รายงานผลการดำเนินงาน

ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยเซลลูโลสิกยีสต์ในถังหมัก 5 ลิตร

ผู้รับผิดชอบโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยเซลลูโลสิกยีสต์ในถังหมัก 5 ลิตร

Ethanol Production from Rice Straw by Cellulosic Yeast in 5 Litre Reacter

รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชมภูนุช กลิ่นวงษ์

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา และ การไฟฟ้าฝ่ายผลิต ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในพื้นที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชวังเขมรมาทำการทดลองผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลจากฟางข้าวโดยนำตัวอย่างฟางข้าวมาปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพจนได้เป็นผง จากนั้นทำการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น พบว่าแกลบ ฟางข้าวเหนียวและฟางข้าวเจ้า มีปริมาณความชื้นน้อย คือ 7.60±0.65, 4.74 ± 0.96 และ 4.00±0.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อนำมาหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช พบว่าฟางข้าว มีปริมาณเฮมิเซลลูโลส 30.82% เซลลูโลส26.24% ลิกนิน1.85% และเถ้า 6.1% และนำปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลส จากนั้นคำนวณเป็นปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี พบว่าฟางข้าวมีค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีสูงที่สุด คือ 75.02 ลิตร/ไร่/ปีจากนั้นนำเชื้อรา *T. reesei* มาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟาเซลลูโลสและไซแลเนสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็น birch wood xylan แล้ววัดค่าแอกทิวิตี พบว่า เซลลูเลสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 1.190 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 1.071 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไซแลเนสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 86.961 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 56.866 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และจะนำเซลลูเลสไซแลเนสไปย่อยสลายฟางข้าวต่อไป

จากผลการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟางข้าวเจ้ายังมีความสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุด โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ ฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวเหนียว และแกลบ ซึ่งมีค่าเป็น 82.44, 74.57 และ 68.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเลือกฟางข้าวเจ้าไปทำการศึกษาในขั้นตอนของการหมักต่อไปผลที่ได้พบว่า ฟางข้าวเจ้ามีผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF คือ 0.58 กรัม/ลิตร หรือ 0.06 กรัม/กรัมของพืช ซึ่งคิดเป็น 19.83 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

คำสำคัญ : จุลินทรีย์เซลลูโลสิกฟางข้าว เอทานอล

สารบัญ

เนื้อหา **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ..... ข

บทคัดย่อ ..... ค

สารบัญ ..... ง

รายงานฉบับสมบูรณ์ ..... **ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า**

บทสรุป..... 1

1. บทนำ 2

2. วัตถุประสงค์..... 2

3.วิธีดำเนินการวิจัยและแผนปฏิบัติงาน 3

3.1วิธีการศึกษา 3

3.1.1 การเก็บตัวอย่างฟางข้าว 3

3.1.2 หาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบของชีวมวลพืช 3

3.1.3 วิเคราะห์ค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี 3

3.1.4. การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส..... 3

3.1.5. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) 4

3.1.6 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF..... 5

4.สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล 6

5.ผลการดำเนินงาน 6

5.1ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในงานวิจัย..... 6

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบของชีวมวลพืช 6
5.3การวิเคราะห์ค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี 7
5.4การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส 7
5.5 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 8
5.6 การผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรด้วยกระบวนการ SSCF..... 10
6. สรุปและวิจารณ์ผล 12
7. เอกสารอ้างอิง 14

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ของเซลลูเลสและไซแลเนสจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081.....8

ตารางที่ 2 ปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลายเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายในฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวเหนียว และแกลบ 9

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ **หน้า**

ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ.....6
ภาพที่ 2 ปริมาณความชื้นของฟางข้าว.....7
ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเป็นน้ำตาลในฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวเหนียว และแกลบ ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย alkaline peroxide (H_2O_2 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร; pH 11.5; 35 องศาเซลเซียส; 24 ชั่วโมง) แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนสที่อุณหภูมิ 50.....9
ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของ *P. stipitis* ที่เวลา 0 - 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส 10
ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* ที่เวลา 0 - 65 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB 11
ภาพที่ 6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการผลิตเอทานอล.....11

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยเซลลูโลสิกยีสต์ในถังหมัก 5 ลิตร

(ภาษาอังกฤษ) Ethanol Production from Rice Straw by Cellulosic Yeast in 5 Litre Reacter

ชื่อผู้วิจัยรองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

หน่วยงานสนับสนุน

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

บทสรุป

บทบาทของจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีความสำคัญและมีความหลากหลายจึงสนใจนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในพื้นที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชวังเขมรมาทำการทดลองผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลจากฟางข้าวโดยนำตัวอย่างฟางข้าวมาปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพจนได้เป็นผง จากนั้นทำการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น พบว่าแกลบ ฟางข้าวเหนียวและฟางข้าวเจ้า มีปริมาณความชื้นน้อย คือ 7.60±0.65, 4.74 ± 0.96 และ 4.00±0.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อนำมาหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช พบว่าฟางข้าว มีปริมาณเฮมิเซลลูโลส 30.82% เซลลูโลส 26.24%ลิกนิน 1.85% และเถ้า 6.1% และนำปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลส จากนั้นคำนวณเป็นปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี พบว่าฟางข้าวมีค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีสูงที่สุด คือ 75.02 ลิตร/ไร่/ปีจากนั้นนำเชื้อรา *T. reesei* มาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟาเซลลูโลส และไซแลเนสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็น birchwoodxylanแล้ววัดค่าแอกทิวิตี พบว่า เซลลูเลสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 1.190 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 1.071 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไซแลเนสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 86.961 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 56.866 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และจะนำเซลลูเลส ไซแลเนสไปย่อยสลายฟางข้าวต่อไป

จากผลการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟางข้าวเจ้ายังมีความสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุด โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ ฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวเหนียว และแกลบ ซึ่งมีค่าเป็น 82.44, 74.57 และ 68.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเลือกฟางข้าวเจ้าไปทำการศึกษาในขั้นตอนของการหมักต่อไปผลที่ได้พบว่า ฟางข้าวเจ้ามีผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF คือ 0.58 กรัม/ลิตร หรือ 0.06กรัม/กรัมของพืช ซึ่งคิดเป็น 19.83 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

1. บทนำ

ป่าธรรมชาติเป็นแหล่งของความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ในปัจจุบันป่าธรรมชาติได้ถูกทำลายจนเสื่อมโทรม จึงต้องวางแผนจัดการเพื่อปรับปรุงพื้นที่ป่าให้คืนสภาพ ซึ่งการปรับปรุงคุณภาพดินก็มีส่วนสำคัญการที่ดินจะมีความสมบูรณ์ได้ ต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากอินทรีย์วัตถุที่ทับถมกันให้เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการฟื้นฟูสภาพดินให้มีความสมบูรณ์ ดังนั้นการศึกษากลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ในดินจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการจัดการปรับปรุงพื้นที่ป่า เพื่อแก้ไขสภาพป่าเสื่อมโทรมที่เป็นอยู่ให้มีสภาพดังเดิม จุลินทรีย์ต่างๆ ในดินจึงเป็นดัชนีที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของการฟื้นฟูสภาพดินว่ามีความสมบูรณ์ และคงทนยาวนานเพียงใด นอกจากนี้เชื้อราในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายบางชนิดสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาพันธุศาสตร์และอาจนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์กับมนุษย์ได้

จุลินทรีย์เป็นทรัพยากรมีค่าชนิดหนึ่งในดินบทบาทของจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีความสำคัญและมีความหลากหลายโดยเฉพาะบทบาทการเป็นผู้ย่อยสลายและปรับปรุงดินให้มีสารอินทรีย์เหมาะกับการเจริญของพืชและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆที่อยู่ในดินการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพื้นที่วังเขมรอำเภอไทรโยคจังหวัดกาญจนบุรีอันมีความสำคัญเนื่องจากเป็นแหล่งพรรณพืชธรรมชาติและสัตว์ที่หายากต่างๆจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆเมื่อประกอบกันเป็นระบบนิเวศในธรรมชาติและทั้งนี้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยเฉพาะที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซโลสในธรรมชาติมีความสำคัญมากเนื่องจากวัสดุธรรมชาติที่พบในป่ามักจะประกอบไปด้วยวัสดุจากพืชซึ่งประกอบไปด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางเคมีและชีวภาพเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆเช่นกลูโคสและไซโลสน้ำตาลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการหมักต่อไปได้การนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และศึกษาความหลากหลายนั้นหากต้องผ่านกระบวนการทางเคมีก่อนนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีอันตราบปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยดังนั้นกระบวนการทางชีวภาพจึงมีบทบาทสำคัญทางการเกษตรและการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อการประยุกต์ทางการเกษตรและการหมักจะเป็นหนทางหนึ่งในการพัฒนาการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคตได้

2. วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลจากฟางข้าวโดยใช้เซลลูโลสิกยีสต์

3.วิธีดำเนินการวิจัยและแผนปฏิบัติงาน

3.1วิธีการศึกษา

3.1.1 การเก็บตัวอย่างฟางข้าว

เก็บตัวอย่างฟางข้าว และนำไปปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ โดยนำตัวอย่างไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปตัดให้มีขนาดเล็กลงและบดด้วยเครื่องบดละเอียด แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 0.4 มิลลิเมตร จนได้เป็นผงออกมา

3.1.2 หาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบของชีวมวลพืช

นำพืชที่บดเป็นผงแล้วมาหาปริมาณความชื้นตามวิธี TAPPI T 210 cm-86 (TAPPI, 1986) และหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) เพื่อหาปริมาณเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.1.3 วิเคราะห์ค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

นำปริมาณเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสของพืชแต่ละชนิดที่หาได้จากข้อ 2. มาคำนวณหาค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี ดังนี้

- ปริมาณน้ำตาลกลูโคส = ปริมาณเซลลูโลส x 1.111
  (เซลลูโลส 1 กรัม เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.111 กรัม)
- ปริมาณน้ำตาลไซโลส = ปริมาณเฮมิเซลลูโลส x 1.136
  (เฮมิเซลลูโลส 1 กรัม เปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซโลสได้ 1.136 กรัม โดยประมาณ)
- ปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี = ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส x 0.51
  (น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส 1 กรัม เปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 0.51 กรัม)

3.1.4. การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส

เชื้อที่ใช้ในงานวิจัย คือ เชื้อรา *T. reesei* เลี้ยงเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารกึ่งแข็งสูตร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ถ่ายเชื้อโดยใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงไปในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเหลวสำหรับผลิตเซลลูเลสหรือไซแลเนส ดังนี้

3.1.4.1 ผลิตเซลลูเลสใช้อาหารเหลวสูตร Mandels medium (Mandels& Weber, 1969) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟาเซลลูโลส บ่มเชื้อในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แยกเส้นใยออก นำส่วนใสที่เป็น crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของเซลลูเลสโดยวัดแอกทิวิตีด้วยวิธี FPU assay (Ghose, 1987) ที่มีสารตั้งต้นเป็นกระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 1 (กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์หรือยูนิต คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน)

3.1.4.2 ผลิตไซแลเนสโดยใช้อาหารเหลวสูตร xylan medium (สุมาลี, 2539) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แยกเส้นใยออก นำส่วนใสที่เป็น crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของไซแลเนสโดยวัดแอกทิวิตีด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ghose (1987) ให้มีสารตั้งต้นเป็น birchwood xylan 1 เปอร์เซ็นต์ (กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์หรือยูนิต คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน)

3.1.4.3 วัดปริมาณโปรตีนใช้วิธี micro Lowry's assay (Held & Hurley, 2001) แล้วคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

3.1.5. **การย่อยสลายด้วยเอนไซม์**(enzymatic hydrolysis)

3.1.5.1 นำฟางข้าวที่เป็นผงแล้วมา 0.6กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 200 มิลลิลิตร โดยทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ alkaline peroxide ซึ่งแต่ละฟลาสก์จะใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรปริมาณ 4 มิลลิลิตรที่มีการปรับ pH เป็น 11.5ด้วย 0.5โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อน แล้วค่อยเติม alkaline peroxide pH 11.5 ลงไปในฟลาสก์นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250รอบต่อนาที อุณหภูมิ35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา24ชั่วโมงจากนั้นปรับ pH เป็น 4.8ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น(Saha&Cotta,2007)

3.1.5.2 เติม 0.05โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์(pH 4.8) 5มิลลิลิตร เติมเซลลูเลสจำนวน 30ยูนิต/มิลลิลิตร และไซแลเนสจำนวน 600ยูนิต/มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.1.5.3 เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยปั่นเหวี่ยงแยกกากที่เหลือออกนำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดโดยใช้วิธี DNS method (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959)

3.1.5.4 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเป็นน้ำตาล (percent conversion)ดังนี้

$$\%\text{conversion} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (มิลลิกรัม/กรัมของหญ้าแห้ง)} \times 100}{}$$

ปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลาย (มิลลิกรัม/กรัมของหญ้าแห้ง)

3.1.5.5 คัดเลือกฟางข้าวที่มี percent conversion สูงที่สุดมาทำการการผลิตเอทานอลในกระบวนการ SSF และ SSCF ต่อไป

3.1.6 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF

3.1.6.1 นำฟางข้าวที่บดเป็นผงแล้วมา 1.5กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับสภาพฟางข้าวด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ alkaline peroxide ตามวิธีในข้อ 5.1 แต่ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเติม 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์(pH 5.0) และเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ประกอบด้วย yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l และ $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียสความ ดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.6.2 เตรียมหัวเชื้อยีสต์*S. Cerevisiae* และ *P. stipitis* โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตร inoculum medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร pH เท่ากับ 5.0 ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรบ่มเชื้อในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.1.6.3 ผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF

นำฟลาสก์มาเติมเซลลูเลสและไซแลเนส 75 และ 1500 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* 3 และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 150 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7วัน

3.1.6.4 เก็บตัวอย่างที่ได้จากการหมักมาปั่นเหวี่ยงนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC และวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจากการหมักโดยใช้วิธี DNS method (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959)

3.1.6.5 เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้จริงเมื่อเทียบกับค่าของเอทานอลที่ผลิตได้ตามทฤษฎี ดังนี้

$$\text{ผลผลิตเอทานอล(\%)} = \frac{\text{เอทานอลที่ผลิตได้จริง} \times 100}{\text{เอทานอลที่ผลิตได้ตามทฤษฎี}}$$

4.สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

นำตัวอย่างฟางข้าวมาทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.ผลการดำเนินงาน

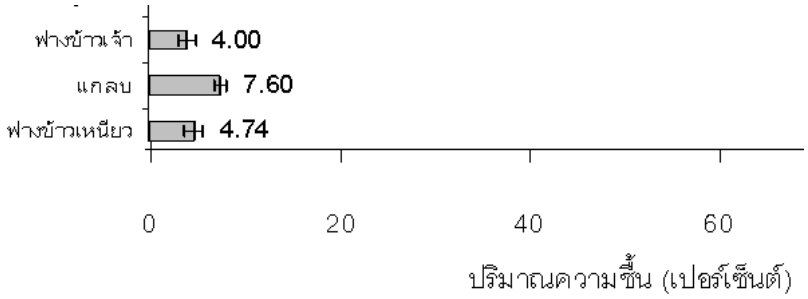
5.1 ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในงานวิจัย

ฟางข้าวเหนียว, แกลบ, ฟางข้าวเจ้า

ภาพที่ 1แสดงตัวอย่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบของชีวมวลพืช

จากตัวอย่างฟางข้าว 3 ชนิด ได้ทำการทดลองโดยใช้ส่วนของใบ ลำต้น และส่วนอื่นที่คาดว่าจะมีองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเมื่อนำส่วนต่าง ๆ ดังกล่าวมาวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น พบว่าแกลบ ฟางข้าวเหนียวและฟางข้าวเจ้า มีปริมาณความชื้นน้อย คือ 7.60±0.65, 4.74 ± 0.96 และ 4.00±0.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2ปริมาณความชื้นของฟางข้าว

ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ คือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน พบว่าฟางข้าว มีปริมาณเฮมิเซลลูโลส 30.82% เซลลูโลส26.24%ลิกนิน1.85% และเถ้า 6.1%

5.3 การวิเคราะห์ค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

จากการศึกษาองค์ประกอบทางชีวมวลของฟางข้าวชนิดต่าง ๆ สามารถนำปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสได้ตามลำดับ (เซลลูโลส 1 กรัม เปลี่ยนเป็นกลูโคสได้ 1.111 กรัม และเฮมิเซลลูโลส 1 กรัม เปลี่ยนเป็นไซโลสได้ 1.136 กรัม) จากนั้นคำนวณเป็นปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี (น้ำตาล 1 กรัม เปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 0.51 กรัม) แล้วคูณด้วยผลผลิตของฟางข้าว (ตัน/ไร่/ปี) พบว่าฟางข้าวมีค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีสูงที่สุด คือ 75.02 ลิตร/ไร่/ปี

5.4 การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส

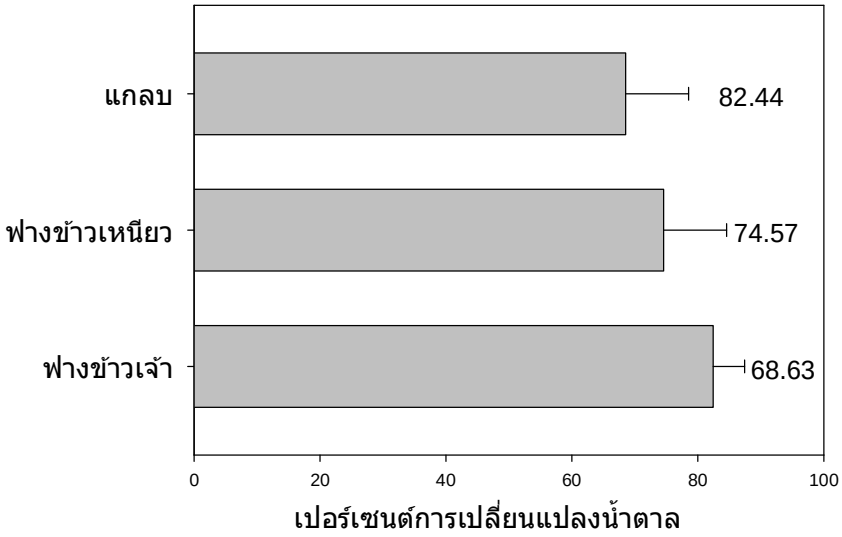
เมื่อนำเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 มาผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟาเซลลูโลส และไซแลเนสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็น birchwoodxylanแล้ววัดค่าแอกทิวิตี พบว่า เซลลูเลสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 1.190 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 1.071 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไซแลเนสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 86.961 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 56.866 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ของเซลลูเลสและไซแลเนสจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081

เอนไซม์	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
เซลลูเลส	1.190	1.111	1.071
ไซแลเนส	86.961	1.529	56.866

5.5 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

จากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากฟางข้าว 3 ชนิด โดยใช้วิธีการปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางเคมีแล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนส พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดมีค่าดังแสดงในตารางที่ 2 โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ทำการทดลองมีความหลากหลายของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่แตกต่างกัน แต่เมื่อนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลายแล้วคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (ภาพที่ 3) พบว่าอันดับแรกที่สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุด คือ ฟางข้าวเจ้า โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ ฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวเหนียว และแกลบ ซึ่งมีค่าเป็น 82.44, 74.57 และ 68.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเลือกฟางข้าวเจ้าไปทำการศึกษาในขั้นตอนของการหมักต่อไป



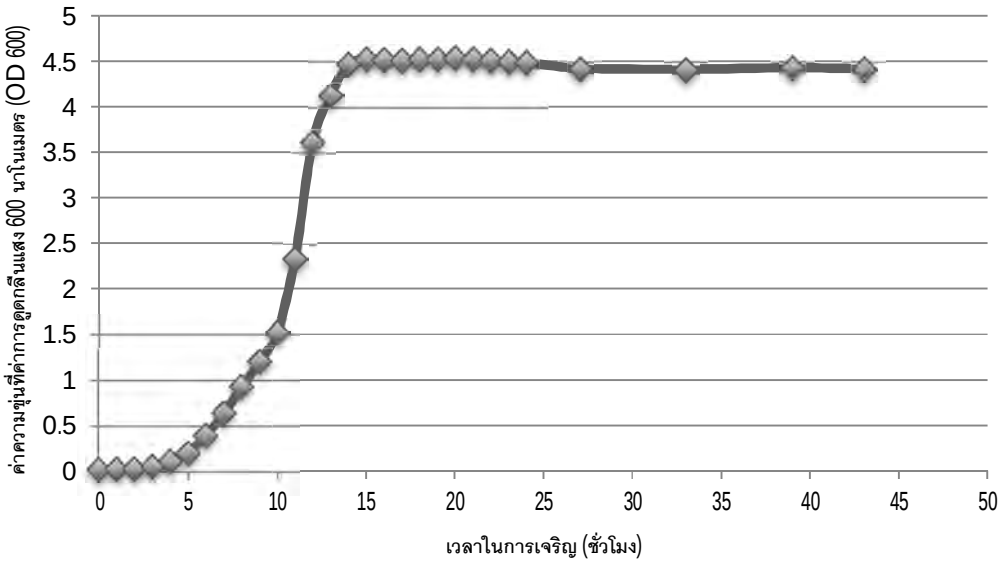
ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเป็นน้ำตาลในฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวเหนียว และแกลบ ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย alkaline peroxide (H_2O_2 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร; pH 11.5; 35 องศาเซลเซียส; 24 ชั่วโมง) แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนสที่อุณหภูมิ 50

ตารางที่ 2ปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลายเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายในฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวเหนียว และแกลบ

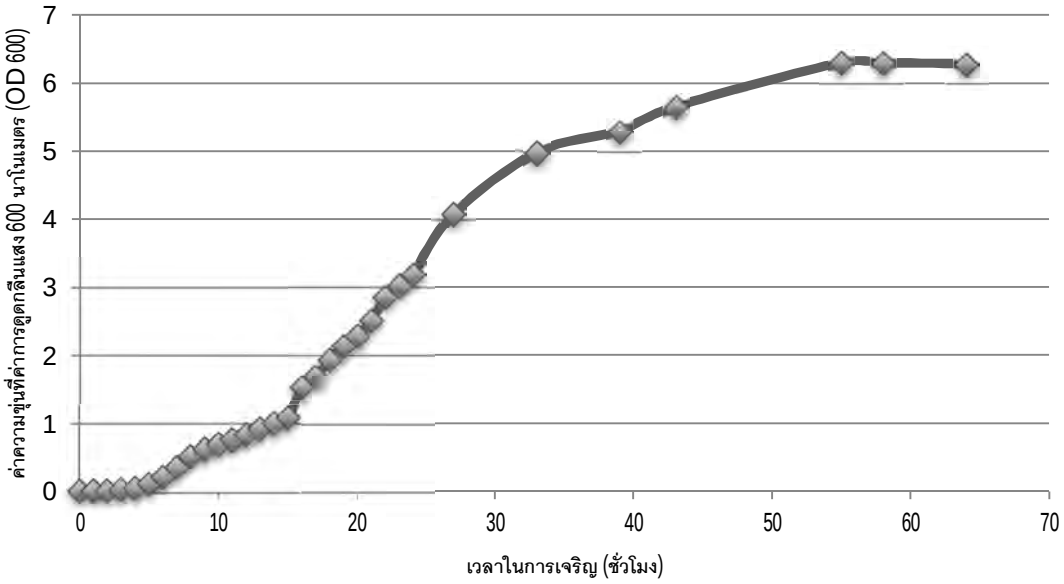
วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลาย (มิลลิกรัม/กรัมของพืชแห้ง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (มิลลิกรัม/กรัมของพืชแห้ง)
ฟางข้าวเหนียว	602.80 ± 5.52	449.53 ± 88.36
แกลบ	554.43 ± 24.46	345.52 ± 70.90
ฟางข้าวเจ้า	570.63 ± 8.60	512.81 ± 76.58

5.6การผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรด้วยกระบวนการ SSCF

จากการศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิต เอทานอล พบว่าเมื่อเลี้ยง *P. stipitis* ในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดังภาพที่ 4 โดยมีระยะแล็กที่เวลา 0 - 5 ชั่วโมง ระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่เวลา 5 - 12 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะสเตชันนารีที่เวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป ซึ่งช่วงเวลาที่เชื้อเข้าสู่ระยะสเตชัน เชื้อจะมีการเจริญเติบโตน้อย ส่วน *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดังภาพที่ 5 โดยไม่เกิดระยะแล็กจึงเริ่มระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่เวลา 0 - 24 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงเชื้อมีการเจริญลดลง ดังนั้นอายุของกล้าเชื้อ *P. stipitis* และ *S. cerevisiae* ที่เหมาะสม คือ ที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของ *P. stipitis*ที่เวลา 0 - 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส



ภาพที่ 5การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* ที่เวลา 0 - 65 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่ง

ภาพที่ 6ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

เมื่อนำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วหมักด้วยกระบวนการ SSCF โดยใช้ยีสต์ 2 ชนิด คือ *P. stipitis* และ*S. cerevisiae*โดยเลี้ยงกล้าเชื้อที่ระยะเวลาที่เหมาะสมดังกล่าว เติมเอนไซม์ 2 ชนิดที่ผลิตจาก *T. reesei* คือ เซลลูเลสและไซแลเนสลงไป แล้วหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสสำหรับ *P.stipitis* และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ผลผลิต เอทานอลที่ได้จากฟางข้าวเจ้ามีผลผลิตสูงที่สุด คือ 0.58 กรัม/ลิตร หรือ 0.06 กรัม/กรัมของพืชเมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี พบว่า ฟางข้าวเจ้ามีผลผลิตเอทานอลสูง คิดเป็น 19.83 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

6. สรุปและวิจารณ์ผล

จากการวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลของฟางข้าว 3 ชนิด พบว่า ฟางข้าวเจ้ามีปริมาณของเฮมิเซลลูโลสสูงที่สุดเป็น 30.82 ± 0.79เปอร์เซ็นต์ ฟางข้าวเจ้ามีปริมาณเซลลูโลสและปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (เฮมิเซลลูโลสรวมกับเซลลูโลส) สูงที่สุดเป็น 57.06 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ฟางข้าวเจ้ายังมีความสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุดโดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ ฟางข้าวเจ้า ฟางข้าวเหนียว และแกลบ ซึ่งมีค่าเป็น 82.44, 74.57 และ 68.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเลือกฟางข้าวเจ้าไปทำการศึกษาในขั้นตอนของการหมักต่อไปผลที่ได้พบว่าฟางข้าวเจ้ามีผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF คือ 0.58 กรัม/ลิตร หรือ 0.06 กรัม/กรัมของพืช ซึ่งคิดเป็น 19.83 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

ซึ่งจากผลการทดลองนั้นจะเห็นได้ว่าในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสนั้นสามารถทำได้ แต่จำเป็นต้องเพิ่มกระบวนการย่อยสลายองค์ประกอบดังกล่าวเพื่อให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาล เพื่อที่จะนำน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้มาหมักเป็นเอทานอล ซึ่งกระบวนการนี้เป็นต้นทุนที่มีราคาสูงดังนั้นการลดต้นทุนการผลิตเอทานอลสามารถทำได้โดยการลดต้นทุนของวัตถุดิบหรือเอนไซม์ที่นำมาใช้ เช่น การใช้วัตถุดิบที่มีการปรับปรุงทางพันธุกรรมเพื่อให้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงร่วมกับการพัฒนาในเรื่องของการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลจะสามารถลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้ (Wooleyและคณะ,1999) ส่วนการลดต้นทุนของการผลิตเอนไซม์นับได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญของการย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ในการโคลนยีนเซลลูเลสเข้าสู่

แบคทีเรีย ยีสต์ และรา จะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์และแอกทิวิตีได้สูงขึ้น (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์และการคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลายชนิด การทนต่อเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงๆ หรือความสามารถในการย่อยสลายและหมักวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ในคราวเดียวกัน ถือได้ว่าเป็นสิ่งที่ควรจะทำต่อไปในอนาคตหากต้องการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

7. เอกสารอ้างอิง

สุมาลี อึ้งใจธรรม. 2539. ไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดสจาก*Streptomyces* spp. ที่ชอบร้อนและชอบด่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulose activities. International Union of Pure and Applied Chemistry 59: 257-268.

Goering, H. K. and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis. The United States Department of Agriculture (USDA). Handbook 379.

Held, P., and Hurley, J. 2001. Determination of total protein by the Lowry method using the BioTek instruments' ELx808 microplatereader[Online]. Available from: http://www.biotek.com /resources/docs/ELx808_Determining_Total_Protein_Lowry_Method.pdf [2007, June 4]

Mandels, M., and Weber, J. 1969. Production of cellulases. Advances in Chemistry Series 95: 391-414.

Miller, G. L. 1959.Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry.31: 426-428.

Saha, B. C., and Cotta, M. A. 2007. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. Enzyme and Microbial Technology. 41: 528-532.

Sun, Y., andCheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology. 83: 1-11.

Technical Association of Pulp and Paper Industry. 1986. Test method for determination of moisture in pulp, TAPPI T 210 cm-86. Atlanta, GA: TAPPI Press.

Wooley, R., Ruth, M., Glassner, D.,and Sheehan, J., 1999. Process design and costing of bioethanol technology: A tool for determining the status and direction of research and development. Biotechnology Progress. 15: 794-803.