลียมนั้นเริ่มขึ้นเมื่อกว่า 20 ปีที่ผ่านมาซึ่งในขณะนั้นเกิดปัญหาน้ำมันดิบในตลาดโลกมีราคาสูงขึ้นมากหลังจากนั้นเป็นต้นมาหน่วยงานภาครัฐเอกชนสถานศึกษาและมหาวิทยาลัยต่างๆได้ทำวิจัยโดยใช้พืชทางการเกษตรได้แก่ฟางข้าวมันสำปะหลังและอ้อยซึ่งผลิตได้เป็นจำนวนมากราคาถูกและสามารถผลิตได้เองในประเทศจากการที่เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงพลังงานทดแทนที่สำคัญสำหรับประเทศไทยและเพื่อให้การส่งเสริมการผลิตและจำหน่ายเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงมีการดำเนินการอย่างเป็นระบบต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพคณะรัฐมนตรีจึงได้มีมติเมื่อวันที่ 19 กันยายน พ.ศ. 2543 เห็นชอบในหลักการโครงการผลิตแอลกอฮอล์จากพืชเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงและมอบหมายให้กระทรวงอุตสาหกรรมแต่งตั้งคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติซึ่งประกอบด้วยผู้แทนระดับสูงจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องต่อมาในปีพ.ศ. 2543 ได้มีมติจากคณะรัฐมนตรีให้ออกใบอนุญาตให้กับบริษัทเอกชนในการก่อสร้างโรงงานผลิตเอทานอลให้เพียงพอต่อความต้องการในประเทศรวมทั้งสิ้น 8 โรงงาน

ในรูปน้ำมันเชื้อเพลิงข้อจำกัดเหล่านี้เป็นแรงผลักดันให้การวางแผนด้านการจัดหาพลังงานเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศต้องปรับเปลี่ยนรัฐบาลภายใต้การนำของพันตำรวจโททักษิณชินวัตรนายกรัฐมนตรีได้กำหนดใช้นโยบายพลังงานทดแทนเป็นวาระแห่งชาติที่ทุกฝ่ายต้องขับเคลื่อนให้เห็นผลเชิงรูปธรรมโดยกำหนดเป้าหมายเพิ่มการใช้พลังงานทดแทนจากร้อยละ 0.5 ในขณะนี้เป็นร้อยละ8 ในอีก 7 ปีข้างหน้าการดำเนินการอย่างสำคัญคือการพัฒนาและส่งเสริมการใช้เชื้อเพลิงทางเลือกให้เพิ่มมากขึ้นทั้งเอทานอลที่นำมาผสมกับน้ำมันเบนซินเป็นน้ำมันแก๊สโซฮอล์ไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันและน้ำมันพืชใช้แล้วรวมถึงก๊าซเอ็นจีวีซึ่งเป็นเชื้อเพลิงจากฟอสซิลแต่มีราคาถูกกว่าน้ำมันและผลิตภายในประเทศ

2.2 การผลิตเอทานอล (สิริวุทธิ์, 2552)

เอทานอลโดยทั่วไปสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ

1. การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical Synthesis) โดยใชเอทิลีน (Ethylene) ที่เป็นผลิตผลพลอยได้จากปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ เอทานอลที่ผลิตโดยวิธีนี้ไม่สามารถนำมาบริโภคได้

2. การหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ (Fermentation) โดยเชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อยและกากน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และอื่นๆ และประเภทสุดท้ายคือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic material) ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เช่น ฟางข้าว กากอ้อย และซังข้าวโพด เป็นต้น ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

2.2.1 การหมักเอทานอล

เอทานอลผลิตได้จากพืชมีขั้นตอนขบวนการเคมีในการผลิตเอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากพืชเช่นมันสำปะหลังอ้อยและกากน้ำตาลในกระบวนการผลิตหากใช้วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลสจะต้องนำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนโดยการใช้กรดหรือเอนไซม์ส่วนวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลสามารถนำมาหมักกับเชื้อยีสต์ได้โดยตรงใช้เวลาในการหมักประมาณ 2-3 วันจะได้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตรจากนั้นต้องนำไปกลั่นแยกแบบลำดับส่วนจะได้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตรในกรณีที่ต้องนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงที่จะใช้ในรถยนต์ในรูปแก๊สโซฮอล์และดีโซฮอล์จะต้องแยกส่วนน้ำออกจากเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิมากกว่า 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีการกลั่นกับสารตัวที่สามหรือแยกด้วยเครื่องโมเลกคูลาซีฟ (molecular sieve) หรือเครื่องแยกระบบเมมเบรน

2.2.2 การเตรียมน้ำตาลเพื่อการหมักเอทานอล

การเปลี่ยนแป้งหรือวัสดุเซลลูโลสอื่นเป็นน้ำตาลเพื่อให้มีสภาพเหมาะกับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ในส่วนต่อไปวัตถุดิบส่วนที่เป็นแป้งที่ได้จากธัญพืชจำเป็นต้องผ่านขบวนการย่อยสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์ร่วมในขบวนการเอนไซม์นี้เป็นกลุ่มอะไมเลส (amylase) ซึ่งมี 2 ประเภทคือ

1. Endoamylase ย่อยแป้งแบบกลุ่มทำให้ได้แป้งโมเลกุลเล็กและเด็กซตรินเอนไซม์ประเภทนี้คือแอลฟ่าอะไมเลส (alfa-amylase)

2. Exoamylase ย่อยแป้งจากปลายทำให้ได้กลูโคสเอนไซม์ประเภทนี้คือเบต้าอะไมเลส (beta-amylase) และกลูโคอะไมเลส glucoamylase

การหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์มีองค์ประกอบที่ต้องมีความเข้าใจและจัดการให้มีความสมดุลย์ 2 ส่วนคือ

- ลักษณะเฉพาะและคุณสมบัติของยีสต์
- จัดการให้มีปัจจัยที่จำเป็นต่อการทำงานของยีสต์

การหมักเอทานอลส่วนมากใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้สูงและสามารถทนสภาพแวดล้อมที่มีเอทานแลได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นการทำงานของยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลคลูโคสเป็นเอทานอลเกิดขึ้นในระดับเซลล์และปลดปล่อยเอทานอลออกมาภายนอกเซลล์ตามทฤษฎีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้ 51.1 เปอร์เซ็นต์และส่วนที่เหลือ 48.9 เปอร์เซ็นต์เป็นแก๊สคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ดังสมการ

$$\underset{\text{(แป้ง)}}{(C_6H_{12}O_5)_n} + nH_2O \longrightarrow \underset{\text{(น้ำตาล)}}{nC_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{(เอทานอล)}}{2nC_2H_5OH} + 2nCO_2$$

ในทางปฏิบัติมีน้ำตาลเพียงประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เปลี่ยนเป็นเอทานอลส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างสารอื่นได้แก่คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 46.5 อะซิตัลดีไฮด์ร้อยละ 0.3 กรดอะซิติกร้อยละ 0.25 กลีเซอรีนร้อยละ 3.0 กรดแลกติกกรดซัลซินิกฟูเซลออยล์ร้อยละ 0.25-0.50 และเฟอฟูรอลอีกเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 การกลั่นเอทานอล

ขบวนการกลั่นแยกน้ำออกจากเอทานอลซึ่งเมื่อมีความเข้มข้นของสารละลายที่ 95 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักจะเกิดรูป azeotrope ของสารละลายซึ่งการกลั่นแยกน้ำออกแบบธรรมดาไม่สามารถแยกเอทานอลให้บริสุทธิ์ได้การแยกน้ำออกจากเอทานอลจนได้เอทานอลที่ความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ปัจจุบันมีขบวนการแยก 3 วิธีคือ

1. การแยกน้ำโดยการกลั่นด้วยการเติมสารตัวที่ 3 วิธีนี้ใช้พลังงานมากและมีต้นทุนสูงโดยต้องใช้สารเติมเพื่อแยกเอทานอลจากน้ำคือเบนซิน (benzene) ต่อมาพบว่าเป็นสารที่อันตรายมากจึงเปลี่ยนไปใช้สารจำพวกไซโคลเฮกเซน (cyclo-hexane) แล้วจึงกลั่นแยกเอทานอลออกมาจากสารที่เติมเข้าไป

2. การใช้โมเลกูล่าซีฟ

3. การแยกน้ำโดยการใช้ membrane ขบวนการ pervaporation วิธีนี้มีความสะดวกใช้พลังงานน้อยและได้สารที่บริสุทธิ์เช่นเดียวกับวิธีอื่นและมีส่วนช่วยทางด้านการประหยัดพลังงานและสิ่งแวดล้อมการแยกน้ำโดยกระบวนการ pervaporation จะไม่ขึ้นอยู่กับสมดุลของเทอร์โมไดนามิกส์แต่จะอาศัยองค์ประกอบที่ต่างชนิดกันในสารละลายที่มีความสามารถในการละลาย/แพร่ผ่าน membrane ไม่เท่ากันหรือกล่าวว่ามีผลต่างของศักยภาพเคมีเป็นแรงขับ (driving force) ทำให้ในการใช้งาน pervaporation จะใช้ได้ดีในกรณีที่การแยกสารโดยวิธีการกลั่นนั้นทำได้ยากและมีราคาสูงแต่กระบวนการ pervaporation จะไม่มีปัญหาในกรณีนี้และลดความจำเป็นที่ต้องเติมสารอื่นหรือต้องกำจัดสารอื่นและยังลดการใช้พลังงานในขบวนการมากกว่าการกลั่น

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล (กมล และ สุเปรมปรีดิ์, 2540)

วัตถุดิบหลักที่ใช้ในหารหมักเอทานอล สามารถแบ่งออกได้ ดังนี้

1. น้ำตาล จากวัตถุดิบพวกอ้อย หัวบีท กากน้ำตาล และของเสียจากโรงงานบางประเภท
2. แป้งจากวัตถุดิบพวกข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลังและอื่นๆ
3. เซลลูโลส จากวัตถุดิบพวกเศษไม้ และของเหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด เป็นต้น
4. ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น น้ำหางนม น้ำแช่เยื่อกระดาษ น้ำแช่ข้าวโพด และน้ำทิ้งจากโรงงานผลไม้ เป็นต้น

ในบรรดาวัตถุดิบทั้งหลาย น้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดโดยเฉพาะกากน้ำตาล เป็นวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ส่วนวัตถุดิบประเภทแป้ง เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของแป้งประกอบด้วย อะไมโลส และ อะไมโลเพคติน โดยมีส่วนประกอบหลักเป็นกลูโคส ดังนั้นจึงต้องใช้เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ย่อยแป้งให้ได้เป็นน้ำตาล แล้วจึงนำไปใช้หมักแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังใช้กรดในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก็ได้แต่เป็นขั้นตอนที่ไม่เหมาะสมหลายประการ เช่น การกัดกร่อนภาชนะด้วยกรด เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	วัตถุดิบที่ใช้	ส่วนประกอบที่ได้จากการย่อยสลาย
ซูโครส	อ้อย บีท กากน้ำตาล	กลูโคสและฟรุคโตส
แป้ง	ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง มันฝรั่ง เผือก	กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรเอส และเดกซ์ตริน
เซลลูโลส	ไม้ เศษไม้ ของเหลือจากการเกษตร (ชานอ้อย ฟางข้าว)	กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส อราบิโนส และไซโลส
แลคโตส	น้ำหางนม	กลูโคสและกาแลคโตส

ที่มา : กมล และ สุเปรมปรีดิ์ (2540)

2.3.1 ความพร้อมด้านวัตถุดิบ

มันสำปะหลัง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ประมาณการผลผลิตมันสำปะหลังในฤดูการผลิต ปี 2550/2551 – ปี 2553/54 จะมีผลผลิตประมาณ 27.62 – 33.58 ล้านตัน เมื่อใช้สำหรับการผลิตมันอัดเม็ด/มันเส้น และแป้งมันสำหรับบริโภคภายในประเทศจำนวน 7.67 – 8.21 ล้านตัน และส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศจำนวน 19.74 – 21.42ล้านตันแล้ว จะเหลือมันสำปะหลังสำหรับผลิตเอทานอล 0.21 – 3.95 ล้านตัน ผลิตเอทานอลได้ประมาณ 0.10 - 1.84 ล้านลิตรต่อวัน

อ้อยและกากน้ำตาล สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม ได้ประมาณการผลิตและความต้องการใช้ในฤดูการผลิต 2550/2551–2553/54 ว่าจะมีผลผลิตอ้อยประมาณ 73.30 – 82.50 ล้านตัน ผลผลิตกากน้ำตาล 3.30 – 3.71 ล้านตัน เมื่อใช้กากน้ำตาลสำหรับการบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ จำนวน 1.86 – 1.90 ล้านตันแล้ว จะเหลือกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอล 1.44 – 1.81 ล้านตัน ใช้ผลิตเอทานอลได้ประมาณวันละ 0.99 - 1.24 ล้านลิตร

สำหรับพืชพลังงานชนิดอื่น จากการเสวนาทางวิชาการของสถาบันยุทธศาสตร์การค้า พบว่า ข้าวโพด แม้จะมีความเหมาะสมต่อการผลิตเป็นเอทานอล แต่ไทยมีปริมาณผลผลิตปีละ 3.8 ล้านตัน (รวมกับที่นำเข้าจากต่างประเทศ 2 แสนตัน) ในขณะที่มีความต้องการใช้ภายในประเทศ 3.3 ล้านตัน เหลือสำหรับส่งออก 5 แสนตัน ซึ่งตัวเลขการส่งออกดังกล่าวเป็นเพียงระบบการจัดการสต็อกเท่านั้น จึงถือว่าอุตสาหกรรมข้าวโพดของไทยอยู่ในภาวะสมดุล ไม่ควรนำมาผลิตเอทานอล ส่วนข้าวฟ่างหวาน แม้จะมีความเหมาะสมสำหรับผลิตเอทานอล แต่ยังมีจำนวนน้อย ไม่คุ้มสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบของโรงงานผลิตเอทานอลที่มีอยู่ในปัจจุบัน

อย่างไรก็ตาม เพียงนำเอากากน้ำตาล อ้อย และมันสำปะหลังทั้งหมด ที่โดยปกติถูกนำไปแปรรูปเพื่อส่งออก มาผลิตเป็นเอทานอล ก็จะได้เอทานอลประมาณ 6,300 ล้านลิตร หรือประมาณร้อยละ 87.53 ของการใช้น้ำมันเบนซินภายในประเทศ จึงเป็นปริมาณที่เพียงพอสำหรับใช้เป็นพลังงานทดแทนภายในประเทศอย่างแน่นอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เชื้อยีสต์ในการผลิตเอทานอล (อนุสิษฐ์, 2554)

2.4.1 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

1. ให้ความเข้มข้นของเอทานอลและมีอัตราการหมักได้เอทานอลสูง
2. ทนต่อเอทานอลที่เกิดขึ้น เนื่องจากถ้าจุลินทรีย์มีความไวต่อเอทานอล จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายปริมาณต่ำ
3. ทนต่อสภาวะกรดหรือพีเอชต่ำ
4. มีความสามารถในการตกตะกอน เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ง่าย
5. มีความคงตัวทางพันธุกรรม ไม่ปลี่ยนแปลงง่าย
6. สามารถทนต่อแรงดันออสโมซิสที่เปลี่ยนแปลงไปได้

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการหมักที่ใช้ยีสต์ในการผลิตจัดเป็นอุตสาหกรรมหมักที่ใหญ่ที่สุด มีดังนี้

1. เครื่องดื่มที่มีแอลกอออล์ (Alcoholic beverages)ได้แก่ เบียร์ และสุราชนิดต่างๆ
2. ยีสต์ในการทำขนมปัง (Baker's yeast)
3. ยีสต์อาหารคนและอาหารสัตว์ (Food and fodder yeast)
4. แอลกอฮอล์เชื้อเพลิง (Fuel alcohol)

2.4.2 วงจรชีวิตของยีสต์ (นวลจิตต์, 2543)

ยีสต์จีนัส *Saccharomyces* มีรูปร่างเป็นเซลล์เดียว (unicellular) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 ไมครอน เจริญได้ดีในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding)

2.4.3 ยีสต์ที่ผลิตเอทานอล

1. จีนัส *Saccharomyces*

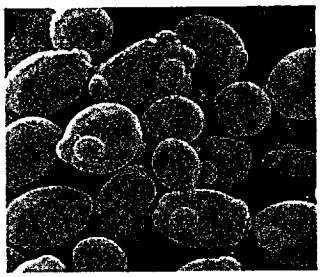
ได้แก่ *Saccharomy cescerevisiae Saccharomyces uvarum Saccharomyces bataiae Saccharomyces carlsbergensis Saccharomyces globosus*โดยยีสต์เหล่านี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์ของยีสต์
กลูโคส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
กาแลคโตส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
ซูโครส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
มอลโตส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
แลคโตส	ไม่มีสายพันธุ์ที่ผลิตได้

ที่มา : กมล และ สุเปรมปรีดี (2540)

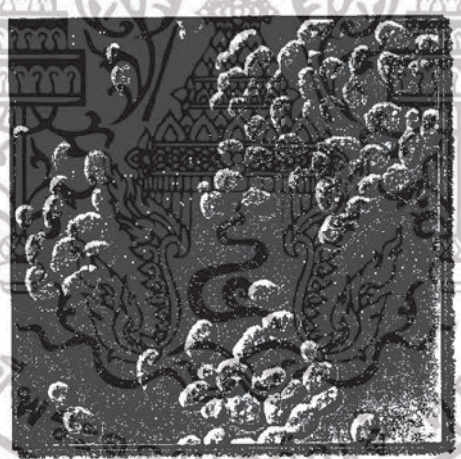
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงรูปเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae*
ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1509/Saccharomycescerevisiae (สืบค้น 17 ตุลาคม 2556)

2. เชื้อยีสต์ *Candida shehatae* (Kreger-Van Rij, 1984)
การจัดจำแนกทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* ดังนี้

ไฟลัม	:	*Deuteromycotina* (Imperfect fungi)
ชั้น	:	*Blastomycetes*
วงศ์	:	*Crytococcaceae*
สกุล	:	*Candida*
สปีชี่ส์	:	*Candida shehatae*



รูปที่ 2.3 แสดงเซลล์ของเชื้อ*Candida shehatae*
ที่มา : http://www.ncyc.co.uk/print-photo-ncyc-CBS5813.html (สืบค้น 17 ตุลาคม 2556)

เชื้อ *C. shehatae* เป็นหนึ่งในจำนวนเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลส (Xylose-Fermenting Yeast) เชื้อ *C. shehatae* สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วบนแหล่งอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic Condition) หมักไซโลสภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ (Anaerobic Condition) และผลิตไซลิทอล (Xylitol) ค่อนข้างเล็กน้อย มีการศึกษา *C.shehatae* เนื่องด้วยความสามารถดังกล่าวที่สามารถใช้ไซโลสได้ดีเท่าๆกับกลูโคส โดยสามารถใช้กลูโคสได้เร็วกว่าไซโลสเพียงเล็กน้อยเท่านั้นลักษณะที่ค่อนข้างทนต่อสภาวะความเข้มข้นเอทานอลสูง (Ethanol Tolerance) นอกจากคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอล โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ไซลิทอลจะถูกเปลี่ยนเป็น ไซลูโลสและไซลูโลสที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนต่อไปเพื่อสร้างไพรูเวท ซึ่งถ้ามีออกซิเจน ไพรูเวทจะเข้าสู่วัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle) เพื่อสร้างพลังงาน แต่ถ้ามีออกซิเจนน้อยไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล

2.5 แหล่งชีวมวล (Ohm-Sha, 2002)

2.5.1 เซลลูโลส

ความหมายของเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์สายยาวและมีมวลโมเลกุลสูงประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า (1,4) (β-(1,4) glucosidic linkage) ประมาณ 10,000 หน่วย

โครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลสมีโครงสร้างเส้นใยเล็กๆที่เรียกว่าไฟบริล (fibril) ซึ่งมีลักษณะเป็นมัดยาวรวมกันอยู่อย่างแข็งแรงด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซีลการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไฟบริลทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างหลายรูปแบบโครงสร้างทางเคมีและกายภาพของเซลลูโลสเกิดจากไฟบริลหรือโปรโตไฟบริลที่มีการเรียงตัวขนานและจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงซึ่งเมื่อตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นแผ่นบางๆและเมื่อตัดขวางแผ่นบางๆเหล่านี้จะพบส่วนที่เป็นโครงสร้างผลึกที่มีการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเรียงตัวขนานกันไปโดยบางส่วนอาจเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบซึ่งบริเวณนี้ทำให้เซลลูโลสสลายตัวและแยกออกจากกันได้โดยการเข้าทำปฏิกิริยาของของเหลวเช่นกรด แก่นอกจากนี้ยังอาจเกิดเป็นรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายโดยแรงกลเนื่องจากความไม่เป็นระเบียบและขีดจำกัดของความยืดหยุ่นของไมโครไฟบริล

สมบัติของเซลลูโลส

สมบัติของเซลลูโลสมักมีส่วนที่เกี่ยวข้องกับน้ำโดยเมื่อความชื้นสัมพัทธ์โดยรอบเปลี่ยนแปลงไปเซลลูโลสที่มีลักษณะแห้งจะดูดความชื้นทำให้เซลลูโลสสามารถพองตัวหรือหดตัวได้แต่ในบางภาวะเช่นเมื่อเซลลูโลสอยู่ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเช่นเบนซีนเซลลูโลสจะไม่เกิดการพองตัวเหมือนอยู่ในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นน้ำความสามารถในการพองตัวของเซลลูโลสอยู่ในช่วงร้อยละ 9-21.1 ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุโดยการดูดน้ำหรือความชื้นจะเกิดจากท่อขนาดเล็กจำนวนมากที่อยู่ตามพื้นที่ผิวสัมผัสของเซลลูโลสและพื้นที่ทั้งหมดของวัสดุโดยทั่วไปเซลลูโลสสามารถพองตัวได้ประมาณ 100 เท่าของวัสดุขณะแห้งซึ่งการพองตัวได้จะทำให้ตัวทำละลายต่างๆเข้าทำลายโครงสร้างได้ง่ายขึ้น

2.5.2 เฮมิเซลลูโลส

ความหมายของเฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำและมีปริมาณการเกิดเป็นพอลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) ประมาณ 200 โดยมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลสหลายชนิดกล่าวคือมีไซโลสมากที่สุดร้อยละ 85-90 และส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม กรดแมนนูโรนิก (mannuronic acid) และกรดกาแลกตูโรนิก (galacturonic acid) เป็นองค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยกรดหรือเบสเจือจางหรือเอนไซม์เพราะเฮมิเซลลูโลสไม่มีรูปร่างแน่นอนไม่เป็นเส้นตรงและมีลำดับของหน่วยย่อยน้ำตาลที่เรียงตัวแบบสุ่มจึงทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่างไซโลสถูกทำลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

พืชประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสประมาณ 1 ใน 3 ของน้ำหนักแห้งโดยอยู่รวมกับเซลลูโลสและลิกนินทำให้เกิดเป็นผนังเซลล์พืชที่แข็งแรงเฮมิเซลลูโลสมีทั้งโครงสร้างที่เป็นสายโซ่ตรงและโซ่กิ่งของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมได้แก่ไซโลสและอะราบิโนสและน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมได้แก่กลูโคสแมนโนสและกาแลกโตสองค์ประกอบส่วนใหญ่ในเฮมิเซลลูโลสเป็นไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า (1,4) และพบในไม้เนื้อแข็งมากกว่าไม้เนื้ออ่อนทั้งนี้ไม่ค่อยพบเฮมิเซลลูโลสที่มีไซโลสเพียงชนิดเดียวในธรรมชาติจึงมักพบอยู่รวมกับน้ำตาลชนิดอื่นๆและมีส่วนของลิกนินจับตัวกันอยู่อย่างหนาแน่นด้วยพันธะโควาเลนท์โดยทั่วไปเฮมิเซลลูโลสจะมีความเป็นกรดเนื่องจากมีหมู่ 4-เมธิล แอลฟา-ดี -กลูโคส (4-methyl-α-D-glucose) จับอยู่กับออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 ซึ่งการมีหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 2 และ 3 ส่งผลให้สามารถสกัดเฮมิเซลลูโลสออกโดยง่ายด้วยสารละลายเบสแต่ขั้นตอนของการสกัดเฮมิเซลลูโลสออกนั้นอาจต้องมีการกำจัดลิกนิน (delignification) ร่วมด้วย

สมบัติของเฮมิเซลลูโลส

ส่วนใหญ่จะพบเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ชั้นนอกสุดและพบส่วนน้อยในผนังเซลล์ชั้นที่ 2 โดยจะถูกย่อยสลายและสกัดออกจากผนังเซลล์พืชได้ในภาวะที่ไม่รุนแรงเนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลมีโซ่กิ่งเป็นจำนวนมากคล้ายกับโครงสร้างของเพกตินโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสจะชอบน้ำทำให้เกิดการรวมตัวกับน้ำเกิดเป็นเจลได้ขณะที่เมื่อเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จะไม่สามารถสกัดออกได้ด้วยน้ำแต่สามารถละลายได้ในเบส

2.5.3 ลิกนิน

ความหมายของลิกนิน

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่พบในผนังเซลล์พืชที่มีความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างร่วมกับเซลลูโลสและพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆลิกนินประกอบด้วยโมเลกุลที่เป็นวงแหวนที่ต่อกันแบบสุ่มเป็นโครงสร้าง 3 มิติโดยภายในโครงสร้างจะเชื่อมกันด้วยพันธะอีเธอร์หรือคาร์บอนระหว่าง 2 โมเลกุลทำให้ลิกนินทนทานต่อการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์มากกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆดังนั้นจึงต้องอาศัยสารเคมีในการแยกลิกนินออกจากพอลิแซ็กคาไรด์

โครงสร้างของลิกนิน

ลิกนินมีโครงสร้างที่เกิดจากหน่วยที่เหมือนกันซ้ำๆประกอบเป็นโมเลกุลที่ใหญ่มีการเชื่อมต่อกันของหน่วยย่อยคือฟีนิลโพรพานอยด์ (phenyl propanoid) ที่มีหมู่เมธิลอยู่บนโมเลกุล

สมบัติของลิกนิน

ลิกนินมีสมบัติที่สำคัญคือการละลายในตัวทำละลายโดยปกติลิกนินจะไม่ละลายน้ำและตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วดังนั้นจึงสามารถสกัดลิกนินได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงขณะที่บางส่วนในกลุ่มของอัลคาไลน์ลิกนิน (alkaline lignin) สามารถละลายได้ในตัวทำละลายพวกไดออกเซน (dioxane) ไพริดีน (pyridine) และสารละลายเบสเจือจางได้นอกจากนี้เมื่อมีการเติมหมู่เมธิล (methylation) และหมู่อะซีติล (acetylation) แทนที่ตำแหน่งต่างๆบนวงแหวนเบนซีนในโครงสร้างของลิกนินทำให้ลิกนินสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 280 นาโนเมตรทั้งนี้การเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ก็เป็นการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลให้แก่โครงสร้างของลิกนินทำให้ลิกนินสามารถดูดกลืนแสงได้ด้วยการที่ลิกนินอยู่รวมกับเซลลูโลสในเนื้อไม้ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรงได้ตามธรรมชาติรวมทั้งยังทำให้จุลินทรีย์และเอนไซม์ไม่สามารถทำลายโครงสร้างพืชได้ง่ายโดยโครงสร้างที่ลิกนินอยู่รวมกับเซลลูโลสจะมีพันธะโควาเลนท์เชื่อมระหว่างลิกนินและเฮมิเซลลูโลสดังนั้นเพื่อให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ประโยชน์จากวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสมีมากขึ้นจึงต้องใช้การปรับสภาพวัสดุเหล่านี้ก่อนและป้องกันผลเสียที่เกิดจากลิกนินรวมทั้งให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

2.6 การปรับสภาพ (ชัชนันท์ และเฉลิม, 2555)

2.6.1 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบและทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้นเช่นการบดการใช้ความร้อน

2.6.2 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment)

จะใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลสเพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลสหรือใช้สารละลายด่างเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน

2.6.3 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-chemical Pretreatment)

เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมีดังเช่นในตัวอย่างการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และความร้อนในสภาวะความดันสูงของการปรับสภาพฟางข้าวในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์พบว่าประสิทธิภาพการย่อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และความร้อนที่เพิ่มขึ้นแต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงเพียงอย่างเดียวพบว่าการย่อยสลายลดลงเมื่อความร้อนเพิ่มขึ้นเนื่องจากการแตกตัวของน้ำตาลที่เกิดขึ้นเปลี่ยนเป็นสารประเภทเฟอฟูรัล (Furfural) สารฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) หรือกรดฟอร์มิก (Formic Acid) ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์

2.6.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก

2.7 การย่อยหรือไฮโดรไลซิส (ชัชนันท์ และเฉลิม, 2555)

วัสดุเซลลูโลสตามธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดการสลายตัวจากการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งพบทั่วไปในจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากในเชื้อราเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูงในสภาวะการทำงานที่เหมาะสมจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วถึง 10^{8}-10^{11} เท่าเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความเฉพาะ (specificity) ต่อปฏิกิริยาหนึ่งๆเท่านั้นทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงแม้ว่าเอนไซม์จะถูกสร้างอยู่ภายในเซลล์แต่สามารถสกัดออกมาใช้งานได้เช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในเซลล์

2.7.1 การไฮโดรไลซีสด้วยกรด

เป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปกรดทุกชนิดสามารถนำมาใช้ได้ แต่กรดที่ใช้ทั่วๆไปได้แก่กรดซัลฟิวริกหรือกรดกำมะถันเพราะมีราคาถูก กระบวนการใช้กรดแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่กรดเจือจางและกรดเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1.1 การใช้กรดเจือจาง

กระบวนการนี้จะใช้อุณหภูมิและความดันสูงระยะเวลา ของปฏิกิริยาจะเป็นวินาทีหรือนาที เหมาะต่อกระบวนการแบบต่อเนื่อง เช่น การใช้กรดซัลฟิวริกร้อยละ 1 ในถังปฏิกรณ์ที่มีการไหลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 0.22 นาทีและอุณหภูมิ 237 องศาเซลเซียส โดยการใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์และให้ผลผลิตน้ำตาลมากกว่าร้อยละ 50 ในกรณีนี้ถ้าใช้ไม้แห้ง 0.9 ตันจะให้ผลผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ 189 ลิตร (50 แกลลอน) การใช้กรดร่วมกับอุณหภูมิและความดันสูงจำเป็นต้องใช้วัสดุพิเศษสำหรับสร้างถังปฏิกรณ์ทำให้มีค่าใช้จ่ายแพง

2.7.1.2 การใช้กรดเข้มข้น

กระบวนการนี้จะใช้อุณหภูมิต่ำและจะมีการใช้ความดันเฉพาะเมื่อต้องการปั๊มส่งถ่ายของจากถังหนึ่งไปยังอีกถังหนึ่งเท่านั้น

2.8 การลดความเป็นพิษในไฮโดรไลเซท ก่อนนำไปหมักเพื่อผลิตเอทานอล (Zhanyou Chi, 2013)

มีงานวิจัยเปรียบเทียบการหมักโดยการใช้น้ำตาลที่ใช้ในทางการค้า การใช้น้ำย่อยหรือไฮโดรไลเซทที่ผ่านการลดความเป็นพิษ (Detoxification) และการใช้ไฮโดรไลเซทที่ไม่ได้ผ่านการลดความเป็นพิษ พบว่าจุลินทรีย์เมื่อใช้ไฮโดรไลเซทที่ไม่ได้ผ่านการลดความเป็นพิษมาก่อนจะมีลักษณะทางจลนพลศาสตร์ (Kinetics) ที่ช้าและทำให้ผลได้และอัตราผลผลิตลดลง ในขณะที่จุลินทรีย์เมื่อใช้น้ำตาลที่ใช้ในทางการค้า และไฮโดรไลเซทที่ผ่านการลดความเป็นพิษจะมีลักษณะทางจลนพลศาสตร์ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นสับสเตรท (Substrates) ที่ได้จากลิกโนเซลลูโลสก่อนจะนำมาใช้ในกระบวนการหมักจึงต้องผ่านการปรับสภาพ และทำให้เป็นกลางเพื่อให้มีสภาวะเหมาะสมต่อเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์

2.9 เอนไซม์เซลลูเลส (พรเทพ, 2538)

2.9.1 การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส

ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสเกิดโดยอาศัยการย่อยสลายจุลินทรีย์หลายชนิดรวมกันในสภาพที่มีออกซิเจนผลที่ได้จากการย่อยสลายจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ฮิวมัสความร้อนและจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นโดยที่ปริมาณการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์จะได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสมมีการระบายอากาศและอุณหภูมิที่เหมาะสมมีแหล่งอาหารเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในระบบเมแทบอลิซึมและการเพิ่มจำนวนเซลล์ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนการย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไฮโดรเจนเอทานอลกรดฟอร์มิกกรดซัคซินิกกรดบิวทีริกและกรดแลกติกเป็นต้นนอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสยังสามารถทำได้โดยวิธีทางเคมีซึ่งมีการย่อยสลายด้วยสารเคมีเช่นการใช้กรดการย่อยสลายวิธีนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะไม่จำเพาะเจาะจงดังนั้นน้ำตาลกลูโลสบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่นและกรดยังทำปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นที่ติดมากับเซลลูโลสทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการนอกจากนี้โครงสร้างในส่วนที่เป็นผลึกคริสตัลลีน (crystalline) ก็ต้องใช้กรดที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคสปฏิกิริยาย่อยจึงเกิดแบบรุนแรงภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อนต้นทุนจึงสูงและกรดที่ถูกทิ้งออกมายังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วยแต่วิธีนี้ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 5-20 นาทีหรือโดยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางชีวภาพเช่นการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสวิธีนี้เป็นวิธีที่จำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลสโดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปนมาจึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งค่อนข้างบริสุทธิ์ลักษณะการย่อยจะเกิดขึ้นช้าๆปฏิกิริยาเกิดขึ้นในที่มีอุณหูมิซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก็ไม่รุนแรงนอกจากนี้ก็อาจไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนทานต่อการกัดกร่อนต้นทุนจึงต่ำกว่าและยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมหากแต่วิธีนี้น้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในรูปสารละลายเจือจาง

2.9.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (พิจิตรา, 2548)

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงเอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆที่ปนเปื้อนมาทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธ์สูงและปฏิกิริยาไม่รุนแรงซึ่งเอนไซม์ที่ถูกย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกรวมว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสเอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสหน่วยเล็กที่สุดหากการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส

จากการศึกษาระบบเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase system) โดยการแยกเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์นั้นทำให้สรุปการจัดระบบของเอนไซม์เซลลูเลสได้ว่าประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์ (Enzyme Classification (E.C)) ดังนี้

1. เอนโดกลูคาเนสหรือเอนโด-เบต้า-1,4-กลูคาเนส (E.C.3.2.1.4) (พิจิตรา, 2548) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลสเช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่งพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (random) ทำให้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิดคือเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligo-saccharides) เซลโลเพนธาโอส (cellopentaose) เซลโลไตรโอส (cellotriose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคสโดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักใดขึ้นอยู่กับสมบัติของแต่ละเอนไซม์

2. เอกโซกลูคาเนสหรือเอกโซ-1,4-กลูคาเนสหรือเอกโซเบต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนสหรือเอกโซเบต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91) พบว่ามักทำหน้าร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสโดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลสผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือน้ำตาลเซลโลไบโอสนอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส

3. เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคซิเดส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอสเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรงกลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสอาศัยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน

ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้เช่นสัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatinafulica) และจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นโปรโตซัวแบคทีเรียแอคติโนมัยสิทและเชื้อราจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความสามารถในการย่อยลสายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่พบว่าเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(celllulolytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่เป็นเอกซ์ตร้าเซลลูลาร์เอนไซม์ (extracellular enzyme) คือเซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ทำให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลสและสะดวกต่อการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการศึกษาหรือใช้ในอุตสาหกรรม (พิจิตรา, 2548)

2.9.3 การยับยั้งการสร้างและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสจะมีการยับยั้งการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส 2 แบบคือการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-completitive) และการยับยั้งแบบแข่งขัน (completitive) สารที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขันได้ได้แก่เซลโลไบโอสและกลูโคสสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบบแข่งขันโดยจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคซิเดสได้แก่กลูโคสทั้งนี้พบการยับยั้งได้แม้แต่ในอาหารที่มีการเติมตัวเหนี่ยวนำ (Fan and Lee, 1983; Moo-Yong และคณะ, 1983) Duff และคณะ, (1996) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละตัวจะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการย่อยสลายกล่าวคือกิจกรรมของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสจะถูกยับยั้งโดยเซลโลไบโอสเช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดสที่ถูกยับยั้งโดยกลูโคสซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไม่รุนแรงส่วนลักษณะการยับยั้งจะเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (completitive inhibition) นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบพอลลาเดียม (palladium) ก็เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์อย่างรุนแรงโดยมีรายงานว่าสารพอลลาเดียมนี้ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* และลักษณะการยับบั้งจะเป็นแบบที่เรียกว่า irreversible inhibition อย่างไรก็ตามสามารถป้องกันการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์วิธีนี้ได้โดยการเติมกรดอะมิโนชนิดฮิสทิดีนซิสเทอีนหรือซิสทีนลงไปในสารละลายผสมได้ (reaction mixture) (พิจิตรา, 2548)

2.9.4 สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส (พรเทพ, 2538)

จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าเซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วนต่อน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,00 ถึง 60,00 ดาลตันมีสมบัติละลายน้ำได้ดีไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆในการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 25-40 องศาเซลเซียสยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิดนอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูงทนต่อความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4–8 และคงทนต่อสารเคมีได้ดีสามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลาหลายปีหรือเก็บโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซิโตนหรือเอทานอลโดยไม่สูญเสียคุณสมบัติอย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันย่อมมีคุณสมบัติแตกต่างกัน

2.9.5 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ทิพวรรณ, 2553)

2.9.5.1 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรงดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้จุลินทรีย์นับว่ามีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมากจุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสมักอยู่ในกลุ่มเชื้อราแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีกเช่นชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจนธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองรวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิตซึ่งได้แก่อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้นความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อุณหภูมิการให้อากาศและอัตราการเขย่า (พรเทพ, 2538)

2.9.5.2 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตเพื่อการค้ามักเป็นเอนไซม์เซลลูเลสผสมที่สกัดได้จากเชื้อราชนิดที่แตกต่างกันไปและให้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้องค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่ใช้ในการผลิตการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสกระทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งขึ้นอยู่กับความเหมะสมการที่จะให้ผลผลิตเอนไซม์สูงและให้คุณภาพดีนั้นจะต้องมีการควบคุมสภาวะต่างๆให้เหมาะสมเช่นอุณหภูมิชนิดอาหารที่ใช้ต้องเหมาะสมพีเอชการปนปื้อนรวมทั้งคำนึงถึงราคาต้นทุนในการผลิตด้วยนอกจากนี้การใส่สารเร่งการเจริญแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์สารเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ก็เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงด้วยสารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้แก่สารประกอบเซลลูโลสอนุพันธ์ของเซลลูโลสและสารที่มีพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกเช่น cellobiose, sepharose และ lactose เป็นต้น (Tsao และ Chaing, 1983)

2.9.6 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสและจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส (พิจิตรา, 2548)

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสหรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ในอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมเช่นใช้ในการสลายพืชผักและกากเหลือจากเกษตรกรรมการย่อยขยะเป็นปุ๋ยหมักเป็นต้นตัวอย่างการใช้ประโยชน์ได้แก่

1. อุตสาหกรรมกระดาษพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสบางชนิดที่เหมาะสมมีส่วนช่วยลดเวลาในการตี (beating time) ทำให้กระดาษมีคุณภาพดี
2. ในกระบวนการน้ำผักกระป๋อง
3. ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้นมเปรี้ยวและทำให้ใสแล้วยังทำให้น้ำผลไม้ที่ได้เป็นเนื้อเดียวกัน
4. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเช่นอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม
5. ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์
6. ใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยหมัก
7. นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาผลิตเป็นยาอีกด้วยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นช่วยเป็นยาขับลมในกระเพาะและช่วยลดอาการแน่นท้องเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยเส้นใยได้

2.9.7 ชนิดและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (ทิพวรรณ, 2553)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์๓ชนิดที่ทำงานร่วมกันแบบ “Synergistication” ได้แก่

1. เอ็นโดกลูคาเนส (Endoglucanase, C_x) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์และยังย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอสโดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (Reducing End) ของสายโซ่เซลลูโลส

2. เอ็กโซกลูคาเนส (Exoglucanase, C_1) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์และเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอสตำแหน่งที่ทำงานเป็นแบบสุ่ม (random)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เบต้า-กลูโคสิเดส (β-glucosidase, C_b) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นดังนี้ β-glucosidase จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นซึ่งจะมีผลยับยั้งต่อเนื่องคือทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้นซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucannase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด

จากการศึกษาของ Selby และ Maitland (1976) พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ต้องทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีแต่เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะมีผลทำให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง

2.9.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (ทิพวรรณ, 2553)

1. อุณหภูมิ (Temperature)

อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียสอัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่งเรียกว่า "ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (Optimum temperature)" เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลงเพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (Denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส

2. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชค่าหนึ่งเรียกว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานณจุดที่พีเอชมีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้กิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์จะลดลงเอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอชระหว่าง 5.0 – 9.0

3. ความเข้มข้นของซับสเตรท (Substrate)

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและลดช้าลงเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทสูงขึ้นจนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก

4. ปริมาณเอนไซม์

พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะมีค่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์

5. ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme Inhibitor)

เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกระบวนการทำงานของเอนไซม์ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรทและลักษณะของ Function group ที่บริเวณ Active side ทำให้เข้าใจและสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้

2.9.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนจึงมีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ด้วยเช่นสภาพความเป็นกรด-ด่างตัวทำละลายอินทรีย์ยูเรียความร้อนหรือรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นต้น

1. ความเป็นผลึก

วัตถุดิบที่มีความเป็นผลึกอยู่มากทำให้เกิดการย่อยได้ยากขึ้น

2. องศาการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชั่น (Degree of polymerization)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นใยที่แข็งแรงเนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนยึดอยู่จึงถูกย่อยได้ยากการเพิ่มองศาการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชั่นจะทำให้เส้นใยมีความแข็งแรงมากขึ้นกว่าเดิมจึงถูกย่อยได้ยากขึ้น

3. ปริมาณคาร์บอน

ในการหมักยีสต์จะใช้คาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสใช้หมักได้ดีเท่ากันโดยปกติแหล่งน้ำตาลที่หาได้ง่ายได้จากกากน้ำตาลน้ำอ้อยข้าวฟ่างหวานและชูการ์บีท นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนยังได้จากผักตบชวาหรือพืชชนิดอื่นที่เป็นพลังงานทางเลือก เป็นต้น

- เป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เช่นจากแป้งมันชนิดต่างๆรวมทั้งมันสำปะหลังข้าวโพดและธัญพืชต่างๆ
- เป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยขบวนการจุลชีวเคมีหรือขบวนการเคมีเช่นจากกระดาษใยจากต้นพืชและขี้เลื่อยซึ่งในปัจจุบันยังอยู่ในขั้นพัฒนาให้มีต้นทุนต่ำลง

4. ปริมาณไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยสต์และเป็นสับสเตรทสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นนับว่าเป็นส่วนสำคัญที่กระตุ้นการหมักหรือการผลิตแอลกอฮอล์ (เอทานอล) โดยในตัวของยีสต์จะมีปริมาณไนโตรเจนราว 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งโดยส่วนใหญ่ยีสต์จะสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมอิออนได้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งให้ธาตุไนโตรเจนและให้ซัลเฟอร์ไปพร้อมกัน (สำหรับยีสต์บางชนิดอาจใช้ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน

5. ปริมาณซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเซลล์ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ 0.4 เปอร์เซ็นต์ แหล่งซัลเฟอร์ที่ยีสต์ใช้ได้ดีคือกรดแอมมอโนเมทไทโอนีนเกลือซัลเฟตในรูปแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีราคาถูกและเป็นแหล่งไนโตรเจนพร้อมกันไป

2.10 ปัจจัยที่สำคัญต่อการหมักเอทานอล (เยาวลักษณ์ และ เสริมเกียรติ, 2552)

การหมักเชิงอุตสาหกรรมต้องมีการควบคุมสิ่งแวดล้อมในการหมักในทุกขั้นตอนเพื่อให้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุดทั้งนี้ต้องมีความสอดคล้องกับคุณลักษณะประจำสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้

2.10.1 ความเข้มข้นของน้ำตาล

ในสภาพการหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะช่วยลดการปนเปื้อนเชื้ออื่นได้ดีแต่น้ำตาลสูงจะยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลและคุณสมบัตินี้เป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ของยีสต์เมื่อเทียบกันกับกรณีความเข้มข้นอทานอลจะมีผลยับยั้งการหมักรุนแรงกว่าแต่หากมีภาวะทั้งน้ำตาลเข้มข้นและเอทานอลสูงจะยิ่งเสริมกันให้มีลักษณะยับยั้งการหมักรุนแรงขึ้น

2.10.2 อุณหภูมิ

ในการหมักยีสต์สายพันธุ์ *S.cerevisiae* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางในช่วง 25-30 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิต่ำสุดที่จะทนได้คือ 5-10 องศาเซลเซียสในสภาพที่อาหารอุดมสมบูรณ์ยีสต์จะทนอุณหภูมิสูงได้ดีและจะหยุดเจริญเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 และเกินกว่า 40 องศาเซลเซียสการควบคุมอุณหภูมิในการหมักเชิงอุตสาหกรรมเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อประสิทธิภาพการหมักที่ดีและจำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิในถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.3 ค่าพีเอช pH

ยีสต์สายพันธุ์ *S.cerevisiae* สามารถเจริญได้ดีในสภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.4-8.6 โดยมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5 ซึ่งในสภาพเป็นกรดอ่อนนี้สามารถช่วยควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ดีการหมักเอทานอลจากซูโครสมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชมากกว่าการใช้กลูโคส

2.10.4 ความเข้มข้นของเอทานอล

ในสภาพที่มีเอทานอลสูงการเจริญและการหมักยีสต์จะถูกยับยั้งเพราะเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์เมื่อเอทานอลมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักมีผลทำให้การเจริญลดลงและจะหยุดลงเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักโดยต่อจากนั้นจะเป็นการหมักเอทานอลจนถึงเอทานอลความเข้มข้น 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักการที่ยีสต์ไม่เจริญทำให้อัตราการหมักลดลงด้วย *S.cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนเอทานอลมากที่สุด

2.10.5 ปริมาณออกซิเจน

ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อออกซิเจนมีความสำคัญมากเนื่องจากยีสต์มีการเจริญสูงในสภาวะที่มีออกซิเจนมากแต่จะมีผลให้การหมักลดลงออกซิเจนส่งเสริมให้การออกซิเดชั่นสมบูรณ์และมีการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในภาวะมีออกซิเจนยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความสำคัญที่ทำให้ยีสต์ทนเอทานอลได้มากขึ้นดังนั้นในสภาวะที่ขาดออกซิเจนยีสต์ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวได้จึงต้องมีการเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อให้ยีสต์สามารถอยู่รอดได้ยีสต์ใช้ออกซิเจนในการหายใจเพื่อการเจริญเติบโตดังนั้นในกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องควรมีการให้อากาศบ้างในระหว่างการหมักเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ทดแทนเซลล์ที่ตายลงและยังพบว่าการให้อากาศปริมาณเล็กน้อยทำให้การใช้กลูโคสได้มากขึ้นและช่วยให้ยีสต์มีความทนทานต่อเอทานอลได้ดี

2.10.6 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเติบโตของยีสต์ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนที่ความดันบรรยากาศปกติหากมีคาร์บอนไดออกไซด์สูงจะเกิดการยังยั้งการเจริญและการหมักอย่างรุนแรงโดยคาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่นและคาร์บอนไดออกไซด์ยังมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การขนถ่ายสารเข้าออกเซลล์เปลี่ยนไป

2.11 การเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอล (จรูญและปราโมทย์, 2526)

เนื่องจากปัญหาพลังงานขาดแคลนทำให้เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลก้าวหน้าไปอย่างมาก มีการค้นคว้าวิจัยหลายแนวทางโดยวิธีการที่แตกต่างกันออกไป ก็เพื่อหาทางลดต้นทุนการผลิตลงให้มากที่สุด

2.11.1 การเสาะหาและปรับปรุงสายพันธ์เชื้อจุลินทรีย์ ประกอบด้วย

1. การผสมพันธุ์และปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์

เป็นวิธีการที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในขณะนี้ วิธีการที่นำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่ Spheroplast Fusion, Transformation และ DNA Recombination

2. การใช้แบคทีเรียในการหมักแอลกอฮอล์และปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรีย

จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Zymomonas* สามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ดี และแบคทีเรียชนิดนี้มีข้อน่าสนใจคือมีอัตราการใช้น้ำตาลและอัตราการผลิตแอลกอฮอล์สูงกว่าในเชื้อยีสต์มีกระบวนการใช้น้ำตาลที่แตกต่างกับยีสต์ ทำให้ได้แอลกอฮอล์ต่อหน่วยน้ำตาลสูงกว่าในเชื้อยีสต์ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีโอกาสปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวให้ทนแอลกอฮอล์สูงได้ และสามารถใช้วัตถุดิบได้กว้างขวางกว่าเชื้อยีสต์

2.11.2 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบและวิธีการหมัก

1. การหมักโดยใช้วิธีตรึงเซลล์

เป็นการยึดเซลล์ให้เกาะกับตัวกลาง แล้วจึงผ่านน้ำตาลลงไป นิยมใช้สำหรับการหมักอย่างต่อเนื่อง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ออกมา วิธีนี้มีข้อจำกัดที่ความบริสุทธิ์ของวัตถุดิบ ความสามารถในการเกาะติดกับตัวกลาง แอลกอฮอล์ที่หมักได้มีปริมาณไม่สูงมากนัก

2. การหมักแบบสุญญากาศ

เพื่อลดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ซึ่งมีผลยับยั้งการหมัก โดยลดความดันในถังหมักให้ได้ 32-35 มิลลิเมตรปรอท จะทำให้น้ำส่าเดือดที่อุณหภูมิ 30-35 องสาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อยีสต์ทำการหมักแอลกอฮอล์นั้น แอลกอฮอล์ที่ผลิตส่วนใหญ่จะแยกไปตลอดเวลา

3. การหมักแบบต่อเนื่อง

เป็นการหมักที่ป้อนวัตถุดิบเข้าไปในถังหมักอย่างต่อเนื่องและเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา โดยในระหว่างการหมักจะต้องมีการควบคุมอย่างใกล้ชิดให้เชื้อยีสต์อยู่ในช่วงที่กำลังหมักอย่างเต็มที่ เพื่อให้กระบวนการหมักคงที่อยู่ตลอดเวลา การหมักวิธีนี้จะได้แอลกอฮอล์ต่ำกว่าการหมักในถังหมักแบบธรรมดาแต่อัตราการผลิตแอลกอฮอล์สูงกว่าหลายเท่า

4. การหมักแบบนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่

เป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ในถังหมักให้มีปริมาณมากขึ้น โดยการแยกเซลล์ออกจากน้ำส่าที่หมักแล้วกลับมาหมักใหม่โดยใช้เครื่องเหวี่ยงหรือใช้ยีสต์ที่ตกตะกอน โดยวิธีนี้ยีสต์จะหมักแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าการหมักแบบปกติ

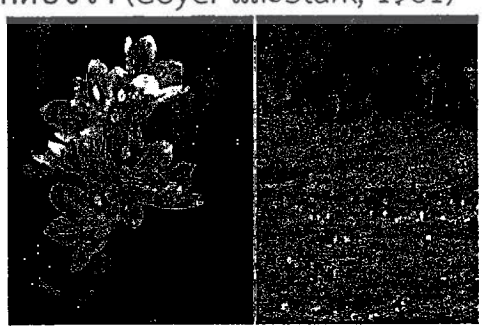
5. การหมักแบบสกัดแอลกอฮอล์

โดยใช้สารบางอย่าง เช่น l-dodecanol สกัดเอาแอลกอฮอล์ออกจากน้ำส่า สารเหล่านี้เป็นพวก aliphatic alcohol ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์

6. การหมักแอลกอฮอล์จากแป้งดิบ

เนื่องจากมีการค้นพบเชื้อราที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ เช่น *Aspergillus* และ *Rhizopus* การหมักวิธีนี้จึงได้รับความสนใจเนื่องจากไม่สิ้นเปลืองพลังงานในการต้มสุกและไม่มีปัญหาเรื่องความหนืดเรื่องของแป้งเริ่มต้นที่ความเข้มข้นสูงซึ่งจะหมักได้แอลกอฮอล์สูงด้วย นอกจากนี้เอนไซม์ที่ย่อยแป้งดิบทำงานได้ดีที่ พีเอชต่ำจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียลงไปได้

2.12 ผักตบชวา (Goyer และStark, 1981)



รูปที่ 2.4 แสดงรูปแสดงลักษณะของผักตบชวา

ที่มา : http://irrigation.rid.go.th/rid15/ppn/om/Water%20Hyacinth.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเป็นไม้น้ำ มีไหลทอดเลื้อยไปตามผิวน้ำ ต้นอวบน้ำ ใบรูปไข่ค่อนข้างกลม สีเขียวเป็นมัน ก้านใบพองออกเพื่อช่วยให้ลอยน้ำได้ ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด กลีบดอกบาง 6 กลีบ สีฟ้าอมม่วง กลีบบนขนาดใหญ่ และมีแต้มสีเหลืองกลางกลีบ ออกดอกปลายฤดูหนาวถึงต้นฤดูร้อน

สรรพคุณ :ช่วยระบายความร้อนในร่างกายผักตบชวาจัดเป็น "เอเลี่ยน สปีชี่ส์" หรือ "ชนิดพันธุ์ต่างถิ่น" ที่เข้ามาแพร่ระบาดรุกรานจนก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศน์ในประเทศไทย มีการแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ใน 1 เดือนผักตบชวาเพียง 1 ต้นอาจขยายพันธุ์ได้มากถึง 1,000 ต้น ถึงแม้น้ำจะแห้งจนต้นตายแต่เมล็ดของมันก็ยังมีชีวิตต่อไปได้นานถึง 15 ปีและทันทีที่เมล็ดได้รับน้ำที่เพียงพอมันก็จะแตกหน่อเป็นต้นใหม่ต่อไป จนกลายเป็นปัญหาทางน้ำและทวีความรุนแรงจนเป็นปัญหาระดับประเทศ ทำให้รัฐบาลต้องเสียงบประมาณในการกำจัดผักตบชวาจำนวนมาก ซึ่งไม่เพียงแต่ประเทศไทยเท่านั้นอีกกว่า 50 ประเทศทั่วโลกก็เจอปัญหาเช่นเดียวกัน จะมีก็แต่ประเทศในแถบยุโรปเท่านั้นที่ปลอดการรบกวน และบริเวณที่ถูกผักตบชวาคุกคามมากที่สุดคือ ทะเลสาบวิกตอเรีย ประเทศไทยเองเริ่มมีการกำจัดผักตบชวามาตั้งแต่สมัยรัชกาลที่ 6 ถึงขนาดมีการออกพระราชบัญญัติสำหรับกำจัดผักตบชวา พ.ศ. 2456 ปัจจุบันมีหน่วยงานและองค์กรต่างๆ ได้เข้ามาช่วยเหลือในการกำจัด เช่น นำไปผลิตเป็นของใช้ อาหารสัตว์ ทำปุ๋ย ฯลฯ และมีการนำแมลงมวนผักตบจากแหล่งกำเนิดที่ทวีปอเมริกาใต้ เข้ามาทดลองปล่อยในประเทศไทย เพื่อควบคุมจำนวนประชากรของผักตบชวา

ผักตบชวา มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Eichornia crassipes* Solms ชื่อสามัญว่า Water Hyacinth อยู่ในวงศ์ Pontederiaceae เป็นพืชน้ำประเภทใบเลี้ยงเดี่ยว ลอยน้ำได้โดยไม่ต้องมีที่ยึดเกาะ สามารถแพร่พันธุ์ได้รวดเร็วมาก แผ่นใบคล้ายรูปหัวใจเป็นมันหนา ก้านใบพองออกตรงช่องกลางภายในมีลักษณะเป็นรูพรุนช่วยพยุงลำต้นให้ลอยน้ำได้

ผักตบชวา สามารถอยู่ได้ทุกสภาพน้ำ ทั้งในน้ำสกปรกและน้ำสะอาด เจริญเติบโตได้ดีที่ pH 4-10 และอุณหภูมิของน้ำไม่สูงกว่า 34 C° และในต้นพืชจะมีน้ำเฉลี่ยประมาณร้อยละ 95 (ในใบร้อยละ 89 และในก้านใบร้อยละ 96.7) ผักตบชวาช่วยในการบำบัดน้ำเสีย โดยอาศัยคุณสมบัติทำหน้าที่เป็นตัวกรอง ผักตบชวาที่ขึ้นอยู่อย่างหนาแน่น เปรียบได้กับการบรรจุวัสดุพรุน ซึ่งกรองน้ำที่ไหลผ่านกอผักตบชวาอย่างช้าๆ จึงทำให้ของแข็งแขวนลอยต่างๆ ที่ปนอยู่ในน้ำถูกสกัดกั้น นอกจากนั้น ระบบรากที่มีจำนวนมาก ช่วยกรองสารอินทรีย์ที่ละเอียด และจุลินทรีย์ที่อาศัยเกาะอยู่ที่ราก ช่วยดูดสารอินทรีย์ไว้ด้วยอีกทางหนึ่ง รากผักตบชวาจะดูดสารอาหารที่อยู่ในน้ำ ลำเลียงไปยังใบเพื่อสังเคราะห์แสง ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเสียจึงถูกกำจัดไป อย่างไรก็ตามไนโตรเจนในน้ำเสียนั้นส่วนมากจะอยู่ในรูปสารประกอบทางเคมี เช่น สารอินทรีย์ไนโตรเจน แอมโมเนียไนโตรเจน และไนเตรทไนโตรเจน พบว่า ผักตบชวาสามารถดูดไนโตรเจนได้ทั้ง 3 ชนิด แต่ในปริมาณที่แตกต่างกันคือ ผักตบชวาสามารถดูดอินทรีย์ไนโตรเจนได้สูงกว่าไนโตรเจนในรูปอื่นๆ คือ ประมาณร้อยละ 95 ขณะที่ไนเตรทไนโตรเจน และแอมโมเนียไนโตรเจนจะลดลงประมาณร้อยละ 80 และร้อยละ 77 ตามลำดับ แต่การใช้ผักตบชวาบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูง จะส่งผลให้ผักตบชวาเจริญเร็วขึ้นและปกคลุมพื้นที่ผิวน้ำมากขึ้น จึงควรมีการดูแลระบบเก็บต้นที่เจริญเต็มที่ขึ้นจากน้ำอย่างสม่ำเสมอ ไม่เช่นนั้น เมื่อผักตบชวาตาย จะเน่าอยู่ในน้ำ ทำให้น้ำเสียนั้นมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นอีก นอกจากนี้รากของผักตบชวามีแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนแกรมลบ คือ *Azospirillum spp.* และมีคุณสมบัติพิเศษ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 2.5 กิโลกรัม/เอเคอร์/วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผักตบชวา ขึ้นได้ในทุกสภาพน้ำ และสามารถบำบัดน้ำเสียได้โดยตรง แต่ถ้าน้ำเสียมีสารมลพิษอยู่ปริมาณสูงหรือน้ำเสียมีปริมาณมาก การใช้ผักตบชวาบำบัดน้ำเสียจะให้ผลช้า และน้ำอาจเน่าเสียได้ จึงควรที่จะใช้ผักตบชวาร่วมกับการบำบัดน้ำเสียระบบอื่นด้วย จึงจะให้ผลดี

ประโยชน์

- การบริโภค ดอกอ่อนและก้านใบอ่อนกินเป็นผักลวกจิ้มน้ำพริกหรือทำแกงส้ม
- ใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ เช่นหมู ใช้ทำปุ๋ยหมัก ก้านและใบอ่อนนำมารับประทานได้

2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ธีรภัทร และคณะ (2549) พบว่ากากมันสำปะหลัง ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 24.99 และ 6.67 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สามารถนำกากมันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์เพื่อผลิตเอทานอลโดยผ่านกระบวนการ pretreatment ด้วยการไฮโดรไลส์โดยใช้กรดหรือเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ในการศึกษาไฮโดรไลส์ด้วยกรดจะใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2-5.0 โมลาร์ ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 60-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพราะว่าการใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิการย่อย 120 องศาเซลเซียส อัตราส่วนมันสำปะหลังต่อกรดซัลฟูริกเท่ากับ 1:2 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดร้อยละ6.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่การใช้วิธีไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ผสม พบว่าการใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลสและเพคติเนสที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 4.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 5.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและค่าพีเอช 4.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งได้น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 6.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และการนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 8.92 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดร้อยละ 3.62 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในชั่วโมงที่ 24 คิดเป็นประสิทธิภาพการหมักร้อยละ 91

อำนวย(2538) พบว่าเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเช่น ฟางข้าวซังข้าวโพดชานอ้อยและต้นมันสำปะหลังการใช้ประโยชน์โดยเปลี่ยนเป็นเอทานอลทำได้โดยใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์การหมักเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อราย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสและหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลจากการคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา2ชนิด3สายพันธุ์คือ*T. reesei* QM 9414 *T.reesei* QM 6a และ *Aspergillus sp.* No 3335พบว่า *T. reesei* QM 6a ให้ activity ของเอนไซม์สูงสุดที่อายุ9วันโดยมีค่าของ endoglucanase (CMCase) เท่ากับ 3.6973 หน่วย/มล. และ cellulase filter paper activity เท่ากับ 0.8525 หน่วย/มล. และพบว่า12วันสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดซึ่งเมื่อนำมาผลิตในถังหมักเป็นเวลา12วันจะได้ CMCase เท่ากับ 2.876 หน่วย/มล. และ FPA เท่ากับ 0.810 หน่วย/มล.

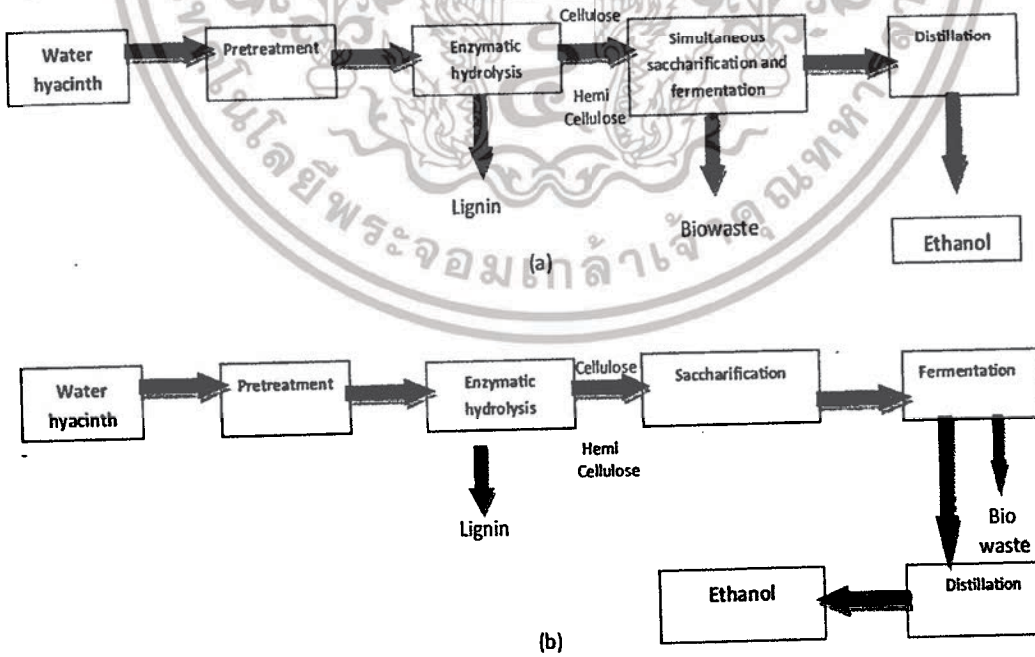
การย่อยสลายฟางข้าวซังข้าวโพดชานอ้อยและต้นมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในด่างและย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. reesei* QM 6a การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทางการค้าให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.720 0.693 และ 0.525 กรัมต่อกรัมซับสเตรท ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.353 0.345 และ 0.276 กรัมต่อกรัมซับสเตรทในฟางข้าวซังข้าวโพดและชานอ้อยตามลำดับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* QM 6a ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.328 0.289 และ 0.216 กรัมต่อกรัมซับสเตรทผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ0.170 0.132 และ 0.158 กรัมต่อกรัมสเตรทในฟางข้าวซังข้าวโพดและชานอ้อยตามลำดับส่วนต้นมันสำปะหลังไม่เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายเมื่อใช้ทั้ง 2 วิธีการ

การหมักเอทานอลจากวัสดุที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* QM 6a ผลผลิตของเอทานอลในฟางข้าวเท่ากับ 0.145 และ 0.133 กรัมต่อกรัมซับสเตรทซังข้าวโพดเท่ากับ 0.251 และ 0.156 กรัมต่อกรัมซับสเตรทและชานอ้อยเท่ากับ 0.156 และ 0.172 กรัมต่อกรัมซับสเตรทจากการย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reseei* QM 6a ตามลำดับ

Ganguly และคณะ (2012) การศึกษาการผลิตเอทานอลจากผักตบชวากับการพัฒนาอุตสาหกรรมที่เติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีความจำเป็นในการพัฒนาอย่างยั่งยืนต่อสิ่งแวดล้อม แหล่งพลังงานต่างๆ คือเอทานอลจากชีวมวลเป็นแหล่งเอทานอลที่น่าสนใจแหล่งพลังงานที่ยั่งยืนสำหรับการใช้ในระบบขนส่งขึ้นอยู่กับสมมติฐานที่ว่าเอทานอลที่เป็นเชื้อเพลิงสามารถทำให้สภาพแวดล้อมสะอาดและมีการบังคับใช้กฎหมายคุ้มครองสิ่งแวดล้อมในหลายประเทศ ทำให้ความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นในการผลิตเอทานอลที่มีประสิทธิภาพจะขึ้นอยู่กับกระบวนการที่ดีที่สุดและการใช้ประโยชน์จากวัสดุราคาถูกเพื่อตอบสนองความต้องการการใช้ประโยชน์จากวัสดุหลายชนิด เช่นพวกลิกโนเซลลูโลส สามารถนำมาใช้สำหรับการผลิตเอทานอลได้ซึ่งจะมีความหลากหลายของสารพวกลิกโนเซลลูโลสจากผักตบชวา ซึ่งเป็นทรัพยากรที่มีศักยภาพที่มีอยู่ในภูมิภาคเขตร้อนของโลกอย่างกว้างขวางมันเป็นวัชพืชน้ำเป็นอันตรายชและเติบโตได้อย่างรวดเร็วงานวิจัยจำนวนมากที่อยู่ในความคืบหน้าสำหรับการเปลี่ยนทางชีวภาพไปสู่เอทานอลโดยใช้ขั้นตอนสองลำดับ คือการย่อยสลายและการหมักงานวิจัยนี้แสดงกระบวนการเปลี่ยนทางชีวภาพของผักตบชวาไปเป็นเอทานอลดังรูปที่ 2.5 และ 2.6

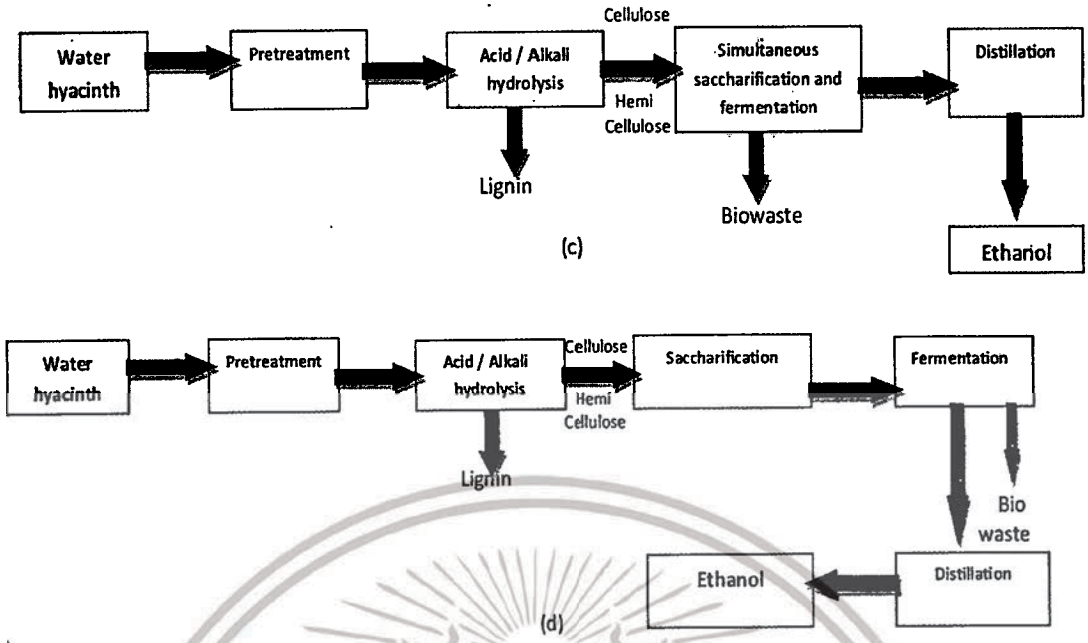


รูปที่ 2.5 แสดงรูปแบบของกระบวนการหมักต่างๆ ในการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาดังนี้

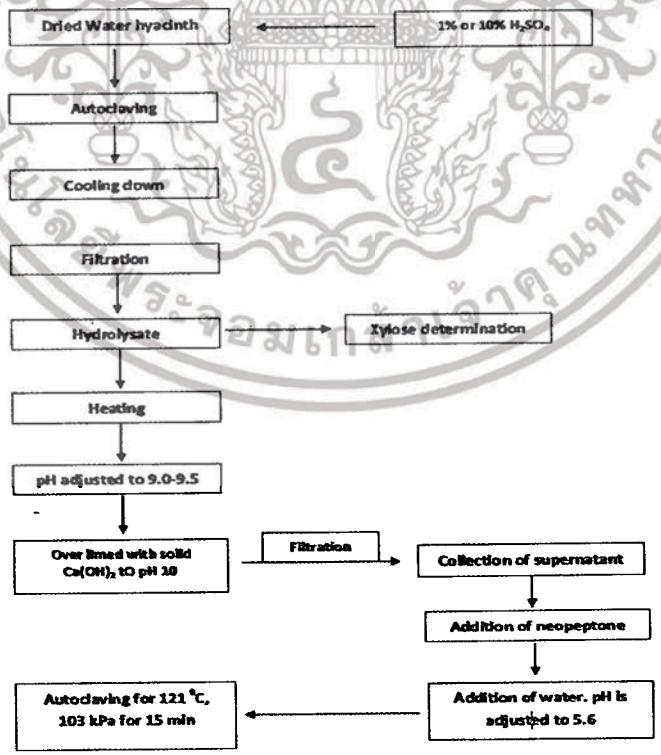
(a) กระบวนการย่อยโดยเอนไซม์และเกิดกระบวนการหมักแบบ SSF

(b) กระบวนการย่อยโดยเอนไซม์และเกิดกระบวนการหมักแบบ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5(ต่อ) รูปแบบของกระบวนการหมักต่างๆ ในการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาดังนี้
(c) กระบวนการย่อยโดยกรดหรือด่างและเกิดกระบวนการหมักแบบ SSF
(d) กระบวนการย่อยโดยกรดหรือด่างและเกิดกระบวนการหมักแบบ SHF
ที่มา : Ganguly และคณะ (2012)



รูปที่ 2.6 แสดงขั้นตอนการย่อย การกำจัดความเป็นพิษ และการเตรียมอาหารสำหรับหมัก
ที่มา : Ganguly และคณะ (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aswathy และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวา โดยศึกษากลไกในการย่อยของเอนไซม์เพื่อให้เกิดน้ำตาล การทดลองนี้มีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดและด่าง พบว่าในการปรับสภาพด้วยด่างนั้นจะมีประสิทธิภาพมากกว่าและตัวอย่างง่ายต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ มีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเบต้ากลูโคซิเดสและสารลดแรงตึงผิวได้ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยให้ได้น้ำตาลมากขึ้น การใช้เอนไซม์ร่วมกันทำให้กระบวนการย่อยน้ำตาลเกิดขึ้นได้ดีขึ้นจากร้อยละ 57 เป็นร้อยละ 71 เมื่อผ่านการย่อยแล้วจึงนำมาหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าผลผลิตของเอทานอลที่ได้เท่ากับ 4.4 กรัม/ลิตร

Kumar และคณะ (2552) ศึกษาการเปลี่ยนองค์ประกอบลิกโนเซลลูโลสของผักตบชวาซึ่งย่อยด้วยกรดเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้ *Pichia stipites* การใช้กรดอ่อนทำให้ได้เฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของผักตบชวาสูงสุด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาทั้งในแง่ของการทดลองและการใช้เครื่องมือทางคณิตศาสตร์ในกระบวนการหมักโดยใช้เฮมิเซลลูโลสของผักตบชวาส่วนไฮโดรไลเซสที่ย่อยด้วยกรดเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *P. Stipites* ใช้ไซโลสร้อยละ 72.83 สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลและมีผลผลิตของเอทานอล 0.425 g_p / g_sประสิทธิภาพของการหมัก 0.176 g_p / L / h แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมได้รับการพัฒนาเพื่อที่จะนำมาอธิบายการเปลี่ยนรูปของเฮมิเซลลูโลสเป็นเอทานอลและแบบจำลองนี้ได้รับการทดสอบทางสถิติเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

Manivannan และคณะ (2012) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวา (*Eichhornia crassipes*) โดยกระบวนการย่อยด้วยกรดและกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Candida intermedia* NRRL *Y-981* การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการแปรรูปผักตบชวา (*Eichhornia crassipes*) เพื่อผลิตเป็นไบโอเอทานอล โดยใช้วิธีการ 2 ขั้นตอนที่ต่อเนื่องกันระหว่างการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 10 และการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Candida intermedia* ผลผลิตเอทานอลที่ได้สูงสุดเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ย่อยให้ได้น้ำตาลและหมักให้ได้เอทานอลโดยใช้ถังหมัก พบว่าผลผลิตเอทานอลสูงสุดคือ 0.21 กรัมต่อกรัมประสิทธิภาพการหมัก 0.010 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ทำนายไว้คือ 0.23 กรัมต่อกรัมซึ่งได้จากการออกแบบส่วนผสมกลาง (Central Composite Design ; CCD) การวัดปริมาณน้ำตาลไซสใช้วิธีการวัดความเข้มของสี 2 วิธี คือ วิธีฟลูโรกลูซินอล (phloroglucinol) และวิธีไดโครเมท (dichromate assays) และวัดปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แม้ว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ได้จากการทดลองมีค่าต่ำแต่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสไปเป็นไบโอเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

ผักตบชวา จากลำคลองประเวศบุรีรมย์ ช่วงเวลา 8.00-11.00น. (เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556) เขตลาดกระบังกรุงเทพมหานคร

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

Candida shehatae TISTR 5843 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.3 สารเคมี

3.3.1 Glucose
3.3.2 D-Xylose
3.3.3 Agar
3.3.4 Yeast extract
3.3.5 Neo-peptone
3.3.6 Sulfuric acid (H_2SO_4) 96 %
3.3.7 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)
3.3.8 Sodium hydroxide (NaOH)
3.3.9 Sodium potassium tartrate (K-Na tartrate)
3.3.10 Calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$)
3.3.11 Sodium sulfite
3.3.12 Absolute ethyl alcohol (C_2H_5OH)
3.3.13 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase; endo-β-glucanase) จาก *Bacillus amyloliquefaciens*
3.3.14 สารเคมีวิเคราะห์ Neutral Detergent Fiber หรือ NDFประกอบด้วย

1) Decahydronapthalene (reagent grade)
2) Acetone (ใช้ชนิดไม่มีสีและระเหยได้หมดไม่มีสิ่งตกค้าง)
3) Sodium sulphite (anhydrous, reagent grade) มีส่วนประกอบดังนี้
   ก. น้ำกลั่น
   ข. Sodium lauryl sulphate (USP)
   ค. Disodium ethylene diaminetetraacetate (EDTA) (dehydrate crystal, reagent grade)
   ง. Sodium borate decahydrate(reagent grade) ($Na_2B_4O_7 .10H_2O$)
   จ. Disodium hydrogen phosphate (reagent grade)(Na_2HPO_4anhydrous)
   ฉ. 2-ethaoxy ethanol (ethylene glyclomonoethylether)(purified grade)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.15 สารเคมีวิเคราะห์ acid detergent fiber (ADF) ประกอบด้วย

1) กรดกำมะถัน (reagent grade) 1 N
2) Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 เครื่องแก้ว (ฟลาสก์ หลอดทดลอง กรวย บีกเกอร์ ฯลฯ)
3.4.2 อุปกรณ์วัดปริมาตร (ปิเปต ไมโครปิเปต กระบอกตวง ฯลฯ)
3.4.3 โถดูดความชื้น (Desicator)
3.4.4 ลวดเขี่ยเชื้อ
3.4.5 จุกยางปิดฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร
3.4.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG5002 ยี่ห้อ Mettler Toledo
3.4.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น SI-234 ยี่ห้อ Denver Instrument
3.4.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น Starter 3000 ยี่ห้อ Ohaus
3.4.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น WNB 45 ยี่ห้อ Memmert
3.4.10 เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate and Magnetic Stirrer) รุ่น C-MAG HS7 ยี่ห้อ Ika
3.4.11 แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร (Magnetic Bar)
3.4.12 เครื่องปั่นรุ่น SK100 ยี่ห้อ Retsch
3.4.13 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น ES-315 ยี่ห้อ Tomy
3.4.14 ตู้เย็น
3.4.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Helios Gamma ยี่ห้อ Thermo Electron Corporation
3.4.16 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge) รุ่น Z383K ยี่ห้อ Hermle
3.4.17 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) รุ่น GC-17A ยี่ห้อ Shimadzu
3.4.18 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Polar1000/Orbit1900 ยี่ห้อ Contherm/Labnet
3.4.19 ตู้อบแห้ง (Hot Air Oven) รุ่น Model 600 ยี่ห้อ Memmert
3.4.20 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench) รุ่น BVT123 ยี่ห้อ Issco
3.4.21 อุปกรณ์ของการวิเคราะห์ NDFและ ADF

1. ชุดเครื่องย่อยพร้อมด้วยบีกเกอร์ทรงกระบอกสูงขนาด 600 มิลลิลิตร
2. เตาไฟฟ้า (Hot plate)
3. Fritted glass crucible ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มี porosity ขนาด 40-90 microns (P2)
4. Funnel
5. เตาเผา (muffle Furnace)
6. Filtering device พร้อม filtering flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร
7. โถดูดความชื้นและตู้อบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเตรียมวัตถุดิบ

เก็บตัวอย่างผักตบชวาจากลำคลองในชุมชนเขตลาดกระบัง นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำก๊อกหลายๆ ครั้ง คัดเลือกเอาเฉพาะส่วนใบและลำต้นเท่านั้น หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 – 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำผักตบชวาที่ได้มาปั่นพอหยาบๆ ให้ได้น้ำหนักแห้งประมาณ 5 กิโลกรัม เก็บผักตบชวาไว้ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 ศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาโดยการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ

โดยชั่งผักตบชวาที่ปั่นหยาบมา 10 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0, 2.0, 2.5, 3.0 และ 4.0 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยใช้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการกรองแยกส่วนของเหลวกับกากออกจากกัน โดยใช้ผ้าขาวบาง 2 ชั้นในการกรอง นำส่วนที่เป็นของเหลวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ส่วนกากนำมาแช่น้ำและล้างด้วยน้ำก๊อกจนกว่าค่าพีเอชจะเป็นกลาง นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนที่เป็นของเหลววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller , 1959) เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่วนของกากผักตบชวาวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เพื่อเปรียบเทียบการใช้กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ให้ปริมาณลิกนินเหลือน้อย

3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในส่วนของกากผักตบชวา (วรพงษ์, 2535)

3.7.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

- การเตรียมสารเคมีวิเคราะห์ Neutral Detergent Fiber หรือ NDF

1. ชั่ง EDTA 37.22 กรัมและ $Na_2B_4O_7 . 10H_2O$ 13.62 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนให้ละลาย อาจใช้ความร้อนช่วยเพื่อให้ละลายเร็วขึ้น
3. ชั่ง Sodium lauryl sulphate 30 กรัม เทใส่บีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร และเติม 2-ethaoxy ethanol จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำไปคนให้ละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer
4. ชั่ง Na_2HPO_4 9.12 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ละลายด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนช่วยให้ละลาย
5. นำสารละลายที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร
6. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

- การเตรียมสารเคมีวิเคราะห์ acid detergent fiber (ADF)

1. เตรียมกรดกำมะถัน (H_2SO_4) เข้มข้น 1 N โดยปิเปตกรดกำมะถันเข้มข้น 96%(AR grade) 13.9 มิลลิลิตรเติมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร ซึ่งเติมน้ำกลั่นไว้บางส่วนแล้ว (อุณหภูมิ 20 °C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ตรวจสอบ normality โดยการไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH1 N หรือจะใช้ Na_2CO_3 1 N ผลที่ได้ควรจะเป็น 1 N

2. ชั่ง Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 20 กรัม นำสารละลายกรดกำมะถัน 1 N ที่เตรียมไว้มา 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer

3.7.2 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ neutral detergent fiber (ผนังเซลล์)

1. ชั่งcelite 1 g ใส่ลงใน Fritted glass crucible ขนาด 50 มิลลิลิตรหลังจากนั้นนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ Fritted glass crucible ใส่ในโถดูดความชื้นรอเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งน้ำหนัก glass crucible

2. ชั่งตัวอย่างที่ตากแห้งและบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. (20-30 mesh) 0.5-1.0 กรัม ให้ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วใส่ลงในบีกเกอร์ทรงกระบอกสูงขนาด 600 มิลลิลิตร

3. เติมน้ำยาและสารเคมีตามลำดับ ดังนี้

- น้ำยา neutral detergent ประมาณ 22 °C	100	มิลลิลิตร
- Decahydronapthaleneหรือ ใช้ 1-Octanol	2	มิลลิลิตร
- Sodium sulphite	0.5	กรัม

ต้มให้เดือดภายใน 5-10 นาที เมื่อเริ่มเดือดลดความร้อนเพื่อกันไม่ให้ฟองล้นจากนั้นรีฟลักค์นับแต่เริ่มเดือด 1 ชั่วโมง

4. กรองโดยใช้ Fritted glass crucible ที่แห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน โดยนำ Fritted glass crucible ไปวางบน filtering flask ที่ต่อกับ suction pump เปิด suction pump เปิดวาล์วดูดอากาศออกจากขวดกรองช้าๆ เพื่อให้เกิดสุญญากาศในขวดกรองขณะที่กรอง และรักษาสุญญากาศในขณะกรองให้พอสำหรับกรองเท่านั้น ไม่ควรให้เกินความต้องการ ล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) โดยใช้น้ำให้น้อยที่สุดเท่าที่จะใช้ได้

5. หยุดสุญญากาศการกรองชั่วคราว เขี่ยเยื่อใยที่ติดแผ่นใน crucible ให้แตกและหลุดออกจากผนัง crucible ด้วยแท่งแก้ว ชะล้างแท่งแก้ว กรองน้ำออก แล้วล้างซ้ำด้วยน้ำกลั่นร้อนอีกครั้ง

6. ล้างกากใน glass crucible ด้วย acetone 2 ครั้ง ดูดให้ตะกอนใน glass crucible แห้งหมดกลิ่น acetone แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส(นาน 8 ชั่วโมง หรือตลอดคืน และนำออกมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งหาน้ำหนักที่คงที่

7. คำนวณหาปริมาณ NDF (cell wall) , NDS (neutral detergent solubles)

$$\%NDF = \frac{A-B}{S} \times 100$$

NDF (cell content) = 100 - %NDF

เมื่อ A = น้ำหนัก crucible + NDF

B = น้ำหนัก crucible แห้ง

S = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

8.นำ glass crucible พร้อมตัวอย่างส่วนที่เหลือ (NDF) ไปเผาในเตาที่อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก crucible+ ash ซึ่งมีค่าเท่ากับ C

$$\%\text{ เถ้าที่ไม่ละลายใน neutral detergent} = \frac{C-B}{S} \times 100$$

เมื่อ C = น้ำหนัก crucible+ ash

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3 วิธีวิเคราะห์ Acid-Detergent Fiber (ADF)

การวิเคราะห์หา ADF เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณ lignocellulose ในอาหารสัตว์อย่างเร็ว ผลต่างระหว่าง NDF และ ADF ก็คือปริมาณ hemicellulose โดยประมาณ (รวมโปรตีนที่ติดอยู่ที่ผนังเซลล์บ้าง)

1. อบ Fritted glass crucible ขนาด 50 มิลลิลิตร ในเตาอบที่ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ Fritted glass crucible ใส่ในโถดูดความชื้นรอเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งน้ำหนัก glass crucible

2. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดและอบแห้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 65 องศาเซลเซียสประมาณ 1 กรัม โดยให้ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วใส่ลงในบีกเกอร์ทรงกระบอกสูงขนาด 600 มิลลิลิตร

3. เติมน้ำยา acid detergent 100 มิลลิลิตรและ Decahydronapthalene (หรือใช้ 1-Octanol) 2 มิลลิลิตร

4. ต้มให้ร้อนในเครื่อง Reflux โดยให้เดือดภายใน 5-10 นาที ลดความร้อนเมื่อเริ่มเดือด เพื่อไม่ให้เป็นฟองล้น ปรับความร้อนให้พอเดือดแล้ว Reflux นาน 1 ชั่วโมง นับแต่เริ่มเดือด

5. กรองโดยใช้ Fritted glass crucible ที่แห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน โดยนำ Fritted glass crucible ไปวางบน filtering flask ที่ต่อกับ suction pump เปิด suction pump ดูดสารละลายออกจาก clucibleในขณะกรองเขี่ยตะกอนให้แตกและหลุดจากผนัง crucible ล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 2 ครั้งโดยใช้น้ำครั้งละประมาณ 60 มิลลิลิตร และให้ล้างข้างๆ crucible ด้วย

6. ล้างกากใน glass crucible ด้วย acetone จนไม่มีสีออกมากับ acetone ที่ใช้ล้าง ในขณะล้างใช้แท่งแก้วเขี่ยให้ตะกอนแตกออกจากกันเพื่อจะได้ถูกล้างโดย acetone ทั่วถึง

7. ดูดให้ตะกอนใน glass crucible แห้ง หมดกลิ่น acetone แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง หรือตลอดคืน

8. นำ glass crucible ออกจากตู้อบ แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นนำ glass crucible มาชั่งภายใน 30 นาที อย่าทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นนานกว่านั้น (ตัวอย่างนี้เก็บไว้วิเคราะห์ลิกนินต่อไป)

9. การคำนวณ

$$\%ADF = \frac{D-B}{S} \times 100$$

เมื่อ D = น้ำหนัก crucible + ADF

B = น้ำหนัก crucible

S = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

10. % Hemicellulose = %NDF - %ADF

3.7.4 การวิเคราะห์หา lignin โดยใช้กรดกำมะถัน

วิธีการเตรียมกรดกำมะถัน (H_2SO_4) 72% จำนวน 1000 มิลลิลิตรโดยเตรียมจาก H_2SO_4 เข้มข้น 96% ความหนาแน่น 1.84 กรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการคำนวณหาปริมาณ H_2SO_4 96%

กรัมของ H_2SO_4 96% = $\frac{100 \times 98.08 \times 12}{96}$ = 1226.00 กรัม

ดังนั้นปริมาณ H_2SO_4 96% ที่จะนำมาใช้ในการเตรียม = $\frac{1226.00}{1.84}$

= 666.30 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม

เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตร 1000 มิลลิลิตรจากนั้นตวงกรด H_2SO_4 96% จำนวน 666.30 มิลลิลิตร ใส่ลงไป และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตรแล้วรอให้สารละลายในขวดวัดปริมาตรเย็นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตรอีกครั้ง (ระหว่างรอให้เย็นปริมาตรจะลดลง แล้วผสมให้เข้ากัน

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้กากที่เหลือจากการวิเคราะห์ ADF หรือดำเนินการวิเคราะห์ขั้นต้นเช่นเดียวกันกับการหา ADF
2. นำcrucible ที่มี ADF อยู่มาวางในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำบีกเกอร์ไปวางบนถาด
3. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 72% ที่เย็นประมาณ 15 องศาเซลเซียส ลงไปใน crucible ให้ท่วม ADF พร้อมกับคนด้วยแท่งแก้วเพื่อให้ตะกอนแตกและละเอียดนุ่มดี (แท่งแก้วจะต้องแช่ค้างอยู่ใน crucible ห้ามนำออก)แล้วเติมกรดกำมะถันลงไปอีกประมาณครึ่งหนึ่งของการเติมครั้งแรกพร้อมกับคนให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 20-23 องศาเซลเซียส (ในที่เย็น) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำ crucible มากรองตะกอน โดยนำ crucible ไปวางบน filtering flask ที่ต่อกับ suction pump เปิด suction pump ดูดกรดที่เหลือออก ในขณะกรองเขี่ยตะกอนให้แตกและหลุดจากผนัง crucible ล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) หลายๆครั้งจนหมดกรด (ใช้กระดาษลิตมัสสีน้ำเงินทดสอบน้ำล้างที่ก้น crucibleดูว่าหมดกรดหรือยัง)กระดาษลิตมัสสีน้ำเงินไม่เปลี่ยนสี
5. นำ crucible ไปอบในเตาอบอุณหภูมิ 100องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หรืออบค้างคืน จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้น เมื่อเย็นแล้วนำออกมาชั่งน้ำหนัก ซึ่งจะเรียกว่า W_3
6. นำ crucible ไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่ง carbon free แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้น เมื่อเย็นแล้วนำออกมาชั่งน้ำหนัก ซึ่งจะเรียกว่า W_4
7. คำนวณปริมาณ lignin

$$\% \text{ lignin} = \frac{W3 - W4 \times 100}{S}$$

เมื่อ S = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

W_3 = crucible + กากหลังอบ

W_4 = crucible + เถ้า หลังอบ

3.8 การกำจัดความเป็นพิษจากการปรับสภาพด้วยกรด (Detoxification) ในส่วนไฮโดรไลเซทที่เป็นของเหลว

โดยนำส่วนที่เป็นของเหลว (Hydrolysate) ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อลดความเข้มข้นของสารประกอบระเหยได้ จากนั้นเติมน้ำกลั่นร้อนเพื่อปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตรเช่นเดิม จากนั้นเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปเรื่อยๆ คนให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Magnetic Stirrer จนพีเอชเป็น 10.0 กรองแยกตะกอนออกไปโดยการกรองสุญญากาศ ซึ่งแคลเซียมจะถูกกำจัดออกไปในกระบวนการนี้ การเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้นปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ให้มีค่าพีเอชเป็นกลาง (Kumar และคณะ, 2009)

นำไฮโดรไลเซทที่เป็นของเหลวไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อีกครั้งโดยวิธี DNSและหมักด้วยเชื้อยีสต์ สำหรับกากผักตบชวาล้างน้ำจนพีเอชเป็นกลางอบให้แห้ง จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 150 ยูนิตต่อ10 กรัม (โดยเอนไซม์ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชให้เป็น 4.8 นำไปบ่มที่สภาวะ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นกรองสุญญากาศ นำส่วนกากทิ้ง นำส่วนน้ำหลังการกรองมาปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 6.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอลและหมักด้วยเชื้อยีสต์

3.9 ศึกษาการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843

3.9.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843

เขี่ยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 จำนวน 1-2 loop เลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง SXA (Sabouraud Xylose Agar) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นเอียง SXA 1-2 loop มาเลี้ยงในจานอาหาร SXA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เชื้อไปใช้ในกระบวนการหมักต่อไป

โดยกระบวนการหมักแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นไฮโดรไลเซทที่เป็นของเหลว หลังจากกำจัดความเป็นพิษในไฮโดรไลเซทแล้ว นำส่วนที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษหมักด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 โดยหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้ง รวมทั้งค่าพีเอชของอาหารหมักจากนั้นหมักในสภาวะไร้อากาศโดยใช้จุกคอร์กปิดและบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ดังนั้นระยะเวลาการหมักทั้งหมดเป็น 72 ชั่วโมง) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้นเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักของเชื้อทั้งสอง

ส่วนที่ 2 เป็นไฮโดรไลเซทที่เป็นกากผักตบชวา หลังจากล้างทำความสะอาดเอาสารตัวทำละลายออกแล้ว นำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 150 ยูนิตต่อ 10 กรัม (โดยเอนไซม์ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ กรองสุญญากาศ นำส่วนกากทิ้ง นำส่วนน้ำหลังการกรองแบบสุญญากาศมาปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 6.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นนำมาหมักด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 โดยหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้น จากนั้นหมักในสภาวะไร้อากาศโดยใช้จุกคอร์กปิดและบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ระยะเวลาการหมักทั้งหมดเป็น 72 ชั่วโมง) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้นเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักของเชื้อทั้งสอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักผักตบชวาโดยใช้เชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843

เมื่อ $Y_{x/s}$ คือ ค่าผลได้ของมวลชีวภาพต่อซับสเตรท

$Y_{p/s}$ คือ ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อซับสเตรท

$P_{x,\ batch}$ คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง หรือค่า Productivity ของมวลชีวภาพ

$P_{p,\ batch}$ คือ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง หรือค่า Productivity ของผลิตภัณฑ์

3.11 การวิเคราะห์

3.11.1 การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บในขวดตัวอย่างเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ส่วนตะกอนเซลล์ที่ได้นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาใส่ในโถดูดความชื้น (Desicator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร โดยคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{น้ำหนักหลอดและเซลล์อบแห้} - \text{น้ำหนักหลอดอบแห้ง (กรัม)}) \times 1000 \text{ มล.}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างน้ำหมัก (มล.)}}$$

3.11.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

3.11.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

นำกลูโคสมาตรฐานไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบแห้ง 0.1 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 100 200 400 600 800 และ1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ แล้วเติมสารละลายดีเอ็นเอส (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที และรอให้เย็น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

3.11.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS) เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดเป็นชนิด Flame Ionization Detector (FID)

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธีของ Duncan โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ

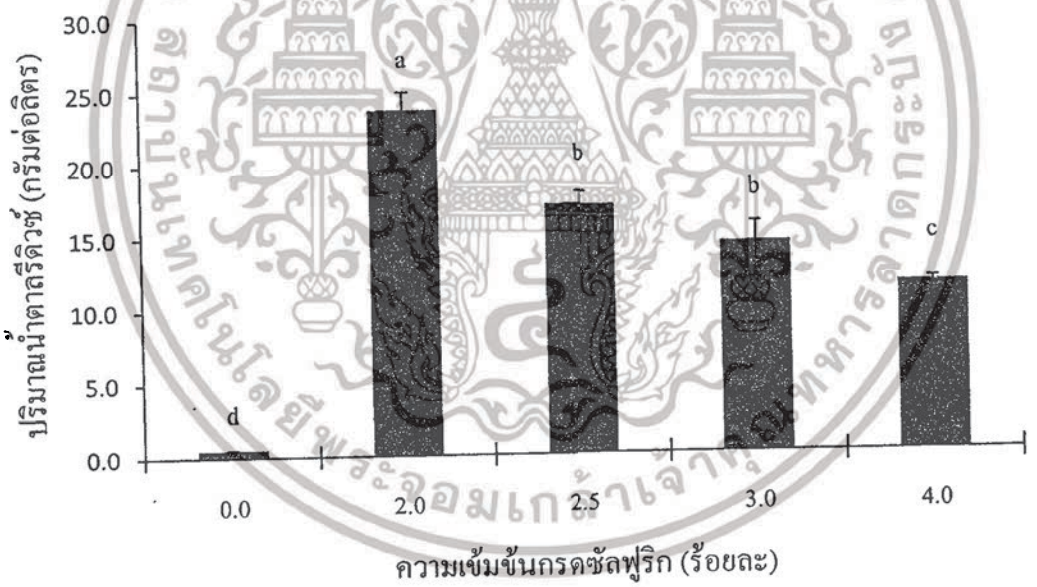
จากการศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ร้อยละ 0 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 นำของเหลวที่กรองได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ของเหลวที่ได้เรียกว่า ไฮโดรไลเซท หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการใช้กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ และคัดเลือกความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่ให้ปริมาณน้ำตาลสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกต่างๆ กัน จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่างกันแสดงดังตารางที่ 4.1 เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด เท่ากับ 0.53±0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 โดยปริมาตรให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 23.74±1.21 17.13±0.86 14.52±1.33 และ 11.52±0.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก ร้อยละ 2.0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ 23.74±1.21 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ความร้อนและความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่สูงขึ้นทำให้สารประกอบในผักตบชวาเปลี่ยนไปเป็นเฟอร์ฟูรอล และ5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลดังนั้นหลังจากกระบวนการปรับสภาพผักตบชวา จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง (นันทิกา และคณะ, 2554) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 2.5 3.0 และ 4.0 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Bamufleh และคณะ (2012) ซึ่งได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเบื้องต้นของผักตบชวาเพื่อผลิตเป็นไบโอเอทานอลพบว่าเมื่อใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ในการปรับสภาพผักตบชวาจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในการทดลองนี้จึงเลือกความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 2.0 มาใช้ในการศึกษาต่อไป ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการปรับสภาพผักตบชวาโดยการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ร้อยละ) ของกรดซัลฟูริก	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ± SD
0*	0.53^{d} ±0.01
2.0	23.74^{a}±1.21
2.5	17.13^{b}±0.86
3.0	14.52^{b} ± 1.33
4.0	11.52^{c} ± 0.23

หมายเหตุ: เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
: * ใช้น้ำกลั่นแทนความเข้มข้นกรดซัลฟูริกร้อยละ 0



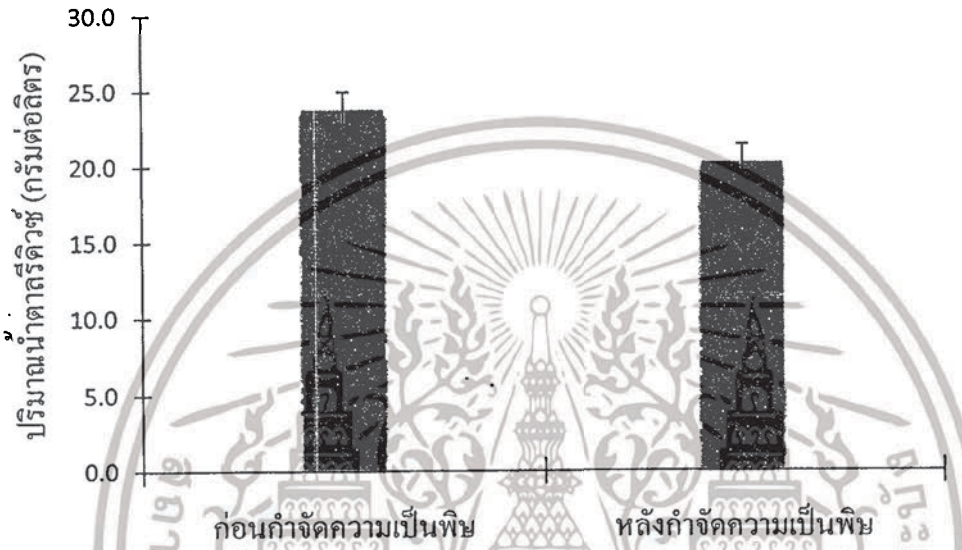
รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการปรับสภาพผักตบชวาโดยการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ

4.2 ผลการกำจัดความเป็นพิษจากการปรับสภาพด้วยกรด (Detoxification)

จากการศึกษาการกำจัดความเป็นพิษจากการปรับสภาพด้วยกรดของผักตบชวาโดยวิธีของ (Kumar และคณะ,2009) โดยนำไฮโดรไลเซทส่วนน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์จนค่าพีเอชของสารละลาย เท่ากับ 10 จากนั้นนำไปกรองด้วยสุญญากาศ แยกส่วนตะกอนทิ้งส่วนของเหลวใสที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าไฮโดรไลเซทที่ได้หลังจากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นร้อยละ 2.0 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนกำจัดความเป็นพิษ 23.74±1.21 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากการกำจัดความเป็นพิษ พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงไป เหลือเท่ากับ 20.26±0.89 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละที่ลดลง 14.66 ซึ่ง Kumar และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของไฮโดรไลเซทที่ได้จากผักตบชวาเพื่อผลิตไบโอเอทานอลโดยเชื้อ *Pichia stipitis* พบว่าหลังกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 3.0 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการกำจัดความเป็นพิษลดลงร้อยละ 10 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (5-HMF) และเฟอร์ฟูรอล ในไฮโดรไลเซทส่วนน้ำก่อนและหลังกำจัดความเป็นพิษ พบว่า ก่อนกำจัดความเป็นพิษมี 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล และเฟอร์ฟูรอล น้อยกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร ภายหลังกำจัดความเป็นพิษตรวจไม่พบสารทั้งสองชนิดแสดงดังตารางที่ 4.2 ซึ่ง 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล และเฟอร์ฟูรอล มีผลต่อกระบวนการหมักเอทานอล โดยสารทั้งสองชนิดจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักที่ได้ลดน้อยลง (Zhanga และคณะ, 2013, Bamufleh และคณะ, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล และเฟอร์ฟูรอล ก่อนและหลังการกำจัดความเป็นพิษของผักตบชวา

ตัวอย่าง	รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ (กรัม/ลิตร)
ก่อนกำจัดความเป็นพิษ	5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล	HPLC	< 0.5
	เฟอร์ฟูรอล	HPLC	< 0.5
หลังกำจัดความเป็นพิษ	5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล	HPLC	ตรวจไม่พบ
	เฟอร์ฟูรอล	HPLC	ตรวจไม่พบ

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ในส่วนกากผักตบชวา

จากการนำผักตบชวาแห้งที่ปั่นหยาบ 10 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยใช้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งให้เย็น ทำการกรองแยกส่วนของเหลวกับกากออกจากกัน นำส่วนที่เป็นของเหลวส่วนใสที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ส่วนกากนำมาแช่น้ำและล้างจนกว่าค่าพีเอชจะเป็นกลาง นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนของกากผักตบชวาวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกต่างๆ จะให้ปริมาณลิกโนเซลลูโลสต่างกันแสดงดังรูปที่ 4.3 เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 0 ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุดร้อยละ 25.42±0.78 และปริมาณลิกนินสูงสุดร้อยละ 3.28±0.67เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 โดยปริมาตร ส่วนกากผักตบชวามีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ15.36±2.43 13.17±1.13 14.02±1.94 และ 12.07±1.77 ตามลำดับ และมีปริมาณลิกนินร้อยละ 1.81±0.45 1.86±0.11 1.71±0.18 และ 1.55±0.20 ตามลำดับ จากการนำผักตบชวาไปปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆพบว่าการใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก ร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด คือร้อยละ 15.36±2.43 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงและไม่มีความแตกต่างกับการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ขณะเดียวกันการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 กากผักตบชวามีปริมาณลิกนินสูงและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 3.0 และ 4.0 แต่แตกต่างทางสถิติกับกากผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกสำหรับปริมาณเฮมิเซลลูโลสพบว่าภายหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณเฮมิเซลลูโลสไม่เหลืออยู่เลยทั้งนี้

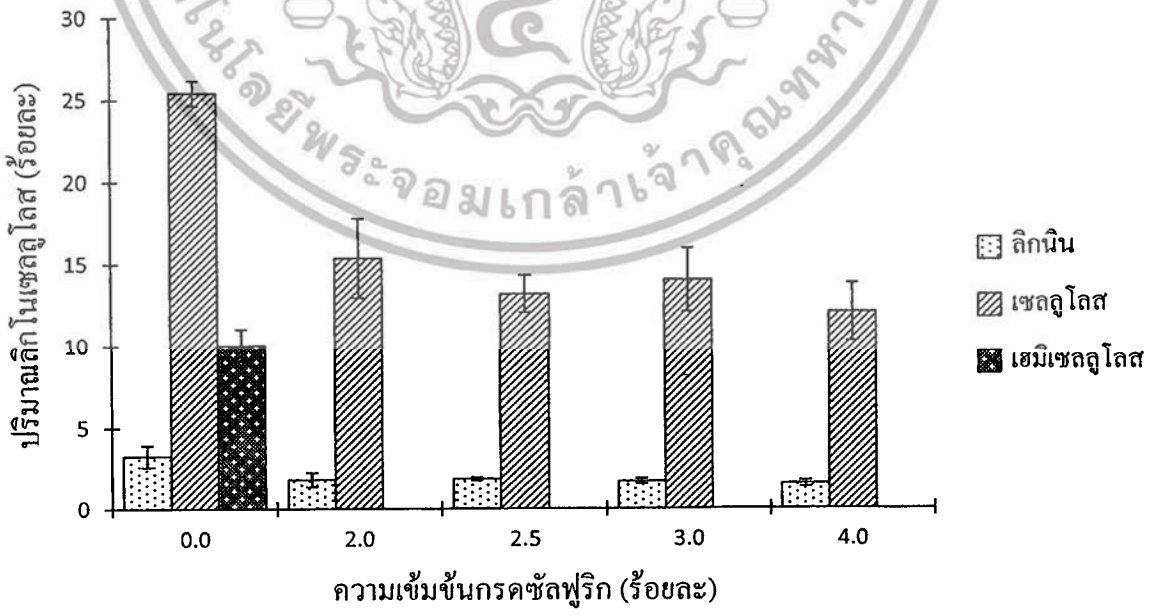
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ทำให้โครงสร้างไม่เป็นระเบียบจึงโดนความร้อนและกรดทำลายโครงสร้างได้ง่าย ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 2.0 โดยปริมาตรมาใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากในส่วนกากผักตบชวายังคงมีปริมาณเซลลูโลสสูง ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยการใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ แสดงตารางที่ 4.3 และดังรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณลิกนิน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส หลังการปรับสภาพผักตบชวาด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ร้อยละ) ของกรดซัลฟูริก	ลิกนิน ± SD (ร้อยละ)	เซลลูโลส± SD (ร้อยละ)	เฮมิเซลลูโลส± SD (ร้อยละ)
0*	$3.28^{a} \pm 0.67$	$25.42^{a} \pm 0.78$	$10.04^{a} \pm 5.11$
2.0	$1.81^{b} \pm 0.45$	$15.36^{b} \pm 2.43$	$0^{b} \pm 0.00$
2.5	$1.86^{b} \pm 0.11$	$13.17^{b} \pm 1.13$	$0^{b} \pm 0.00$
3.0	$1.71^{b} \pm 0.18$	$14.02^{b} \pm 1.94$	$0^{b} \pm 0.00$
4.0	$1.55^{b} \pm 0.20$	$12.07^{b} \pm 1.77$	$0^{b} \pm 0.00$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวตั้ง ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
: * ใช้น้ำกลั่นแทนความเข้มข้นกรดซัลฟูริกร้อยละ 0



รูปที่ 4.3 ปริมาณลิกโนเซลลูโลสของผักตบชวาหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยไฮโดรไลเซทส่วนกากผักตบชวา

จากการนำไฮโดรไลเซทส่วนกาก 10 กรัม ซึ่งได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร บดให้ละเอียด จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 150 ยูนิตต่อ10 กรัม (โดยเอนไซม์ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชให้เป็น 4.8 นำไปบ่มที่สภาวะ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำส่วนน้ำหลังการย่อยมากรองสูญญากาศ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าภายหลังการย่อยกากผักตบชวาด้วยเอนไซม์มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยเท่ากับ 5.78±0.06 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 1.42±0.96 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังการย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสของไฮโดรไลเซทส่วนกากผักตบชวา

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ± SD
ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์	1.42±0.96
หลังการย่อยด้วยเอนไซม์	5.78±0.06

4.5 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843

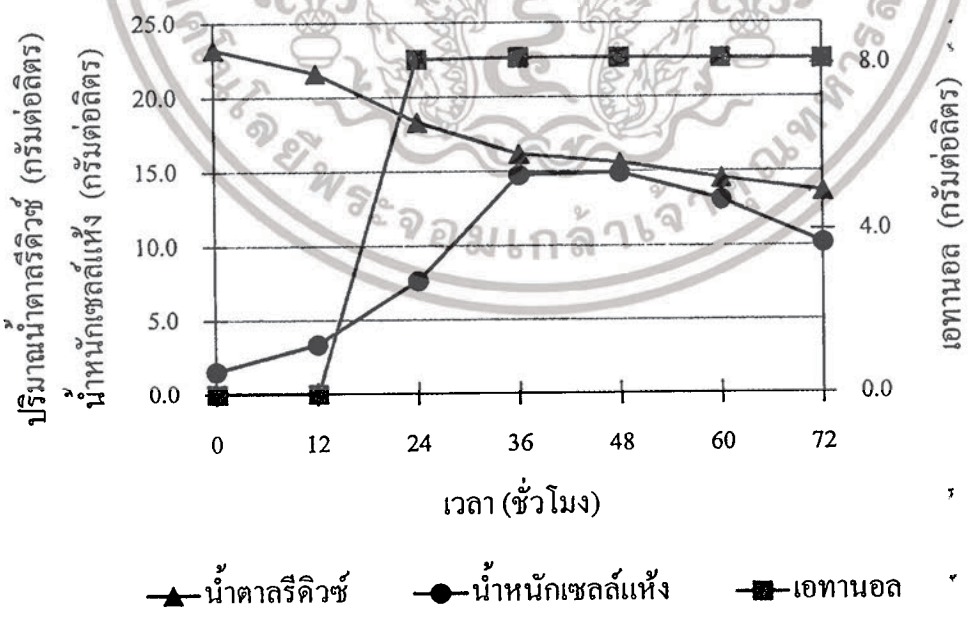
4.5.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลในอาหาร 2 ชนิด คือ ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำและไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวา โดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843

จากการนำไฮโดรไลเซทซึ่งได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร และผ่านการกำจัดความเป็นพิษในส่วนน้ำและในส่วนกากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสใช้เป็นซับสเตรทในการหมักโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 การศึกษากระบวนการหมักเอทานอล แบ่งชุดการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ใช้ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำ และไฮโดรไลเซทส่วนกาก โดยเตรียมอาหารทั้งสองส่วนใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อาหารละ 3 ฟลาสก์ เติมเปปโตน 10 กรัม ปรับพีเอชให้เป็น 6.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมหัวเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 จำนวน 2 ลูป หมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้ง รวมทั้งค่าพีเอชของอาหารหมัก จากนั้นหมักในสภาวะไร้อากาศโดยใช้จุกคอร์กปิดและบ่มที่สภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างเหมือนขั้นต้น ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอล ส่วนตะกอนเซลล์นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง จากการศึกษาพบว่าจากการหมักไฮโดรไลเซทส่วนน้ำเชื้อมีการเจริญได้สูงหลังการหมัก 12 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีการเจริญสูงสุดโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 14.88±0.90 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจะลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในไฮโดรไลเซทส่วนน้ำเท่ากับ 23.22±0.31 กรัมต่อลิตรปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 24-36 ชั่วโมงของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

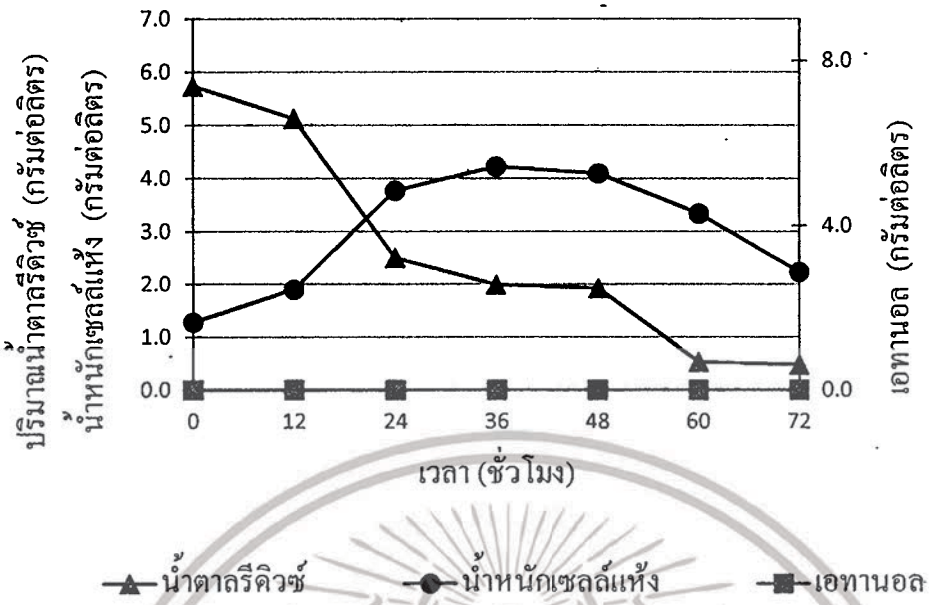
หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างช้าๆจนสิ้นสุดการหมัก ซึ่งจะมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 13.61±0.62 กรัมต่อลิตรสำหรับปริมาณเอทานอลในไฮโดรไลเซทส่วนน้ำค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12-36 ชั่วโมงของการหมักโดยมีปริมาณ เอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 โดยมีปริมาณ 8.15±0.02 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง ค่าพีเอชของน้ำหมักในไฮโดรไลเซทส่วนน้ำมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยมีพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-6.5 แสดงดังรูปที่ 4.5 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น โดยเชื้อจะนำน้ำตาลรีดิวซ์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอลขณะเดียวกันมีการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตซึ่งจะสังเกตได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น

จากการหมักไฮโดรไลเซทส่วนกาก พบการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักเอทานอลมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงในไฮโดรไลเซทส่วนน้ำ โดยพบว่าเชื้อมีการเจริญได้สูงสุดภายหลังการหมัก 12-36 ชั่วโมง โดยชั่วโมงที่ 36 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 4.22±0.43 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อลดลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในไฮโดรไลเซทส่วนกากเท่ากับ 5.12±0.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยมากน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12-24 ชั่วโมงของการหมักหลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างช้าๆจนสิ้นสุดการหมัก ซึ่งจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 0.47±0.02 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณเอทานอลในไฮโดรไลเซทส่วนกากมีน้อยมากจนไม่สามารถจะตรวจวัดได้ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น พีเอชของน้ำหมักมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากและมีแนวโน้มพีเอชลดลง อาจเนื่องมาจากเชื้อยีสต์มีกิจกรรมในการสร้างสารต่างๆเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ กรดคาร์บอนิก เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ทำให้พีเอชของน้ำหมักมีค่าลดลงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักจากไฮโดรไลเซทส่วนกากแสดงดังรูป 4.5



รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการหมักไฮโดรไลเซทส่วนน้ำของผักตบชวาด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการหมักไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวาด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.5.2 ผลการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลในอาหาร 2 ชนิด คือ ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำและไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวาโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843

สำหรับการหมักไฮโดรไลเซทส่วนน้ำและไฮโดรไลเซทส่วนกากผักตบชวาด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 ซึ่งพบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำหมัก *C. shehatae* TISTR 5843 มีค่า $Y_{x/s}$ 2.0820 ซึ่งสูงกว่าการใช้ไฮโดรไลเซทส่วนกากซึ่งมีค่า $Y_{x/s}$ 1.1283 และสัมพันธ์กับค่า $P_{x,\ batch}$ จะเห็นได้ว่าการหมักไฮโดรไลเซทส่วนน้ำด้วย *C. shehatae* TISTR 5843 ให้ค่า $P_{x,\ batch}$ สูงกว่าการหมักไฮโดรไลเซทส่วนกากผักตบชวา สำหรับค่า $Y_{p/s}$จากการหมักไฮโดรไลเซทส่วนน้ำด้วย *C. shehatae* TISTR 5843 มีค่า 1.1528 ซึ่งสูงกว่าการหมักในไฮโดรไลเซทส่วนกากที่มีค่า 0.0000 และสัมพันธ์กับค่า $P_{b,\ batch}$ โดยพบว่าการไฮโดรไลเซทส่วนน้ำหมักด้วย *C. shehatae* TISTR 5843 มีค่า $P_{p,\ batch}$ 0.1132 ซึ่งสูงกว่าการหมักในไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวาที่มีค่า 0.0000 แสดงดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลในอาหาร 2 ชนิด คือ ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำและไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวาโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843

ค่าจลนพลศาสตร์	*C. shehatae* TISTR 5843	
	น้ำ	กาก
$Y_{X/S}$	2.0820[a]	1.1283[c]
$Y_{P/S}$	1.1528[a]	0.0000[b]
$P_{x, batch}$	0.1857[a]	0.0410[c]
$P_{p, batch}$	0.1132[a]	0.0000[b]

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแนวนอน ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

: เมื่อ $Y_{x/s}$ คือ ค่าผลได้ของมวลชีวภาพต่อซับสเตรท

$Y_{p/s}$ คือ ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อซับสเตรท

$P_{x, batch}$ คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง หรือค่า Productivity ของมวลชีวภาพ

$P_{p, batch}$ คือ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง หรือค่า Productivity ของผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 0 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที เพื่อเลือกความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมต่อการย่อยผักตบชวาโดยพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเซทส่วนน้ำ และปริมาณเซลลูโลสในไฮโดรไลเซทส่วนกาก พบว่าการใช้กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 23.74±1.21 กรัมต่อลิตร และในไฮโดรไลเซทส่วนกากภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตรให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุดร้อยละ 15.36±2.43 จึงเลือกใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตรมาใช้ย่อยผักตบชวาต่อไป ภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำนำมากำจัดความเป็นพิษด้วยวิธีของ Kumar และคณะ (2009) มีผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นลดลงร้อยละ 14.66 จากนั้นนำมาหมักด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 สำหรับไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวา นำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 150 ยูนิตต่อ 10 กรัม ผักตบชวา และนำของเหลวที่ได้จากการย่อยมาหมัก จากการหมัก ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 ปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณเอทานอล 8.15±0.02 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 – 36 ชั่วโมง สำหรับน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 – 36 ชั่วโมง ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง พีเอชของอาหารหมักลดลงเล็กน้อยหลังการหมัก สำหรับการหมักไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวาด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงในไฮโดรไลเซทส่วนน้ำ ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นมีค่าน้อยมากจนไม่สามารถจะตรวจวัดได้อาจเนื่องจากในไฮโดรไลเซทส่วนกากของผักตบชวาภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นน้อยมากคือ 5.12±0.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์เป็นซับสเตรทในการผลิตเอทานอลของเชื้อนี้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงตลอดระยะเวลาของการหมัก ขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 – 36 ชั่วโมงของการหมัก

สำหรับการหมักไฮโดรไลเซทส่วนน้ำและส่วนกากของผักตบชวาด้วยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 พบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทส่วนน้ำหมักด้วย *C. shehatae* TISTR 5843 มีค่า $Y_{x/s}$ 2.0820 ซึ่งสูงกว่าการใช้ไฮโดรไลเซทส่วนกากและสัมพันธ์กับค่า $P_{x,\ batch}$ สำหรับค่า $Y_{p/s}$ จากการหมักไฮโดรไลเซทส่วนน้ำด้วย *C. shehatae* TISTR 5843 มีค่า 1.1528 ซึ่งสูงกว่าการใช้ไฮโดรไลเซทส่วนกากที่มีค่า 0.0000 และสัมพันธ์กับค่า $P_{p,\ batch}$

ข้อเสนอแนะ

5.1 ในการเก็บผักตบชวาควรเก็บในปริมาณมากและเก็บครั้งเดียวให้เพียงพอตลอดการทดลอง เนื่องจากผักตบชวาในแต่ละฤดูกาลมีความแตกต่างกันจึงทำให้ปริมาณลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกัน ทั้งนี้การเก็บผักตบชวาครั้งเดียวทำให้ปริมาณลิกโนเซลลูโลสมีความใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชัชนันท์ นิวาสวงษ์ เฉลิมเรือง วิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลลูโลซิกเอทานอลในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ปีที่ 40 ฉบับที่ 4. หน้า. 1073-1088. [เมื่อ 14 ตุลาคม 2556]

ทิพวรรณ แตงสวน. 2553. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร.หน้า 2-10. [เมื่อ 14 ตุลาคม 2556] ได้จาก http://161.246.67.22/aganimal_v2/THeSiSDoC/ 7481f15eb380ba12ac942c366bffdb04 .pdf

ธีรภัทร ศรีนรคุตร เลิศลักษณ์ แก้ววิมล ละเอียด แซ่โง้ว. 2549. การย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปีที่ 31 ฉบับที่ 1. หน้า 77-84.

นันทิกา คล้ายชม และคณะ. 2554. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากชางข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด. วิศวกรรมสาร มก,ฉบับที่ 75 ปีที่ 24 มกราคม - มีนาคม 2554. หน้า. 91-101.

เยาวลักษณ์ วัฒนาวรสกุล. 2552. การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในกระบวนการหมักเอทานอลจากข้าวโดยใช้เทคนิคการออกแบบ. หน้า 2058-2064. [เมื่อ 14 ตุลาคม 2556] ได้จาก http://www.eg.mahidol.ac.th/dept/egie/images/IE-Network Archives/ 2011/ PDF/ 4.QMA/QMA30.pdf

วิโรจน์ พุทธวิถี. 2553. เอทานอล. [เมื่อ 20 ตุลาคม 2556] ได้จาก http://waterpacific.com/ index.php/ 2010-08-14-10-07-37

วรพงษ์ สุริยจันทราทอง. 2535. การวิเคราะห์เยื่อใย (Detergent analysis). ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา. [เมื่อ 5 ตุลาคม 2556] ได้จาก http://www.dld.go.th/ncna_ nak/index/Detergent%20analysis.html

วรรณา อ่างทอง และคณะ. 2547. การประเมินค่าการย่อยได้ของอินทรียวัตถุและพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์โดยวิธี Hohenhiem Gas Test (2) วัตถุดิบอาหารสัตว์. รายงานผลงานวิจัยประจำปี, กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, หน้า. 364 – 379

สิริวุทธิ์ เสียมภักดี. 2551. นวัตกรรมพลังงานทดแทนไทย เอทานอลจากอ้อยและมันสำปะหลัง สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย. [เมื่อ 12 ตุลาคม 2556] ได้จาก http://www.vcharkarn.com/ varticle/38199

สิริวุทธิ์ เสียมภักดี. 2552. **อุตสาหกรรมเอทานอลไทย ปัญหา อุปสรรค และแนวทางการส่งเสริมพัฒนา.** หนังสือสมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย [เมื่อ 12 ตุลาคม 2556]ได้จาก http://thaitapiocastarch.org/article16_th.asp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุชาดา สังวรวงษ์พนา. 2556. การใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตเอทานอล. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ ส่วนน้ำเสียอุตสาหกรรมกรมควบคุมมลพิษ.ฉบับเดือนมีนาคม, หน้า 1-6. [เมื่อ 11 พฤศจิกายน 2556] ได้จาก http://wqm.pcd.go.th/water/images/stories/industry/journal/2556/athanol.pdf

อนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. 2554. การผลิตเอทานอลและเอนไซม์โดยกระบวนการหมักจากผักตบชวา. [เมื่อ 20 ตุลาคม 2556] ได้จาก http://research.rdi.ku.ac.th/forest/Project.aspx?ProjectNumber=5410151000&BudgetYear=2011

อาคม รวมสุวรรณ. 2556. ความรู้เรื่องเชื้อเพลิง E85. [เมื่อ 20 ตุลาคม 2556] ได้จาก http://www.thairath.co.th /content/life/344731

อำนวย ขวัญเมือง. 2538. การหมักแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เซลลูเลส และ *Saccharomyces cerevisiae* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Asli, A. E., Boles, E., Hollenberg, C. P., Errami, M. 2002. Conversion of xylose to ethanol by a novel phenol-tolerant strain of *Enterobacteriaceae* isolated from olive mill wastewater, Biotechnology Letters, Volume 24, Issue 13, pp. 1101-1105.

Aswathy, U. S., Sukumaran, R.K., Devi, G. L., Rajasree, K. P., Singhania, R. R.,Pandey, A. 2010. Bioethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy, Bioresource Technology, 101, pp. 925-930.

Chi, Z., Rover, M., Jun, E., Deaton, M., Johnston P., Brown R. C., Wen, Z., Jarboe L. R. 2013. Overliming detoxification of pyrolytic sugar syrup for direct fermentation of levoglucosan to ethanol. Bioresource technology, Volume 10, pp. 220-227.

Hisham, S., Bamufleh, Yahia A. Alhamed, Muhammad A. Daous. 2013. Furfural from midribs of date-palm trees by sulfuric acid hydrolysis. industrial crops and products, volume 42, pp. 421– 428

Knittel, C. R., Smith, A. 2012. Ethanol production and gasoline prices: A spurious correlation. Volume 12, pp. 1-43.

Ganguly, A., Chatterjee, P.K., Dey, A. 2012. Studies on ethanol production from water hyacinth – A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews. Volume 16, no.1, pp. 966-972.

Goyer, R. A., Stark, J. D. 1984. The impact of *Neochetina eichhorniae* on water hyacinth in southern Louisiana. journal of aquatic plant management, 22, 57-61.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kumar, A., Singh , L.K., Ghos, S. 2009. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. Bioresource Technology, Volume 100, No. 13, pp. 3293-3297.

Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. J.Clin. Microbiol. 35(5), pp. 1216-1223.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosaiicyiic acid reagent for determination of reducing sugar. analytical chemistry, 31: 426-428.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Biores. Technol. 96:673-686.

Tsubaki N., Tomishige K. 2002. Biomass to hydrocarbons in biomass handbook. 2nd edition, Ohmsha, Tokyo. pp. 20-24.

Palmqvist, E. and Hagerdal, B. H. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibitors and detoxification. Biores.Technol Volume 74, Issue 1, pp. 17-24.

Palmqvist, E. and Hagerdal, B. H. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Biores.Technol Volume 74, Issue 1, pp. 17-24.

Silverstein, R. A. 2007. A comparison of chemical pretreatment methodsfor improving saccharification of cotton stalks. Bioresource Technology 98, 3000–3011.

Sun,Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresour. Technol. 83:1-11.

Soest, V., P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Science 74:3583-3597.

Zhang, W. and Geng, A. 2012. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method. Biotechnology for Biofuels 5:46.

Zhu, J. Y., Pan, X.J. 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. Bioresource Technology, Volume 101, pp. 4992–5002.

[Online].Available:http://water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37

[Online].Available:http://www.thai-explore.net/documents/vdo_1299_399.doc

[Online].Available:http://www.region8.m-energy.go.th/ethanol.htm

[Online].Available:http://omniamicrobes.wordpress.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available:http://enologyaccess.org/EA2/index.php/winemicrobes/918-yeastid/85-blastodendrion- intermedium.html
[Online].Available:http://www.straininfo.net/strains/452855
[Online].Available:http://irrigation.rid.go.th/rid15/ppn/om/Water%20Hyacinth.htm
[Online].Available:http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2552/biot0352at_ch2.pdf
[Online].Available:http://www.engin.umich.edu/dept/che/research/savage/energy.html
[Online].Available:http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2552/biot0352at_ch2.pdf
[Online].Available:http://dwb.unl.edu/.../Biochem_3521/lect14/lect14.html[Online].Available:http://science.srru.ac.th/org/sci-elearning/courseonline/4022503/chapter3-disac.htm
[Online].Available:http://www.biotec.or.th/TSB/images/stories/Jounalbiotech/02%20y e ar%201%20no2%20se p%202554.pdf
[Online].Available:http://en.wikipedia.org/wiki/Schizosaccharomyces_pombe
[Online].Available:http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1509/saccharomyces-cerevisiae
[Online].Available:http://irrigation.rid.go.th/rid15/ppn/om/Water%20Hyacinth.htm
[Online].Available:http://www.farmkaset.org/contents/?content=00908
[Online].Available:http://develop.excise.go.th/Know_ethanal.php
[Online].Available:http://www.jie.or.jp/biomass/AsiaBiomassHandbook/Thai/Part-2_T.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้