รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

   กิจกรรม : การผลิตไบโอเอทานอลจากมวลชีวภาพ

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การผลิตเอทานอลจากชานอ้อยและฟางข้าวในระดับชุมชน

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Production of ethanol from bagasse and straw at community level.

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน นายพินิจ จิรัคคกุล ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น
นางสาวภรณี สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นายวุฒิพล จันทร์สระคู ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น
นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นายพยุงศักดิ์ รวยอารี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์มีวัตถุประสงค์คือ 1) เพื่อศึกษาผลของการปรับสภาพของฟางข้าว โดยใช้กรด /ด่าง ร่วมกับ เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (Aspergillus niger) 2) เพื่อศึกษาความสามารถของ *Pichia pastoris* X-33 และ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 ในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ไฮโดรไลเสทฟางข้าวเป็นสับสเตรท จากผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส ทางการค้า 0.5 ยูนิต ได้น้ำตาลกลูโคส 1.576 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการกำจัดสารพิษในไฮโดรไลเสทด้วย activated charcoal และหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 5 ชั่วโมง เท่ากับ 3.000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

6. คำนำ

พลังงานจากชีวมวล คือ พลังงานสะอาดที่ได้จากอินทรีย์สารของพืชหรือสัตว์ ได้แก่พืชเกษตรกรรม วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม พืชพลังงาน รวมทั้งขยะอินทรีย์และมูลสัตว์ มีการหมุนเวียนเกิดขึ้นใหม่ตลอดเวลา จัดเป็นพลังงานสีเขียวที่จะเข้ามาแทนที่เชื้อเพลิงจากฟอสซิลที่กำลังจะหมดไปในไม่ช้านี้ การใช้เชื้อเพลิงจากชีวมวลยังช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากพลังงานจากชีวมวลมีการปลดปล่อยมลพิษทางอากาศและสารพิษต่างๆ ออกมาน้อยกว่าพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล อีกทั้งยังเป็นการช่วยลดปริมาณขยะลงได้อีกมาก การนำชีวมวลเหล่านี้มาใช้ประโยชน์โดยนำมาแปรรูปเป็นพลังงานนั้นทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้งาน ในบรรดาแหล่งพลังงานชีวมวลทั้งหลายที่มีศักยภาพมากที่สุดนั้น แหล่งวัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง ซึ่งได้แก่ พวกเศษวัสดุจากการเกษตรเช่น ซังข้าวโพด (corn stover) เส้นใยข้าวโพด (corn fibre) ชานอ้อย (sugar cane bagasse) วัสดุเหลือทิ้งจากไม้ เช่น ขี้เลื่อยจากทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง พวกขยะจากกระบวนการแปรรูปอาหาร และเศษกระดาษ ฯลฯ เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจมากที่สุดเนื่องจากมีอยู่มากโดยเฉพาะพวกชานอ้อยและฟางข้าวพบว่ามีจำนวนมากหลายล้านตันในแต่ละปีในประเทศไทย ส่วนในระดับโลกเศษแหลือทิ้งจากอาหารที่เป็นพวกลิกโนเซลลูโลสิกมีมากถึง 3 พันล้านเมกากรัมต่อปี (Kusch *at al*., 2009) และเนื่องจากงานวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์จากลิกโนเซลลูโลสิกยังมีน้อย น่าจะถึงเวลาแล้วที่งานวิจัยควรจะหันทิศทางมาเพื่อพัฒนาการแปรรูปวัสดุที่มีเซลลูโลสเหล่านี้มาผลิตเป็นพลังงานทดแทนและผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่า (value-added products) ต่างๆ ให้มากยิ่งขึ้น (อรุณี, 2555)

กระบวนการผลิตเอทานอลที่ผลิตได้จากเซลลูโลส เป็นเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด เปลือกไม้ หรือจากต้นพืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับพืชที่มนุษย์บริโภค ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปีย ข้าวฟ่างหวาน สาหร่าย สบู่ดำ อ้อยพลังงาน (อรพิมพ์, 2553) วัตถุดิบดังกล่าวประกอบไปด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส และเรียกวัตถุดิบประเภทนี้ว่า วัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของพืช ซึ่งเกิดขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลุโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวหรือพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลสจึงมีคุณสมบัติและลักษณะทางเคมีเช่นเดียวกับเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้งที่ได้จากอ้อยหรือมันสำปะหลัง

กระบวนการผลิตเซลลูโลซิกเอทานอลจากพืชชีวมวล มีขั้นตอนตั้งแต่การปรับสภาพเบื้องต้น (pretreatment) ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสารประกอบจำพวกลิกนินที่ห่อหุ้มเฮมิเซลลูโลสและ

เซลลูโลสออกไป (Ververis *et al*., 2007) เนื่องจากสารประกอบเหล่านี้จะทำให้มีผลต่อขั้นตอนกระบวนการย่อยสลาย ถ้าไม่กำจัดออกจะทำให้การย่อยสลายได้ยาก หรือออาจทำให้เกิดสารอนุพันธ์ที่อาจมีผลต่อกระบวนการผลิตได้ (Mussatto *et al*., 2008) ซึ่งการปรับสภาพเบื้องต้นสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธี ได้แก่ 1. การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) เป็นการทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก เช่น การบด และใช้ความร้อน เป็นต้น 2. การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment) โดยใช้สารละลายกรดหรือด่างเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน 3. การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี-ฟิสิกส์ (physic-chemical pretreatment) เป็นการใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับสารเคมี เช่นการใช้สารละลายเบสเจือจางและความร้อนภายใต้ความดันสูงในการปรับสภาพ ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ NaOH ซึ่งเป็นการกำจัดลิกนิน เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสบางส่วนออกไปด้วย ดังนั้น การใช้ NaOH จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับพืชชนิดนั้นๆ ผลผลิตที่ได้จึงจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด (Wang *et al*., 2010) และ 4. การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment) เป็นการใช้เอนไซม์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรง (ประเวศ และคณะ, 2551)

กระบวนการย่อยสลาย (hydrolysis) คือการย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส และการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ของน้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม จะได้น้ำตาลไซโลส แมนโนส อะราบิโนส และกลูโคส ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Bosch *et al*., 2010) ซึ่งการย่อยสลายสามารถย่อยด้วยกรด เป็นการใช้กรดเจือจางภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง หรือ ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้จึงต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส จะช่วยย่อยสารในกลุ่มเซลลูโลสให้มีโมเลกุลเล็กลง เอนไซม์ไซลาเนส จะช่วยย่อยสารในกลุ่มลิกนิน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสถูกเรียกรวม ๆ กันว่าเฮมิเซลลูเลส ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดอย่างจำเพาะตามชนิดของสารตั้งต้นซึ่งมีเอนไซม์หลายชนิดเกี่ยวข้องเช่น อะราบิเนส ได้น้ำตาลอะราบิโนส กาแลกตาเนส แมนนาเนส ได้น้ำตาลแมนแนนและเอนไซม์ไซลาเนสได้น้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักเนื่องจากโครงสร้างของเซลล์พืชบกมีไซแลนถึง 80-95 % ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์จะเป็นวิธีที่นิยมกันมากเนื่องจากให้ปริมาณน้ำตาลที่สูงจึงเหมาะแก่การหมัก เอทานอล หลังจากการย่อยสลายได้น้ำตาลแล้วจะเข้าสู่กระบวนการหมัก (fermentation) เป็นการย่อยสลายน้ำตาลโดยใช้จุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ ทำให้เกิดเป็นเอทานอล จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการหมักในปัจจุบัน ได้แก่ เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจุดเด่นของ *S. cerevisiae* คือสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง 30-40 องศาเซลเซียส และทนอุณหภูมิสูงได้ (ธราพงษ์ และคณะ, 2553) Jeffries *et al*. (2007) ได้ศึกษายีสต์ *Pichia stipitis* ใน

การหมักน้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 41 กรัม ต่อน้ำตาล 1 ลิตร ปัจจุบันมีเทคโนโลยีการหมัก 2 แบบ ธราพงษ์ และคณะ (2553) ได้แก่ 1. การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch fermentation) ดังภาพที่ 2 เป็นการผสมหัวเชื้อลงในน้ำหมัก โดยเกิดขึ้นในถังหมักเพียงใบเดียว จนเสร็จสิ้นการหมักภายในเวลา 72 ชั่วโมง

Balat, M (2011) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัสดุที่มีลิกโนเซลลูโลสิกเป็นองค์ประกอบ พบว่ามีความเป็นไปได้สูงมากสำหรับการใช้วัสดุเหล่านี้มาผลิตเอทานอล

Alya Limayem และ Steven C. Ricke (2012) ชี้ว่าผลจากการขึ้นราคาน้ำมันดิบทำให้รัฐบาลของอเมริกาหันมาให้ความสนใจการผลิตเอทานอลจากพืชซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่มีความยั่งยืนมากกว่ามวลชีวภาพกำลังมีบทบาทสำคัญในการผลิตไบโอเอทานอลในช่วงหลายปีที่ผ่านมาและการผลิตระดับอุตสาหกรรมจะมุ่งเน้นไปยังขยายขนาดการผลิตด้วยต้นทุนต่ำโดยใช้วัสดุที่มีลิกโนเซลลูโลสิกเป็นองค์ประกอบโดยเฉพาะจากการเกษตรและป่าไม้ แม้ว่าการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสมีความเหมาะสมแต่ยังมีสิ่งรบกวนในกระบวนการหมักทำให้มีความสนใจลงทุนน้อย ในการวิจัยได้ชี้ให้เห็นถึงความคุ้มค่าและความสำคัญของการนำลิกโนเซลลูโลสิกมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลโดยการนำเทคโนโลยีต่าง ๆมาช่วยเช่น การดัดแปลงพันธุกรรม การศึกษาเทคนิคการพรีทรีตเมนต์เพื่อให้เกิดความคุ้มทุน

M. Vishnu (2012) ชี้ให้เห็นว่าการผลิตพลังงานทดแทนจากมวลชีวภาพชนิดลิกโนเซลลูโลสิกกำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก โดยมุ่งเน้นไปยังวัสดุธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม การพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอลเข้าสู่ยุคที่ 2 ได้แก่ลิกโนเซลลูโลสิกไบโอแมสซึ่งสนับสนุนทั้งด้านพลังงานและสิ่งแวดล้อมเป็นชีวมวลที่มีราคาถูก มีความยั่งยืน นำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างไม่มีขีดจำกัดและมีศักยภาพในการทดแทนพลังงานจากฟอสซิลได้อย่างหลากหลายในกลุ่มของพลังงานต่าง ๆ เช่นความร้อนพลังง่านไฟฟ้า น้ำมัน วัสดุและสารเคมีต่าง ๆ ลิกโนเซลลูโลสเป็นโครงสร้างหลักของเนื้อไม้และพืชที่ไม่ใช่เนื้อไม้ ให้ส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน การใช้องค์ประกอบหลักทั้ง 3 อย่างครบถ้วนจะเกิดความคุ้มค่าในทางเศรษฐศาสตร์ในการผลิตเอทานอลจากมวลชีวภาพ ขบวนการหมักไบโอแมสประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 5 ประการคือ การคัดเลือกชนิดของไบโอแมสที่เหมาะสม การทำพรีทรีตเมนต์ที่มีประสิทธิภาพ การผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส การหมักน้ำตาล 5 และ 6 โมเลกุลของคาร์บอนและขบวนการกลั่น ซึ่งปัจจุบันพบปัญหาด้านการพรีทรีตเมนต์และการขาดเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ

ประเทศไทยมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรปริมาณมากได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ใบอ้อย กากมันสำปะหลัง ทะลายปาล์ม เปลือกยูคาลิปตัส เป็นต้น หากนำมาเพิ่มมูลค่าโดยการหมักให้เป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอล ก็จะช่วยด้านการผลิตพลังงานทดแทนได้ดียิ่งขึ้น การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประสบความสำเร็จในหลายประเทศเช่นสหรัฐอเมริกา แคนาดา ยุโรป เป็นต้น สำหรับประเทศไทยเรายังคงมีวัตถุดิบกลุ่มแป้งและน้ำตาลปริมาณมาก ทำให้ประเทศไทยมีแหล่งพลังงานทดแทนที่มั่นคง แต่ในอนาคตเราก็จำเป็นต้องหาทางผลิตจากแหล่งอื่น ดังนั้นเราจึงต้องเร่งกระบวนการวิจัยด้านนี้ให้มากขึ้นเพื่อรองรับปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบพวกแป้งและน้ำตาลซึ่งเป็นพืชอาหารในอนาคต นอกจากนี้การผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสกำลังได้รับความสนใจจากหลายประเทศทั่วโลก มีการวิจัยอย่างกว้างขวาง มีโอกาสประสบความสำเร็จสูง เป็นเทคโนโลยีที่เราพัฒนาขึ้นเองได้โดยใช้วัสดุในท้องถิ่นและองค์ความรู้ที่มีในปัจจุบัน องค์ความรู้ที่ได้สามารถพัฒนาต่อยอดเข้าสู่วิสาหกิจชุมชนได้ เกิดการสร้างงานลดการนำเข้าประชาชนพึ่งตนเองได้

7. วิธีดำเนินการ

การปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยด่าง

นำวัสดุชีวมวลที่บดและทำให้แห้งแล้วจำนวน 50 กรัมละลายใน 5%NaOH ในอัตราส่วน 1 : 10 (W/V) บ่มตัวอย่างในอ่างน้ำร้อน 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองด้วยผ้า นำมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ด้วยเทคนิค DNS

การปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยกรด

นำวัสดุชีวมวลที่บดและทำให้แห้งแล้วจำนวน 50 กรัมละลายใน 1%HCl ในอัตราส่วน 1 : 10 (W/V) นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยผ้าแล้ว นำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ด้วยเทคนิค DNS

การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเปลี่ยนวัสดุชีวมวลให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์

นำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพวัสดุชีวมวลจำนวน 1 กรัม มาหมักด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสที่ผลิตได้จากฟางข้าวหรือกากมันสำปะหลังปริมาณเริ่มต้น 0.5 ยูนิต ในสารละลาย 10 ml ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความพีเอ็ช 4.8 ลงในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก นำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ในเครื่องเขย่า เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง การกำจัดสารพิษนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยด่าง กรดและเอนไซม์มาผสมกับผงถ่าน activated charcoal ในอัตราส่วน 20:1 w/w นำไปเขย่าบนแมกเนติกเสตอเรอร์เป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 เพื่อแยกเอาผงถ่านออกไป นำมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยเทคนิค DNS

การหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวโดยใช้ยีสต์

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

ทำการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Pichia pastoris* และ *Saccharomyces cerevisae* โดยเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ ในอาหารเหลว YEPD เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับปริมาณเซลล์ยีสต์ให้ได้ 8×10^{-9} cfu/ml

การหมัก

นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากข้างต้น มาเติมสารอาหารดังนี้ 1%KH2PO4, 0.5% (NH4)2SO4, 0.05% MgSO4.7H2O, และ 0.1% yeast extract ปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 โดยการเตรียมสารละลายปริมาตรรวม 100 มล. ในฟลาสก์แก้วขนาด 250 มล. นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS วัดปริมาณเอทานอลที่ได้ด้วยเทคนิค Flash distillation

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี
ระยะเวลาทำการทดลอง ปี 2559 – 2560

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองการปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยด่างและกรด

การปรับภาพด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้สารละลายกรด สารละลายด่าง เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูเลส ถ้าเป็นสารละลายกรดจะสามารถทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา ส่วนสารละลายด่างมีส่วนทำให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินละลายน้ำออกมา เพิ่มความสามารถในการพองตัวซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้แก่วัตถุดิบ นอกจากเป็นการสลายโครงสร้างเพื่อให้ง่ายต่อการไฮโดรซิสแล้ว ยังทำให้ทราบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการสลายพันธะ

จากผลการทดลองผลกระทบของการใช้กรดและด่างในการปรับสภาพวัสดุชีวมวล โดยใช้ฟางข้าวเป็นตัวอย่างชีวมวล พบว่าการปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยด่าง 5% NaoH ในอัตราส่วน ด่าง:ชีวมวล 1:10 เมื่อนำมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS method แล้วนำค่า OD ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานน้ำตาลกลูโคส พบว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ 1.280 mg/ml และการปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยกรด 1% HCL ในอัตราส่วน กรด:ชีวมวล 1:10 เมื่อนำมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS method แล้วนำค่า OD ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานน้ำตาลกลูโคส พบว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ 1.587 mg/ml ซึ่งให้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าการรับสภาพด้วยด่าง ดังนั้น การปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยกรด 1% HCL ในอัตราส่วน กรด:ชีวมวล 1:10 จึงเป็นการปรับสภาพชีวมวลที่เหมาะสมกับชีวมวลฟางข้าว

ผลการทดลองความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเปลี่ยนวัสดุชีวมวลให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์

ผลการทดลองพบว่า กระบวนการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุด คือ ปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส 0.5 (Unit/ml) ปริมาตร 500 ul และใช้ปริมาณวัสดุชีวมวล 1:10 (g/ml) ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 1.576 mg/ml เนื่องจากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ดีจึงให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูง การย่อยฟางข้าวโดยใช้กรดที่มีความเข้มข้นต่ำร่วมกับเอนไซม์จะสามารถเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลทำ ให้ได้น้ำตาลเป็นจำนวนมาก ได้แก่ กลูโคส,อะราบิโนส และไซโลส นอกจากนี้ยังมีผลพลอยได้อื่น ๆ ได้แก่ กรดอะซีติก, เฟอร์ฟูรอล

ตารางที่ 1 ผลการทดลองการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด 1% HCL และ 5% NaoH ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส

ตัวอย่าง	**ชั่วโมง**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)**
ฟางข้าว ปรับสภาพด้วย 5% NaoH	0	1.154
	24	1.321
	48	1.368
	72	1.393
ฟางข้าว ปรับสภาพด้วย 1% HCL	0	1.307
	24	1.372
	48	1.416
	72	1.576

ผลการทดลองการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว

สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากฟางข้าวหลังจากถูกนำไปหมักด้วยยีสต์ *P.pastoris* x-33 มีค่าลดลง จาก 1.314 เป็น 1.077 mg/ml ในวันที่ 7 ของการหมักเอทานอล ผลของการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิค Flash distillation ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 2.886 mg/ml ดังตารางที่ 2 สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากฟางข้าวหลังจากถูกนำไปหมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* Sc90 มีค่าลดลง จาก 1.314 เป็น 1.056 mg/ml ในวันที่ 5 ของการหมักเอทานอล ผลของการวิเคราะห์ปริมาณ เอทานอลด้วยเทคนิค Flash distillation ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 3.000 mg/ml ดังตารางที่ 3

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายฟางข้าว ด้วยเชื้อยีสต์ *P.pastoris* X-33 คือ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน และ การหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายฟางข้าว ด้วยเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* Sc90 คือ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 2 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวโดยใช้ยีสต์ *P.pastoris* X-33

ระยะเวลาหมัก (hr)	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)**	**ปริมาณเอทานอล (mg/l)**
0	1.314	0.000
24	1.102	1.072
48	1.098	1.412
72	1.091	2.244
96	1.085	2.384
120	1.081	2.588
144	1.072	2.686
168	1.077	2.886

ตารางที่ 3 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวโดยใช้ยีสต์ *S.cerevisiae* Sc90

ระยะเวลาหมัก (hr)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณเอทานอล (mg/l)
0	1.314	0.000
24	1.186	1.265
48	1.184	1.603
72	1.090	2.000
96	1.066	2.825
120	1.056	3.000
144	1.066	2.855
168	1.056	2.928

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ฟางข้าวมี องค์ประกอบของเซลลูโลส 30% เฮมิเซลลูโลส 50% และลิกนิน 15% ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพ (Pretreatment) เพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส ส่งผลให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ สามารถเข้าถึงและย่อยได้ง่ายวัสดุได้มากขึ้นในขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลในรูปแบบของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส เป็นต้น

การศึกษาผลของการปรับสภาพของฟางข้าว โดยใช้กรด /ด่าง ร่วมกับ เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (*Aspergillus niger*) จากผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์ เซลลูเลส ทางการค้า 0.5 ยูนิต ได้น้ำตาลกลูโคส 1.576 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาความสามารถของ *Pichia pastoris* X-33 และ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 ในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ไฮโดรไลเสทฟางข้าวเป็นสับสเตรท พบว่าเชื้อยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 5 ชั่วโมง เท่ากับ 3.000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดลองในครั้งนี้ ทำให้ทราบถึงการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทฟางข้าวที่มีอยู่อย่างแพร่หลายในท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าจากวัสดุต้นทุนต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถนำ ข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มผลได้เอทานอลและการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเพื่อลดต้นทุนในการหล่อน้ำเย็นในการหมักระดับถังหมัก

10. เอกสารอ้างอิง

ธราพงษ์ วิฑิตศานต์, นวดล เหล่าศิริพจน์ และประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ. 2553. รายงานสถานภาพของงานวิจัยและผลิตเอทานอลไบโอดีเซล ไบโอแก๊ส และน้ำมันชีวภาพในประเทศไทย. สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.)

ประเวศ ตุ้ยเต็มวงศ์, จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร, ปิยรัตน์ บุญแสวง และธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2552. การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. สำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง. วารสารสิ่งแวดล้อม. ปีที่ 16 เล่มที่ 2. 8 น.

Alya Limayem , Steven C. Ricke , 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production : Current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in Energy and Combustion Science. 38(4) : 449-467.

Balat M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via biochemical pathway : A review. Energy Conversion and Management. 52(2) : 858-875. http://www.scopus.com/record/display.

Bosch P., Wallberg O., Joelsson E., Galbe M. and G. Zacchi. 2010. Impact of dual temperature profilein dilute acid hydrolysis of spruce for ethanol production. Biotechnology for Biofuels. 3: 15.

Jeffries T.W., Grigoriev I.V., Grimwood J., Laplaza J.M., Aerts A., Salamov A., Schmutz J., Lindquist E., Dehal P., Shapiro H., Jin Y.S., Passoth V. and Richardson P.M. 2007. Genome sequence of the lignocelluloses-bioconverting ans xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. Nature Biotechnology. 25 (3) : 319-326.

Kusch S. and M.V. Morar. Integration of lignocellulosic biomass into renewable energy generation concepts. ProEnvironment 2, 32-37.

Mussatto S.I., Fernandes M., Milagres A.M.F. and Roberto I.C. 2008. Effect of

hemicelluloses and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. Enzyme and Microbial Technology. 43 : 124-129.

Ververis C., Georghiou, K., Danielidis D., Hatzinikolaou D.G., Santas P., Santas R. and Corleti V. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. Bioresource Technology 98 : 296-301.

Zhu J.Y., Zhuang X.S., 2012. Conceptual net energy output for biofuel production from lignocellulosic biomass through biorefining. Progress in Energy and Combustion Science. 38(4) :583-598.

11. ภาคผนวก

การวิเคราะห์ ปริมาณกลูโคสโดยใช้ สาร Dinitrosalicylic acid (DNS)

1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยชั่งกลูโคส มา 0.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น ปรับริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml จะได้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 1.0 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1.0 mg/ml

2 เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml ในหลอด

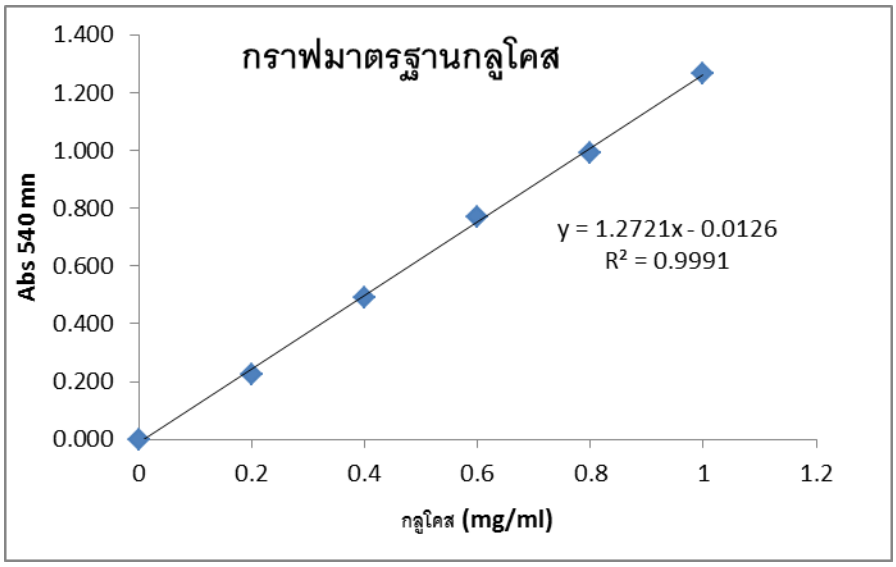
3 เติม DNS reagent 0.5 ml ลงไปในหลอด

4 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อทำปฏิกิริยาแล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

5 นำไปวัดค่า OD520 นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นกลูโคส} = \frac{(\text{ค่า OD520 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



การวิเคราะห์ ปริมาณเอทานอลโดยวิธี Flash distillation

สารเคมี

สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในกรดซัลฟิวริ ก 0.5 โมลาร์ละลายโพแทสเซียมไดโครเมตหนัก 29.4 กรัม ในสารละลายกรดซัลฟิวริก 98% ปริ มาตร 25.6 มิลลิลิตร ปรับปริ มาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ เพื่อใช้เตรียมสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐานค่าความเข้มข้นในช่วง 2 ถึง 10กรัมต่อลิตร

วิธีเตรียม: เจือจางแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ ด้วยน้ำกลันให้มีความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 10 กรัมต่อลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ปริมาณแอลกอฮอล์ : ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มี ความเข้มข้นขอแอลกอฮอล์โดยประมาณให้มีในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 10 กรัมต่อลิตร แล้วจึงปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ทาการเจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในกรดซัลฟิวริก 0.5 โมลาร์ ปริ มาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ ลงในหลอดฝาเกลียวปิดสนิท เติมน้ำกลันลงไป 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นนาไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบระยะเวลานาไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 2 นาทีทันที จากนั้นจึงนาสารละลาย ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงโดยเทียบกับสารละลายแบลงค์ นำไปอ่านค่าความเข้นข้นของแอลกอฮอล์บนกราฟของสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐาน