รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย : การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

กิจกรรม : การแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมพืชและจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเอทานอล

3. ชื่อการทดลอง : การทดสอบพืช/สาหร่ายนำเข้าจากต่างประเทศที่เหมาะสมสำหรับผลิตไบโอเอทานอลเทียบกับพืชท้องถิ่น

รหัสการทดลอง : 03-07-56-01-03-00-01-57

4. คณะผู้ดำเนินงาน

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวภรณี สว่างศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	สำนักวิจัยวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดสอบพืช/สาหร่ายนำเข้าจากต่างประเทศที่เหมาะสมสำหรับผลิตไบโอเอทานอลเทียบกับพืชท้องถิ่น

Renewable energy plants/algae imported from abroad testing for the production of bio-ethanol with native plants.

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ นางสาวภรณี สว่างศรี
นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการทดสอบพืชและสาหร่ายชีวมวลในประเทศไทยเพื่อทดแทนพืชพลังงานเปรียบเทียบกับสาหร่ายนำเข้าจากต่างประเทศที่เหมาะสมสำหรับผลิตไบโอเอทานอล โดยเริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี 2557-2558 รวบรวมชนิดพืช/สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) เปรียบเทียบกับ *Chlorella* sp. (J1) จากประเทศญี่ปุ่น ทำการ Pre-treatment ของพืช 4 ชนิด ส่วนสาหร่าย 2 สายพันธุ์ ไม่ได้ Pre-treatment จากนั้นทดสอบการย่อยโดยกระบวนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสที่ความเข้มข้น 15 FPU/g substrate เพื่อย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กที่ไม่ผ่านการ Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในวันที่ 9 มีค่าเท่ากับ 4,236.25 mg/l รองลงมาคือ *Chlorella* sp. (J1) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 8 มีค่าเท่ากับ 2,874.25 mg/l ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากหญ้าคิงเนเปียร์ ปากช่อง 1 มีค่าเท่ากับ 2,814.63 mg/l รองลงมาคือ ต้นเลา หญ้าคิงเนเปียร์ (ขอนแก่น) และอ้อยพลังงาน ตามลำดับ และนำตัวอย่างช่วงวันที่ 6-9 ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงไปทดสอบกระบวนการหมักด้วยยีสต์ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า*Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีการย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้เร็วที่สุดในวันที่ 2 มีค่าน้ำตาลกลูโคสสูงสุด เท่ากับ 2.284 mg/ml รองลงมาคือ *Chlorella* sp. (J1) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง 1) หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) ตามลำดับ

- รหัสการทดลอง 03-07-56-01-03-00-01-57

Abstract

This experiment was conducted to test the plant and algae biomass for renewable energy plants in comparison with algae imported from abroad for the production of bio-ethanol that it conducted since 2014-2015. The collection of plants/algae had been the potential to produce six types of ethanol such as Lao grass, Napier grass (Khonkaen), King Napier grass (Pakchong 1) energy cane (hybrid KJ), *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) compared with *Chlorella* sp. (J1). Pre-treatment of the four species of plants but two species of algae were not Pre-treatment. Then test the reducing sugar by the enzyme cellulase and xylanase 15 FPU/g substrate. The result of *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) has the highest reducing sugar in nine days content of 4,236.25 mg/l. *Chlorella* sp. (J1) has the reducing sugar content of 2,874.25 mg/l that non significant with King Napier grass (Pakchong 1) content of 2,814.63 mg/l, followed King Napier grass (Khonkaen) and energy cane respectively. The samples had been the highest a reducing sugar within 6-9 days for test the yeast in anaerobic conditions in five days. The results showed that *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) to be reduced into glucose, the fastest in two days content of 2.284 mg/ml, followed by *Chlorella* sp. (J1), King Napier grass (Pakchong 1), Napier grass (Khonkean), Lao grass and energy cane (hybrid KJ) respectively.

คำนำ

พลังงานจัดเป็นปัจจัยสำคัญและมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ หลายๆประเทศทั่วโลกจึงแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่เพื่อเป็นหลักประกันความมั่นคงด้านพลังงานในระยะยาว ทั้งยังเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการใช้พลังงานที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมัน และ ถ่านหิน อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน การผลิตไบโอเอทานอลได้รับความสนใจทั่วโลก เนื่องจากเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดภาวะโลกร้อนและยังเป็นการรักษาความมั่นคงของพลังงานทั่วโลกอีกด้วย ในช่วงแรกนั้นการผลิตไบโอเอทานอลผลิตจากน้ำตาลและแป้งที่ได้จากพืชผลและธัญพืชจากการเกษตร แต่ในปัจจุบันไบโอเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัสดุทดแทนประเภทอื่นๆ นอกเหนือจากแป้งและน้ำตาล เช่น วัสดุลิกโนเซลลูโลส ที่เรียกว่า ลิกโนเซลลูโลสิกเอทานอล ตัวอย่างเช่นเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เศษไม้ เศษวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและเศษขยะ และพืชพลังงานต่างๆ อย่างไรก็ดี รัฐบาลมีนโยบายทางด้านเศรษฐกิจที่จะส่งเสริมและผลักดันให้ปลูกพืชพลังงาน ซึ่งกระทรวงพลังงานได้ทำการวิจัยหญ้าที่เหมาะเป็นพืชพลังงาน จำนวน 20 ชนิด พบว่าหญ้าเนเปียปากช่อง 1 ให้ผลผลิตต่อไร่สูงสุดประมาณ 70-80 ตันสดต่อปีต่อไร่ ซึ่งมากกว่าหญ้าชนิดอื่นเกือบ 7 เท่า จึงเป็นพืชที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นพลังงานทดแทน นอกจากนี้คณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ (กพช.) ได้

ปรับเป้าหมายของแผนพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกในระยะเวลา 10 ปี (พ.ศ.2555-2564) ของประเทศไทยโดยใช้พลังงานทดแทนจากหญ้าเนเปีย (ไกรลาศ, 2556 ; http://webkc.dede.go.th/testmax/node/152) นอกจากพืชพลังงานดังกล่าวแล้ว สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสภาพแวดล้อมของโลกและความเป็นอยู่ของมนุษย์ เป็นส่วนหนึ่งของต้นทางห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศน์ เป็นตัวการในการรักษาสมดุลทางธรรมชาติ สามารถสร้างสารพิเศษบางชนิดที่มีประโยชน์และโทษต่อมนุษย์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารได้ด้วยตนเองโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไปและโดยกระบวนการออโทรฟ สาหร่ายถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Procaryote และ eukaryote กลุ่ม Procaryote ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนแบคทีเรีย ส่วนกลุ่ม eukaryote เป็นสาหร่ายแท้ มีขนาดเล็กตั้งแต่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจนกระทั่งถึงขนาดใหญ่มีความยาวหลายเมตร สาหร่ายมีรูปร่างหลายแบบ อาจเป็นแบบเซลล์เดี่ยว หลายเซลล์มารวมกลุ่มกันเรียกว่าโคโลนี เป็นเส้นสายทั้งแตกแขนงและไม่แตกแขนง เป็นทัลลัสที่มีราก ลำต้นและใบคล้ายพืชชั้นสูงแต่ไม่มีระบบท่อลำเลียง ทุกเซลล์ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงเพื่อการดำรงชีวิตเหมือนๆกัน (ยุวดี, 2548 ลัดดา, 2544 และ Edward and Sigee, 2010) สาหร่ายมีคลอโรฟิลล์สูง ทั้งยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารไม่ว่าจะเป็นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน แร่ธาตุ และวิตามินหลายชนิด ที่สำคัญคือมีน้ำมันในปริมาณมาก และมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าพืชหลายเท่า ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อพื้นที่ขนาดเท่ากับพื้นที่ปลูกสบู่ดำ 1 ต้น เป็นเวลา 7 ปี สบู่ดำจะให้น้ำมันร้อยละ 25 ในขณะที่สาหร่ายให้น้ำมันมากถึงร้อยละ 1,000 ปริมาณน้ำมันนี้อาจเพียงพอกระทั่งผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศได้ (นิรนาม, 2552) ทำให้สาหร่ายมีศักยภาพมากต่อการผลิตพลังงานทดแทนน้ำมันดิบ ซึ่งคาดการณ์ว่าจะหมดไปภายใน 30 ปีข้างหน้า Lali (2008) และ Anonymous (2009) ได้กล่าวว่า วิวัฒนาการของการผลิตพลังงานชีวมวล (biomass) ได้มาถึงยุคที่ 4 แล้ว คือ การผลิตพลังงานจากสาหร่ายหรือสาหร่ายดัดแปรพันธุกรรม น้ำมันดิบเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์และนับวันยิ่งมีบทบาทมากยิ่งขึ้น ทำให้เกิดวิกฤตน้ำมันและปัญหาสิ่งแวดล้อมสืบเนื่องมาจากน้ำมัน ทำให้หลายประเทศทั่วโลกพยายามคิดค้นพลังงานใหม่ๆ ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ พลังงานจากพืช หรือพลังงานสะอาดขึ้นมาทดแทนพลังงานจากน้ำมันดิบที่กำลังจะหมดไป แม้ว่าสถานการณ์ปัจจุบันราคาน้ำมันจะปรับตัวลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ความสำคัญของพลังงานทดแทนยังคงไม่แปรเปลี่ยน ซึ่งเป็นเพราะซัพพลายน้ำมันโลกที่เหลือน้อย กลายเป็นแรงผลักดันให้หลายประเทศทั่วโลกวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนต่อไป ในส่วนของประเทศไทยสัญญาณที่เห็นได้ชัดเจน คือ บริษัทการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย จำกัด (มหาชน) (ปตท.) ซึ่งเป็นบริษัทน้ำมันแห่งชาติ ได้ทุ่มเงินไม่น้อยกว่าปีละ 1,000 ล้านบาท ทำการวิจัยพลังงานทดแทนโดยใช้วัตถุดิบที่ไม่ใช่พืชอาหาร การเพราะไม่ต้องการสร้างปัญหาการแย่งชิงทรัพยากร ซึ่งจะเกิดปัญหาต่างๆตามมามากมาย โดยเฉพาะจะทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนพืชอาหาร ส่งผลให้ราคาผันผวนมาก และหากเปรียบเทียบศักยภาพของสาหร่ายกับชีวมวลจากพืชที่ให้เซลลูโลส เช่น มันสำปะหลัง พบว่าสาหร่ายมีศักยภาพสูงกว่า เนื่องจากไม่ใช่พืชอาหาร ตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดอย่างแท้จริง ขณะที่ชีวมวลจากพืชมีโครงสร้างทำลายยาก ทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิต ปัญหาสำคัญของการผลิตพลังงานทดแทนจากสาหร่ายให้มีคุณภาพดีและปริมาณมาก คือ สายพันธุ์สาหร่ายที่เหมาะสมต่อการผลิต การเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Patrick *et al*., 2015) ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการทดลองนี้ เพื่อ

ศึกษาและทดสอบพืช/สาหร่ายชีวมวลที่มีอยู่ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของต่างประเทศว่ามีความเหมาะสมสำหรับผลิตไบโอเอทานอลแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อเป็นประโยชน์และแนวทางในการคัดเลือกพืช/สาหร่ายชีวมวลในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตัวอย่างพืชชีวมวลจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) (รุ่งนภา, 2556) และสาหร่าย *Chlorella* sp. (J1) จากประเทศญี่ปุ่น
2. เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
3. เครื่องบดตัวอย่างพืช ยี่ห้อ FOSS รุ่น Cyclotec^{TM}1093
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer ยี่ห้อ PERKIN ELMER รุ่น MBA 2000)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำพร้อมอบแห้ง (Autoclave)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
8. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Incubator shaker)
9. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
10. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส
11. เครื่องควบคุมการสั่นของคลื่น Ultrasonic (Ultrasonic Processor) ใช้สำหรับทำให้เซลล์สาหร่ายแตก รุ่น VCX130 PB
12. เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100) พร้อมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกลูโคส
13. อุปกรณ์ที่ใช้คัดเลือกและเลี้ยงสาหร่ายให้บริสุทธิ์ ได้แก่ ชั้นเลี้ยงสาหร่ายที่ควบคุมแสงได้ จานเขี่ยเชื้อ (petridish) ลูปเขี่ยเชื้อ ฟลาสก์ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petridish)
14. อุปกรณ์ที่ใช้หมักตัวอย่างพืช ได้แก่ ฟลาสก์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร จุกยางพร้อมชุดหลอดแก้วสำหรับหมักตัวอย่างพืชในสภาพไร้ออกซิเจน (Airlock)
15. Micropipette ขนาด 200, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
16. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อใช้ในการปรับสภาพเนื้อเยื่อ (Pre-treatment)
17. เอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนส เพื่อใช้ในกระบวนการไฮโดรไลซิสให้เป็นน้ำตาล
18. อาหาร Yeast Peptone Dextrose (YPD) อบฆ่าเชื้อแล้วที่ 121 °C 15 ปอนด์ เป็นเวลา 30 นาที
19. อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายสีเขียว Bold’s Basal medium(ภาคผนวก)

<u>วิธีการ</u>

1. รวบรวมชนิดพืชที่มีศักยภาพในการผลิตไบโอเอทานอล สาหร่ายทั้งในและต่างประเทศ

ทำการเก็บพันธุ์พืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) และนำท่อนพันธุ์ปลูกไว้ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และบดตัวอย่างพืชด้วยเครื่องบด ยี่ห้อ FOSS รุ่น Cyclotec™1093 ไว้สำหรับทดสอบการปรับสภาพเนื้อเยื่อพืช (Pre-treatment) และเก็บเพื่อใช้สำหรับหมักเป็นเอทานอล เปรียบเทียบกับสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด คือ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) (รุ่งนภา, 2556) และ *Chlorella* sp. (J1) จากประเทศญี่ปุ่น

2. ทำการปรับสภาพเนื้อเยื่อพืช (Pre-treatment) เพื่อแยกลิกนินออก ดังนี้

2.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion)

นำวัตถุดิบที่เตรียมไว้มาบรรจุลงในเครื่องระเบิดเยื่อด้วยไอน้ำ โดยใส่วัตถุดิบครั้งละ 200 กรัมต่อหนักแห้ง เข้าเครื่องระเบิดเยื่อที่พร้อมใช้งานแล้ว โดยใช้สภาวะในการระเบิดเยื่อที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เก็บตัวอย่างเยื่อที่ได้เฉพาะส่วนที่เป็นเส้นใยให้ได้มากที่สุด สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีส่วนที่เหลือบรรจุลงในถุงพลาสติกโดยมัดปากถุงให้มิดชิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้สกัดด้วยน้ำ ในขั้นต่อไป

2.2 การสกัดด้วยน้ำ (Water extraction)

ชั่งตัวอย่างเยื่อที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำแล้ว โดยเติมน้ำกลั่นในสัดส่วนของปริมาณเยื่อต่อน้ำ เท่ากับ 1:8 (กรัมเยื่อต่อมิลลิลิตรน้ำ) ให้ความร้อนคงที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บส่วนที่เป็นเส้นใยไว้ นำมาล้างด้วยน้ำ ประปาจนกระทั่งน้ำ ที่ผ่านออกมาใสไม่มีสี เก็บเยื่อในถุงพลาสติกปิดปากถุงด้วยยางรัดให้แน่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดด้วยด่างต่อไป โดยสุ่มตัวอย่างส่วนหนึ่งเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

2.3 การสกัดด้วยด่าง (Alkaline extraction)

ชั่งตัวอย่างเยื่อที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำ ใส่ในบีกเกอร์ โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) เติมด่างในสัดส่วนของปริมาณเยื่อต่อด่างเท่ากับ 1:8 (กรัมเยื่อต่อมิลลิลิตรด่าง) ให้ความร้อนคงที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บส่วนที่เป็นเส้นใยไว้ นำมาล้างด้วยน้ำประปาจนกระทั่งน้ำที่ผ่านออกมามีค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลาง เก็บเยื่อที่ได้ในถุงพลาสติกปิดปากถุงด้วยยางรัดของให้แน่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาการหมักโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกันขั้นต่อไป และทำการสุ่มตัวอย่างส่วนหนึ่งเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3. ทดสอบการย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยกระบวนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

ทำการทดสอบพืชทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน และสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด คือ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) (รุ่งนภา, 2556) และ *Chlorella* sp. จากประเทศญี่ปุ่น (J1) โดยใช้เยื่อพืชทดสอบที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส โดยใช้ปริมาณเยื่อ 10% (w/v) ทำการย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส อย่างละ 15 FPU/g substrate ของแต่ละตัวอย่างพืช จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นระยะเวลาประมาณ 10 วัน และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) ทุกวันในเวลาเดียวกัน ตามวิธีการของ DNS Method

4. ทดสอบกระบวนการหมักของเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและเอนไซม์ในระดับห้องปฏิบัติการ

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Yeast Peptone Dextrose (YPD) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เพปโทน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตร 270 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ (inoculum) ของการหมักเอทานอลต่อไป

4.2 การทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อการลิตเอทานอลพืชทดสอบทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) และ สาหร่าย *Chlorella* sp. จากประเทศญี่ปุ่น (J1) ศึกษาการผลิตเอทานอลปริมาตรการทำงาน 500 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร โดยใช้เยื่อพืชทดสอบที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส โดยใช้ปริมาณเยื่อ 10% (w/v) และเติมเพปโทน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 5 ด้วยซิเทรทบัฟเฟอร์ 0.05 M และทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์ Cellulase และ Xylanase อย่างละ 15 FPU/g substrate ใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ 10% ภายใต้สภาวะการหมักที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ได้จากการหมักวัดหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและแอลกอฮอล์

<u>ระยะเวลา</u>

เดือน ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558

<u>สถานที่ดำเนินการ</u>

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ต.รังสิต อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. รวบรวมชนิดพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล สาหร่ายทั้งในและต่างประเทศ

ได้พันธุ์พืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) สามารถนำท่อนพันธุ์ปลูกไว้ได้ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จ.ปทุมธานี (ภาพที่ 1 และ 2) สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) (รุ่งนภา, 2556) และสาหร่าย *Chlorella* sp. จากประเทศญี่ปุ่น (J1) (ภาพที่ 3)

<u>ภาพที่ 1</u> ท่อนพันธุ์ของพืชชีวมวล 4 ชนิด ได้แก่ เลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) เก็บไว้ขยายพันธุ์

<u>ภาพที่ 2</u> ตัวอย่างพืชชีวมวลตากแห้งและบดให้ละเอียดสำหรับไว้ผ่านขั้นตอน Pre-treatment

สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4)

Chlorella sp. จากประเทศญี่ปุ่น (J1)

<u>ภาพที่ 3</u> สาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella* spp. ทั้งในและต่างประเทศที่นำมาใช้ทดสอบเลี้ยงและเพิ่มปริมาณในอาหารอาหารสูตร Bold Basal medium เป็นระยะเวลา 5 วัน

2. การทดสอบการปรับสภาพเนื้อเยื่อพืช (Pre-treatment)

การปรับสภาพพืชด้วยเบสแก่เป็นการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบที่เกาะแทรกอยู่กับเซลลูโลสเนื่องจากโครงสร้างของลิกนินจะขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของกรดในกระบวนการไฮโดรไลซิส นอกจากนี้ลิกนินยังรบกวนการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ต้องทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเบสอีกด้วย (Palmqvist *et al*, 2000) ขณะที่เฮมิเซลลูโลสจะทำให้ประสิทธิภาพของการย่อยเซลลูโลสลดลงเนื่องจากโครงสร้างเฮมิเซลลูโลสสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส (Obembe *et al*., 2006) จากการทดลองการปรับสภาพเนื้อเยื่อพืช (Pre-treatment) พบว่า พืชทั้ง 4 ชนิดปรับสภาพด้วยด่าง (Alkaline extraction) ดีที่สุด โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ ในสัดส่วนเยื่อต่อด่าง 1:8 (กรัมเยื่อต่อมิลลิลิตรด่าง) และให้ความร้อนคงที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่าเส้นใยพืชนุ่มและเปื่อยไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5) พร้อมที่จะนำไปเป็นตัวอย่างในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนส เพื่อให้โครงสร้างของพืชแตกเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลต่อไป ได้มีรายงานของ McMillan (1994) วัตถุดิบในการผลิตเอทานอลนั้น ต้องนามาผ่านกระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อให้ได้น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส ไซโลส แมนโนส อะราบิโนส กาแลกโตส ก่อนจากนั้นจึงหมักด้วยยีสต์หมักน้าตาลให้เป็นเอทานอล และสอดคล้องกับ จักรพงศ์ และคณะ (2555) ได้รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพตัวอย่างลำต้นธูปฤาษีแยกสกัดลิกนินออกจากตัวย่างให้ได้มากที่สุดคือการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างลำต้นธูปฤาษี 1 ต่อ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถแยกสกัดลิกนินออกมาได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากค่าปริมาณลิกนินที่เหลืออยู่ หรือ ค่า Kappa number ที่ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการปรับสภาพอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 3.55 ยังมีค่าเปอร์เซ็นต์การแยกสกัดลิกนินสูงสุด เท่ากับ 0.67 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ประมุข (2555) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล 4 ชนิด คือไม้ยูคาลิปตัส ไม้กระถินเทพา ลำต้นปาล์ม และทางใบปาล์ม โดยนำไปผ่านการพรีทรีตเมนต์โดยการสกัดด่างที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด่างของไม้ยูคาลิปตัสและกระถินเทพา คือ ความเข้มขันของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลา 90 นาที โดยสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุดและลิกนินต่ำสุด คือ 76.84, 16.79 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และ 61.54, 29.86 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

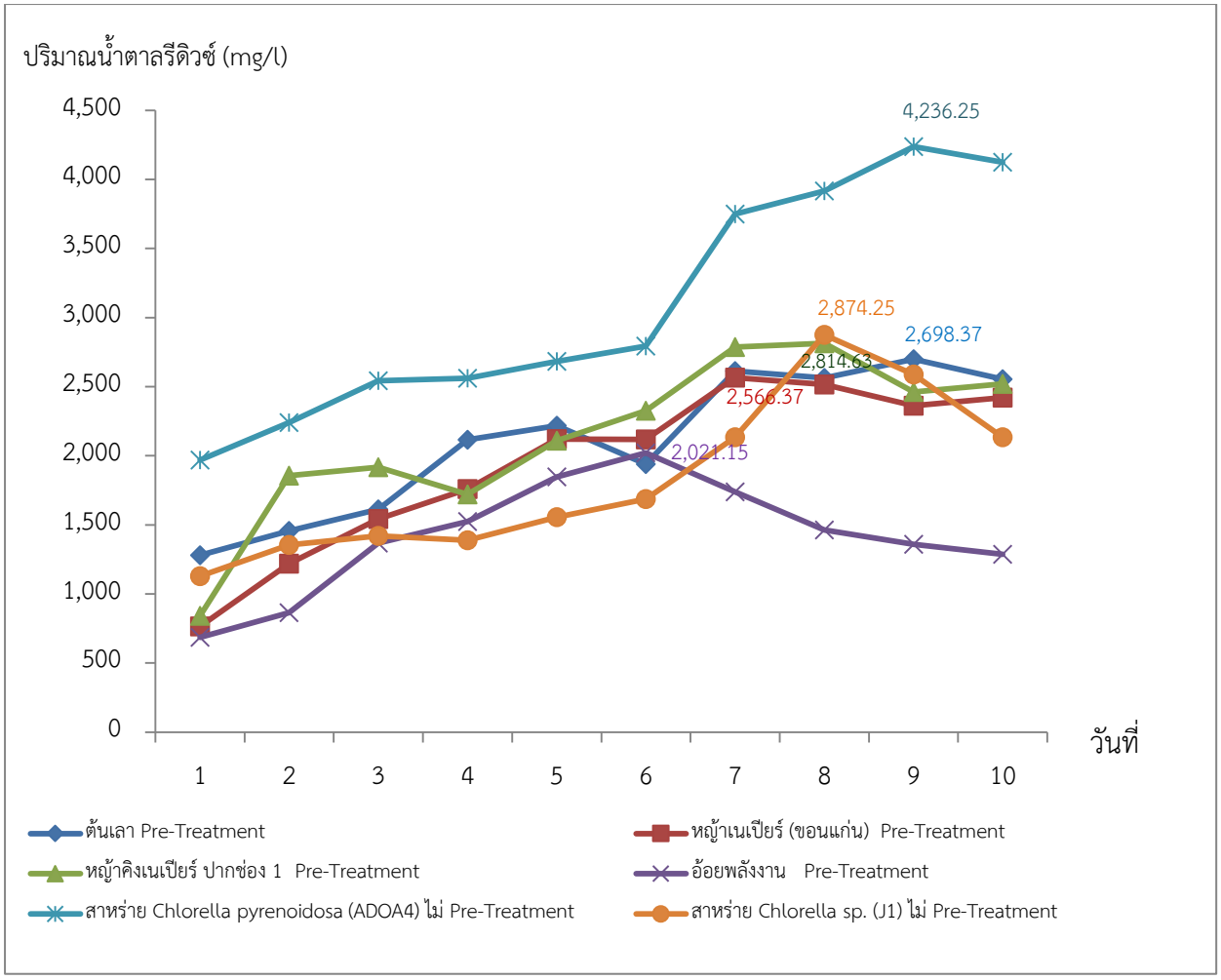
<u>ภาพที่ 4</u> ปรับสภาพด้วยด่าง (Alkaline extraction) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ ในสัดส่วนเยื่อต่อด่าง 1:8 (กรัมเยื่อต่อมิลลิลิตรด่าง) และให้ความร้อนคงที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3. ทดสอบการย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยกระบวนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

จากการปรับสภาพเนื้อเยื่อพืชเพื่อกำจัดลิกนิน และปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสแล้ว ซึ่งกระบวนการไฮโดรไลซิสอาจจะใช้กรดหรือเอนไซม์ Huang *et al*. (2013) จึงนำเนื้อเยื่อที่ได้เข้าสู่กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และในการทดลองนี้ใช้เอนไซม์เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเนื้อเยื่อพืช 2 ชนิดด้วยกัน คือ เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซแลนเนส เนื่องจากเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่พบมากในเนื้อเยื่อพืช โดยพบในส่วนของผนังเซลล์ของพืช อยู่รวมกับเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ปริมาณที่พบแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืช เช่น เนื้อไม้พบประมาณร้อยละ 40-50 และเส้นใยฝ้ายพบประมาณร้อยละ 98 (Eriksson *et al*., 1990; Goshadrou *et al*., 2011) และผลการทดลองพบว่า จากการใช้เอนไซม์ Cellulase และ Xylanase อย่างละ 15 FPU/g substrate กับตัวอย่างพืชจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) และสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด คือ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) และ *Chlorella* sp. (J1) เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่ไม่ผ่านการ Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในวันที่ 9 มีค่าเท่ากับ 4,236.25 mg/l รองลงมาคือ *Chlorella* sp. (J1) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 8 มีค่าเท่ากับ 2,874.25 mg/l ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากหญ้าคิงเนเปียร์ ปากช่อง 1 ที่ผ่าน Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 8 เช่นเดียวกัน มีค่าเท่ากับ 2,814.63 mg/l รองลงมาคือ ต้นเลา Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในในช่วงวันที่ 7-9 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2,698.37 mg/l รองลงมาคือ หญ้าคิงเนเปียร์ (ขอนแก่น) และอ้อยพลังงาน ที่ผ่านการ Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 2,566.37 mg/l และ 2,021.15 mg/l ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับได้มีรายงานว่า ความจำเป็นที่จะต้องทำการปรับสภาพพืช (pretreatment) เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางกายภาพและทางเคมีของลิกโนเซลลูโลสให้เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส อีกทั้งยังช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาอีกด้วย (Alvira *et al*., 2010 และ Taherzadeh *et al*., 2008) กระบวนการปรับสภาพพืชจะช่วยกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบที่แทรกอยู่ในเซลลูโลสโดยลดความเป็นผลึกของโครงสร้างเซลลูโลสและเพิ่มลักษณะความเป็นรูพรุนของวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้มากขึ้น (Huang *et al*., 2013) การปรับสภาพพืชด้วยเบสจัดเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและสามารถท้าได้ที่อุณหภูมิปกติและช่วยลดอัตราการสลายตัวของน้ำตาลที่มีในพืชได้ สารละลายเบสที่เหลือใช้จากการปรับสภาพพืชสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หรือนำไปปรับเปลี่ยนสารด้วยกระบวนการทางเคมีก่อนนำมาใช้ใหม่อีกครั้งได้ซึ่งเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิต (Balat, 2011) อย่างไรก็ตามก็ยังคงต้องมีการศึกษา และปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ให้มากขึ้น เช่นเรื่องอุณหภูมิ ระยะเวลาเพื่อให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้หากมีการนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีการพัฒนาในการย่อยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ ก็จะช่วยลดขั้นตอนในการปรับสภาพ (Pre-treatment) ทำให้กระบวนการผลิตไบโอเอทานอลเป็นไปได้รวดเร็วยิ่งขึ้นและช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ค่อนข้างมาก

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของพืช/สาหร่ายทดสอบ รวมทั้งหมด 6 ชนิด ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส (mg/l) เป็นระยะเวลา 10 วัน

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส (mg/l)									
	วันที่									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. ต้นเลา Pre-Treatment	1,280.00	1,456.27	1,613.33	2,116.67	2,216.67	1,940.23	2,613.48	2,563.00	2,698.37	2,553.73
2. หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) Pre-Treatment	765.23	1,218.45	1,542.05	1,760.00	2,120.00	2,117.69	2,566.37	2,516.38	2,363.33	2,420.00
3. หญ้าคิงเนเปียร์ ปากช่อง 1 Pre-Treatment	841.32	1,856.47	1,916.67	1,720.36	2,110.00	2,326.67	2,786.37	2,814.63	2,461.53	2,520.00
4. อ้อยพลังงาน Pre-Treatment	686.29	865.13	1,367.90	1,523.28	1,846.28	2,021.15	1,738.21	1,462.43	1,358.34	1,287.16
5. สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ไม่ Pre-Treatment	1,968.47	2,240.00	2,543.33	2,560.40	2,683.33	2,793.33	3,750.00	3,916.67	4,236.25	4,124.61
6. สาหร่าย *Chlorella* sp. (J1) ไม่ Pre-Treatment	1,128.22	1,355.50	1,421.46	1,387.62	1,556.41	1,687.33	2,133.83	2,874.25	2,587.66	2,133.46



<u>ภาพที่ 5</u> แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของพืชทดสอบ 6 ชนิด ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส (mg/l) เป็นระยะเวลา 10 วัน

4. ทดสอบกระบวนการหมักของเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและเอนไซม์ในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลจากการหมักพืชทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) และสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด คือ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) และ *Chlorella* sp. (J1) เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีการย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้เร็วที่สุดในวันที่ 2 มีค่าน้ำตาลกลูโคสสูงสุด เท่ากับ 2.284 mg/ml รองลงมาคือ *Chlorella* sp. (J1) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง 1) หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จะสังเกตได้ว่าสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ในประเทศและต่างประเทศ และไม่ได้ผ่านการ Pre-treatment พบว่า มีการย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 1-3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาหร่ายขนาดเล็กมีผนังเซลไม่หนามากเท่ากับเส้นใยของพืชทดสอบ 4 ชนิด และจะสังเกตได้ว่าพืชทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) วันที่ 1-5 มีค่าเฉลี่ย

น้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.402-0.787 mg/ml ใกล้เคียงกันทั้ง 4 ชนิด น้อยกว่าสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 2 ชนิด ประมาณ 3 เท่า แต่มีแนวโน้มของปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นในวันที่ 4-5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยกับตัวอย่างพืชยังไม่สามารถย่อยโครงสร้างพืชได้หมด ดังนั้นยังคงต้องมีการศึกษาและปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ให้มากขึ้น เช่นเรื่องปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายโครงสร้างพืช ระยะเวลา เพื่อให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ควรมีการศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ควบคู่ไปพร้อมๆกัน

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักของพืช 6 ชนิด ได้แก่ ต้นเลา หญ้าคิงเนเปีย (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปีย (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) และ *Chlorella* sp. (J1) เป็นระยะเวลา 5 วัน

ตัวอย่างพืช	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)**				
	วันที่ 1	**วันที่ 2**	**วันที่ 3**	**วันที่ 4**	**วันที่ 5**
ต้นเลา	0.431	0.555	0.555	0.545	0.402
หญ้าคิงเนเปีย (ขอนแก่น)	0.582	0.530	0.605	0.687	0.610
หญ้าคิงเนเปีย (ปากช่อง 1)	0.569	0.570	0.650	0.787	0.710
อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ)	0.445	0.449	0.531	0.579	0.529
Chlorella pyrenoidosa (ADOA4)	1.929	2.284	2.112	1.880	1.655
Algae (J1)	1.533	1.585	1.755	1.258	1.147

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบการย่อยสลายเนื้อเยื่อพืช 4 ชนิดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วและสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด คือ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) และ *Chlorella* sp. (J1) โดยกระบวนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส ที่ความเข้มข้น 15 FPU/g substrate ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า*Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่ไม่ผ่านการ Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในวันที่ 9 มีค่าเท่ากับ 4,236.25 mg/l รองลงมาคือ *Chlorella* sp. (J1) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 8 มีค่าเท่ากับ 2,874.25 mg/l ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากหญ้าคิงเนเปียร์ ปากช่อง 1 ที่ผ่าน Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 8 เช่นเดียวกัน มีค่าเท่ากับ 2,814.63 mg/l รองลงมาคือ ต้นเลา Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในในช่วงวันที่ 7-9 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2,698.37 mg/l รองลงมาคือ หญ้าคิงเนเปียร์ (ขอนแก่น) และอ้อยพลังงาน ที่ผ่านการ Pre-treatment มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 2,566.37 mg/l

และ 2,021.15 mg/l ตามลำดับ และจากทุกตัวอย่างพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงเฉลี่ยอยู่ในช่วงวันที่ 6-9 จึงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะต่อการนำไปใช้หมักเป็นเอทานอลต่อไป

2. การหมักพืชพลังงาน ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง1) อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) และสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด คือ สายพันธุ์ของประเทศไทย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น *Chlorella* sp. (J1) เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีการย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้เร็วที่สุดในวันที่ 2 มีค่าน้ำตาลกลูโคสสูงสุด เท่ากับ 2.284 mg/ml รองลงมาคือ *Chlorella* sp. (J1) หญ้าคิงเนเปียร์ (ปากช่อง 1) หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) ตามลำดับ ดังนั้นสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ทั้งในและต่างประเทศที่นำมาใช้ทดสอบมามีแนวโน้มที่ให้น้ำตาลกลูโคสสูงใกล้เคียงกัน และสูงกว่าพืชพลังงานทั้ง 4 ชนิด น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาขยายแทนพืชพลังงานได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อย สามารถลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศได้ และลดสภาวะโลกร้อน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำข้อมูลพื้นฐานการทดสอบพืช/สาหร่ายสายพันธุ์จากต่างประเทศเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ท้องถิ่น ซึ่งจะนำไปใช้เป็นพืชพลังงานทางเลือกต่อไปได้ในอนาคต
2. สามารถนำเทคโนโลยีการย่อยสลายเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส จากเอนไซม์ และกระบวนการหมักเป็นเอทานอลจากเชื้อยีสต์ไปใช้ทดสอบกระบวนการหมักเป็นเอทานอลที่มีขนาดใหญ่และปริมาณมากขึ้นได้

เอกสารอ้างอิง

รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล ภรณี สว่างศรี บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ หทัยรัตน์ อุไรรงค์ ชยานิจ ดิษฐบรรจง และอลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2558. คัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาสมกับการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล. การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 (NCAP 2015). DP-13.

จักรพงศ์ สังโชติ นงรักษ์ เขียนปัญญา พุทธชาติ ประคำนอก วิภาดา ผลเจริญ. 2555. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยลำต้นธูปฤาษีด้วยกรดเพื่อการผลิตเอทานอล. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. 84 น.

นิรนาม. 2552. “สาหร่าย” พลังงานใหม่จากโลกใต้น้ำ. *ว. สื่อพลัง.* 1: 46 - 48.

ประมุข ภระกลูสุขสถิตย์. 2555. การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 137 น.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2548. สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย. โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย. 361 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 851 หน้า.

Anonymous. 2009. น้ำมันในอนาคตสกัดจากสาหร่าย. Vol.19, No.1, 2 น. http://www.Green.in.th.

Alvira, P., P. Tomas-Pejo, E. Ballesteros, M. and Negro, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : A review. Bioresour. Technol. 101 : 4851-4861.

Edward G.B. and D.C. Sigee. 2010. Introduction to Freshwater algae : Identification and Use as Bioindicators. John Wile & Sons, Ltd. 40 p.

Eriksson, K.E.L., R.A. Blanchette and P. Ander. 1990. Microbial and Enzymatic Degardation of Wod and Wood Component. Springer Verlag, Berlin. 407 p.

Goshadrou A., K. Karimi, and M.J. Taherzadeh. 2011. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by Mucor hiemalis. Ind Crops Prod 34 : 1219-1225.

Lali, A. 2008. Biotechnology for next generation biofuels/bioenergy. ICS Workshop Trieste. DBT-UICT centre of energy biosciences. Institute of chemical technology. Matunga, Mumbai. 20 p.

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

Obembe, O.O., E. Jacobsen, R.G.F. Visser and J. Vincken. 2006. Cellulose hemicelluloses networks as target for in plant a modification of the properties of natural fibres. Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 1 : 76-86.

Palmqvist, E. and B. Hahn-Hagerdal. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II : inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresour. Technol. 74 : 25-33.

Patrick L. and P. Sorgeloos. 2015. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture : Algae Growing Conditions. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Ghent, Belgium.

Taherzadeh, M.J. and K. Karimi. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production : A review. J. Mol. Sci. 9 : 1621-1651.

ภาคผนวก

ตารางผนวก อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสูตร Bold's Basal medium (Bold และ Wynne, 1978)

สารอาหาร	ความเข้มข้น
$NaNo_3$	0.025 กรัม/ลิตร
$K_2HPO_4.3H_2O$	0.075 กรัม/ลิตร
KH_2PO_4	0.175 กรัม/ลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.075 กรัม/ลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.025 กรัม/ลิตร
NaCl	0.025 กรัม/ลิตร
Ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA)	0.050 กรัม/ลิตร
KOH	0.031 กรัม/ลิตร
$FeSO_4$	0.050 กรัม/ลิตร
H_3BO_3	0.0114 กรัม/ลิตร
Trace element	1.000 มิลลิลิตร/ลิตร
น้ำกลั่น	999 มิลลิลิตร
pH	7.0
Trace element	
$MnCl_2.4H_2O$	0.0014 กรัม/ลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0088 กรัม/ลิตร
MoO_3	0.0007 กรัม/ลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.0016 กรัม/ลิตร
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.0005 กรัม/ลิตร
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร