ผลของความร้อนและสารเคมีในการปรับสภาพขั้นต้น สำหรับการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร

นายปรเมษฐ สุขชุ่ม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECT OF THERMO-CHEMICAL PRETREATMENT ON BIOETHANOL PRODUCTION FROM AGRO-INDUSTRAIL RESIDUALS

Mr. Poramate Sukchum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Environmental Engineering

Department of Environmental Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของความร้อนและสารเคมีในการปรับสภาพขั้นต้นสำหรับการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร
โดย	นายปรเมษฐ สุขชุ่ม
สาขาวิชา	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ชวาลภาฤทธิ์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชวลิต รัตนธรรมสกุล)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ชวาลภาฤทธิ์)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนัสกร ราชากรกิจ)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนาธิป ผาริโน)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มณีรัตน์ องค์วรรณดี)

ปรเมษฐ สุขชุ่ม : ผลของความร้อนและสารเคมีในการปรับสภาพขั้นต้นสำหรับการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร (EFFECT OF THERMO-CHEMICAL PRETREATMENT ON BIOETHANOL PRODUCTION FROM AGRO-INDUSTRIAL RESIDUALS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. อรทัย ชวาลภาฤทธิ์, 92 หน้า.

การศึกษา ผลของความร้อนและสารเคมีในการปรับสภาพขั้นต้น เพื่อผลิตเอทานอลจากชานอ้อยและซังข้าวโพด โดยปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟุริก ซึ่งแปรผันอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนที่ 120-170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-30 นาที แล้วย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นหมักด้วยเชื้อ *Zymomonas mobilis* โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลาย จากผลการทดลองพบว่า วิธีการปรับสภาพสำหรับซังข้าวโพด คือ การแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในสารละลายกรดซัลฟุริกร้อยละ 1 ส่วนวิธีการปรับสภาพสำหรับชานอ้อย คือ การแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำตะกอนซังข้าวโพดและชานอ้อยข้างต้นมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 10 FPUต่อกรัมตะกอนในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.40 และ 0.42 กรัมต่อกรัมชีวมวล โดยมีร้อยละการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 40.26 และ 41.89 ตามลำดับ จากนั้นเมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยมาทำการหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมที่พีเอชประมาณ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ได้เอทานอล 0.22 และ 0.14 มิลลิลิตรต่อกรัมชีวมวล คิดเป็นร้อยละ 35.93 และ 26.21 ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ ซึ่งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และการหมักด้วยเชื้อผสมระหว่าง *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae*

ภาควิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต……..……...

สาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่ออ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก……..…..

ปีการศึกษา.....2554.....

##5270381121 : MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING
KEYWORDS : ETHANOL/ THERMO-CHEMICAL PRETREATMENT/ CELLULOLYSIS/ LIGNOCELLULOSIC MATERIAL

PORAMATE SUKCHUM : EFFECT OF THERMO-CHEMICAL PRETREATMENT ON BIOETHANOL PRODUCTION FROM AGRO-INDUSTRAIL RESIDUALS. ADVISOR : ASSOC. PROF ORATHAI CHAVALPARIT, Ph.D., 92 pp.

Effect of thermo-chemical pretreatment on bioethanol production from corncobs and bagasses were investigated. The pretreatment conditions used NaOH, H_2SO_4 and heating. The temperature were varied for 120 to 170 °C at 5 to 30 min. The result showed that the optimal pretreatment conditions of corncobs were treated with 2 % (w/v) NaOH for 24 hr, digestion in 1 % (v/v) H_2SO_4 and heated at 170 °C for 5 min. For bagasses, the optimal pretreatment conditions were treated with 2 % (w/v) NaOH for 24 hr. The result of enzyme digestion of both pretreated biomass at optimized condition showed that the level of reducing sugar were obtained at 0.40 and 0.42 g/g biomass respectively. The optimum conditions were achieved at cellulase loading 10 FPU/g in citrate buffer pH 5.0 at 50 °C and digestion time 4 hr. After that the reducing sugar solution was fermented with *Zymomonas mobilis* at 30 °C, pH 5.0 and reducing sugar 5 mg/ml for 48 hr. The result showed that corncobs and bagasses had the highest ethanol yield of 0.22 and 0.14 ml/g biomass which were 35.93 and 26.21 % respectively of the theoretical ethanol yield when compared with *Saccharomyces cerevisiae* and co-fermentation of *Z. mobilis* and *S. cerevisiae*.

Department : Environmental Engineering Student's Signature……..…...
Field of Study : Environmental Engineering Advisor's Signature……
Academic Year : 2011 .

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร . อรทัย ชวาลภาฤทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ แนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆ รวมถึงการให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์นี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร . วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล ที่ให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ อำนวยความสะดวกในการวิจัย รวมถึงแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์นี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์รองศาสตราจารย์ ดร.ชวลิต รัตนธรรมสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนัสกร ราชากรกิจ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนาธิป ผาริโน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณีรัตน์ องค์วรรณดี ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอน และถ่ายทอดความรู้แก่ผู้ทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงานที่สนับสนุนเงินทุนเพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนเงินทุนเพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณบริษัท เบรนน์แท็ก อินกรีเดียนส์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องเอนไซม์เซลลูเลสในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความรัก กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา จนประสบความสำเร็จ

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุกความช่วยเหลือที่มีให้จนประสบความสำเร็จ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…… จ

กิตติกรรมประกาศ…….... ฉ

สารบัญ……... ช

สารบัญตาราง…… ญ

สารบัญภาพ…… ฎ

บทที่ 1 บทนำ…… 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา…….. 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย…… 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย…… 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……. 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….. 4

2.1 เอทานอลจากเซลลูโลส……... 4

2.1.1 Gasification……. 4

2.2.2 Cellulolysis…….. 5

2.2 6

วมวลของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้ในการผลิตเอทานอล……...

2.2.1 องค์ประกอบของชีวมวลในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส…….. 6

2.2.2 ซังข้าวโพด…….. 9

2.2.3 ชานอ้อย…….. 11

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอลแบบ Cellulolysis……. 15

2.3.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ…… 15

2.3.2 การย่อยหรือไฮโดรไลซิส……... 16

2.3.3 การเตรียมหัวเชื้อและการหมัก…… 18

2.3.4 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์…….…… 21

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….. 21

2.4.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวมวลที่ศึกษา…….. 21

2.4.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวมวลอื่น……. 24

บทที่ 3 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และขั้นตอนดำเนินงานวิจัย……... 32

หน้า

3.1 แผนผังขั้นตอนการวิจัย..... 32
3.2 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 34
3.2.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์..... 34
3.2.2 เคมีภัณฑ์..... 34
3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย..... 35
3.3.1 การเตรียมชีวมวล..... 35
3.3.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟุริก และความร้อน..... 36
3.3.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 39
3.3.4 ศึกษาการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลปรับสภาพ ด้วย *Z. mobillis*..... 41
3.4 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์..... 45
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล..... 46
4.1 ลักษณะชีวมวลที่ใช้ในการทดลอง..... 46
4.2 การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยกรดซัลฟุริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน..... 47
4.2.1 การปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริก..... 47
4.2.2 การปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกร่วมกับความร้อน..... 48
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส... 53
4.3.1 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 53
4.3.2 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ..... 54
4.3.3 ผลของระยะเวลาในการย่อยสลายที่มีต่อการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ..... 55
4.4 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ..... 60

หน้า

4.4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis*…….. 60
4.4.2 ผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อ *Z. mobilis*……... 61
4.4.3 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วย *Z. mobilis* โดยกระบวนการหมัก ชนิดกึ่งกะ (Fedbatch)……. 63
4.4.4 ศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* และเชื้อผสมระหว่าง *Z. mobilis* กับ *S. cerevisiae*……. 64
4.5 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อย……..…… 66
4.6 การประเมินศักยภาพของการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อย….. 70
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ……. 72
5.1 สรุปผลการวิจัย……... 72
5.2 ข้อเสนอแนะ……... 73
รายการอ้างอิง…….…… 74
ภาคผนวก……... 79
ภาคผนวก ก……...…… 80
ภาคผนวก ข……... 83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…….. 92

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ศักยภาพชีวมวลของประเทศไทยปี 2550/2551…….. 8
2.2 สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลในประเทศและต่างประเทศ…… 28
3.1 พารามิเตอร์ที่ทำการวิเคราะห์…… 45
4.1 ร้อยละขององค์ประกอบในชีวมวล…… 46
4.2 เปรียบเทียบองค์ประกอบชีวมวลชนิดต่างๆ……..…… 47
4.3 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการ
ปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ……... 52
4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ…….. 56
4.5 เปรียบเทียบผลการย่อยสลายชีวมวลให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในงานวิจัยนี้และ
งานวิจัยอื่น…….. 58
4.6 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ของซังข้าวโพดและชานอ้อย.. 62
4.7 เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อย……... 66
4.8 เปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลที่ได้จากการย่อยสลายและหมักเซลลูโลสที่
ใช้ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ……. 68
4.9 เปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลที่ได้จากการย่อยสลายและหมักเซลลูโลสที่
ใช้ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ……..… 69
4.10 ประมาณการการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพด…….. 70
4.11 ประมาณการการผลิตเอทานอลจากอ้อย……. 71

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส..... 7
2.2 สูตรโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส..... 7
2.3 สูตรโครงสร้างของลิกนิน..... 8
2.4 ซังข้าวโพด..... 9
2.5 กระบวนการผลิตอาหารสัตว์..... 11
2.6 ชานอ้อย..... 12
2.7 กระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย..... 14
2.8 ลักษณะของลิกโนเซลลูโลสภายหลังจากการปรับสภาพ..... 16
2.9 กระบวนการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส..... 17
2.10 กระบวนการเอทเนอร์-ดูโดรอฟฟ์ของ *Z. mobilis*..... 19
3.1 แผนผังขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... 33
3.2 แผนผังการทดลองศึกษาการปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริก..... 36
3.3 แผนผังการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกและความร้อน..... 37
3.4 แผนผังการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ..... 39
3.5 แผนผังการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในหมักชีวมวล..... 41
4.1 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายองค์ประกอบเซลลูโลสของซังข้าวโพดและชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมี..... 48
4.2 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกร่วมกับความร้อน..... 49
4.3 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อการปรับสภาพชานอ้อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกร่วมกับความร้อน..... 50
4.4 ร้อยละขององค์ประกอบในชีวมวลเมื่อปรับสภาพที่สภาวะเหมาะสม..... 52
4.5 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 53

4.6 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส…….. 54
4.7 ปฏิกริยาการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส…….. 55
4.8 ปริมาณเอทานอลจากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากซังข้าวโพดและชานอ้อย…….. 62
4.9 ปริมาณเอทานอลจากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์แบบกึ่งกะเปรียบเทียบกับแบบกะ.. 64
4.10 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ซังข้าวโพดโดยเปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด…… 65

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนกำลังได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากปัญหาการขาดแคลนพลังงานทั่วโลก เอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมได้ ซึ่งเอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอร์ (Ethyl Alcohol) มีสูตรเคมี คือ C_2H_5OH เป็นแอลกอฮอร์ชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น สามารถผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดจากการนำพืชมาย่อยสลายเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์หรือสารเคมีบางชนิดช่วยในการย่อย สลาย และ หมักด้วยจุลินทรีย์เพื่อ เปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ แล้วทำให้แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการกลั่นและแยกน้ำ เพื่อนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ รวมถึงการนำไปผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิง กระบวนการผลิตเอทานอล ในปัจจุบัน จะผลิตจากพืชจำพวกแป้ง หรือน้ำตาล รวมทั้ง กากน้ำตาล ซึ่งพืชที่เหมาะสมสำหรับเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลในประเทศไทย ได้แก่ มันสำปะหลัง และอ้อย แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเพื่อนำ วัสดุเหลือใช้จากการเก็บเกี่ยวพืชผลทางการเกษตร หรือเศษวัสดุจากพืชมาผลิตเอทานอล โดยเอทานอลที่ผลิตได้จากมวลชีวภาพอาจเรียกอีกอย่างว่า ไบโอเอทานอล (Bioethanol) (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2552)

วัสดุเหลือ ทิ้ง ทาง อุตสาหกรรม การเกษตรเป็นแหล่ง วัตถุดิบ หนึ่งที่ได้รับสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ในการนำมาผลิตเป็นเอทานอล เนื่องจากหาได้ง่าย ราคาถูก และมีสารอาหารเหลืออยู่ในปริมาณที่น่านำกลับมาใช้ประโยชน์ได้ ชานอ้อย และ ซังข้าวโพด เป็นวัสดุเหลือ ทิ้งที่มีปริมาณมากถึง 8 และ 0.32 ล้านตันต่อปี มีปริมาณเซลลูโลสสูงร้อยละ 33.4 และ 45 ตามลำดับ และยังสามารถรวบรวมได้ง่ายจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลและอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งการจัดการ วัสดุเหลือ ทิ้งเหล่านี้ในปัจจุบัน จะนำไปเผาเป็นเชื้อเพลิงบางส่วน ถ้าสามารถนำเซลลูโลส ดังกล่าวมาทำการแปรรูปเป็นเอทานอล จะทำให้ช่วย เพิ่มมูลค่าของเสีย ช่วยลดปัญหามลพิษจากการเผาทิ้งวัสดุดังกล่าว และยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงขึ้นด้วย (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2551)

การนำเซลลูโลสจากวัสดุเหลือใช้ทางอุตสาหกรรมการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต้องประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ คือ ขั้นตอนที่ 1.การปรับสภาพ ชีวมวล (Pretreatment) เพื่อกำจัดองค์ประกอบอื่นได้แก่ ลิกนิน (Lignin) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

และทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างที่เหมาะสมและเพิ่มพื้นที่ในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางเป็นวิธีที่นิยมพัฒนานำมาใช้ในการผลิตระดับโรงทดลองนำร่องและระดับโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้แล้ว ยังกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกไปได้บางส่วน ส่วนการปรับสภาพด้วย ด่างเป็นวิธีที่ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำกว่าวิธีอื่นโดยเกิดได้ที่อุณหภูมิห้อง สามารถ กำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้เป็นอย่างดี ขั้นตอนที่ 2. การย่อยสลายเซลลูโล ส (Hydrolysis) ด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ การใช้เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงสูง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ภาวะกลาง ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ และยังลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสีย (Wyman, 1994) ขั้นตอนที่ 3.การหมัก (Fermentation) เป็นการนำน้ำตาลรีดิวซ์มาใช้ในการผลิตเอทานอล โดยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด แต่ที่สำคัญคือ *Zymomonas mobilis* และยีสต์ ซึ่งสามารถสร้างเอทานอลได้ปริมาณมาก เจริญได้ในสภาวะน้ำตาลเข้มข้นสูง หรือ ในสภาวะ ที่มีกรด หรือเอทานอลสูง

งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากชีวมวล ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม 2 ชนิดได้แก่ ชานอ้อยและซังข้าวโพด โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยความร้อนและสารเคมี ได้แก่ กรดซัลฟุริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วศึกษา สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอทานอล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลกระทบของของความร้อนและชนิดสารเคมี ที่มีต่อปริมาณและองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในชานอ้อยและซังข้าวโพด โดยการปรับสภาพด้วยความร้อน กรดซัลฟุริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2. ศึกษาผลกระทบของพีเอชและความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส ที่มีต่อการย่อยสลายเซลลูโลสของชานอ้อยและซังข้าวโพด

3. ศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม ในการหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิตเอทานอล

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีขอบเขตการศึกษา ดังนี้

1. การทดลองผลิตเอทานอลจากชีวมวล ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม 2 ชนิด ได้แก่ ชานอ้อย และซังข้าวโพด

2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วย วิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี โดยใช้ สารละลาย กรดซัลฟุริกและ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2 ตามลำดับ และปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ 3 ระดับตั้งแต่ 120 - 170 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาแตกต่างกันตั้งแต่ 5 – 30 นาที แล้วเปรียบเทียบกับชุดที่ใช้สารเคมีอย่างเดียว และชุดควบคุมที่ไม่มีการปรับสภาพ

3. ศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลส ด้วยเอมไซม์เซลลูเลสโดยปรับเปลี่ยน ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส ตั้งแต่ 1 - 120 FPU ต่อกรัมชีวมวล ทดลองที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4.5 – 6.5 และระยะเวลาการย่อยสลาย 0 - 48 ชั่วโมง

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมใน การหมักน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วย *Z. mobilis* โดยปรับเปลี่ยนพีเอชเริ่มต้นในการหมักตั้งแต่ 4.5 - 6.5 และระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักตั้งแต่ 0 – 7 วัน

5. พารามิเตอร์ที่ตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณองค์ประกอบต่างๆในชีวมวล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณเอทานอล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการ ปรับสภาพขั้นต้นสำหรับการ ผลิตเอทานอล จากชีวมวลทั้ง 2 ชนิด

2. สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประยุกต์นำชีวมวลดังกล่าวไปใช้ในการผลิตเอทานอลในภาคชุมชนและอุตสาหกรรม

3. ส่งเสริมการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรให้มีประโยชน์และมีมูลค่าสูงขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอลจากเซลลูโลส (Cellulosic Ethanol) (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2550)

เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลส เป็นเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบหลักประเภทกากอ้อย ซังข้าวโพด ฟางข้าว และเปลือกไม้ วัตถุดิบดังกล่าวประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic Material) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์พืช ซึ่งเกิดขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวหรือโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส การผลิตเอทานอลส่วนใหญ่ใช้วัตถุดิบหลัก 2 ประเภท คือ น้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล และแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพด จึงเริ่มมีความกังวลว่าวัตถุดิบดังกล่าวอาจไม่เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลในระยะข้างหน้า และเป็นการนำพืชอาหารมาใช้ผลิตเอทานอล ดังนั้น ปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลในหลายประเทศจึงมุ่งเน้นไปที่วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสซึ่งเป็นเศษเหลือใช้ที่ได้จากพืชแทน

เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลสมีวิธีการผลิต มี 2 วิธีหลัก ได้แก่

2.1.1 Gasification

Gasification คือ การเปลี่ยนชีวมวลซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ให้กลายเป็นก๊าซที่เผาไหม้ได้หรือ การแตกสารประกอบประเภทคาร์บอนของเซลลูโลสให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (Carbon Monoxide) คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon Dioxide) และไฮโดรเจน (Hydrogen) โดยกระบวนการดังกล่าวเป็นการเผาไหม้อินทรียสารแบบจำกัดปริมาณออกซิเจน ทำให้เกิดการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ จากนั้นหมักด้วยจุลินทรีย์กลายเป็นแอลกอฮอล์ ผ่านการกลั่นและแยกน้ำจนเป็นเอทานอล แต่มีข้อจำกัดคือ ควรมีคุณสมบัติของเชื้อเพลิงที่เหมาะสมในการป้อนเตาแก๊สซิไฟเออร์ ดังนี้

- มีขนาดที่เหมาะสม และสม่ำเสมอ

- มีความชื้นน้อย เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่ดี (ไม่ควรเกินร้อยละ 20-30)
- มีความหนาแน่นเชื้อเพลิง (Bulk density) เหมาะสมและสม่ำเสมอ

ข้อดีของระบบแก๊สซิฟิเคชั่น คือ เหมาะกับระบบการผลิตไฟฟ้าขนาดเล็ก (ต่ำกว่า 1 เมกะวัตต์) จึงเหมาะสมกับบริเวณที่มีปริมาณเชื้อเพลิงจำกัด และเหมาะสมกับหมู่บ้านชนบทที่กระแสไฟฟ้าเข้าไม่ถึง

ข้อเสียของระบบแก๊สซิฟิเคชั่น คือ มีน้ำมันดิน หรือทาร์ (Tar) ผสมในก๊าซเชื้อเพลิง ทำให้ต้องหาทางกำจัด หรือทำให้น้อยลง เพื่อไม่ให้มีปัญหาต่อการทำงานของเครื่องยนต์ นอกจากนี้ถ้าออกแบบระบบการเผาไหม้ไม่ดี และมีคุณภาพเชื้อเพลิงที่ไม่สม่ำเสมอ (ขนาด ความชื้น ปริมาณขี้เถ้า ค่าความร้อน) จะส่งผลให้ก๊าซเชื้อเพลิงที่ได้มีคุณภาพไม่แน่นอน และการผลิตไฟฟ้าจะไม่สม่ำเสมอ

2.1.2 Cellulolysis

Cellulolysis คือ การย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส แล้วหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยจุลินทรีย์ กลายเป็นแอลกอฮอล์ ผ่านการกลั่นและแยกน้ำจนเป็นเอทานอล โดยวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ส่วนมากวัตถุดิบประเภทนี้จะเป็นผลพลอยได้จากเกษตรกรรม และอุตสาหกรรมเกษตร ได้แก่ ซังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว และของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ เป็นต้น ส่วนใหญ่วัตถุดิบในกลุ่มนี้จะทนต่อการย่อยสลายมาก ดังนั้นขั้นตอนการผลิตเอทานอลจึงซับซ้อนมากกว่าวัตถุดิบจากแป้งและน้ำตาล

ข้อดีของการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส มีดังนี้

- วัตถุดิบสามารถหาได้ง่าย เนื่องจากเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของพืชหลายประเภท และสามารถนำส่วนของพืชที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ อาทิ ฟางข้าว ซังข้าวโพด และกากอ้อย มาผลิต
- การผลิตและใช้เอทานอลจากเซลลูโลสช่วยลดก๊าซเรือนกระจกได้ถึงร้อยละ 85 ของการผลิตและใช้น้ำมันเบนซิน ขณะที่การผลิตและใช้เอทานอลที่ผลิตจากแป้งช่วยลดก๊าซเรือนกระจกเพียงร้อยละ 18-29
- ช่วยลดปัญหาการนำพืชอาหารที่ใช้บริโภคไปผลิตเอทานอล เพราะเซลลูโลสเป็นส่วนของพืชที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ วัตถุดิบที่นำมาผลิตจึงไม่ใช่อาหารที่มนุษย์บริโภค

- ทำให้มีปริมาณวัตถุดิบใช้ผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นเนื่องจากสามารถนำส่วนต่าง ๆ ของพืชมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น อาทิ น้ำอ้อยนำมาผลิตเอทานอลด้วยวิธีการเดิม ขณะที่กากอ้อยนำมาผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส

2.2 ชีวมวลของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม, 2551)

ชีวมวลแปลมาจากศัพท์ภาษาอังกฤษว่า "Biomass" ประกอบด้วยคำสองคำคือ ชีวะและมวล ชีวะคือสิ่งมีชีวิตเช่นมนุษย์ พืช และสัตว์ มวลคือวัตถุสิ่งของต่างๆ ดังนั้น ชีวมวล หมายถึงวัตถุหรือสสารที่ได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น ข้าว รำ แกลบ และฟางข้าวได้มาจากต้นข้าว เป็นต้น อีกความหมายหนึ่งของชีวมวลคือ สารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งกักเก็บพลังงานจากธรรมชาติและสามารถนำมาใช้ผลิตพลังงานได้ เช่น เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือกากจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมการเกษตร ชีวมวลเป็นแหล่งเชื้อเพลิงราคาถูก หากมีการใช้ประโยชน์ในบริเวณที่ไม่ไกลจากแหล่งเชื้อเพลิงมากนัก การนำชีวมวลมาใช้จึงช่วยลดการสูญเสียเงินตราต่างประเทศในการนำเข้าเชื้อเพลิง และสร้างรายได้ให้กับคนท้องถิ่น นอกจากนี้ การผลิตพลังงานจากเชื้อเพลิงชีวมวลด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสมจะไม่ก่อให้เกิดมลภาวะและไม่สร้างสภาวะเรือนกระจก เนื่องจากการปลูกทดแทนทำให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดการหมุนเวียน และไม่มีการปลดปล่อยเพิ่มเติม เพื่อให้มีความเข้าใจยิ่งขึ้นได้ นิยามความหมายชีวมวลในที่นี้ว่า "เศษวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปสินค้าทางการเกษตรหรือจากการเก็บเกี่ยว"

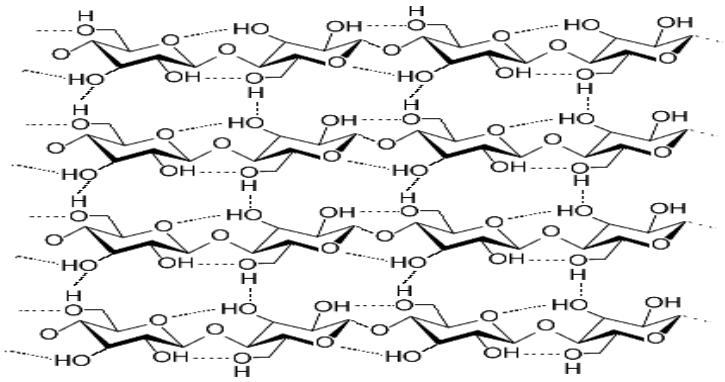
2.2.1 องค์ประกอบของชีวมวลในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

เซลลูโลส เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ สูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เกิดจากกลูโคสประมาณ 50,000 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว แต่ละสายของสายของเซลลูโลสเรียงขนานกันไป มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสาย ทำให้มีลักษณะเป็นเส้นใยสะสมไว้ในพืช ไม่พบในเซลล์สัตว์ เซลลูโลสเมื่อถูกย่อยจะแตกตัวออกให้น้ำตาลกลูโคสจำนวนมาก 1 ,000-10,000 โมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุล 200,000-2,000,000 หน่วยย่อยพื้นฐานคือ เซลโลไบโอสซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิก โดยที่ไม่มีการแตกแขนง โมเลกุลของเซลลูโลสมีความเสถียรมาก เซลลูโลสสามารถแบ่งได้ 3 ชนิดตามลักษณะการละลายในกรดหรือด่าง คือ

1) แอลฟาเซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่แท้จริงไม่สามารถละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

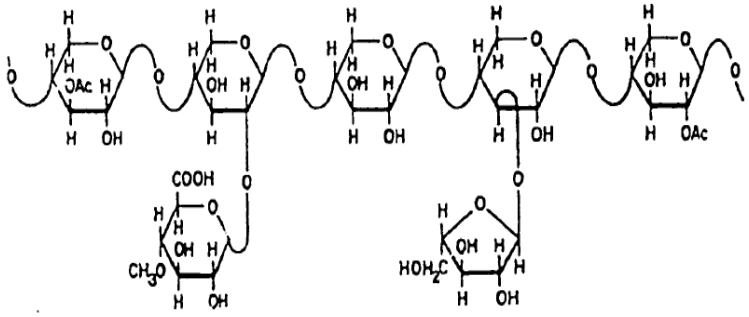
2) เบต้าเซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

3) แกมมาเซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ดีในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสและสารละลายกรดเจือจาง แต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกลอฮอร์



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส (http://th.wikipedia.org/wiki/)

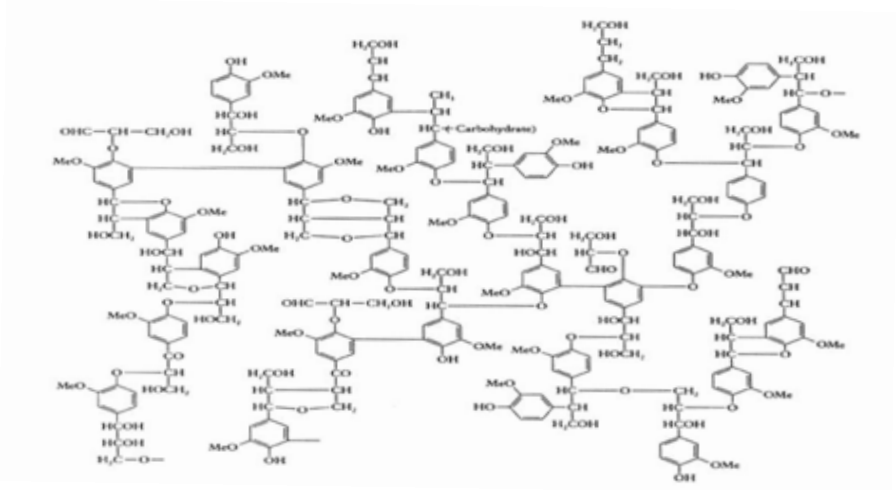
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เป็นพอลิแซกคาไรด์ชนิดหนึ่งซึ่งคล้ายเซลลูโลสแต่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น กลูโคส กาแลกโตส แมนโนส อะราบิโนส ไซโลส รวมทั้งกรดกลูคูโรนิก และกาแลกทูโรนิก เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยรวมอยู่กับลิกนิน



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Ericksson, Blanchette และ Ander, 1990)

ลิกนิน (Lignin) เป็นสารประกอบโพลิเมอร์เชิงซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่รวมกับเซลลูโลส เป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิดซึ่งเป็นสารอะโรมาติก ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืช

ที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (Lignase) หรือลิกนินเนส (Ligninase) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในรา



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของลิกนิน (Glazer และ Nikaido, 1995)

ชีวมวลในประเทศไทยมีหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งควรพิจารณาความเหมาะสมด้านศักยภาพในการนำมาใช้ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ศักยภาพชีวมวลของประเทศไทยปี 2550/2551 (กระทรวงพลังงาน, 2551)

ชีวมวล	ปริมาณชีวมวล (ตัน)	ค่าความร้อน (MJ/kg)	พลังงาน (GJ)	เทียบเท่าน้ำมันดิบ (ktoe)	กำลังไฟฟ้า (MW)
ชานอ้อย	22,050,300	16.21	357,435,363	8,461	97.2
ฟางข้าว	35,581,000	15.51	551,810,992	13,064	152.3
ซังข้าวโพด	807,310	16.63	13,425,565	318	3.7
ทะลายปาล์ม	2,130,270	19.41	37,221,547	881	10.2
กะลาปาล์ม	554,840	21.13	11,744,899	278	3.1
ไม้ยูคาลิปตัส	1,360,000	16.85	22,916,000	542	6.2
ขี้เลื่อยไม้ยางพารา	940,980	16.65	1,581,417	37	0.3
เหง้ามันสำปะหลัง	255,550	10.61	2,668,945	63	0.6

จากการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับชีวมวลชนิดต่างๆ พบว่า ชานอ้อยและซังข้าวโพดเป็นชีวมวลที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเอทานอล เนื่องจากชีวมวลดังกล่าวมีปริมาณมากในอันดับต้นๆ และเป็น

ชีวมวลที่ได้จากภาคอุตสาหกรรมน้ำตาล ข้าวโพดและแป้ง สามารถรวบรวมมาใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมได้ง่าย

2.2.2 ซังข้าวโพด (สุรีพร, 2543)

ซังข้าวโพด (Ground corncobs) หมายถึง ฝักข้าวโพดที่กะเทาะเปลือกและเมล็ดออกแล้ว

ลักษณะทั่วไป ซังข้าวโพดได้จากการสีข้าวโพดเพื่อนำเมล็ดมาใช้งาน ส่วนใหญ่เป็นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ในส่วนของลำต้นจะถูกตัดหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้ว

แหล่งที่มา ปัจจุบันการสีข้าวโพดจะใช้เครื่องจักรที่สามารถเคลื่อนที่ไปตามไร่ข้าวโพด ดังนั้น สามารถหาซังข้าวโพดและต้นข้าวโพดได้ตามไร่ข้าวโพดทั่วไป

การนำไปใช้งาน ซังข้าวโพดมีประโยชน์หลายอย่าง เช่น นำไปเป็นวัตถุดิบผลิตแอลกอฮอล์เป็นเชื้อเพลิง ผสมกับโมลาสเพื่อเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น

จุดเด่น ซังข้าวโพดมีค่าความร้อนสูงเมื่อเทียบกับชีวมวลอื่นๆ ส่วนลำต้นข้าวโพดมีส่วนหนึ่งที่ไม่ได้นำไปใช้งาน ชาวไร่ข้าวโพดจะไถฝังกลบในไร่

จุดด้อย ซังข้าวโพดมีการนำไปใช้ประโยชน์หลายอย่าง ดังนั้นต้องพิจารณาถึงแหล่งที่มีการนำไปใช้งานน้อยที่สุด เพื่อไม่ให้มีการแก่งแย่งกันซื้อ

รูปที่ 2.4 ซังข้าวโพด

กระบวนการผลิตอาหารสัตว์

โรงงานผลิตอาหารสัตว์เป็นแหล่งที่มาของซังข้าวโพด โดยขั้นตอนการผลิตเริ่มต้นจากรับซื้อข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จากเกษตรกร ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคมของทุกปี ฝักข้าวโพดจะแก่จัดและเก็บเกี่ยวทิ้งไว้ในแปลงให้แห้งก่อน โดยเฉลี่ยแล้วข้าวโพดมีอายุตั้งแต่ปลูกถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 90-120 วัน หลังจากเก็บฝักข้าวโพดและปอกเปลือกออก เมื่อฝักข้าวโพดแห้งดีแล้ว ทำ

การคัดแยกเมล็ดข้าวโพดออกจากซัง เมล็ดที่ได้จะอบแห้งให้ความชื้นลดลงเหลือประมาณ ร้อยละ 14 จากนั้นจะส่งไปยังโรงงานผลิตอาหารสัตว์ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมของการผลิตอาหารสัตว์ต่อไป ซึ่งกระบวนการทำอาหารสัตว์ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน คือ

1. การบด (Grinding) การบดวัตถุดิบอาหารสัตว์ทุกประเภทให้มีขนาดละเอียดเท่ากันหมด เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบอาหารสัตว์ให้มากขึ้น ทำให้สามารถผสมวัตถุดิบอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกันง่ายขึ้น ช่วยให้อาหารเม็ดที่อัดออกมายึดตัวดีขึ้น และให้การย่อยอาหารดีขึ้น

2. การชั่งน้ำหนัก (Weighing) ให้ได้ปริมาณตามที่กำหนดไว้จะต้องใช้วัตถุดิบแต่ละชนิดเป็นส่วนผสมในปริมาณเท่าใด จากนั้นจึงทำการแยกชั่งน้ำหนักวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิด

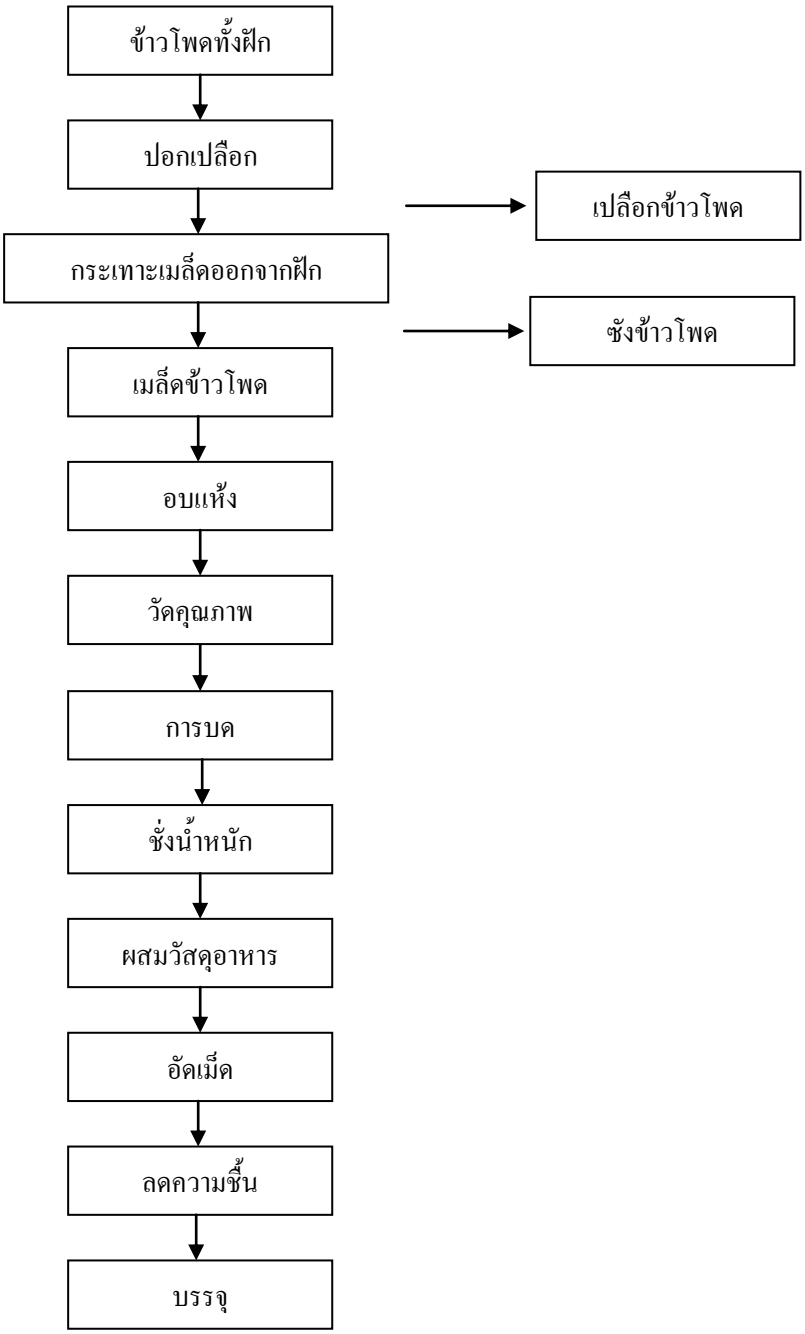
3. การผสมวัสดุอาหาร (Mixing) เพื่อให้อาหารที่กำหนดเป็นส่วนประกอบคลุกเคล้าเป็นเนื้อเดียวกัน กระจายตามเนื้อของส่วนผสมอย่างทั่วถึง

4. การอัดเม็ด (Pelleting) เพื่อให้ได้เป็นอาหารเม็ดเหมาะสมแก่การนำมาให้สัตว์กิน ทำให้กินอาหารได้มากขึ้นหรือได้รับธาตุอาหารมากขึ้น ยังช่วยป้องกันสัตว์เลือกกินวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ชอบเท่านั้น

5. การลดความชื้น (Cooling and drying) ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมเพื่อนำไปให้สัตว์กิน และสามารถเก็บรักษาอาหารเม็ดได้ระยะเวลาหนึ่งโดยไม่เกิดเชื้อรา ซึ่งจะใช้เวลาอบแห้ง ประมาณ 20-30 นาที ก็จะทำให้ความชื้นเหลือประมาณร้อยละ 10

6. การบรรจุ (Packing) การบรรจุเข้าหีบห่อเพื่อเก็บหรือจำหน่ายต่อไป

ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิต คือ ซังข้าวโพดซึ่งจะถูกคัดแยกออกมาต่างหาก ซึ่งโดยเฉลี่ยในการคักแยกเมล็ดแล้ว 1 ตันจะได้ส่วนประกอบหลักเป็นเมล็ดข้าวโพดประมาณ 800 - 810 กิโลกรัม และได้ซังข้าวโพดประมาณ 200 กิโลกรัม กระบวนการผลิตอาหารสัตว์มีดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 กระบวนการผลิตอาหารสัตว์ (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2548)

2.2.3 ชานอ้อย (หรรษา และ เนริสา, 2544)

ชานอ้อย หมายถึง ส่วนของลำต้นอ้อยที่หีบเอาน้ำอ้อยหรือน้ำตาลออกแล้ว มีส่วนประกอบอย่างหยาบ ๆ คิดเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักของชานอ้อยเปียก (ความชื้นร้อยละ 48) คือ ชานอ้อยหรือไฟเบอร์ (Fiber) ร้อยละ 48.5 น้ำร้อยละ 48.0 น้ำตาลร้อยละ 3.0 และอื่นๆ ร้อยละ 0.5

ลักษณะทั่วไป มีลักษณะเป็นขุย ได้จากการผลิตน้ำตาลดิบ โดยนำอ้อยมาคั้นน้ำออก ส่วนที่เป็นน้ำนำไปผลิตเป็นน้ำตาลดิบ ส่วนที่เหลือคือ กากอ้อย หรือชานอ้อย

แหล่งที่มา โรงงานน้ำตาล ซึ่งทั้งประเทศมีอยู่ประมาณ 46 โรงงาน

จุดเด่น ยังมีกากอ้อยเหลืออีกส่วนหนึ่งที่ยังไม่ได้นำไปใช้งาน

จุดด้อย น้ำหนักเบา และความชื้นสูง

ประโยชน์และการนำไปใช้งาน

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิง ส่วนใหญ่ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อผลิตน้ำตาลดิบ
2. สำหรับผลิตไอน้ำและกระแสไฟฟ้าสำหรับใช้ภายในโรงงานน้ำตาลเอง
3. ใช้ผลิตวัสดุก่อสร้างโดยอาศัยกาว เช่น อัดเป็นแผ่น (Particle board) ไม้อัดผิวเส้นใย (Fiber-overlaid plywood) และแผ่นกันความร้อน (Insulating board) เป็นต้น
4. ใช้ผลิตเยื่อกระดาษ (Pulp) และกระดาษชนิดต่างๆ
5. ใช้เป็นอาหารสัตว์
6. ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมผลิต Furfural Furfuryl alcohol และ Xylitol
7. ใช้ทำปุ๋ยหมัก โดยหมักร่วมกับปุ๋ยคอก กากตะกอน หรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์
8. ใช้เป็นวัตถุคลุมดินเพื่อรักษาความชื้นของดินและป้องกันวัชพืช

รูปที่ 2.6 ชานอ้อย

กระบวนการผลิตน้ำตาล

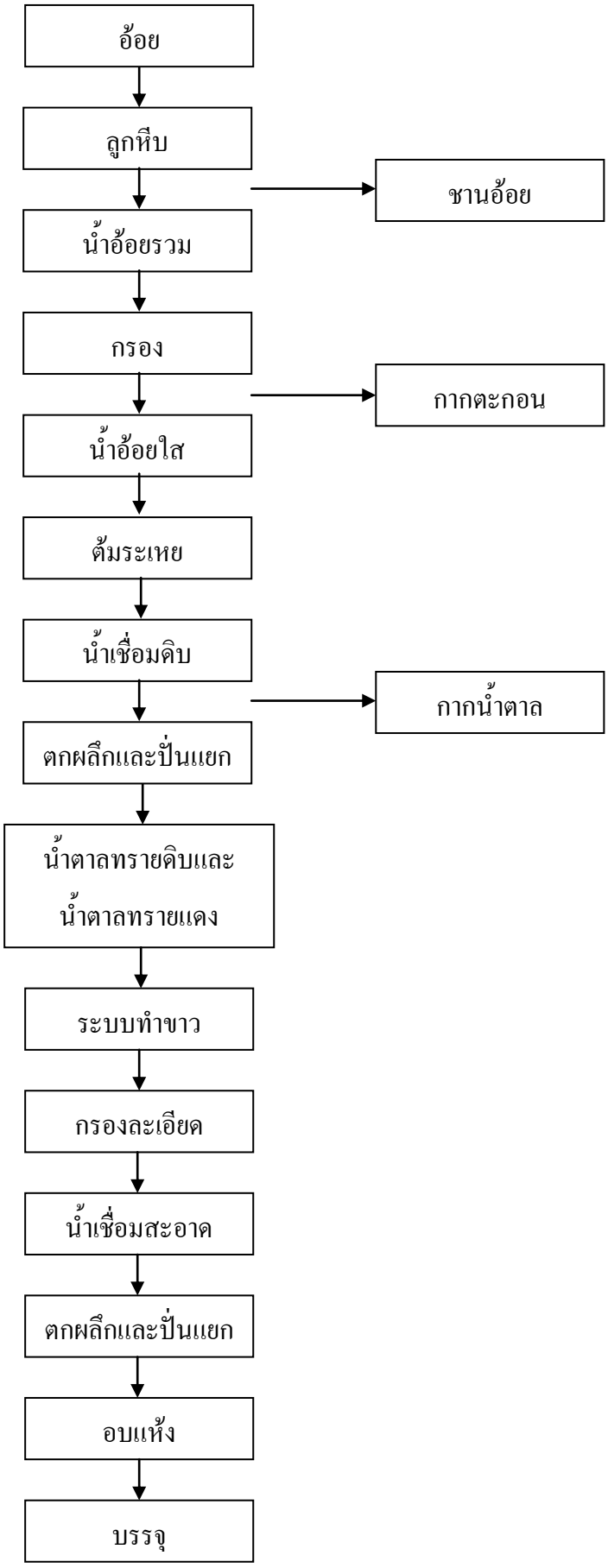
กระบวนการผลิตน้ำตาล เป็นแหล่งที่มาของชานอ้อย เริ่มจากที่ชาวไร่อ้อยตัดอ้อยที่ได้อายุในการตัด คือประมาณ 10 เดือนขึ้นไป ซึ่งปกติจะกำหนดเปิดหีบอ้อยประมาณปลายเดือนพฤศจิกายน หรือเดือนธันวาคมของทุกปี เมื่ออ้อยมาถึงโรงงาน อ้อยจะไหลลงสะพานลำเลียงซึ่งมีชุดใบมีด และเครื่องตีอ้อย เพื่อเตรียมอ้อยให้เป็นเส้นใยหรือฝอยละเอียดก่อนเข้าสู่ชุดลูกหีบ เมื่ออ้อยถูกหีบที่ลูกหีบชุดแรกในระยะเวลาพอสมควร ในชุดลูกหีบซึ่งจะมีลูกหีบ 4-6 ชุด จะหีบน้ำอ้อย

ออกให้มากที่สุด โดยใช้ระบบการพรมน้ำที่เรียกว่า Compound Imbibitions เพื่อสกัดเอาน้ำตาลในอ้อยออกให้หมด โดยส่วนของกากอ้อยที่ออกจากลูกหีบชุดสุดท้ายจะถูกลำเลียงโดยสะพานลำเลียงเข้าสู่หม้อน้ำเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงผลิตไอน้ำขับเทอร์ไบน์ต่างๆ และผลิตกระแสไฟฟ้า สำหรับน้ำอ้อยที่ได้จากชุดลูกหีบจะถูกส่งไปผ่านตะแกรงกรองกากอ้อย เข้าสู่กรรมวิธีทางวิศวกรรมเคมีเพื่อรักษาคุณภาพน้ำอ้อย จนกระทั่งได้น้ำอ้อยใส จึงนำไปต้มเพื่อระเหยน้ำออกและได้น้ำเชื่อมเข้มข้น ส่วนกากตะกอนจากน้ำอ้อยจะถูกกรองและถูกลำเลียงออกนอกกระบวนการผลิตนำเข้าสู่ที่เก็บเพื่อทำเป็นปุ๋ย น้ำอ้อยใสเมื่อออกจากหม้อต้มลูกสุดท้าย จะได้น้ำเชื่อมดิบที่มีความเข้มข้น 60 - 65 บริกส์ และจะเคี่ยวให้ตกผลึกเป็นเม็ดน้ำตาลที่มีผลึกน้ำตาลและน้ำเลี้ยงรวมกันอยู่ แล้วจึงปล่อยลงรางกวน ก่อนจะนำไปปั่นแยกผลึกออกจากน้ำเลี้ยงที่หม้อปั่น ในการปั่นแยกแต่ละขั้นตอนจะได้น้ำตาลเอ น้ำตาลบี น้ำตาลซี และกากน้ำตาล เป็นลำดับสุดท้าย สำหรับน้ำตาลเอ เมื่อนำผ่านกระบวนการลดค่าสี แล้วจึงส่งไปสู่ขั้นตอนการเคี่ยวและการอบแห้งจะได้น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ สำหรับน้ำตาลบี หรือน้ำตาลทรายดิบจะถูกบรรจุกระสอบเพื่อจำหน่ายไปยังต่างประเทศ ส่วนน้ำตาลซี จะนำไปเป็นเชื้อในการเคี่ยวน้ำตาลเอและน้ำตาลบี สำหรับกากน้ำตาลจะถูกส่งไปทำให้เย็นก่อนนำไปเก็บที่ถังเก็บกากน้ำตาลเพื่อรอการขนย้ายไปจำหน่าย โดยกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยเป็นดังแสดงในรูปที่ 2.7

ซึ่งโดยเฉลี่ยในการหีบอ้อย 1 ตันจะได้ส่วนประกอบหลักต่างๆดังนี้

1. น้ำตาล 105-110 กิโลกรัม
2. น้ำ 500-510 กิโลกรัม
3. กากอ้อย (ความชื้นร้อยละ 50-52) 270-290 กิโลกรัม
4. กากตะกอนหม้อกรอง (ความชื้นร้อยละ 70-72) 28-40 กิโลกรัม
5. กากน้ำตาล 50-60 กิโลกรัม

น้ำตาลที่ได้จากกระบวนการผลิตถือว่าเป็นผลิตภัณฑ์หลักของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล ส่วนที่เหลือนั้นสามารถนำไปใช้ภายในโรงงานน้ำตาล หรือนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆได้อีก เรียกว่า ผลิตผลพลอยได้ (By-products)



รูปที่ 2.7 กระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย (กลุ่มมิตรผล, 2009)

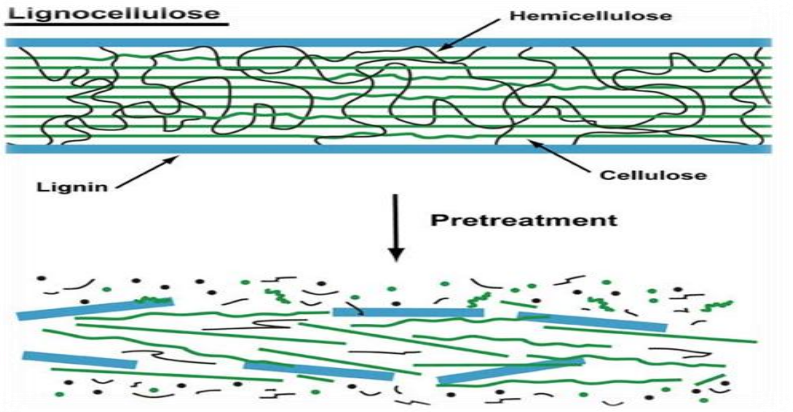
2.3 กระบวนการผลิตเอทานอลแบบ Cellulolysis (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2550)

กระบวนการผลิตเอทานอลที่สำคัญแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนคือ

2.3.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลอยู่ในรูปที่เป็นสารผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (Complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนที่นำมาใช้จริงคือ ส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เพราะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมัก (Fermentation) ด้วย ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการผลิตเอทานอล คือ เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ วิธีการปรับสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธีคือ

1) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment) เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด การใช้ความร้อน
2) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment) จะใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส หรือใช้สารละลายด่างเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน
3) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-chemical Pretreatment) เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี ทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มาก และสามารถกำจัดสารขัดขวางการย่อยสลายของเอนไซม์ด้วย
4) การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก



รูปที่ 2.8 ลักษณะของลิกโนเซลลูโลสภายหลังจากการปรับสภาพ (Hector, Hughes และ Liang-Li, 2008

2.3.2 การย่อยหรือไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) (Parisi, 1989)

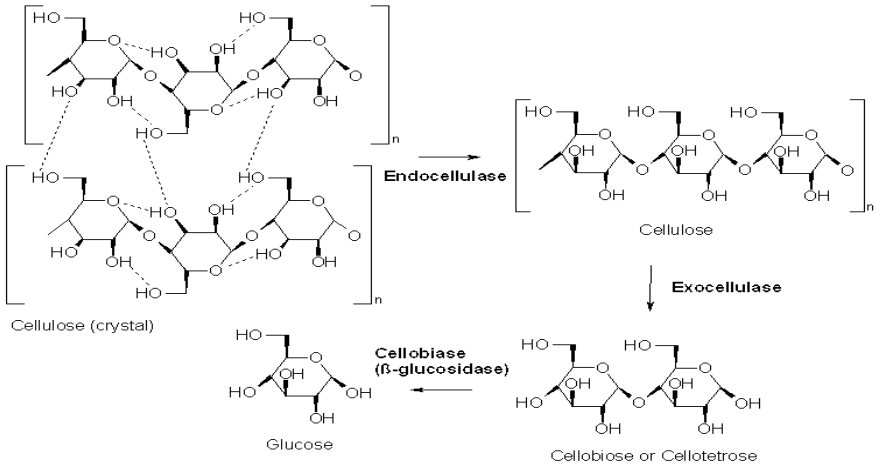
กระบวนการย่อยพื้นฐานของเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส แบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1) การไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ กรดเจือจาง และกรดเข้มข้น
   - การใช้กรดเจือจาง จะใช้อุณหภูมิและความดันสูง ระยะเวลาของปฏิกิริยาจะเป็นวินาทีหรือนาที เหมาะต่อกระบวนการแบบต่อเนื่อง การใช้กรดร่วมกับอุณหภูมิและความดันสูงจำเป็นต้องใช้วัสดุพิเศษสำหรับสร้างถังปฏิกรณ์ ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง
   - การใช้กรดเข้มข้น กระบวนการนี้จะใช้อุณหภูมิต่ำ และจะมีการใช้ความดันเฉพาะเมื่อต้องการปั๊มส่งถ่ายของจากถังหนึ่งไปยังอีกถังหนึ่งเท่านั้น
2) กระบวนการใช้เคมีที่อุณหภูมิสูง กระบวนการผลิตเอทานอลซึ่งใช้ปฏิกิริยาเคมีที่อุณหภูมิสูงในปัจจุบัน มี 2 แบบ
   - ระบบที่ใช้เคมีที่อุณหภูมิสูงร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ เป็นการทำวัสดุชีวมวลให้เป็นก๊าซก่อนด้วยการใช้เคมีที่อุณหภูมิสูง ก๊าซสังเคราะห์ (SynGas) ซึ่งเป็นของผสมระหว่างไฮโดรเจนกับคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นใส่จุลินทรีย์ซึ่งมีความสามารถในการเปลี่ยนก๊าซสังเคราะห์เพื่อให้เกิดการหมักเป็นเอทานอล
   - การใช้เคมีที่อุณหภูมิสูงโดยไม่มีการใช้จุลินทรีย์ วัสดุชีวมวลจะถูกทำให้เป็นก๊าซด้วยการใช้เคมีที่อุณหภูมิสูงก่อน จากนั้นก๊าซจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล

3) การไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ วัสดุเซลลูโลสตามธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดการสลายตัวจากการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งพบทั่วไปในจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากในเชื้อรา ในสภาวะการทำงานที่เหมาะสมจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วถึง 10^8 ถึง 10^{11} เท่า เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง นอกจากนี้ เอนไซม์ยังมีความเฉพาะ (Specificity) ต่อปฏิกิริยาหนึ่งๆเท่านั้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551)

เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ *Trichoderma reessi* เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ 3 ชนิด ที่ทำงานร่วมกันแบบ “Synergisticaction” ได้แก่

1) เอ็นโดกลูคาเนส (Endoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ และยังย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (Reducing End) ของสายโซ่เซลลูโลส
2) เอ็กโซกลูคาเนส (Exoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ และเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส ตำแหน่งที่ทำงานเป็นแบบสุ่ม (Random)
3) เบต้า-กลูโคสิเดส (β-glucosidase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส



รูปที่ 2.9 กระบวนการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Mechanism of cellulolysis)

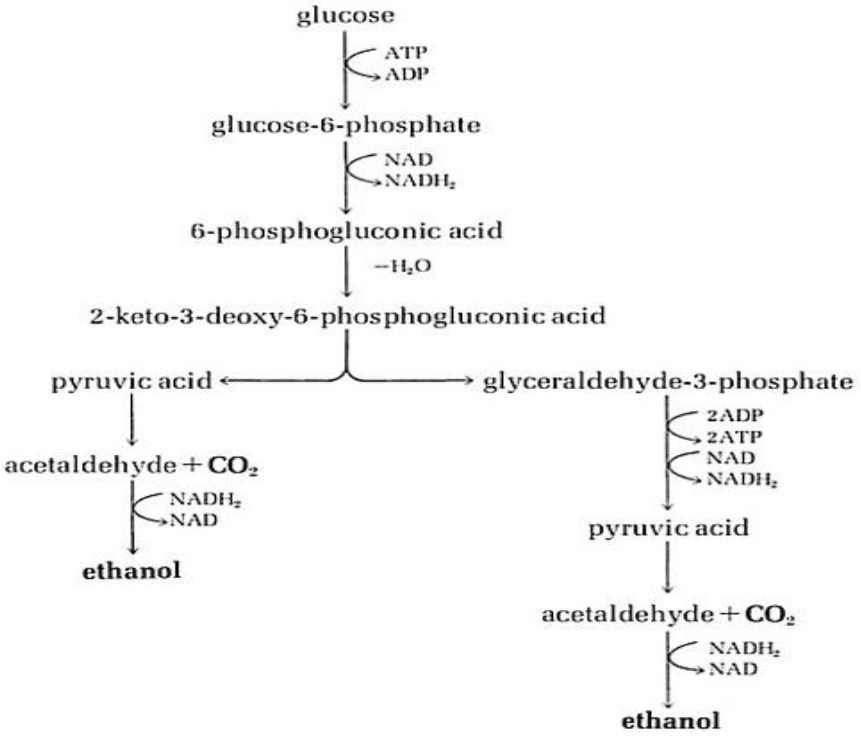
(http://www.answers.com/topic/cellulase)

2.3.3 การเตรียมหัวเชื้อและการหมัก (Fermentation) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551)

การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum) เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับในการหมัก โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณที่ต้องการผสมกับวัตถุดิบ (น้ำตาล) รวมทั้งสารอาหารที่ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ ถ่ายลงในถังหมัก (Fermentor) จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมัก เช่น อัตราการให้อากาศ (Aeration rate) อัตราการกวน (Agitation rate) ค่าพีเอช (pH) และอุณหภูมิในระหว่างการหมัก ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของการหมัก ชนิดของผลิตภัณฑ์ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้

เชื้อจุลินทรีย์ *Z. mobilis* (สรวง และคณะ, 2525) ลักษณะโดยทั่วไปมีรูปร่างเป็นรูปแท่งยาว 2-6 ไมโครเมตร กว้าง 1-1.4 ไมโครเมตร การจัดเรียงตัวอาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ ติดสีย้อมสีแดง (Gram negative) มีแฟลกเจลลา 1-4 อันในตำแหน่งขั้วเซลล์ ไม่มีการสร้างสปอร์ โคโลนีมีสีขาวครีม เจริญได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน แต่สามารถทนออกซิเจนได้บ้าง สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตสได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และ พีเอช 5.0-7.0 โดยใช้กระบวนการเอทเนอร์ขดูโดรอฟฟ์ (Entner-Doudoroff pathway) ดังรูป 2.10 ในการย่อยสลายได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นหลัก นอกจากนั้นยังมีกรดแลคติก (Lactic acid) และอะซีตาลดีไฮด์ (Acetadehyde) เกิดขึ้นเล็กน้อยในน้ำหมักที่มีสารสกัดยีสต์ (Yeast extract) จะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) และถ้าหมักในน้ำหมักที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะเจริญและผลิตแอลกลอฮอร์ได้ดีในระยะ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้น้ำตาลกลูโคสได้เกือบหมดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 2 วัน มีสมการการใช้น้ำตาลกลูโคสแสดงดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 1.8\ C_2H_5OH + 1.9\ CO_2 + 0.15\ \text{Lactic acid}$$



รูปที่ 2.10 แผนภาพแสดงกระบวนการเอทเนอร์-ดูโดรอฟฟ์ของ *Z. mobilis*

คุณสมบัติที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลมีดังนี้คือ

1) สร้างเอทานอลได้ในปริมาณมากถึง 1.5-1.9 โมลต่อน้ำตาลกลูโคส 1 โมล โดยใช้น้ำตาลร้อยละ 98 ในการสร้างเอทานอล และ ร้อยละ 2 ใช้ในการเจริญ ในขณะที่ยีสต์ *Saccharomyces* ใช้เพียงร้อยละ 90 ของน้ำตาลที่มีในการสร้างเอทานอล
2) เอทานอลที่ได้มี Higher alcohol เจือปนอยู่ 0.6 มิลลิกรัมต่อน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ซึ่งน้อยกว่ายีสต์ *Saccharomyces* ที่หมักในสภาพเดียวกันถึง 40 เท่า
3) สามารถเจริญและหมักได้ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงถึง ร้อยละ 25 และบางสายพันธุ์ถึงร้อยละ 30
4) สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีแอลกลอฮอร์สูง ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในเอทานอลร้อยละ 5.5 และบางสายพันธุ์ทนได้ถึง ร้อยละ 7.7-10 ซึ่งสอดคล้องกับความเจริญและหมักให้ได้แอลกลอฮอร์ในสภาพที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง
5) สามารถเจริญในสภาพที่มีกรดสูง โดยสามารถเจริญในสภาพที่มีพีเอช 3.5-4.0 ซึ่งจัดว่าเป็นพีเอชที่ต่ำมากสำหรับแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีสำหรับการป้องกันการปะปนของเชื้ออื่น

6) สามารถทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ถึง 500 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ซึ่งเป็นปริมาณที่แบคทีเรียและจุลินทรีย์หลายชนิดถูกยับยั้ง ลักษณะเช่นนี้เป็นประโยชน์เมื่อใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นตัวทำละลาย
7) การตกตะกอนจะเป็นการตกตะกอนจับตัวกันในลักษณะที่เรียกว่า Flocculation ซึ่งเหมาะและสะดวกในการแยกเซลล์ออกภายหลังจากการหมัก

แต่ข้อด้อยกว่ายีสต์ของ *Z. mobilis* คือ แบคทีเรียใช้น้ำตาลได้จำกัด 3 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส แต่ยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายกว่าแบคทีเรีย เพื่อให้แบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น จึงมีการปรับปรุงพันธุ์วิศวกรรมเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นคือ สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น แม้ว่าจะได้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Z. mobilis* ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นแต่การนำแบคทีเรียมาใช้ค่อนข้างที่จะยาก เพราะโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่คุ้นเคยกับยีสต์มากกว่า

กระบวนการหมัก (Fermentation) ขั้นตอนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อ จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลเป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าไกลโคไลซิส (Glycolysis) ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปการหมักแบบกะ (Batch fermentation) จะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร ดังสมการ

$$(C_6H_{12}O_5)_n + nH_2O \xrightarrow{\text{enzyme}} nC_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{microorganism}} 2nC_2H_5OH + 2nCO_2$$

ในทางปฏิบัติน้ำตาลเพียงร้อยละ 95 เท่านั้น ที่จะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ได้ นอกจากนั้นจุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญเติบโตของตัวมันเอง และเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ ได้แก่ อะซีตัลดีไฮด์ร้อยละ 0-0.03 กรดอะซิตริก ร้อยละ 0.05-0.25 กลีเซอรีนร้อยละ 2.5- 3.6 กรดแลคติกร้อยละ 0-0.2 กรดซัคซินิคร้อยละ 0.5-0.77 น้ำมันฟิวเซลหรือฟิวเซลออยล์ร้อยละ 0.25- 0.5 และฟิวเฟอรัลจำนวนเล็กน้อย ซึ่งปริมาณของสารเหล่านี้ที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และในสภาวะที่ใช้ในการหมักด้วย โดยการหมักแอลกอฮอล์นั้น สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1) การหมักแบบกะ (Batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการเติมวัตถุดิบ สารอาหาร และหัวเชื้อ ลงไปในถังหมักเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก

2) การหมักแบบกึ่งกะ (Fed batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปในถังหมักมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไป เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบและสารอาหารได้ในปริมาณสูงขึ้น
3) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลาเช่นกัน ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดในระยะเวลาเท่ากันเมื่อเทียบกับการหมักทั้งสองชนิดที่กล่าวมา

2.3.4 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์ (Ethanol production)

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักน้ำตาลด้วยเชื้อจุลินทรีย์แล้ว น้ำหมักที่ได้จะผ่านสู่กระบวนการกลั่น (Distillation) เพื่อทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (ร้อยละ 95 โดยปริมาตร) เอทานอลที่เข้มข้นนี้จะถูกส่งต่อไปยังกระบวนการกำจัดน้ำ (Dehydration) เพื่อให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ที่ไร้น้ำ (Anhydrous ethanol) ที่เข้มข้นมากกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร สำหรับการนำไปใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อเป็นเชื้อเพลิง เรียกว่า เอทานอลไร้น้ำ (Anhydrous หรือ Absolute ethanol) ดังนั้น จำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นๆ ที่นิยมใช้มีอยู่ 3 แบบ ประกอบด้วย

1) กระบวนการแยกด้วยวิธีกลั่นสกัดแยกกับสารตัวที่สาม (Extractive distillation with the third component) วิธีนี้เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันมาเป็นเวลานาน ปัจจุบันก็ยังใช้กันในเชิงพาณิชย์อยู่ โดยใช้สารไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane)
2) กระบวนการแยกด้วยวิธีเมมเบรน (Membrane pervaporation) ซึ่งจะใช้เยื่อหุ้มบางๆมาเป็นตัวซึมผ่านและระเหยกลายเป็นไอเพื่อแยกน้ำออกจากเอทานอล
3) กระบวนการแยกด้วยวิธีโมเลคูลาซีฟ (Molecular sieve separation) โดยการให้เอทานอลที่มีน้ำ (Hydrous ethanol) ผ่านวัสดุที่มีรูพรุนสูง เช่น Zeolite เพื่อให้รูพรุนนั้นดักเอาน้ำออก ซึ่งเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยมมากที่สุด

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวมวลที่ศึกษา

Chang และคณะ (2001) ได้นำหญ้าสวิตซ์ ซังข้าวโพด และไม้ปอพลาร์ มาทำการปรับสภาพด้วยปูนขาวเพื่อผลิตเอทานอล โดยการปรับสภาพนั้น หญ้าสวิตซ์จะเติมปูนขาวปริมาณ 0.1

กรัม และน้ำ 9 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมหญ้าแห้ง ให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนซังข้าวโพดเติมปูนขาวปริมาณ 0.075 กรัม และน้ำ 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมซังข้าวโพด ให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และไม้ปอพลาร์ทำการปรับสภาพด้วยปูนขาวปริมาณ 0.1 กรัม และน้ำ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมไม้ปอพลาร์ ให้ความร้อนที่ 150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากทำการปรับสภาพแล้วนำชีวมวลที่ได้ 3 กรัมมาใช้ในกระบวนการหมักด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation: SSF) โดยมีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Spezyme-CP 1.3 มิลลิลิตร ซึ่งมีแอคติวิตี 25 FPUต่อชีวมวล 1 กรัม ร่วมกับการหมักด้วย *S. cerevisiae* strain D5A ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 5 และเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่าหญ้าสวิตซ์ ซังข้าวโพด และไม้ปอพลาร์สามารถผลิตปริมาณเอทานอลได้เป็น 14.1 11.6 และ 15.4 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 72 62 และ 73 ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ โดยการปรับสภาพดังกล่าวทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าไม่ได้ปรับสภาพถึงประมาณ 6 เท่า

Pattra และคณะ (2008) ทำการศึกษาการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟุริก ซึ่งแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.25-7.0 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 ต่อ 15 กรัมน้ำหนักแห้งต่อสารละลาย ใช้เวลาในการปรับสภาพ 15-240 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพคือใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟุริกร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 60 นาที เนื่องจากได้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคส 11 กรัมต่อลิตร น้ำตาลไซโลส 11.29 กรัมต่อลิตร น้ำตาลอะราบิโนส 2.48 กรัมต่อลิตร กรดอะซิติก 2.48 กรัมต่อลิตร และฟิวฟูรัล 0.12 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟุริกจากร้อยละ 0.5-1.0 ไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟุริกมากขึ้นเป็นร้อยละ 1-5 พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสลดลง และพบน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลหลักที่เกิดขึ้นสำหรับการย่อยซังข้าวโพด ในขณะเดียวกันถ้าปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจะได้เอทานอลผลผลิตมากขึ้นด้วย

Salas และคณะ (2009) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลของชานอ้อยและกากว่านหางจระเข้ โดยทำการปรับสภาพด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียสและความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำชานอ้อยและกากว่านหางจระเข้ที่ได้มาทำการปรับสภาพต่อโดยวิธีต่างๆกัน ได้แก่ การปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1.2 ซึ่งใช้ชีวมวล 2 กรัมผสมกับกรดไฮโดรคลอริกในอัตราส่วน 30 มิลลิลิตรต่อกรัมชีวมวล แล้วให้ความร้อนและความดันเท่าเดิม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และอีกวิธีหนึ่งใช้วิธีการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 โดยชีวมวล 2 กรัมผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วให้ความร้อนและความดันเท่าเดิม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับพีเอชเท่ากับ 5-7 แล้วผสมเอนไซม์ Celluclast SAFMEX ที่มีแอคติวิตี 107 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณภูมิที่

55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วหมักด้วย *S. cerevisiae* โดยหมักแบบกะ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สำหรับชานอ้อยและกากว่านหางจระเข้ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกมีปริมาณเอทานอลผลผลิตที่ได้เป็น 4.7 และ 7.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนชานอ้อยและกากว่านหางจระเข้ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์มีปริมาณเอทานอลผลผลิตที่ได้เป็น 12.9 และ 6.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Carrasco และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาโดยการนำชานอ้อยมาทำการปรับสภาพด้วยความร้อนเพื่อการผลิตเอทานอล ซึ่งในทำการปรับสภาพใช้ชานอ้อยแห้ง 300 กรัม แปรผันความร้อนในการปรับสภาพตั้งแต่ 180-205 องศาเซลเซียสและใช้เวลา 5 หรือ 10 นาที ร่วมกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก โดยการเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำก่อนการให้ความร้อน จากการทดลองพบว่า การใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ร้อยละ 2 และอุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 68.3 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งชานอ้อย หรือคิดเป็นร้อยละ 87.3 จากนั้นทำการย่อยด้วยเอนไซม์ Celluclast 1.5 L ซึ่งมีแอคติวิตี 65 FPU/กรัม และ Novozym 188 แอคติวิตี 376 IU/กรัม-กลูโคซิเดส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีการปั่นกวนที่ 300 รอบต่อนาที แล้วเปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยหมักด้วย *S. cerevisiae* TMB3400, TMB 3006 และ *Pichia stipitis* CBS6054 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยอัตราเร็ว 170 รอบต่อนาที พบว่า ผลิตภัณฑ์เอทานอลที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 17 36 และ 9 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งชานอ้อยตามลำดับที่เวลา 72 ชั่วโมง

Kahar Taku และ Tanaka (2010) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพด ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้นต่ำ โดยนำซังข้าวโพดบดด้วยเครื่อง ball-milled ให้มีขนาด 5 มิลลิเมตร ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟุริกร้อยละ 0.5 และ 5 โดยปริมาตร ให้ความร้อนตั้งแต่ 105-128 องศาเซลเซียส และแปรผันเวลาตั้งแต่ 20 นาที ถึง 2 ชั่วโมง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพคือ ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟุริกร้อยละ 0.5 และให้ความร้อนที่ 122 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการย่อยด้วยเอนไซม์ Celluclast 1.5 L ที่มีแอคติวิตี 32 FPU 16 CBU และ Novozyme 188 80 CBUต่อกรัมเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์คิดเป็นร้อยละ 80 โดยน้ำหนัก เมื่อใช้เอนไซม์ในการย่อย 0.024 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด แล้วนำมาหมักด้วยกระบวนการย่อยพร้อมหมัก โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมและมีซังข้าวโพดที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพเป็นตัวควบคุมใช้ในการเปรียบเทียบ หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* NBRC2114 48 ชั่วโมง พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลผลผลิตเท่ากับ 0.12 กรัมเอทานอลต่อกรัมซังข้าวโพด หรือ 48.6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 77 โดยน้ำหนัก

Li และคณะ (2010) ศึกษานำเอาซังข้าวโพดมาใช้ผลิตเป็นเอทานอล โดยปรับสภาพก่อนด้วยสารละลายแอมโมเนียแบบ Soaking in aqueous ammonia (SAA) ร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วน 1 ต่อ 11 ชีวมวลต่อสารละลาย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปั่นกวนเป็นเวลา 8-24 ชั่วโมงเพื่อหาเวลาที่เหมาะสม ศึกษาทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ไซเลเนสและเอนโดกลูคาเนส แล้วเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เป็นเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบ Two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF) ที่มีการย่อยสลายด้วย *E. coli* KO11 ร่วมกับ *S. cerevisiae* D5A พบว่า สภาวะที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ การปรับสภาพด้วยสารละลายแอมโมเนียร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก เติมในอัตราส่วน 1 ต่อ 11 ชีวมวลต่อสารละลาย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการย่อย 2 ครั้งคือ ครั้งที่ 1 ย่อยด้วยเอนไซม์ไซเลเนส 8000 GXU/g-glucan เอ็นโดกลูคาเนส 50 units/g-glucan และครั้งที่ 2 ย่อยด้วยกลูคาเนส GC220 ที่มีแอคติวิตี 15 FTU 220 g/g-glucan และ Novozyme 188 30 CBU/g-glucan แล้วหมักด้วย *E. coli* ATCC_ 55124 และ *S. cerevisiae* D5A ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 22.3 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 78 ของเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีในการหมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

2.4.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวมวลอื่น

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ศึกษาการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยพบว่าการปรับสภาพวิธีที่ดีที่สุด คือ การแช่เหง้ามันสำปะหลังในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะได้ตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ประกอบอยู่ร้อยละ 96.46 1.85 และ 1.69 ตามลำดับ จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 4.079 FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีพีเอชเท่ากับ 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการย่อย 24 ชั่วโมง จะผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 8.30 กรัมต่อลิตร และร้อยละการเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 21.62 เมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์มาเลี้ยงเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยการเลี้ยงเชื้อในสารอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 25 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 ในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จะได้เอทานอล 10.60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 69.84 ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร ($Y_{P/S}$) 0.68 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตเอทานอล 0.30 กรัมต่อลิตต่อชั่วโมง

Dawson และBoopathy (2007) ได้ศึกษาการหมักยอดและใบอ้อย เพื่อผลิตเอทานอล โดยใช้การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟุริกเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการกำจัดลิกนิน ซึ่งการปรับสภาพด้วยกรดจะเริ่มจากการนำชีวมวล 3 กรัมแช่ในกรดซัลฟุริกแปรผันความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟุริกตั้งแต่ 0.2-0.8 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนึ่งด้วยความดันไอ ทำให้เย็นแล้วหมักด้วย *S. cerevisiae* strain 765 เข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 21 วัน วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้ HPLC ส่วนการปรับสภาพด้วยด่างใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 1-5 ปรับพีเอช ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนึ่งด้วยความดันไอ ทำให้เย็นแล้วหมักด้วย *S. cerevisiae* strain 765 เข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 21 วัน วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้ HPLC เช่นกัน พบว่าปริมาณเอทานอลผลผลิตที่ได้ในการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟุริก 0.8 โมลาร์เป็นเวลา 12 วันเท่ากับ 335.67 มิลลิกรัมต่อลิตรเอทานอลที่ 10 วัน ซึ่งเป็นปริมาณมากที่สุด ส่วนการปรับสภาพด้วยไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมที่สุดคือ ความเข้มข้นร้อยละ 2 พีเอชเท่ากับ 13 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเอทานอลผลผลิตที่ได้เท่ากับ 130.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเอทานอลที่ 10 วัน

วนิดา ปานอุทัย และคณะ (2551) ได้ทำการศึกษานำเอาไม้ยูคาลิปตัสมาผลิตเอทานอล ซึ่งปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัสด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำด้วยเครื่องระเบิดเยื่อด้วยไอน้ำ สภาวะในการระเบิดเยื่อที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เยื่อที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ แล้วนำมาทำการสกัดด้วยน้ำโดยให้ความร้อนคงที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 8 ให้ความร้อนคงที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 เข้มข้นร้อยละ 10 พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ Celluclast 1.5L ที่มีแอคติวิตี 15 FPUต่อกรัมซับสเตรต และ Novozym 188 ที่มีแอคติวิตี 15 IUต่อกรัมซับสเตรต ภายใต้สภาวะการหมักที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีบนเครื่องเขย่า ศึกษาการหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในการหมักแบบ SSF จากการศึกษาปริมาณเยื่อ (ร้อยละ 5 7.5 และ 10 น้ำหนักต่อปริมาตร) และอุณหภูมิ (30 35 และ 40 องศาเซลเซียส) เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด พบว่า ปริมาณเยื่อ ร้อยละ 10 น้ำหนักต่อปริมาตรในการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสม ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล 28.47 กรัมต่อลิตร และ คิดเป็นร้อยละ 79.01 ของเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

Linde และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟุริก โดยนำฟางข้าวสาลีมาแช่ด้วยกรดซัลฟุริกเจือจางที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (20 กรัมสารละลายต่อกรัมน้ำหนักแห้งฟางข้าวสาลี) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการปรับสภาพต่อด้วยความร้อน ใช้ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการแช่ด้วยกรดซัลฟุริกปริมาณ 60 กรัม ให้ความร้อนโดย

แปรผันอุณหภูมิตั้งแต่ 190-210 องศาเซลเซียส และแปรผันเวลา 2-10 นาที จากการทดลองการปรับสภาพพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพฟางข้าวสาลีคือ ใช้ความร้อน 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้ฟางข้าวสาลีที่ทำการปรับสภาพแล้วในการหมักด้วยกระบวนการ ย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน โดยใช้เอนไซม์ Celluclast 1.5 L ที่มีแอคติวิตี 3-14 FPUต่อกรัมส่วนไม่ละลายน้ำ และ Novozyme 188 (เบตา -กลูโคซิเดส) ที่มีแอคติวิตี 3-17 FPUต่อกรัมส่วนไม่ละลายน้ำ ในการย่อยสลายร่วมกับการหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้เอนไซม์แอคติวิตี 14 FPUต่อกรัมเซลลูโลส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ผลผลิตเป็นเอทานอล 13.2 กรัมต่อฟางข้าวสาลี 100 กรัม หรือคิดเป็นร้อยละ 67 ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

Mishima และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาและดอกจอก โดยศึกษาการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เริ่มจากการใช้ชีวมวลทั้งสองที่ผ่านการอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส บดละเอียดคัดขนาดเล็กกว่า 0.8 มิลลิเมตร แล้วปรับสภาพชีวมวลดังกล่าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปรับสภาพต่อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นและเวลาเท่ากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หมักเพื่อผลิตเอทานอลด้วยการเปรียบเทียบ 2 กระบวนการคือ กระบวนการย่อยร่วมกับการหมัก และกระบวนการย่อยแยกกับการหมัก (Separated saccharification and fermentation mode: SHF) ซึ่งในกระบวนการ SHF การย่อยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคติวิตี 20 FPUต่อกรัมชีวมวล เอนไซม์ไซเลเนสที่มีแอคติวิตี 615 หน่วยต่อกรัมชีวมวลในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำปฏิกิริยาที่สภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* NBRC 2346 และเชื้อ *E. coli* KO11 ซึ่งมีการตัดต่อส่วนยีนส์ของเชื้อ *Z. mobillis* เพื่อปรับปรุงการผลิตเอทานอล พบว่า ผักตบชวาและดอกจอกที่ผ่านการปรับสภาพได้ผลผลิตเป็นเอทานอล 0.14-0.17 และ 0.15-0.16 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ส่วนการหมักด้วยกระบวนการ SSF จะใช้ชีวมวล 8 กรัมที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* NBRC 2346 และเชื้อ *E. coli* KO11 ที่พีเอชเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 96 ชั่วโมง พบว่า ผักตบชวาและดอกจอกที่ผ่านการปรับสภาพหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* NBRC 2346 ได้ผลผลิตเป็นเอทานอล 14.4 และ 14.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนผักตบชวาและดอกจอกที่ผ่านการปรับสภาพหมักด้วย *E. coli* KO11 ได้ผลผลิตเป็นเอทานอล 16.9 และ 16.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Jeung และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยปูนขาว โดยการปรับสภาพจะเริ่มด้วยการนำฟางข้าว 10 กรัม ปรับสภาพด้วยปูนขาว (Lime pretreatment: CaCCO) ความเข้มข้น 13.5 มิลลิโมลาร์ ให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส

และความดันสูง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากฟางข้าวเย็นลงแล้ว ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอัตราเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เป็นกลาง แล้วนำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพดังกล่าว 16 กรัม มาใช้กระบวนการย่อยร่วมกับการหมัก ที่มีการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ Novozyme 188 ที่มีแอคติวิตี 12 FPU/มิลลิลิตร ร่วมกับการหมักด้วย *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* โดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มาให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อสารละลายเย็นลงทำการบดด้วยเครื่องบด 5 ครั้ง แล้วถ่ายของเหลวดังกล่าว 714 กรัมลงในถังปฏิกรณ์เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อัตราเร็ว 100 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ความดัน 0.11 เมกกะพาสคาล พร้อมกวนผสมด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ให้ความร้อนที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมเอนไซม์ที่ใช้หมักและเชื้อจุลินทรีย์ดังที่กล่าวมาแล้วหมักที่ 30 องศาเซลเซียส กวนผสมด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที พบว่าได้ปริมาณเอทานอลผลผลิตเท่ากับ 19.1 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 74 ของเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีในเวลา 79 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.2 แสดงสรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสทั้งในประเทศและต่างประเทศ

ตารางที่ 2.2 สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลในประเทศและต่างประเทศ

แหล่งเซลลูโลส	การปรับสภาพ	การย่อย	การหมัก	ปริมาณ เอทานอลผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวมวลที่ศึกษา					
หญ้าสวิตซ์ ซังข้าวโพด และไม้ปอพลาร์	ปูนขาวและความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส, 2 ชั่วโมง ปูนขาวและความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส, 4 ชั่วโมง ปูนขาวและความร้อนที่ 150 องศาเซลเซียส, 6 ชั่วโมง	กระบวนการหมักด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกัน (SSF) ย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Spezyme-CP) 25 FPUต่อชีวมวล 1 กรัม หมักด้วย *S. cerevisiae* D5A ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 5 และเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน		14.1 11.6 และ 15.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ	Chang และคณะ (2001)
ชานอ้อยและกากว่านหางจระเข้	ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 ให้ความร้อนและความดันเท่าเดิม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	เอนไซม์ Celluclast (SAFMEX) แอคติวิตี 107 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนักให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	หมักด้วย *S. cerevisiae* โดยหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	12.9 และ 6.6 กรัมต่อลิตรตามลำดับ	Salas และคณะ (2009)

แหล่งเซลลูโลส	การปรับสภาพ	การย่อย	การหมัก	ปริมาณ เอทานอลผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
ชานอ้อย	ความร้อนอุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ร้อยละ 2	เอนไซม์ Celluclast 1.5 L ซึ่งมีแอคติวิตี 65 FPU/กรัม และ Novozym 188 แอคติวิตี 376 IU/กรัม-กลูโคซิเดส อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง กวน 300 รอบต่อนาที	เปรียบเทียบการหมักด้วย *S. cerevisiae* TMB3400, TMB 3006 และ *P.stipitis* CBS6054 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปั่นกวนด้วยอัตราเร็ว 170 รอบต่อนาที 72 ชั่วโมง	17 36 และ 9 กรัม เอทานอลต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้งชานอ้อย ตามลำดับ	Carrasco และคณะ (2010)
ซังข้าวโพด	กรดซัลฟุริกร้อยละ 0.5 อุณหภูมิ 122 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	กระบวนการย่อยพร้อมหมัก (SSF) ย่อยด้วยเอนไซม์ Celluclast 1.5 L ที่มีแอคติวิตี 32 FPU 16 CBU และ Novozyme 188 80 CBUต่อกรัมเอนไซม์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* NBRC2114 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง		48.6 กรัมต่อลิตร	Kahar Taku และ Tanaka (2010)
ซังข้าวโพด	สารละลายแอมโมเนียแบบ Soaking in aqueous ammonia (SAA)ร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก เติมในอัตราส่วน 1 ต่อ 11 ชีวมวลต่อสารละลาย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12	หมักแบบ Two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF) มีการย่อย 2 ครั้งคือ 1) ย่อยด้วยเอนไซม์ไซเลเนส 8000 GXU/g-glucan เอ็นโดกลูคาเนส 50 units/g-glucan 2) ย่อยด้วย กลูคาเนส GC220 15 FPU 220 g/g-glucan และNovozyme 188 30 CBU/g-glucan หมักด้วย *E. coli* ATCC_ 55124		22.3 กรัมต่อลิตร	Li และคณะ (2010)

แหล่งเซลลูโลส	การปรับสภาพ	การย่อย	การหมัก	ปริมาณเอทานอลผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
	ชั่วโมง	และ *S. cerevisiae* ATCC_ 200062 (D5A) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที 120 ชั่วโมง			
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวมวลอื่น					
ยอดและใบอ้อย	เปรียบเทียบการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟุริก 0.8 โมลาร์เป็นเวลา 12 วัน กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 2 พีเอชเท่ากับ 13 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง	-	หมักด้วย *S. cerevisiae* strain 765 เข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา10 วัน	0.335 และ 0.130 กรัมต่อลิตรเอทานอล (กรดซัลฟุริก, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์)	Dawson และBoopathy (2007)
ไม้ยูคาลิปตัส	การระเบิดด้วยไอน้ำ แล้วให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส 30 นาที ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาณเยื่อต่อด่างเท่ากับ 1:8 ให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส 30 นาที	กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน(SSF) หมักด้วย *S. cerevisiae* Sc90 เข้มข้นร้อยละ 10 พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ Celluclast 1.5L ที่มีแอคติวิตี 15 FPUต่อกรัมซับสเตรต และ Novozym 188 ที่มีแอคติวิตี 15 IUต่อกรัมซับสเตรต		28.47 กรัมต่อลิตร	วนิดา และคณะ (2551)
ฟางข้าวสาลี	กรดซัลฟุริกเจือจางเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วใช้ความร้อน 190	กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (SSF) โดยใช้ Celluclast 1.5 L ที่มีแอคติวิตี 14 FTUต่อกรัมส่วนไม่ละลายน้ำ และ Novozyme 188 ที่มีแอคติวิตี 14 FPU		13.2 กรัมต่อฟางข้าวสาลี 100 กรัม	Linde และคณะ (2008)

แหล่งเซลลูโลส	การปรับสภาพ	การย่อย	การหมัก	ปริมาณเอทานอลผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
	องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที	ต่อกรัมชีวมวล โดยใช้ *S. cerevisiae* ภายใต้สภาวะการหมักที่ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 5 เวลา 70 ชั่วโมง			
ผักตบชวาและดอกจอก	โซเดียมไฮดรอกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	กระบวนการย่อยร่วมกับการหมัก (SSF) ย่อยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคติวิตี 20 FPUต่อกรัมชีวมวล เอนไซม์ไซเลเนสที่มีแอคติวิตี 615 หน่วยต่อกรัมชีวมวล หมักด้วยเชื้อ *E. coli* KO11 ที่พีเอชเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 96 ชั่วโมง		16.9 และ 16.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ	Mishima และคณะ (2008)
ฟางข้าว	ปูนขาว (CaCCO) ความเข้มข้น 13.5 มิลลิโมลาร์ ให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง	กระบวนการย่อยร่วมกับการหมัก (SSF) ย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ Novozyme 188 ที่มีแอคติวิตี 12 FPU/มิลลิลิตร ร่วมกับการหมักด้วย *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนผสมด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง		19.1 กรัมต่อลิตร	Jeung และคณะ (2010)

บทที่ 3

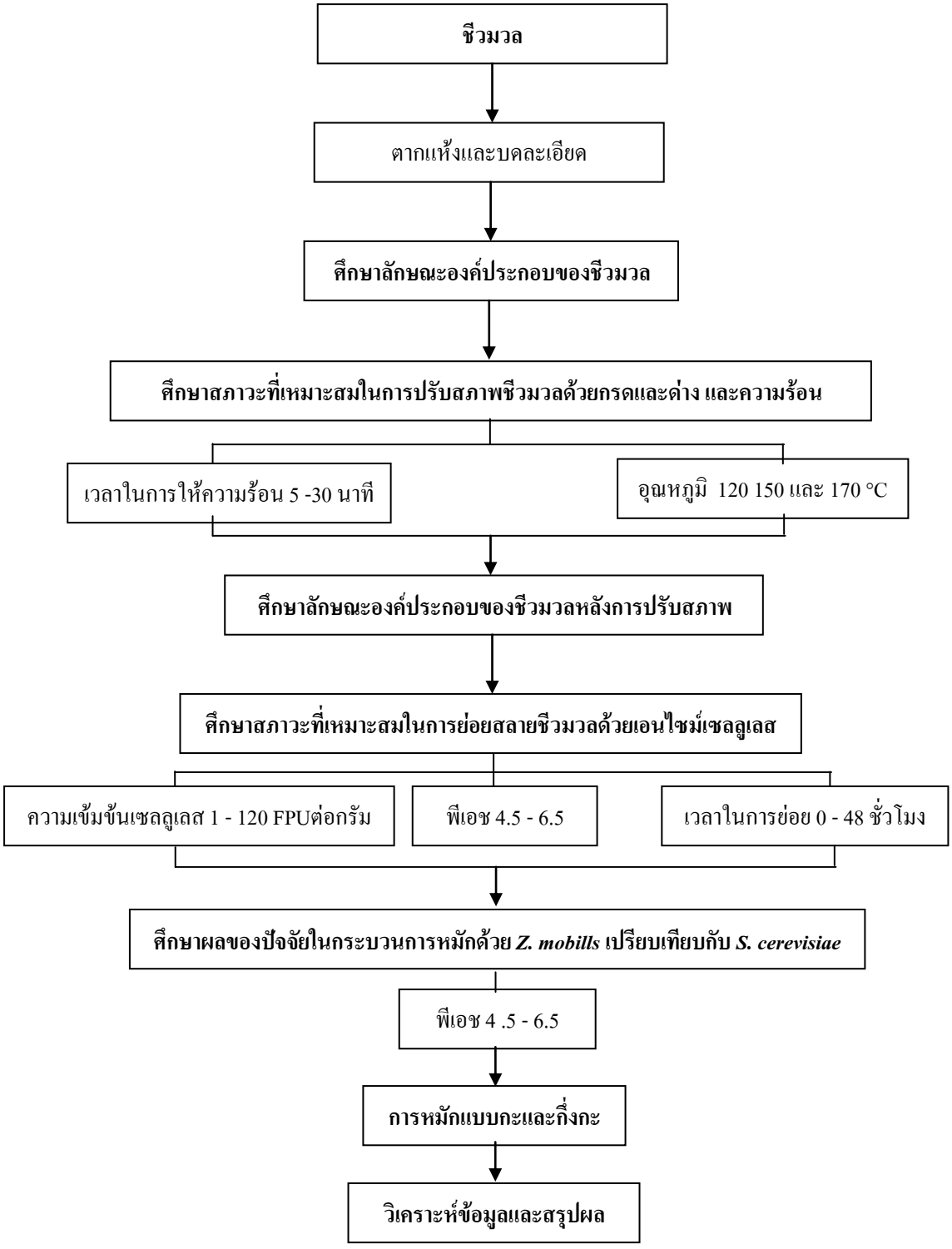
เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

3.1 แผนผังขั้นตอนการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากชีวมวลที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม 2 ชนิดได้แก่ ชานอ้อยและซังข้าวโพด โดยการนำมาปรับสภาพชีวมวลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟุริก และความร้อนก่อน แล้วย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอทานอลในระดับห้องปฏิบัติการ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีขั้นตอนในการทดลองดังนี้

1) ศึกษาลักษณะองค์ประกอบของชีวมวล โดยพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
2) ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยกรดซัลฟุริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน
3) ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส พีเอชเริ่มต้น และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส
4) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นในการหมักด้วย *Z. mobilis*
5) วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอลของชีวมวลทั้งสองชนิด มาใช้ในการหมักในระดับอุสาหกรรมต่อไป

โดยแผนผังขั้นตอนการดำเนินการวิจัยแสดงดังรูป 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.2 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

4) กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman, England)
5) กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CH30RF200 (Olympus, Japan)
6) เครื่อง Gas chromatography รุ่น GC-2010A (Shimadzu, Japan)
7) เครื่องกวนสารแบบแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น PC-420 (Corning, USA)
8) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) รุ่น VS-8480SFN (Vision Sciencetific, Korea)
9) เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น KMC-1300V (Vision Sciencetific, Korea)
10) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) รุ่น Extend ED2248 (Sartorius, Germany)
11) เครื่องบดละเอียด (Milling machine) รุ่น LG-500A (โง้วฮวดหยู, ประเทศไทย)
12) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany)
13) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น DR/2010 (HACH, USA)
14) เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น PP-50 (Sartorius, Germany)
15) ตะแกรงคัดแยกขนาด (Seive) ขนาด 0.2 มิลลิเมตร (ORTO ALRESA, Spain)
16) ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) รุ่น Clean model:BC (แลบ เซอร์วิส, ประเทศไทย)
17) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (EHRET, Germany)
18) เตาอบความร้อนสูง (Hot air oven) (Memmert, Germany)
19) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SA-500K (Sturdy industrial, Taiwan)
20) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Memmert, Germany)

3.2.2 เคมีภัณฑ์

1. 1, 10-ฟีนานโธรลีนโมโนไฮเดรต [$C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$] (Merck, Germany)

2. กรดซัลฟุริก [H_2SO_4] (Merck, Germany)
3. กรดซิตริก [$COOHCH_2C(OH)COOHCH_2COOH{\cdot}H_2O$] (AJAX chemical, Australia)
4. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก [$C_7H_4N_2O_7$] (Fluka, Switzerland)
5. กรดไฮโดรคลอริก [HCl] (Merck, Germany)
6. กลูโคส [$C_6H_{12}O_6$] (AJAX chemical, Australia)
7. เชื้อหมัก *Z. mobillis* stain TISTIR 405 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)
8. โซเดียมซิเตรต [$NaC_6H_5O_7{\cdot}2H_2O$] (AJAX chemical, Australia)
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] (Merck, Germany)
10. เปบโตน (Peptone from casein) (SCharlau, Spain)
11. โพแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรต [$KNaC_4H_4O_6{\cdot}4H_2O$] (Univar, Australia)
12. โพแทสเซียมไดโครเมต [$K_2Cr_2O_7$] (AJAX chemical, Australia)
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต [KH_2PO_4] (AJAX chemical, Australia)
14. เฟอร์รัสซัลเฟต [$FeSO_4{\cdot}7H_2O$] (AJAX chemical, Australia)
15. เฟอรัสแอมโมเนียซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4{\cdot}FeSO_46H_2O$] (AJAX chemical, Australia)
16. แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4{\cdot}7H_2O$] (AJAX chemical, Australia)
17. สารสกัดมอลต์ (Malt extract) (Hi media, India)
18. สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) (Bio Basic Inc., Canada)
19. วุ้นผง (Agar) (วุ้นบริสุทธิ์, ประเทศไทย)
20. เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) (เบรนน์แท็ก อินกรีเดียนส์ จำกัด(มหาชน), ประเทศไทย)
21. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
22. เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (Merck, Germany)
23. แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] (AJAX chemical, Australia)

3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมชีวมวล

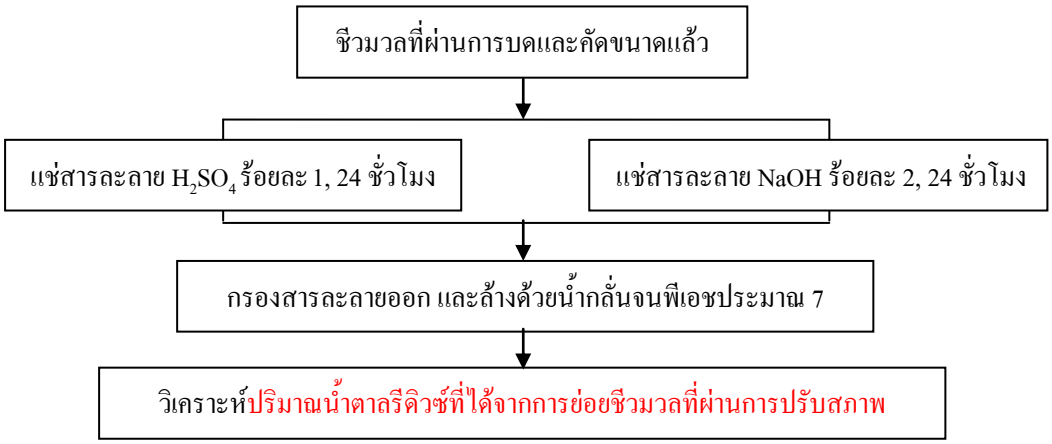
ชานอ้อย ได้จากการหีบอ้อย ส่วนซังข้าวโพดได้จากการกะเทาะเอาเมล็ดออก นำมาตากให้แห้ง นำมาอบในเตาอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด คัดขนาดโดยการร่อนผ่านตะแกรงคัดขนาดให้มีขนาดเล็กกว่า 0.25 มิลลิเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์

หาปริมาณส่วนประกอบต่างๆในชีวมวล ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ด้วยวิธีใน TAPPI 203 om-88 (ภาคผนวก ข)

3.3.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟุริก และความร้อน

เป็นการทดลองเพื่อศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม หรือสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด และมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินน้อยที่สุดในการปรับสภาพชีวมวลด้ว ย กรดซัลฟุริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน โดยใช้ชีวมวลที่เตรียมในข้อ 3.3.1 มาทำการปรับสภาพ ซึ่งค่าของปัจจัยต่างๆที่ทำการแปรผันมาจากงานวิจัยที่มีการศึกษาการปรับสภาพชีวมวลมาแล้วของ Pattra และคณะ (2008) Salas และคณะ (2009) และ Kahar, Taku และ Tanaka (2010) มาประยุกต์ใช้ ดังแผนผังการทดลองในรูปที่ 3.2 และ 3.3

3.3.2.1 วิธีการทดลองศึกษาการปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริก



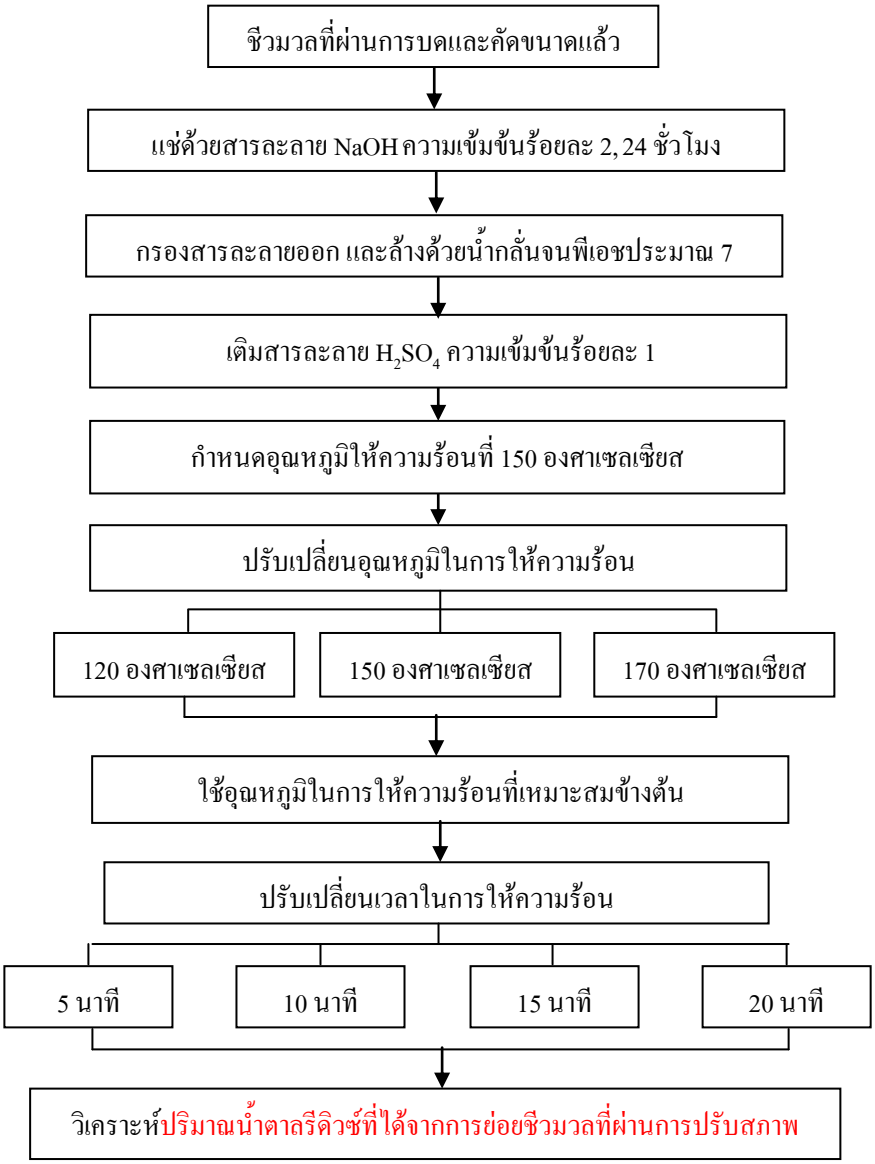
รูปที่ 3.2 แผนผังการทดลองศึกษาการปรับสภาพชีวมวลด้วย
สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริก

วิธีการทดลองการปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริก

1. นำชีวมวลที่ผ่านการบดและคัดแยกขนาดแล้วจากข้อ 3.3.1 แช่ในสารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ 1 หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 2 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักของชีวมวลต่อสารละลาย ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. หลังจากผ่านการปรับสภาพแล้ว กรองสารละลายออกล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นจนน้ำล้างมีสภาพเป็นกลาง (พีเอชประมาณ 7) นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาชั่งเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักชีวมวลที่หายไปในระหว่างการปรับสภาพ และวิเคราะห์หา ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ (ภาคผนวก ข)

3.3.2.2 วิธีการทดลองศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิในการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกร่วมกับความร้อน



รูปที่ 3.3 แผนผังการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกและความร้อน

วิธีการทดลองศึกษาอุณหภูมิการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวล

1. นำชีวมวลที่ผ่านการบดและคัดแยกขนาดแล้วจากข้อ 3.3.1 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 2 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักของชีวมวลต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. หลังแช่ชีวมวลครบ 24 ชั่วโมงแล้ว นำมากรองสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออก ล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นจนมีสภาพเป็นกลาง (พีเอชประมาณ 7)

3. เติมสารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ 1 ในอัตราส่วนเท่าเดิม แล้วให้ความร้อนในเตาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. หลังจากผ่านการปรับสภาพแล้ว กรองสารละลายออก ล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นจนน้ำล้างมีสภาพเป็นกลาง (พีเอชประมาณ 7) นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาชั่งเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักชีวมวลที่หายไปในระหว่างการปรับสภาพ และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ (ภาคผนวก ข)

5. ทำการทดลองตามข้อ 1-4 โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ 150 และ 170 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลองศึกษาระยะเวลาการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวล

1. นำชีวมวลที่ผ่านการบดและคัดแยกขนาดแล้วจากข้อ 3.3.1 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 2 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักของชีวมวลต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. หลังแช่ชีวมวลครบ 24 ชั่วโมงแล้ว นำมากรองสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออก ล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นจนมีสภาพเป็นกลาง (พีเอชประมาณ 7)

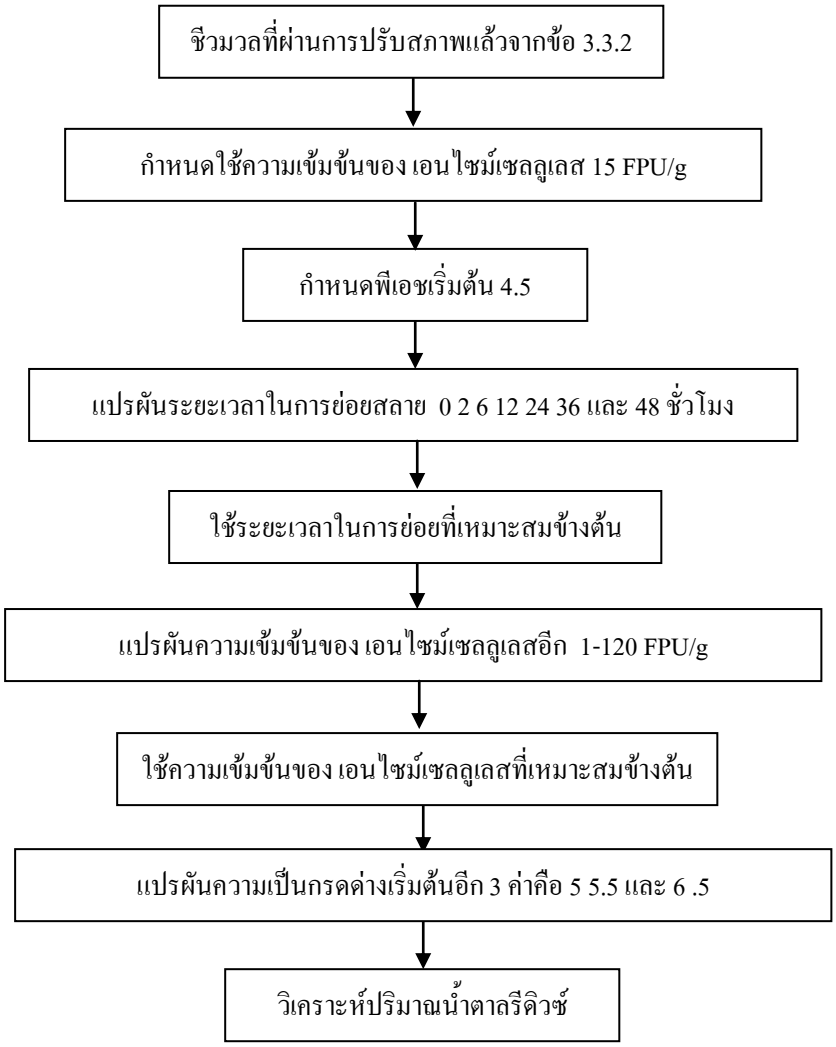
3. เติมสารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ 1 ในอัตราส่วนเท่าเดิม แล้วให้ความร้อนในเตาอบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองที่แล้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. หลังจากผ่านการปรับสภาพแล้ว กรองสารละลายออกล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นจนน้ำล้างมีสภาพเป็นกลาง (พีเอชประมาณ 7) นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาชั่งเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักชีวมวลที่หายไปในระหว่างการปรับสภาพ และวิเคราะห์หา ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ (ภาคผนวก ข)

5. ทำการทดลองตามข้อ 1-4 โดยปรับเปลี่ยนเวลาในการให้ความร้อนเป็น 5 10 และ15 นาที

3.3.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เป็นการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส พีเอชเริ่มต้น และเวลาที่เหมาะสม หรือสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดในการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟุริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนที่สภาวะที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.3.2 โดยใช้พีเอชเริ่มต้นในการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของเซลลูเลสจากงานวิจัยของพรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 แผนผังการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ

3.3.3.1 วิธีการทดลองศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ

1. ชั่งตะกอนชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.3.2 น้ำหนัก 50 มิลลิกรัมใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร โดยแปรผันพีเอชเท่ากับ 4.5 5 5.5 และ 6.5
2. เติมเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น15 FPUต่อกรัมชีวมวล
3. ทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เก็บตัวอย่างสารละลายแต่ละหลอดไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

3.3.3.2 วิธีการทดลองศึกษาความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ

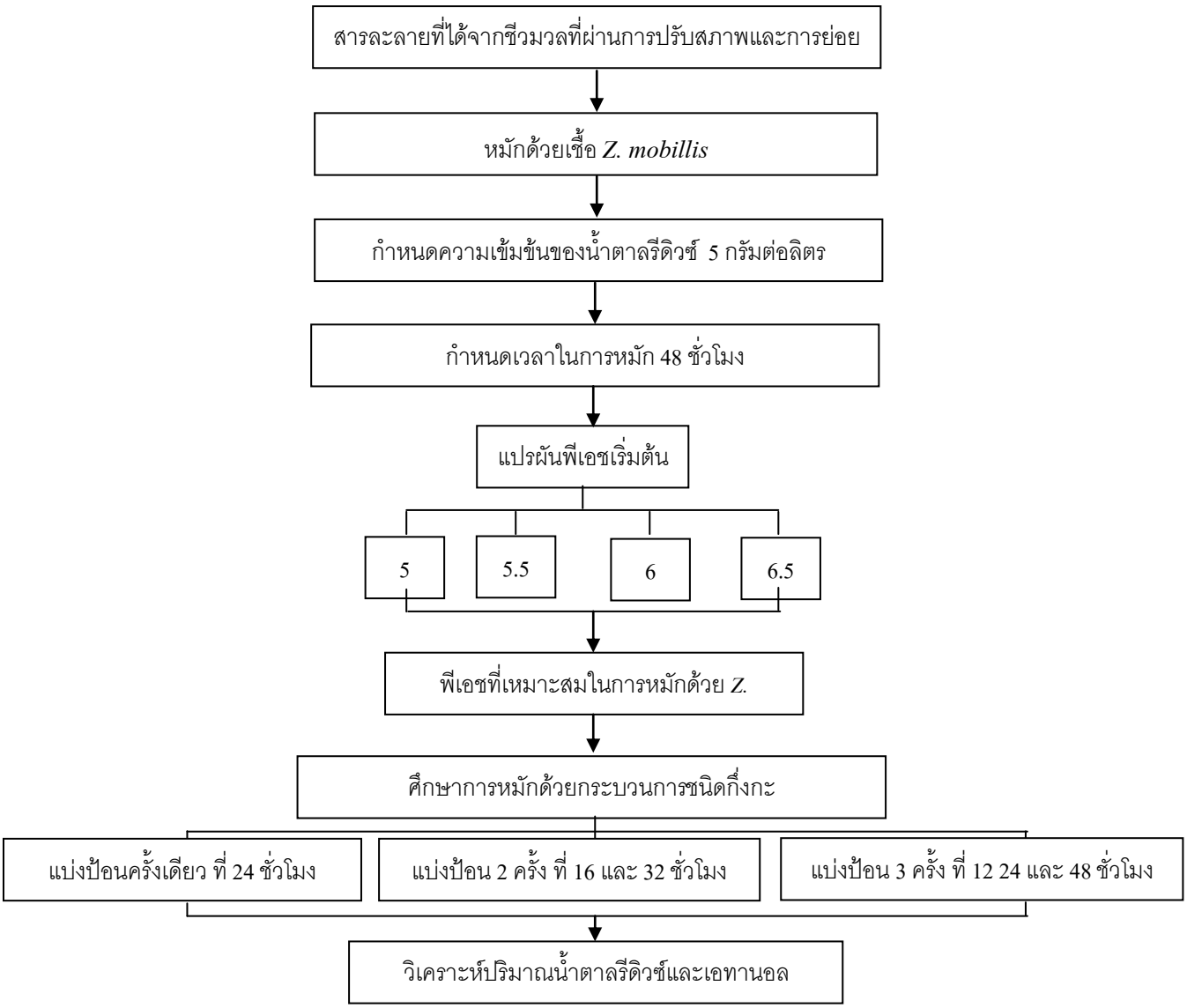
1. ชั่งตะกอนชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.3.2 น้ำหนัก 50 มิลลิกรัมใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ที่พีเอชเหมาะสมจากข้อ 3.3.3.1
2. เติมเอนไซม์เซลลูเลสโดยแปรผันความเข้มข้น 1 – 120 FPUต่อกรัมชีวมวล
3. ทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เก็บตัวอย่างสารละลายแต่ละหลอดไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

3.3.3.3 วิธีการทดลองศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ

1. ชั่งตะกอนชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.3.2 น้ำหนัก 50 มิลลิกรัมใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ 1.5 มิลลิลิตร ที่พีเอชเหมาะสมจากข้อ 3.3.3.1
2. เติมเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.2
3. ทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
4. เก็บตัวอย่างสารละลายแต่ละหลอดไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 - 48 ชั่วโมงของการย่อย

3.3.4 ศึกษาการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลปรับสภาพ ด้วย *Z. mobillis*

เป็นการศึกษาหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม หรือสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลผลผลิตมากที่สุดในการหมักชีวมวลที่ผ่านปรับสภาพด้วยกรดซัลฟุริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนและผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว โดยแผนผังการทดลองดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 แผนผังการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในหมักชีวมวล

3.3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อ *Z. mobilis*

ถ่ายเชื้อโดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อมาลากลงบนอาหารแข็งเอียงตามสูตรดังแสดงในภาคผนวก ก นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารใหม่ (Subculture) ทุก 3 เดือน

3.3.4.2 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เตรียมอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นตามสูตรในภาคผนวก ก ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อ เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นเขี่ยเชื้อ 1 ลูปจาก agar slant ลงบนอาหารแข็งบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ นำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.3.4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis*

1. เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อตามสูตรในภาคผนวก ก แล้วถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียวหลอดละ 15 มิลลิลิตร และใส่ในขวดรูปชมพู่ขวดละ 50 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นเขี่ยเชื้อ 1 ลูปจาก agar slant ใส่ลงในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.4

3. ถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตรจากหลอดทดลองลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรทุก 3 ชั่วโมง เพื่อสร้างกราฟการเจริญของเชื้อ (Growth curve)

3.3.4.4 การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น

1. เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อตามสูตรในภาคผนวก ก แล้วถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียวหลอดละ 15 มิลลิลิตร และใส่ในขวดรูปชมพู่ขวดละ 50 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นเขี่ยเชื้อ 1 ลูปจาก agar slant ใส่ลงในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.2

3. นำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ

3.3.4.5 ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลปรับสภาพ ด้วย *Z. mobillis*

เตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลให้มีความเข้มข้นน้ำตาลเป็น 5 กรัมต่อลิตร

1. นำสารละลายน้ำตาลที่ได้มาเติมสารอาหารตามสูตรอาหารเหลวสำหรับเตรียมเชื้อหมักแต่ไม่เติมกลูโคส แล้วปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5 5.5 6 และ 6.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์

2. ถ่ายสารละลายที่ได้ใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ทำการถ่ายเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร จากข้อ 3.3.4.3 ลงในอาหารเหลวสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วจากข้อ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ดังภาคผนวก ข

3.3.4.6 ศึกษาการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ ด้วย *Z. mobilis* โดยกระบวนการหมัก ชนิดกึ่งกะ (Fedbatch)

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลให้มีความเข้มข้นน้ำตาลเป็น 5 กรัมต่อลิตร

2. นำสารละลายน้ำตาลที่ได้มาเติมสารอาหารตามสูตรอาหารเหลวสำหรับเตรียมเชื้อหมักแต่ไม่เติมกลูโคส แล้วปรับค่าพีเอชเท่ากับพีเอชที่เหมาะสมจากการทดลอง 3.3.4.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์

3. ถ่ายสารละลายที่ได้ใส่ขวดรูปชมพู่ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. ทำการถ่ายเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร จากข้อ 3.3.4.3 ลงในอาหารเหลวสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วจากข้อ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที

5. เติมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการแบ่งเติม 3 แบบ คือ ป้อนครั้งเดียว ป้อน 2 ครั้ง และป้อน 3 ครั้ง ซึ่งปริมาณในการเติมจะขึ้นกับการแบ่ง คือ ถ้าแบ่งป้อนครั้งเดียวจะเติมอาหารร้อยละ 50 ที่ 24 ชั่วโมง แบ่งป้อน 2 ครั้ง จะเติมอาหารครั้งละร้อยละ 33.33 ที่ 16 และ 32 ชั่วโมง ส่วนการป้อน 3 ครั้งจะแบ่งเติมทีละร้อยละ 25 ที่ 12 24 และ 36 ชั่วโมง

6. เก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ดังภาคผนวก ข

3.3.4.7 ศึกษาการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อผสมระหว่าง *Z. mobilis* กับ *S. cerevisiae*

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชีวมวลให้มีความเข้มข้นน้ำตาลเป็น 5 กรัมต่อลิตร

2. นำสารละลายน้ำตาลที่ได้มาเติมสารอาหารตามสูตรอาหารเหลวสำหรับเตรียมเชื้อหมักแต่ไม่เติมกลูโคส ดังภาคผนวก ก แล้วปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5 5.5 6 และ 6.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์

3. ถ่ายสารละลายที่ได้ใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. ทำการถ่ายเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วจากข้อ 3 ซึ่งเชื้อ *S. cerevisiae* เตรียมตามข้อ 3.3.4.4 แต่ใช้อายุเชื้อตาม ชินพร, 2551 ส่วนเชื้อผสมระหว่าง *Z. mobilis* กับ *S. cerevisiae* เตรียมเช่นเดียวกัน โดยเลี้ยงแยกกันตามอายุเชื้อของทั้งสองชนิดแล้วนำมาผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ก่อนทำการหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ดังภาคผนวก ข

3.4 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ที่ทำการวิเคราะห์

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์	ช่วงการเก็บตัวอย่าง/การวัด
1. พีเอช	เครื่องวัดพีเอช	ก่อนและหลังการปรับสภาพ ส่วนการย่อยและการหมักวัดระหว่างการทดลอง
2. อุณหภูมิ	เทอร์โมมิเตอร์	ขณะทำการปรับสภาพ
3. องค์ประกอบต่างๆ ในชีวมวล	วิธี TAPPI 203 cm-88 (TAPPI, 2000) (ภาคผนวก ข)	ก่อนและหลังการปรับสภาพ
4. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	วิธีของ Mandel และ Sternbery (Mandel and Sernbery, 1976) (ภาคผนวก ข)	หลังจากการย่อย และระหว่างการหมัก
5. ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์	วิธีของ Mandel และ Sternbery (Mandel and Sernbery, 1976) (ภาคผนวก ข)	ก่อนการย่อย
6. ปริมาณเอทานอล	Gaschromatogragphy (ภาคผนวก ข)	ระหว่างการหมัก

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 องค์ประกอบของชานอ้อยและซังข้าวโพด

ชีวมวลที่ใช้ในการทดลอง เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม 2 ชนิดได้แก่ ชานอ้อยและซังข้าวโพด หลังจากผ่านการทำให้แห้ง บดละเอียด และคัดขนาดเล็กกว่า 0.2 มิลลิเมตร เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบต่างๆในชีวมวล ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีของ TAPPI 203 om-88 พบว่า ซังข้าวโพดมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ร้อยละ 66.52 19.21 และ 14.27 ตามลำดับ ส่วนชานอ้อยมีองค์ประกอบเท่ากับร้อยละ 63.0 20.21 และ 16.79 ตามลำดับ ซึ่งมีองค์ใกล้เคียงกัน โดยซังข้าวโพดมีเซลลูโลสมากกว่าชานอ้อยประมาณร้อยละ 3.52 แต่มีเฮมิเซลลูโลสและลิกนินน้อยกว่าชานอ้อย เท่ากับร้อยละ 1 และ 2.52 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ร้อยละขององค์ประกอบในชีวมวล

ชีวมวล	ร้อยละขององค์ประกอบ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ซังข้าวโพด	66.52	19.21	14.27
ชานอ้อย	63.00	20.21	16.79

จากตารางที่ 4.1 บ่งชี้ว่า ชีวมวลทั้งสองชนิดมีปริมาณเซลลูโลสค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชีวมวลชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 4.2 ชานอ้อยและซังข้าวโพดจึงเหมาะ สมที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นเอทานอล แต่เนื่องจากยังมีส่วนประกอบอื่นอยู่ในโครงสร้าง ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสให้เป็นน้ำตาล เพื่อผลิตเอทานอล ดังนั้น จึงต้องทำการปรับสภาพเพื่อแยกองค์ประกอบดังกล่าว ออกจากโครงสร้าง และปรับ ปรุง โครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ก่อน

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบองค์ประกอบชีวมวลชนิดต่างๆ (Sun และ Cheng, 2002)

ชีวมวล	ร้อยละขององค์ประกอบ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าวเจ้า	32.1	24.0	18.0
ฟางข้าวสาลี	30.0	50	15
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
หญ้าเบอร์มิวดา	25.0	35.7	18.9
ซังข้าวโพด	45	35	15
ชานอ้อย	33.4	30.0	18.9

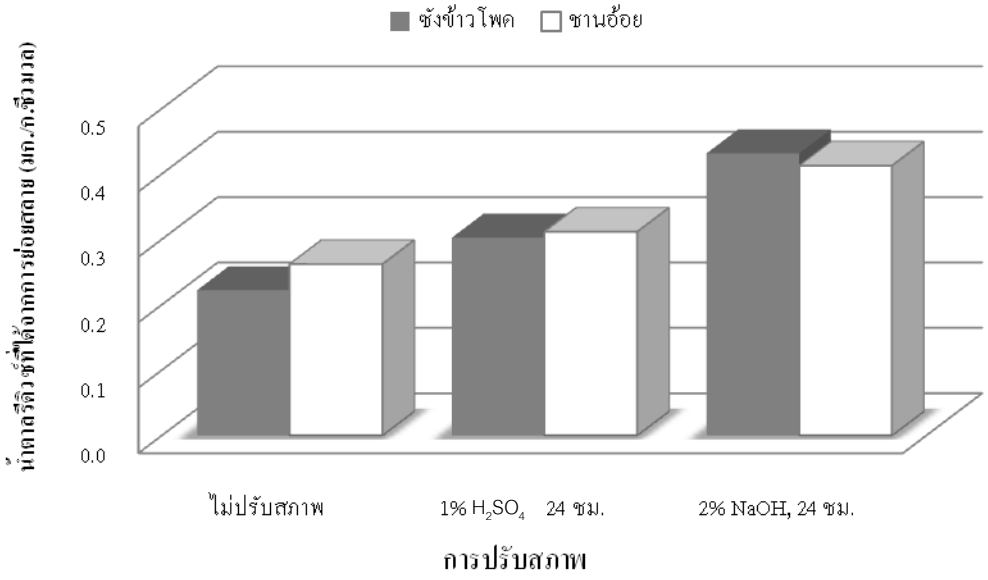
4.2 การ ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลด้วยกรดซัลฟุริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน

4.2.1 การปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริก

เมื่อทำการปรับสภาพซังข้าวโพด และชานอ้อย ที่ผ่านการทำให้แห้งบดละเอียด และคัดขนาดเล็กกว่า 0.2 มิลลิเมตรแล้ว ด้วยวิธีทางเคมีโดยการนำมาแช่ในสารละลายกรดซัลฟุริก ความเข้มข้น ร้อยละ 1 หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับวัสดุชีวมวลก่อนปรับสภาพ จากผลการทดลอ งการปรับสภาพชีวมวลด้วยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้อัตราส่วน องค์ประกอบ ของชีวมวลเปลี่ยนแปลงไป ค่อนข้างมาก ซึ่งพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการนำชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 15 FPU ต่อกรัมชีวมวล ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 5 ที่ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย 1 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการย่อยสลายชีวมวลที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ พบว่า ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้น 0.21 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด หรือประมาณร้อยละ 49 สำหรับชานอ้อยเมื่อปรับสภาพด้วยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีอัตราส่วน เซลลูโลส ในชีวมวลที่ปรับสภาพแล้ว เพิ่มสูงขึ้น เช่นกัน จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มสูงขึ้น 0.15 หรือประมาณร้อยละ 37 ในขณะที่การแช่ชีวมวลในสารละลายกรดซัลฟุริกความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำให้ อัตราส่วน องค์ประกอบ ของทั้ง ซังข้าวโพดและชานอ้อย

เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ ดังรูปที่ 4.1

จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่า การปรับสภาพชีวมวลในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่สามารถทำให้อัตราส่วนเซลลูโลสออกมาเพิ่มสูงขึ้นได้ แต่กำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลสต่อไปได้ อีกทั้งการปรับสภาพโดยแช่ในสารละลายกรดอ่อน และสารละลายด่างอ่อนจำเป็นต้องใช้เวลานาน ดังนั้นจึงทำการทดลองปรับสภาพต่อโดยการนำชีวมวลไปปรับสภาพด้วย สารเคมี ร่วมกับการให้ความร้อน เพื่อลดระยะเวลาในการทำปฏิกริยาลงและอาจช่วยเพิ่มอัตราส่วนเซลลูโลสในชีวมวลด้วย

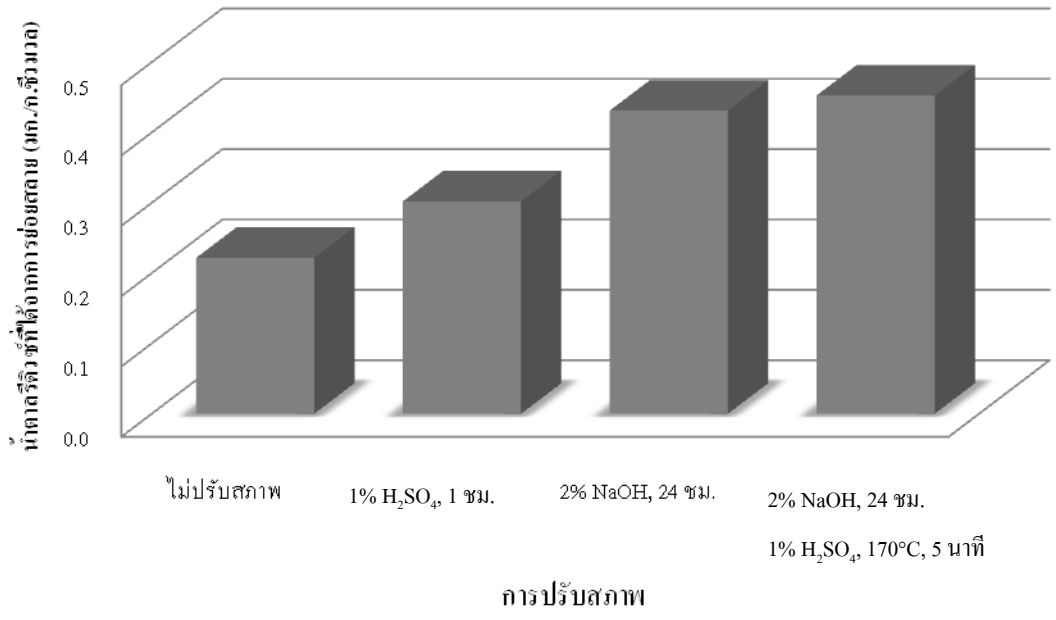


รูปที่ 4.1 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายองค์ประกอบเซลลูโลสของซังข้าวโพดและชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมี

4.2.2 การปรับสภาพชีวมวลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกร่วมกับความร้อน

การปรับสภาพซังข้าวโพด และชานอ้อย ด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับการให้ความร้อน โดยการนำวัสดุชีวมวลดังกล่าวมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น ร้อยละ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างน้ำจนเป็นกลาง แล้วเติมสารละลายกรดซัลฟุริกความเข้มข้น ร้อยละ 1 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 150 และ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า การให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆไม่มีผลต่อ อัตราส่วน เซลลูโลส ในซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้ว เมื่อพิจารณาจาก

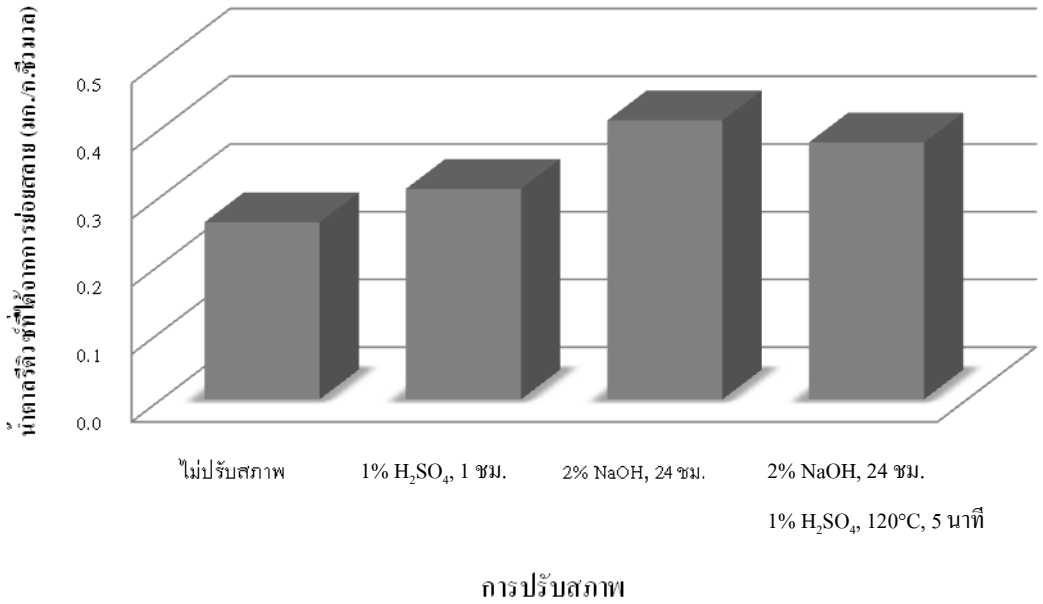
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายซังข้าวโพดปรับสภาพ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 15 FPUต่อกรัมชีวมวล ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 5 ที่ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย 1 ชั่วโมง โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 0.30 – 0.45 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด ที่อุณหภูมิ 120 – 170 องศาเซลเซียส โดยมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนเซลลูโลสสูงที่สุด เมื่อให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าซังข้าวโพดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ 0.23 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด หรือเพิ่มขึ้นถึงประมาณร้อยละ 51 โดยการปรับสภาพด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกร่วมกับความร้อน นั้น ทำให้มี ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ มากกว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียวประมาณร้อยละ 5 และทำให้อัตราส่วน เซลลูโลสมากขึ้นจากซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟุริกร้อยละ 33 ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพสำหรับซังข้าวโพด คือ ปรับสภาพด้วยการแช่ในสารละลาย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายกรดซัลฟุริกความเข้มข้น ร้อยละ 1 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อการปรับสภาพซังข้าวโพด
ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกร่วมกับความร้อน

สำหรับ การปรับสภาพ ชานอ้อย พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อ อัตราส่วน เซลลูโลส ในชีวมวลไม่มากนักเช่นเดียวกับซังข้าวโพด โดยเมื่อนำชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสด้วยสภาวะเดียวกันกับการย่อยสลายซังข้าวโพด ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 0.31 – 0.41 กรัมต่อกรัมชานอ้อย และเมื่อนำชานอ้อยปรับสภาพโดยให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการให้ความร้อน 5 นาที พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.38 กรัมต่อกรัมชานอ้อย ใกล้เคียงกันกับการปรับสภาพด้วยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีปริมาณน้ำตารีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัมชานอ้อย ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชานอ้อย คือ ปรับสภาพด้วยการแช่ในสารละลาย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยไม่ต้องให้ความร้อน ดังรูปที่ 4.3

การปรับสภาพด้วยสารเคมีร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมินั้น จะทำให้สามารถแยกเซลลูโลสออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ดี ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นต่อไปได้ แต่ยังมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการปรับสภาพคือ อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ใช้ ขนาดของวัตถุดิบ และปริมาณความชื้น (Sanchez และ Cardona, 2008)



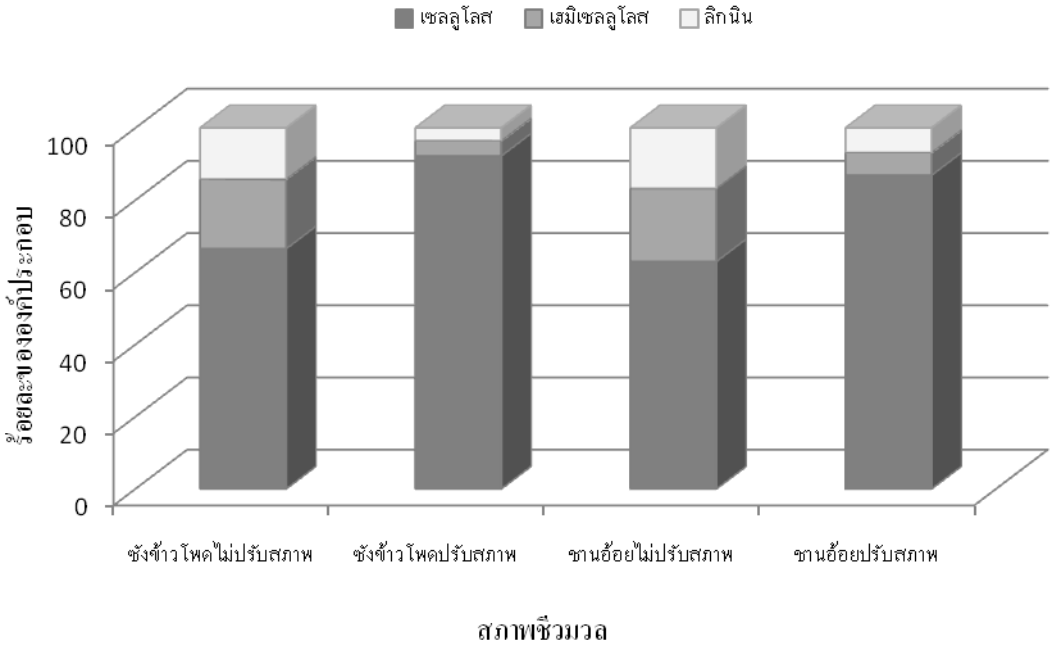
รูปที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อการปรับสภาพชานอ้อย
ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟุริกร่วมกับความร้อน

จากผลการทดลองที่ผ่านมา ข้างต้น ทำให้สามารถคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการปรับสภาพชีวมวลแต่ละชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ต่อไป โดยแสดงสรุป ร้อยละขององค์ประกอบชีวมวลจากการปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ ได้ดังตารางที่ 4.3 สามารถเลือกวิธีที่เหมาะสมในการปรับสภาพได้ ดังนี้ สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพสำหรับซังข้าวโพด คือ การแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปให้ความร้อน ในสารละลายกรดซัลฟุริกความเข้มข้นร้อยละ1 ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที เนื่องจากวิธีดังกล่าวทำให้อัตราส่วนองค์ประกอบของซังข้าวโพดเปลี่ยนไปมากที่สุด การปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟุริก และความร้อนนั้น จะทำให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น และเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลง เนื่องจากสารเคมีจะเข้าทำปฏิกิริยาการสลายพันธะของโครงสร้างระหว่างลิกนินและเซลลูโลส โดยมีความร้อนช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยา จึงทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสหลุดออกมาจากตะกอนชีวมวลได้มากขึ้น และเพิ่มรูพรุนและพื้นที่ผิวให้กับวัตถุดิบ ทำให้ย่อยสลายได้ดีขึ้น (Silverstein, 2004)

ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชานอ้อย คือ ปรับสภาพด้วยการแช่ในสารละลายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น เนื่องจากการปรับสภาพด้วยวิธีดังกล่าว ทำให้อัตราส่วนองค์ประกอบในชานอ้อยใกล้เคียงกับการปรับสภาพร่วมกับความร้อน แต่ไม่ต้องทำการให้ความร้อนร่วมด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนองค์ประกอบดังแสดงในรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ

ชีวมวล	การปรับสภาพ	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ (ก./ก.ชีวมวล)	ร้อยละของการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์
ซังข้าวโพด	ไม่ปรับสภาพ	0.22	-
	1% H_2SO_4, 24 hr	0.30	26.67
	2% NaOH, 24 hr	0.43	48.83
	2% NaOH, 24 hr, 1% H_2SO_4, 170°C, 5 min	0.45	51.11
ชานอ้อย	ไม่ปรับสภาพ	0.26	-
	1% H_2SO_4, 24 hr	0.31	16.13
	2% NaOH, 24 hr	0.41	36.58
	2% NaOH, 24 hr, 1% H_2SO_4, 120°C, 5 min	0.38	31.59

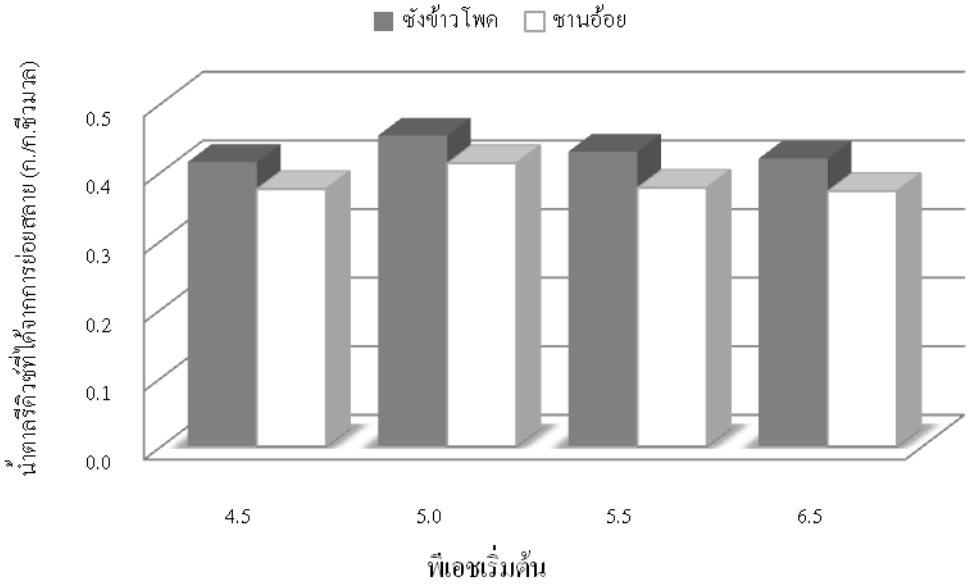


รูปที่ 4.4 ร้อยละขององค์ประกอบในชีวมวลเมื่อปรับสภาพที่สภาวะเหมาะสม

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.3.1 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อ การย่อยสลาย ชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

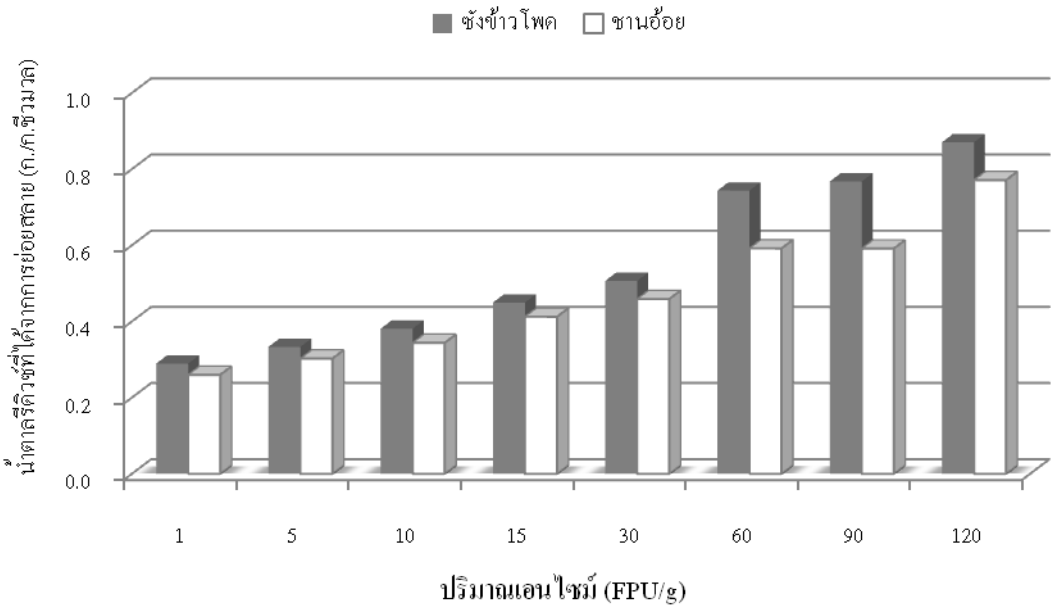
การทดลองศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของสารละลายที่มี ต่อการย่อยสลาย เซลลูโลสในชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยนำซังข้าวโพดและชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพที่สภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลอง 4.2 มาย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 15 FPUต่อกรัมชีวมวล ทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 4.5 – 6.5 ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิต ได้ พบว่าพีเอชมีผลต่อการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยเพียงเล็กน้อย ซังข้าวโพดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.41 – 0.45 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด ที่พีเอช 5 ส่วนชานอ้อยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าซังข้าวโพดซึ่งเท่ากับ 0.37 – 0.41 กรัมต่อกรัมชานอ้อย ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัมชานอ้อย ที่พีเอช 5 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่า ที่พีเอช 5 ทั้งซังข้าวโพดและชานอ้อยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ดังนั้น จึงเลือกพีเอช 5 มาทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป



รูปที่ 4.5 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.3.2 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ

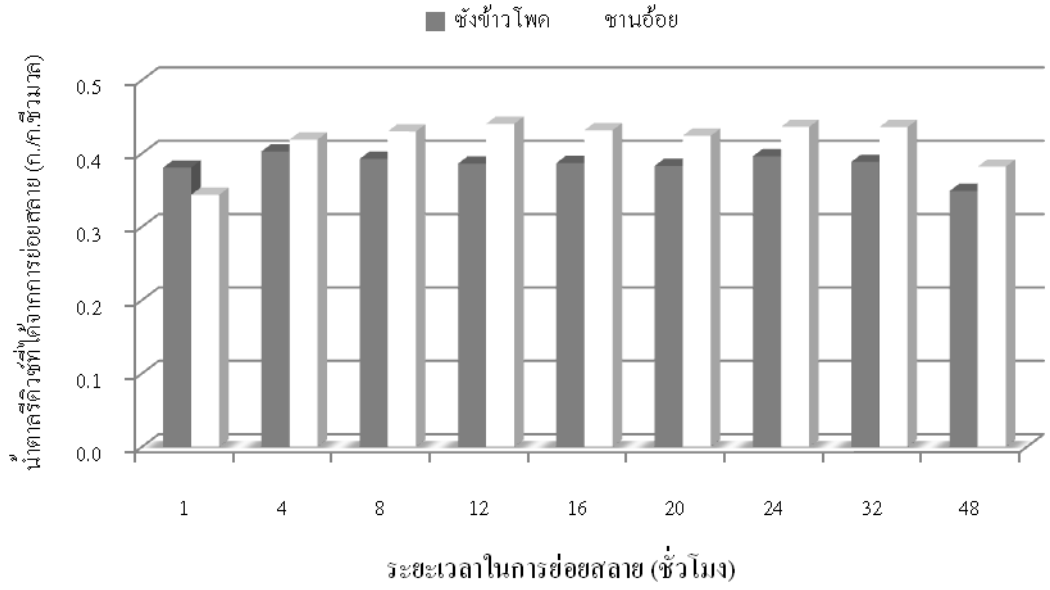
ทำการย่อยสลายเซลลูโลสในซังข้าวโพด และชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ แล้วจากการทดลอง 4.2 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 1-120 FPUต่อกรัมชีวมวล ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มี พีเอชเท่ากับ 5 จากการทดลองที่ 4.3.1 ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า ทั้งซังข้าวโพดและชานอ้อยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสตั้งแต่ 1 – 30 FPUต่อกรัมชีวมวล และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสมากกว่า 30 FPUต่อกรัม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้นด้วย ซึ่งการย่อยสลายเซลลูโลสในซังข้าวโพดและชานอ้อย มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด เท่ากับ 0.87 และ 0.77 กรัมต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 120 FPUต่อกรัม แต่เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลส 10 FPUต่อกรัม พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน คือ 0.38 และ 0.34 กรัมต่อกรัมชีวมวล ซึ่งเห็นได้ว่าใช้เอนไซม์น้อยกว่าถึง 3 เท่า ดังรูปที่ 4.6 ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 10 FPUต่อกรัมชีวมวล มาทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการย่อยสลายต่อไป ซึ่งเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการย่อยสลายได้ เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสมีราคาค่อนข้างสูง



รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.3.3 ผลของระยะเวลาในการย่อยสลายที่มีต่อการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ

ทำการย่อยสลายเซลลูโลสในซังข้าวโพด และชานอ้อย ที่ผ่านการปรับสภาพ จากการทดลองที่ 4.2 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 10 FPUต่อกรัมชีวมวล จากการทดลองที่ 4.3.2 ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มี พีเอช 5 โดยติดตามปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นใน การย่อยสลายเซลลูโลสที่ระยะเวลาตั้งแต่ 1-48 ชั่วโมง พบว่า การย่อยสลายเซลลูโลสในซังข้าวโพดที่เวลา 4 ชั่วโมง ทำให้เกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคือ 0.40 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด ส่วนการย่อยสลายเซลลูโลสในชานอ้อยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ที่เวลาในการย่อยเท่ากับ 12 ชั่วโมง มีปริมาณเท่ากับ 0.44 กรัมต่อกรัมชานอ้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่การย่อยสลายเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับ 0.42 กรัมต่อกรัมชานอ้อย พบว่า ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเพียงร้อยละ 4.76 ดังรูปที่ 4.7 ดังนั้น จึงเลือกเวลา 4 ชั่วโมงมาใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสในชานอ้อยเช่นเดียวกับซังข้าวโพด



รูปที่ 4.7 ปฏิกริยาการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ
ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองศึกษาพีเอชเริ่มต้น ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพเพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ในขณะที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสน้อยที่สุด ซึ่งในส่วนของการย่อยสลายในงานวิจัยนี้ได้สนใจเฉพาะน้ำตาลกลูโคสที่ได้จาก

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสเท่านั้น เนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักที่มีมากที่สุดในซังข้าวโพดและชานอ้อย การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย่อยสลาย พบว่า เมื่อย่อยสลายซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้เอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 10 FPUต่อกรัมชีวมวล พีเอช 5 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีร้อยละการเปลี่ยนชีวมวลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณร้อยละ 40 ซึ่งมากกว่าซังข้าวโพดที่ไม่ได้ปรับสภาพประมาณร้อยละ 18 ส่วนชานอ้อยปรับสภาพที่ย่อยสลายด้วยสภาวะที่เหมาะสมเดียวกับซังข้าวโพดมีร้อยละการเปลี่ยนชีวมวลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณร้อยละ 42 ซึ่งมากกว่าชานอ้อยที่ไม่ได้ปรับสภาพประมาณร้อยละ 16 และมากกว่าซังข้าวโพดที่ปรับสภาพร้อยละ 2 แสดงให้เห็นว่าวิธีการปรับสภาพและเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อยได้ดี ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพ

ชีวมวล	สภาวะ การย่อยสลาย	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ จากการย่อยสลาย (มก./กรัมชีวมวล)	ร้อยละ การเปลี่ยนชีวมวล เป็นน้ำตาลรีดิวซ์
ซังข้าวโพด ปรับสภาพ	เซลลูเลส 10 FPU/g พีเอช 5 เวลา 4 hr	402.64	40.26
ซังข้าวโพด ไม่ปรับสภาพ	เซลลูเลส 10 FPU/g พีเอช 5 เวลา 4 hr	221.63	22.16
ชานอ้อย ปรับสภาพ	เซลลูเลส 10 FPU/g พีเอช 5 เวลา 4 hr	418.87	41.89
ชานอ้อย ไม่ปรับสภาพ	เซลลูเลส 10 FPU/g พีเอช 5 เวลา 4 hr	261.49	26.15

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Li, Kim และ Nghiem (2010) ซึ่งนำเอาซังข้าวโพดมาใช้ผลิตเป็นเอทานอล โดยปรับสภาพก่อนด้วยสารละลายแอมโมเนียแบบ Soaking in aqueous ammonia (SAA) ร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก เติมในอัตราส่วน 1 ต่อ 11 ชีวมวลต่อสารละลาย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปั่นกวนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ไซเลเนสและเอนโดกลูคาเนส น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ คือ 5.8 กรัมต่อลิตร มากกว่าซังข้าวโพดที่ไม่ปรับสภาพร้อยละ 28 ซึ่งน้อยกว่าในงานวิจัยนี้ และ ในงานวิจัยของ Salas และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลของชานอ้อย โดยทำการปรับสภาพด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียสและความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำชานอ้อยที่ได้มาทำการปรับสภาพต่อด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 โดยชีวมวล 2 กรัมผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วให้

ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียสและความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับพีเอชเท่ากับ 5-7 แล้วย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลโดย เอนไซม์ Celluclast ที่มีแอคติวิตี 107 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณ ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยสลาย มีปริมาณน้ำตาลเป็น 50.08 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 50 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง หรือเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าในงานวิจัยนี้แต่การปรับสภาพด้วยวิธีการดังกล่าวต้องสูญเสียพลังงานในการให้ความร้อนสำหรับการปรับสภาพมากกว่าในงานวิจัยนี้ และยังมีงานวิจัยอื่นที่ศึกษาการปรับสภาพชีวมวลต่างๆในการผลิตเอทานอลอีกดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการย่อยสลายชีวมวลให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในงานวิจัยนี้และงานวิจัยอื่น

วัสดุชีวมวล	การปรับสภาพ	สภาวะการย่อย				ผลการย่อย	รายการอ้างอิง
		ปริมาณเอนไซม์	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)		
ชานอ้อย	โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 ให้ความร้อนที่ 121°C และความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 4 ชั่วโมง	Celluclast 107 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก	5.0	55	4	50.08 กรัมต่อลิตร ร้อยละ 50 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง	Salas, J. และคณะ, 2009
ชานอ้อย	ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ให้ความร้อนอุณหภูมิ 190 °C, 5 นาที	Celluclast 1.5 L 65 FPU/กรัม และ Novozym 188 376 IU/กรัม-กลูโคซิเดส	5.0	40	72	0.68 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	Carrasco, C. และคณะ, 2010
ซังข้าวโพด	สารละลายแอมโมเนียแบบ Soaking in aqueous ammonia ร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 60 °C, 12 ชั่วโมง	ไซเลเนส 8000 GXU/g-glucan เอ็นโดกลูคาเนส 50 units/g-glucan และกลูคาเนส GC220 15 FTU 220 g/g-glucan ร่วมกับNovozyme 188 30 CBU/g-glucan	4.8	40	24	5.8 กรัมต่อลิตรไซโลสมากกว่าซังข้าวโพดที่ไม่ปรับสภาพร้อยละ 28	Li, X., Kim, T., และ Nghiem, N., 2010
ชานอ้อย	โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2, 24 ชั่วโมง	เซลลูเลส 10 FPUต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	5.0	50	4	9.02 กรัมต่อลิตร 0.42 กรัมต่อกรัมชีวมวล	งานวิจัยนี้

วัสดุชีวมวล	การปรับสภาพ	สภาวะการย่อย				ผลการย่อย	รายการอ้างอิง
		ปริมาณเอนไซม์	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)		
ซังข้าวโพด	โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2, 24 ชั่วโมง ให้ความร้อนในกรดซัลฟุริกร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 170 °C , 5 นาที	เซลลูเลส 10 FPUต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	5.0	50	4	8.74 กรัมต่อลิตร 0.40 กรัมต่อกรัมชีวมวล	งานวิจัยนี้
ฟางข้าว	แช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 โมลาร์, 24 ชั่วโมง ต้มที่อุณหภูมิ 70 °C, 90 นาที	เซลลูเลส 500 ไมโครลิตรต่อกรัม เซลลูโลส	4.0	55	16	0.557 กรัมต่อกรัม เซลลูโลส	ระวีวรรณ แกล้วกล้า, 2538
เหง้ามันสำปะหลัง	แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์, 24 ชั่วโมง ต้มที่อุณหภูมิ 50 °C, 90 นาที	เอนไซม์เซลลูบริกซ์ 4.079 FPU ต่อกรัม เหง้ามันสำปะหลัง	4.8	50	24	8.30 กรัมต่อลิตร ร้อยละการเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 21.62	พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545
กากว่านหางจระเข้	โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 ให้ความร้อนที่ 121 °C และความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 4 ชั่วโมง	Celluclast 107 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก	5.0	55	4	56.37 กรัมต่อลิตร ร้อยละ 55 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง	Salas, J. และคณะ, 2010

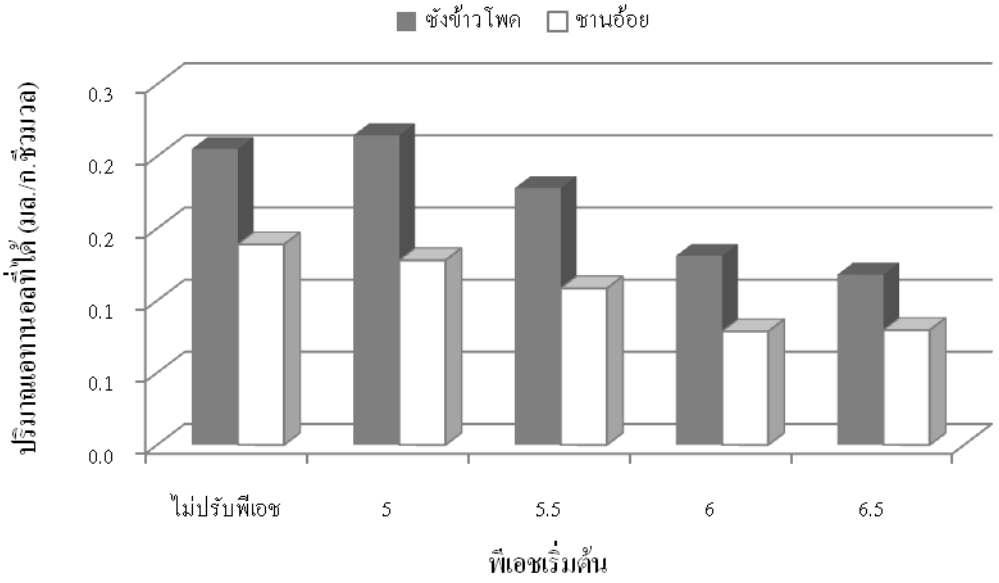
4.4 การหมักเอทานอลจาก น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ

4.4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis*

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis* เป็นการเลือกเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น สำหรับใช้ในการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพ ซึ่งจะเลือกใช้เชื้อที่เจริญเติบโตอยู่ในช่วง log phase หรือระยะเอกซ์โพเนนเชียล เป็นระยะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าต่อหน่วยเวลา กราฟจะมีลักษณะเป็นเส้นตรงที่มีความชันมากที่สุด โดยค่าความชันนี้ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ จึงเป็นช่วงที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด โดยเริ่มจากการเขี่ยเชื้อ *Z. mobilis* ในอาหารเอียงลงในอาหารเหลวที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.4 จากนั้นถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร จากหลอดทดลองที่ได้ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก 3 ชั่วโมง เพื่อสร้างกราฟการเจริญของเชื้อ (growth curve) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ในภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย โดยเจริญเติบโตไม่มากนักในช่วงเริ่มต้นถึง 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจริญอยู่ในช่วงเอกซ์โพเนเชียลซึ่งเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ที่เวลาประมาณ 12 – 24 ชั่วโมง แล้วเจริญแบบคงที่หลังจาก 30 ชั่วโมง และมีการเจริญเติบโตลดลงหลังจาก 60 ชั่วโมงของการเจริญเติบโตเป็นต้นไป จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถเลือกเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ได้ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง (ภาคผนวก ข) ซึ่ง เป็นการเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางของเอกซ์โพเนเชียล โดยเชื้อ *Z. mobilis* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด มาใช้เป็นอายุของเชื้อในการเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นในกระบวนการหมักต่อไป

4.4.2 ผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมัก เอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยเชื้อ *Z. mobilis*

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักชีวมวลด้วย *Z. mobilis* โดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพในสภาวะที่เหมาะสมทั้งซังข้าวโพดและชานอ้อย จากการทดลอง 4.3 มาใช้ในการหมักโดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาเตรียมเป็นอาหารหมักซึ่งมีสูตรเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์แทนน้ำตาลกลูโคส แล้วปรับ พีเอชเท่ากับ 5, 5.5, 6 และ 6.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วทำการหมักในสภาวะปราศจากอากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้กล้าเชื้อ *Z. mobilis* อายุ 18 ชั่วโมง พบว่า การหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากซังข้าวโพดได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ พีเอชเท่ากับ 5 ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 0.22 มิลลิลิตรต่อกรัมซังข้าวโพด คิดเป็นร้อยละของการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ (%Conversion) เท่ากับ 36.64 หรือคิดเป็นร้อยละ 34.35 ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ส่วนการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชานอ้อย พบว่า ชานอ้อยมีปริมาณเอทานอลน้อยกว่าซังข้าวโพดประมาณร้อยละ 10 โดยมีปริมาณเอทานอล สูงที่สุดที่สภาวะที่ได้จากการย่อยสลายโดยตรง หรือที่พีเอชเท่ากับ 5.08 ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 0.14 มิลลิลิตรต่อกรัมชานอ้อย คิดเป็นร้อยละการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 28.48 หรือคิดเป็นร้อยละ 26.21 ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ดังรูปที่ 4.8 ดังนั้น พีเอชเริ่มต้นประมาณ 5 เป็นพีเอชที่เหมาะสมในการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายซังข้าวโพด และชานอ้อย ปรับสภาพแล้วด้วยเชื้อ *Z. mobilis* ดังตารางที่ 4.6



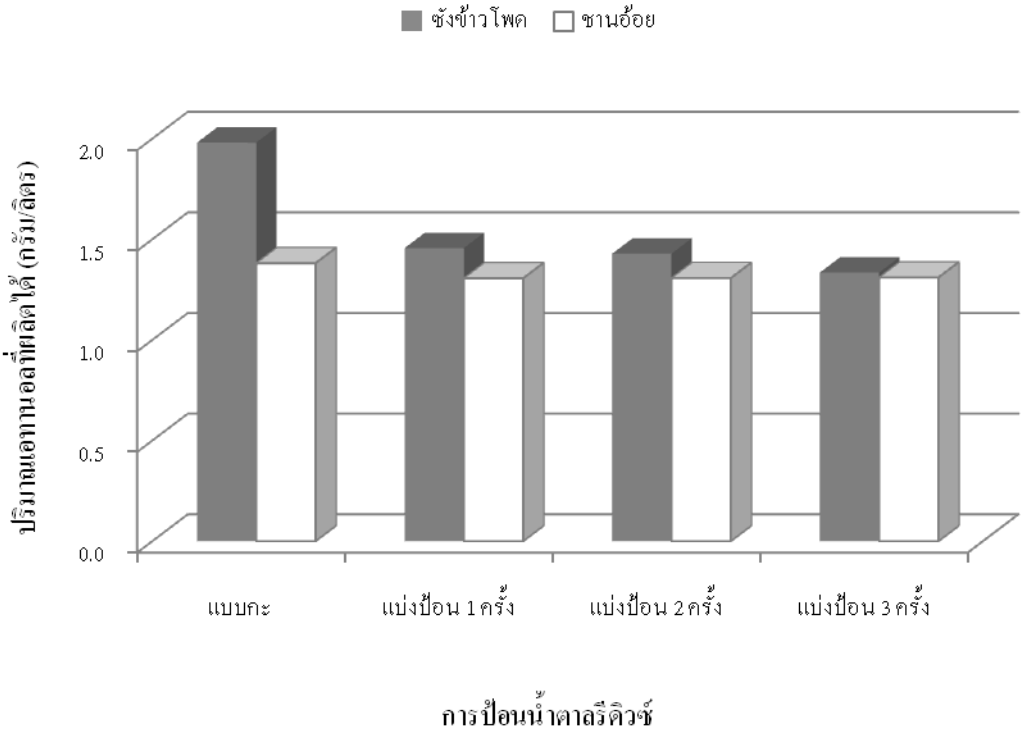
รูปที่ 4.8 ปริมาณเอทานอลจากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากซังข้าวโพดและชานอ้อย

ตารางที่ 4.6 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ของซังข้าวโพดและชานอ้อย

วัสดุชีวมวล	พีเอชเริ่มต้นในการหมัก	ปริมาณเอทานอล (มิลลิลิตรต่อกรัมชีวมวล)	ร้อยละการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์	ร้อยละของเอทานอลที่ผลิตได้เทียบกับค่าทางทฤษฎี
ซังข้าวโพด	5	0.22	31.70	35.93
	5.5	0.18	37.75	29.80
	6	0.13	37.76	21.94
	6.5	0.13	41.18	19.76
	ไม่ปรับพีเอช (5.45)	0.21	36.64	34.35
ชานอ้อย	5	0.13	35.72	24.13
	5.5	0.11	30.29	20.47
	6	0.08	35.47	14.83
	6.5	0.08	41.20	15.00
	ไม่ปรับพีเอช (5.08)	0.14	28.48	26.21

4.4.3 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วย *Z. mobilis* โดยกระบวนการหมัก ชนิดกึ่งกะ (Fedbatch)

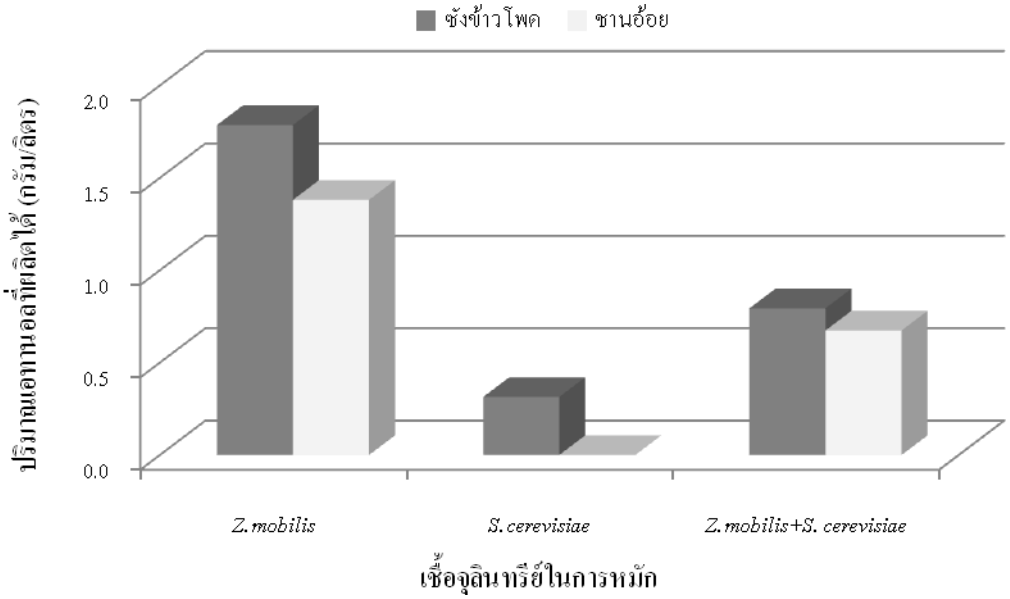
การศึกษาการหมักด้วยกระบวนการหมัก ชนิดกึ่งกะในการหมักชีวมวลด้วย *Z. mobilis* โดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพในสภาวะที่เหมาะสมทั้ง ซังข้าวโพด และชานอ้อย จากการทดลอง 4.3 มาหมักโดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาเตรียม เป็นอาหารหมัก ซึ่งมีสูตรเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำตาล ที่ย่อยสลายได้ แทนน้ำตาลกลูโคส แล้วทำการหมักในสภาวะปราศจากอากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้กล้าเชื้อ *Z. mobilis* อายุ 18 ชั่วโมง แบ่งการป้อนน้ำตาลรีดิวซ์ 3 แบบ คือ แบ่งป้อนครั้งเดียว, 2 และ 3 ครั้ง เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบกะในการทดลองที่ 4.4.2 ผลการทดลอง พบว่า การหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากซังข้าวโพด ด้วยเชื้อ *Z. mobilis* โดยทำการแบ่งป้อนน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ใช้ในการหมัก ทำให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้ มีปริมาณเอทานอลลดลง เมื่อเพิ่มจำนวนครั้งในการแบ่งป้อนมากขึ้นเทียบกับในการหมักแบบกะ ที่ไม่มีการแบ่งป้อนน้ำตาลรีดิวซ์ในการทดลองที่ 4.4.2 โดยการป้อนครั้งเดียวได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 1.45 กรัมต่อลิตร แต่น้อยกว่าแบบกะ 0.52 กรัมต่อลิตร ดังนั้น การหมักแบบกะจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายซังข้าวโพดปรับสภาพแล้วด้วยเชื้อ *Z. mobilis* เนื่องจากมีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มากกว่า ส่วน การหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชานอ้อย ด้วยเชื้อ *Z. mobilis* โดยทำการแบ่งป้อนน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า การแบ่งป้อนน้ำตาลรีดิวซ์ทำให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้มีปริมาณเอทานอลลดลง เช่นเดียวกับการหมักในซังข้าวโพด โดยการแบ่งป้อนทั้ง 3 แบบมีปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกันประมาณ 1.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าแบบกะประมาณ 0.07 กรัมต่อลิตร เท่านั้น ดังนั้น การหมักแบบกะจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลาย ชานอ้อย ปรับสภาพแล้วด้วยเชื้อ *Z. mobilis* เนื่องจากมี ร้อยละการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มากกว่า ดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ปริมาณเอทานอลจากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์แบบกึ่งกะเปรียบเทียบกับแบบกะ

4.4.4 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* และเชื้อผสมระหว่าง *Z. mobilis* กับ *S. cerevisiae*

การศึกษา การหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายซังข้าวโพดและชานอ้อย ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* และเชื้อผสมระหว่าง *Z. mobilis* กับ *S. cerevisiae* โดยทดลองเหมือนข้อ 4.4.3 แต่ใช้กล้าเชื้อ *Z. mobilis* อายุ 18 ชั่วโมง และกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* อายุ 9 ชั่วโมง (ชินพร, 2551) เปรียบเทียบกับการหมักด้วย *Z. mobilis* อย่างเดียว พบว่า การหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากซังข้าวโพดด้วย *Z. mobilis* อย่างเดียวมีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด ซึ่งเท่ากับ 1.79 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 35.93 ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ซึ่งมากกว่าการใช้ *S. cerevisiae* ประมาณ 6 เท่า และมากกว่าที่ใช้เชื้อผสมประมาณ 2 เท่า เช่นเดียวกับการการหมักชานอ้อยด้วย *Z. mobilis* ซึ่งมีปริมาณเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 1.38 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 26.21 ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ซึ่งมากกว่าที่ใช้เชื้อผสมประมาณ 2 เท่า และมากกว่าใช้ *S. cerevisiae* ซึ่งไม่มีเอทานอลเกิดขึ้น จากการทดลองการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพโดยเปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ในการหมัก 3 ชนิด ได้แก่ *Z. mobilis, S. cerevisiae* และเชื้อผสมระหว่าง *Z. mobilis* กับ *S. cerevisiae* พบว่า การหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* ทำให้ได้เอทานอลมากที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์อีก 2 ชนิด ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ซังข้าวโพด
โดยเปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด

จากการทดลองศึกษาผลของความร้อนและสารเคมีในการปรับสภาพขั้นต้นสำหรับ การผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพด และชานอ้อย หากสรุปโดยเริ่มต้นจากซังข้าวโพดและชานอ้อย 1 ตัน มาทำการปรับสภาพ ย่อยสลาย และหมัก ด้วยสภาวะที่เหมาะสมจนได้เป็นเอทานอล พบว่า เมื่อเริ่มต้นจากการใช้ซังข้าวโพด 1 ตัน มาทำการปรับสภาพด้วยการแช่ในสารละลาย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายกรดซัลฟุริกความเข้มข้น ร้อยละ 1 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที และย่อยสลายเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 5 ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 10 FPUต่อกรัมชีวมวล และ ระยะเวลาในการย่อยสลาย 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 328 กิโลกรัม จากนั้นเมื่อหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* ในสภาวะการหมักที่พีเอชประมาณ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล 215 ลิตร

เมื่อเปรียบเทียบกับการนำชานอ้อย 1 ตัน มาปรับสภาพด้วยการแช่ในสารละลาย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว ย่อยสลายเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 5 ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 10 FPUต่อกรัมชีวมวล และ ระยะเวลาในการย่อยสลาย 4 ชั่วโมง ที่ 50 องศาเซลเซียส จะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 312 กิโลกรัม จากนั้นเมื่อหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* ในสภาวะการหมักที่พีเอชประมาณ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ

ให้ได้ปริมาณเอทานอล 139 ลิตร ซึ่งพบว่า น้อยกว่าการผลิตจากซังข้าวโพด 76 ลิตร หรือในทางกลับกันการผลิตเอทานอล 1 ลิตรจะต้องใช้ซังข้าวโพดและชานอ้อยเท่ากับ 4.66 และ 7.20 กิโลกรัม ตามลำดับ

4.5 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อย

การศึกษาผลของความร้อนและสารเคมีในการปรับสภาพขั้นต้นสำหรับ การผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพด และชานอ้อย จากการทดลองที่ผ่านมา เมื่อนำซังข้าวโพดและชานอ้อยมาทำการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟุริก และความร้อน ย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* ที่สภาวะที่เหมาะสมแล้ว การหมักเอทานอลจากซังข้าวโพดมีปริมาณเอทานอล 0.22 มิลลิลิตรต่อกรัมชีวมวล หรือคิดเป็น ร้อยละ 35.93 ของเอทานอลที่ผลิตได้เทียบกับค่าทางทฤษฎี เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักเอทานอลจากชานอ้อยซึ่งมีปริมาณเอทานอล 0.14 มิลลิลิตรต่อกรัมชีวมวล หรือคิดเป็น ร้อยละ 26.21 ของเอทานอลที่ผลิตได้เทียบกับค่าทางทฤษฎี พบว่า ผลิตเอทานอลได้น้อยกว่าซังข้าวโพด 0.08 มิลลิลิตรต่อกรัมชีวมวล หรือประมาณร้อยละ 10 ของเอทานอลที่ผลิตได้เทียบกับค่าทางทฤษฎี แต่การผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดต้องทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟุริก และความร้อนร่วมด้วย ต่างจากการปรับสภาพชานอ้อยซึ่งปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่านั้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ซังข้าวโพดเป็นวัสดุชีวมวลที่นำผลิตเป็นเอทานอลได้ดีกว่าชานอ้อย ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อย

วัสดุชีวมวล	สารเคมีในการปรับสภาพ (ต่อกรัมชีวมวล)	เอนไซม์เซลลูเลส (ต่อกรัมชีวมวล)	ผลผลิตเอทานอล (มิลลิลิตร/กรัม)	ร้อยละของเอทานอลที่ผลิตได้เทียบกับค่าทางทฤษฎี
ซังข้าวโพด	-โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 กรัม - กรดซัลฟุริก 0.1 มิลลิลิตร	10 FPU	0.22	35.93
ชานอ้อย	-โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 กรัม	10 FPU	0.14	26.21

จากผลการทดลองการผลิตเอทานอลจากวัสดุชีวมวลที่เป็นซังข้าวโพดและชานอ้อยโดยการปรับสภาพเบื้องต้น สามารถสรุปได้ว่า วิธีการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยการแช่ในสารละลาย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วให้ความร้อนในสารละลายกรดซัลฟุริกที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส ตามด้วยการย่อยสลายโดยใช้เอมไซม์เซลลูเลส และหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* เป็นกระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดแล้ว โดยมีผลผลิตเอทานอลสูงถึง 0.22 มิลลิลิตรต่อกรัม และเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Kahar และคณะ (2010) พบว่า ได้ผลผลิตสูงกว่า นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณเอมไซม์ที่ใช้ย่อยสลาย พบว่า งานวิจัยนี้ใช้เอนไซม์น้อยกว่าอีกด้วย แต่เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Li และคณะ (2010) พบว่า มีผลผลิตเอทานอลต่ำกว่า เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวย่อยสลายซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์ ถึง 4 ชนิด ในการย่อย 2 ครั้ง ซึ่งจะทำให้มีน้ำตาลในการหมักมากกว่า จึงทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า

ส่วนการผลิตเอทานอลจากชานอ้อยโดยการปรับสภาพโดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตามด้วยการย่อยสลายโดยใช้เอมไซม์เซลลูเลส และหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* เช่นเดียวกับซังข้าวโพด พบว่า ได้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.14 มิลลิลิตรต่อกรัม ซึ่งค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Salas และคณะ (2009) และ Carrasco และคณะ (2010) เนื่องจากในงานวิจัยดังกล่าวทำการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับความดัน ทั้งยังใช้เอนไซม์ในการหมักที่มีแอคติวิตีสูงกว่าในงานวิจัยนี้ ดังตารางที่ 4.8 ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปจึงควรมีการพัฒนาปรับปรุงขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ หรือการย่อย เพื่อให้สามารถมีเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้กับชีวมวลอื่นๆ นอกเหนือจากซังข้าวโพดและชานอ้อย โดยเรียงลำดับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ เหง้ามันสำปะหลังในงานวิจัยของ พรรณวิไล (2545) 0.86 มิลลิลิตรต่อกรัม , ไม้ยูคาลิปตัสในงานวิจัยของ วนิดา (2551) 0.51 มิลลิลิตรต่อกรัม, ไม้ปอพลาร์ในงานวิจัยของ Chang และคณะ (2001) 0.24 มิลลิลิตรต่อกรัม, หญ้าสวิตซ์ในงานวิจัยของ Chang และคณะ (2001) ผักตบชวาในงานวิจัยของ Mishima และคณะ (2008) และซังข้าวโพดในงานวิจัยนี้ 0.22 มิลลิลิตรต่อกรัม, ดอกจอกในงานวิจัยของ Mishima และคณะ (2008) 0.20 มิลลิลิตรต่อกรัม, ฟางข้าวสาลีในงานวิจัยของ Linde และคณะ (2008) 0.17 มิลลิลิตรต่อกรัม, ชานอ้อยในงานวิจัยนี้ และกากว่านหางจระเข้ในงานวิจัยของ Salas และคณะ (2010) 0.14 มิลลิลิตรต่อกรัม ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลที่ได้จากการย่อยสลายและหมักเซลลูโลสที่ใช้ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

วัสดุชีวมวล	จุลินทรีย์	สภาวะในการหมัก			ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตเอทานอล (กรัม/กรัม)	ผลผลิตเอทานอล (มิลลิลิตร/กรัม)	เอกสารอ้างอิง
		พีเอช	อุณหภูมิ (^{O}C)	เวลา (ชั่วโมง)				
ซังข้าวโพด	*S. cerevisiae*	5.0	38	168	-	0.18	0.23	Chang และคณะ, 2001
ชานอ้อย	*S. cerevisiae*	5.0	30	48	50.08	0.12	0.15	Salas และคณะ, 2009
ชานอ้อย	*S. cerevisiae* TMB3400	-	30	72	20.00	0.17	0.22	Carrasco และคณะ, 2010
	S. cerevisiae TMB3006	-	30	72	20.00	0.36	0.46	
	Pichia stipitis CBS6054	-	30	72	20.00	0.09	0.11	
ซังข้าวโพด	*S. cerevisiae* NBRC2114	5.0	30	48	-	0.12	0.15	Kahar, Taku และ Tanaka, 2010
ซังข้าวโพด	*E. coli* ATCC_ 55124 และ *S. cerevisiae* ATCC_ 200062	5.0-7.0	37	120	-	0.28	0.36	Li, Kim และ Nghiem, 2010
ซังข้าวโพด	***Z. mobilis* TISTR 405**	**5.45**	**30**	**48**	**3.94**	**0.17**	**0.22**	**งานวิจัยนี้**
ชานอ้อย	***Z. mobilis* TISTR 405**	**5.08**	**30**	**48**	**3.93**	**0.11**	**0.14**	**งานวิจัยนี้**

4.9 เปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลที่ได้จากการย่อยสลายและหมักเซลลูโลสที่ใช้ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

วัสดุชีวมวล	จุลินทรีย์	สภาวะในการหมัก			ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตเอทานอล (กรัม/กรัม)	ผลผลิตเอทานอล (มิลลิลิตร/กรัม)	เอกสารอ้างอิง
		พีเอช	อุณหภูมิ (^{O}C)	เวลา (ชั่วโมง)				
ฟางข้าว	*S. cerevisiae* TISTR 5013	5.0	30	96	2.70	-	-	ระวีวรรณ, 2538
หญ้าสวิตซ์	*S. cerevisiae*	5.0	38	168	-	0.17	0.22	Chang และคณะ, 2001
ไม้ปอพลาร์	*S. cerevisiae*	5.0	38	168	-	0.19	0.24	Chang และคณะ, 2001
เหง้ามันสำปะหลัง	*Z. mobilis* TISTR 405	5.0	30	60	25.00	0.68	0.86	พรรณวิไล, 2545
ไม้ยูคาลิปตัส	*S. cerevisiae Sc90*	5.0	35	96	-	0.40	0.51	วนิดา และคณะ, 2551
ยอดและใบอ้อย	*S. cerevisiae* strain 765	13	30	240	-	-	-	Dawson และ Boopathy, 2007
ฟางข้าวสาลี	*S. cerevisiae*	5.0	35	72	-	0.13	0.17	Linde และคณะ, 2008
ผักตบชวา	*E. coli KO11*	5.0	37	96	-	0.17	0.22	Mishima และคณะ, 2008
ดอกจอก	*E. coli* KO11	5.0	37	96	-	0.16	0.20	Mishima และคณะ, 2008
ฟางข้าว	*S. cerevisiae* และ *P. stipitis*	6	30	79	-	-	-	Jeung และคณะ, 2010
กากว่านหางจระเข้	*S. cerevisiae*	5.0	30	48	56.37	0.11	0.14	Salas และคณะ, 2010

4.6 การประเมินศักยภาพของการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อย

ผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ในปีการผลิต 2553/2554 มีเนื้อที่เพาะปลูกรวมทั้งประเทศ 7.11 ล้านไร่ โดยมีผลผลิตรวมทั้งประเทศ 4.49 ล้านตัน โดยผลผลิตข้าวโพด 1 ตันจะได้ส่วนประกอบหลักเป็นเมล็ดข้าวโพดประมาณ 800 กิโลกรัม และได้ซังข้าวโพดประมาณ 200 กิโลกรัม จากผลผลิตจะได้เมล็ดข้าวโพด 3.59 ล้านตัน และซังข้าวโพดประมาณ 9 แสนตัน ซึ่งเมล็ดข้าวโพด มีความต้องการใช้ภายในประเทศ 3.3 ล้านตัน เหลือสำหรับส่งออกประมาณ 3 แสนตัน ในขณะที่ซังข้าวโพดเหลือ ประมาณ 2.4 แสนตัน เมื่อคิดศักยภาพของชีวมวลในการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพด พบว่า มีปริมาณ 215 ลิตรต่อตันซังข้าวโพด ดังนั้นจึงสามารถผลิตเป็นเอทานอลได้ 1.6 แสนลิตรต่อวัน หรือ 58.05 ล้านลิตรต่อปี ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ประมาณการการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพด

ประมาณการการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพด	
ผลผลิต	ล้านตัน/ปี
ข้าวโพด[1]	4.49
เมล็ดข้าวโพด[2]	3.59
ซังข้าวโพด[2]	0.90
ความต้องการใช้	
เมล็ดข้าวโพดภายในประเทศ[3]	3.30
เมล็ดข้าวโพดส่งออก[3]	0.29
ซังข้าวโพด[4]	0.63
เหลือซังข้าวโพด	0.27
ผลผลิตเอทานอล (ล้านลิตรต่อวัน)	0.16

ที่มา:

1. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554
2. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2548
3. สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2554
4. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2551

ด้านผลผลิตอ้อยในปีการผลิต 2553/2554 มีผลผลิตอ้อย รวมทั้งประเทศ ประมาณ 82.50 ล้านตัน และผลผลิตกากน้ำตาล 3.71 ล้านตัน เมื่อใช้กากน้ำตาลสำหรับการบริโภคภายในประเทศ และส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศจำนวน 1.90 ล้านตันแล้ว จะเหลือกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอล 1.81 ล้านตัน จากความสามารถในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล 250 ลิตรต่อตัน จึงได้เอทานอลประมาณวันละ 1.24 ล้านลิตร ส่วนกากอ้อยโดยผลผลิต อ้อย 1 ตัน จะได้กากอ้อยประมาณ 270 กิโลกรัม จากผลผลิตจึงมีกากอ้อย 22.27 ล้านตัน นำไปใช้ภายในประเทศ 20.05 ล้านตัน ทำให้เหลือกากอ้อยเพียง 2.22 ล้านตัน เมื่อคิดจากศักยภาพในการผลิตเอทานอลจากกากอ้อย 139 ลิตรต่อตัน ใช้ผลิตเอทานอลได้ประมาณวันละ 0.85 ล้านลิตร ต่อวัน ทำให้ผลผลิตเอทานอลรวมเป็น 2.09 ล้านลิตรต่อวัน หรือ 762.85 ล้านลิตรต่อปี ดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ประมาณการการผลิตเอทานอลจากอ้อย

ประมาณการการผลิตเอทานอลจากอ้อย	
ผลผลิต	ล้านตัน/ปี
อ้อย[1]	82.50
กากน้ำตาล[1]	3.71
กากอ้อย[2]	22.27
ความต้องการใช้	
กากน้ำตาลภายในประเทศ[1]	1.40
กากน้ำตาลส่งออก[1]	0.50
กากอ้อย[3]	20.05
เหลือกากน้ำตาล	1.81
เหลือกากอ้อย	2.22
ผลผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล (ล้านลิตรต่อวัน)[4]	1.24
ผลผลิตเอทานอลจากกากอ้อย (ล้านลิตรต่อวัน)	0.85
ผลผลิตเอทานอลรวม (ล้านลิตรต่อวัน)	2.09

ที่มา:

1. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2554
2. กลุ่มมิตรผล, 2009
3. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2551
4. สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย, 2554

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1.สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากชีวมวลที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม การเกษตร 2 ชนิด ได้แก่ ชานอ้อยและซังข้าวโพด โดยการนำมาปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟุริก และความร้อน ก่อน แล้วย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอทานอลในระดับห้องปฏิบัติการ สรุปได้ ดังนี้

1) สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพซังข้าวโพด คือ การปรับสภาพด้วยการแช่ในสารละลายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วต้มในสารละลายกรดซัลฟุริกร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชานอ้อย คือ การแช่ในสารละลายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น ซึ่งทำให้ซังข้าวโพดและชานอ้อยมีอัตราส่วนองค์ประกอบเซลลูโลสมากขึ้นร้อยละ 26 และ 24 ตามลำดับ และลดอัตราส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลงด้วย
2) การย่อยสลายชีวมวล ที่ปรับสภาพแล้วเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้นของ 10 FPUต่อกรัมชีวมวล ที่พีเอช 5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสในซังข้าวโพดและชานอ้อย เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 40 และ 41 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าซังข้าวโพดและชานอ้อย ที่ไม่ปรับสภาพที่ทำการย่อยสลายด้วยสภาวะเดียวกัน ประมาณ 1.8 และ 1.6 เท่า ตามลำดับ
3) เมื่อนำมาหมักด้วยเชื้อ *Z. mobilis* พบว่า สภาวะการหมักที่เหมาะสม คือ ที่ พีเอช 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อยร้อยละ 35.93 และ 26.21 ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* และการหมักด้วยเชื้อผสมระหว่าง *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae*
4) การคำนวณสมดุลมวลสารของกระบวนการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อยโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองตั้งแต่การปรับสภาพ การย่อยสลายและการหมัก

พบว่า การใช้ซังข้าวโพด 1 ตัน จะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 215 ลิตร ส่วนชานอ้อยมีศักยภาพต่ำกว่าซังข้าวโพดมาก โดยชานอ้อย 1 ตันสามารถผลิตได้ 139 ลิตร

5) จากผลการประเมินศักยภาพของชีวมวลเชิงวัตถุดิบที่มีในประเทศไทยซึ่งมีปริมาณซังข้าวโพดและชานอ้อย 0.27 และ 2.22 ล้านตันตามลำดับ ในปี 2553 สรุปได้ว่าซังข้าวโพดและชานอ้อยมีศักยภาพในการผลิตเอทานอลสูง สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 58.05 และ 762.85 ล้านลิตรต่อปี ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดและชานอ้อยในระดับอุตสาหกรรม ต่อไปนั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆอีกมาก เนื่องจากชีวมวลแต่ละชนิดเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่ต่างกัน ศักยภาพชีวมวลต่างกัน นอกจากนี้ยังมีความเหมาะสมกับกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันอีกด้วย จึงเสนอแนะ ดังนี้

1) ควรวิเคราะห์ถึงความคุ้มทุนและต้นทุนในทางเศรษฐศาสตร์ การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง และกระบวนการผลิต เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลให้ได้จริง
2) การปรับปรุงและพัฒนาการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพและชีวภาพ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมีปรับสภาพและเป็นการทำให้เซลลูโลสออกมาจากโครงสร้างมาก ในขณะที่มีเฮมิเซลลูโลสแลลิกนินหลงเหลืออยู่น้อย ทั้งยังเป็นการลดมลพิษที่อาจเกิดจากสารเคมี
3) การพัฒนาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นเองในประเทศไทย ให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีวมวลมากขึ้น เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณมาก ในขณะที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส เพียงเล็กน้อย ซึ่งเป็นการลดต้นทุนสำหรับเอนไซม์เซลลูเลส
4) การพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักให้มีความสามารถในการผลิตเอทานอลมากขึ้น หรือพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้หมักให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นความสามารถในการใช้น้ำตาลให้ได้หลายชนิด การทนต่อเอทานอลผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น หรือความสามารถในการย่อยสลายพร้อมการหมักในคราวเดียวกัน เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูง และเป็นการลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการผลิตให้น้อยลง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน . ศักยภาพชีวมวลของประเทศไทยปี 2550/2551. [ออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา: http://www.dede.go.th [2553, ตุลาคม 14]

กลุ่มมิตรผล. มิตรผลแหล่งความรู้เรื่องกระบวนการผลิตน้ำตาล. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: http://www.mitrphol.com/th [2553, ตุลาคม 9]

เกษม สุขสถาน. 2523. อ้อย. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนเล่ม 5: หน้า 65 - 127.

ชินพร วงศ์วัฒนไพบูลย์. 2551. การผลิตเอทานอลจากหญ้าโดย *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กระทรวง. กรมควบคุมมลพิษ. 2548. แนวปฏิบัติที่ดีด้านการป้องกันและลดมลพิษอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เล่มที่ 5/8.

ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย . ฝ่ายวิชาการส่วนวิเคราะห์ธุรกิจ . 2550. Cellulosic Ethanol ทางเลือกใหม่ของการผลิตเอทานอลในอนาคต . กรุงเทพธุรกิจ 21. (28 พ.ย. 2550)

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พลังงาน, กระทรวง. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน . 2551. แผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี (พ.ศ. 2551-2565): เอทานอล.

พลังงาน, กระทรวง. กรมพัฒนาและส่งเสริมพลังงาน . 2544. รายงานสถานการณ์พลังงานประเทศไทย พ.ศ. 2543. กรุงเทพฯ.

มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม. ชีวมวล. [ออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา: http://www.efe.or.th/home [2554, มิถุนายน 4]

วนิดา ปานอุทัย, นิคม แหลมสัก, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา และ ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. 2551. การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48: การเสนอผลงานทางวิชาการหมวดวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมสาขาอุตสาหกรรมเกษต ร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย , ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ , กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กระทรวงพลังงาน, 2551. การศึกษาเปรียบเทียบเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลของสหรัฐอเมริกาและไทย . สมุทรปราการ: พิมพ์พินิจ การพิมพ์.

สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย. วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล. [ออนไลน์]. 2554. แหล่งที่มา: http://www.thaiethanolassociation.com [2554, กรกฎาคม 28]

สรวง อุดมวรภัณฑ์, คำพูน คุณานุกร และ ธัชพล กิตติจิตต์. 2525. ความสัมพันธุ์ระหว่างการเจริญเติบโตของ *Zymomonas mobillis* กับความสารถในการผลิตแอลกลอฮอร์ . โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. รายงานการเก็บเกี่ยวอ้อยและการผลิตน้ำตาลทราย. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: www.oae.go.th [2554, พฤษภาคม 14]

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีการเพาะปลูก 2544/2545. [ออนไลน์]. 2545. แหล่งที่มา: www.oae.go.th [2553, กันยายน 16]

สำนักบริหารยุทธศาสตร์ . การศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง ประจำปี 2552. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: http://boc.dip.go.th/download/report5.pdf [2553, ตุลาคม 2]

สุรีพร เกตุงาม . 2543. เอกสารประกอบการสอนวิชาธัญพืช . ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ เนริสา คุณประทุม . 2544. การผลิตเอ็นไซม์จากวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นแนวทางการใช้ในอาหารสัตว์ . การประชุมวิชาการการขยายปรับปรุงพันธุ์และความสมบูรณ์พันธุ์ในสัตว์ ประจำปี 2544 (การใช้วัสดุหลือใช้ทางการเกษตรอย่างยั่งยืนในการผลิตสัตว์): 2-7.

ภาษาอังกฤษ

Antal, M. J., Allen, S. G., Dai, X., Shimizu, B., Tam, M. S., and Gronli, M. 2000. Attainment of the theoretical yield of carbon from biomass. Ind. Eng. Chem. Res 39: 4024–4031.

Bertolini, M. C., Erlandes, J. R., Laluse, C. 1991. New yeast strains for alcoholic fermentation of high sugar concentration. Biotechnol Bioeng 13: 197–202.

Carrasco, C., Baudel, H.M., Sendelius, J., Modig, T., Roslander, C., Galbe, M., Hahn, B., Zacchi, G., and Lidn, G. 2010. SO2-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. Enzyme and Microbial Technology 46: 64–73.

Chang, V. S., Kaar, W. E., Burr, B., and Holtzapple, M. T. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. Biotechnology Letters 23: 1327-1333.

Danielle, S. S., Anna, C. C., Kelly, P. R., Luís, C. C., and Nei, P. J. 2010. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by Zymomonas mobilis Using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Process. Appl Biochem Biotechnol 161: 93–105. DOI 10.1007/s12010-009-8810-x.

Dawson, L., and Boopathy, R. 2007. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. Bioresource Technology 98: 1695–1699.

Dey, S. 2002. Semicontinuous production of ethanol from agricultural wastes by immobilised coculture in a two stage bioreactor. Journal of Environmental Biology 23(4): 399-406.

Ghose, T. K. 1987. Pure & Applied Chemistry 59: 257–268.

Harris, J., Baker, A., and Zerbe, J. 1984. Two-stage dilute sulfuric acid hydrolysis of hardwood for ethanol production. Energy Biomass Wastes 8: 1151–1170.

Hendriks, A. and Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol 100: 10–18.

Jeung, P., Riki, S., Muhammad, I.A., Ying, Z., Masakazu, I., Yumiko, A., Atsuhi, I., Motohiko, K., and Ken, T. 2010. A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw–Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. Bioresource Technology 101: 6805–6811.

Kahar, P., Taku, K., and Tanaka, S. 2010. Enzymatic digestion of corncobs pretreated with low strength of sulfuric acid for bioethanol production. Journal of Bioscience and Bioengineering. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.05.002.

Li, X., Kim, T., and Nghiem, N. 2010. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). Bioresource Technology 101: 5910–5916.

Linde, M., Jakobsson, E. L., Galbe, M., and Zacchi, G. 2008. Steam pretreatment of dilute H_2SO_4–impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. Biomasss and bioenergy 32: 326-332.

Miller, W. C. 2010. Evaluation of Feedstocks for Cellulosic Ethanol and Bioproducts Production in the Northwest. Master of Science in Biological and Ecological Engineering, Oregon State University.

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.

Parisi, F. 1989. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 38: 53-87.

Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., and Reungsang, A. 2008. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by Clostridium butyricum. International journal of hydrogen energy 33: 5256 – 5265.

Rogers, P. L., Lee, K. J., and Skotinich, D. E. 1982. Tribe Advances in Biochemical Engineering 23: 27–84.

Saha, B. C., Dien, B. S., and Bothast, R. J. 1998. Fuel ethanol production from corn fiber: current status and technical prospects. Appl. Biochem. Biotechnol 70–72: 115–125.

Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion, J. Ind. Microbiol. Biotechnol 30: 279–291.Salas, J.M., Ramirez, M.S., Rendon, J.S., Hernandez, K.N., Cesar, R.A., Espinosa, M.A., and Estrada, S.R. 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. Bioresource Technology 100: 1238–1245.

Sanchez, O. J., and Cardona, C. A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstock. Bioresource Technology 99: 5270-5295.

Silverstein, R. A. 2004. A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol. Master's Thesis. Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University.

Stickle, M. B. 2008. Nature Reviews Genetics 9: 433-443.Sun, Y., and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulolysis material for ethanol production: A review. Bioresource Technology 83: 1-11.

Swings, J. and DeLey, J. 1977. Bacteriological Reviews. Baltimore 41: 1–46.

TAPPI, 2001. Method for determination of alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp. Technical Association of Pulp and Paper Industry.

Wyman, C. E. 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. Bioresource Technology 50: 3-15.

Zheng, Y., Pan, Z., and Zhang, R. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. Int J Agric & Biol Eng 2(3): 51-68.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ลักษณะองค์ประกอบของชีวมวลโดยวิธี TAPPI 203 om-88

1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 175 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.5 นอร์มัล

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 24.52 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐานเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 4.904 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.4 สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียซัลเฟตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียซัลเฟต 40.5 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำการหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้

1.5 สารละลายฟีนานโธรลีนอินดิเคเตอร์

ละลาย 1, 10 ฟีนานโธรลีนโมโนไฮเดรต 1.5 กรัม กับเฟอรัสซัลเฟต 0.7 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการไตเตรต

1.6 สารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น 3 นอร์มัล

ค่อยๆเทกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 83.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. สารเคมีสำหรับปรับสภาพชีวมวล

2.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายกรดซัลฟุริก 2 เปอร์เซ็นต์

ค่อยๆเทกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 20.41 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. สารเคมีสำหรับหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (FPU assay) โดยวิธีของ Mandel และ Stembery

3.1 สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

ละลายโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต 14.72 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 4.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 3 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.2 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 5 กรัมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทำให้ละลายเป็นเนื้อดียวกันในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส และค่อยๆ ละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตอีก 150 กรัม จนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง

4. อาหารสำหรับเชื้อ *Zymomonas mobilis*

4.1 อาหารแข็งสำหรับเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (Nutrient agar) มีสูตรอาหารดังนี้

- กลูโคส 20 กรัม
- เปบโตน 10 กรัม
- สารสกัดยีสต์ 5 กรัม
- วุ้นผง 15 กรัม
- น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นผงวุ้นในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆเทวุ้นผงลงไป จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หากเป็นอาหารเลี้ยงชนิดเหลว (Broth) เตรียมเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมวุ้นผง

4.2 อาหารเหลวสำหรับเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นและการหมักน้ำตาลรีดิวซ์

- กลูโคส 40 กรัม
- สารสกัดยีสต์ 10 กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต 1.5 กรัม
- แอมโมเนียซัลเฟต 1 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชตามที่กำหนด ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หากเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลปรับสภาพเตรียมเช่นเดียวกันไม่ใส่น้ำตาลกลูโคส แต่เติมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้แทน

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Saccharomyces cerevisiae*

5.1 อาหารแข็งสำหรับเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ Yeast malt agar (YMA)

- กลูโคส 10 กรัม
- สารสกัดยีสต์ 3 กรัม
- สารสกัดมอลต์ 3 กรัม
- เปบโตน 5 กรัม
- วุ้นผง 20 กรัม
- น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นผงวุ้นในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เทวุ้นผงลงไป จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.2 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Yeast malt broth (YMB)

- กลูโคส 20 กรัม
- สารสกัดยีสต์ 3 กรัม
- สารสกัดมอลต์ 3 กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม
- น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชตามที่กำหนด จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ลักษณะองค์ประกอบของชีวมวลโดยวิธี TAPPI 203 om-88

การวิเคราะห์ลักษณะองค์ประกอบของชีวมวลจะวิเคราะห์องค์ประกอบ 3 ชนิด ได้แก่

- แอลฟาเซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่แท้จริง ไม่สามารถละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- เบต้าเซลลูโลส หรือเฮมิเซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- แกมม่าเซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ดีในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสและสารละลายกรดเจือจาง แต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกลอฮอร์

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

1. ชั่งชีวมวลหนัก 1.5 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ลงบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร บันทึกน้ำหนักชีวมวลไว้ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอรเซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา จับเวลาทันทีที่เติมสารละลาย นำไปกวนบนเครื่องกวนสาร 30 นาที เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลังครบเวลากวนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2. กรองสารละลายเพื่อแยกตะกอนออกโดยทิ้งสารละลายใส 10 มิลลิลิตรแรกของการกรอง เก็บสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ 100 มิลลิลิตร

3. วิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส (เซลลูโลส)

3.1 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.5 นอร์มัล 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.2 ค่อยๆเทกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตรลงไป โดยเอียงขวดทำมุม 45 องศากับพื้นเพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.3 หยดอินดิเคเตอร์ 2–4 หยด นำไปไตเตรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้มเป็นสีน้ำตาลอมม่วง บันทึกปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต

3.4 เตรียมสารละลายแบลงค์ (Blank) โดยปิเปตโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 5 มิลลิลิตร แล้วทำวิธีเดียวกับสารละลายในข้อ 3.1 – 3.3

3.5 การคำนวณ

แอลฟา-เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) = $100 – [6.85 (V_2-V_1) \times N \times 20 / AW]$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารตัวอย่าง, มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับแบลงค์, มิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, นอร์มัล

A = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้, มิลลิลิตร

W = น้ำหนักชีวมวล, กรัม

6.85 = มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

4. วิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-เซลลูโลส

4.1 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในกระบอกตวงที่มีจุกปิด เติมกรดซัลฟุริกความเข้มข้น 3 นอร์มัล ปริมาตร 50 มิลลิลิตรผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ให้ความร้อน 70-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 นาที เพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์แล้วกรองสารละลายโดยเก็บส่วนวิเคราะห์วิธีเดียวกับข้อ 3.1-3.3

4.2 การคำนวณ

แกมม่า-เซลลูโลส = $[6.85 (V_4-V_3) \times N \times 20 / AW]$

เมื่อ V_3 = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารตัวอย่าง, มิลลิลิตร

V_4 = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับแบลงค์, มิลลิลิตร

5. วิเคราะห์ปริมาณเบต้า-เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

เบต้า-เซลลูโลส = 100 – (แอลฟา-เซลลูโลส + แกมม่า-เซลลูโลส)

6. วิเคราะห์ปริมาณลิกนิน

ปริมาณลิกนิน = 100 – เปอร์เซ็นต์เซลลูโลส – เปอร์เซ็นต์เฮมิเซลลูโลส

24. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (DNS method)

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง โดยมีตัวทำละลายเป็นสารละลายแบลงค์
2. เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา
4. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1) อบกลูโคสที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมหลอดทดลองให้มีสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สูตรการคำนวณคือ $N_1V_1 = N_2V_2$

N_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ต้องใช้ตามตารางช่องที่ 2

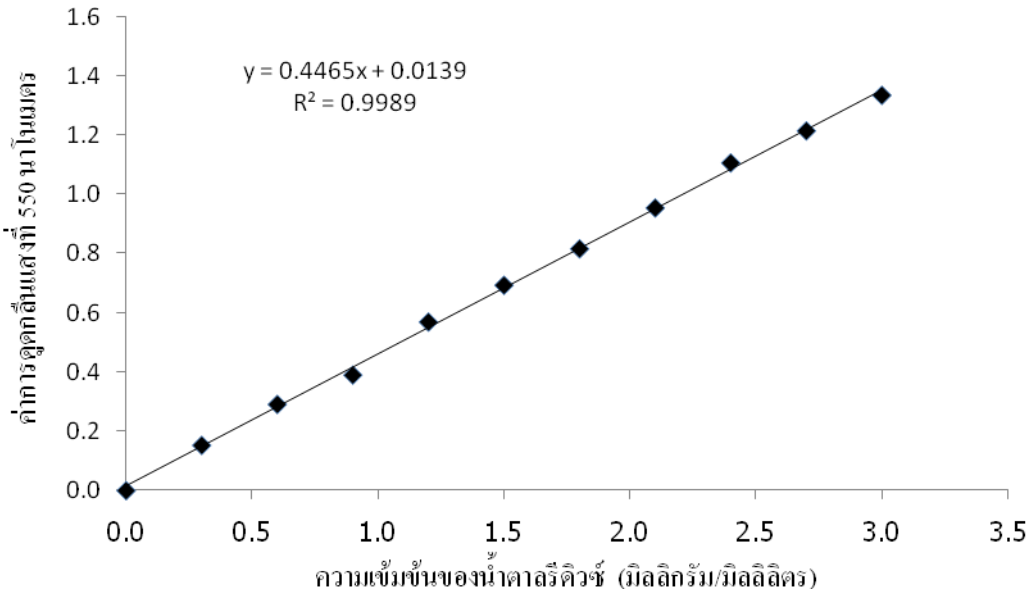
N_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ต้องการตามตารางช่องที่ 4

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร ดังตารางข้างล่างนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคส เข้มข้น 3 มก./มล. (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)	ความเข้มข้นกลูโคส (มก./มล.)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.1	0.9	0.3
3	0.2	0.8	0.6
4	0.3	0.7	0.9
5	0.4	0.6	1.2
6	0.5	0.5	1.5
7	0.6	0.4	1.8
8	0.7	0.3	2.1
9	0.8	0.2	2.4
10	0.9	0.1	2.7
11	1.0	0.0	3.0

2) ทำตามข้อ 2-4 ของการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

3) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน และหาค่าความชัน



กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

3. การหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (FPU assay)

การหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยกระดาษกรอง โดยใช้วิธีของ Mandel และ Stembery มีวิธีการดังนี้

1. ใส่กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร จำนวน 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง
2. เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
5. คำนวณหาค่าแอกทิวิตีของเซลลูเลส

การคำนวณหาค่าแอกทิวิตีของเซลลูเลส

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

1 ยูนิตของเอนไซม์ = 1 ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที
= 0.180 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม มีค่าเท่ากับ 1 ไมโครโมล

ถ้าเอนไซม์ย่อยสลายได้กลูโคส X มิลลิกรัม จะมีค่าเท่ากับ $\frac{X}{0.180}$ หรือ 5.556X ไมโครโมล

ในระยะเวลา 60 นาที กลูโคสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ 5.556X ไมโครโมล

ระยะเวลา 1นาที จะมีกลูโคสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ $\frac{5.556X}{60}$ หรือ 0.0926X ไมโครโมล/นาที

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จะมีกลูโคสเท่ากับ 0.0926X ไมโครโมล/นาที

ถ้าใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร จะมีกลูโคสเท่ากับ $\frac{0.0926X}{0.5}$ หรือ 0.185X ไมโครโมล/นาที/มิลลิลิตร

ซึ่งเท่ากับ 0.185X ยูนิต/มิลลิลิตร (Filter paper units: FPU/มิลลิลิตร)

4. การหาปริมาณเอทานอลโดยวิธี Gas Chromatography (GC)

เก็บตัวอย่างที่ได้จากการหมักมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 420 ไมโครลิตร มาผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 280 ไมโครลิตร ใส่ใน ขวดVial ปิดปากขวดให้แน่นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้ GC ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	DB-WAX ขนาด 30.0 m. x 0.53 mm.
อุณหภูมิของ column	:	45 องศาเซลเซียส
ชนิดของ detector	:	Flame ionization detector (FID)
อุณหภูมิของ detector	:	260 องศาเซลเซียส
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	H_2 (อัตราการไหล 60 ml/min)
ปริมาตรฉีด	:	1 ไมโครลิตร
อุณหภูมิของ injector	:	250 องศาเซลเซียส

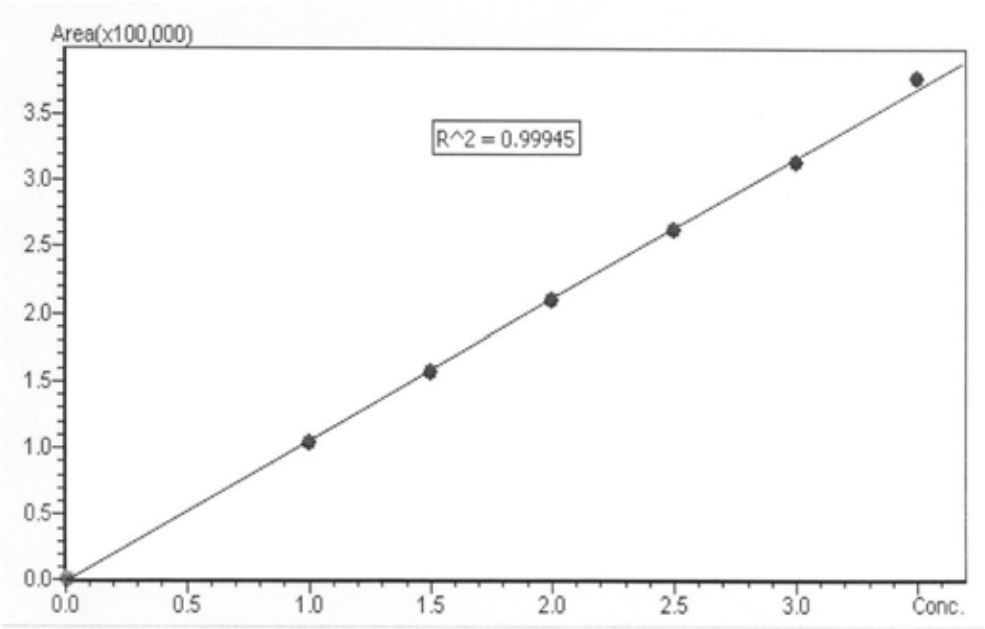
นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟกับ ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) เพื่อใช้ในการ คำนวณหาปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้จริงเมื่อเทียบกับค่าเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี

การสร้างกราฟมาตรฐานเอทานอล

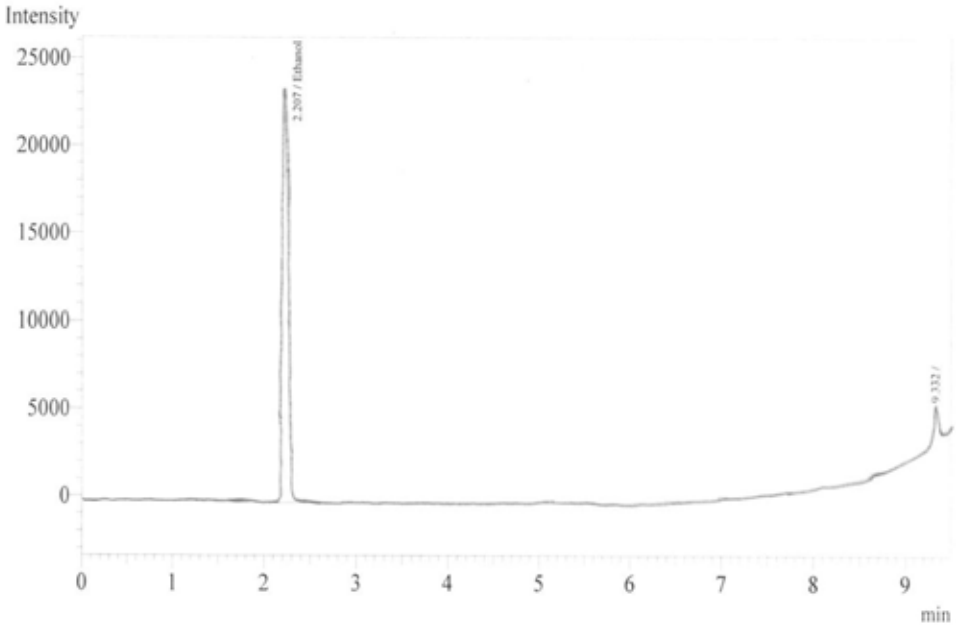
1) เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่มีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร โดยใช้ เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 12.67 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เตรียมหลอดทดลองให้มีสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

หลอดที่	สารละลายเอทานอล (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
1	0	1000	0.0
2	100	900	1.0
3	150	850	1.5
4	200	800	2.0
5	250	750	2.5
6	300	700	3.0
7	350	650	3.5

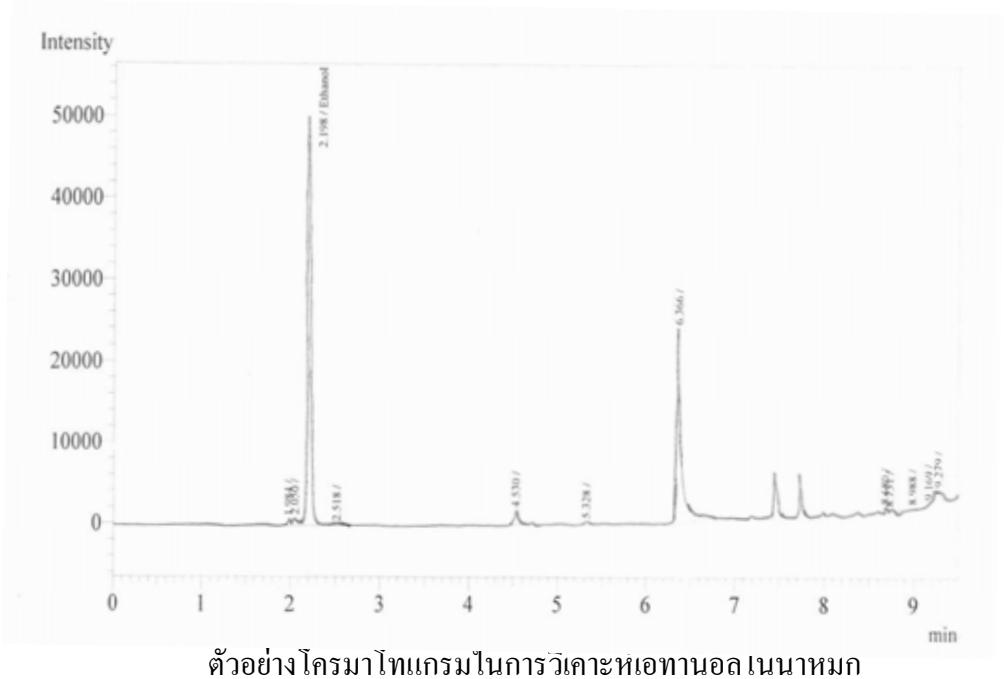
2) นำสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ได้ปริมาตร 420 ไมโครลิตร มา ผสมด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ใส่ในขวดVial ปิดปากขวดให้แน่นผสมให้เข้ากัน แล้ว นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้ GC เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานเอทานอล



กราฟมาตรฐานของเอทานอล



ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารละลายเอทานอลมาตรฐาน
(Retention time 2.207 นาที พื้นที่ 103921 ความสูง 23553 ความเข้มข้น 0.984 กรัมต่อลิตร)



ตัวอย่างโครมาโทแกรมในการวิเคาะหเอทานอลเนนาหมก
(Retention time 2.198 นาที พื้นที่ 126244 ความสูง 49827 ความเข้มข้น 1.195 กรัมต่อลิตร)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้จริงเมื่อเทียบกับค่าเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี

นำปริมาณเซลลูโลสของชีวมวลแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี เมื่อคิดในกรณีที่สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์และน้ำตาลที่ได้เปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ทั้งหมด ดังนี้

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (เปอร์เซ็นต์) = ปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) x 1.111

จากสมการการใช้น้ำตาลของ *Zymomonas mobilis* ในทางทฤษฎีสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้ 49.8 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 50.2 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 1.8\ C_2H_5OH + 1.9\ CO_2$$

180 กรัม	1.8 x 46 กรัม	1.9 x 44 กรัม
	49.8 เปอร์เซ็นต์	50.2 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อกรัมเซลลูโลส) = ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (เปอร์เซ็นต์) x $\frac{0.498}{100}$

ปริมาณเอทานอล (มิลลิลิตรต่อกรัมเซลลูโลส) = $\frac{\text{ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อกรัมเซลลูโลส)}}{0.789}$

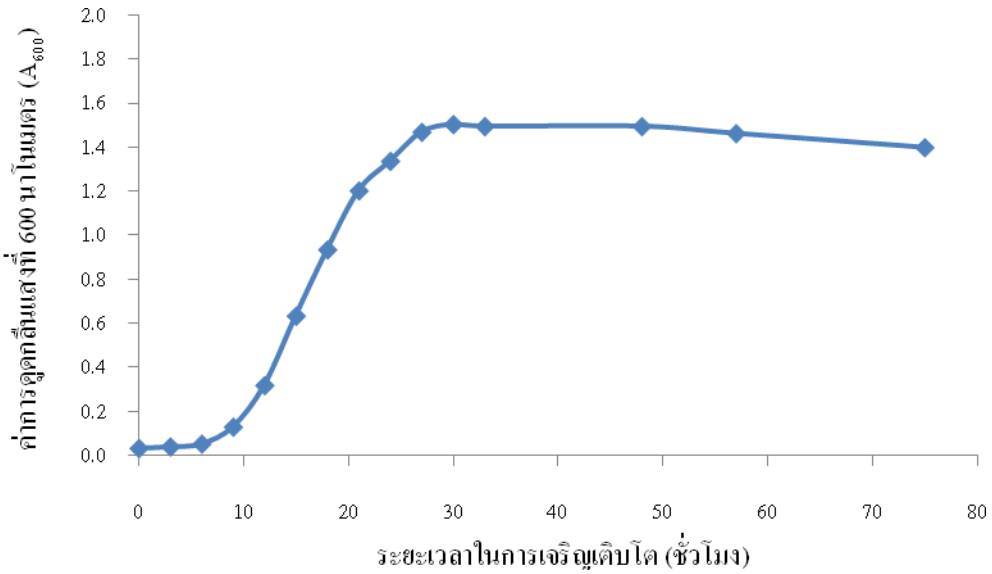
* 0.789 = ความหนาแน่นของเอทานอล (กรัมต่อมิลลิลิตร)

ปริมาณเอทานอล (มิลลิลิตรต่อกรัมชีวมวล) = $\frac{\text{เอทานอล (มล. /กรัม เซลลูโลส) x กรัมเซลลูโลส}}{\text{กรัมชีวมวล}}$

ร้อยละของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับทางทฤษฎี = $\frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จริง x 100}}{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี}}$

ร้อยละการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ (%Conversion) = $\frac{\text{น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น-น้ำตาลที่เหลือ x100}}{\text{น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น}}$

5. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis*



การเจริญเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis*

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปรเมษฐ สุขชุ่ม เกิดวันที่ 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดกาญจนบุรี ระดับปริญญาตรีสำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2551 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 ในขณะที่ศึกษาได้รับทุนการศึกษาจากกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน และ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และได้เผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ วิศวกรรมและสิ่งแวดล้อม ครั้งที่ 3 (CESEM 3) ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างวันที่ 14 – 15 มีนาคม พ.ศ. 2554 โดยนำเสนอด้วยวาจาในหัวข้อเรื่อง Effect of thermo-chemical pretreatment on bioethanol production from agro-industrial residuals และในงานประชุมวิชาการ The 2011 International Conference on Energy, Environment and Sustainable Development (EESD 2011) ณ Shanghai University of Electric Power ประเทศจีน ระหว่างวันที่ 21 – 23 ตุลาคม พ.ศ. 2554 โดยนำเสนอด้วยวาจาในหัวข้อเรื่อง Effect of thermo-chemical pretreatment on bioethanol production from corncobs และได้ตีพิมพ์ฉบับสมบูรณ์ในรายงานการประชุม