

การหมักสารละลายไซโลสและไฮโดรไลเซตจากขานอ้อย
ด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* เพื่อผลิตเอทานอล



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การหมักสารละลายไซโลสและไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย
ด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* เพื่อผลิตเอทานอล



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fermentation of Xylose Solution and Hydrolysates from Sugarcane Bagasse
by Yeast *Pichia stipitis* for Ethanol Production



A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Bachelor of Engineering in Chemical Engineering
Faculty of Engineering
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริญญานิพนธ์เรื่อง

การหมักสารละลายไซโลสและไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยด้วยยีสต์
Pichia stipitis เพื่อผลิตเอทานอล

โดย

นายยศพล ติวีเศษ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.ณัฐนนท์ ไพบุลย์ศิลป์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปริญญานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาและอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบปริญญานิพนธ์

ณัฐนนท์ ไพบุลย์ศิลป์

ประธานกรรมการ

(ดร.ณัฐนนท์ ไพบุลย์ศิลป์)

อัญชลีพร วาริตสวัสดิ์ หล่อทองคำ

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชลีพร วาริตสวัสดิ์ หล่อทองคำ)

ธนวรรณ พิณรัตน์

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนวรรณ พิณรัตน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริญญานิพนธ์เรื่อง

การหมักสารละลายไซโลสและไฮโดรไลเซทจากขานอ้อยด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* เพื่อผลิตเอทานอล

โดย

นายยศพล ตีวิเศษ

ปริญญา

วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา

วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.ณัฐนนท์ ไพบูลย์ศิลป์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการเพิ่มมูลค่าไฮโดรไลเซทจากขานอ้อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่พบมากในประเทศไทยโดยการผลิตเอทานอลด้วยการหมักในระบบปิดโดยใช้ยีสต์ *Pichia stipitis* ATC.58376 และเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนจากสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้น 0.2, 5.0, 10.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร ตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิการหมัก 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็วรอบในการเขย่าขวดรูปชมพู่ 100 รอบต่อนาที พบว่ายีสต์มีระยะเวลาเจริญอย่างทวีคูณใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักที่ทุกภาวะของการทดลอง จากนั้นยีสต์จะเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารละลายไซโลสมีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์และผลได้ของเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะและสามารถผลิตเอทานอลได้สูงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไซโลสต่ำ ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลประมาณ 58 ที่ความเข้มข้นของสารละลายไซโลส 0.2 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไซโลสสูง อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์และร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลจะลดลง ที่ความเข้มข้นของสารละลายไซโลส 20 กรัมต่อลิตร ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 27 สำหรับการหมักไฮโดรไลเซทจากขานอ้อยมีร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 115 ซึ่งสูงกว่าร้อยละผลได้โดยมวลทางทฤษฎีประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้เพราะในไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย นอกจากไซโลสแล้วยังพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลหลายโมเลกุล นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าผลพลอยได้อื่นในไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย เช่น เฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ ผลการศึกษานี้แสดงความเป็นไปได้ของการใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรสำหรับเป็นแหล่งพลังงานทดแทนและวัตถุดิบสำหรับผลิตสารชีวเคมีที่มีมูลค่าสูง

Report Title	Fermentation of Xylose Solution and Hydrolysates from Sugarcane Bagasse by Yeast <i>Pichia stipitis</i> for Ethanol Production
By	Mr.Yotsapol Deewised
Degree	Bachelor of Engineering
Program	Chemical Engineering
Year	2016
Advisor	Dr.Natthanon Phaiboonsilpa

ABSTRACT

This research studied the utilization of hydrolysates from sugarcane bagasse, which is abundant agricultural residue in Thailand, by a closed-system fermentation to produce ethanol using yeast *Pichia stipitis* ATC.58376. Fermentation of xylose solutions at 0.2, 5.0, 10.0 and 20.0 g/l as the carbon source was compared. The experiments were conducted by fermentation temperature of 30°C for 72 hours using a shaking rate of Erlenmeyer flasks at 100 rpm. As a result, exponential growth phase of yeast was observed during the first 12-hour fermentation for all experimental conditions. Yeast growth rate reached its stationary phase at the end of fermentation of 72 hours accordingly. The concentration of the xylose solutions significantly affected the specific growth rate of yeast and ethanol yield. At low xylose concentration, yeast exhibited high specific growth rate and produced high yield of ethanol. The ethanol yield was approximately 58 wt% at the xylose concentration of 0.2 g/l. However, as the xylose concentration increased, the specific growth rate and ethanol yield decreased. The ethanol yield was found to be 27 wt% at the xylose concentration of 20 g/l. In case of the fermentation of hydrolysates from sugarcane bagasse, ethanol yield was 115 wt%, which was 2 times higher than theoretical yield. This was due to the fermentation of xylose, mono-saccharides and poly-saccharides in the hydrolysates from sugarcane bagasse. According to other relevant research, by-products in the hydrolysates such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural could inhibited the yeast growth. This study elucidated the feasibility of agricultural residue utilization as a potential resource for renewable energy and value-added biochemicals.

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสำเร็จจาก ดร.ณัฐนนท์ ไพบูลย์ศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ผู้จัดทำขอขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการ ตลอดจนดูแลและแก้ไขปัญหาต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี และขอขอบคุณทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สัญญาเลขที่ MRG5980129 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) อีกทั้งคณาจารย์และบุคคลหลายฝ่าย ดังรายนามต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชลีพร วาริตสวัสดิ์ หล่อทองคำ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนวรรณ พิณรัตน์ กรรมการผู้ตรวจสอบปริญญานิพนธ์ที่ตรวจแก้รายงานให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นพดล เหล่าศิริพจน์ อาจารย์ประจำบัณฑิตวิทยาลัยร่วมด้านพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และ ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ อาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษาและเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและเครื่องมือสำหรับการทดลอง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และรุ่นพี่รุ่นน้องที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ที่ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจตลอดการทำโครงการ หากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขอน้อมรับ และขออภัยมา ณ ที่นี้

ยศพล ตีวิเศษ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....	I
ABSTRACT.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญรูป.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลิกโนเซลลูโลส.....	4
2.2 วิธีการปรับสภาพทางเคมีของวัสดุลิกโนเซลลูโลส.....	5
2.3 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส.....	8
2.4 น้ำตาลรีดิวซ์.....	8
2.5 การหมักไซโลสเพื่อผลิตเอทานอล.....	9
2.6 ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์.....	11
2.7 ปัจจัยที่มีผลการหมักไซโลส.....	13
2.8 ปัจจัยที่มีผลยับยั้งการหมักไซโลส.....	14
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	21
3.1 การเตรียมไฮโดรไลเซทของขานอ้อย.....	21
3.2 การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ.....	21
3.3 การเตรียมเชื้อก่อนการหมัก.....	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 การสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณของเซลล์ยีสต์แห้ง.....	22
3.5 การหมัก.....	23
3.6 การวัดการเจริญของยีสต์	23
3.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอล.....	24
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	25
4.1 ปริมาณของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในไฮโดรไลเซตจากชานอ้อย.....	25
4.2 ผลของความเข้มข้นต่อการเจริญของยีสต์ในสารละลายไซโลส และไฮโดรไลเซตจากชานอ้อย.....	26
4.3 การผลิตเอทานอลจากการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้นต่างๆ.....	27
4.4 การผลิตเอทานอลจากการหมักไฮโดรไลเซตจากชานอ้อย.....	30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	32
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	32
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	33
บรรณานุกรม.....	34
ภาคผนวก	38
ภาคผนวก ก.....	39
ภาคผนวก ข.....	41

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบหลักทางเคมีของลิกโนเซลลูโลส.....	4
ตารางที่ 2.2 การผลิตเอทานอลจากสารตั้งต้นและภาวะต่างๆ.....	16
ตารางที่ 2.3 ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล.....	20
ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรไลเซตจากชานอ้อย	25
ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในแหล่งคาร์บอนในการหมัก.....	27
ตารางที่ 4.3 ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลและเทียบกับทฤษฎี.....	31
ตารางที่ ข.1 พื้นที่ได้กราฟโครมาโทแกรมและความเข้มข้นในการหมักที่ต่างกัน.....	45



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1	กระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอลจากไซโลส.....	10
รูปที่ 2.2	กราฟลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างลการที่มของจำนวนเซลล์กับเวลา.....	11
รูปที่ 4.1	กราฟระหว่างลการที่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมัก ของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้นต่างๆ	26
รูปที่ 4.2	ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักสารละลายไซโลส ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร	28
รูปที่ 4.3	ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักสารละลายไซโลส ความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร	28
รูปที่ 4.4	ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักสารละลายไซโลส ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร	29
รูปที่ 4.5	ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักสารละลายไซโลส ความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตร	30
รูปที่ 4.6	ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักไฮโดรไลเซทจาก ชานอ้อย	31
รูปที่ ข.1	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งกับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร	41
รูปที่ ข.2	กราฟระหว่างลการที่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมัก ของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร.....	42
รูปที่ ข.3	กราฟระหว่างลการที่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมัก ของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร.....	42
รูปที่ ข.4	กราฟระหว่างลการที่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมัก ของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร.....	43
รูปที่ ข.5	กราฟระหว่างลการที่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมัก ของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตร.....	43
รูปที่ ข.6	กราฟระหว่างลการที่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมัก ของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย.....	44
รูปที่ ข.7	กราฟมาตรฐานพื้นที่ได้กราฟโครมาโทแกรมและความเข้มข้นของไซโลส	44
รูปที่ ข.8	กราฟมาตรฐานพื้นที่ได้กราฟโครมาโทแกรมและความเข้มข้นของเอทานอล	45

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

วิกฤตพลังงานในปัจจุบันทำให้มีการรณรงค์ลดการใช้เชื้อเพลิงปิโตรเลียม และเพิ่มปริมาณการใช้เชื้อเพลิงจากแหล่งพลังงานทดแทน แผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี ของกระทรวงพลังงานมีเป้าหมายเพิ่มอัตราส่วนการใช้พลังงานทดแทนเป็นร้อยละ 20 ของปริมาณการใช้พลังงานขั้นสุดท้ายของประเทศในปี 2565 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2559) พลังงานทดแทนที่มีศักยภาพและเหมาะสมที่จะนำมาใช้ประเภทหนึ่ง คือ พลังงานชีวมวล (Biomass energy) ซึ่งหมายถึงพลังงานที่ได้มาจากชีวมวล หรือสสารในสถานะของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ที่ผลิตหรือแปรรูปมาจากวัตถุดิบอินทรีย์ในธรรมชาติ รวมทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร ชุมชน ฯลฯ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2550)

ในอุตสาหกรรมเกษตรนอกเหนือจากผลิตผลของการเพาะปลูก ผลพลอยได้ที่สำคัญ คือ วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น ทะลายปาล์มเปล่า ฟางข้าว แกลบ ชังข้าวโพด และชานอ้อย จากรายงานพบว่า ในปี 2556 ประเทศไทยมีวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร 61,766,610 ตัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2559) วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรที่กล่าวมาข้างต้นส่วนใหญ่เป็นชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ที่มีองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารอินทรีย์ เมื่อใช้กระบวนการทางกายภาพ เคมี และ/หรือชีวภาพภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เซลลูโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และเฮมิเซลลูโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ผสมที่ประกอบด้วยไซโลสเป็นหลัก (Shinozaki และ Kitamoto, 2011) ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักแอลกอฮอล์หรือผลิตภัณฑ์ทางเคมีอื่นๆ ได้

วิธีการหมักกลูโคสเป็นเอทานอลสามารถทำได้โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* กระบวนการดังกล่าวเป็นที่รู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์จากวัตถุดิบที่เป็นแป้งและน้ำตาล แต่การหมักโดยใช้สารตั้งต้นเป็นไซโลสที่ได้จากการไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสเพื่อผลิตเอทานอลยังคงอยู่ในขั้นตอนการวิจัยและพัฒนา งานวิจัยโดยส่วนมากสนใจการปรับสภาพ (Pretreatment) ลิกโนเซลลูโลสเพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน และนำกากที่ประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นหลักไปเปลี่ยนเป็นกลูโคสด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้สารละลายกรดและ/หรือเอนไซม์ แล้วจึงหมักต่อจนได้เอทานอล แต่ไม่ค่อยให้ความสนใจศึกษาและนำไฮโดรไลเซทของเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากขั้นตอนการปรับสภาพไปใช้ โดยเฉลี่ยลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 25-35 โดยมีมวล (Rabemanolontsoa และ Saka, 2013) หาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถใช้ประโยชน์จากเฮมิเซลลูโลสโดยเปลี่ยนเป็นเชื้อเพลิงหรือผลิตภัณฑ์ทางเคมีที่มีมูลค่าเพิ่มอื่นๆ ได้ จึงเป็นแนวทางที่เพิ่มมูลค่าของลิกโนเซลลูโลสและเกิดการใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่า

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลมี 2 กลุ่มคือ กลุ่มแบคทีเรีย เช่น *Zymomonas mobilis* และกลุ่มยีสต์ เช่น *Kluyveromyces marxianus* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Olsson และ Hahn-Hägerdal, 1996) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีข้อจำกัดในการหมักไฮโดรไลสที่ได้จากการไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลส (ประเวทย์ และ คณะ, 2552) แต่มียีสต์บางชนิด ได้แก่ *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* และ *Pachysolen tannophilus* ที่สามารถผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสได้ (Banerjee และคณะ, 2009; Jeffries และคณะ, 2007; Zaldivar และคณะ, 2001) จากจุดมุ่งหมายในการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โครงการนี้จึงศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยการหมักไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* และเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนจากสารละลายไฮโดรไลสความเข้มข้นต่างๆ ผลการวิจัยที่ได้จะช่วยให้เห็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าแก่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และช่วยแก้ปัญหาด้านการจัดการขยะชีวมวลอย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยตอบสนองต่อแผนพัฒนาพลังงานทดแทนของกระทรวงพลังงาน

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรไลสในการหมักด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* เพื่อผลิตเอทานอล และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการหมักโดยใช้ไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3 ขอบเขตการศึกษา

- 1.3.1 เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research)
- 1.3.2 ชานอ้อยที่ใช้ในการทดลองเป็นอ้อยพันธุ์สิงคโปร์ และนำมาเตรียมเป็นตัวอย่างการทดลองโดยสกัดสารมีซัวและไม่มีซัวออกจนหมด (Extractives-free sample)
- 1.3.3 การเตรียมไฮโดรไลเซทใช้ชานอ้อยปราศจากสารสกัดและน้ำปราศจากไอออน โดยทำปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์แบบกะ (Batch reactor) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 210 องศาเซลเซียส แล้วหยุดปฏิกิริยาทันที
- 1.3.4 การทดลองการหมักเพื่อผลิตเอทานอลมีตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมดังนี้

ตัวแปรต้น	ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรไลส 0.2, 5.0, 10.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร และไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย
-----------	--

- ตัวแปรตาม - ปริมาณของเอทานอลที่ผลิตได้
 - ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเหลว
 - การเจริญของเชื้อ
- ตัวแปรควบคุม - ปริมาตรการหมัก 150 มิลลิลิตร
 - ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งในการหมักเริ่มต้น 0.01 กรัมต่อลิตร
 - อุณหภูมิการหมัก 30 องศาเซลเซียส
 - ความเร็วรอบในการเขย่าขวดรูปชมพู่ 100 รอบต่อนาที

1.3.5 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง คือ *Pichia stipitis* ATC.58376

1.3.6 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการหมัก ได้แก่ สารละลายไซโลส และไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย

1.3.7 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายไซโลสต่อผลได้โดยมวลของเอทานอล และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการหมักเมื่อใช้ไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

- 1.4.1 ศึกษาทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- 1.4.2 แหล่งคาร์บอนในการหมัก ได้แก่ สารละลายไซโลส และไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย
- 1.4.3 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากการหมักสารละลายไซโลส
- 1.4.5 ศึกษาการผลิตเอทานอลจากการหมักไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย
- 1.4.6 สรุปผลการทดลองและจัดทำรายงาน

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

- 1.5.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากการหมักไซโลสและไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย
- 1.5.2 สามารถนำภาวะที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลจากการหมักไฮโดรไลเซทของลิกโนเซลลูโลสอื่นๆ ได้
- 1.5.3 เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลส คือ สารอินทรีย์จากผนังเซลล์ของพืช ซึ่งมีโครงสร้างแบบเชิงซ้อนประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และองค์ประกอบอื่นๆ ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างของลิกโนเซลลูโลส จำแนกตามประเภทของพืช แหล่งของลิกโนเซลลูโลสที่พบมาก ได้แก่ ไม้ทั้งเนื้อแข็ง (Hardwoods) และเนื้ออ่อน (Softwoods) วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ชังข้าวโพด เส้นใยข้าวโพด แกลบ และฟางข้าว และวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหาร (สถาบันวิจัยภาวะแวดล้อม, 2558) โดยส่วนใหญ่องค์ประกอบทางเคมีของลิกโนเซลลูโลสมีเซลลูโลสร้อยละ 40 เฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 30 และลิกนินร้อยละ 30 โดยมวล

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบหลักทางเคมีของลิกโนเซลลูโลส (Rabemanolontsoa และ Saka, 2013)

ลิกโนเซลลูโลส		องค์ประกอบ (ร้อยละโดยมวล)			
		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	อื่นๆ*
พืชใบเลี้ยงคู่	สนญี่ปุ่น	38.67	23.16	33.78	4.39
	บีชญี่ปุ่น	43.94	28.43	24.02	3.60
พืชใบเลี้ยงเดี่ยว	ไม้	39.80	31.41	20.81	7.98
	ฟางข้าว	34.53	21.82	20.22	23.42
	ชังข้าวโพด	34.61	33.10	18.16	14.13
	ชานอ้อย	40.92	33.01	22.33	3.74
	ลำต้นปาล์ม	31.10	28.86	28.66	11.38

หมายเหตุ *อื่นๆ ได้แก่ โปรตีน แป้ง สารสกัด และเถ้า

2.1.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) มีลักษณะเป็นโซ่ตรง ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic linkage) เกิดเป็นพอลิเมอร์กลูแคน (Glucan) มีความยาวตามธรรมชาติประมาณ 10,000 หน่วย ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน เกิดเป็นเส้นใยขนาดเล็ก เรียกว่า ไมโครไฟบริล (Microfibril) เมื่อเส้นใยเหล่านี้ประกบกันเป็นจำนวนมากจะยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน และเกิดเส้นใยขนาดใหญ่ เรียกว่า ไฟเบอร์ เซลลูโลสมีสมบัติที่เป็นผลึกและไม่ละลายน้ำ (Eriksson และคณะ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1990) พบในส่วนของผนังเซลล์ของพืช อยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ปริมาณที่พบแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืช เช่น เนื้อไม้พบประมาณร้อยละ 40-50 และเส้นใยฝ้ายพบประมาณร้อยละ 98 โดยมวล

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ (Heteropolymer) ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ ไซโลส (Xylose) อะราบินอส (Arabinose) แมนโนส (Mannose) กลูโคส (Glucose) และกาแล็กโทส (Galactose) (Bastawde และคณะ, 1992) โมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 200 หน่วย เฮมิเซลลูโลสที่พบในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักมากถึงร้อยละ 85-93 โดยไซโลสที่พบจะเชื่อมต่อกันเป็นสายไซโลแลน (Xylan) ด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก และมีน้ำตาลหรือกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ต่อเป็นโซ่กิ่ง ทำให้เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous) (Browning, 1963) สำหรับองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ กรดคลอโรโรนิก กรดกาแล็กตูโรนิก และกรดแอสติค สามารถตรวจพบได้เช่นกัน แต่มีปริมาณเล็กน้อย

2.1.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนขอบมุมผนังเซลล์ของพืชมีปริมาณแตกต่างกันไปตามชนิดพืช ในธรรมชาติลิกนินเป็นส่วนประกอบที่ช่วยป้องกันเซลลูโลสไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โครงสร้างประกอบด้วยโมเลกุลที่เป็นวงแหวนเชื่อมต่อกันแบบสุ่มซึ่งทำให้เกิดลักษณะเป็นโครงสร้าง 3 มิติ ด้วยพันธะอีเทอร์ พันธะเอสเทอร์ หรือพันธะระหว่างคาร์บอน 2 โมเลกุล เนื่องจากความซับซ้อนและลักษณะความไม่มีซ้ำของโมเลกุลทำให้ลิกนินมีความทนทานต่อการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์ (Ragg และ Fields, 1987)

2.2 วิธีการปรับสภาพทางเคมีของวัสดุลิกโนเซลลูโลส

วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพคือ การกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส ลดความเป็นผลึก เพิ่มความเป็นรูพรุนของวัสดุ และเพิ่มพื้นที่ผิวเซลลูโลส เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเกิดการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์ (Zheng และคณะ, 2009)

2.2.1 การระเบิดด้วยไอน้ำหรือคาร์บอนไดออกไซด์ (Steam or CO₂ explosion)

หลักการของวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ ทำให้ลิกโนเซลลูโลสอิมัตว์ด้วยไอน้ำภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง จากนั้นลดความดันลงทันทีทำให้น้ำระเหยออกจากโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสอย่างรวดเร็วส่งผลให้เส้นใยของเซลลูโลสแยกออกจากกัน การระเบิดด้วยไอน้ำจึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างและเพิ่มพื้นที่ผิวของเซลลูโลสเพื่อให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ ภายใต้ภาวะดังกล่าวจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเอมิเซลลูโลสเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย

สำหรับการระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์คล้ายกับการระเบิดด้วยไอน้ำ แต่การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เป็นการใช้กรดคาร์บอนิกที่เกิดจากการละลายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอัตราการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสในขั้นตอนถัดไป โดยทั่วไปนิยมใช้ตัวทำละลายสารอินทรีย์ร่วมด้วย เช่น เอทานอล เพื่อช่วยในการขจัดลิกนิน วิธีการนี้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้ไอน้ำ แต่ไม่เกิดตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนไฮโดรไลซิสเซลลูโลสเหมือนวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (Ragg และ Fields, 1987)

2.2.2 การใช้น้ำร้อนอัดความดัน (Liquid hot compressed water method)

วิธีการนี้ใช้น้ำอุณหภูมิสูงที่มีความดันสูงกว่าจุดอิมัตว์เพื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ออยู่ระหว่าง 160 ถึง 240 องศาเซลเซียส และความดันมากกว่า 5 เมกะปาสคาล ที่ระยะเวลา 20 นาที วิธีการนี้ทำให้เกิดสารยับยั้งซึ่งขัดขวางการเติบโตของจุลินทรีย์ปริมาณน้อย เช่น ฟูเฟอร์รัล และกรดคาร์บอกซิลิก วิธีการนี้สามารถผลิตไซโลสได้ในปริมาณมาก ประมวลร้อยละ 88-90 โดยไม่ต้องใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ทั้งนี้ควรมีการปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 4-7 เนื่องจากว่าในช่วงดังกล่าวทำให้เอมิเซลลูโลสยังคงอยู่ในรูปของโอลิโกเมอร์ (oligomeric) เพื่อช่วยลดปัญหาการเกิดการรวมตัวเป็นพอลิเมอร์ใหม่อีกครั้ง (Mosier และคณะ, 2005)

2.2.3 การใช้น้ำที่ภาวะเหนือหรือใต้วิกฤต (Super/subcritical water method)

น้ำที่ภาวะเหนือหรือใต้วิกฤต (อุณหภูมิวิกฤตของน้ำ 374.2 องศาเซลเซียส และความดันวิกฤตของน้ำ 22.1 เมกะปาสคาล) มีสมบัติผสมระหว่างวัฏภาคของเหลวและก๊าซ ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) มีค่าลดลงทำให้เพิ่มสมบัติในการละลายสารที่มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และมีค่าไอออนิกโปรดักต์ (Ionic product) เพิ่มขึ้นส่งผลให้น้ำที่ภาวะดังกล่าวสามารถกลายเป็นแหล่งจ่ายไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ไอออนได้ การใช้น้ำที่ภาวะเหนือหรือใต้วิกฤตในการแยกสลายลิกโนเซลลูโลสจึงสามารถเกิดไฮโดรไลซิสได้เสมือนมีตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูง แต่ในขณะเดียวกันปฏิกิริยาข้างเคียง ซึ่งได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาดังน้ำออกจากโมเลกุลน้ำตาล (Dehydration) และปฏิกิริยาการแตกโมเลกุล (Fragmentation) สามารถเกิดขึ้นภายใต้ภาวะ

ดังกล่าวเช่นกัน ทำให้ผลได้ของน้ำตาลลดลงอย่างมากหากไม่มีการควบคุมภาวะการทำปฏิกิริยาที่ดี นอกจากนี้ประเด็นเรื่องการใช้พลังงานสูงและความปลอดภัยยังเป็นข้อจำกัดของวิธีการนี้ (Lu และคณะ, 2009)

2.2.4 การปรับสภาพโดยใช้กรด (Acid pretreatment)

กระบวนการปรับสภาพโดยใช้กรดมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินออกจากโครงสร้าง เพิ่มพื้นที่ผิวของเซลลูโลส และผลิตกลูโคสให้ได้ในปริมาณสูงในขั้นตอนถัดไป ซึ่งได้แก่การไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ชนิดของกรดที่นำมาปรับสภาพมีหลายประเภท ได้แก่ กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก หรือกรดฟอสฟอริก ในกระบวนการปรับสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจาง (Palmqvist และคณะ, 2002) การใช้สารละลายกรดเจือจางเพื่อปรับสภาพลิกนินเซลลูโลสมักถูกใช้เพื่อไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลรีดิซ ตามด้วยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส (Silverstein และคณะ, 2007)

2.2.5 การปรับสภาพโดยใช้ด่าง (Alkali pretreatment)

กลไกการทำงานของด่างในการปรับสภาพลิกนินเซลลูโลส ได้แก่ การทำให้เกิดการพองตัวภายในโมเลกุลและพันธะภายในของไซแลนในเฮมิเซลลูโลส ซึ่งความพรุนของวัสดุเพิ่มขึ้นได้เมื่อสายโซ่ที่เชื่อมต่อกันภายในของโมเลกุลดังกล่าวถูกทำลาย การใช้ด่างเจือจางในการปรับสภาพลิกนินเซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายใน ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการไฮโดรไลซิส การเพิ่มความพรุนในวัสดุลิกนินเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ นอกจากนี้ด่างยังสามารถทำลายพันธะเคมีระหว่างโมเลกุลของลิกนิน และทำลายพันธะเคมีระหว่างโมเลกุลของลิกนินกับเฮมิเซลลูโลส ปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในลิกนินเซลลูโลสส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการปรับสภาพโดยใช้ด่าง (Silverstein และคณะ, 2007) ด่างที่นิยมใช้ในการแยกลิกนิน ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Kim และคณะ, 2008)

2.2.6 การย่อยเปียก (Wet oxidation)

วิธีการนี้ใช้ออกซิเจนและอากาศเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำภายใต้แรงดัน และระยะเวลาสั้น โดยทั่วไปจะใช้ อุณหภูมิ 170-200 องศาเซลเซียส ความดันระหว่าง 10-12 บาร์ของออกซิเจน และเวลา 10-15 นาที (Ogbonna และคณะ, 2001) จากงานวิจัยของ Mishima และคณะ พบว่าการย่อยเปียกมีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน และทำให้ผลได้ของเซลลูโลสในกากของแข็งมีค่าเพิ่มขึ้น วิธีการนี้นิยมใช้ในกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเอทานอลแบบการย่อยให้เป็นน้ำตาลพร้อมการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

2.3 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส

ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส คือ ปฏิกริยาที่น้ำเข้าไปสลายพันธะ ทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ แยกสลายเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง สามารถเกิดขึ้นได้โดยมีน้ำเป็นตัวทำปฏิกริยาภายใต้ภาวะที่ อุณหภูมิและ/หรือความดันสูง หรืออาจใช้กรดหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกริยาได้เช่นกัน การทำ ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลสมีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายโครงสร้างและตัดสายโซ่พอลิเมอร์ของ เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสให้สั้นลง ผลผลิตของเหลวหรือไฮโดรไลเซตที่จะได้ประกอบด้วยน้ำตาล รีดิวิซ์หลายชนิดซึ่งสามารถนำไปหมักเป็นเอทานอลได้ในขั้นตอนถัดไป การไฮโดรไลซิส เฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ ไซโลส และ อะราบิโนส น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ กลูโคส กาแลกโทส และ แมนโนส และน้ำตาลหลายโมเลกุลอื่นๆ ที่อยู่ในรูปพอลิเมอร์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหล่านี้ ส่วนการ ไฮโดรไลซิสเซลลูโลสจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และน้ำตาลหลายโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งเป็น พอลิเมอร์ของกลูโคส เช่น เซลโลไบโอส (Cellobiose) เซลโลไตรโอส (Cellotriose) เซลโลเตตระโอส (Cellotetraose) เป็นต้น ทั้งนี้ชนิดและอัตราส่วนของน้ำตาลที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและภาวะ ในการทำปฏิกริยาไฮโดรไลซิส (Bosch และคณะ, 2010)

2.4 น้ำตาลรีดิวิซ์

น้ำตาลรีดิวิซ์ คือ น้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตนอิสระ ซึ่งมีสมบัติเป็นตัวรีดิวิซ์ได้ น้ำตาลที่ถูก จัดอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวิซ์ ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทุกชนิด เช่น อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส กาแลกโทส และแมนโนส เป็นต้น และน้ำตาลโมเลกุลคู่หรือน้ำตาลหลายโมเลกุล บางชนิดที่อยู่ในรูป สายโซ่เปิดซึ่งเผยหมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตนอิสระออกมา เช่น เซลโลไบโอส (Cellobiose) แลกโทส (Lactose) และมอลโทส (Maltose) เป็นต้น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่ และหลายโมเลกุลที่ได้ จากการไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลสล้วนเป็นน้ำตาลรีดิวิซ์ ดังนั้นปริมาณของน้ำตาลจากลิกโนเซลลูโลส ในไฮโดรไลเซต (Hydrolysates) จึงสามารถรายงานในรูปน้ำตาลรีดิวิซ์ทั้งหมด (Total reducing sugars, TRS) (Campbell และ Farrell, 2012; Nelson, 1994; Miler, 1959)

2.5 การหมักไซโลสเพื่อผลิตเอทานอล

2.5.1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด (McMillan, 1993) จำแนกได้ดังนี้

- 1) ยีสต์ ได้แก่ *Brettanomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Pachysolen*, *Schizosaccharomyces* และเชื้อที่มีการปรับพันธุกรรมให้สามารถใช้ไซโลสแทนกลูโคสได้ เช่น *Saccharomyces* และ *Schizosaccharo myces*
- 2) รา ได้แก่ *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Neurospora*, *Paecilomyces* และ *Rhizopus*
- 3) แบคทีเรีย ได้แก่ *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Thermoanaerobacter* และเชื้อที่มีการปรับพันธุกรรมให้สามารถใช้ไซโลสได้ เช่น *Erwinia*, *Escherichia* และ *Klebsiella*

2.5.2 กลไกเมตาบอลิซึมของการผลิตเอทานอลจากไซโลสของเชื้อจุลินทรีย์

การขนส่งไซโลสเข้าสู่เซลล์ของยีสต์จำเป็นต้องใช้โปรตีนช่วยขนส่ง (Transport protein) รูปแบบการขนส่งไซโลสเข้าสู่เซลล์ของยีสต์ มี 2 แบบ คือ การขนส่งแบบใช้พลังงาน (Active transport) ที่พบในยีสต์โดยจะใช้พลังงานจากการสลายอาหารระดับเซลล์ คือ อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate, ATP) เป็นอะดีโนซีนไดฟอสเฟต (Adenosine diphosphate, ADP) เป็นแรงขับเคลื่อน โดยการขนส่งแบบใช้พลังงานดังกล่าวต้องอาศัยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยนอะดีโนซีนไตรฟอสเฟตเป็นอะดีโนซีนไดฟอสเฟต และแบบที่ 2 การขนส่งแบบมีสิ่งอำนวยความสะดวก (Facilitated transport) ซึ่งส่วนมากจะพบในแบคทีเรีย การลำเลียงแบบนี้ไม่ใช้พลังงานและไม่อาศัยออกซิเจน แต่อาศัยหลักความต่างของความเข้มข้นของน้ำตาลเป็นแรงขับเคลื่อน (Jojima และคณะ, 2010)

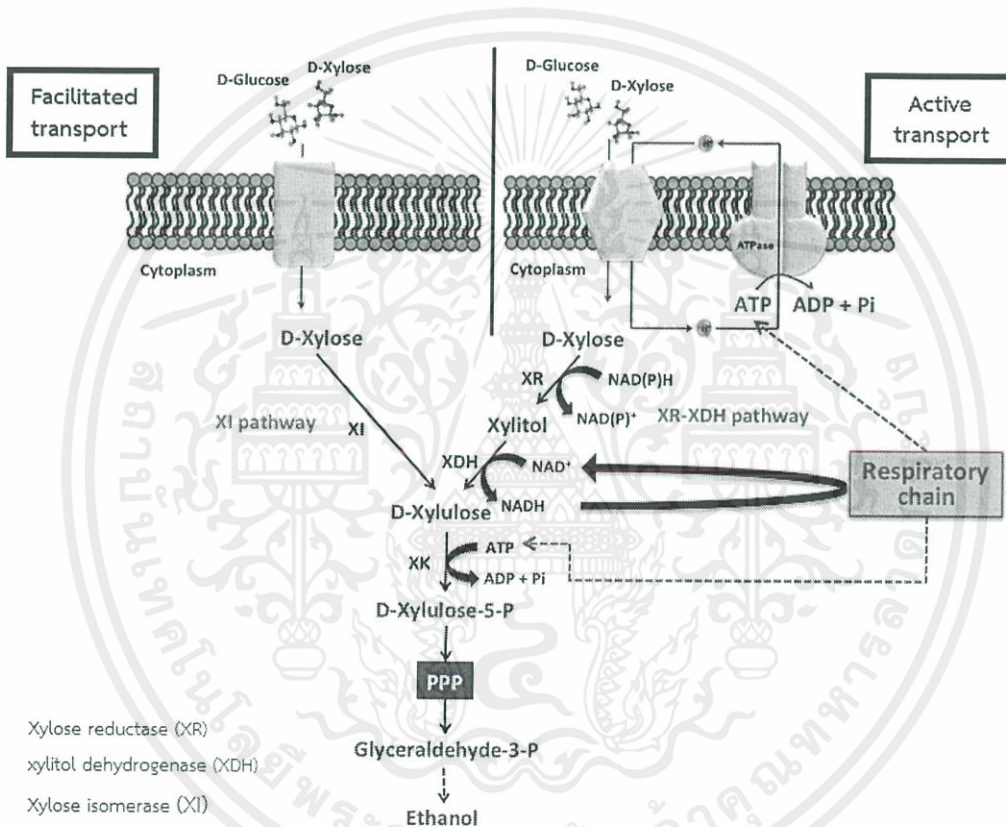
กระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์นั้นจะใช้การขนส่งแบบใช้พลังงาน ซึ่งยีสต์จะต้องใช้พลังงานจากการสลายอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในการนำไซโลสเข้าสู่เซลล์ จากนั้นไซโลสจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเตส (Xylose reductase, XR) และใช้ นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) เป็นโคแฟกเตอร์ ไซลิทอลที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นไซลูโลส (Xylulose) โดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (Xylitol dehydrogenase, XDH) และใช้ นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) เป็นโคแฟกเตอร์ ไซลูโลสจะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตและเร่งด้วยเอนไซม์ไซลูโลโคเนส (Xylulokinase) จนได้ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-phosphate, X5P) หลังจากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจึงสามารถเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway, PPP) และถูกสร้างต่อไปเป็นเอทานอล (Hahn-Hagerdal และคณะ, 2007) ปฏิกริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคมีในการเปลี่ยนไซโลสเป็นเอทานอลแสดงดังสมการที่ 2.1 และกระบวนการเมตาบอลิซึมแสดงดังรูปที่ 2.1



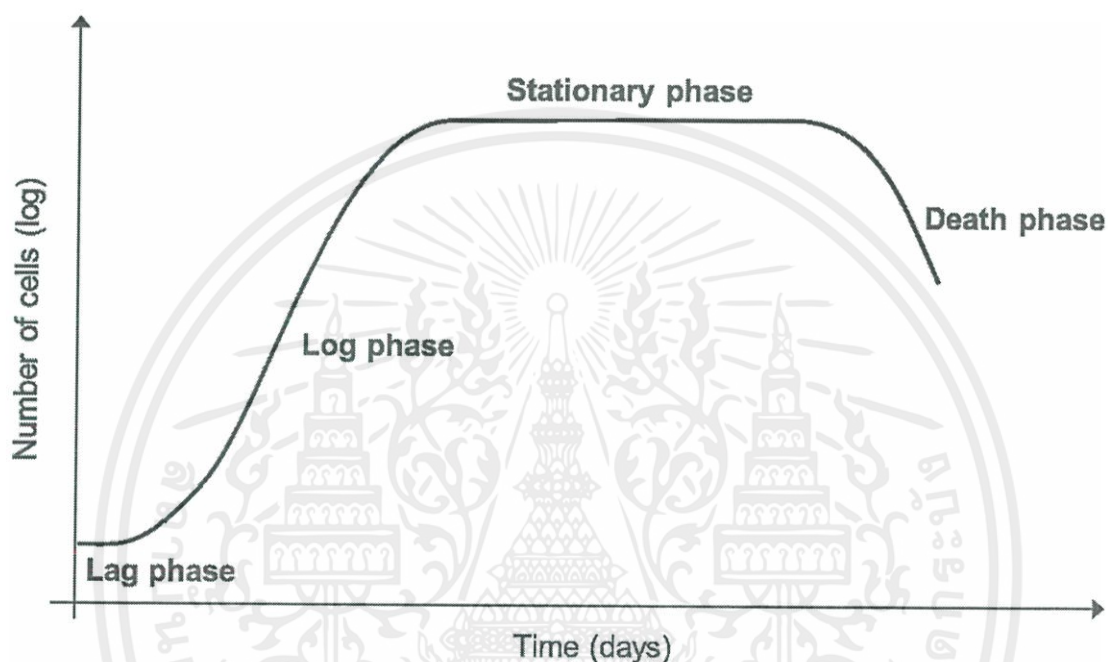
จากสมการที่ 2.1 พบว่าไซโลส 3 โมล สามารถถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 5 โมล การคำนวณจะได้ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลต่อไซโลสเท่ากับ 51.11 การคำนวณแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก



รูปที่ 2.1 กระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอลจากไซโลส (Lertwattanasakul และคณะ, 2013)

2.6 ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2560)

จุลินทรีย์เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยสามารถสังเกตได้จากจำนวนที่เพิ่มขึ้น หากนำจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ กัน มาพลอตกราฟโดยเทียบกับเวลา ซึ่งอาจใช้ค่าลอการิทึมของจำนวนจุลินทรีย์ หรือค่าจำนวนจริงของจุลินทรีย์ก็ได้ จะพบว่าจำนวนประชากรของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่แตกต่างกันตามช่วงของเวลา กราฟแสดงการเจริญของจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นระยะต่างๆ ได้ 4 ระยะ ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กราฟลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างลอการิทึมของจำนวนเซลล์กับเวลา (Tamara และ Claudia, 2016)

2.6.1 ระยะพัก (Lag phase)

เป็นระยะเริ่มต้นหลังใส่จุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระยะนี้จุลินทรีย์จะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนจุลินทรีย์ยังไม่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เพราะยังไม่เกิดการแบ่งเซลล์ แต่เซลล์จะมีความว่องไว และสังเคราะห์โปรโทพลาซึม (Protoplasm) ใหม่ รวมทั้งสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) เพื่อให้เพียงพอต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ ในระยะพักนี้เป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีกิจกรรมทางสรีรวิทยาสูง ขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการเพิ่มความยาว และมีการเพิ่มโปรตีนและน้ำหนักแห้งด้วย ตอนปลายของระยะนี้ จุลินทรีย์จะเริ่มแบ่งตัว แต่เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ได้แบ่งตัวพร้อมกัน ดังนั้นจำนวนประชากรจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น

ระยะพักจะยาวนานเพียงใดขึ้นกับสภาพแวดล้อม และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ อาทิเช่น ถ้านำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงอาหารชนิดหนึ่งไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดิมระยะพักจะสั้น หรือถ้านำ

จุลินทรีย์ที่พร้อมจะแบ่งตัวเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ระยะพักจะสั้นลงอีก แต่ถ้าเชื่อนั้นมีความผิดปกติหรือเป็นเชื้อที่เก็บไว้นานจุลินทรีย์ก็จะต้องใช้เวลานานในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่

2.6.2 ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Logarithmic phase หรือ exponential phase)

เป็นระยะที่จุลินทรีย์แบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่าๆ กัน ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์มีความว่องไวที่สุด และสารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็ว การแบ่งเซลล์จะสัมพันธ์กับการสังเคราะห์โปรตีนโพลีซิมและกิจกรรมทางเคมีของจุลินทรีย์ จำนวนจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า จึงทำให้ลักษณะของกราฟเป็นแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential function)

เมื่อจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมก็เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นหากสถานะแวดล้อมอื่นๆ คงที่ อัตราการเพิ่มของเซลล์จะแปรผันตามความเข้มข้นของเซลล์ในขณะนั้น ดังความสัมพันธ์ในสมการที่ 2.2

$$\frac{dy}{dx} \propto y \quad (2.2)$$

เมื่อ y = ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
 x = เวลา (ชั่วโมง)

จากความสัมพันธ์แปรผันจะสามารถเปลี่ยนเป็นสมการโดยแทนด้วยค่าคงที่ μ สามารถเขียนสมการได้ดังนี้

$$\frac{dy}{dx} = \mu y \quad (2.3)$$

เมื่อ y = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
 x = เวลา (ชั่วโมง)
 μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) (ชั่วโมง⁻¹)

เมื่ออินทิเกรตสมการข้างต้นจะได้

$$y_x = y_0 e^{\mu x} \quad (2.4)$$

เมื่อ y_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
 y_x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา x ชั่วโมง
 e = ฐานของลอการิทึมธรรมชาติ

2.6.3 ระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase)

เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก กล่าวคือถึงแม้จะมีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

2.6.4 ระยะเซลล์ตาย (Death phase หรือ Decline phase)

เป็นระยะที่จุลินทรีย์ตายอย่างรวดเร็วแบบทวีคูณ สาเหตุการตายอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไป เกิดการสะสมของเสีย และสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม จุลินทรีย์จะมีอัตราการตายที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น พวกทรงกลมและแกรมลบ จะตายอย่างรวดเร็วมากภายใน 2-3 วัน และเหลือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่น้อยมาก จุลินทรีย์บางชนิดตายช้าจึงทำให้มีเซลล์มีชีวิตหลงเหลืออยู่ได้เป็นเวลานานหลายเดือน

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักไซโลสเพื่อผลิตเอทานอล

2.7.1 ธาตุอาหาร

ยีสต์ต้องการธาตุอาหารเพื่อการเจริญและการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ธาตุอาหารที่ใช้ในการสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบหลัก (Major component) ได้แก่ คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โพแทสเซียม และแมกนีเซียม เพื่อการสังเคราะห์องค์ประกอบรอง (Minor component) และต้องการแมงกานีส โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก และสารอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และวิตามิน ในปริมาณเล็กน้อยอีกด้วย

2.7.2 อุณหภูมิ

ปกติจุลินทรีย์จะสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญค่าหนึ่ง การเพาะเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่หมักที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงอย่างมากที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และไม่มีการเจริญที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส (Halasz และ Lasztity, 1991)

2.7.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อกิจกรรมทางชีววิทยาของเซลล์น้อยกว่าอุณหภูมิเพราะว่าเซลล์ยังคงสามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ได้ แม้มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างภายนอกเซลล์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารจากภายนอกอาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพให้ซึมผ่านได้ของเซลล์ (Cell permeability) ค่าความเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรด-ต่างมีบทบาทช่วยลดการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมัก โดยปกติอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญของยีสต์มีค่าความเป็นกรด-ต่างอยู่ในช่วง 4-5 (Halasz และ Lasztity, 1991)

2.7.4 ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการเมตาบอลิซึมในยีสต์ และเป็นสารอินทรีย์ที่สำคัญต่อการเติบโตของยีสต์ โดยออกซิเจนจะเข้าร่วมในการสังเคราะห์กรดโอเลอิก (Oleic acid) เออร์โกสเตอรอล (Ergosterol) และกรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) ซึ่งยีสต์สามารถใช้กรดอินทรีย์เหล่านี้ในการเจริญและผลิตเอทานอลภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Halasz และ Lasztity, 1991)

2.7.5 คาร์บอนไดออกไซด์

ยีสต์ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่ำสำหรับกระบวนการแยกสลายอาหารระดับเซลล์ มีผู้รายงานว่าการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพียงร้อยละ 2.5 ของอากาศทั้งหมดสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อากาศบริสุทธิ์ แต่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของยีสต์คือร้อยละ 5 ของอากาศทั้งหมด (Halasz และ Lasztity, 1991)

2.8 ปัจจัยที่มีผลยับยั้งการหมักไซโลส

ประสิทธิภาพในการหมักของจุลินทรีย์จะลดลงเนื่องจากปัจจัยสำคัญ หลายประการ ได้แก่ ปริมาณเอทานอลในระบบ ปริมาณและชนิดของผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น กรดอินทรีย์ น้ำตาล ความเข้มข้นสูงในระบบ การเจริญอย่างรวดเร็วของเซลล์เนื่องจากการให้อากาศและการกวน การปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียและยีสต์ชนิดอื่น ไอออนบวกบางชนิดที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในการหมักระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือเชื้อเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะไปได้อีกด้วย โดยทั่วไปการเจริญและการหมักของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอลที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าเมื่อมีปริมาณเอทานอลในระบบการหมักร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนัก จะทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง การเจริญของยีสต์โดยทั่วไปจะหยุดเมื่อมีเอทานอลร้อยละ 4.7-7.8 โดยน้ำหนัก ดังนั้นปริมาณเอทานอลในระบบการหมักจึงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งที่จำกัดการผลิตเอทานอลของยีสต์ (Panchal และ Tavares, 1990)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากการหมักไซโลส กลูโคส และไฮโดรไลเซทจากวัสดุ ลิกโนเซลลูโลส ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2.2 ซึ่งพบว่าปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตเอทานอล ได้แก่ ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ สารตั้งต้น ความเข้มข้นของน้ำตาลในแหล่งคาร์บอน และภาวะในการหมัก เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง การเติมอากาศ ความเร็วรอบในการเขย่าหรือผสมอาหาร ระหว่างการหมัก ซึ่งส่งผลต่อระดับออกซิเจนที่ละลายในของเหลว

Erdei และคณะ (2013) ศึกษาการหมักกลูโคสและไซโลสในไฮโดรไลเซทจากฟางข้าวที่ถูกปรับสภาพด้วยเอนไซม์โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 ที่ตัดต่อพันธุกรรม จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ KE6-12 และ KE6-13i เปรียบเทียบกับการหมักโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์เดิม คือ TMB3400 การทดลองใช้ไฮโดรไลเซทที่ไม่ได้เจือจาง หรือเจือจาง 1.5 และ 2 เท่า เป็นสารตั้งต้นในการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนในถังหมักปริมาตร 1 ลิตร ปริมาณของเซลล์ยีสต์แห้งที่ใช้ คือ 5 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 ใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง พบว่ายีสต์สายพันธุ์ KE6-13i มีความทนทานอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม และให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นกว่าร้อยละ 50 แต่ยีสต์สายพันธุ์ KE6-12 ไม่สามารถบริโภคไซโลสได้ดีในไฮโดรไลเซทที่ไม่ได้เจือจาง แต่เมื่อเจือจางไฮโดรไลเซท 1.5 และ 2 เท่า พบว่า KE6-12 มีประสิทธิภาพในการหมักเพิ่มขึ้น

Li และคณะ (2016) เปรียบเทียบการหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สองสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ สายพันธุ์ SR8u ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสและเอนไซม์ไซลูโลสรีดักเตสเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลและไซลูโลสได้ และสายพันธุ์ SXA-R2P-E ซึ่งสามารถผลิตไซลูโลสโดยใช้เอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (Xylose isomerase) การทดลองใช้วิธีการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ SXA-R2P-E มีผลิตภัณท์เป็นเอทานอลสูงกว่าสายพันธุ์ SR8u ในเกือบทุกภาวะการหมักที่ทดลอง

อภิขญา และคณะ (2558) ศึกษาการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Sc90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-เปปโตเน-เดกซ์โตรส (Yeast Extract-Peptide-Dextrose, YPD) ซึ่งใช้กลูโคส ไซโลส และกลูโคสผสมไซโลส (อัตราส่วน 1:1 โดยมวล) เป็นสารตั้งต้น พบว่าผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 0.38 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส 0.17 กรัมเอทานอลต่อกรัมไซโลส และ 0.35 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคสผสมไซโลส ตามลำดับ ผลการทดลองบ่งชี้ว่ายีสต์เปลี่ยนไซโลสเป็นเอทานอลได้เพียงเล็กน้อย จึงศึกษาการหมักด้วยจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 ร่วมกับยีสต์ *Pichia stipitis* TISTR 5806 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 ร่วมกับแบคทีเรียรีคอมบิแนนต์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ KO11 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พบว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 ร่วมกับแบคทีเรียรีคอมบิแนนต์ *Escherichia coli* KO11 มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลได้โดยมวลของการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.49 ซึ่งสูงกว่าการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 เพียงชนิดเดียว และใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 ร่วมกับยีสต์ *Pichia stipitis* TISTR 5806 ซึ่งมีผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 0.35 และ 0.17 ตามลำดับ

Zhang และคณะ (2016) ศึกษาการหมักกลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโลส ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร แบบจำกัดปริมาณออกซิเจนโดยใช้ยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส คณะผู้วิจัยพบว่ายีสต์จะบริโภคกลูโคสและเปลี่ยนเป็นเอทานอลและกลีเซอรอล ส่วนไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลและเอทานอล ตามลำดับ นอกจากนี้ยีสต์สายพันธุ์ YZJ119 ถูกพบว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุด สามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้น 50.10 กรัมต่อลิตร และไซลิทอล 55.88 กรัมต่อลิตร โดยไซโลสถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลิทอลได้ถึงร้อยละ 98

ตารางที่ 2.2 การผลิตเอทานอลจากสารตั้งต้นและภาวะต่างๆ

ยีสต์	สายพันธุ์	แหล่งคาร์บอนในการหมัก	ภาวะ	ชนิดและความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อ้างอิงจาก
<i>S. cerevisiae</i>	TMB3400	ไฮโดรไลเซทจากฟางข้าวที่ถูก	32 องศาเซลเซียส ค่า pH 5.0	ไซโลส, 20	0.12	Erdei และคณะ, 2013
	KE6-12	ปรับสภาพด้วยไอน้ำ	ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที	ไซโลส, 12.3	0.10	
	KE6-13i			ไซโลส, 24.7	0.19	
	SR8u	ไซโลส	30 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.0	ไซโลส, 40	0.39	Li และคณะ, 2016
	SXA-R2P-E		ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที		0.43	
	n.a.	ไฮโดรไลเซทจากเฮมิเซลลูโลสในไบเฟิร์น	25 องศาเซลเซียส ค่า pH 7.0	ไซโลสและกลูโคส, 0.00176	0.19	Saha และคณะ, 2014
<i>K. marxianus</i>	DMB3-7	ไซโลส	30 องศาเซลเซียส	ไซโลส, 40	0.187	Goshima และคณะ, 2013
	YZj119	ไซโลส และกลูโคส	42 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที	ไซโลส, 60 และกลูโคส, 120	0.55	Zhang และคณะ, 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การผลิตเอทานอลจากสารตั้งต้นและภาวะต่างๆ (ต่อ)

ยีสต์	สายพันธุ์	แหล่งคาร์บอนในการหมัก	ภาวะ	ชนิดและความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อกรัม น้ำตาล)	อ้างอิงจาก
<i>P. stipitis</i>	CBS 6054	ไซโลส และ กลูโคส	30 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.3 ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที	ไซโลส, 30 และกลูโคส, 30	0.44	Agbogbo และคณะ, 2006
				ไซโลส, 60	0.44	
				กลูโคส, 60	0.42	
	BCRC 2177	ไฮโดรไลเซทจาก ฟางข้าวโดยวิธี ไฮโดรไลซิสด้วย กรดเจือจาง	30 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.0 ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที	น้ำตาลรีดิวซ์, 48.68	0.45	Chen และ คณะ, 2012
ไฮโดรไลเซทจาก ฟางข้าวโดยวิธี ไฮโดรไลซิสด้วย เอนไซม์	น้ำตาลรีดิวซ์, 76.42	0.50				
n.a.	ไฮโดรไลเซทจาก ไม้อัด ชานอ้อน และไม้ไผ่ โดยวิธี ไฮโดรไลซิสด้วย กรดเจือจางและ เอนไซม์	30 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.0 ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที	ไซโลส, 20	0.45	Lin และ คณะ, 2016	
<i>S. arborariae</i> และ <i>S. cerevisiae</i>	UFMG-HM19.1A (<i>S.arborariae</i>)	ไฮโดรไลเซท จากเปลือกข้าว	28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที	ไซโลสและ กลูโคส, 33	0.62	Cunha-Pereira และคณะ, 2011
	ICVD254 (<i>S.cerevisiae</i>)					

Goshima และคณะ (2013) ศึกษาการหมักไซโลสในไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยด้วยยีสต์ทนความร้อน *Kluyveromyces marxianus* จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ DMB3-7 และ DMB3-15 ความเข้มข้นเริ่มต้นในการหมักของไซโลส 40 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 42 และ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณการบริโภคไซโลสจะลดลงและมีผลได้ไซลิทอลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์สายพันธุ์ DMB3-7 บริโภคไซโลสแล้วผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ DMB3-15 โดยสามารถบริโภคไซโลสได้เกือบทั้งหมดแล้วผลิตเอทานอลได้สูงสุดถึง 6.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 0.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agbogbo และคณะ (2006) ศึกษาการหมักสารละลายผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* CBS 6054 ทดสอบหมักสารละลายน้ำตาลผสมในอัตราส่วนที่ต่างกัน ได้แก่ 1:1 และ 1:3 โดยมวล และทดสอบการหมักกลูโคสและไซโลสแยกกันด้วย ใช้เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากันทุกการทดลองที่ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าผลได้โดยมวลของเอทานอลจากการหมักสารละลายผสมในอัตราส่วนของ กลูโคสและไซโลส 1:1 โดยมวล เท่ากับ 0.44 ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นเอทานอล 24.3 กรัมต่อลิตร และ ผลได้โดยมวลสูงสุดของเอทานอลจากการหมักกลูโคสและไซโลส เท่ากับ 22.7 และ 24.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการหมักกลูโคสและไซโลสจะเสร็จสิ้นที่เวลา 96 และ 120 ชั่วโมง ซึ่งผลการศึกษา ชี้ให้เห็นว่า ยีสต์ *Pichia stipitis* CBS 6054 มีศักยภาพในการเปลี่ยนไซโลสเป็นเอทานอลมากกว่า การเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอล

Chen และคณะ (2012) ศึกษาเพื่อประเมินการหมักกลูโคสและไซโลสจากไฮโดรไลเซทจาก พางข้าวที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดเจือจางและเอนไซม์ ซึ่งแต่ละกระบวนการให้ปริมาณ ความเข้มข้นของน้ำตาลต่างกัน โดยใช้ยีสต์ *Pichia stipitis* สายพันธุ์ BCRC 2177(CBS 6054) หมัก ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ควบคุมความเป็น กรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ 0.4 กรัมต่อลิตร พบว่าผลได้โดยมวลของเอทานอล จากการหมักไฮโดรไลเซทที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดเจือจางและเอนไซม์ เท่ากับ 0.45 และ 0.50 ตามลำดับ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้และศักยภาพของยีสต์ *Pichia stipitis* ใน การเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในไฮโดรไลเซทจากวัสดุกลูโคสที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส ประเภทต่างๆ ให้เป็นเอทานอลได้

Lin และคณะ (2016) ทดลองเติมไฮโดรไลเซทจากกากพางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการ ไฮโดรไลซิสด้วยกรดเจือจางร้อยละ 15 ของน้ำหนัก ภายใต้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็น กรด-ด่างเท่ากับ 5.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเติมไฮโดรไลเซทจากกากพางข้าวลงในไฮโดรไลเซทจาก ไม้อัด ชานอ้อย และไม้ไผ่ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการไฮโดรไลซิสด้วยกรดเจือจางและเอนไซม์ ตามลำดับ เพื่อเพิ่มมวลของเซลล์ยีสต์ *Pichia stipites* ในการหมักไซโลสเป็นเอทานอล ในการ ทดลองใช้ความเข้มข้นไซโลสบริสุทธิ์เริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร หมักในเครื่องเขย่าควบคุม อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของยีสต์ 1.0 กรัมต่อ ลิตร และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 พบว่าผลได้โดยมวลของ เอทานอลจากการหมักไซโลสเท่ากับ 0.45 ซึ่งการเติมกากพางข้าวลงในไฮโดรไลเซทจากไม้อัด ชานอ้อย และไม้ไผ่ ยังสามารถเพิ่มร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลได้ถึง 20 ถึง 50

Cunha-Pereira และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์พันธุ์ใหม่ *Spathaspora arborariae* สายพันธุ์ UFMG-HM19.1A ที่พบบริเวณป่าฝนแอตแลนติกในบราซิล ร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ ICV D254 เพื่อเปลี่ยนกลูโคสและไซโลสในไฮโดรไลเซทจาก แกลบโดยใช้การหมักแบบจำกัดค่าความต้องการออกซิเจน (OD, 600nm) เท่ากับ 1 ใช้เครื่องเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ไซลิทอล เอทานอล และกรดอะซิติก จากผลการทดลอง คณะผู้วิจัยสามารถพิสูจน์ได้ว่าการหมักโดยใช้ยีสต์ *Spathaspora arborariae* สายพันธุ์ UFMG-HM19.1A ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ ICV D254 มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลจากกลูโคสและไซโลส โดยมีผลได้โดยมวลของเอทานอลและไซลิทอลเท่ากับ 0.62 และ 0.45 ตามลำดับ

Pradip Saha และคณะ (2014) นำเสนอการผลิตไบโอเอทานอลจากเฮมิเซลลูโลสจากใบเฟิร์น (*Pteris*) ซึ่งสามารถปลูกและเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ถือเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกได้ในอนาคต จากการไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสพบว่าได้กลูโคสและไซโลส ความเข้มข้นรวม 1.76 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นหมักไฮโดรไลเซตด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 พบว่าได้เอทานอลความเข้มข้น 0.333 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้โดยมวลของเอทานอลได้เท่ากับ 0.19 ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าใบเฟิร์น 1 กรัม สามารถผลิตเอทานอลได้ 0.1332 มิลลิกรัม

เนื่องจากมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลจากไซโลส จากข้อดีข้อเสียของจุลินทรีย์ และภาวะในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ดังแสดงตารางที่ 2.3 จึงเลือกยีสต์ *Pichia stipitis* เพราะสามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ และมีความสามารถหมักไซโลสได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถใช้กลูโคส กาแลกโทส และ เซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักได้

ตารางที่ 2.3 ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์	ลักษณะ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
<i>S. cerevisiae</i>	สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถผลิตเอทานอลได้โดยธรรมชาติ - ผลิตเอทานอลได้ในปริมาณมาก 	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่สามารถผลิตเอทานอลจากไซโลส - ไม่สามารถเจริญในอุณหภูมิสูง 	Gamage และคณะ, 2010
<i>C. shehatae</i>	ชอบภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย	สามารถหมักไซโลส	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่ทนต่อภาวะที่มีเอทานอล - ผลิตเอทานอลได้น้อย - ไม่สามารถหมักไซโลสในภาวะที่เป็นกรด 	Banerjee และคณะ, 2009; Zaldivar และคณะ, 2001
<i>P. stipitis</i>	สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ	<ul style="list-style-type: none"> - มีความสามารถหมักไซโลสได้ดีที่สุด - สามารถใช้กลูโคส กาแลกโทส และ เซลโลไบโอสได้ 	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่สามารถทนต่อภาวะที่มีเอทานอลเข้มข้นสูงถึง 40 กรัมต่อลิตร - ไม่สามารถหมักไซโลสในภาวะที่เป็นกรด - ต้องการอากาศเล็กน้อยในการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณมาก 	Jeffries และคณะ, 2007; Nigam, 2001
<i>P.tannophilus</i>	สามารถเจริญได้ในที่มีอากาศ	สามารถหมักไซโลสได้	<ul style="list-style-type: none"> - ผลิตเอทานอลได้น้อย - ต้องการอากาศเล็กน้อยในการผลิตเอทานอล - ไม่สามารถหมักไซโลสในภาวะที่เป็นกรด 	Zaldivar และคณะ, 2001; Zayed และ Meyer, 1996

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

โครงการนี้ศึกษาการหมักสารละลายไซโลส และไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* เพื่อผลิตเอทานอล โดยมีวิธีการดำเนินงานดังต่อไปนี้

3.1 การเตรียมไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย

3.1.1 การเตรียมชานอ้อยปราศจากสารสกัด

ชานอ้อยที่ใช้ในการทดลองเป็นอ้อยพันธุ์สิงคโปร์ที่เพาะปลูกในจังหวัดสุพรรณบุรี หลังหีบ น้ำอ้อยออกจนหมดนำมาล้างน้ำกรองจนไม่มีกลิ่นน้ำอ้อยเหลือ ผึ่งแดดให้แห้ง แล้วนำมาอบที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง จนแห้งสนิท จากนั้นปั่นด้วยเครื่องบดอาหารจนชานอ้อย มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร และนำไปคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อน (Mesh sieving) ระหว่าง 425-850 ไมโครเมตร นำชานอ้อยที่ได้ไปสกัดสารไม่มีขั้วออกด้วยชุดสกัดแบบซ็อกเลต (Soxhlet extraction) โดยใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย เมื่อครบเวลา 8 ชั่วโมง นำออกผึ่งในตู้ดูดควันและ อบที่ 60 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยอะซิโตนออกจนหมด ทำการสกัดสารมีขั้วเป็นขั้นตอนสุดท้าย โดยปั่นกวนชานอ้อยในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรอง แยก และอบชานอ้อยที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชานอ้อยในถุง ซิปล็อกเพื่อป้องกันความชื้น ก่อนใช้ในการทดลองอบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักชานอ้อยอบแห้ง

3.1.2 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยน้ำร้อนอัดความดัน

จากการศึกษาการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยน้ำร้อนอัดความดันของกลุ่มวิจัย พบว่า อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมซึ่งพิจารณาจากผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์จาก เหมิเซลลูโลสสูงสุด คือ 210 องศาเซลเซียส ที่ 0 นาที (หยุดปฏิกิริยาเมื่ออุณหภูมิภายในเครื่อง ปฏิกิริยาแบบกะเท่ากับ 210 องศาเซลเซียส) จึงใช้ภาวะดังกล่าวเพื่อผลิตไฮโดรไลเซทและ นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก

3.2 การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ

ฆ่าเชื้ออุปกรณ์การทดลองที่ต้องสัมผัสเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งประเภทเหลวและแข็งด้วย หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อป้องกันการ ปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น การเพาะเลี้ยงเชื้อและเตรียมเชื้อก่อนการหมักทำในตู้ปลอดเชื้อ (Clean

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bench) สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นแรกนำยีสต์ *Pichia stipitis* (ATC.58376) ในรูปเชื้อแห้งที่ซื้อจากบริษัท ไบโอมิเดีย (ประเทศไทย) จำกัด มาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Broth media) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร และไซโลส 20 กรัมต่อลิตร เช่าเชื้อแห้งให้กระจายตัวและแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ก่อนที่เชื้อแห้งจะตกตะกอนปิเปตของผสมดังกล่าวปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Solid media) ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร ไซโลส 20 กรัมต่อลิตร ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spender glass rod) ที่เผาไฟและทิ้งให้เย็นเกลี่ยเชื้อจนทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง ปิดจานเพาะเลี้ยงโดยพันด้วยฟิล์มพาราฟิน จากนั้นนำไปเก็บในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยคว่ำจานเพาะเชื้อลงเพื่อแยกน้ำที่เกิดจากกระบวนการเติบโตของยีสต์ ยีสต์จะเกิดเป็นโคโลนี (Colony) ภายใน 1 สัปดาห์ และสามารถนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับเตรียมเชื้อก่อนการหมักได้ หากต้องการกล้าเชื้อในปริมาณมากหรือยีสต์โตจนเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้ว สามารถขยายกล้าเชื้อใส่อาหารแข็งจานใหม่และเก็บรักษาในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิได้

3.3 การเตรียมเชื้อก่อนการหมัก

ใช้เข็มเย็บเชื้อปลายกลม (Inoculating loop) ที่เผาไฟและทิ้งให้เย็น เชี่ยกล้าเชื้อที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดรูปชมพู่ฝาเกลี่ยขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดฝาและนำเชื้อในอาหารเหลวไปใส่เครื่องเขย่า (Shaking incubator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อในอาหารเหลวมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) เพื่อคำนวณปริมาณของเซลล์ยีสต์แห่งผ่านกราฟมาตรฐาน (หัวข้อ 3.4) ในการหมัก ใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห่งในการหมักเริ่มต้นเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร เท่ากันทุกการทดลอง

3.4 การสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณของเซลล์ยีสต์แห่ง

นำเชื้อที่เตรียมได้ในหัวข้อ 3.3 เจือจางด้วยอาหารเหลวเพื่อใช้เป็นของผสมมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห่งที่แตกต่างกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำของผสมดังกล่าวที่ทราบปริมาณแน่นอนไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum filter) ใช้กระดาษกรองขนาด 2.5 ไมโครเมตร (ยีสต์มีขนาดเซลล์ 3-4 ไมโครเมตร) จากนั้นนำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกระดาษกรองที่ผ่านการอบมาชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งเพื่อคำนวณน้ำหนักของเซลล์ยีสต์แห่ง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห่ง (กรัมต่อลิตร) และค่าการดูดกลืนแสง

3.5 การหมัก

- 3.5.1 ทำการควบคุมปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 3.5.2 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ สารละลายไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ และไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยที่ได้จากข้อ 3.1.2
- 3.5.3 นำแหล่งคาร์บอนในการหมัก ได้แก่ สารละลายไซโลส และไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยมาเติมสารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร โดยปรับให้มีปริมาตรรวมเป็น 150 มิลลิลิตร
- 3.5.4 ฆ่าเชื้อสารละลายในข้อ 3.5.3 ด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ทิ้งให้เย็นในตู้ปลอดเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้อง
- 3.5.5 จากนั้นเติมเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3 ลงในสารละลายในข้อ 3.5.4 ด้วยอัตราส่วนของน้ำหนักของเซลล์ยีสต์แห้ง 0.01 กรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตร
- 3.5.6 ระหว่างการหมักเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ระหว่างทำการหมักจะเก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตรทุกๆ 12 ชั่วโมง
- 3.5.7 นำตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ไปตรวจหาความเข้มข้นของของเซลล์ยีสต์แห้งด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อหาการเจริญของยีสต์
- 3.5.8 นำตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่เหลือฉีดผ่านหัวกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล และไซโลส ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) รายละเอียดการวิเคราะห์อธิบายในหัวข้อ 3.7 การทดลองหมักภายใต้ภาวะที่ศึกษา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6 การวัดการเจริญของยีสต์

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากการหมักมาหาความเข้มข้นน้ำหนักเซลล์ของเซลล์ยีสต์แห้งด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยการส่องตัวอย่างเทียบกับอาหารที่ใช้ในการหมักโดยไม่เติมยีสต์ (Blank) และนำมาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งกับเวลาเพื่อทราบการเจริญของยีสต์

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอล

ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการไฮโดรไลซิสซันอ้อย และผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการหมักจะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รายละเอียดภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มีดังนี้

- คอลัมน์วิเคราะห์ Shodex KS 801
- สารพา คือ น้ำปราศจากไอออน
- อัตราการไหลของสารพา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- อุณหภูมิคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส
- ตัววัดสัญญาณดัชนีหักเห (Refractive index detector, RID)

สร้างกราฟมาตรฐานด้วยสารละลายไซโลสมาตรฐานและเอทานอลที่ทราบความเข้มข้น 3 ค่า คือ 0.2, 5.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ โครมาโทแกรมของสารละลายไซโลสมาตรฐานและเอทานอล จากนั้นใช้กราฟมาตรฐานที่ได้ในการคำนวณปริมาณของไซโลสและเอทานอลจากพื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมของไซโลสและเอทานอลในตัวอย่างไฮโดรไลเซทและผลิตภัณฑ์ของเหลวจากการหมักที่ตรวจวัดได้จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

ในบทนี้จะแสดงผลการทดลองและอภิปรายผลที่ได้จากศึกษาผลของความเข้มข้นในการหมักสารละลายไซโลส และเปรียบเทียบการหมักไฮโดรไลเซทจากขานอ้อยด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* แบ่งเป็น 4 หัวข้อ ได้แก่ (4.1) ปริมาณของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย (4.2) ผลของความเข้มข้นต่อการเจริญของยีสต์ในสารละลายไซโลสและไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย (4.3) การผลิตเอทานอลจากการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้นต่างๆ (4.4) การผลิตเอทานอลจากการหมักไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1 ปริมาณของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย

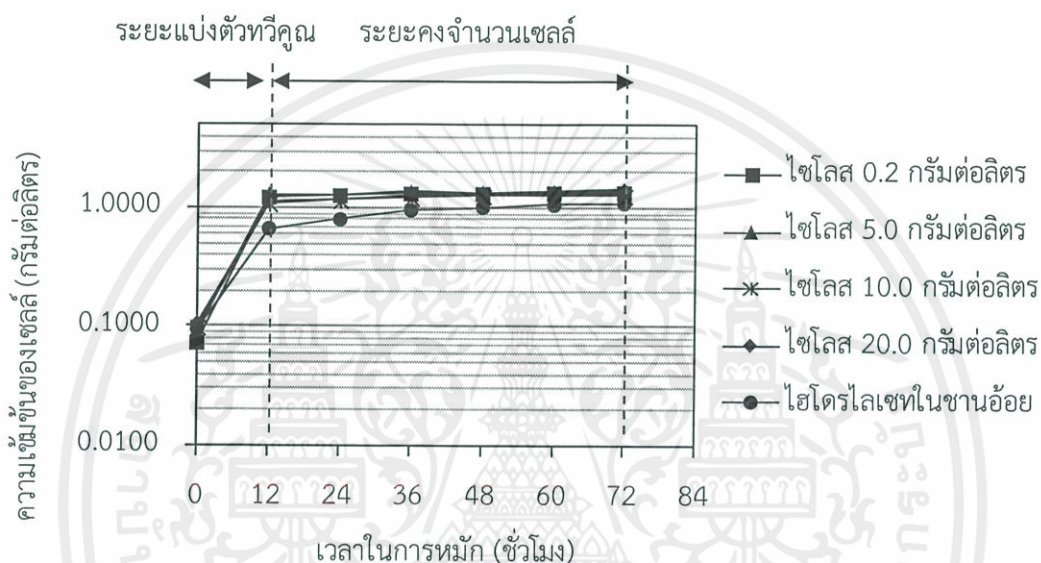
จากผลการศึกษาการไฮโดรไลซิสขานอ้อยด้วยน้ำร้อนอัดความดันเพื่อย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสพบว่าภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส และเวลา 0 นาที (เปิดสวิตซ์ให้ความร้อนเครื่องปฏิกรณ์แบบกะเพื่อหยุดปฏิกิริยาทันทีที่อุณหภูมิภายในของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 210 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์จากเฮมิเซลลูโลสสูงสุด พบว่าเฮมิเซลลูโลสถูกแยกสลายกลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หลายชนิด ทั้งที่อยู่ในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลหลายโมเลกุล ซึ่งจากการหมักด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* สามารถเปลี่ยน น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น ไซโลส อะราบิโนส กลูโคส ฟรุคโตส หรือน้ำตาลหลายโมเลกุล เช่น เซลโลไบโอส เป็นเอทานอลได้ จึงวิเคราะห์องค์ประกอบของไฮโดรไลเซทโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและรายงานชนิดและปริมาณน้ำตาล เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลง และศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลชนิดอื่นๆ และผลพลอยได้นอกจากไซโลสที่มีต่อการหมัก ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบที่ได้

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย

ผลิตภัณฑ์ที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	
น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว	กลูโคส	0.0005
	ไซโลส	0.1167
	อะราบิโนส	0.0220
	ฟรุคโตส	0.1000
น้ำตาลหลายโมเลกุล	เซลโลไบโอส	0.0850
	ไซโลไบโอส	4.0342
สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ	เฟอร์ฟูรัล	0.0037
	ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล	0.0133

4.2 ผลของความเข้มข้นต่อการเจริญของยีสต์ในสารละลายไซโลสและไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย

เมื่อพลอตกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้ง (จำนวนจุลินทรีย์) และเวลาที่ใช้ในการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเกิดเส้นตรงที่มีความชันแตกต่างกันแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ได้แก่ ช่วงแรก คือ เวลาการหมักตั้งแต่ 0 ถึง 12 ชั่วโมง และช่วงที่สอง คือ เวลาตั้งแต่ 12 ถึง 72 ชั่วโมง ช่วงแรกเป็นระยะแบ่งตัวทวีคูณของยีสต์ ซึ่งเกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วด้วยอัตราคงที่สามารถหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้จากสมการที่ 2.4 ในหัวข้อ 2.5.2 ตารางที่ 4.2 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในระยะแบ่งตัวทวีคูณของการหมักโดยใช้สารละลายไซโลสและไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย รายละเอียดการคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะแสดงในภาคผนวก ก



รูปที่ 4.1 กราฟระหว่างลอการิทึมความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมักของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้นต่างๆ

อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์มีค่าลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไซโลสเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ได้เท่ากับ 0.2354 ต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นไซโลส 0.2 กรัมต่อลิตร ส่วนการหมักไฮโดรไลเซทจากชานอ้อยแม้ว่ามีความเข้มข้นของไซโลสในปริมาณต่ำ (ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.1) แต่ไฮโดรไลเซทประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ชนิดอื่นๆ ซึ่งยีสต์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักได้ทำให้ความเข้มข้นรวมของน้ำตาลที่หมักได้มากกว่าความเข้มข้นของไซโลสในไฮโดรไลเซท นอกจากนี้ผลพลอยได้อื่นๆ เช่น เฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล ในไฮโดรไลเซทยังส่งผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในการหมักไฮโดรไลเซทมีค่าต่ำกว่าการหมักสารละลายไซโลส

ส่วนในช่วงที่สองเป็นระยะคงจำนวนเซลล์ โดยอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์มีค่าเข้าใกล้ 0 กล่าวคืออัตราการเกิดของยีสต์เท่ากับอัตราการตาย จึงสังเกตเห็นได้ว่าความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งมีค่าคงที่ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบเพียงระยะแบ่งตัวทวีคูณ และระยะคงจำนวนเซลล์เท่านั้น แต่ไม่พบระยะพัก และระยะเซลล์ตาย เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมเชื้อก่อนการหมัก (หัวข้อ 3.3) ยีสต์ถูกทำให้อยู่ในภาวะพร้อมแบ่งตัวภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับการทดลองหมัก ระยะพักจึงสั้น

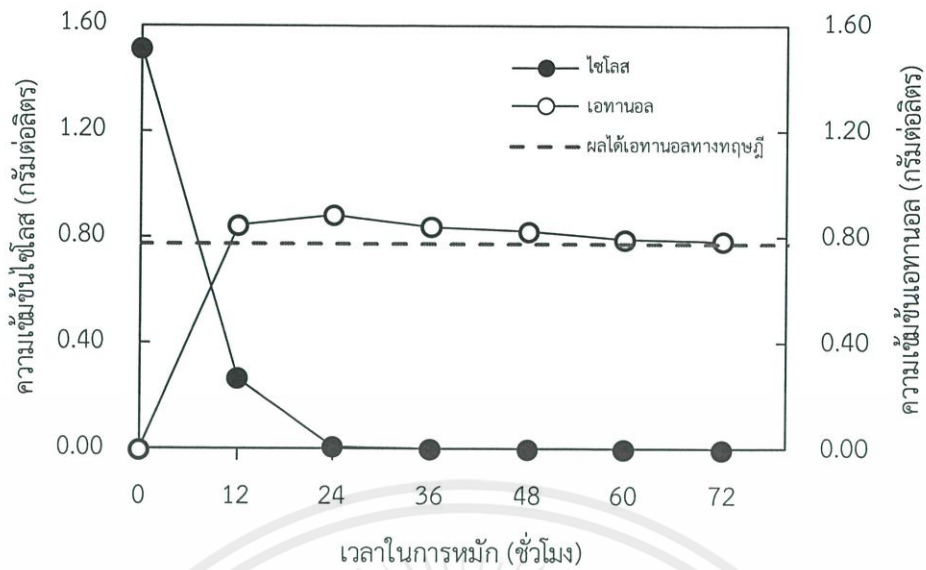
จนไม่สามารถสังเกตเห็นได้ในระหว่างการทดลอง นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก คือ 72 ชั่วโมง ซึ่งยังคงมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังเหลืออยู่และอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้ยีสต์เข้าสู่ระยะเซลล์ตาย

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในแหล่งคาร์บอนในการหมัก

แหล่งคาร์บอนในการหมัก	อัตราการเจริญจำเพาะ (1/ชั่วโมง)
สารละลายไซโลส	
ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร	0.2354
ความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร	0.2239
ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร	0.1996
ความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตร	0.1959
ไฮโดรไลเซตจากชานอ้อย	
ความเข้มข้นไซโลส 0.11 กรัมต่อลิตร	0.1627

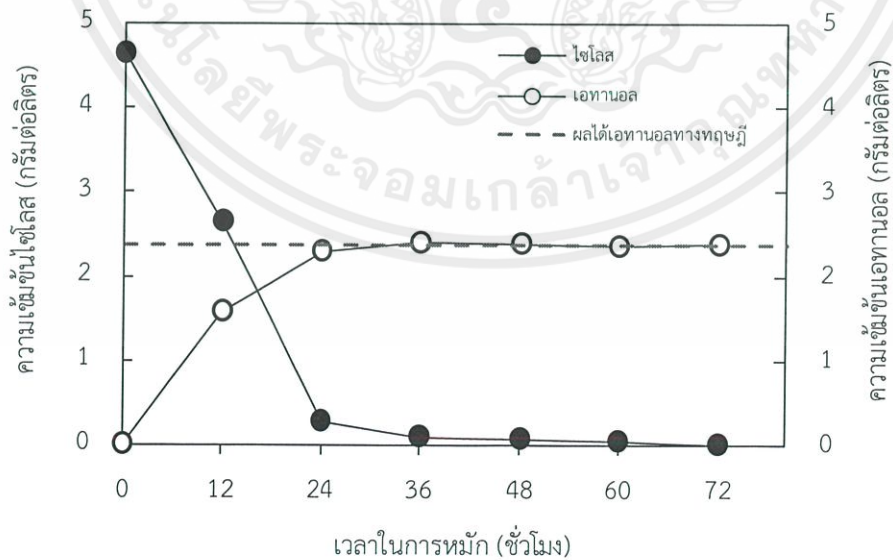
4.3 การผลิตเอทานอลจากการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่ 4.2 ถึง 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไซโลสและเอทานอลเมื่อเทียบกับเวลา พบว่ายีสต์มีรูปแบบการผลิตเอทานอลที่คล้ายกัน คือ ไซโลสจะถูกย่อยสลายและเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ เมื่อพิจารณาการหมักโดยใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์มีการเจริญแบบทวีคูณในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก ส่งผลให้ไซโลสที่เป็นแหล่งคาร์บอนลดลงและเกิดเอทานอลขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากชั่วโมงที่ 24 ยีสต์จะมีอัตราการผลิตเอทานอลค่อนข้างคงที่ เนื่องจากไซโลสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนถูกใช้ไปจนเกือบหมด กราฟการหมักแสดงดังรูปที่ 4.2 ในการหมักสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 0.88 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 58.47 หรือร้อยละ 114.40 เมื่อเปรียบเทียบกับผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎี การคำนวณร้อยละเปรียบเทียบกับผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎีแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก สาเหตุที่ผลได้โดยมวลของเอทานอลมีค่าเกินกว่าค่าทางทฤษฎีอาจเกิดจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น กลูโคส ฟรุคโทส และมอลโทส ซึ่งประกอบอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งยีสต์สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตเป็นเอทานอลได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของไซโลสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักมีค่าต่ำ ทำให้ร้อยละความผิดพลาดจากการหมักน้ำตาลองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีนัยสำคัญต่อผลได้ของเอทานอลที่ควรเกิดขึ้นจริงจากไซโลสของแหล่งคาร์บอนในการหมัก



รูปที่ 4.2 ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักสารละลายไซโลส ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร

กราฟการหมักโดยใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่ายีสต์มีรูปแบบการผลิตเอทานอลคล้ายกับกรณีที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร แต่ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 2.37 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการหมักนานกว่าคือ 36 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 51.04 หรือร้อยละ 99.86 เมื่อเปรียบเทียบกับผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎี

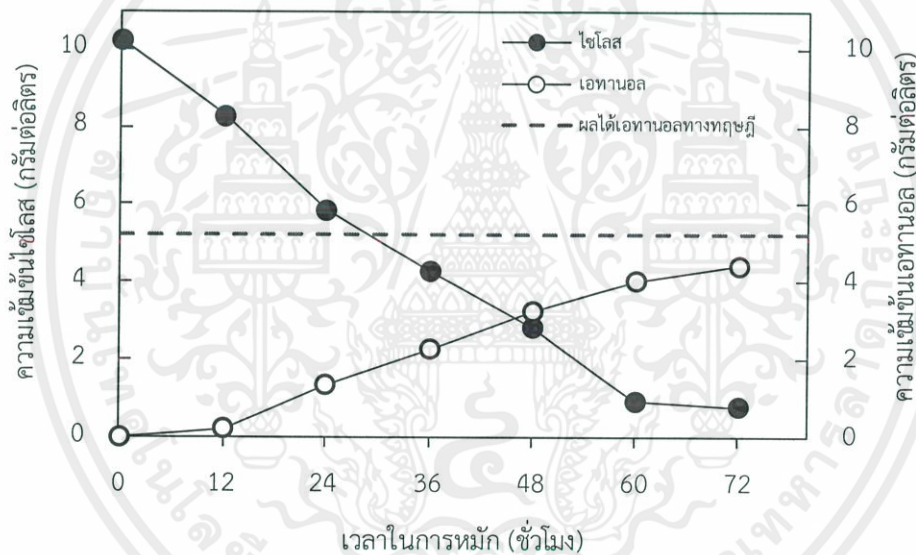


รูปที่ 4.3 ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักสารละลายไซโลส ความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร

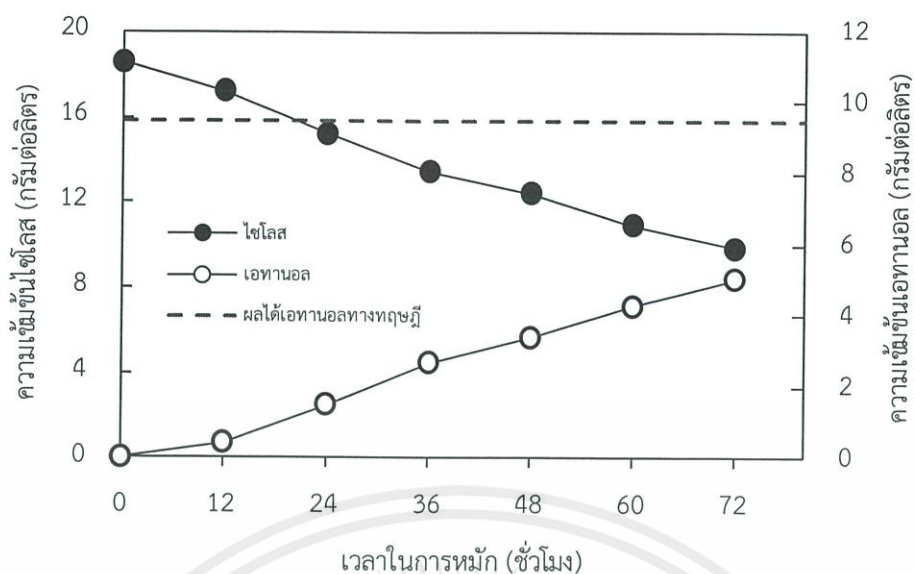
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้น 10.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร กราฟการหมักแสดงดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก ยีสต์มีอัตราการผลิตเอทานอลช้ากว่าการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้นต่ำ (0.2 และ 5.0 กรัมต่อลิตร) สังเกตได้จากความชันของกราฟความเข้มข้นเอทานอลในช่วง 12 ชั่วโมงแรก

การหมักสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 4.42 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการหมัก 72 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 43.16 หรือร้อยละ 84.72 เมื่อเปรียบเทียบกับผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎี และการหมักสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 18.52 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการหมัก 72 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 27.16 หรือร้อยละ 53.14 เมื่อเปรียบเทียบกับผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎี อย่างไรก็ตามหากเพิ่มระยะเวลาในการหมักสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้น 10.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร คาดว่าผลได้ของเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอีก



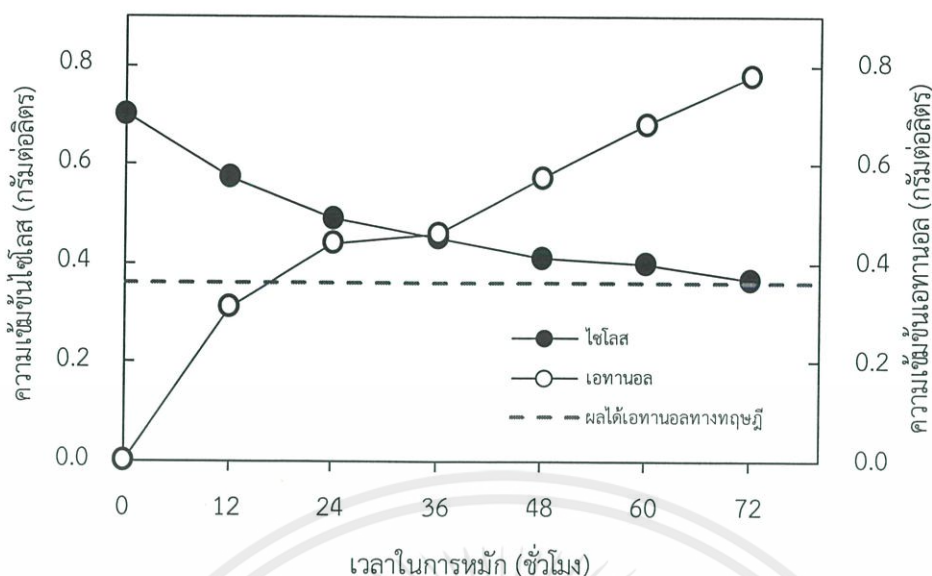
รูปที่ 4.4 ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.5 ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักสารละลายไซโลส ความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตร

4.4 การผลิตเอทานอลจากการหมักไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย

กราฟการหมักโดยใช้ไฮโดรไลเซทจากขานอ้อยแสดงดังรูปที่ 4.6 จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็นองค์ประกอบของไฮโดรไลเซทในตารางที่ 4.1 มีไซโลส 0.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองหมักสารละลายไซโลส จากรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่ายีสต์มีอัตราการผลิตเอทานอลที่รวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งคล้ายกับการหมักจากสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้น 0.2 และ 5.0 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2 และ 4.3) และมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงระหว่าง ชั่วโมงที่ 24 ถึง 36 แต่ภายหลังจากชั่วโมงที่ 36 พบว่ายีสต์ผลิตเอทานอลอีก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อพิจารณาปริมาณไซโลสในระบบหมัก พบว่าลดลงจาก 0.70 เป็น 0.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็นความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไปเท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตร จากตุลมวลระหว่างไซโลสที่ถูกใช้ไปกับเอทานอลที่ถูกผลิต ควรได้เอทานอลความเข้มข้นประมาณ 0.17 กรัมต่อลิตร แต่จากรูปที่ 4.6 พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าสูงกว่า 0.17 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงสรุปได้ว่ายีสต์ใช้น้ำตาลชนิดอื่นในไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักได้ ไฮโดรไลเซทจากขานอ้อยประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย ทำให้ไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเซทที่เกิดขึ้น เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง พบว่ามีร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 115.57 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 226.12 เมื่อเปรียบเทียบกับผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎี



รูปที่ 4.6 ปริมาณไซโลสและเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาในการหมักไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย

จากการหมักของแต่ละแหล่งคาร์บอนในหัวข้อ 4.2 และ 4.3 สามารถสรุปเป็นตารางร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล และร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเมื่อเทียบกับทฤษฎีของการหมัก แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลและร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเทียบกับทฤษฎี

แหล่งคาร์บอนในการหมัก	ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล *	ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเทียบกับทฤษฎี **
สารละลายไซโลส		
ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร	58.47	114.40
ความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร	51.04	99.86
ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร	43.16	84.72
ความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตร	27.16	53.14
ไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย		
ความเข้มข้นไซโลส 0.11 กรัมต่อลิตร	115.57	226.12

หมายเหตุ * ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล = $\frac{\text{ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้}}{\text{ความเข้มข้นของไซโลสที่เวลาเริ่มต้น}} \times 100$

** ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเทียบกับทฤษฎี = $\frac{\text{ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล}}{\text{ร้อยละผลได้โดยมวลทางทฤษฎี}} \times 100$

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายไซโลสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการหมักโดยใช้ไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย พบว่าระยะแบ่งตัววิคูณในการหมักทุกภาวะที่ทำการทดลองอยู่ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ซึ่งยีสต์สามารถเจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนที่มีไซโลสความเข้มข้นต่ำ และมีอัตราการเจริญช้าที่สุดใน การหมักไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย สาเหตุคาดว่าน้ำตาลรีดิวิซหรือสารอินทรีย์บางชนิดที่มีอยู่ในไฮโดรไลเซท เช่น เฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล ส่งผลยับยั้งการเจริญของยีสต์

ในการหมักแหล่งคาร์บอนจากสารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.2 และ 5.0 กรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์สามารถเปลี่ยนไซโลสเป็นเอทานอลได้อย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไซโลส 0.2 กรัมต่อลิตร ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 58.47 และที่ความเข้มข้นของสารละลายไซโลส 5.0 กรัมต่อลิตร ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 51.04 แต่ที่ความเข้มข้นของสารละลายไซโลส 10.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์เปลี่ยนไซโลสเป็นเอทานอลได้ช้าลงในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และมีผลได้ของเอทานอลต่ำกว่าการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้นต่ำ ที่ความเข้มข้นของสารละลายไซโลส 10.0 กรัมต่อลิตร ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเท่ากับ 43.16 และที่ความเข้มข้นของสารละลายไซโลส 20.0 กรัมต่อลิตร ร้อยละผลได้โดยมวลเอทานอลเท่ากับ 27.16 นอกจากนี้เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ในการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้น 10.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร พบว่ายังคงมีไซโลสเหลือ หากเพิ่มเวลาในการหมักคาดว่าผลได้ของเอทานอลจะเพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบกับ การหมักไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย ซึ่งมีไซโลสประมาณ 0.11 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลอื่น เช่น กลูโคส อะราบิโนส และฟรุคโตส พบว่ามีร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล 115.57 ทั้งนี้เกิดจากยีสต์ *Pichia stipitis* สามารถย่อยสลายน้ำตาลประเภทอื่นได้ เช่น กลูโคส แล็กโทส และเซลโลไบโอส เป็นต้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 5.2.1 ร้อยละผลได้ในกำกับการหมักสารละลายไซโลสและไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย พบว่าสูงกว่าร้อยละผลได้ทางทฤษฎี เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลอื่นๆ ซึ่งยีสต์สามารถย่อยสลายและผลิตเป็นเอทานอลได้ ผู้วิจัยคิดว่าควรทดลองไม่ใส่สารอาหารบางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น มอลต์สกัดที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำตาลหลายชนิด เช่น มอลโทส กลูโคส ซูโครส และฟรุกโทส เพื่อศึกษาการเจริญและร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลจากไซโลสโดยที่ไม่มีผลจากน้ำตาลชนิดอื่นๆ
- 5.2.2 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบในไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย พบว่ามีไซโลสปริมาณ 0.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูง แต่พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์กลับมีค่าน้อยที่สุด อาจเป็นเพราะผลพลอยได้อื่นๆ เช่น เพอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล ยับยั้งการเจริญของยีสต์ ผู้วิจัยเสนอว่าควรศึกษาปัจจัยที่ก่อให้เกิดการยับยั้งที่แน่ชัด เพื่อหาแนวทางการเพิ่มผลได้ของเอทานอลในกำกับการหมักไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย เช่น กำจัดสารยับยั้งเหล่านี้ เป็นต้น
- 5.2.3 การหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้น 10.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร พบว่าในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ ยีสต์มีอัตราการเปลี่ยนไซโลสเป็นเอทานอลได้ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกำกับการหมักสารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.2 และ 5.0 กรัมต่อลิตร ดังนั้นผู้วิจัยเสนอทำการทดลองเพิ่มปริมาณของยีสต์ที่ใช้ในกำการหมักแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูงเพื่อปรับปรุงผลได้ของไซโลส

บรรณานุกรม

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. “แผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี.” [ออนไลน์].
แหล่งที่มา: <http://www.eppo.go.th/> (สืบค้นเมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2560)
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. “ผลการประเมินศักยภาพพลังงานชีวมวล.”
[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://biomass.dede.go.th/> (สืบค้นเมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2560)
- เจริญ เจริญชัย. “การหมักแบบครั้ง” [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://drcharoen.wordpress.com/>
(สืบค้นเมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2560)
- นพพล เลิศวัฒนาสกุล. “การหมักเอทานอลจากไซลอส.” Omnimicrobes. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<https://omnimicrobes.wordpress.com/> (สืบค้นเมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2560)
- ประเวทย์ ตัญเฒ่าวงศ์, จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร, ปิยรัตน์ บุญแสง และ ธีรภัทร ศรีนรคุตร. “การผลิต
เอทานอลจากเซลลูโลส.” รายงานวิจัย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2552.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, นิธิยา รัตนานนท์. “Generation time.” ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบ
วงจร. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com/> (สืบค้นเมื่อวันที่
4 มิถุนายน 2560)
- สถาบันวิจัยภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. “ลิกโนเซลลูโลส.” [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<https://www.yumpu.com/> (สืบค้นเมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2560)
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. “เทคโนโลยีชีวภาพกับพลังงานทดแทน.”
BIOTECHNOLOGY เทคโนโลยีชีวภาพสำหรับโลกยุคใหม่, กรุงเทพฯ, 2550. หน้า 49-50.
- อภิขญา จันทร์มัน, สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และกิติพงษ์ รัตนภรณ์. “การหมักเอทานอลด้วยยีสต์
Saccharomyces cerevisiae Sc90 และ การหมักด้วยจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ร่วมกัน ในอาหาร
เลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีกลูโคสและไซลอส.” การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53, 2558.
- Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M. and Wenger, K.S. “Fermentation of
glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*.” Process Biochemistry, Vol. 41,
2006. pp. 2333-2336.
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpate, D., Chakrabarti, T. and Pandey, R.A.
“Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and
possible remedies.” Biofuels, Bioproducts and Biorefining, Vol. 4, 2009. pp. 77-
93.
- Bastawde, K.B. “Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action.”
World J. of Microbiol and Biotechnol, Vol 8, 1992. pp. 355-368.

- Bosch, P., Wallberg, O., Joelsson, E., Galbe, M. and Zacchi, G. "Impact of dual temperature profile in dilute acid hydrolysis of spruce for ethanol production." *Biotechnology for Biofuels*, Vol. 3, 2010. pp. 15.
- Browning, B.L. "Method in wood chemistry." Interscience Publishers, New York, London, 1963. pp. 389-407.
- Campbell, M.K. and Farrell, S.O. "Biochemistry." USA: Mary Finch, 2012. pp. 459.
- Chen, W.H., Lin, T.S., Guo, G.L. and Huang, W.S. "Ethanol production from rice straw hydrolysates by *Pichia stipitis*." *Energy Procedia*, Vol. 14, 2012. pp. 1261-1266.
- Cunha-Pereira, F., Hickert, L.R., Sehnem, N.T., Souza-Cruz, P.B., Rosa, C.A., and Ayub, M.A.Z. "Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations." *Bioresource Technology*, Vol. 102, 2011. pp. 4219-4225.
- Erdei, B., Franko, B., Galbe, M. and Zacchi, G. "Glucose and xylose co-fermentation of pretreated wheat straw using mutants of *S. cerevisiae* TMB3400." *Journal of Biotechnology*, Vol. 164, 2013. pp. 50-58.
- Eriksson, K.E.L., R.A. Blanchette. and P. Ander. "Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component." Springer Verlag, Berlin, 1990. pp. 407.
- Gamage, J., Lam, H. and Zhang, Z. "Bioethanol production from lignocellulosic biomass." *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, Vol. 4, 2010. pp. 3-11.
- Goshima, T., Negi, K., Tsuji, M., Inoue, H., Yano, S., Hoshino, T. and Matsushika, A. "Ethanol fermentation from xylose by metabolically engineered strains of *Kluyveromyces marxianus*." *Bioscience and Bioengineering*, Vol. 116, 2013. pp. 551-554.
- Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Fonseca C., Spencer-Martins I. and Gorwa-Grauslund MF. "Towards industrial pentose-fermenting yeast strains." *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 74(5), 2007. pp. 937-953.
- Halasz, A. and R. Lasztity. "Use of Yeast Biomass in Food Production." CRC Press, Boca Raton, 1991.
- Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A. and Salamov, A. "Genome sequence of the lignocellulose bio-converting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*." *Nature Biotechnology*, Vol. 25(3), 2007. pp. 319-326.
- Jojima T., Omumasaba CA., Inui M. and Yukawa H. "Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook." *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 85(3), 2010. pp. 471-480.

- Kim, T.H., Taylor, F. and Hicks, K.B. "Bioethanol Production from Barley Hull Using SSA (Soaking in Aqueous Ammonia) Pretreatment." *Bioresource Technology*, Vol. 99, 2008. pp. 5694-5702.
- Lertwattanasakul, N., Suprayogi., Murata, M., Rodrussamee, N., Limtong, S., Kosaka, T. and Yamada, M. "Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 103, 2013. 933-945.
- Li, X., Park, A., Estrela, R., Kim, S.R., Jin, Y.S. and Cate, J. "Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biotechnology Reports*, Vol. 9, 2016. pp. 53-56.
- Lin, T.H., Guo, G.L., Hwang, W.S. and Huang, S.L. "The addition of hydrolyzed rice straw in xylose fermentation by *Pichia stipitis* to increase bioethanol production at the pilot-scale." *Biomass and Bioenergy*, Vol. 91, 2016. pp. 204-209.
- Lu, X., Yamauchi, K., Phaiboonsilpa, N. and Saka, S. "Two-step hydrolysis of Japanese beech as treated by semi-flow hot-compressed water." *Journal of Wood Science*, Vol. 55, 2009. pp. 367-375.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology*, Vol. 96, 2005. pp. 673-686.
- McMillan, J.D. "Xylose fermentation to ethanol: A review." Published by NREL. ISBN. B0006QLMFU. (<http://www.nrel.gov>), 1993.
- Mishima, D., Tateda, M., Ike, M. and Fujita, M. "Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes." *Bioresource Technology*, Vol. 97(16), 2006. pp. 2166-2172.
- Nigam, J.N. "Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*." *Journal of Biotechnology*, Vol. 87(4), 2001. pp. 17-27.
- Olsson, L. and B. Hahn-Hägerdal. "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production." *Enzyme Microbial Technol.* Vol. 18, 1996. pp. 312-331.
- Panchal, C.J. and F.C.A. Tavares. "Yeast stain selection for ethanol production." In C.J. Panchal (ed). *Yeast Stain Selection*. Marcel Dekker, New York, 1990. pp. 225-243.

- Rabemanolontsoa, H. and Saka, S. "Comparative study on chemical composition of carious biomass species." *The Royal Society of Chemistry*, Vol. 3, 2013. pp. 3946-3956.
- Ragg, P.L. and Fields, P.R. "The development of a process for the hydrolysis of lignocellulosic waste." *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, Vol. A321, 1987. pp. 537-547.
- Saha, P., Baishnab, A.C., Alam, F., Khan, M.R. and Islam, A. "Production of bio-fuel (bio-ethanol) from biomass (pteris) by fermentation process with yeast." *Procedia Engineering*, Vol. 90, 2014. pp. 504-509.
- Shinozaki, Y. and H.K. Kitamoto. "Ethanol production from ensiled rice straw and whole-crop silage by the simultaneous enzymatic saccharification and fermentation process." *Biosci, Bioeng.* Vol. 111, 2011. pp. 320-325.
- Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D. and Osborne, J. "A comparison of chemical pre-treatment methods for improving saccharification of cotton stalks." *Bioresource Technology*, Vol. 98, 2007. pp. 3000-3011.
- Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D. and Templeton, D.W. "Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks." *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 58, 2010. pp. 9043-9053.
- Zaldivar, J., Nielsen, J. and Olsson, L. "Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration." *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 56, 2001. pp. 17-34.
- Zayas, G. and Mayer, O. "The single-batch bioconversion of wheat straw to ethanol employing the fungus *Trichoderma viride* and the yeast *Pachysolen tannophilus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 45, 1996. pp. 551-555.
- Zhang, B., Zhang, J., Wang, D., Han, R., Ding, R., Gao, X., Sun, L. and Hong, J. "Simultaneous fermentation of glucose and xylose at elevated temperatures co-produces ethanol and xylitol through overexpression of a xylose-specific transporter in engineered *Kluyveromyces marxianus*." *Bioresource Technology*, Vol. 216, 2016. pp. 227-237.
- Zheng Yi, Zhongli Pan. and Ruihong Zhang. "Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production" *Int. J. Agric. & Biol. Eng.*, Vol. 2, 2009. pp. 51-68.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การคำนวณ

1. การคำนวณค่าร้อยละผลได้ทางทฤษฎีของการหมักด้วยยีสต์

จากสมการที่ 2.1 การเปลี่ยนไซโลสเป็นเอทานอลของยีสต์



มวลโมเลกุลของเอทานอล = 46 กรัมต่อโมล

มวลโมเลกุลของไซโลส = 150 กรัมต่อโมล

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้นร้อยละผลได้ทางทฤษฎี} &= \frac{5\text{EtOH}}{3\text{Xylose}} \\ &= \frac{5 \times 46}{3 \times 150} \times 100 \\ &= 51.11 \% \end{aligned}$$

2. การคำนวณค่าร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล และร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอลเทียบกับทฤษฎี

$$\text{ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล} = \frac{\text{ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้}}{\text{ความเข้มข้นของไซโลสที่เวลาเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละผลได้โดยมวลจากการทดลองเทียบกับทฤษฎี} = \frac{\text{ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล}}{\text{ร้อยละผลได้โดยมวลทางทฤษฎี}} \times 100$$

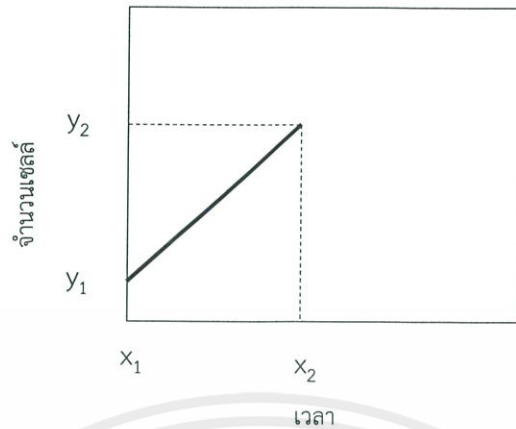
ตัวอย่าง หมักสารละลายไซโลสความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร จากผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) มีไซโลสความเข้มข้น 10.23 กรัมต่อลิตร หลังจากหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เกิดเอทานอลความเข้มข้น 4.42 กรัมต่อลิตร

$$\text{ร้อยละผลได้โดยมวลของเอทานอล} = \frac{4.42}{10.23} \times 100 = 43.2$$

$$\text{ร้อยละผลได้โดยมวลจากการทดลองเทียบกับทฤษฎี} = \frac{4.42}{0.51 \times 10.23} \times 100 = 84.72$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์



ระยะที่จุลินทรีย์แบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่าๆ กัน อัตราการเพิ่มของเซลล์จะแปรผันตามความเข้มข้นของเซลล์ในขณะนั้น ดังความสัมพันธ์

$$\frac{dy}{dx} \propto y$$

จากความสัมพันธ์แปรผันจะสามารถเปลี่ยนเป็นสมการโดยแทนด้วยค่าคงที่ μ สามารถเขียนสมการได้ดังนี้

$$\frac{dy}{dx} = \mu y$$

เมื่ออินทิเกรตสมการข้างต้นจะได้

$$\int_{y_1}^{y_2} \frac{dy}{y} = \int_{x_1}^{x_2} \mu dx$$

$$\ln y_2 - \ln y_1 = \mu(x_2 - x_1)$$

ที่ $x_1 = 0$ วินาที

$$\ln \frac{y_2}{y_1} = \mu(x_2 - 0)$$

ได้สมการการเจริญระยะทวีคูณดังนี้

$$y_2 = y_1 e^{\mu x}$$

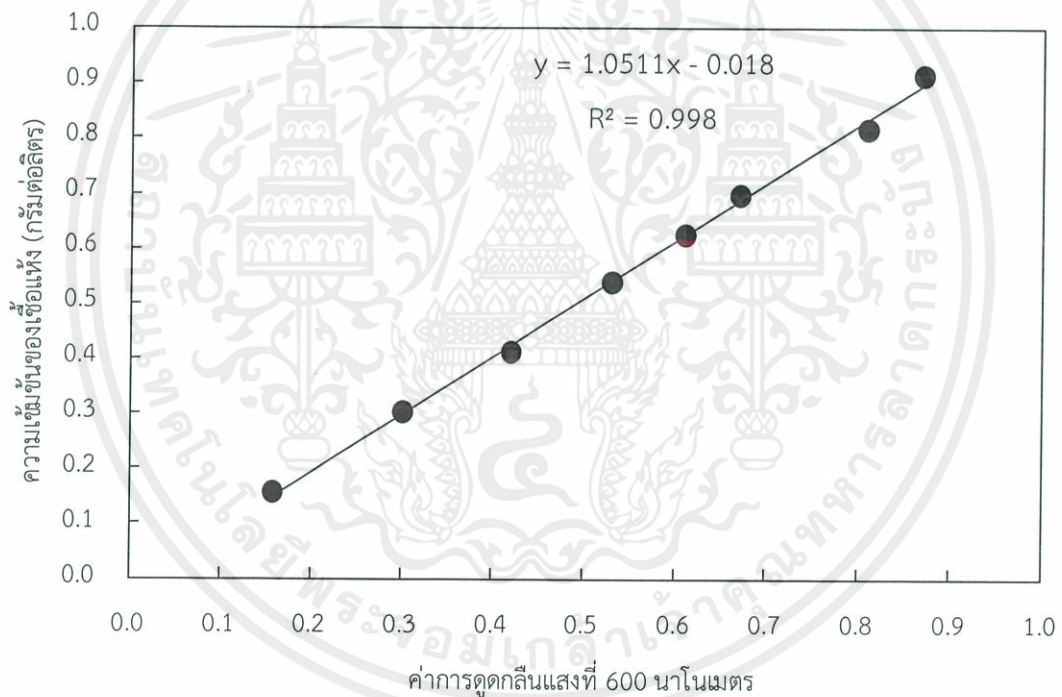
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลดิบ

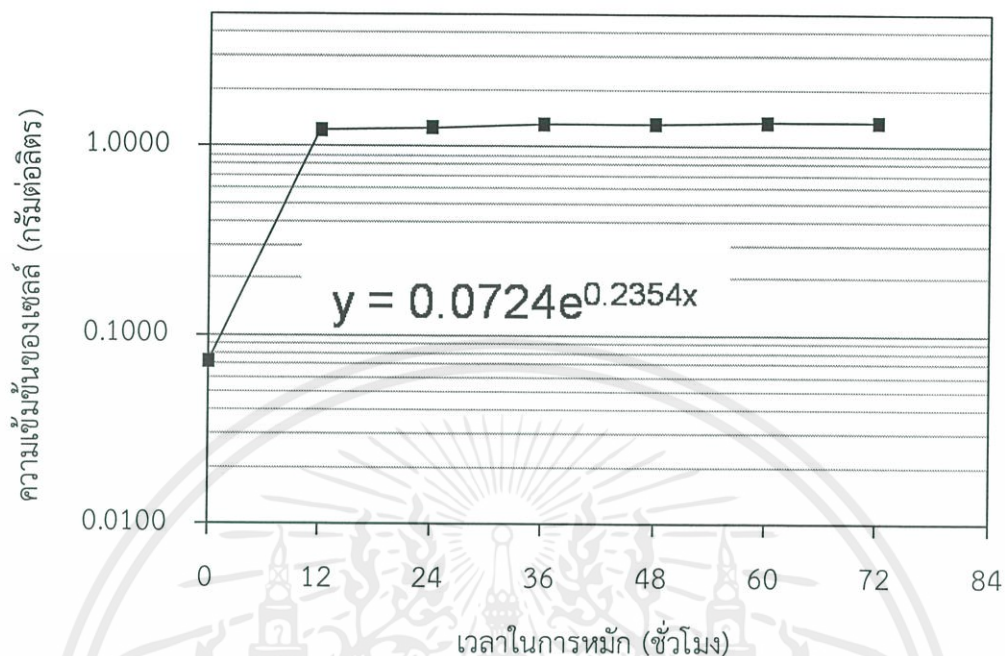
1. กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเชื้อแห้งกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

จากหัวข้อที่ 3.4 เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางด้วยอาหารเหลวทำให้ของเซลล์ยีสต์แห้งมีความเข้มข้นต่างกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์โดยกรองและอบแห้ง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และค่าการดูดกลืนแสง พบว่าได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการ $y = 1.0511x - 0.018$ ดังรูป ข.1

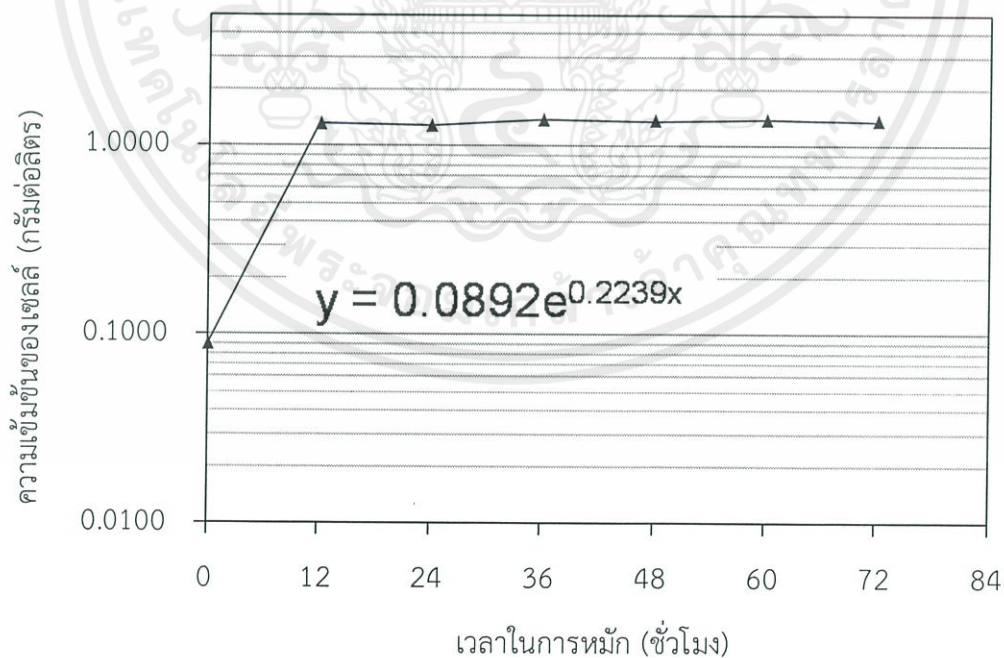


รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

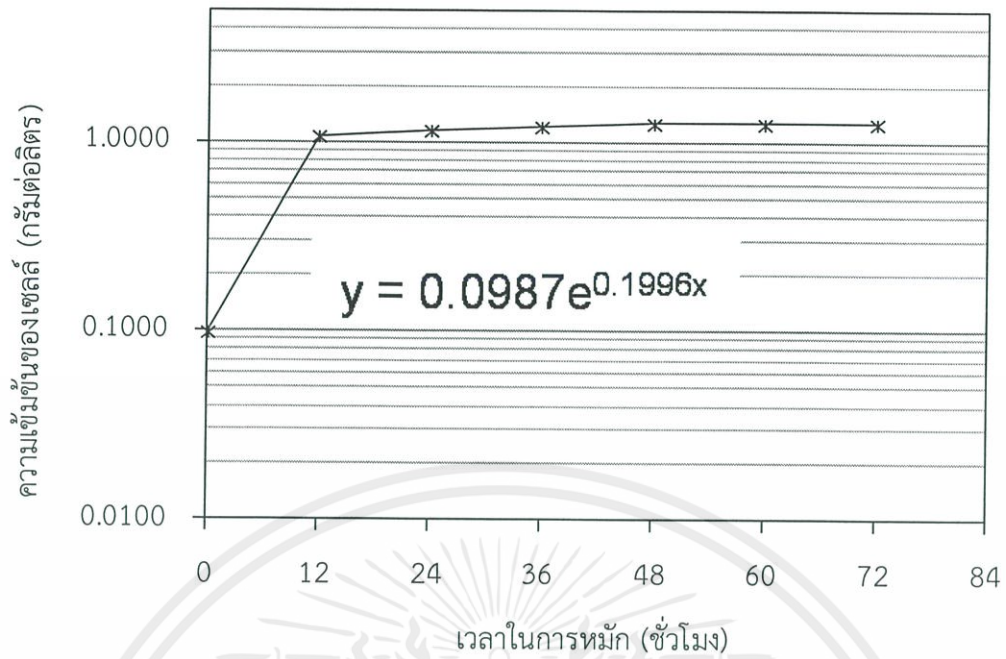
2. กราฟระหว่างลอการิทึมความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมักของแหล่งคาร์บอน
ต่างๆ ที่ใช้ในการหมัก



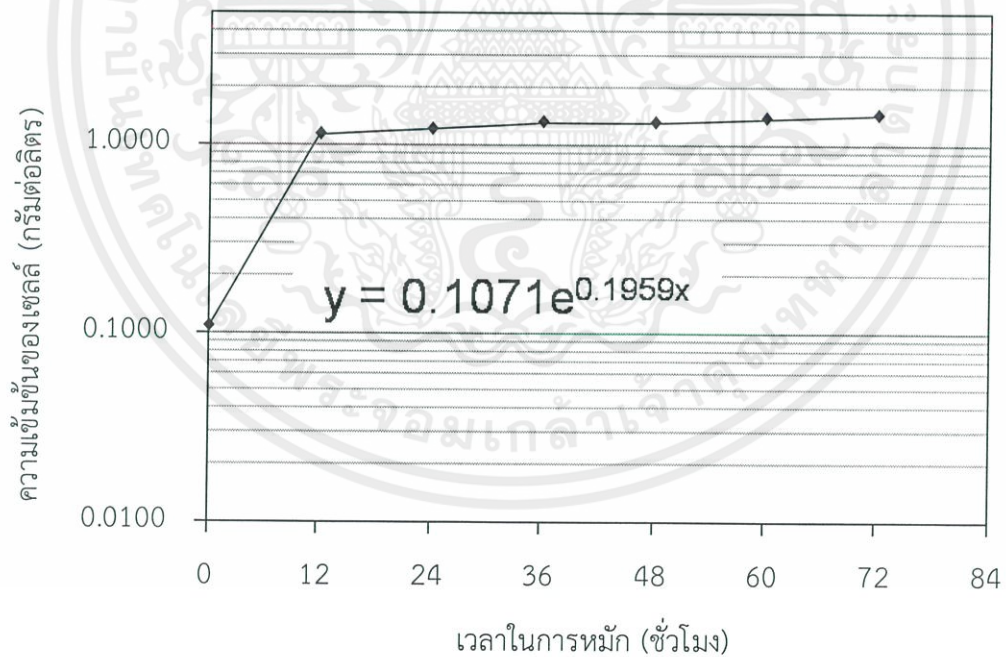
รูปที่ ข.2 กราฟระหว่างลอการิทึมความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมักของแหล่ง
คาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร



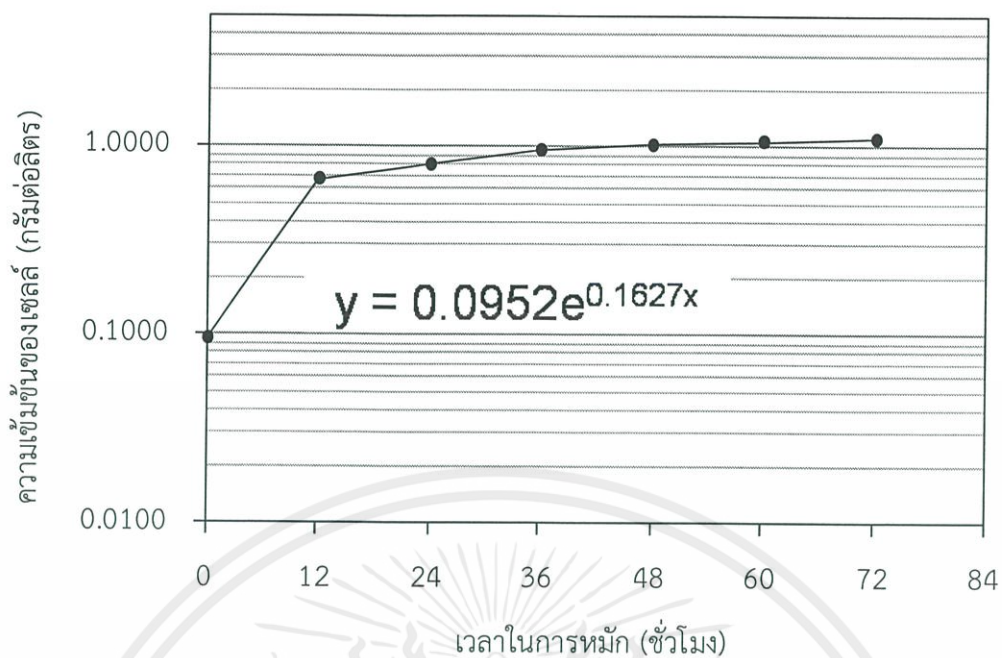
รูปที่ ข.3 กราฟระหว่างลอการิทึมความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมักของแหล่ง
คาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ ข.4 กราฟระหว่างลอการิทึมความเข้มข้นของเซลลูโลสแห้งและเวลาในการหมักของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร

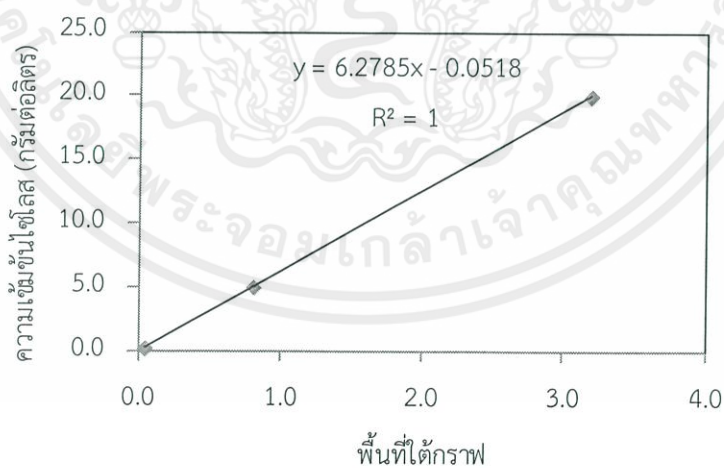


รูปที่ ข.5 กราฟระหว่างลอการิทึมความเข้มข้นของเซลลูโลสแห้งและเวลาในการหมักของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตร

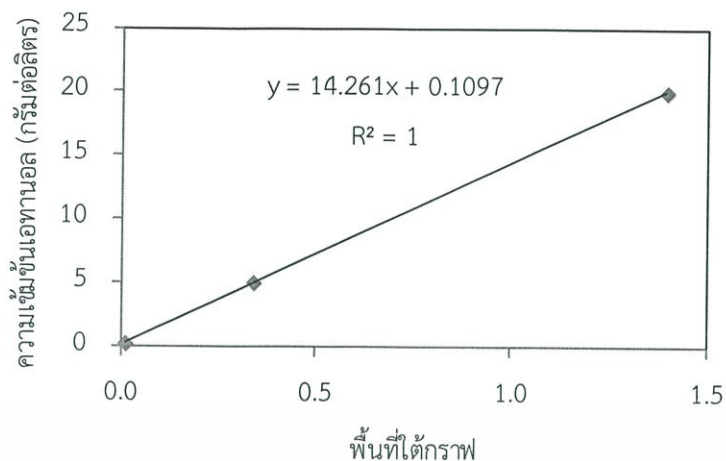


รูปที่ ข.6 กราฟระหว่างลอการิทึมความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้งและเวลาในการหมักของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ไฮโดรไลเซทจากชานอ้อย

3. กราฟมาตรฐานพื้นที่ได้กราฟโครมาโทแกรมกับความเข้มข้นของไซโลสและเอทานอล



รูปที่ ข.7 กราฟมาตรฐานพื้นที่ได้กราฟโครมาโทแกรมและความเข้มข้นของไซโลส



รูปที่ ข.8 กราฟมาตรฐานพื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมและความเข้มข้นของเอทานอล

4. พื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรม

ตารางที่ ข.1 พื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมและความเข้มข้นในการหมักที่ต่างกัน

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการหมัก	เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	พื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรม ($\times 10^{-6}$)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	
		ไซโลส	เอทานอล	ไซโลส	เอทานอล
สารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร	0	249,781	35,613	1.5165	0.0000
	12	51,343	190,041	0.2706	0.8470
	24	10,102	197,276	0.0116	0.8867
	36	8,796	189,310	0.0034	0.8430
	48	8,624	185,928	0.0023	0.8245
	60	8,590	180,440	0.0021	0.7944
	72	8,260	179,435	0.0001	0.7889
	สารละลายไซโลสความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร	0	748,989	20,215	4.6507
12		430,444	130,897	2.6507	1.5784
24		52,135	181,253	0.2755	2.2966
36		23,251	185,409	0.0942	2.3558
48		18,945	185,672	0.0671	2.3596
60		14,491	185,425	0.0392	2.3561
72		1,106	186,682	0.0000	2.3740

ตารางที่ ข.1 พื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมและความเข้มข้นในการหมักต่างกัน (ต่อ)

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการหมัก	เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	พื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรม ($\times 10^{-6}$)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	
		ไซโลส	เอทานอล	ไซโลส	เอทานอล
สารละลายไซโลสความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร	0	1,638,401	11,599	10.2349	0.0000
	12	1,325,997	31,233	8.2735	0.2242
	24	940,072	110,655	5.8504	1.3568
	36	690,875	175,419	4.2859	2.2804
	48	459,900	243,709	2.8357	3.2543
	60	155,739	298,783	0.9260	4.0397
	72	133,714	325,279	0.7877	4.4176
สารละลายไซโลสความเข้มข้น 20.0 กรัมต่อลิตร	0	2,963,241	15,514	18.5529	0.0000
	12	2,751,002	45,365	17.2204	0.4257
	24	2,428,164	120,452	15.1934	1.4965
	36	2,149,447	203,693	13.4435	2.6836
	48	1,987,591	252,865	12.4273	3.3849
	60	1,750,809	314,647	10.9407	4.2659
	72	1,573,608	368,883	9.8281	5.0394
สารละลายจากไฮโดรไลเซทจากขานอ้อย	0	126,574	17,507	0.7010	0.0000
	12	95,636	39,354	0.5746	0.3115
	24	91,778	48,452	0.4904	0.4413
	36	75,541	49,789	0.4520	0.4603
	48	74,029	57,664	0.4101	0.5726
	60	70,997	65,266	0.3993	0.6811
	72	57,309	72,165	0.3656	0.7794

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้