การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม

PRODUCTION OF ETHANOL FROM REDUCING SUGAR OBTAINED FROM PRETREATED WATER HYACINTH USING *Trichoderma harzianum*

มนิษา ปุลวะวัน

Manisa Pulavavana

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-SC-M-016-035

การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้เชื้อรา ไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม

PRODUCTION OF ETHANOL FROM REDUCING SUGAR OBTAINED FROM PRETREATED WATER HYACINTH USING *Trichoderma harzianum*

มนิษา ปุลววัน

Manisa Pulavavana

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-SC-M-016-035

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF ETHANOL FROM REDUCING SUGAR OBTAINED FROM PRETREATED WATER HYACINTH USING *Trichoderma harzianum*

Manisa Pulavavana

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2012

KMITL-2012-SC-M-016-035

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2012

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม
Production of Ethanol from Reducing Sugar Obtained from Pretreated Water Hyacinth using *Trichoderma harzianum*

นักศึกษา นางสาวมนิษา ปุลวัน
รหัสประจำตัว 51609852
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุวรรณี	จรรยาพูน	
ผศ.ดร.อุสารัตน์	ถาวรชัยสิทธิ์	
ดร.สุชาติ	เหลืองประเสริฐ	
ผศ.ดร.ชลอ	จารุสุทธิรักษ์	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2555 เวลา 9.00 – 12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 502 ชั้น 5 อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 18 **เดือน** ..... **พ.ศ.** 55

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม
นักศึกษา	นางสาวมนิษา ปุลวัน
รหัสประจำตัว	51609852
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม
พ.ศ.	2555
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์

บทคัดย่อ

ผักตบชวาประกอบด้วย เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งสามารถนำมาผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาล-รีดิวซ์จากผักตบชวา ด้วยการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับทางเคมี และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยนำตัวอย่างของผักตบชวาที่ผ่านการปั่นและอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาปรับสภาพโดยการต้มด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการอบแห้งและปรับค่าพีเอชในช่วง 4.5-5.5 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ได้แก่ ระยะเวลา ปริมาณน้ำอิสระของผักตบชวา อุณหภูมิ และความเข้มข้นของสารละลาย-สปอร์ พบว่าที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน ปริมาณน้ำอิสระเท่ากับ 0.98 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ 1.09×10^{8} CFU/ml โดยใช้อัตราส่วนผักตบชวาแห้งต่อสารละลาย-สปอร์เท่ากับ 5 กรัมต่อ 12 มิลลิลิตร สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 12.99±0.55 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้ง จากนั้นนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพมาผลิตเอทานอลโดยใช้การหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเอทานอลความเข้มข้น 4.023 กรัมเอทานอลต่อลิตร คิดเป็น 0.414 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ หรือ 0.0362 กรัมเอทานอลต่อกรัมผักตบชวาแห้ง

คำสำคัญ : ไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม, น้ำตาลรีดิวซ์, ผักตบชวา, ลิกโนเซลลูโลส, เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Production of ethanol from reducing sugar obtained from pretreated water hyacinth using *Trichoderma harzianum*
Student	Manisa Pulavavana
Student ID	51609852
Degree	Master of Science
Program	Environmental Chemistry
Year	2012
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Chalor Jarusutthirak

ABSTRACT

Water hyacinth mainly composes of cellulose and hemicelluloses, which can be digested to reducing sugar. This research studied a production of reducing sugar from water hyacinth using *Trichoderma harzianum*. The water hyacinth was grounded and dried at a temperature of 65 degree celsius for 24 hours. The sample was boiled in 0.25% (v/v) sulfuric acid solution at a temperature of 100 degree celsius for 60 minutes, and then dried and adjusted pH to 4.5-5.5. Optimum conditions for *Trichoderma harzianum* in digesting water hyacinth and producing reducing sugar, including time, water activity, temperature, and concentration of spore solution, were investigated. The results showed that digestion time of 10 days, water activity of 0.98, temperature of 30 degree celsius, and the concentration of spore solution of 1.09×10^{8} CFU/ml by using the ratio of material to spore solution at 5 g: 12 ml, reducing sugar were produced at the amount of 12.99±0.55 mg/g of dried sample. The production of ethanol from reducing sugar was then investigated under anaerobic fermentation process using *Saccharomyces cerevisiae* yeast at a concentration of 5%(v/v) and a temperature of 30 degree celsius for 72 hours. The results showed that ethanol at a concentration of 4.023 g/l was produced, equivalent to 0.414 g/g reducing sugar, or 0.0362 g/g dried weight of water hyacinth

Keywords : ethanol, lignocellulose, reducing sugar, *Trichoderma harzianum*, water hyacinth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ และดร. สุชาติ เหลือง-ประเสริฐ ที่กรุณาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบริษัท แอพพลายเด็ม (ประเทศไทย) จำกัด กรุงเทพมหานคร ที่อนุเคราะห์ผงเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี รวมทั้งอำนวยความสะดวกต่างๆระหว่างทำการวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆน้องๆ ในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำแนะนำ และช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้ความสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่บิดามารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

มนิษา ปุลวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล	5
2.2 ผักตบชวา	6
2.2.1 ลักษณะสำคัญทางพฤกษศาสตร์	6
2.2.2 ผลเสียของผักตบชวา	7
2.2.3 องค์ประกอบของผักตบชวา	8
2.2.4 ลักษณะทางเคมีของผักตบชวา	9
2.3 การปรับสภาพวัตถุดิบ	11
2.3.1 วิธีทางกายภาพ	11
2.3.2 วิธีทางเคมี	11
2.3.3 วิธีทางชีวภาพ	11
2.3.4 วิธีการร่วมทางกายภาพและเคมี	12
2.4 เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์	12
2.4.1 ลักษณะทางกายภาพ	12
2.4.2 ปัจจัยที่มีผลในการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 กระบวนการผลิตเอทานอล	15
2.5.1 องค์ประกอบของเอทานอล	15
2.5.2 การผลิตเอทานอล	16
2.6 ยีสต์	18
2.6.1 ยีสต์ที่ใช้สำหรับการหมักเอทานอล	18
2.6.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์	20
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	
3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการทดลอง	24
3.1.1 อุปกรณ์	24
3.1.2 สารเคมี	25
3.2 การดำเนินงานวิจัย	25
3.3 วัตถุดิบและการเตรียมตัวอย่าง	28
3.4 การปรับสภาพวัตถุดิบทางกายภาพและทางเคมี	28
3.5 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*	28
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*	29
3.6.1 ผลของระยะเวลา	29
3.6.2 ผลของอุณหภูมิ	29
3.6.3 ผลของปริมาณน้ำอิสระ	29
3.6.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ของเชื้อรา	30
3.7 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์	30
3.7.1 การเตรียมสารละลายยีสต์	30
3.7.2 สารละลายน้ำตาลตัวอย่าง	30
3.8 ขั้นตอนการผลิตเอทานอล	31
3.9 พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	
4.1 ผลการปรับสภาพผักตบชวาโดยวิธีทางกายภาพร่วมกับเคมี	32
4.2 การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum*	33
4.2.1 ผลของระยะเวลาต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์	33
4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์	34
4.2.3 ผลของปริมาณน้ำอิสระต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์	35
4.2.4 ผลของค่าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์	36
4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และค่าการทำงานของเอนไซม์	37
4.4 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*	39
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	42
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์	47
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง	62
ประวัติผู้เขียน	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 ตารางแสดงการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบประเภทต่างๆ 5

2.2 องค์ประกอบของผักตบชวา 8

2.3 คุณสมบัติของเอทานอล 15

3.1 พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์ 31

4.1 ค่าการทำงานของเอนไซม์ในสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในวัสดุหมักชนิดต่างๆ 38

ก-1 ค่ามาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 49

ก-2 ความเข้มข้นของ NaCl ที่ปริมาณน้ำอิสระต่างๆ 57

ก-3 ค่ามาตรฐานของเอทานอล 59

ข-1 ผลการศึกษาระยะเวลาในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 63

ข-2 ผลการศึกษาอุณหภูมิในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 64

ข-3 ผลการศึกษาปริมาณน้ำอิสระในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 64

ข-4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 65

ข-5 ผลการศึกษาปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสในผักตบชวา 65

ข-6 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาและน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 66

ข-7 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากจากผักตบชวาและน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way ANOVA 67

ข-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความเข้มข้นเอทานอลทั้งหมด 67

ข-9 การเปรียบเทียบความเข้มข้นเอทานอลทั้งหมดด้วยวิธีดันแคนส์ 68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

ข-10 ผลการศึกษาปริมาณเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากผักตบชวาและน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way ANOVA 68

ข-11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเอทานอลทั้งหมด 69

ข-12 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลทั้งหมดวิธีดันแคนส์ 69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

2.1 ผักตบชวา 7

2.2 การจัดเรียงตัวของเส้นใยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในผนังเซลล์พืช 8

2.3 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส 9

2.4 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส 10

2.5 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน 10

2.6 ลักษณะเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 13

2.7 ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* 19

2.8 ภาพแสดงการหมักโดยกระบวนการไกลโคไลซีส 20

3.1 ขั้นตอนการศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 26

3.2 ขั้นตอนการศึกษาการผลิตเอทานอล 27

4.1 ลักษณะทางกายภาพของผักตบชวา (ก) ผักตบชวาสด (ข) ผักตบชวาอบแห้ง และ (ค) ผักตบชวาที่ผ่านการต้มด้วยกรดเจือจาง 32

4.2 ผลของระยะเวลาต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 34

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 35

4.4 ผลของปริมาณน้ำอิสระต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 36

4.5 ผลของความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 37

4.6 ปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ที่ได้จากผักตบชวาที่สภาวะต่างๆ 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.7 ลักษณะของสารละลายน้ำตาลตัวอย่างที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (ก) น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการต้มในกรดเจือจาง (ข) น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (ค) น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการผสมของน้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มในกรดเจือจางและการย่อยด้วยเชื้อรา (ง) น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการผสมของน้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มในกรดเจือจางและการย่อยด้วยเชื้อรา (จ) น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยปริมาตร 39

4.8 กราฟแสดงความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา (ก) น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มด้วยกรดเจือจาง (ข) น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยเชื้อรา (ค) น้ำตาลรีดิวซ์ผสม (ง) น้ำตาลกลูโคสเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม 40

4.9 กราฟแสดงปริมาณของเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา (ก) น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มด้วยกรดเจือจาง (ข) น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยเชื้อรา (ค) น้ำตาลรีดิวซ์ผสม (ง) น้ำตาลกลูโคสเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม (จ) น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยปริมาตร 41

ก-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 49

ก-2 วิธีการนับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacytometer (ก) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์ (ข) ภาพขยายของตารางที่ 10X (ค) 5 ช่องที่ใช้ในการนับ 56

ก-3 กราฟมาตรฐานเอทานอล 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันไบโอเอทานอลได้ถูกนำมาใช้ในการแก้ปัญหาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพลังงานและสิ่งแวดล้อมหลายประการ เช่น ส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อมในท้องถิ่น ลดการนำเข้าวัสดุเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเพลิงจากฟอสซิล เอทานอลมีข้อดีคือเป็นเชื้อเพลิงหมุนเวียน ให้การเผาไหม้สะอาด และไม่ทำให้เกิดก๊าซเรือนกระจก (วิโรจน์, 2553) เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่มีออกซิเจนอยู่ในสารประกอบ 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะลดการปลดปล่อยสารประกอบไนโตรเจนออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ เอทานอลมีค่าออกเทนสูง มีช่วงติดไฟกว้าง มีอัตราเร็วการเกิดเปลวไฟสูง และมีค่าความร้อนของความดันไอสูง คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้มีอัตราแรงอัดอากาศสูงและใช้เวลาเผาไหม้สั้นกว่า ทำให้มีประสิทธิภาพมากกว่าน้ำมันเชื้อเพลิง (พุทธิพร, 2552)

ไบโอเอทานอลนั้นเป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากแหล่งวัตถุดิบตามธรรมชาติที่มาจากแป้งหรือน้ำตาลหรือเซลลูโลส วัตถุดิบต่างๆที่นำมาผลิตเอทานอลนั้น ได้แก่ 1) วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น 2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล บีทรูท ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น และ 3) วัตถุดิบประเภทเส้นใย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น ผลผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบจำพวกแป้งหรือน้ำตาลหรือเส้นใยบางประเภท เป็นการดึงเอาสัดส่วนของวัตถุดิบที่เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์มาใช้ทำให้เกิดการขาดแคลน (กระทรวงพลังงาน, 2554) จึงควรมีการวิจัยและพัฒนาวัตถุดิบที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย และต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ ได้แก่ วัตถุดิบจำพวกวัชพืช เช่น ผักตบชวามาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลแทน

ผักตบชวาเป็นวัชพืชที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ทนทานต่อสภาพแวดล้อม มีการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วทั้งทางเมล็ดและการแตกหน่อ การแพร่กระจายของผักตบชวาในแหล่งน้ำธรรมชาติ ก่อให้เกิดผลเสีย เช่น ผักตบชวาจะขัดขวางการระบายน้ำของประตูน้ำ ทำให้เกิดการตื้นเขินของแหล่งน้ำต้องขุดลอกบ่อย การแพร่ระบาดของผักตบชวาทำให้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงและพาหะนำโรคต่างๆมีผลต่อสุขภาพอนามัย เป็นต้น (กรมชลประทาน, 2550) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผักตบชวามีโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 18 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 48 และลิกนินร้อยละ 3.5 (Nigam, 2002) โดยเซลลูโลสมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนเฮมิเซลลูโลสมีน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบเช่น กลูโคส ไซโลส กาแลกโตส แมนโนส อะราบิโนส เป็นต้น (พุทธิพร, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้สามารถนำมาผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้ อย่างไรก็ตาม การนำวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสในผักตบชวามาใช้เป็นสารตั้งต้นจำเป็นต้องทำการปรับสภาพก่อน เพราะในเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นผลึก เฮมิเซลลูโลส และโครงสร้างของลิกนินที่ขัดขวางการเกิดน้ำตาล ทำให้น้ำตาลเกิดขึ้นได้น้อย (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2541) การเปลี่ยนเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสในผักตบชวาให้เป็นน้ำตาลทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี การให้ความร้อน การใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ และการใช้จุลินทรีย์ การใช้สารเคมีเป็นการย่อยสลายโครงสร้างของเซลลูโลสส่วนที่เป็นผลึก การให้ความร้อนเป็นการทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์จับกับวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น การใช้เอนไซม์บริสุทธิ์เอนไซม์จะสามารถจำเพาะต่อสารที่อยู่ในวัตถุดิบได้มากขึ้น แต่เอนไซม์บริสุทธิ์มีขั้นตอนการผลิตซับซ้อน และมีราคาแพง การใช้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้น้ำตาลที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับเอนไซม์บริสุทธิ์ และยังสามารถลดต้นทุนและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2541)

เชื้อรากลุ่ม White rot fungi เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลสเพื่อผลิตเป็นน้ำตาลได้ ตัวอย่างของ White rot fungi เช่น *Phanerochaete chrysosporium, Tremates* sp., *Cerporiopsis Subvermispora, Phebia radiata, Pycnoporous* sp., *Coriolopsis rigida, Garnoderma lucidum, Nematoloma frowardii, Cyathus stercoreus, Bjerkandera* spp., *Trichoderma viride, Trichoderma hamatum* และ *Trichoderma harzianum* เป็นต้น (ยสนันท์ อรุณีและ ธีรวัฒน์, 2548) เชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นกลุ่มเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส (laccase) ไซแลนเนส (xylanase) และไพโรซีเดส (peroxidase) เพื่อย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ได้มากที่สุด และยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่ 4.5-5.5 (สุกาญจน์, 2554) อย่างไรก็ตามโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสส่วนที่เป็นผลึกเป็นตัวขัดขวางทำให้ประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ดังกล่าวลดลง เชื้อราเข้าไปเปลี่ยนรูปเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลทำได้ยาก (นงลักษณ์ และปรีชา, 2541) จึงจำเป็นต้องทำการปรับสภาพร่วมกับทางกายภาพและทางเคมี แล้วจึงทำการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อให้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ผักตบชวาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมีร่วมกับการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* รวมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ได้แก่ ระยะเวลา ปริมาณน้ำอิสระของผักตบชวา อุณหภูมิ และความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ของเชื้อรา น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ต่อไป ซึ่งผลของการศึกษาวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทน ที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ และเพื่อลดปัญหาการขาดแคลนพลังงานต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

1.2.3 เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอล จากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากผักตบชวา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ คือ ผักตบชวาโดยใช้เฉพาะส่วนก้านทำการเตรียมโดยการปั่นและอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3.2 การปรับสภาพผักตบชวาทางกายภาพและทางเคมีโดยการต้มผักตบชวาในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนของผักตบชวาต่อสารละลายกรดซัลฟูริก เป็น 1:10 (w/v) เป็นเวลา 60 นาที

1.3.3 สารละลายสปอร์ที่ใช้ เตรียมจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในรูปผง ได้มาจาก บริษัท แอพพลายเค็ม (ประเทศไทย) จำกัด กรุงเทพมหานคร

1.3.4 การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในอัตราส่วนวัสดุหมัก 5 กรัมต่อสารละลายสปอร์ 12 มิลลิลิตร โดยสภาวะที่ทำการศึกษา ได้แก่

1) ระยะเวลาในการหมักผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* แปรค่าที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 14, 18 วัน
2) อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* แปรค่าที่ 30, 35, 40 องศาเซลเซียส
3) ปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) ของผักตบชวาแปรค่าที่ 0.90, 0.95, 0.98
4) ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ของ *Trichoderma harzianum* แปรค่าที่ 1.09×10^6, 2.18×10^6, 1.09×10^7, 1.09×10^8 CFU/ml

1.3.5 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากผักตบชวา เปรียบเทียบกับสารละลายกลูโคส ใช้กระบวนการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นแนวทางในการลดปัญหาปริมาณผักตบชวาที่มีมากเกินไปในแหล่งน้ำ

1.4.2 ลดปัญหาการขาดแคลนพลังงาน โดยนำวัชพืชที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศมาผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อเป็นวัตถุดิบในทางอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล

1.4.3 สามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาพลังงานทดแทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้จากผลผลิตทางการเกษตร วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทุกส่วนของพืชสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอลได้ โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

- วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น
- วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีทรูท ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น
- วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่ เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

อย่างไรก็ตามในการผลิตนั้นกระบวนการผลิตจะแตกต่างกันไปตามประเภทของวัตถุดิบ และให้ผลผลิตเอทานอลที่แตกต่างกันด้วย ตามตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบประเภทต่างๆ

วัตถุดิบทางการเกษตร	ผลผลิตเอทานอล (ลิตรต่อกิโลกรัม น้ำหนักแห้ง)	ของเสียทางการเกษตร	ผลผลิตเอทานอล (ลิตรต่อกิโลกรัม น้ำหนักแห้ง)
ข้าวบาร์เล่ย์	0.41	ฟางข้าวบาร์เล่ย์	0.31
ข้าวโพด	0.46	ซังข้าวโพด	0.29
ข้าวโอ๊ต	0.41	ฟางข้าวโอ๊ต	0.26
ข้าว	0.48	ฟางข้าว	0.28
ข้าวฟ่าง	0.44	ฟางข้าวฟ่าง	0.27
ข้าวสาลี	0.40	ฟางข้าวสาลี	0.29
อ้อย	0.50	ชานอ้อย	0.28

ที่มา : กระทรวงพลังงาน (2545)

แม้ว่าจะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิด ที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นเอทานอล โดยมีหลักในการพิจารณา คือ

(1) วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดปี หาได้ง่าย ราคาถูก

(2) สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบ และต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์และสัตว์

ดังนั้นวัตถุดิบจากวัชพืชเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยลดต้นทุนการนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศ และยังช่วยลดปัญหาวัชพืชจำนวนมากที่เกิดขึ้น ในการทดลองการผลิตเอทานอลในครั้งนี้จึงได้ใช้ผักตบชวาซึ่งเป็นพืชที่หาได้ง่าย และเจริญได้อย่างรวดเร็ว (กระทรวงพลังงาน, 2545)

2.2 ผักตบชวา

ผักตบชวา (Water Hyacinth) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Eichhornia crassipes* เป็นพืชน้ำลักษณะใบเป็นประเภทใบเดี่ยว แผ่นใบกว้างมนโค้ง ก้านใบยาวอวบน้ำ ดอกมีลักษณะเป็นช่อกลีบ เป็นพืชน้ำล้มลุก อายุหลายฤดู สามารถอยู่ได้ทุกสภาพน้ำ มีถิ่นกำเนิดในแถบลุ่มน้ำอเมซอน ประเทศบราซิล ในทวีปอเมริกาใต้ มีดอกสีม่วงอ่อน คล้ายช่อดอกกล้วยไม้ และแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว มีชื่อเรียกในแต่ละท้องถิ่นดังนี้ ผักปอดสวะ ผักโรค ผักตบชวา ผักยะวา ผักอีโยก ผักป่อง

ผักตบชวาถูกนำเข้ามาในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2444 ในสมัยรัชกาลที่ 5 โดยนำเข้ามาจากประเทศอินโดนีเซียในฐานะเป็นไม้ประดับสวยงาม และนำกลับมาในประเทศไทย ใส่ในอ่างดินเลี้ยงไว้หน้าสนามวังสระปทุม จนกระทั่งเกิดน้ำท่วมวังสระปทุมขึ้น ทำให้ผักตบชวาหลุดลอยกระจายไปตามแม่น้ำลำคลองทั่วไป และแพร่พันธุ์อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน (สุรชัย, 2538)

2.2.1 ลักษณะสำคัญทางพฤกษศาสตร์

ผักตบชวาเป็นพันธุ์ไม้น้ำจืดประเภทล้มลุก มีอายุได้หลายปี ทั้งในน้ำนิ่งและน้ำไหล น้ำลึกและน้ำตื้น ในน้ำลึกจะมีทุ่นลอย (floating structure) ซึ่งจะมีหัวรากลอย (floating rhizomes) และที่ฐานใบจะมีกระเปาะลอยภายในมีลักษณะพรุนคล้ายฟองน้ำ ลำต้นจะมีสีเขียว สูงประมาณ 5-10 เซนติเมตร แต่ในดินโคลนจะสูงถึง 50 เซนติเมตร เจริญแบบแตกกอ (sympodial) ใบมีการจัดเรียงในลักษณะแบ่งเป็นรัศมีออกจากจุดเดียวกัน (rosette) เป็นใบเดียวประกอบด้วยก้านใบ (petiole) และแผ่นใบ (blade) ซึ่งมีลักษณะดังรูป 2.1 การสืบพันธุ์มี 2 แบบคือ แบบอาศัยเพศโดยการใช้ดอกและแบบที่ไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (ไหล) ซึ่งเป็นวิธีสำคัญในการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เกิดขึ้นทุกๆ 6-8 วัน ทำให้ใบและลำต้นคลุมพื้นที่น้ำได้ร้อยละ 8 ต่อวัน การเจริญเติบโตต้องการปัจจัยคล้ายคลึงกับพืชสีเขียวทั่วไป คือ แสงสว่างและอาหาร ผักตบชวา เจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีพีเอช 4-10 และอุณหภูมิของน้ำไม่สูงกว่า 34 องศาเซลเซียส ในต้นพืชจะมีน้ำเฉลี่ยประมาณ ร้อยละ 95 ประกอบด้วยน้ำในใบร้อยละ 89 และในก้านใบร้อยละ 96.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 ผักตบชวา

2.2.2 ผลเสียของผักตบชวา

การแพร่กระจายของผักตบชวาทำให้เกิดผลเสียทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อมต่างๆ ดังนี้ (สุรชัย, 2538)

1. ด้านการชลประทาน

ผักตบชวาทำให้การพัฒนาแหล่งน้ำไม่ได้ผลตามเป้าหมายเนื่องจากทำให้อัตราการไหลของน้ำลดลงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ขัดขวางการระบายน้ำของประตูน้ำ ทำให้เกิดการตื้นเขินของแหล่งน้ำต้องขุดลอกบ่อยและประการสำคัญคือผักตบชวาทำให้การระเหยน้ำเพิ่มมากกว่าพื้นที่ที่ไม่มีผักตบชวาปกคลุมถึง 35 เท่า ในพื้นที่ 1 ตารางเมตร ผักตบชวาสามารถระเหยน้ำได้สูงถึง 0.35 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน ถ้าคิดเป็นพื้นที่ทั่วประเทศจะสูญเสียประมาณปีละ 16,000 ล้านลูกบาศก์เมตร

2. ด้านการผลิตไฟฟ้า

ผักตบชวาก่อให้เกิดปัญหาสำคัญในการผลิตไฟฟ้าโดยผักตบชวาจะลดปริมาณน้ำจากการที่ผักตบชวาตายทับถมกันทำให้อ่างเก็บน้ำตื้นเขินและทำให้ปริมาณน้ำลดลงเนื่องจากการระเหยของน้ำทำให้น้ำหมดไปโดยเปล่าประโยชน์อย่างรวดเร็วและผักตบชวาแย่งเนื้อที่การเก็บกักน้ำของอ่างเก็บน้ำทำให้เก็บรักษาน้ำได้น้อยลง ด้วยสาเหตุเหล่านี้จึงทำให้ปริมาณน้ำไม่เพียงพอต่อการสร้างกระแสไฟฟ้า

3. ด้านการเกษตรกรรม

ผักตบชวาจะแย่งธาตุอาหารและน้ำ ถ้าคลุมผิวน้ำมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงส่งผลกระทบต่อสัตว์บดบังแสงแดดทำให้พืชน้ำพวกสาหร่ายและแพลงตอนลดลงรุกล้ำพื้นที่การเกษตรกรรม และการประมง

4. ด้านเศรษฐกิจและสังคม

การที่ผักตบชวาขึ้นอย่างหนาแน่นทำให้เกิดอุปสรรคต่อการขนส่งทางน้ำล่าช้าลง นอกจากนั้นการแพร่ระบาดของผักตบชวาทำให้เกิดเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงและพาหะนำโรคต่างๆมีผลต่อสุขภาพอนามัยของประชาชน ต้องสูญเสียงบประมาณกำจัดผักตบชวาปีละกว่า 50 ล้านบาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 องค์ประกอบของผักตบชวา

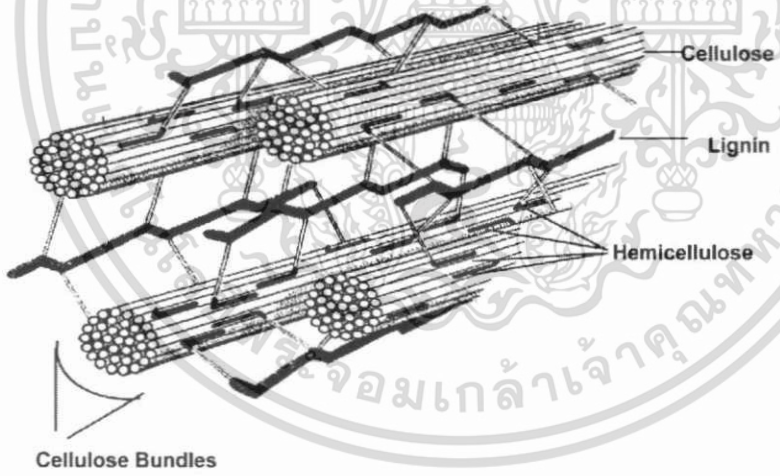
ผักตบชวาเป็นพืชอวบน้ำ น้ำหนักแห้งมีประมาณร้อยละ 6-7 มีโปรตีนต่ำประมาณร้อยละ 1-2 ของน้ำหนักสด ใบผักตบชวาแห้งมีโปรตีนประมาณร้อยละ 14-20 ขึ้นอยู่กับปริมาณก้านใบที่ปนมา ใบผักตบชวาแห้งใช้ผสมเป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารสุกรและสัตว์ปีกได้ในปริมาณจำกัด เนื่องจากมีเส้นใยสูง ดังตารางที่ 2.2 สารที่ประกอบเป็นเส้นใยประเภทที่ไม่ละลายน้ำได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยที่ผักตบชวามีสารประกอบของเซลลูโลสร้อยละ 18 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 48 และลิกนินร้อยละ 3.5 (Nigam, 2002)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของผักตบชวา

ความชื้น	ไขมัน	โปรตีน	เส้นใย	เถ้า	N.F.E.*	เฮมิเซลลูโลส	เซลลูโลส
7.23	2.24	14.88	18.94	12.33	44.39	33.97	18.00

ที่มา : พุทธิพร (2552) *N.F.E. (Nitrogen Free Extract) คือ สารสกัดที่ปราศจากไนโตรเจน

องค์ประกอบหลักของผักตบชวาที่นำมาผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อนำไปหมักให้เป็นเอทานอลนั้น ส่วนใหญ่เป็นเส้นใยที่เกิดจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน รวมกันเป็นรูปร่าง ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การจัดเรียงตัวของเส้นใยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในผนังเซลล์พืช (พรรณวิไล, 2545)

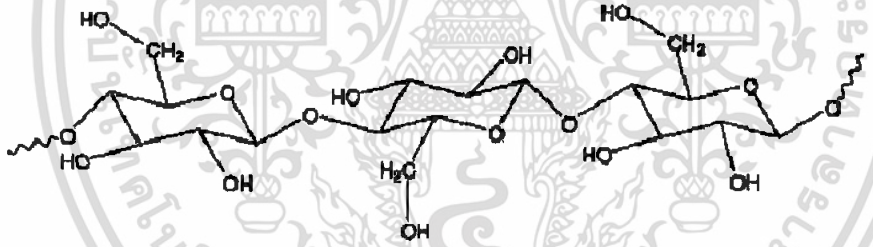
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 ลักษณะทางเคมีของผักตบชวา

ผักตบชวาประกอบด้วยโครงสร้างที่เกิดจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (พุทธิพร, 2552) ดังนี้

1) เซลลูโลส

เซลลูโลส (cellulose) เป็นพอลิแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ ที่มีประมาณร้อยละ 40-50 ในผนังเซลล์พืช ลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรง ไม่มีกิ่งก้านสาขา และเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) ของ β-D-glucose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α—1,4 glycosidic linkage ดังรูปที่ 2.3 โดยมีค่า degree of polymerization อยู่ในช่วงประมาณ 100 ถึงมากกว่า 10,000 เกาะรวมกันภายใน crystalline microfibrils ด้วยพันธะไฮโดรเจน เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 ถึง 750,000 ดาลตัน ซึ่งเท่ากับ 100-4,000 หน่วยกลูโคส โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวกันเป็นมัดเรียกว่า fibril โดยมีพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ใกล้กันของเซลลูโลสสายหนึ่ง กับเซลลูโลสอีกสายหนึ่งเชื่อมต่อกันเป็น fibril นอกจากนั้น เซลลูโลสที่พบในทั้งไม้เนื้ออ่อน และไม้เนื้อแข็งมีความทนต่อกรดได้มากกว่า เฮมิเซลลูโลส

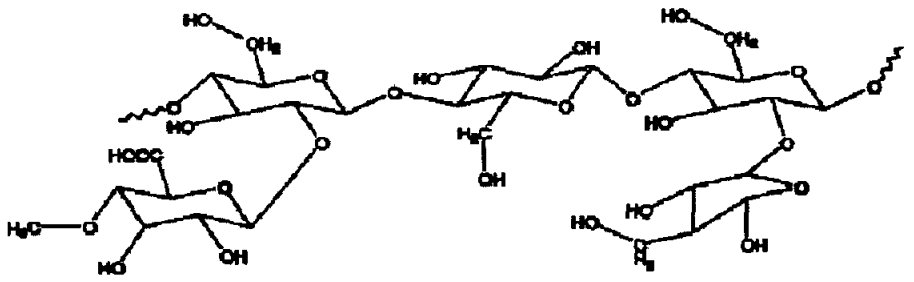


รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (Stenius, 2000)

2) เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบพวก amorphous polymeric carbohydrate พบมากในไม้เนื้อแข็ง เปลือกพวกพืชตระกูลหญ้า ละลายในสารละลายที่เป็นด่างหรือกรดเจือจาง ปกติจะอยู่ร่วมกับเซลลูโลส และลิกนินในผนังเซลล์ของพืช โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็น heteroglycan ประกอบด้วย น้ำตาลหลายชนิดมาต่อกัน เช่น β-D-xylopyronose, α-L-arabofuranose, β-D-glucopyranose, α-L-galactopyranose, β-D-mannopyronose, α-L-rhamnopyronose และ α-L-fucopyronose ดังรูปที่ 2.4 เฮมิเซลลูโลสในพืชทั่วๆไปมีโครงสร้างหลักเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส ที่เชื่อมต่อกันด้วย 1,4-β-linkage โดยมี branch chain เป็นน้ำตาล pentose, hexose หรือ uronic acid

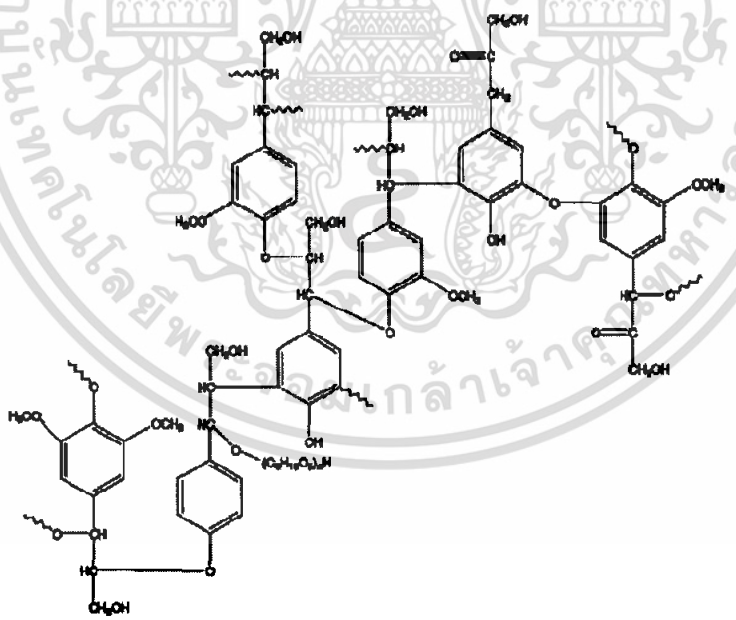
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส (Stenius, 2000)

3) ลิกนิน

ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบ aromatic ซึ่งหมู่ –OH group สามารถสร้างพันธะกับหมู่ aldehyde ได้เป็น hemiacetal และหมู่ ketone ได้เป็น ketals ดังรูปที่ 2.5 ซึ่งลิกนินนั้นมีความต้านทานต่อจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ไม่สามารถที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับ aromatic ring ของลิกนินได้ หรือถ้าเข้าทำปฏิกิริยาก็จะช้ามากเป็นเวลาหลายวัน ลิกนินพบในธรรมชาติโดยเป็นตัวยึดเกาะระหว่างเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน (ปรีชา, 2528)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การปรับสภาพวัตถุดิบ

เมื่อนำวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส มาใช้ในกระบวนการหมักจำเป็นต้องผ่านการปรับสภาพเสียก่อน การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) จึงเป็นการเตรียมวัตถุดิบก่อนที่จะเข้าสู่ขั้นตอนการย่อย โดยทำให้วัตถุดิบมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ปริมาณลิกนินลดลง ในการปรับสภาพมีหลายวิธีดังนี้ (พงศกร ลัลตรา และ สุวิดา, 2552)

2.3.1 วิธีทางกายภาพ

เป็นการปรับลดขนาดและลดส่วนที่เป็นโครงสร้างผลึก และทำลายโครงสร้างเซลล์ของวัตถุดิบ เพื่อให้ปฏิกิริยาเคมีหรือชีวเคมีในขั้นตอนการหมักไปเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถทำได้โดยการตัดหรือการบดให้ขนาดชิ้นวัตถุดิบมีขนาดเล็กลง หรือการใช้ความร้อน จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ หรือไอน้ำจับกับวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น

Martin Cerez และ Briones (1995) ศึกษาการปรับสภาพไม้สน โดยใช้ไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 200 และ 220 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆกัน พบว่าการปรับสภาพไม้สนโดยใช้ไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส และมีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 4.1 กรัมต่อลิตร และ 1.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.3.2 วิธีทางเคมี

ในการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี วิธีนี้จะละลายส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลลูโลสและเตรียมสู่ขั้นตอน acid hydrolysis หรือ enzymatic hydrolysis สารเคมีที่นิยมใช้มีดังนี้ คือ กรดซัลฟูริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์

Harun และคณะ (2011)ได้ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดผักตบชวาด้วยการต้มด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 5 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และอบไอน้ำด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ 121 องศาเซลเซียส ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที พบว่าต้มที่เวลา 30 นาที กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และอบไอน้ำด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ 121 องศาเซลเซียสสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากที่สุด ที่ 33.55 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 37.62 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

2.3.3 วิธีทางชีวภาพ

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ β-1, 4-glucosidic ภายใต้โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสในธรรมชาติให้เป็นสายยาวและได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส วัสดุเซลลูโลสตามธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดการสลายตัวจากการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งพบทั่วไปในจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากในเชื้อรา เอนไซม์เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนชนิดหนึ่ง ที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะ (specificity) ต่อซับสเตรทหนึ่งๆ เท่านั้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีความบริสุทธิ์สูง

Zhang และคณะ (2010) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดผักตบชวาด้วยการใช้ กรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ร่วมกับเชื้อรา กลุ่ม white rot (*Echinodontium taxodii*) หรือ เชื้อรากลุ่ม brown rot (*Antrodia* sp. 5898) โดยใส่เชื้อรากลุ่มต่างๆในผักตบชวา เป็นเวลา 10 วัน แล้วเติม กรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยแปรค่าที่อุณหภูมิ 25, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 60 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที การใช้เชื้อรากลุ่ม white rot ร่วมกับการปรับสภาพด้วยกรดอ่อนจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 36.6 มิลลิกรัมต่อกรัม สามารถผลิตน้ำตาลได้ดีกว่าการใช้กรดอ่อนอย่างเดียวที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 32.2 มิลลิกรัมต่อกรัม หรือ การใช้กรดอ่อนกับเชื้อรากลุ่ม brown rot ที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.9 มิลลิกรัมต่อกรัม

2.3.4 วิธีการร่วมทางกายภาพและเคมี

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

ในงานทดลองนี้ใช้การปรับสภาพร่วมกัน ระหว่างวิธีการทางกายภาพและวิธีการทางเคมี โดยการปั่นละเอียดนำไปอบแห้ง แล้วจึงต้มวัตถุดิบในสารละลายกรดเจือจางที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สลายลิกโนเซลลูโลสได้ ด้วยสารละลายสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆในการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์

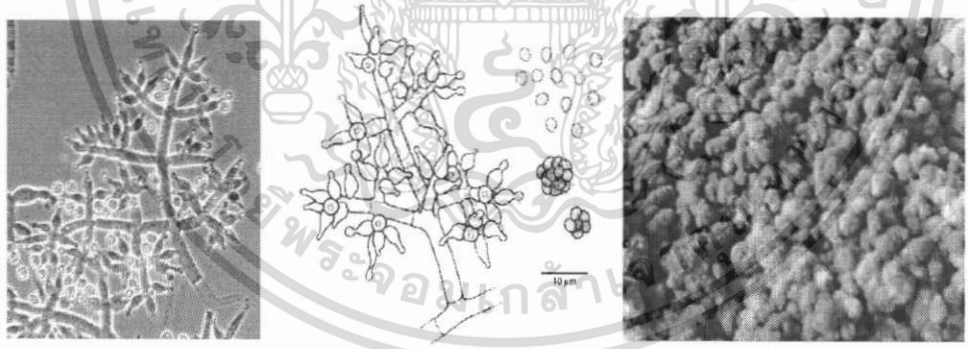
2.4 เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

2.4.1 ลักษณะทางกายภาพ

เชื้อ *Trichoderma harzianum* เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินและเศษซากอินทรีย์วัตถุธรรมชาติ และเจริญเติบโตได้ดีที่ 25 ถึง 32 องศาเซลเซียส เชื้อ *Trichoderma harzianum* มีรูปแบบการสร้างเส้นใยสีขาวได้รวดเร็วและส่วนที่ขยายพันธุ์ที่เรียกว่าสปอร์ ซึ่งเกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก รวมกันเป็นกลุ่มมีสีเขียว เชื้อราสามารถมีชีวิตรอดในธรรมชาติได้ดี ซึ่งอาศัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารจากอินทรียวัตถุ และเศษซากพืช การเจริญบนอาหารเริ่มแรกโคโลนีไม่มีสี (translucent) หรือสีขาวใส (watery white) เจริญแบบราบติดอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาโคโลนีจะมีลักษณะเป็นปุยฝ้าย (watery floccose) หรือเป็นกระจุกแน่น มีสีเขียว (green) หรือขาวล้วน (pure white) หรือเป็นลักษณะต่างๆในโคโลนีเดียว เส้นใย (mycelium) ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไม่มีผนังกั้นเซลล์แต่เป็นผนังเส้นใยเรียบมีการแตกกิ่งก้านมากมาย โดยทั่วไปบริเวณที่มีการสร้างสปอร์มีลักษณะเป็นวงรอบๆ (ring-like zone) หรือเกิดเดี่ยวๆ ไม่เป็นระเบียบบนเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อจากส่วนแกนกลางของก้าน conidiophores จะแตกกิ่งก้านด้านข้าง (side branch) จำนวนมาก มีขนาดสั้นๆซึ่งมีทั้งที่ออกมาเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่มจนถึงสามอัน และสร้างต่อไปเรื่อยๆ มีขนาดเล็กลง (small side branch) และทำมุมกว้างกับแกนกลาง ทำให้เห็นลักษณะการแตกกิ่งคล้ายลักษณะของต้นสน ที่ปลายกิ่งก้านแต่ละอันเป็นที่เกิดของ phialide ซึ่งมีรูปร่างแบบขวดชมพู่ หรือ พินโบว์ลิ่ง บางครั้งยาวรีอย่างลูกแพรจนถึงรูปไข่ โดยทั่วไปมีฐานแคบ บริเวณกลางๆ พองกว่า และด้านปลายค่อยๆแคบลงจนถึงปลายคอเป็นรูปกรวย (conical neck) หรือค่อนข้างเป็นรูปทรงกระบอก เกิดห่างสลับกันไปไม่เป็นระเบียบ หรือเกิดเป็นคู่อยู่ตรงข้ามกัน (เกรียงศักดิ์, 2546) ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ แลคเคส (laccase) ไซแลนเนส (xylanase) และไพโรซิเดส (peroxidase) เพื่อย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) (สุกาญจน์, 2554) จึงสามารถนำมาย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสในผักตบชวาให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้



รูปที่ 2.6 ลักษณะเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Yedidia Benhamou and Chet, 1999)

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลในการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ปัจจัยหลักที่เชื้อราต้องใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่

1) น้ำ (water) น้ำเป็นสิ่งจำเป็นในขบวนการของสิ่งมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อราตามจุดประสงค์ที่สำคัญ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. น้ำเป็นตัวกลางการกระจายและการแทรกซึมของเอนไซม์และการละลายอาหารต่างๆ ข้างนอกเชื้อราที่มีลักษณะเหมือนด้าย (hyphae) นอกจากนี้น้ำยังทำในผนังของสปอร์อ่อน และทำการเคลื่อนย้ายอาหารต่างๆเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

ข. น้ำเป็นตัวเข้าไปในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เอนไซม์ที่รวมกันกับน้ำแบ่งแยกในโมเลกุลของสารประกอบเกิดเป็นโมเลกุลใหม่ของสารประกอบ

น้ำหรือความชื้นที่เชื้อราในการเจริญเติบโตแยกเป็น

- ความชื้นในวัตถุดิบ เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีที่ ความชื้นร้อยละ 80-95
- ความชื้นในอากาศ ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต คือร้อยละ 60-70 ถ้าสูงหรือต่ำกว่านี้จะเจริญได้ไม่ดี

2) อุณหภูมิ (temperature) เป็นที่ทราบกันดีว่าอุณหภูมิจะมีผลต่ออัตราความเร็วของปฏิกิริยาทางเคมีของสิ่งมีชีวิต กล่าวว่าปฏิกิริยานี้จะมีความเร็วเป็น 2 เท่า ทุกๆอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่เพิ่มขึ้นภายในขอบเขตจำกัด สำหรับเชื้อราโดยทั่วไปอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญเติบโตจะอยู่ประมาณ 42 องศา-เซลเซียส อุณหภูมิปานกลางที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจะอยู่ระหว่าง 30 องศาเซลเซียส และเชื้อราจะหยุดการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ปรีชา, 2528) ซึ่งเชื้อ *Trichoderma harzianum* เจริญเติบโตได้ดีที่ 25 ถึง 32 องศาเซลเซียส

3) ออกซิเจน (oxygen) เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต ซึ่งพลังงาน (energy) ต่างๆที่เกิดขึ้นในขบวนการของเซลล์นั้นได้มาจากขบวนการหายใจ เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ซับซ้อน และจะสมบูรณ์เมื่อมีการใช้อาหารที่มีอยู่และปลดปล่อยพลังงานออกมา ซึ่งจะเกี่ยวกับการใช้ออกซิเจน การปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ สู่บรรยากาศการหายใจของเชื้อรา มี 2 แบบ คือ

1. Aerobic เป็นการหายใจที่ใช้ออกซิเจนที่บริสุทธิ์ ได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma* sp.
2. Anaerobic (fermentation) เป็นการหายใจที่ไม่ต้องใช้หรือขาดออกซิเจน

4) อาหาร (food) เชื้อรา *Trichoderma* sp. ต้องการอาหารเพื่อมาผลิตเป็นพลังงานใช้ในการเจริญเติบโต การกินอาหารของเชื้อราจะใช้เอนไซม์เข้าไปสลายโมเลกุลของอาหารให้แตกเป็นโมเลกุลเล็กๆ จากนั้นก็จะดูดซึมเข้าสู่เส้นใยของเชื้อรา อาหารที่เชื้อราต้องการ ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง น้ำตาล และแร่ธาตุอื่นๆ

นอกจากนี้ปัจจัยรองที่เชื้อราโดยทั่วไปใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่

1) ความเข้มข้นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Trichoderma harzianum* มีพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.5 เป็นกรดอ่อน ๆ ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่พืชปลูกส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีเช่นกัน

2) แสงสว่าง (light) แสงสว่างเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เชื้อราสร้างดอกเห็ด (fruiting bodies) แต่แสงสว่างไม่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตระยะแรกของเชื้อรา ส่วนแสง Ultraviolet (UV) จะเป็นพิษต่อเชื้อราส่วนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 กระบวนการผลิตเอทานอล

เอทานอล เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นของเหลวใสไม่มีสี ติดไฟง่าย มีกลิ่นเฉพาะตัว สำหรับสารละลายเจือจางจะมีรสหวาน แต่ถ้าสารละลายเข้มข้นจะมีรสขม เอทานอลผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และกระบวนการทางชีวเคมี โดยใช้พืชผลหรือวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งกระบวนการที่ได้รับความนิยมและมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายชนิดตามความเหมาะสมของแต่ละประเทศ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มัน-สำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล สาหร่าย ฯลฯ นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสสูง เช่น ฟางข้าว ขี้เลื่อย หญ้า เป็นต้น (สาวิตรี, 2549)

2.5.1 องค์ประกอบของเอทานอล

เอทานอลประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน เอทานอลมีขนาดมวลโมเลกุล 46.07 กรัมต่อโมลจัดเป็นโมเลกุลมีขั้วจึงสามารถละลายในน้ำได้ โดยเอทานอลหนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หนึ่งหมู่ ตารางที่ 2.3 แสดงคุณสมบัติของเอทานอล

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติของเอทานอล

สูตรโมเลกุล	C_2H_6O
มวลโมเลกุล	46.07 กรัมต่อโมล
ลักษณะทางกายภาพ	ของเหลวใสไม่มีสี
ความสามารถในการละลายน้ำ	ละลายน้ำได้อย่างดี
จุดหลอมเหลว	-114 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	78.5 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น	0.789 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ที่มา : วิโรจน์ (2553)

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นส่วนประกอบในการผลิตสินค้าได้หลายอย่างด้วยกัน ได้แก่ สินค้าที่ใช้รับประทานโดยตรงจำพวกเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ต่างๆ อุตสาหกรรมสี เครื่องสำอาง และใช้ในทางการแพทย์ เป็นต้น สำหรับการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทน ผสมในอัตราส่วนของแอนไฮดรัส (Anhydrous) 11-20 เปอร์เซ็นต์ได้เหมือนเชื้อเพลิงปกติ แต่สำหรับประเทศไทยพบว่าถ้าใช้แอนไฮดรัส (Anhydrous) ผสมน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนของแอนไฮดรัส 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้ แต่อัตราการสิ้นเปลืองเชื้อเพลิงจะสูงกว่าปกติ (วิโรจน์, 2553) และเอทานอลยังใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเบนซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Gasoline) แล้วยังทำหน้าที่เป็นสารเติมแต่งเพิ่มค่าออกเทนและสารป้องกันการน็อกให้แก่น้ำมันเบนซินได้ด้วย ซึ่งประโยชน์ที่ได้รับ ประกอบด้วย

- ช่วยทดแทนสารเพิ่มออกเทน MTBE ซึ่งจะช่วยประหยัดเงินตราต่างประเทศในการนำเข้า MTBE และน้ำมัน ได้ไม่น้อยกว่า 13,000 ล้านบาทต่อปี (คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2555)
- ลดปัญหามลพิษทางอากาศ และการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ จากการทดแทนสาร MTBE ที่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะ
- แก้ปัญหาผลผลิตทางการเกษตรล้นตลาด เช่น อ้อย มันสำปะหลัง หรือลดปัญหาของวัชพืชที่มีปริมาณมากเกินไป

2.5.2 การผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

ก. เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis)

เป็นการผลิตจากอนุพันธ์สารปิโตรเลียม เช่น เอทิลีนด้วยปฏิกิริยาการระเหยน้ำโดยเอทิลีนจะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์โดยใช้กรดซัลฟูริกตามด้วยน้ำ ดังสมการ 2.1

$$CH_2CH_2 + H_2SO_4 \text{ -----> } CH_3CH_2OSO_3H \text{------} H_2O \text{------> } CH_3CH_2OH \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2.1)$$

เอทิลีน กรดซัลฟูริก เอทานอล

ข. กระบวนการหมัก (fermentation process)

ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมทั่วโลกประมาณร้อยละ 93 ใช้กระบวนการหมัก (ชนิตพล, 2553) ซึ่งวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจะเป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภทดังนี้

(1) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล และ บีทน้ำตาล ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบ ประเภทนี้ได้โดยตรง และไม่ต้องผ่านกระบวนการใด

(2) วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวโพด มันสำปะหลัง และมันฝรั่ง ในการผลิตเอทานอลนั้น แป้งจะต้องถูกย่อย (starch hydrolysis) ให้ได้น้ำตาลกลูโคสเสียก่อน จึงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ ซึ่งการย่อยแป้งประกอบด้วยสองขั้นตอนคือ การย่อยครั้งแรกทำให้เป็นของเหลว (liquefaction) การย่อยครั้งสุดท้ายหรือการทำให้หวาน (saccharification)

(3) วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด เป็นต้น ในการผลิตเอทานอลนั้น เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส จะต้องถูกย่อยให้ได้เป็นน้ำตาลเสียก่อน จึงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้

สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากที่ย่อยวัตถุดิบที่มีเป็นน้ำตาลแล้ว จึงนำมาหมักกับเชื้อยีสต์ ซึ่งกระบวนการหมักประกอบด้วย 2 ขั้นตอนดังนี้คือ ขั้นตอนแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยกระบวนการ glycolysis ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังสมการ 2.2

$C_6H_{12}O_6$ + ยีสต์ ----------> $2CO_2$ + $2C_2H_5OH$ + 28.7 kcal ..... (2.2)

100 48.89 51.11

โดยตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 100 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล 48.89 และ 51.11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่นๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ของยีสต์ทำให้ได้เอทานอลประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (กรมวิชาการเกษตร, 2554)

กระบวนการหมักเอทานอลมีทั้งการใช้การหมักแบบแบตช์ (batch) คือการเติมครั้งเดียว การหมักแบบเติมวัตถุดิบมากกว่า 1 ครั้ง (fed-batch) และการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous)

(ก) การหมักแบบแบตช์ (batch fermentation) เป็นการหมักผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยเติมวัตถุดิบ สารอาหาร และหัวเชื้อลงในถังหมักเพียงครั้งเดียวตลอดกระบวนการ

(ข) การหมักแบบเติมวัตถุดิบมากกว่า 1 ครั้ง (fed-batch fermentation) เป็นการหมักผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยเติมวัตถุดิบ สารอาหารลงไปในถังหมักมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไป เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบและสารอาหารได้ในปริมาณสูง

(ค) การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นการหมักผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยเติมวัตถุดิบ สารอาหารลงไปในถังหมักและแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลา ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูง

ในปัจจุบัน กระบวนการหมักได้มีการพัฒนาไปอีกขั้นคือการหมักแบบ SSF (Simultaneous saccharification and fermentation) เป็นการรวมการไฮโดรไลซีสกับการหมักเข้าด้วยกัน เพื่อลดจำนวนถังปฏิกรณ์และปริมาณสารยับยั้งที่เกิด และลดความเข้มข้นกลูโคสลง เพื่อไม่ให้เกิดการยับยั้งการหมักโดยกลูโคส การลดระยะเวลาในการไฮโดรไลซีสทำให้ต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้นและได้น้ำตาลน้อยลง วิธีนี้จึงต้องหาจุดสมดุลระหว่างต้นทุนที่ลดลงจากการยุบรวมถังปฏิกรณ์และต้นทุนที่เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์ เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่างการย่อยเซลลูโลส (45 องศาเซลเซียส) สูงกว่าอุณหภูมิของการหมักเอทานอล (30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ SSF จึงอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส หรือประมาณกึ่งกลางของทั้งสองจุด (พุทธิพร, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

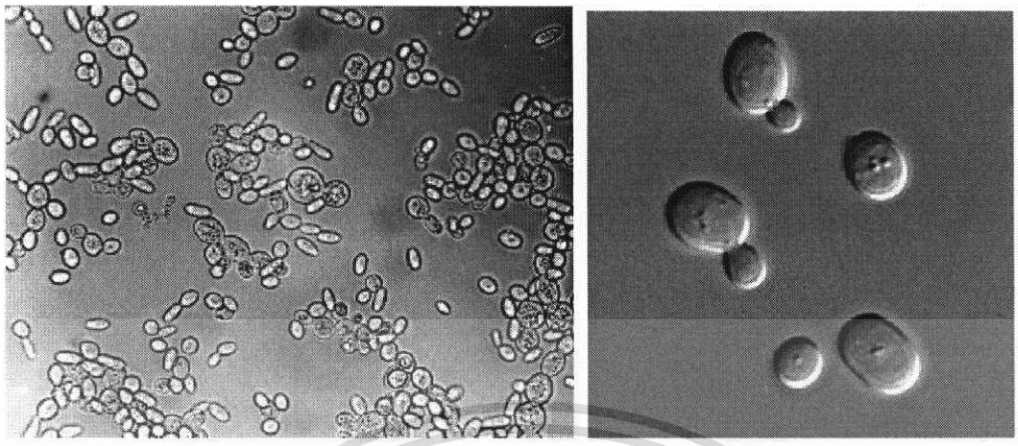
2.6 ยีสต์

ยีสต์ หมายถึง ราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดียวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่ายีสต์ต่างจากสาหร่ายเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และไม่เหมือนโพรโตซัวเพราะมีผนังเซลล์ที่แข็งแรง นอกจากนี้ยังแตกต่างไปจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ เพราะมีขนาดใหญ่กว่าและสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันด้วย โดยทั่วไปขนาดของเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าแบคทีเรีย แต่ยีสต์ที่มีขนาดเล็กที่สุดก็ยังไม่ใหญ่เท่าแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ ความกว้าง 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 3-5 ไมโครเมตร หรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์แต่ละชนิดจะมีรูปร่างโดยเฉพาะ แม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ก็ยังมีความแตกต่างกันที่ขนาดและรูปร่างของแต่ละเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีแฟคเจลลา (fragella) หรืออวัยวะในการเคลื่อนที่ ยีสต์สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0 ถึง 47 องศาเซลเซียส บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ก่อโรคเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรดระหว่างพีเอช 3.5-3.8 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่

2.6.1 ยีสต์ที่ใช้สำหรับการหมักเอทานอล

การคัดเลือกเชื้อยีสต์สำหรับการหมักแอลกอฮอล์ในอุตสาหกรรมขึ้นกับ ชนิดของวัตถุดิบการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลโดยทั่วไป มักจะเหมาะกับเชื้อยีสต์พวก *Saccharomyces* sp. เช่น *S. cerevisiae, S. ellipsoideus, S. uvarum* (*carlsbergensis*) นอกจากนั้นเชื้อ *Candida pseudotropicalis* สามารถหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลแลคโตสได้ เชื้อ *C.utillis* ใช้หมักน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ เนื่องจากเชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลเพนโตสได้ เชื้อ *Pachysolen tannophilus* และ *Pichia stiptis* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสในการหมักแอลกอฮอล์ (ปรียารัตน์, 2550) ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักน้ำตาลกลูโคส เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจนเป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมการหมัก คุณสมบัติที่ดีคือการเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถหมักน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโครส มอลโทส กาแลคโตส และราฟฟิโนส เชื้อที่หมักแอลกอฮอล์จะสังเกตได้ง่ายจากการเขย่าขวดจะเห็นฟองเกิดขึ้นมาก (Rose, 1977) *Saccharomyces cerevisiae* (ดังรูป 2.7) เป็นเชื้อตัวสำคัญที่ถูกพิจารณาเนื่องจากคุณสมบัติหลายอย่างดีกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Arroyo, 2009)

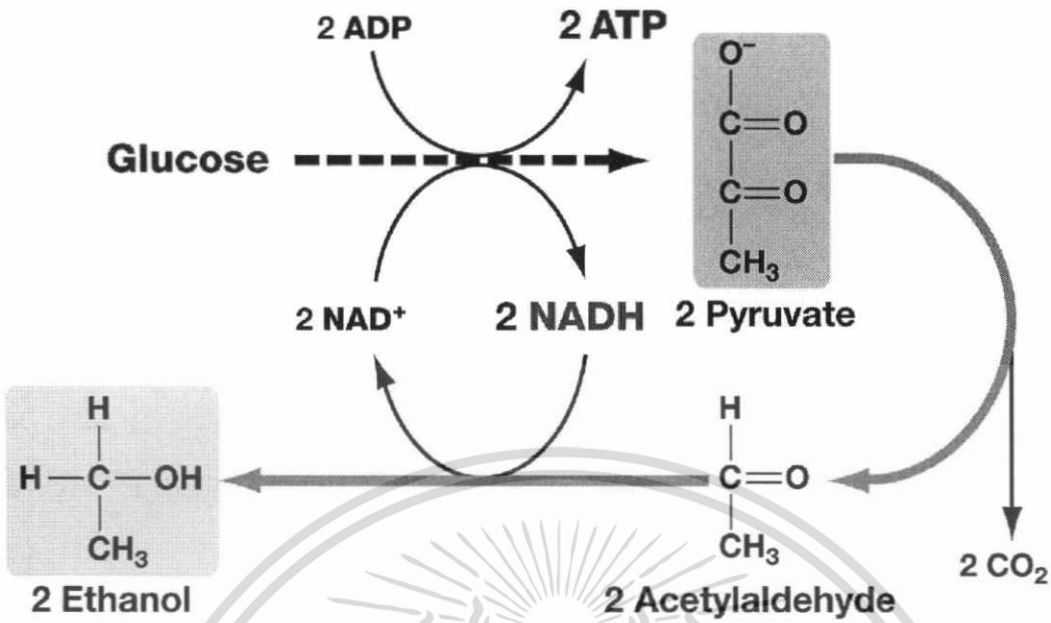
ก. ชีวเคมีของการหมักเอทานอล

การหมักเอทานอลของยีสต์เกิดโดยการที่น้ำตาลถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซีส หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway จนได้ไพรูเวท โดยถ้าเริ่มจากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล ให้ไพรูเวท 2 โมเลกุล ดังสมการ 2.3

$$\text{Glucose} + 2\,\text{ATP} + 2\text{NAD}^{+} \text{-------} > 2\,\text{pyruvate} + 4\,\text{ATP} + 2(\text{NADH}+\text{H}^{+}) \quad \text{.....(2.3)}$$

ต่อจากนั้นไพรูเวทเกิดการแยกเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออก (decarboxiration) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylase) เป็นตัวเร่งสร้างแอซีทาลดีไฮด์ ซึ่งเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยมีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากไม่มีตัวรับไฮโดรเจนจากภายนอก เช่น ออกซิเจน จึงต้องมีขั้นตอนการสร้างและการใช้ $NADH_2$ ในขณะที่เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสรีดิวซ์ แอซีทาลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอลจะเกิดการออกซิไดซ์ $NADH_2$ ที่ได้จากวิถี EMP ดังรูป 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ภาพแสดงการหมักโดยกระบวนการไกลโคไลซีส (สุนันทา, 2555)

2.6.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์

ปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล คือ เอทานอล ความเข้มข้นของซับสเตรท และสภาวะแวดล้อมหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ พีเอช ออกซิเจน และ คาร์บอนไดออกไซด์ โดยอุณหภูมิและระยะเวลาของการหมักมีผลต่ออัตราการเจริญของยีสต์ ปริมาณของยีสต์ สปีชีส์ต่างๆ มีผลต่อการหมัก อัตราการเจริญของยีสต์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจาก 30-35 องศาเซลเซียสการหมักที่อุณหภูมิต่างๆ มีผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมีของยีสต์ด้วย ในการหมักที่อุณหภูมิต่ำ จะมีการผลิตแอลกอฮอล์โมเลกุลสูงในปริมาณลดลง แต่จะมีการผลิตสารพวกเอสเทอร์ในปริมาณมากขึ้น ได้แก่ isoamyl acetate isobutyl acetate และ ethyl acetate เป็นต้น ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อัตราการเจริญของ *S. cerevisiae* จะลดลงเมื่อพีเอชลดลง จาก 3.5 เป็น 3.0 และยีสต์ชนิดอื่นๆ ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน

Salvado และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *S. cerevisiae, H. uraram, T. delbrueckii, C. Zemplinina, P. fermentans*, *K. marxianus* ที่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0-25 และที่อุณหภูมิ 4-40 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเอทานอลมีความเข้มข้นถึงร้อยละ 16 ยีสต์ในแต่ละสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับ *S. cerevisiae, H. uraram, T. delbrueckii, C. Zemplinina, P. fermentans*, *K. marxianus* เท่ากับ 31.42, 24.51, 27.08, 24.77, 25.51, 38.68 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

Harun และคณะ (2011) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดผักตบชวาด้วยการต้มด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 5 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และอบไอน้ำด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ 121 องศาเซลเซียส ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที พบว่าต้มที่เวลา 30 นาที กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 5 ด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และอบไอน้ำด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ 121 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากที่สุด ที่ 33.55 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 37.62 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

Zhang และคณะ (2010) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดผักตบชวาด้วยการใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 ร่วมกับ เชื้อรา กลุ่ม white rot (*Echinodontium taxodii*) หรือ เชื้อรากลุ่ม brown rot (*Antrodia* sp. 5898) โดยใส่เชื้อรากลุ่มต่างๆในผักตบชวา เป็นเวลา 10 วัน แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยแปรค่าที่อุณหภูมิ 25, 80, 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 15, 30, 60 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที การใช้เชื้อรากลุ่ม white rot ร่วมกับการปรับสภาพด้วยกรดอ่อนจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 36.6 มิลลิกรัมต่อกรัม สามารถผลิตน้ำตาลได้ดีกว่าการใช้กรดอ่อนอย่างเดียวที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 32.2 มิลลิกรัมต่อกรัม หรือ การใช้กรดอ่อนกับ เชื้อรากลุ่ม brown rot ที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.9 มิลลิกรัมต่อกรัม

Sukumaran (2009) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาโดยใช้ยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces serevisiae*) ที่ซื้อได้ตามร้านค้าทั่วไป นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต หลังจากนั้นจึงนำมา หมักที่ร้อยละ 5 โดยปริมาตรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 18 กรัมต่อลิตรที่ 84 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mishima และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยผักตบชวาและจอกโดยหมักแบบ Separated hydrolysis and fermentation (SHF) ในขั้นตอนไฮโดรไลซีสใช้เอนไซม์ร่วมกับโซเดียมฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และในขั้นตอนการหมักใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Escherichia coli* และแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ทำเหมือนกับแบบ SHF แต่ปรับอุณหภูมิเป็น 37 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้เท่ากับ 16.9 และ 16.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ *Escherichia coli* ได้กรดแอซีติกจากการหมักด้วย ส่วนการหมักแบบ SSF ใช้เวลาเพียง 36 ชั่วโมงในการหมักซึ่งน้อยกว่าแบบ SHF

Zhang และ Cai (2008) ได้ทำการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) ในรูปของ Filter-paper activity (FPA) โดยการย่อยสลายข้าวฟ่างด้วยเชื้อ *Trichoderma reesei* ZM4-F3 และทำการบำบัดเบื้องต้นโดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ NaOH ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าก่อนการบำบัดเบื้องต้นและหลังการบำบัดเบื้องต้นมีปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 54.83 เปอร์เซ็นต์ ลดปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลง 61.07 และ36.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 4.5 และค่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส 96 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) ในรูปของ Filter-paper activity (FPA) มีค่าเป็น 2.231 กรัมต่อลิตร และ 12.92 Unit/ml ตามลำดับ

Maria และ Josefa (2006) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อราที่ก่อโรคคือ *Rhizoctonia solani* และ *Verticillium dahlia* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) ภายใต้ปริมาณน้ำอิสระ (water activity) ที่ 0.85 ถึง 0.995 และอุณหภูมิที่ 15 ถึง 25 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อราทั้งสามเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มน้ำในอาหาร และเจริญเติบโตเร็วสุดที่ปริมาณน้ำอิสระในอาหารมีค่าเท่ากับ 0.995 และอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญคือเมื่ออุณหภูมิลดลงการเจริญก็ลดลงด้วย เชื้อรา *Trichoderma harzianum* เจริญเติบโตได้เร็วกว่า *Rhizoctonia solani* และ *Verticillium dahlia* ที่อุณหภูมิที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส และระดับของปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (water activity) ที่ 0.98 ถึง 0.995

Nigam (2002) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากผักตบชวา โดยหาองค์ประกอบของผักตบชวา พบว่าในผักตบชวามีสารประกอบของเซลลูโลส 18 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 48 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 3.5 เปอร์เซ็นต์ และในการหมักใช้ *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 และบำบัดเบื้องต้นโดยให้ความร้อนและใส่กรดซัลฟูริก หรือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ผักตบชวาที่ไม่ผ่านการบำบัดเบื้องต้นมีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอลน้อยกว่าผักตบชวาที่มีการบำบัดเบื้องต้น โดยเปอร์เซ็นต์น้ำตาลและเอทานอล ($Y_{p/s}$) ที่ไม่ผ่านการบำบัดผลิตได้ 20.15±0.17 เปอร์เซ็นต์ และ 0.19±0.003 $g_p\ g_s^{-1}$ ตามลำดับ กับเปอร์เซ็นต์น้ำตาลและเอทานอล ($Y_{p/s}$) ที่ผ่านการบำบัดผลิตได้ 76.0±0.32 เปอร์เซ็นต์และ 0.35 $g_p\ g_s^{-1}$ตามลำดับ

Sonia และ Naresh (1998) ได้ศึกษาประสิทธิภาพปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (water activity) ที่ระดับ 0.85 ถึง 0.995 และอุณหภูมิที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส ในเชื้อรา 13 ชนิด ได้แก่ *Trichoderma viride, Fusarium graminearum, Fusarium subglutinans, Fusarium proliferatum, Aspergillus niger, Aspergillus parasiticus, Aspergillus tamarii, Aspergillus glaucus, Eurotium chevalieri, Eurotium repens, Penicillium implicatum, Penicillium aurantiogriseum, Penicillium canescens* พบว่า *Aspergillus niger* สามารถเจริญได้ทุกระดับ *Fusarium* sp. สามารถเจริญได้เพียงที่ระดับ water activity 0.995 *Eurotium* sp. สามารถเจริญที่ระดับ water activity 0.85 ถึง 0.90 *Trichoderma viride* สามารถเจริญที่ระดับ water activity 0.95 ถึง 0.995 และ *Trichoderma viride* เจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสได้ดีกว่า 15 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

1) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น B-3100S บริษัท Sartorius, ประเทศไทย
2) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-254 บริษัท Denver Instrument Company, ประเทศเยอรมัน
3) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaker) รุ่น WNB-22 ยี่ห้อ Memmert, ประเทศเยอรมัน
4) เครื่องกรองลดความดัน รุ่น A-35 บริษัท Tokyorikakika, ประเทศญี่ปุ่น
5) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) รุ่น T60 ยี่ห้อ PG Instrument Limited, ประเทศเยอรมัน
6) เครื่องวัด pH (pH meter) รุ่น 827 ยี่ห้อ Metrohm, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
7) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น Tomy SS 325 บริษัท Hirayama Manufacturing Corperation HV-50, ประเทศญี่ปุ่น
8) ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow) รุ่น HS123 บริษัท International Scientific Supply HS123, ประเทศไทย
9) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Plus II บริษัท Gallenkamp, ประเทศอังกฤษ
10) เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (water activity meter) รุ่น Aqualab Series3 บริษัท จาร์พา เท็ค เซ็นเตอร์ จำกัด, ประเทศไทย
11) ตู้อบ (oven) รุ่น ISOTEMP บริษัท Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
12) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ GC/FID (flame ionization detector) บริษัท Agilent Technologies, ประเทศสหรัฐอเมริกา
13) ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer), ประเทศญี่ปุ่น
14) กล้องจุลทรรศน์ Olympus CH30 Scopes, ประเทศญี่ปุ่น
15) กระดาษกรอง 0.45 ไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

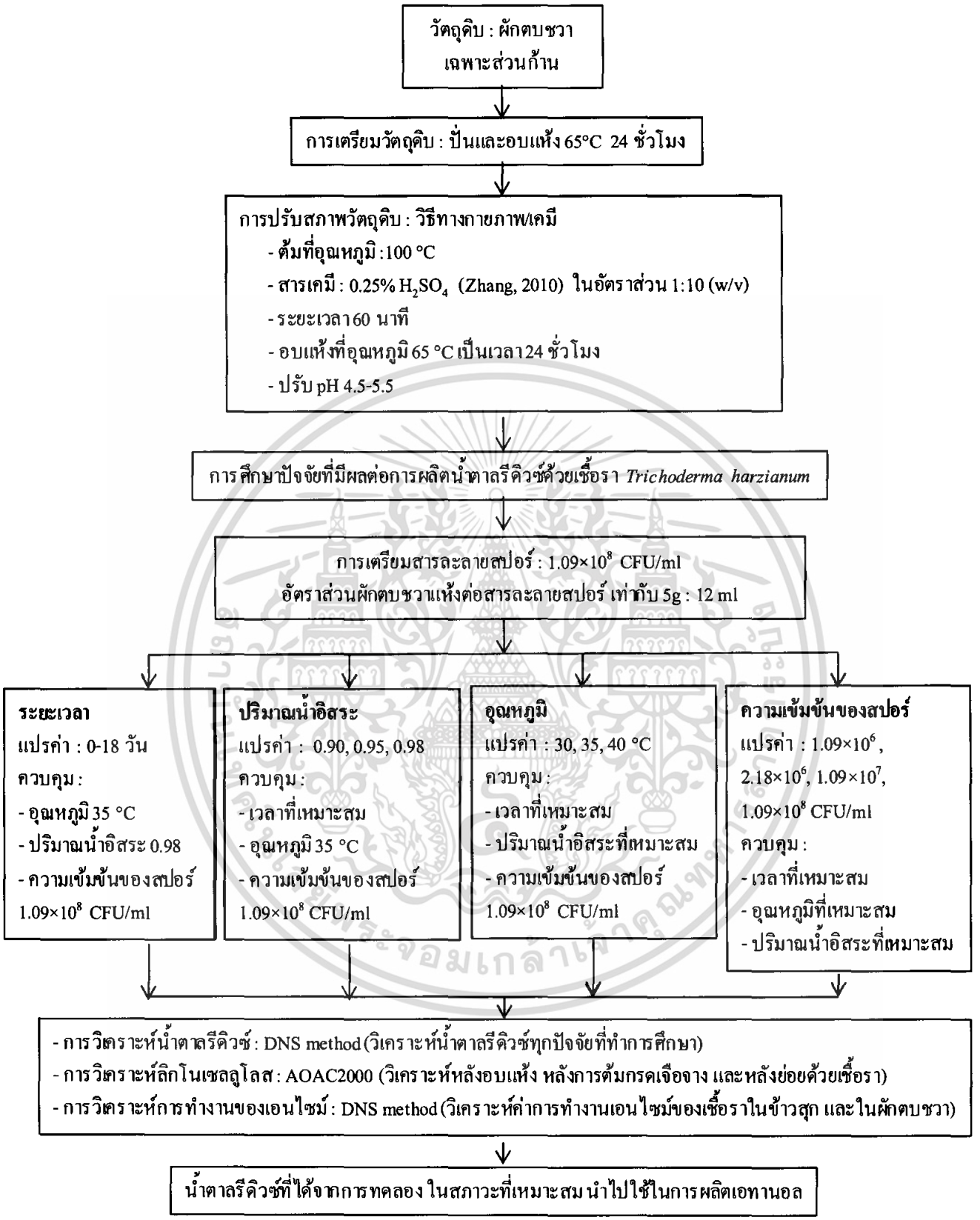
3.1.2 สารเคมี

1) โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
2) 3,5-ไดไนโตรซาลิกไซลิก เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
3) โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
4) โซเดียมไบคาร์บอเนต เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
5) โซเดียมคลอไรด์ เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
6) แอมโมเนียมคลอไรด์ เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
7) น้ำตาลกลูโคส เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
8) กรดไฮโดรคลอริก เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
9) กรดซัลฟูริก เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย
10) เอทานอล เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ CARLO ERBA บริษัท ITALMAR จำกัด, ประเทศไทย

3.2 การดำเนินงานวิจัย

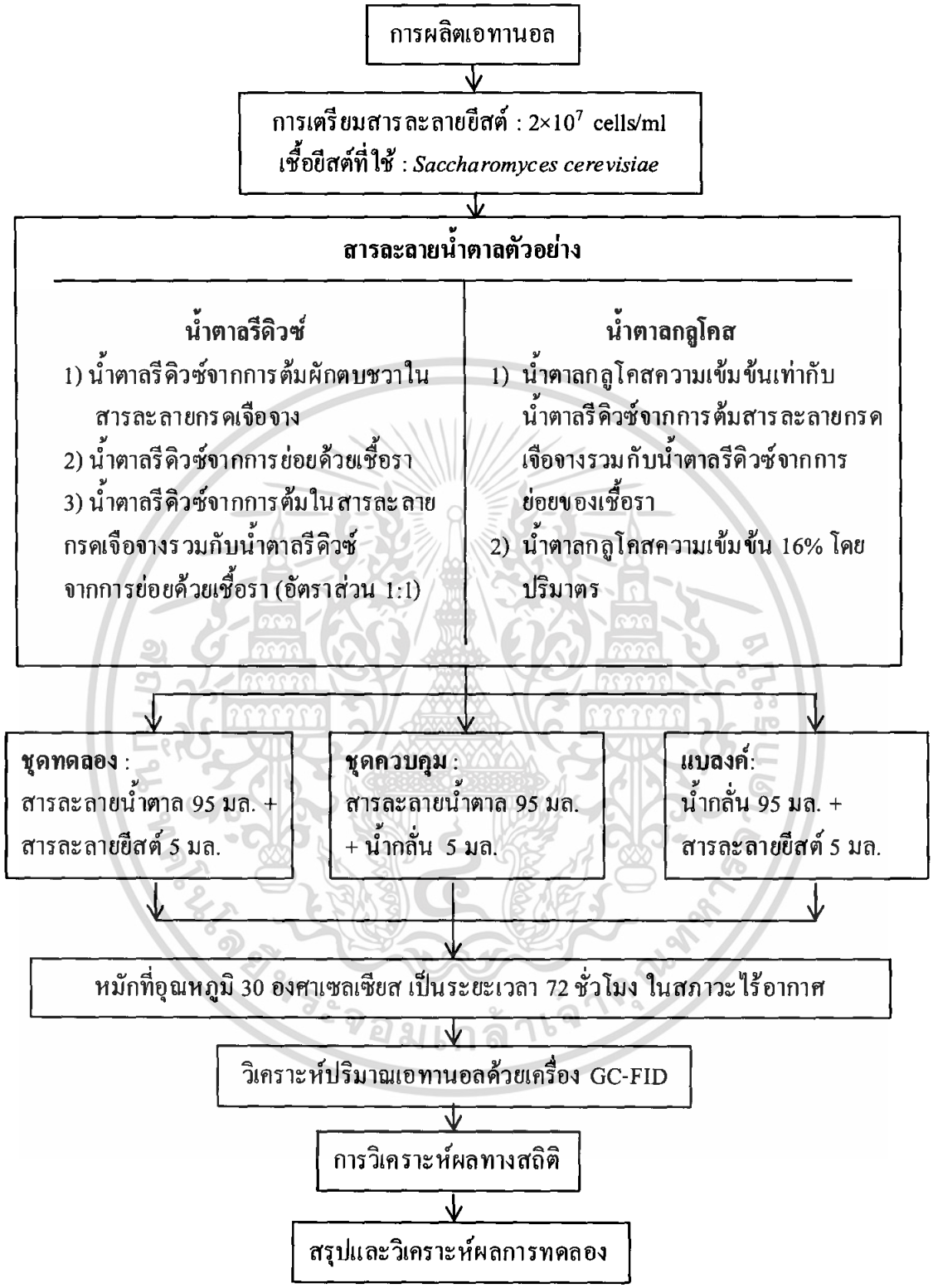
ในงานทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยทำการศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ดังขั้นตอนในรูปที่ 3.1 และทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ ดังขั้นตอนในรูป 3.2 ซึ่งรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานมีดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการศึกษาการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วัตถุดิบและการเตรียมตัวอย่าง

วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ผักตบชวาโดยการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

1) ล้างให้สะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนก้าน (ศักรินทร์, 2553) นำไปปั่นให้ละเอียด แบ่งใส่ถาด ถาดละ 300 กรัม จำนวน 3 ถาด ชั่งน้ำหนัก

2) นำแต่ละถาดมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก (Harun และคณะ, 2011)

3) บันทึกผลน้ำหนักของผักตบชวาก่อนและหลังอบแห้ง

3.4 การปรับสภาพวัตถุดิบทางกายภาพและทางเคมี

1) ผักตบชวาที่ผ่านการอบแห้ง จำนวน 200 กรัมต้มด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร (อัตราส่วนวัตถุดิบต่อสารละลายกรดเท่ากับ 1:10โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (Zhang และคณะ, 2010) ทิ้งไว้ให้เย็น

2) กรองสารละลายที่ได้จากการต้มผักตบชวาด้วยสารละลายกรดเจือจาง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ใช้ในการผลิตเอทานอล แบ่งสารละลายบางส่วนไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (รายละเอียดแสดงในภาคผนวกที่ ก-1)

3) กากผักตบชวาที่ได้จากการต้มด้วยสารละลายกรดไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) แบ่งส่วนกากของผักตบชวาบางส่วนไปวิเคราะห์ลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธี AOAC 2000 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวกที่ ก-2)

5) นำกากผักตบชวาไปปรับพีเอชด้วยกรดซัลฟูริกให้ได้ประมาณ 4.5-5.5 เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อไป

3.5 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

1) เชื้อราที่ใช้คือ *Trichoderma harzianum* ในรูปผงได้มาจาก บริษัท แอพพลายเค็ม (ประเทศไทย) จำกัด กรุงเทพมหานคร

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยในงานวิจัยนี้ใช้ข้าวสุกเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (รายละเอียดแสดงในภาคผนวกที่ ก-3) นำข้าวสุกปริมาณ 100 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

3) ใส่ผงเชื้อราลงในข้าวสุกปริมาณ 0.6 กรัมต่อขวด เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องที่มีอากาศถ่ายเท เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 200 มิลลิลิตร ลงในข้าวสุก เขย่าให้สปอร์ของเชื้อราหลุดออกจากข้าวสุก และกรองสารละลายสปอร์ที่ได้ไว้ แบ่งสารละลายสปอร์บางส่วนมาวัดจำนวนสปอร์ด้วยเครื่อง haemacytometer (รายละเอียดแสดงในภาคผนวกที่ ก-3)

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยเชื้อรา*Trichoderma harzianum*

3.6.1 ผลของระยะเวลา

1) เตรียมผักตบชวาที่ผ่านการปรับพีเอชแล้วในหัวข้อที่ 3.4 แบ่งใส่ขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาณ 5 กรัมจำนวน 33 ขวด นำไปปรับปริมาณน้ำอิสระที่ 0.98 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวกที่ ก-4)

2) เติมสารละลายสปอร์ที่ได้จากการเตรียมในหัวข้อ 3.5 ขวดละ 12 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยจุกสำลี

3) ใส่ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส

4) ทำการหมักเป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 14, 18 วัน

5) เมื่อครบกำหนดระยะเวลาที่ทำการศึกษา นำผักตบชวาที่ผ่านการหมักด้วย *Trichoderma harzianum* จำนวน 3 ขวดเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำมากรองด้วยเครื่องกรองลดความดัน

6) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายที่ได้ด้วยวิธี DNS

3.6.2 ผลของอุณหภูมิ

1) เตรียมผักตบชวาที่ผ่านการปรับพีเอชแล้วในหัวข้อที่ 3.4 แบ่งใส่ขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาณ 5 กรัม จำนวน 9 ขวด นำไปปรับปริมาณน้ำอิสระที่ 0.98 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวกที่ ก-4)

2) เติมสารละลายสปอร์ที่ได้จากการเตรียมในหัวข้อ 3.5 ขวดละ 12 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยจุกสำลี

3) ใส่ในตู้บ่มเชื้อแปรค่าอุณหภูมิที่ 30, 35, 40 องศาเซลเซียสอย่างละ 3 ขวด

4) หมักด้วยระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.6.1

5) เมื่อครบเวลา นำผักตบชวาที่ผ่านการหมักด้วย *Trichoderma harzianum* แต่ละขวดเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำมากรองด้วยเครื่องกรองลดความดัน

6) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายที่ได้ด้วยวิธี DNS

3.6.3 ผลของปริมาณน้ำอิสระ

1) เตรียมผักตบชวาที่ผ่านการปรับพีเอชแล้วในหัวข้อที่ 3.4 แบ่งใส่ขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาณ 5 กรัมจำนวน 9 ขวด นำไปปรับปริมาณน้ำอิสระโดยแปรที่ 0.90, 0.95, 0.98 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวกที่ ก-4) อย่างละ 3 ขวด

2) เติมสารละลายสปอร์ที่ได้จากการเตรียมในหัวข้อ 3.5 ขวดละ 12 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยจุกสำลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ใส่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 ตามลำดับ

4) เมื่อครบกำหนดเวลา นำผักตบชวาที่ผ่านการหมักด้วย *Trichoderma harzianum* แต่ละขวดเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำมากรองด้วยเครื่องกรองลดความดัน

5) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายที่ได้ด้วยวิธี DNS

3.6.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ของเชื้อรา

1) เตรียมผักตบชวาที่ผ่านการปรับพีเอชแล้วในหัวข้อที่ 3.4 แบ่งใส่ขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาณ 5 กรัม จำนวน 12 ขวด นำไปปรับปริมาณน้ำอิสระที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.6.3

2) เติมสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.09×10^{6}, 2.18×10^{6}, 1.09×10^{7}, 1.09×10^{8} CFU/ml ปริมาตร 12 มิลลิลิตร อย่างละ 3 ขวด ปิดฝาด้วยจุกสำลี บ่มที่อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองในหัวข้อ 3.6.1 และ 3.6.2

3) เมื่อครบกำหนดเวลา นำผักตบชวาที่ผ่านการหมักด้วย *Trichoderma harzianum* แต่ละขวดเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำมากรองด้วยเครื่องกรองลดความดัน

4) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด้วยวิธี DNS

3.7 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์

3.7.1 การเตรียมสารละลายยีสต์

1) เตรียมอาหารเลี้ยงยีสต์สำเร็จรูป Yeast malt extract (YM broth) ปริมาณ 2.1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ละลายด้วยไมโครเวฟ 1-2 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น

2) เติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ปริมาณ 0.6 กรัมต่อขวด ลงในอาหารที่เตรียมไว้ เลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 50 รอบต่อนาที (ลักขณาและคณะ, 2554)

3) แบ่งสารละลายยีสต์บางส่วนไปนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง haemacytometer

4) นำสารละลายยีสต์ที่เตรียมไว้ ใส่ในน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อเตรียมผลิตเอทานอลต่อไป

3.7.2 สารละลายน้ำตาลตัวอย่าง

ตัวอย่างสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอทานอล แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (5 ตัวอย่าง) ดังนี้

1. สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวามี 3 ตัวอย่าง ได้แก่
   1.1) น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มผักตบชวาในสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจาง
   1.2) น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3) น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มผักตบชวาในกรดซัลฟูริกเจือจางรวมกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในอัตราส่วน 1:1

2. สารละลายน้ำตาลกลูโคสมี 2 ตัวอย่าง ได้แก่

2.1) สารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการต้มผักตบชวาด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางรวมกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

2.2) สารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล

3.8 ขั้นตอนการผลิตเอทานอล

ในการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลมีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

1) ใส่ตัวอย่างสารละลายน้ำตาล จำนวน 95 มิลลิลิตรลงในขวดดูแรนขนาด 150 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 6 ขวด โดยแบ่งเป็น ชุดทดลอง 3 ขวด และชุดควบคุม 3 ขวด

2) เติมสารละลายยีสต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในชุดทดลอง ส่วนชุดควบคุมเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแทนสารละลายยีสต์

3) เตรียมแบลงค์จำนวน 3 ขวด โดยแต่ละขวดใช้น้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายยีสต์ 5 มิลลิลิตร

4) ปิดฝาขวด เพื่อให้อยู่ในสภาพไร้อากาศ ใส่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

5) วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC-FID (รายละเอียดแสดงในภาคผนวกที่ ก-5)

3.9 พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆโดยใช้เครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์

พารามิเตอร์	เครื่องมือ/วิธีการ	หมายเหตุ
น้ำตาลรีดิวซ์/ น้ำตาลกลูโคส	UV-VIS Spectrophotometer / DNS	ภาคผนวกที่ ก-1
ลิกโนเซลลูโลส	AOAC2000	ภาคผนวกที่ ก-2
เอทานอล	Gas chromatograph - FID	ภาคผนวกที่ ก-5
ค่าการทำงานเอนไซม์	UV-VIS Spectrophotometer / DNS	ภาคผนวกที่ ก-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ของผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยปรับสภาพร่วมกับทางกายภาพและทางเคมี และทำการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ เพื่อหาความสามารถและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ของผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล

4.1 ผลการปรับสภาพผักตบชวาโดยวิธีทางกายภาพร่วมกับเคมี

ผลการศึกษาการปรับสภาพของผักตบชวา โดยนำผักตบชวาสดที่ผ่านการปั่นละเอียดมาชั่งน้ำหนักปริมาตร 300 กรัม พบว่าหลังจากผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 65±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผักตบชวาสดที่ผ่านการอบแห้งมีน้ำหนักลดลงเหลือเพียง 33.52 กรัม เนื่องจากผักตบชวามีส่วนประกอบของน้ำอยู่ร้อยละ 95 และเมื่อนำผักตบชวาที่ผ่านการอบแห้งปริมาณ 200 กรัมมาต้มด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร ปริมาณ 2000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที พบว่าผักตบชวาที่ผ่านการต้มด้วยสารละลายกรดเจือจางมีสีซีดและนุ่มยุ่ยกว่าผักตบชวาที่ยังไม่ผ่านการต้มด้วยกรด ดังรูป 4.1

รูปที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของผักตบชวา (ก) ผักตบชวาสด (ข) ผักตบชวาอบแห้ง และ (ค) ผักตบชวาที่ผ่านการต้มด้วยกรดเจือจาง

จากการทดลองพบว่าปริมาณเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในผักตบชวาที่ผ่านการอบแห้งเมื่อต้มด้วยกรดเจือจางมีค่าลดลงจาก 24.14±0.25 เหลือเท่ากับ 19.90±0.32 และจาก 49.83±0.73 เหลือเท่ากับ 49.45±0.61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เนื่องจากการต้มผักตบชวาด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจาง กรดจะเข้าไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสกับพันธะ glycosidic linkage พร้อมทั้งเติมโมเลกุลของน้ำเข้าไปยังโมเลกุลของลิกโนเซลลูโลส ทำให้ผักตบชวามีความอ่อนนุ่มมากขึ้น ทั้งยังเข้าไปตัดโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส ทำให้โมเลกุลสายสั้นลงกลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ และ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการต้มด้วยสารละลายกรดเจือจางเท่ากับ 19.42±2.17 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้ง

4.2 การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum*

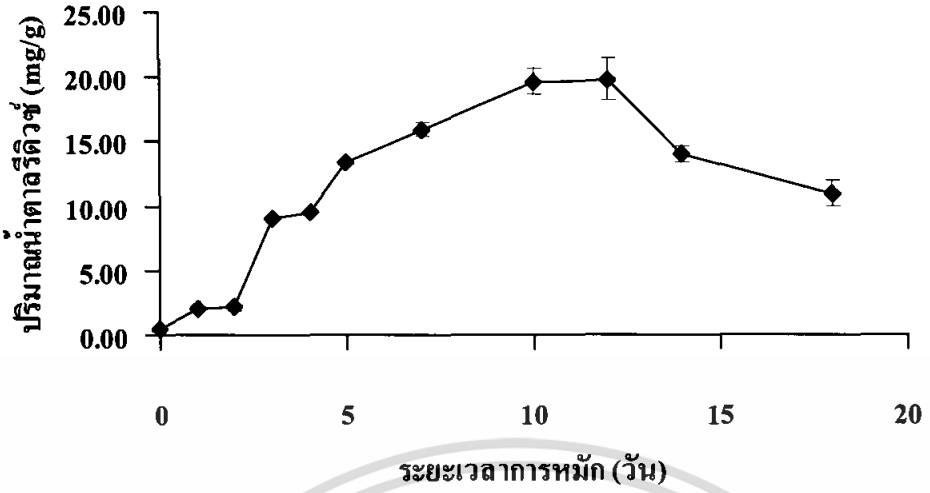
กากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางและผ่านการอบแห้งแล้วถูกนำมาปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 4.5-5.5 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อราเจริญได้ดี (สุกาญจน์, 2554) หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อความสามารถในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ดังต่อไปนี้

4.2.1 ผลของระยะเวลาต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

นำผักตบชวาที่ผ่านการปรับพีเอชเติมสารละลายสปอร์ในอัตราส่วนผักตบชวา 5 กรัมต่อสารละลายสปอร์ 12 มิลลิลิตร โดยควบคุมความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ 1.09×10^{8} CFU/ml ปริมาณน้ำอิสระที่ 0.98 และทำการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการแปรค่าระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 14 และ18 วัน จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.2 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข-1) พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา ที่ผลิตโดย *Trichoderma harzianum* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 12 วันแรก หลังจาก 12 วันปริมาณน้ำตาลที่ผลิตได้มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Beaulieu (2010) กล่าวว่าช่วง 12 วันแรกเชื้อราอยู่ในช่วงเพิ่มจำนวน DNA เพื่อให้สปอร์มีความเข้มข้นสูงขึ้น และในช่วง 12 วันแรกเชื้อรายังดูดซึมสารอาหารในปริมาณน้อย หลังจาก 12 วัน เชื้อรามีการสร้างสปอร์น้อยลง เชื้อราเริ่มดูดสารอาหารเพิ่มมากขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงสันนิษฐานได้ว่าในช่วง 12 วันแรกที่เชื้อราทำการเพิ่มจำนวน DNA และดูดซึมสารอาหารน้อย ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณมาก แต่หลังจาก 12 วัน เมื่อเชื้อราทำการดูดซึมสารอาหารมากขึ้น ปริมาณน้ำตาลจึงลดลง

ผลการทดลองพบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 12 วัน สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากสุด เท่ากับ 19.78±1.57 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้ง แต่เนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกับน้ำตาลที่ผลิตได้จากการหมัก 10 วัน ซึ่งมีค่าน้ำตาลเท่ากับ 19.59±1.02 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้ง จึงเลือก 10 วันเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



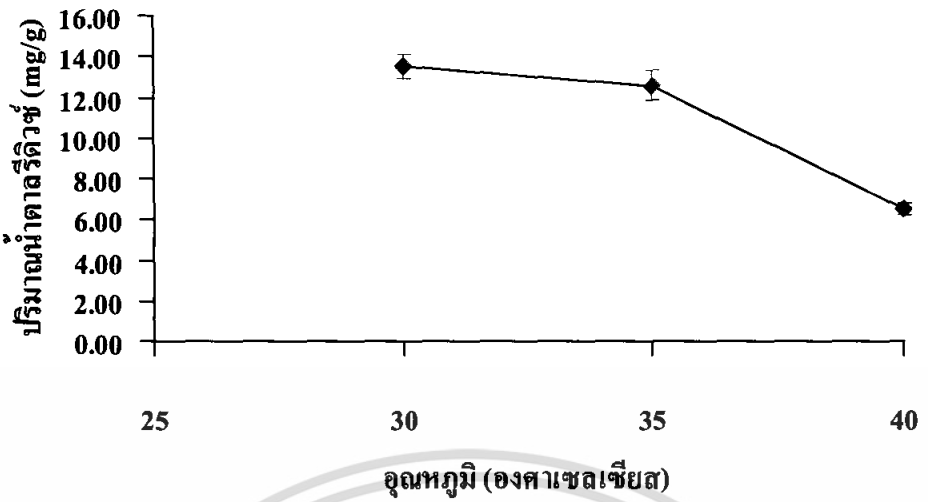
รูปที่ 4.2 ผลของระยะเวลาต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

นำผักตบชวาที่ผ่านการปรับพีเอชแล้ว เติมสารละลายสปอร์ในอัตราส่วนผักตบชวา 5 กรัม ต่อสารละลายสปอร์ 12 มิลลิลิตร ควบคุมปริมาณความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ 1.09×10^{8} CFU/ml ระยะเวลาการหมัก 10 วัน และ ปริมาณน้ำอิสระที่ 0.98 แปรค่าอุณหภูมิการหมักที่ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลง ดังแสดงในรูป 4.3 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข-2) จากงานวิจัย Mohamed (2006) กล่าวว่าการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีค่าคงที่จนถึงอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และการทำงานของเอนไซม์ค่อยๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงสันนิษฐานได้ว่า เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น มีแนวโน้มลดลงเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ลดลง และผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของสุกาญจน์ (2554) ที่พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของกระบวนการสร้างเซลล์ในเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่อุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส เชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดี และเจริญได้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิเริ่มสูงขึ้น

จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากสุดเท่ากับ 13.50±0.57 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้งจึงเลือกใช้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



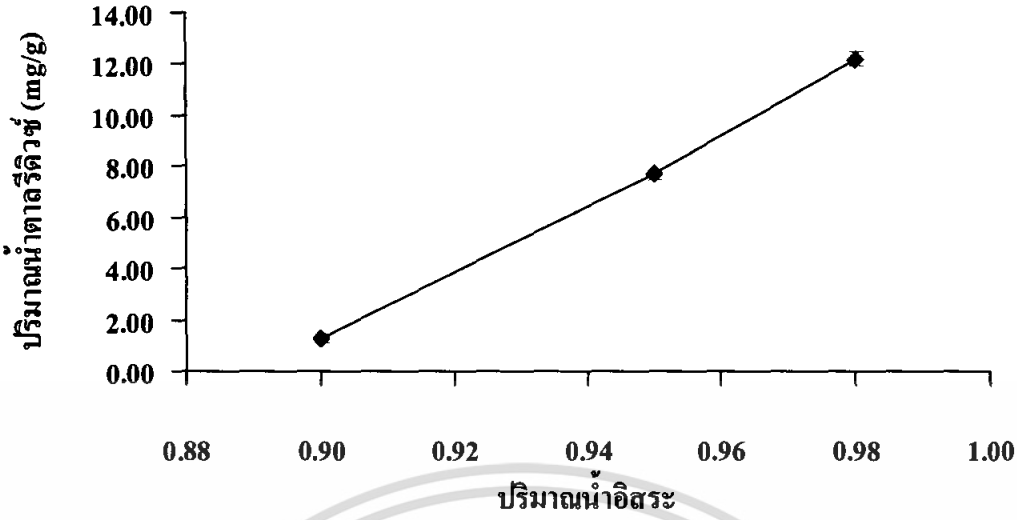
รูปที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

4.2.3 ผลของปริมาณน้ำอิสระต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

นำผักตบชวาที่ผ่านการปรับพีเอชแล้ว เติมสารละลายสปอร์ในอัตราส่วนผักตบชวา 5 กรัม ต่อสารละลายสปอร์ 12 มิลลิลิตร ควบคุมปริมาณความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ 1.09×10^{8} CFU/ml ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 วัน แปรค่าปริมาณน้ำอิสระที่ 0.90, 0.95, 0.98 จากการทดลองพบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำอิสระในผักตบชวาส่งผลให้การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.4 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข-3) จากงานวิจัยของ Maria และ Josefa (2006) กล่าวว่า การเพิ่มปริมาณน้ำอิสระ ส่งผลต่อการสร้างเซลล์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ยิ่งปริมาณน้ำอิสระมากขึ้น การสร้างเซลล์ก็เพิ่มมากขึ้น และเจริญได้สูงสุดที่ค่าน้ำอิสระที่ 0.995 และจากงานวิจัยของ Beaulieu (2010) ที่กล่าวว่าเชื้อราทำการสร้างสปอร์ในช่วง 12 วันแรก และยังดูดซึมสารอาหารได้น้อย ดังนั้นในงานวิจัยจึงสันนิษฐานได้ว่าในระยะเวลา 10 วันเมื่อปริมาณน้ำอิสระสูงขึ้น การสร้างเซลล์มากขึ้น จึงสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากขึ้น

ผลการทดลองพบว่าค่าปริมาณน้ำอิสระที่ใช้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดคือ 0.98 ซึ่งผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 12.20±.027 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้ง จึงเลือกใช้ค่าน้ำอิสระที่ 0.98 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



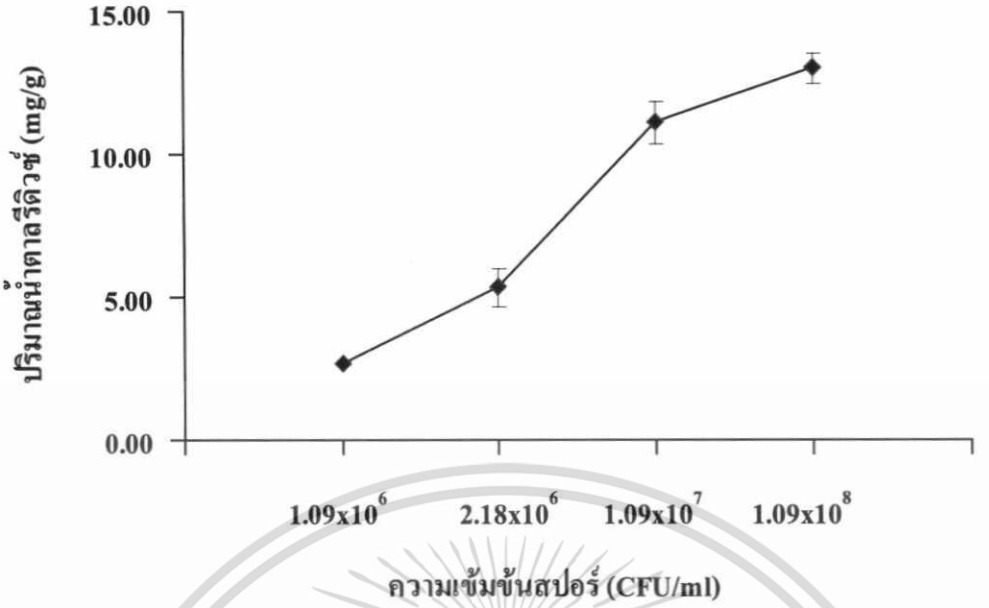
รูปที่ 4.4 ผลของปริมาณน้ำอิสระต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

4.2.4 ผลของค่าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

นำผักตบชวาที่ผ่านการปรับพีเอชแล้ว เติมสารละลายสปอร์ในอัตราส่วนผักตบชวา 5 กรัม ต่อสารละลายสปอร์ 12 มิลลิลิตร โดยแปรค่าความเข้มข้นของสปอร์เป็น 1.09×10^{6}, 2.18×10^{6}, 1.09×10^{7}, 1.09×10^{8} CFU/ml ทำการควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำอิสระที่ 0.98 ระยะเวลาการหมัก 10 วัน จากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าสูงขึ้น ดังรูป 4.5 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข-4) ทั้งนี้เมื่อเชื้อรามีความเข้มข้นสูง และยังดูดซึมสารอาหารได้น้อย (Beauleiu, 2010) ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้สูงขึ้น

จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ 1.09×10^{8} CFU/ml เป็นความเข้มข้นที่ให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 12.99±0.55 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้ง

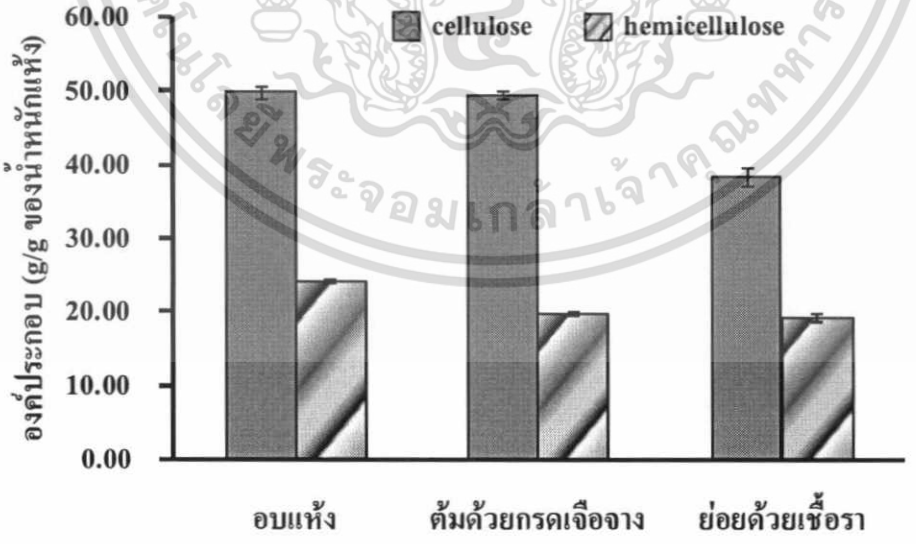
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และค่าการทำงานของเอนไซม์

การวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสในผักตบชวาที่ผ่านการอบแห้ง ผักตบชวาที่ผ่านการต้มด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง และผักตบชวาที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ได้ผลดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ที่ได้จากผักตบชวาในสภาวะต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูป 4.6 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข-5) พบว่าปริมาณลิกโนเซลลูโลสมีค่าลดลงเมื่อผ่านการต้มด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางเนื่องจากกรดซัลฟูริกเข้าไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสกับลิกโนเซลลูโลสโดยตัดพันธะ glycosidic linkage พร้อมทั้งเติมโมเลกุลของน้ำลงไปตรงส่วนที่โดยตัด ทำให้โมเลกุลของสารมีขนาดเล็กลง โดยปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่ผ่านการอบแห้งและการต้มกรดเจือจางมีค่าเท่ากับ 24.14±0.25 และ 19.90±0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเซลลูโลสที่ผ่านการอบแห้งและการต้มกรดเจือจางมีค่าเท่ากับ 49.83±0.73 และ 49.45±0.61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และผักตบชวาที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* แล้วมีปริมาณลิกโนเซลลูโลสลดลง เนื่องจากในเชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนส และไพโรซิเดส ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยเซลลูโลสได้ เอนไซม์ไซแลนเนส และไพโรซิเดส สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ จึงเป็นสาเหตุให้ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีปริมาณลดลง โดยปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรามีค่าเท่ากับ 19.18±0.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรามีค่าเท่ากับ 38.51±1.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

การวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นการวิเคราะห์ปริมาณการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อราที่เลี้ยงในข้าวสุก ขณะเตรียมสารละลายสปอร์ เปรียบเทียบกับค่าการทำงานของเอนไซม์ในขณะที่ทำการหมักผักตบชวาอบแห้งด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าการทำงานของเอนไซม์ในสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในวัสดุหมักชนิดต่างๆ

ชนิดเอนไซม์	ค่าการทำงานของเอนไซม์ (unit per ml)	
	ข้าวสุก	ผักตบชวา
อะไมเลส	0.327	0.173
เซลลูเลส	0.164	0.330
ไซแลนเนส	0.157	0.298

จากตารางที่ 4.1 พบว่าสำหรับเอนไซม์ของเชื้อราที่ทำการเลี้ยงในข้าวสุก เชื้อรามีค่าการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส มากกว่าเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนส เนื่องจากในข้าวสุกมีส่วนประกอบของแป้ง จึงทำให้ค่าการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสมากกว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่น เพื่อนำมาจับกับซับสเตรทที่เป็นอะไมโลสในแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่เมื่อเติมสารละลายสปอร์ที่เตรียมจากข้าวสุกลงในผักตบชวาพบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสมีค่าลดลง ในขณะที่ค่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสมีค่ามากขึ้น เนื่องจากซับสเตรทในผักตบชวาส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เชื้อราจึงมีการปรับตัวสำหรับสร้างเอนไซม์ในการจับกับซับสเตรทที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสในผักตบชวามากขึ้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอื่นๆ

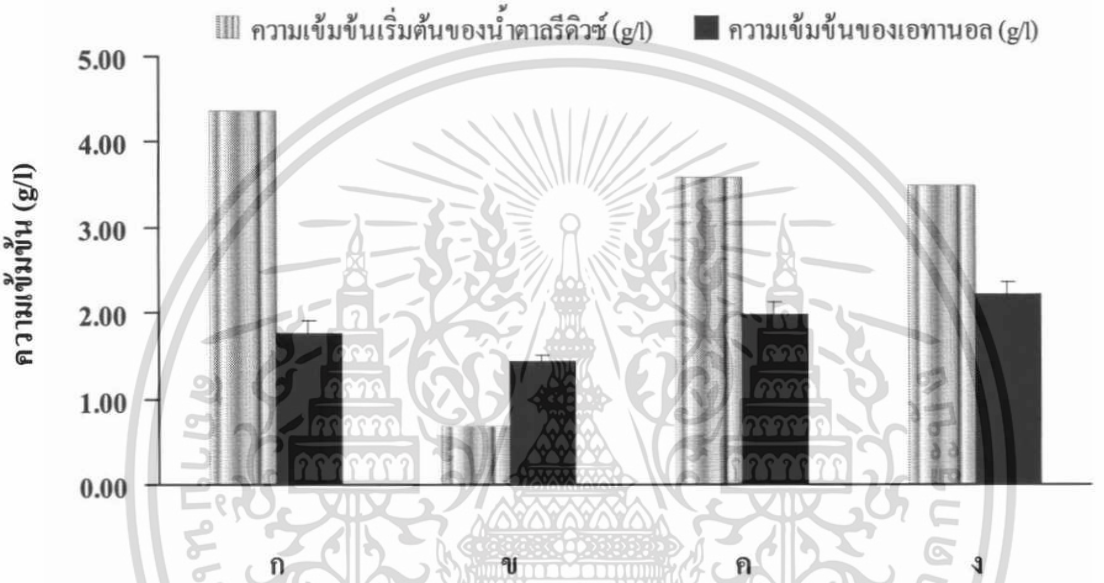
4.4 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ในการศึกษาการผลิตเอทานอล ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการต้มด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางรวมกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นสารตั้งต้น ดังแสดงในรูป 4.7 (ก-ค) เปรียบเทียบกับเอทานอลที่ผลิตได้จากสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม และสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้ในอุตสาหกรรมคือร้อยละ 16 โดยปริมาตรดังรูป 4.7 (ง-จ) โดยทำการหมักน้ำตาลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และวัดเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ดีเทคเตอร์ FID (Flame ionization detector) ผลการทดลองแสดงในรูป 4.8

รูปที่ 4.7 ลักษณะของสารละลายน้ำตาลตัวอย่างที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (ก) น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการต้มในกรดเจือจาง (ข) น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (ค) น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการผสมของน้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มในกรดเจือจางและการย่อยด้วยเชื้อรา (ง) น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการผสมของน้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มในกรดเจือจางและการย่อยด้วยเชื้อรา (จ) น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

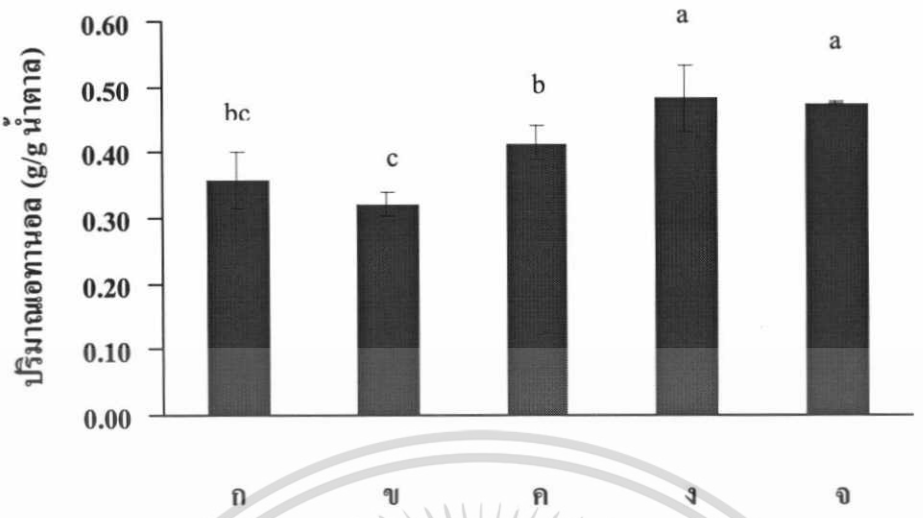
ผลการทดลองจากรูปที่ 4.8 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข-6) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากผักตบชวาที่ผ่านการต้มในกรดเจือจาง (ก) เอทานอลที่เกิดจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยเชื้อรา (ข) เอทานอลที่ได้จากน้ำตาลรีดิวซ์ผสม (ค) และเอทานอลที่ได้จากสารละลายกลูโคส (ง) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นพบว่าความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นเท่ากับ 1.76±0.18, 1.45±0.05, 1.99±0.12 และ 2.21±0.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา (ก) น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มด้วยกรดเจือจาง (ข) น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยเชื้อรา (ค) น้ำตาลรีดิวซ์ผสม (ง) น้ำตาลกลูโคสเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัมของน้ำตาลที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ดังรูปที่ 4.9 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข-6) พบว่าสารละลายกลูโคสให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ เท่ากับ 0.483±0.049 และ 0.475±0.001 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลคิดเป็นร้อยละ 48.26 และ 47.51 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากน้ำตาลกลูโคสตามทฤษฎีซึ่งมีค่าร้อยละ 51 พบว่าปริมาณเอทานอลที่เกิดจากสารละลายกลูโคสจากการทดลอง (ง, จ) ให้ค่าต่ำกว่าเล็กน้อย เนื่องจากเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่นๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ให้กับยีสต์ (สาวิตรี, 2549) จึงให้ปริมาณเอทานอลได้ต่ำกว่าทางทฤษฎี และเมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ได้จากน้ำตาล-รีดิวซ์ (ก, ข, ค) พบว่าเอทานอลที่ได้มีค่าน้อยกว่าเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลกลูโคส (ง, จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงปริมาณของเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา (ก) น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มด้วยกรดเจือจาง (ข) น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยเชื้อรา (ค) น้ำตาลรีดิวซ์ผสม (ง) น้ำตาลกลูโคสเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม (จ) น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยปริมาตร

ในกลุ่มของเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการต้มด้วยกรดเจือจาง (รูปที่ 4.9 ก) และน้ำตาลรีดิวซ์ผสม (รูปที่ 4.9 ค) ให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.358±0.043 และ 0.414±0.026 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ คิดเป็นร้อยละ 35.80 และ 41.40 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อรา (รูปที่ 4.9 ข) มีปริมาณเอทานอลแตกต่างกันกับน้ำตาลรีดิวซ์ตัวอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.321±0.018 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ คิดเป็นร้อยละ 32.10 เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่นำมาใช้ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงอาจทำให้น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยเชื้อราสูญเสียไปกับการสร้างเซลล์ให้กับทั้งยีสต์และเชื้อรา จึงทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ตัวอื่น และเมื่อเทียบเอทานอลที่ผลิตได้จากน้ำตาลรีดิวซ์ผสม (รูปที่ 4.9 ค) กับน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 4.9 ง, จ) พบว่าปริมาณเอทานอลที่เกิดจากน้ำตาลรีดิวซ์มีน้อยกว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลกลูโคส อาจเป็นเพราะยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ใช้น้ำตาลในน้ำตาลรีดิวซ์ได้แค่บางตัว เช่น แมนโนส กาแลกโตส อะราบิโนส เป็นต้น แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสซึ่งมีปริมาณมากสุดในน้ำตาลรีดิวซ์ได้ (นิธิยา, 2555) จึงทำให้ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นมีน้อยกว่าปริมาณเอทานอลที่เกิดจากสารละลายกลูโคส

ดังนั้นในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ให้มีปริมาณมากที่สุด ควรทำการปรับสภาพทางกายภาพและเคมี ร่วมกับการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* แล้วจึงนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ทั้งหมดมาผลิตเอทานอลต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved
ห้ามคัดลอก ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมีโดยการต้มผักตบชวาด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 ในอัตราส่วนผักตบชวา 200 กรัมต่อสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจาง 2,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที พบว่า สามารถผลิตน้ำตาล-รีดิวซ์ได้เท่ากับ 19.42±2.17 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้ง

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ได้แก่ ระยะเวลาในการย่อย 10 วัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำอิสระที่ 0.98 และความเข้มข้นของสารละลายสปอร์เท่ากับ 1.09×10^{8} CFU/ml ในอัตราส่วนผักตบชวา 5 กรัมต่อสารละลายสปอร์ 12 มิลลิลิตร สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 12.99±0.55 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวาแห้ง

3. การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ผสมที่ได้จากการผสมของน้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มในกรดเจือจางและการย่อยด้วยเชื้อรา สามารถผลิตเอทานอลได้ 0.414±0.026 กรัมเอทานอลต่อกรัมผักตบชวาแห้งคิดเป็นร้อยละ41.40 ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้ดีกว่าน้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มด้วยกรดเจือจางและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อราเพียงอย่างเดียวที่ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.358±0.043 และ 0.321±0.018 กรัมเอทานอลต่อกรัมผักตบชวาแห้ง และคิดเป็นร้อยละ 35.80 และ 32.10 ตามลำดับ

4. การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ให้มีปริมาณมากที่สุด ควรใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี ร่วมกับการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อความสามารถในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

2. ควรศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพลังงาน. 2545. **พลังงานทดแทนเอทานอล และไบโอดีเซล.** กรุงเทพ : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน.

กระทรวงพลังงาน. 2554. **พลังงานทดแทน.** กรุงเทพ : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน.

กรมชลประทาน. 2550. **ชีววิทยาของผักตบชวา.** [Online] : Available. http://www.wikipedia.org/wiki/ผักตบชวา. (วันที่สืบค้น 15 พฤษภาคม 2555)

กรมวิชาการเกษตร. 2554. **พลังงานทดแทนจากมันสำปะหลัง**. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกรียงศักดิ์ แสงศรีดำ. 2546. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ร่วมกับเชื้อรา *Gliocladium* sp. เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2555. **พลังงานทดแทน เอทานอล และ ไบโอดีเซล.** [Online] : Available. http://www1.mod.go.th/opsd/dedweb/energy . (วันที่สืบค้น 15 พฤษภาคม 2555)

ชนิตพล . 2553. **เอทานอลพลังงานของประเทศไทย**. [Online]: Available. http://www.vcharkan.com/เอทานอลพลังงานในประเทศไทย. (วันที่สืบค้น 15 พฤษภาคม 2555)

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2555. **เฮมิเซลลูโลส** . [Online] : Available.http://www.foodnetworksolution.com /vocab/word/3154/Hemicellulose. (วันที่สืบค้น 10 กันยายน 2555)

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปรีชา เกียรติกระจาย. 2528. **เคมีของเนื้อไม้**. [Online] : Available. http://www.buranapagroup.com (วันที่สืบค้น 15 พฤษภาคม 2555)

ปรียารัตน์ โยวะผุย. 2550. กระบวนการควบคู่การแปรรูปเป็นน้ำตาลและการหมักของวัสดุเหลือใช้จากโรงงานแป้งมันสำปะหลังเพื่อการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ผสม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

พงศกร ไชยบุญมา ลัลตรา กิจพิทยาฤทธิ์ และ สุวิดา ศิวะพิรุฬห์เทพ. 2552. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ จากรำหยาบโดยเชื้อรา ไตรโครเดอร์มา เพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พุทธิพร ศรวรเวทย์. 2552. การพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวาและวัสดุเหลือทิ้งมันสำปะหลังโดยกระบวนการหมักโดยอะไมโลไลติกยีสต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยสนันท์ พรหมโชติกุล อรุณี วีณิน และธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. 2548. ความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ และสัตว์ป่า. **รายงานการประชุมความก้าวหน้าของผลงานวิจัย และกิจกรรมปี 2548**. กรุงเทพ

ลักขณา เหล่าไพบูลย์ กุลเชษฐ์ เพียรทอง วรวุฒิ ศรีดี ประสิทธิ ใจศิล มัลลิกา บุญมี และ พัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2554. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในระดับขยายขนาด. วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิโรจน์ พุทธวิถี. 2553. รู้จักเอทานอล. [Online] : Available. http://water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37 (วันที่สืบค้น 9 กรกฎาคม 2555)

ศักรินทร์ บุญล้ำ. 2553. การผลิต 5'-ไรโบนิวคลีโอไทด์จากน้ำสกัดใบผักตบชวาโดยเชื้อเห็ดชนิดต่าง ๆ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. กรุงเทพ : ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์. 2554. การใช้เชื้อราปฏิปักษ์เพื่อปรับปรุงคุณภาพกล้าไม้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

สุนันทา ภิญญาวัธน์. 2555. **ชีวเคมี**. [Online] : Available. http://th.wikipedia.org/wiki/glycolysis. (วันที่สืบค้น 15 พฤษภาคม 2555)

สุรชัย มัณฉาชีพ. 2538. **วัชพืชในประเทศไทย.** กรุงเทพ: แพร่พิทยา.

Arroyo, F., Orlic S, Querol A, and Barrio E. 2009. **Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of Saccharomyces cerevisiae, S. kudriavzevii and theirinterspecifichybrid.** [Online] Available. http://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae (วันที่สืบค้น 15 พฤษภาคม 2555)

Beaulieu R, Mondéjar R, Tittarelli F, Margarita R , Pascual J.2010. qRT-PCR quantification of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Bioresource Technology** 102 :2793–2798

Harun M.Y., Dayang A.B., Zainal Z., amd Yunus R. 2011. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Bioresource Technology** 102 :5193–5199.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Maria P.S. and Josefa R. 2006. Influence of temperature and water on the antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Verticillium* and *Rhizoctonia*. **Crop Protection**. 25:1130–1134.

Martin R., Cerez P., and Briones R.1995. Simultaneous production of ethanol and Kraft pulp from pine (*pinus radiate*) using steam explosion. **Bioresource Technology** 53 : 217-223.

Mishima D., Kuniki M., Sei K., Soda S., Ike M. and Fujita M. 2008. Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes*- L.). **Bioresource Technology** . 99:2495–2500.

Mohamed A. , Nevin M. Farid E ., btsam N. and Hossiny B.2006. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from Trichoderma harzianum. **Journal of Biotechnology** 127 : 54–64

Nigam J.N. 2002. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose–fermenting yeast. **Journal of Biotechnology.** 97:107–116.

Rose, A.H. 1977. Microbiology and biochemistry of alcoholic beverage production. **Alcoholic Beverages**, 39: 7-32.

Salvado Z., Arroyo F.N., Barrio E., Querol A., and Guillamon J.M.2011. Quantifying individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**. 28:1155-1161

Sonia M.,and Naresh V. 1998. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. **Applied Mycology Group**, 8:959-964

Stenius, P. 2000. **Forest Products Chemistry**. [Online] : Available. www.wikipedia.org/wiki/ (วันที่สืบค้น 15 พฤษภาคม 2555)

Sukumaran R.K. 2009. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: An evaluation of enzymatic saccharification strategy. **Bioresource Technology**. 925-930.

Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. **Induction of defense responses in cucumber plants (Cucumis sativus L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*.** [Online] : Available. http://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma_harzianum (วันที่สืบค้น 15 พฤษภาคม 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhang X., Fuying M., Yang N., Xu C., Yu H., and Wu J. 2010. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresource Technology** 101:9600–9604.

Zhang Q. and Cai W. 2008. Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma ressei* ZM4-F3. **Biomass and Bioenergy.** 32:1130-1135.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
   - ชั่งกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
2. เตรียม Dinitrosalicyclic reagent หรือ DNS reagent
   - ชั่งกรด 3,5 – ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5- Dinitrosalicyclic acid) 10 กรัมในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากันจนกระทั่งได้สารละลายใส เติมโซเดียมโพแทสเซียมทราเทรตลงไปทีละน้อยจนครบ 200 กรัม และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง
3. เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ (2 M NaOH)
   - ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 16 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

- เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส 1.0 กรัมต่อลิตร โดยนำกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- ปิเปตสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- นำหลอดทดลองทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นทันที
- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ทุกหลอดทดลอง
- เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร
- นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของน้ำตาลกลูโคส

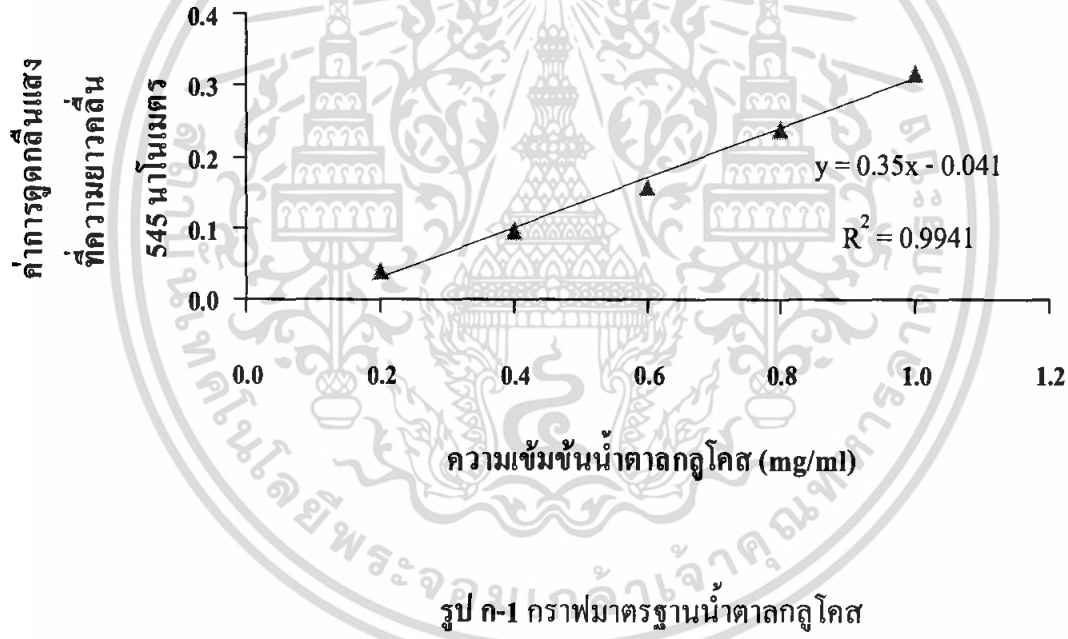
เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส 1.0 กรัมต่อลิตร โดยนำกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายกลูโคสที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองเติม DNS 3 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาวคลื่น 545 นาโนเมตร โดยตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงและการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงในตารางที่ ก-1 และ รูป ก-1

ตารางที่ ก-1 ค่ามาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 nm
0.2	0.038
0.4	0.095
0.6	0.157
0.8	0.239
1.0	0.316



รูป ก-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ทำได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสารละลายตัวอย่าง และคำนวณหาปริมาณน้ำตาลในหน่วยมิลลิกรัมของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมของผักตบชวา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณ

จากผลการทดลองปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ต่อกรัมผักตบชวา พบว่าการหมักผักตบชวา 5 กรัม เป็นระยะเวลา 12 วัน สารละลายตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1.880 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 50 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายทั้งหมด 94 มิลลิกรัม

ผักตบชวา	5	กรัม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	94	มิลลิกรัม
ผักตบชวา	1	กรัม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	(94 x 1) / 5 = 18.8	มิลลิกรัม

ดังนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากผักตบชวา 1 กรัมมีค่าเท่ากับ 18.8 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

วิธีวิเคราะห์ Neutral Detergent Fiber (NDF)

สารเคมี

1. Sodium Lauryl Sulphate (USP หรือ purified grade)
2. Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) dehydrate, Crystal, reagent grade
3. Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) reagent grade
4. Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) reagent grade
5. Triethylene glycol, reagent grade
6. Sodium sulphite anhydrous, reagent grade
7. Acetone (AR grade) ชนิดปราศจากสี และสามารถระเหยได้หมด
8. α-amylase EC number 3.2.1.1 ชนิด heat-stable
9. น้ำกลั่น

การเตรียมสารละลาย NDF

1. ชั่ง Sodium Lauryl Sulphate 60 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร แล้วใส่ใน Volumetric flask ขนาด 2 ลิตร ล้างสารที่ติดอยู่ด้วยน้ำร้อน เขย่าเบาๆ
2. เติม Triethylene glycol 20 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ขนาด 2 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. ละลาย Na_2HPO_4 9.12 กรัม $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 13.62 กรัม EDTA 37.22 กรัม ด้วยน้ำกลั่นที่ร้อน ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่ Volumetric flask ปรับปริมาตร 2 ลิตร ปรับ pH 6.9-7.1

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. นำ crucible ขนาด 50 มิลลิลิตร อบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าไว้
2. ชั่งตัวอย่าง 0.5-1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตรนำสารละลาย NDF ไปต้มให้ร้อนประมาณ 5 นาที ตวงใส่บีกเกอร์ตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร นำไปทำการย่อย (หลัง 5 นาทีเขย่าบีก-เกอร์ ในตัวอย่างที่กรองยากใส่ α-amylase ด้วย) ทำ Reflux 60 นาที
3. กรองใส่ crucible ที่ชั่งแล้ว ล้างตัวอย่างในบีกเกอร์ด้วยน้ำร้อน จนหมดฟอง ล้างตัวอย่างใน crucible ให้หมด ใช้ vacuum pump ดูดน้ำออก
4. ล้างด้วย Acetone จนไม่มีสี แล้วนำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง หรือตลอดคืน
5. นำไปใส่โถดูดความชื้นเพื่อให้เย็น ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล
6. นำไปเผาที่ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น ชั่งหา ash

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีวิเคราะห์ Acid Detergent Fiber (ADF)

สารเคมี

1. H_2SO_4, reagent grade
2. Cetyl triethyl ammonium bromide (CTAB) , reagent grade
3. Acetone, reagent grade
4. น้ำกลั่น

การเตรียมสารละลาย ADF

1. H_2SO_4 51.08 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เทใส่ Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 200 มิลลิลิตร
2. ล้างกรด H_2SO_4 ในบีกเกอร์ ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วเทใส่ Volumetric flask เขย่าให้เท่ากัน ปรับปริมาตร
3. ชั่ง CTAB 20 กรัมลงในบีกเกอร์ แล้วเทใส่ Volumetric flask เขย่า ล้าง H_2SO_4 ในบีกเกอร์แล้วเทให้หมด

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. นำ crucible ขนาด 50 มิลลิลิตรอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วใส่ที่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าไว้
2. ชั่งตัวอย่าง 0.5-1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร นำสารละลาย ADF ไปต้มให้ร้อนประมาณ 5 นาที ตวงใส่บีกเกอร์ตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร นำไปทำการย่อย (หลัง 5 นาทีเขย่าบีก-เกอร์ ในตัวอย่างที่กรองยากใส่ α-amylase ด้วย) ทำ Reflux 60 นาที
3. กรองใส่ crucible ที่ชั่งแล้ว ล้างตัวอย่างในบีกเกอร์ด้วยน้ำร้อน จนหมดฟอง ล้างตัวอย่างใน crucible ให้หมด ใช้ vacuum pump ดูดน้ำออก
4. ล้างด้วย Acetone จนไม่มีสี แล้วนำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง หรือตลอดคืน
5. นำไปใส่โถดูดความชื้นเพื่อให้เย็น ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล
6. นำไปเผาที่ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น ชั่งหา ash

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีวิเคราะห์ Acid Detergent Lignin (ADL)

สารเคมี

1. H_2SO_4conc, AR grade
2. น้ำกลั่น

การเตรียมสารละลาย 72% H_2SO_4

1. conc H_2SO_4 670 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตรที่มีน้ำอยู่แล้ว 100 มิลลิลิตร (บีกเกอร์ต้องอยู่ในอ่างเย็นตลอดเวลา)
2. ปิดกระจกนาฬิกา ทิ้งไว้ให้เย็น 20 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตรคนให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เย็น 20 องศาเซลเซียส อีกครั้ง

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. นำ crucible ที่มีตัวอย่างที่วิเคราะห์หา ADF มาแล้ว เติม 72% H_2SO_4 20 องศาเซลเซียส ครึ่ง crucible นำไปวางลงในถาดสแตนเลส ใช้แท่งแก้วคนเพื่อให้ตัวอย่างแยกออกจากกัน โดยมีน้ำกลั่นอยู่ในสแตนเลส รักษาอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส
2. ค่อยๆเติมสารละลาย 72% H_2SO_4 20 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายใน crucible แห้ง คนเป็นระยะๆ 3 ชั่วโมง
3. นำไป Suction เพื่อล้างสารละลายกรดออก แล้วล้างด้วยน้ำร้อน โดยใช้น้ำร้อนประมาณ 1,400 มิลลิลิตรหรือจนหมดกรด ไล่ตัวอย่างข้าง crucible ด้วย
4. นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมงใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักและบันทึกผลไว้

วิธีคำนวณ

NDF $\%NDF = [(W_1 + W_2)/W_3 \times 100] - \%ash$ จากการเผา NDF

ADF $\%ADF = [(W_1 + W_2)/W_3 \times 100] - \%ash$ จากการเผา ADF

W_1 = น้ำหนัก crucible+น้ำหนักตัวอย่าง

W_2 = น้ำหนัก crucible

W_3 = น้ำหนักตัวอย่าง

% Hemi cellulose = %NDF - %ADF

% Lignin = %ADF - %ADL

% Cellulose = %ADL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-3 วิธีการขยายเชื้อราไตรโคเดอร์มาและการเตรียมสารละลายสปอร์

ก-3.1 วิธีเตรียมอาหารโดยใช้ข้าวสุก

1. ใช้ปลายข้าวหรือข้าวสาร (ข้าวเจ้า) 3 แก้ว (1 แก้วมีความจุประมาณ 250 ซีซี) ประมาณ 600 กรัม ใส่น้ำเปล่าสะอาด 2 แก้ว หรือประมาณ 0.5 ลิตร หุงด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้าจะได้ข้าวสุก (ประมาณ 1 กิโลกรัม)
2. ตักข้าวที่หุงสุกใหม่ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 กรัมรอให้ข้าวอุ่นหรือเก็บเย็น

ก-3.2 ขั้นตอนขยายเชื้อราไตรโคเดอร์มา

1. นำขวดรูปชมพู่ที่ใส่อาหารเตรียมไว้ ไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ปลอดเชื้อ (lamina air flow) แล้วใส่ผงเชื้อราไตรโคเดอร์มาประมาณ 0.6 กรัม ลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ปิดปากขวดด้วยถุงพลาสติก มัดยางรอบปากขวดให้แน่น เขย่าเบาๆให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร
3. ใช้ปลายเข็มเจาะถุงพลาสติกที่ปากขวด ประมาณ 10 รูต่อขวด (เพื่อให้มีอากาศถ่ายเท เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราไตรโคเดอร์มา)
4. บ่มเชื้อไว้ในที่มีอากาศถ่ายเทมีแสงสว่างส่องถึง ไม่ตากแดด ปลอดภัยจากมด ไร และสัตว์อื่นๆ เมื่อครบ 2 วันเขย่าขวดเบาๆ เพื่อให้เส้นใยของเชื้อกระจายทั่วทั้งขวด บ่มขวดที่ใส่เชื้อต่ออีก 5 วันก่อนนำไปใช้ ถ้ายังไม่ใช้ต้องเก็บเชื้อไว้ในตู้เย็น แต่ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 15 วัน

ก-3.3 วิธีการเตรียมสารละลายสปอร์

1) อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลายสปอร์

1. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร 2 ใบ ขวดใบแรกใส่น้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ขวดใบที่สองไม่ใส่น้ำกลั่น
2. กรวยแก้ว+สำลี
3. ตะแกรงกรองตาถี่

นำอุปกรณ์ในข้อ 1และ 2 ไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) วิธีการเตรียม

1. หลังจากเลี้ยงเชื้อไป 5-7 วัน ก็นำน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ค่อยๆเทใส่ในขวดที่เลี้ยงเชื้อไว้ เขย่าเบาๆ แล้วค่อยๆเทเชื้อผ่านตะแกรงกรองตาถี่ลงในขวดรูปชมพู่ที่เตรียมไว้
2. ปิดด้วยจุกสำลี
3. นำสารละลายสปอร์ที่ได้แบ่งไปนับจำนวนสปอร์ วัดการทำงานของเอนไซม์ และใช้ในการทดลอง

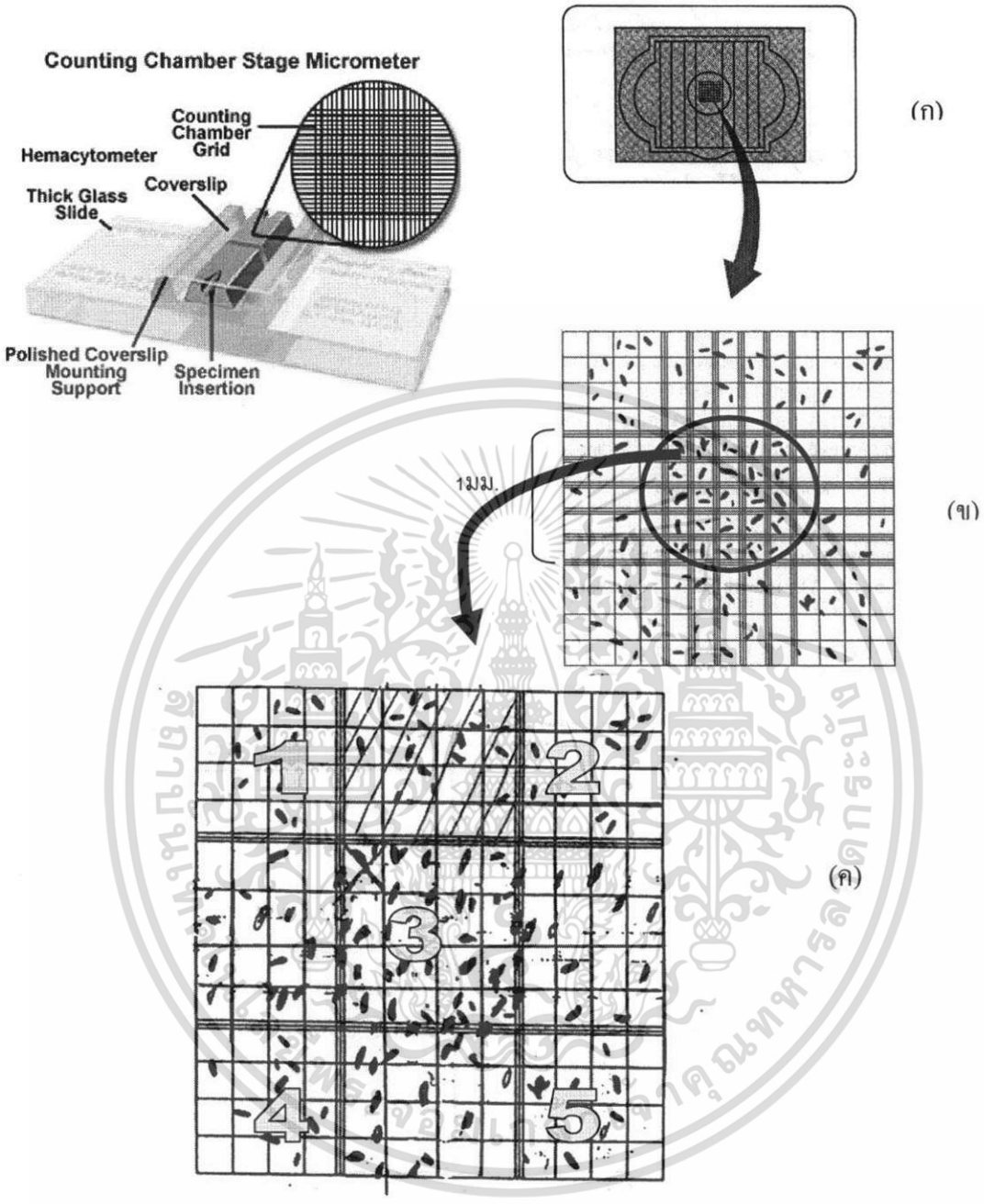
ก-3.4 การนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธี Haemacytometer

1. ปิเปตสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้ลงในสไลด์นับเซลล์ (ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์) ดูดมา 1-2 หยด และหยดลงด้านข้างของแผ่นกระจกปิดสไลด์
2. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า
3. นับจำนวนสปอร์ใน 5 ช่องกลางจาก 25 ช่อง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับ ถ้าจำนวนสปอร์ที่ทำการนับได้น้อยกว่า 50 สปอร์ ให้เปลี่ยนไปใช้ตัวอย่างที่เข้มข้นขึ้นแล้วทำการนับใหม่ แต่ถ้าจำนวนสปอร์มากกว่า 400 ให้เจือจางตัวอย่างลงอีกและนับสปอร์ใหม่ดังแสดงในรูปที่ ก-2

วิธีการคำนวณหาปริมาณสปอร์

ปริมาณของ 1 ช่องกลางมีค่าเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตรx 0.2 มิลลิเมตรx 0.1 มิลลิเมตร
หรือเท่ากับ 0.02 เซนติเมตรx 0.02 เซนติเมตรx 0.01 เซนติเมตร
หรือเท่ากับ 0.000004 ลบ.ซม หรือ 0.000004 มิลลิลิตร
เท่ากับ 4×10^{-6} มิลลิลิตร
ปริมาตร 4×10^{-6} มิลลิลิตรมีจุลินทรีย์ Z สปอร์
ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมีจุลินทรีย์ $(Z \times 1) / 4 \times 10^{-6}$ สปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก-2 วิธีการนับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacytometer (ก) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์ (ข) ภาพขยายของตารางที่ 10X (ค) 5 ช่องที่ใช้ในการนับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-4 วิธีการปรับค่าปริมาณน้ำอิสระของตัวอย่าง

ในการศึกษาสภาวะของปริมาณน้ำอิสระ (water activity) ทำได้โดยการเตรียมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง ก-2

ตารางที่ ก-2 ความเข้มข้นของ NaCl ที่ปริมาณน้ำอิสระต่างๆ

ค่าปริมาณน้ำอิสระ	ความเข้มข้น NaCl (Molal), m
0.90	2.5
0.95	1.5
0.98	0.5

ขั้นตอนการปรับสภาพ

1) นำถังที่มีฝาปิดขนาด 2,000 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ดังนี้
   1.1) ถังใบที่ 1 ใส่สารละลาย NaCl เข้มข้น 2.5 m โดยใส่สาร 2.5 กรัมต่อน้ำ 1 กิโลกรัม
   1.2) ถังใบที่ 2 ใส่สารละลาย NaCl เข้มข้น 1.5 m โดยใส่สาร 1.5 กรัมต่อน้ำ 1 กิโลกรัม
   1.3) ถังใบที่ 3 ใส่สารละลาย NaCl เข้มข้น 0.5 m โดยใส่สาร 0.5 กรัมต่อน้ำ 1 กิโลกรัม
2) เมื่อใส่สารละลายครบทั้ง 3 ถัง ปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3) นำขวดที่ใส่ผักตบชวาที่เตรียมไว้ ใส่ลงในถังที่ต้องการปรับค่าปริมาณน้ำอิสระทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4) แบ่งบางส่วนมาตรวจสอบค่าปริมาณน้ำอิสระ ด้วยเครื่องวัด water activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-5 การวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column	:	RESTEK MXT-1 15 METER
Column length	:	15 Meter
Oven temperature	:	100 ° C
Isothermal	:	100 ° C
Detector	:	Flame-Ionized detector
Carrier gas	:	Helium at 5 psi
		Nitrogen at 5 psi
		Hydrogen at 5 psi

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียม Internal standard ในการทดลองใช้ isopropanol (pure) ให้มีความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร ใน acetone
2. เตรียมสารมาตรฐาน ในการทดลองใช้ ethanol ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 % หรือ ที่ความเข้มข้น 1.973, 3.945, 5.918, 7.890, 9.863, 11.835 กรัมต่อลิตร
3. ผสมสารละลาย Internal standard จากข้อ 1. กับสารมาตรฐานในข้อ 2. จำนวนเท่าๆกัน ผสมสารละลาย isopropanol 10% กับ ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1
4. ใช้สารละลายผสมที่ได้จากข้อ 3. จำนวน 1 μL ฉีดเข้าเครื่อง GC เพื่อหาพื้นที่พีกของสารละลายมาตรฐาน และพื้นที่พีกของสารละลาย Internal standard จากโครมาโทรแกรมของ isopropanol กับ ethanol และนำมาหาอัตราส่วนพื้นที่พีก ดังนี้

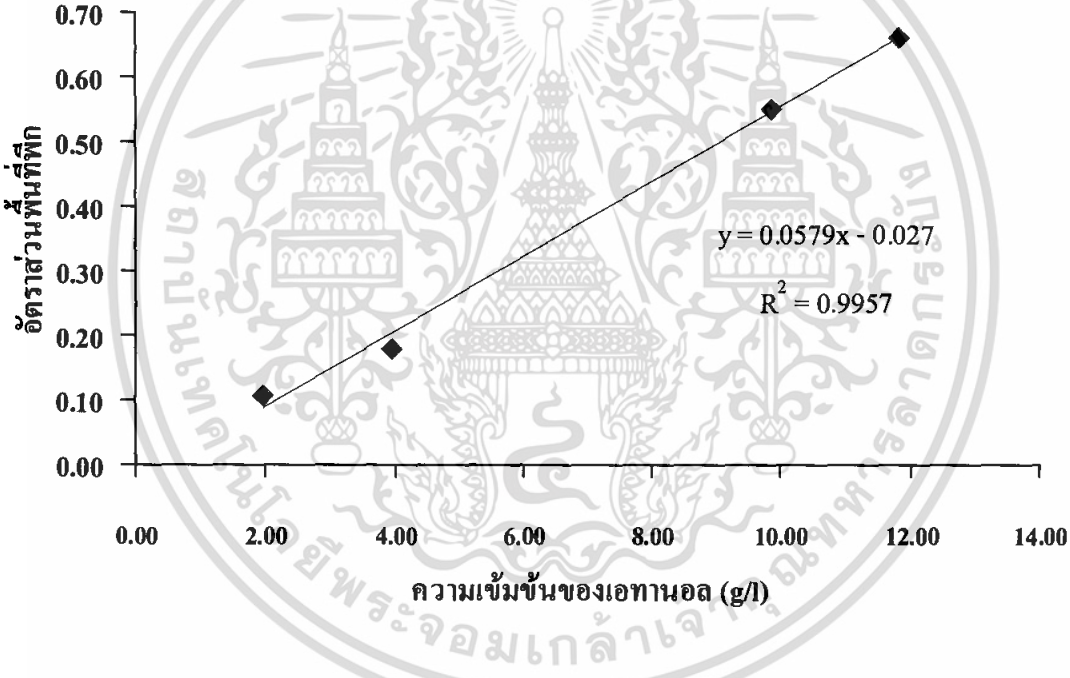
$$\text{อัตราส่วนพื้นที่พีก} = \frac{\text{พื้นที่พีกของ ethanol}}{\text{พื้นที่พีกของ isopropanol}}$$

5. เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่พีก กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ethanol จะได้ Calibration curve ดังตารางที่ ก-2 และรูป ก-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-3 ค่ามาตรฐานของเอทานอล

ความเข้มข้นของเอทานอล (g/l)	พื้นที่ ethanol	พื้นที่ isopropanol	อัตราส่วนพื้นที่พีก
1.97	28161.22	266399.25	0.11
3.95	66589.31	375599.03	0.18
5.92	99950.94	468992.31	0.21
7.89	114751.70	414500.35	0.28
9.86	218395.28	398117.63	0.55
11.84	285528.84	432846.18	0.66



รูป ก-3 กราฟมาตรฐานเอทานอล

6. ผสมสารละลาย Internal standard (isopropanol 10%) จากข้อ1. กับ สารละลายตัวอย่างที่ได้จากการทดลอง ในอัตราส่วน 1:1
7. นำสารละลายที่ผสมจำนวน 0.1 μL ฉีดเข้าเครื่อง GC เพื่อหาพื้นที่พีกของสารละลายตัวอย่าง และพื้นที่พีกของสารละลาย Internal standard จากโครมาโทรแกรมของ สารละลายตัวอย่างกับ isopropanol
8. นำมาหาอัตราส่วนพื้นที่พีกของสารละลายตัวอย่างต่อ isopropanol
9. นำอัตราส่วนที่คำนวณได้ไปหาความเข้มข้นของเอทานอลจาก Calibration curve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

ในการทดลองใช้ผักตบชวา 10 กรัม ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 12.99 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายน้ำตาล 100 มิลลิลิตร ในการผลิตเอทานอล ได้เอทานอลความเข้มข้นเท่ากับ 4.0234 กรัมต่อลิตร

จากการคำนวณปริมาณเอทานอลต่อน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 4.0234 กรัมต่อลิตร

สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีเอทานอล 4.0234 กรัม

สารละลาย 100 มิลลิลิตร มีเอทานอล $\frac{4.0234 \times 100}{1000} = 0.402$ กรัม

ดังนั้นในผักตบชวา 10 กรัม มีเอทานอลเท่ากับ 0.402 กรัม

ในผักตบชวา 1 กรัม มีเอทานอลเท่ากับ $\frac{0.402}{10} = 0.040$ กรัม

ในการทดลองสารละลายกลูโคส 24.62 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ในการผลิตเอทานอลได้เอทานอลความเข้มข้นเท่ากับ 119.27 กรัมต่อลิตร

จากการคำนวณน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 119.27 กรัมต่อลิตร

สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีเอทานอล 119.27 กรัม

สารละลาย 100 มิลลิลิตร มีเอทานอล $\frac{119.27 \times 100}{1000} = 11.93$ กรัม

ปริมาณสารละลายกลูโคส 100 มิลลิลิตร มีกลูโคส 24.62 กรัม

กลูโคส 24.62 กรัม มีเอทานอล 11.93 กรัม

กลูโคส 1 กรัม มีเอทานอล $\frac{11.93 \times 1}{24.62} = 0.48$ กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-6 การหาค่าการทำงานของเอนไซม์

ค่าทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองแต่ละตัวคือ เอนไซม์ไอโมโลกลูโคซิเดส และไซแลน-เนส วัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี DNS method

สารเคมี

1. สารละลาย DNS
2. Starch solution (Analar, USA)
3. ไซแลน จาก oat spelts (Sigma-Aldrich, Inc, USA)
4. กลูโคส (Sigma-Aldrich, Inc, USA)
5. ไซโลส (Sigma-Aldrich, Inc, USA)

วิธีการ

1. เติมเอนไซม์ 500 ไมโครลิตร ลงในซับสเตรทที่ต้องการหาปริมาณเอนไซม์ (1.0% ไซแลน หรือ 1.0% starch) ใน 0.05M acetate buffer pH 5.0 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร
2. บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. ดูดสารตัวอย่างออกมา 250 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DNS 500 ไมโครลิตร
4. นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที
5. แช่หลอดในอ่างน้ำเย็น 5 นาที
6. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว-คลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐาน (ใช้กลูโคสเป็นกราฟมาตรฐานในการอ่านค่าเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ส่วนไซแลนเนส ใช้กราฟมาตรฐานที่เป็นไซโลส) โดยใช้ความเข้มข้นช่วง 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1 ผลการศึกษาระยะเวลาในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร			สมการกราฟมาตรฐาน *	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมผักตบชวา)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
0	0.001	0.000	0.002	y=0.577x-0.0296	0.052	0.050	0.054	0.520	0.503	0.537	0.520	0.017
1	0.027	0.031	0.029	y=0.595x-0.0094	0.203	0.210	0.207	2.034	2.101	2.067	2.067	0.034
2	0.064	0.072	0.083	y=0.51x-0.0352	0.194	0.210	0.231	1.941	2.098	2.314	2.118	0.187
3	0.319	0.321	0.311	y=0.4105x-0.0525	0.905	0.910	0.885	9.049	9.098	8.854	9.000	0.129
4	0.429	0.432	0.430	y=0.504x-0.0488	0.946	0.952	0.948	9.464	9.524	9.484	9.491	0.030
5	0.548	0.556	0.552	y=0.4325x-0.0251	1.326	1.345	1.336	13.264	13.449	13.356	13.356	0.093
7	0.565	0.602	0.611	y=0.4125x-0.0637	1.524	1.614	1.636	15.243	16.141	16.359	15.914	0.592
10	0.637	0.674	0.711	y=0.362x-0.035	1.856	1.959	2.061	18.564	19.586	20.608	19.586	1.022
12	0.622	0.715	0.617	y=0.35x-0.041	1.894	2.160	1.880	18.943	21.600	18.800	19.781	1.577
14	0.494	0.470	0.447	y=0.39x-0.0766	1.462	1.400	1.341	14.615	14.000	13.410	14.009	0.603
18	0.306	0.367	0.374	y=0.3755x-0.0611	0.979	1.141	1.160	9.787	11.413	11.600	10.933	0.997

* สมการกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส y เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร, x เท่ากับ ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการหมักผักตบชวาด้วยเชื้อ *Trichoderma harzianum* ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อสารละลายสปอร์ 5 กรัมต่อ 12 มิลลิลิตร ของสารละลายสปอร์เข้มข้น 1.09×10^{8} CFU/ml ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) เท่ากับ 0.98 และ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ; ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้เจือจาง 50 มิลลิลิตร

ตารางที่ ข-2 ผลการศึกษาอุณหภูมิในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 นาโนเมตร			ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)*			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมผักตบชวา)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
30.0	0.761	0.734	0.697	1.404	1.356	1.290	14.043	13.560	12.898	13.500	0.575
35.0	0.706	0.701	0.631	1.306	1.297	1.172	13.059	12.970	11.717	12.582	0.750
40.0	0.358	0.342	0.325	0.683	0.655	0.624	6.834	6.547	6.243	6.541	0.295

*สมการกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส $y = 0.559x - 0.0248$ $R^2 = 0.996$

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการหมักผักตบชวาด้วยเชื้อ *Trichoderma harzianum* ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อสารละลายสปอร์ 5 กรัมต่อ 12 มิลลิลิตรของสารละลายสปอร์เข้มข้น 1.05×10^8CFU/ml ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) เท่ากับ 0.98 เป็นระยะเวลาการหมัก 10 วัน ; ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้เจือจาง 50 มิลลิลิตร

ตารางที่ ข-3 ผลการศึกษาปริมาณน้ำอิสระในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ปริมาณน้ำอิสระ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 นาโนเมตร			ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.) *			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมผักตบชวา)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
0.90	0.051	0.035	0.054	0.132	0.104	0.137	1.320	1.039	1.373	1.244	0.180
0.95	0.420	0.417	0.401	0.782	0.776	0.748	7.817	7.764	7.482	7.688	0.180
0.98	0.669	0.684	0.653	1.220	1.246	1.192	12.201	12.465	11.919	12.195	0.273

*สมการกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส $y = 0.568x - 0.024$ $R^2 = 0.998$

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการหมักผักตบชวาด้วยเชื้อ *Trichoderma harzianum* ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อสารละลายสปอร์ 5 กรัมต่อ 12 มิลลิลิตรของสารละลายสปอร์เข้มข้น 1.05×10^8 CFU/ml อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 10 วัน; ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้เจือจาง 50 มิลลิลิตร

ตารางที่ ข-4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ (CFU/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 นาโนเมตร			ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.) *			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/ กรัมผักตบชวา)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
1.09×10^{6}	0.126	0.124	0.117	0.272	0.268	0.256	2.716	2.682	2.561	2.653	0.082
2.18×10^{6}	0.301	0.296	0.232	0.574	0.566	0.455	5.744	5.657	4.550	5.317	0.666
1.09×10^{7}	0.653	0.609	0.569	1.183	1.107	1.038	11.834	11.073	10.381	11.096	0.727
1.09×10^{8}	0.741	0.736	0.684	1.336	1.327	1.237	13.356	13.270	12.370	12.999	0.546

*สมการกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส $y = 0.578x - 0.0316$ $R^2 = 0.998$

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการหมักผักตบชวาด้วยเชื้อ *Trichoderma harzianum* ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) เท่ากับ 0.98 ระยะเวลาการหมัก 10 วัน และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ; ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้เจือจาง 50 มิลลิลิตร

ตารางที่ ข-5 ผลการศึกษาปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสในผักตบชวา

การปรับสภาพผักตบชวา	เซลลูโลส					เฮมิเซลลูโลส				
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	เฉลี่ย	SD	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	เฉลี่ย	SD
อบแห้ง	49.03	50.47	49.98	49.83	0.73	24..60	24.31	23.96	24.14	0.25
ต้ม H_2SO_4 60 นาที	48.91	50.11	49.34	49.45	0.61	20.14	20.01	19.54	19.90	0.32
หลังย่อยด้วยเชื้อรา	37.84	39.92	37.76	38.51	1.22	19.67	19.23	18.65	19.18	0.51

ตารางที่ ข-6 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาและน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ตัวอย่าง			ปริมาตรน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (mg/ml)	ความเข้มข้นเอทานอล (g/l) *					g เอทานอล	g เอทานอล /g กลูโคส	g เอทานอล /g น้ำตาลรีดิวซ์
					การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	เฉลี่ย	SD			
Blank	น้ำกลั่นใส่สารละลายยีสต์		100	0.00	2.239	2.225	2.177	2.213	0.032	-		-
ชุดทดลอง	น้ำตาลรีดิวซ์	กรดเจือจาง	100	4.37	3.619	3.779	3.936	3.778	0.158	0.156		0.358
		เชื้อรา	100	0.69	3.607	3.570	3.672	3.616	0.052	0.140		0.321
		กรด+เชื้อรา	100	3.60	4.181	3.953	3.937	4.023	0.136	0.181		0.414
	น้ำตาลกลูโคส	เท่าน้ำตาลรีดิวซ์ผสม	100	3.50	3.684	3.960	3.919	3.854	0.149	0.164	0.483	
		16%	100	2.46	119.656	119.319	118.835	119.270	0.413	11.706	0.475	
ชุดควบคุม	น้ำตาลรีดิวซ์	กรดเจือจาง	100	4.37	2.046	2.021	1.982	2.016	0.032	0.202		0.046
		เชื้อรา	100	4.37	2.184	2.151	2.163	2.166	0.017	0.217		0.050
		กรด+เชื้อรา	100	3.60	2.059	2.000	2.037	2.032	0.030	0.203		0.046
	น้ำตาลกลูโคส	เท่าน้ำตาลรีดิวซ์ผสม	100	3.50	1.593	1.621	1.719	1.644	0.066	0.164	0.484	
		16%	100	2.46	1.658	1.454	1.533	1.549	0.103	0.155	0.006	

* สมการของกราฟมาตรฐานเอทานอล $y = 0.057x - 0.027$ $R^2 = 0.995$

หมายเหตุ : ปริมาณเอทานอลที่เกิดจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะไร้อากาศ

ตารางที่ ข-7 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากจากผักตบชวาและน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way ANOVA

ชนิดของน้ำตาล	ความเข้มข้นเอทานอล (g/l)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยเชื้อรา	3.619	3.779	3.936	3.778	0.158
น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มกรดเจือจาง	3.607	3.570	3.672	3.616	0.052
น้ำตาลรีดิวซ์ผสม	4.181	3.953	3.937	4.023	0.136
น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม	3.684	3.960	3.919	3.854	0.149

$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

H_i: น้ำตาลอย่างน้อย 1 ตัวมีความเข้มข้นเอทานอลทั้งหมดเฉลี่ยแตกต่างกัน

ตารางที่ ข-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความเข้มข้นเอทานอลทั้งหมด

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.951	3	0.317	18.766	0.001
Within Groups	0.135	8	0.017		
Total	1.086	11			

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS พบว่า

จากตารางที่ ข-8 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.001 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0

สรุปว่าน้ำตาลอย่างน้อย 1 ตัวมีความเข้มข้นเอทานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-9 การเปรียบเทียบความเข้มข้นเอทานอลทั้งหมดด้วยวิธีดันแคนส์

Duncan

ชนิดของน้ำตาล	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยเชื้อรา	3	1.450		
น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มกรดเจือจาง	3		1.762	
น้ำตาลรีดิวซ์ผสม	3		1.992	1.992
น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม	3			2.210
Sig.		1.000	0.062	0.074

Mean for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ข-10 ผลการศึกษาปริมาณเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากผักตบชวาและน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way ANOVA

ชนิดของน้ำตาล	ปริมาณเอทานอล (g/g น้ำตาล)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยเชื้อรา	0.316	0.356	0.403	0.358	0.034
น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มกรดเจือจาง	0.313	0.308	0.342	3.616	0.018
น้ำตาลรีดิวซ์ผสม	0.444	0.395	0.403	0.414	0.026
น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม	0.425	0.510	0.512	0.483	0.050
น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์	0.477	0.475	0.473	0.475	0.002

$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$

H_i: น้ำตาลอย่างน้อย 1 ตัวมีปริมาณเอทานอลทั้งหมดเฉลี่ยแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเอทานอลทั้งหมด

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.060	4	0.015	14.010	0.000
Within Groups	0.011	10	0.001		
Total	0.071	14			

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS พบว่า

จากตารางที่ ข-11 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0

สรุปว่าน้ำตาลอย่างน้อย 1 ตัวมีปริมาณเอทานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ข-12 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลทั้งหมดวิธีดันแคนส์

Duncan

ชนิดของน้ำตาล	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยเชื้อรา	3	0.321		
น้ำตาลรีดิวซ์จากการต้มกรดเจือจาง	3	0.358	0.358	
น้ำตาลรีดิวซ์ผสม	3		0.414	
น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์	3			0.475
น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ผสม	3			0.483
Sig.		0.198	0.063	0.784

Mean for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นามสกุล	มนิษา ปุลววัน
วัน เดือน ปีเกิด	29 สิงหาคม 2529
ที่อยู่	59/216 หมู่บ้านลลิล หมู่ 1 ตำบลเสาธงหิน อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี 11140
การศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอม-เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้