การผลิตเอทานอลจากหญ้าโดย *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis*

นางสาวชินพร วงศ์วัฒนไพบูลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ETHANOL PRODUCTION FROM GRASSES BY *Saccharomyces cerevisiae*
AND *Pichia stipitis*

Miss Jinaporn Wongwatanapaiboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลจากหญ้าโดย *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis*
โดย	นางสาวชินพร วงศ์วัฒนไพบูลย์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์)

.... กรรมการ
(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. วรกันต์ บูรพาธนะ)

ชินพร วงศ์วัฒนไพบูลย์ : การผลิตเอทานอลจากหญ้าโดย *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis*. (ETHANOL PRODUCTION FROM GRASSES BY *Saccharomyces cerevisiae* AND *Pichia stipitis*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 137 หน้า.

หญ้าจำนวน 18 ชนิดที่เก็บมาจากจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง ราชบุรี และเพชรบุรี แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ หญ้าอาหารสัตว์ 8 ชนิด (ใบเนเปียร์ ใบเนเปียร์แคระ ใบเนเปียร์ยักษ์ ใบบาน่า กินนีสีม่วง รูซี่ แพงโกล่า และอะตราตัม) และหญ้าแฝก 10 กลุ่มพันธุ์ (กำแพงเพชร 2 สงขลา 3 สุราษฎร์ธานี ศรีลังกา ร้อยเอ็ด เลย นครสวรรค์ ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี และกำแพงเพชร 1) หญ้าทั้งหมดมีปริมาณความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 51.31 - 77.80 เปอร์เซ็นต์ และประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 31.85 - 38.51, 31.13 - 42.61 และ 3.10 - 5.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของหญ้าชนิดต่างๆ เพื่อคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมไปใช้ในการหมัก จะนำหญ้าไปปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ ตามด้วยการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ผลที่ได้พบว่า หญ้าแต่ละชนิดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายค่อนข้างใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงนำผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าทั้ง 18 ชนิดมาคำนวณร่วมด้วย จากการคัดเลือกจึงได้หญ้า 11 ชนิด (หญ้าอาหารสัตว์ทั้ง 8 ชนิด และหญ้าแฝก 3 กลุ่มพันธุ์ คือ ศรีลังกา ประจวบคีรีขันธ์ และราชบุรี) ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิน 630 กิโลกรัม/ไร่/ปี ไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการย่อยสลายและหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง (SSCF) โดยใช้เซลลูเลสและไซแลเนสในการย่อยสลาย และใช้ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis* ที่มีอายุ 9 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ ในการหมักร่วมกัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลที่ได้พบว่า หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกามีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 1.14 กรัม/ลิตร หรือ 0.14 กรัม/กรัมของวัตถุดิบ คิดเป็น 32.72 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี เมื่อคำนวณร่วมกับผลผลิตน้ำหนักแห้ง หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกาจะมีปริมาณเอทานอลเป็น 184.27 ลิตร/ไร่/ปี ในขณะที่ใบหญ้าเนเปียร์แคระจะมีปริมาณเอทานอลสูงที่สุดเป็น 435.29 ลิตร/ไร่/ปี (0.98 กรัม/ลิตร หรือ 0.12 กรัม/กรัมของวัตถุดิบ คิดเป็น 30.60 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี)

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต..........

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..........

4972277323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : GRASS/ ALKALINE PEROXIDE PRETREATMENT/ CELLULASE/ XYLANASE/ SSCF

JINAPORN WONGWATANAPAIBOON : ETHANOL PRODUCTION FROM GRASSES BY *Saccharomyces cerevisiae* AND *Pichia stipitis*. ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., 137 pp.

18 types of grasses, collected from the provinces of Chiang Mai, Lampang, Ratchaburi and Petchaburi, were divided into 2 groups: 8 types of forage grasses (napier leaves, mott dwarf elephant leaves, king leaves, bana leaves, purple guinea, ruzi, pangola and atratum) and 10 ecotypes of vetiver grasses (Khamphaeng Phet 2, Songkhla 3, Surat Thani, Sri Lanka, Roi Et, Loei, Nakhon Sawan, Prachuap Khiri Khan, Ratchaburi and Khamphaeng Phet 1). All of the grasses had 51.31 - 77.81 % moisture content and contained cellulose, hemicellulose and lignin at 31.85 - 38.51, 31.13 - 42.61 and 3.10 - 5.64 % on average, respectively. In the study of enzymatic saccharification of grasses in order to select the suitable grasses for fermentation, the grasses were pretreated with alkaline peroxide and followed by enzymatic hydrolysis using cellulase and xylanase produced from *Trichoderma reesei*. The results showed that the reducing sugar yields of each grass obtained after hydrolysis were rather similar. Therefore, dry matter yields (kg/rai/year) were also included in the calculation. From this selection, 11 types of grasses (all of the forage grasses and 3 ecotypes of vetiver grasses: Sri Lanka, Prachuap Khiri Khan and Ratchaburi) having the reducing sugar yields over 630 kg/rai/year were used as feedstock for ethanol production by simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) using cellulase and xylanase for hydrolysis and *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* after 9 and 10 h of cultivation under co-fermentation at 35 °C for 7 days. The results showed that Sri Lanka ecotype vetiver grass had the highest ethanol yield of 1.14 g/l or 0.14 g/g substrate which was equivalent to 32.72 % of the theoretical ethanol yield. When dry matter yields were included in the calculation, Sri Lanka ecotype vetiver grass had ethanol yield of 184.27 litres/rai/year whereas napier leaves had maximum ethanol yield of 435.29 litres/rai/year (0.98 g/l or 0.12 g/g substrate which was equivalent to 30.60 % of the theoretical ethanol yield).

Field of Study : Biotechnology Student's Signature ....

Academic Year : 2008 Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆ ฝ่าย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส และ ดร. วรกันต์ บูรพาธนะ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งบุคลากรในสถาบันวิจัยและเทคโนโลยี ได้แก่ คุณพิชิต ไพรพนาพงศ์ ดร. กันย์ กังวานสายชล ดร. วรกันต์ บูรพาธนะ และ ดร. สุชาดา บุตรนาค ที่ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่ให้ทุนการศึกษา และทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วน

กราบขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ลำปาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบุรี ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ และสถานีพัฒนาที่ดินราชบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างหญ้ามาใช้ในงานวิจัย

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ สมาชิกในห้องปฏิบัติการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณอมเรศ วรรณะวัลย์ ที่คอยอยู่เคียงข้าง ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอขอบคุณน้องชาย ที่ให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ... จ

กิตติกรรมประกาศ.. ฉ

สารบัญ.. ช

สารบัญตาราง... ฎ

สารบัญภาพ.. ฏ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.. ฑ

บทที่

1. บทนำ.. 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา….. 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.. 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย.. 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 3

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย... 3

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง... 4

2.1 การผลิตเอทานอล... 4

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ...................... 5

2.2.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล.. 5

2.2.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง.. 6

2.2.3 วัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลส... 7

2.3 องค์ประกอบของชีวมวลพืชในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส............................ 8

2.3.1 เซลลูโลส.. 10

2.3.2 เฮมิเซลลูโลส... 12

2.3.3 ลิกนิน.. 14

2.4 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส. 16

2.4.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ.. 16

2.4.2 การย่อยสลาย.. 20

บทที่ หน้า

2.4.3 กระบวนการหมัก.. 28
2.4.4 การผลิตเอทานอลจากหญ้า.. 34
2.5 หญ้าที่พบในประเทศไทย.. 35
3. วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย... 38
วัสดุอุปกรณ์.. 38
เคมีภัณฑ์.. 39
วิธีดำเนินการวิจัย.. 41
3.1 ตัวอย่างหญ้าที่ใช้ในงานวิจัย.. 41
3.1.1 การเก็บตัวอย่าง….. 41
3.1.2 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ...................................... 41
3.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น... 42
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส.................. 42
3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช............................. 42
3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส.. 43
3.4 การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส.. 44
3.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์.. 44
3.4.1.1 การเก็บรักษาเชื้อ... 45
3.4.1.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์.. 45
3.4.2 การผลิตเซลลูเลสและการวัดแอกทิวิตี... 45
3.4.3 การผลิตไซแลเนสและการวัดแอกทิวิตี... 46
3.4.4 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด.. 46
3.5 การศึกษาการย่อยสลายหญ้าชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์เพื่อคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมไปใช้ในกระบวนการหมัก.. 47
3.5.1 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมี... 47
3.5.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์.. 48
3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์... 48

บทที่ หน้า

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์.................... 49
3.6 การผลิตเอทานอล... 49
3.6.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก... 49
3.6.1.1 การเก็บรักษาเชื้อ... 50
3.6.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (starter culture) 50
3.6.2 การศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล.. 50
3.6.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae*....................... 50
3.6.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *P. stipitis*............................. 51
3.6.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีก่อนใช้ในกระบวนการ SSCF...... 51
3.6.4 การเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์................ 51
3.6.5 การเตรียมเอนไซม์.. 52
3.6.6 การผลิตเอทานอลจากหญ้าชนิดต่างๆ ด้วยกระบวนการ SSCF........... 52
3.6.6.1 การเลี้ยงกล้าเชื้อ... 52
3.6.6.2 การเติมเอนไซม์... 52
3.6.7 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาล... 52
3.6.8 การวิเคราะห์เอทานอลที่ผลิตได้จากการหมัก.................................... 53
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.. 54
4. ผลการทดลอง... 55
4.1 ตัวอย่างหญ้าที่ใช้ในงานวิจัย.. 55
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น.. 57
4.3 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช... 58
4.4 การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส.. 61
4.5 การศึกษาการย่อยสลายหญ้าชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์เพื่อคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมไปใช้ในกระบวนการหมัก.. 62
4.6 การผลิตเอทานอล.. 65
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.. 74

บทที่ หน้า

6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ........ 87

รายการอ้างอิง........ 89

ภาคผนวก........ 99

ภาคผนวก ก........ 100

ภาคผนวก ข........ 112

ภาคผนวก ค........ 113

ภาคผนวก ง........ 116

ภาคผนวก จ........ 120

ภาคผนวก ฉ........ 123

ภาคผนวก ช........ 127

ภาคผนวก ซ........ 131

ภาคผนวก ฌ........ 133

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์........ 137

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในวัสดุชนิดต่างๆ...................................... 9

2.2 การเปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลส. 21

2.3 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรด.. 22

2.4 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์.. 23

2.5 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้... 25

2.6 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซแลเนสได้.. 27

2.7 ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการ SHF, SSF และ CBP................................ 34

2.8 ตัวอย่างหญ้าแฝก 28 กลุ่มพันธุ์ ในประเทศไทย.. 37

4.1 หญ้าอาหารสัตว์จำนวน 8 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัย... 55

4.2 หญ้าแฝกจำนวน 10 สายพันธุ์ (อีโคไทป์) ที่ใช้ในงานวิจัย............................ 56

4.3 ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลในหญ้าแต่ละชนิด..................................... 59

4.4 ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ของเซลลูเลสและไซแลเนสจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081... 62

4.5 ปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในหญ้าทั้ง 18 ชนิดที่มีก่อนการย่อยสลายเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้น หลังการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้อัลคาไลน์เปอร์ออกไซด์แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนส... 63

4.6 อัตราการเจริญจำเพาะ(μ) ของ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ที่เวลาต่างๆ.. 68

4.7 ปริมาณเอทานอลจากกระบวนการ SSCF ของวัตถุดิบชนิดต่างๆ................. 69

4.8 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักด้วยกระบวนการ SSCF ในหญ้า 11 ชนิด............................ 72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของอะไมโลส (บน) และอะไมโลเพคติน (ล่าง)	6
2.2	โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสที่พบในเซลล์พืช..	9
2.3	โครงสร้างของเซลลูโลส..	10
2.4	บริเวณคริสตัลไลน์และบริเวณอะมอร์ฟัสในเซลลูโลส..................................	11
2.5	การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส..	11
2.6	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส..	12
2.7	โครงสร้างของกาแลกโตกลูโคแมนแนนในไม้เนื้ออ่อน.................................	13
2.8	โครงสร้างของอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน................................	13
2.9	โครงสร้างของกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง...	14
2.10	โครงสร้างของลิกนิน..	15
2.11	สารตั้งต้น 3 ชนิด ที่ใช้ในการสังเคราะห์ลิกนิน..	15
2.12	ลักษณะของลิกโนเซลลูโลสภายหลังจากการปรับสภาพ..............................	16
2.13	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด...............	21
2.14	การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่ตำแหน่งต่างๆ ของเซลลูโลส..........	24
2.15	การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสที่ตำแหน่งต่างๆ ของเฮมิเซลลูโลส	27
2.16	กระบวนการ SHF...	30
2.17	กระบวนการ SSF...	31
2.18	กระบวนการ SSCF...	32
2.19	กระบวนการ CBP หรือ DMC..	33
3.1	ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช........................	43
3.2	ลักษณะของเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 อายุ 8 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA..	45
4.1	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ของหญ้าทั้ง 18 ชนิด...................................	57
4.2	ปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) ของหญ้าทั้ง 18 ชนิด	60
4.3	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี) เมื่อคำนวณจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของหญ้าทั้ง 18 ชนิด..	61

ภาพที่ หน้า

4.4 เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลในหญ้า 18 ชนิด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เปอร์ออกไซด์แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนส.......... 64

4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (กิโลกรัม/ไร่/ปี) และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี) เมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในหญ้า 18 ชนิด................. 65

4.6 การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* ที่เวลา 0 - 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส (ก) จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อเวลา (ข) ln (จำนวนเซลล์ยีสต์) ต่อเวลา.......... 66

4.7 การเจริญเติบโตของ *P. stipitis* ที่เวลา 0 - 92 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส (ก) จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อเวลา (ข) ln (จำนวนเซลล์ยีสต์) ต่อเวลา.......... 67

4.8 ปริมาณเอทานอลของวัตถุดิบชนิดต่างๆ จากกระบวนการ SSCF โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี........................ 70

4.9 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักน้ำตาลที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คิดเป็นความเข้มข้นในหน่วยกรัม/ลิตร และเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี โดยใช้ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดเป็น 3 กรัม และมีปริมาตรรวมของเชื้อและอาหารเป็น 150 มิลลิลิตร...... 73

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

FPU หน่วยหรือยูนิตของเซลลูเลสที่ได้จากการวัดด้วยวิธี Filter paper unit assay

GC แก๊สโครมาโทกราฟี

SHF กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

SSF กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่อง

SSCF กระบวนการย่อยสลายและหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันปัญหาภาวะโลกร้อน (global warming) กำลังกลายเป็นปัญหาที่ทั่วโลกต่างให้ความสนใจ สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน คือ การมีปริมาณแก๊สเรือนกระจกในบรรยากาศเพิ่มมากขึ้น แก๊สที่สำคัญ คือ คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลและการตัดไม้ทำลายป่า แนวทางในการแก้ไขปัญหานี้วิธีหนึ่ง คือ การหันมาใช้พลังงานทดแทนให้มากขึ้น ดังนั้นการศึกษาหาแหล่งพลังงานทดแทนที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น แหล่งพลังงานทดแทน ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม และเชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น ไบโอเอทานอลจัดเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้ เนื่องจากสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้โดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ใช้ในรูปน้ำมันเชื้อเพลิงผสมโดยนำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ หรือผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเติมแต่งหรือสารเคมีเพิ่มค่าออกเทนให้แก่เครื่องยนต์ เป็นการทดแทนการใช้สารเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเธอร์ (MTBE) หรือเอทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเธอร์ (ETBE) ได้ (สภาผู้แทนราษฎร, คณะกรรมาธิการการพลังงาน, 2545)

เอทานอลที่ผลิตได้จากการมวลชีวภาพ เรียกว่า ไบโอเอทานอล สามารถผลิตได้จากการใช้วัตถุดิบทางการเกษตร เช่น น้ำตาล แป้ง และวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส วัตถุดิบราคาถูกที่มีความเหมาะสมสำหรับนำมาผลิตเอทานอล คือ วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ซังข้าวโพด หญ้า ขี้เลื่อย เศษไม้ และชานอ้อย (Sun และ Cheng, 2002) ส่วนการนำแป้งและน้ำตาลที่มาจากมันสำปะหลัง ข้าวโพด หรืออ้อยมาใช้นั้นอาจส่งผลกระทบต่อแหล่งอาหารของมนุษย์ได้ ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาที่ทั่วโลกต่างวิตกกังวล ดังนั้นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล

พืชพลังงาน (energy crop) เป็นพืชที่มีการปลูกขึ้นมาเพื่อใช้สำหรับผลิตเป็นเชื้อเพลิง นอกเหนือจากอ้อยและมันสำปะหลังแล้ว พืชที่มีความเหมาะสมที่จะเป็นพืชพลังงานในอนาคต คือ พืชที่มีการเจริญเติบโตเร็ว เป็นพวกไม้พุ่ม และหญ้า เช่น ต้นไฮบริดปอพลาร์ ต้นวิลโลว์ และหญ้าสวิตช์ เป็นต้น พืชเหล่านี้จัดเป็นพืชที่มีอายุหลายปี (perennial crop) มีความเหมาะสมที่จะ

นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากมีผลผลิตสูง ราคาถูก มีความเหมาะสมต่อพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย (Balat, Balat และ Öz, 2008)

งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส มักจะศึกษาเฉพาะการย่อยสลายเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสเพียงอย่างเดียวให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเพื่อใช้ในการหมักเป็นเอทานอล งานวิจัยนี้จึงได้สนใจการใช้ประโยชน์ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในหญ้าเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืชให้ได้มากที่สุด เนื่องจากหญ้าค่อนข้างมีปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่สูง โดยค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของชีวมวลพืชในหญ้าทั่วไปจะมีปริมาณของเซลลูโลสเป็น 25 - 40 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลสเป็น 25 - 50 เปอร์เซ็นต์ และลิกนินเป็น 10 - 30 เปอร์เซ็นต์ (Howard และคณะ, 2003)

เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสามารถนำไปผลิตเป็นเอทานอลได้โดยการใช้กรดหรือเอนไซม์ย่อยสลายให้กลายเป็นน้ำตาล การใช้กรดนั้นมีข้อเสีย คือ ในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นรุนแรงและเป็นการย่อยที่ไม่เฉพาะเจาะจง เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อนของกรดได้ซึ่งมีราคาแพง และต้องมีการกำจัดน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการซึ่งมีกรดเจือปนอยู่ ดังนั้นการใช้เอนไซม์จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงสูง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ภาวะเป็นกลาง ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการเหมือนกับการใช้กรด และทำให้ค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียลดลง (Wyman, 1994)

ในการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนั้นเป็นการผลิตพลังงานทดแทนในระยะสั้น ในอนาคตวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอาจมีไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ผลิตเป็นเอทานอล ดังนั้นเพื่อให้มีการผลิตพลังงานทดแทนอย่างยั่งยืนและเห็นผลได้ในระยะยาวจึงควรที่จะมีการปลูกพืชพลังงานขึ้นมาเพื่อใช้ประโยชน์ร่วมกับการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร การศึกษาหาพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น หญ้าถือได้ว่าเป็นพืชพลังงานชนิดหนึ่งที่มีความเหมาะสม เนื่องจากเป็นพืชที่มีอายุหลายปี เมื่อตัดแล้วสามารถเจริญออกมาได้ใหม่ และสามารถขึ้นในที่แห้งแล้งได้ดี หญ้าที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีอยู่หลายชนิด ดังนั้นการคัดเลือกชนิดของหญ้าที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis* เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเป็นเอทานอลได้ตามลำดับ และนิยมใช้มากในอุตสาหกรรม จึงได้นำเชื้อทั้งสองชนิดนี้มาใช้ในกระบวนการย่อยสลายและหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง (simultaneous saccharification and co-fermentation: SSCF) เพื่อผลิตเอทานอลจากหญ้า

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของหญ้าชนิดต่างๆ ที่พบในประเทศไทย และคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการย่อยสลายและหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง (SSCF) เพื่อที่จะวิเคราะห์ศักยภาพของหญ้าที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นพืชพลังงานต่อไป

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบชีวมวลของหญ้าอาหารสัตว์และหญ้าแฝกที่นิยมปลูกในประเทศไทย รวมทั้งความสามารถในการถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลโดยใช้เซลลูเลสและไซแลเนสที่ผลิตขึ้นเองจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* เพื่อคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการย่อยสลายและใช้ยีสต์ 2 ชนิด คือ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ในกระบวนการหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบศักยภาพของหญ้าในประเทศไทยที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นพืชพลังงานต่อไปในอนาคต

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างหญ้า
2. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น
3. วิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี
4. ผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส
5. ศึกษาการย่อยสลายหญ้าชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์เพื่อคัดเลือกหญ้าไปใช้ในการหมัก
6. ผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF และเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลของหญ้าที่ได้จากการหมักกับปริมาณเอทานอลของหญ้าที่ได้ทางทฤษฎี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การผลิตเอทานอล

เอทานอล (C_2H_5OH) สามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีทางเคมี

เป็นการใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์เอทานอล โดยมีเอทิลีนเป็นวัตถุดิบ เอทานอลที่ได้ เรียกว่า เอทานอลสังเคราะห์ (สภาผู้แทนราษฎร, คณะกรรมาธิการการพลังงาน, 2545) วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่

1.1 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการไฮเดรชันของเอทิลีนโดยตรง โดยมีกรดฟอสฟอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ความดันและอุณหภูมิสูง โดยทั่วไปมักใช้ที่ 1000 psi และ 300 องศาเซลเซียส (Plotkin, 2006) สมการของการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังนี้

$$C_2H_4 + H_2O \xrightarrow{H_3PO_4} C_2H_5OH$$

1.2 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการไฮเดรชันของเอทิลีนโดยอ้อม โดยมีกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้ได้เอทิลซัลเฟตซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นเอทานอล (Demirbas, 2005) สมการของการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังนี้

$$C_2H_4 + H_2SO_4 \longrightarrow C_2H_5OSO_3H$$

$$C_2H_5OSO_3H + H_2O \longrightarrow C_2H_5OH + H_2SO_4$$

วิธีการสังเคราะห์เอทานอล ทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมาแต่เดิมนิยมใช้กันมาก เพราะเป็นกระบวนการที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก กระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับปัจจัยเพียงไม่กี่อย่าง แต่เนื่องจากวิธีการสังเคราะห์ดังกล่าวต้องใช้สารเริ่มต้นที่เป็นผลผลิตจากปิโตรเลียม ทำให้ต้นทุนการผลิตของทั้งสองวิธีนี้สูงขึ้นมาก จึงทำให้มีการผลิตเอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพแทน

2. วิธีทางชีวภาพ

เป็นการใช้มวลชีวภาพ เช่น น้ำตาล แป้ง หรือ วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยมีการอาศัยกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ เข้ามาเกี่ยวข้อง เป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน มีสมการการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH\ +\ 2\ CO_2$$

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการหมักได้ คือ วัตถุดิบที่มีน้ำตาลหรือวัตถุดิบที่สามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปน้ำตาลได้ แบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่

2.2.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

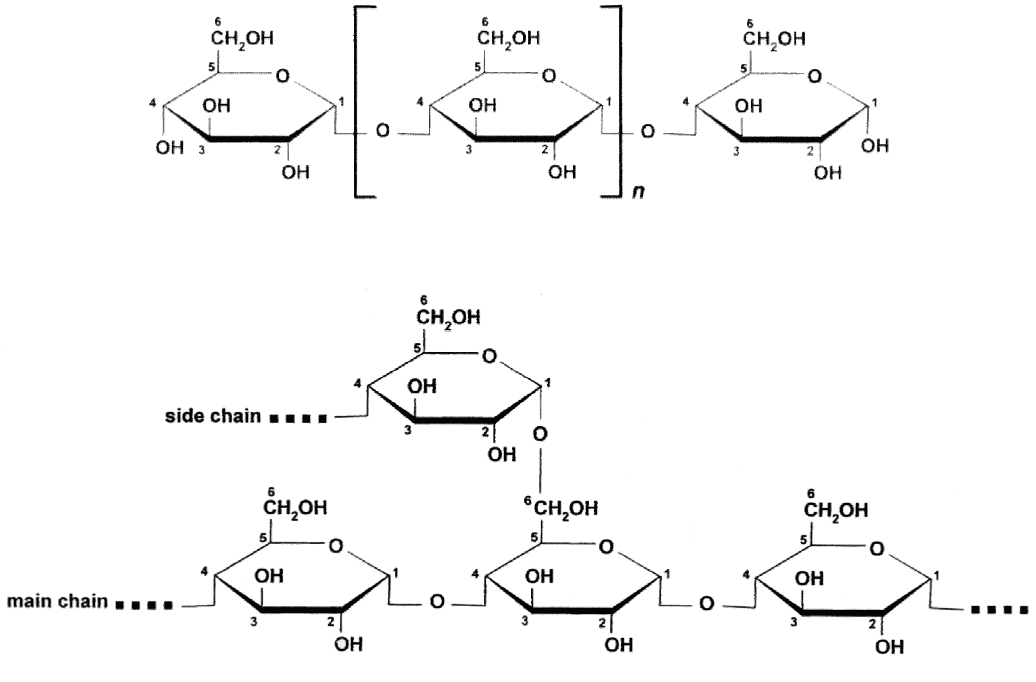
วัตถุดิบหลักๆ ที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอล คือ อ้อยซึ่งอยู่ในรูปของน้ำอ้อยหรือผลผลิตพลอยได้ที่เป็นกากน้ำตาล (molasses) (Sánchez และ Cardona, 2008) ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีวัตถุดิบอื่นๆ ที่มีน้ำตาลมากซึ่งสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบได้เช่นกัน ได้แก่ หัวบีทหรือหัวผักกาดหวาน (sugar beet) ข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) และผลไม้ต่างๆ (Badger, 2002) สองในสามของการผลิตน้ำตาลทั่วโลกจะมาจากอ้อย และหนึ่งในสามจะมาจากหัวบีท (Kumar และคณะ, 2006 อ้างถึงใน Balat และคณะ, 2008)

ข้อดีของการใช้พืชที่มีน้ำตาลในการผลิตเอทานอล คือ สามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอทานอลได้ง่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบที่เป็นแป้งและลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากไม่ต้องมีกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบก่อน ยีสต์สามารถย่อยสลายน้ำตาลนี้เพื่อนำไปใช้ได้โดยตรง (Cardona และ Sánchez, 2007) เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักส่วนใหญ่ คือ *S. cerevisiae* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสที่สามารถนำไปใช้ในการหมักเป็นเอทานอลได้ อย่างไรก็ตามข้อเสียของการใช้วัตถุดิบเหล่านี้ คือ วัตถุดิบบางชนิดมีราคาสูงจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ผลิตเป็นเชื้อเพลิงเอทานอล

2.2.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น (สภาผู้แทนราษฎร, คณะกรรมาธิการการพลังงาน, 2545) การผลิตเอทานอลในทวีปอเมริกาเหนือและยุโรปมักจะใช้ข้าวโพดและข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบ ส่วนประเทศในเขตร้อนมักใช้พวกพืชหัวเป็นวัตถุดิบ (Cardona และ Sánchez, 2007)

แป้งจัดเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวคือน้ำตาลกลูโคส แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิดที่มีสัดส่วนแตกต่างกัน คือ อะไมโลส (16 - 30 เปอร์เซ็นต์) และอะไมโลเพคติน (65 - 85 เปอร์เซ็นต์) อะไมโลสเป็นโพลิเมอร์ของดี-กลูโคสในรูปแอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิก เป็นโพลิเมอร์ที่มีสายตรงซึ่งจะมีลักษณะขดเป็นเกลียว (helix) ส่วนอะไมโลเพคตินเป็นโพลิเมอร์ที่มีกลูโคสมาต่อกันพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิก และมีการแตกกิ่งแขนงโดยมีน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อตรงกิ่งด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก (Prasad, Singh และ Joshi, 2007) ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของอะไมโลส (บน) และอะไมโลเพคติน (ล่าง) (Casey และคณะ, 2006)

การนำวัตถุดิบประเภทแป้งมาใช้ต้องมีการย่อยสลายแป้งเพื่อให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสสำหรับใช้ในการหมัก กระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลจะมีขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่หนึ่งเป็นการย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (liquefaction) โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มแอลฟา-อะไมเลส ในขั้นตอนนี้จะมีการเปลี่ยนแป้งให้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า เดกซ์ทริน ขั้นตอนที่สองเป็นการย่อยแป้งครั้งสุดท้าย (saccharification) เพื่อทำให้แป้งโมเลกุลเล็กเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส จะใช้เอนไซม์ในกลุ่มกลูโคอะไมเลส เมื่อได้เป็นน้ำตาลแล้วจึงเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป

ประเทศไทยนิยมใช้หัวมันสำปะหลังสดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลซึ่งมีข้อดีคือ มีสัดส่วนของแป้งสูงและเส้นใยต่ำ ให้ปริมาณเอทานอลต่อพื้นที่เพาะปลูกสูง สามารถปลูกได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ส่วนข้อเสีย คือ ต้องมีขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนนำไปหมัก

การนำวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้งซึ่งยังคงเป็นอาหารของมนุษย์มาใช้ในการผลิตเอทานอลอาจส่งผลกระทบทำให้วัตถุดิบมีราคาสูงขึ้นได้ เนื่องจากมีปริมาณไม่เพียงพอและในที่สุดอาจเกิดภาวะขาดแคลนอาหารขึ้น ดังนั้นการนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

2.2.3 วัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสจัดเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก การนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ไม่ได้ใช้เป็นอาหารของมนุษย์มาใช้ จะทำให้ได้วัตถุดิบที่มีราคาถูกสำหรับผลิตเอทานอล วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ใช้สำหรับผลิตเอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม (Sánchez และ Cardona, 2008) ดังนี้

(1) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (crop residue หรือ agricultural waste) ได้แก่ ฟางข้าวสาลี ฟางข้าวบาร์เลย์ ฟางข้าวเจ้า แกลบ ชานอ้อย ใบข้าวโพด ลำต้นข้าวโพดและซังข้าวโพด ซึ่งรวมเรียกส่วนต่างๆ ของข้าวโพดนี้ว่า คอร์นสโตเวอร์

(2) วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (industrial residue) ได้แก่ วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เช่น กากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง (recycled paper sludge) และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานไม้ เช่น เศษไม้ ขี้เลื่อย เป็นต้น

(3) วัสดุเหลือทิ้งจากอาคารบ้านเรือน (municipal solid waste: MSW) ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษใช้แล้ว เป็นต้น

(4) ไม้เนื้อแข็ง (hardwood) ได้แก่ ต้นแอสเพน ต้นปอพลาร์

(5) ไม้เนื้ออ่อน (softwood) ได้แก่ ต้นสน เช่น ไพน์

(6) พืชล้มลุก (herbaceous biomass) ได้แก่ หญ้าชนิดต่างๆ เช่น หญ้าสวิตซ์ หญ้ารีดคาแนรี หญ้าเบอร์มิวดา และหญ้าทิโมธี เป็นต้น

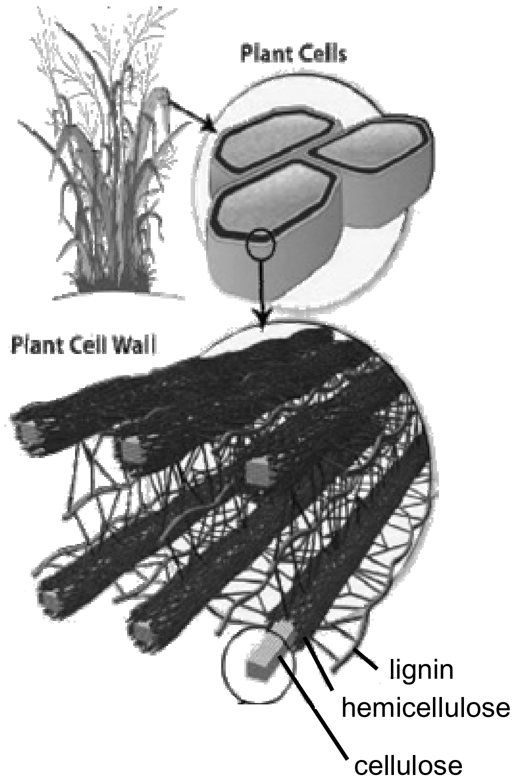
ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคสมาต่อกันเป็นสายยาวเช่นเดียวกับแป้งแต่มีลักษณะของโครงสร้างแตกตางกัน การมีลิกนินมาห่อหุ้มไว้ทำให้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสถูกย่อยสลายได้ยากกว่าแป้ง (Badger, 2002) โพลิเมอร์หลัก 2 ชนิด คือ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสควรถูกย่อยสลายให้กลายเป็นน้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลต่อไป แต่กระบวนการย่อยสลายมีความซับซ้อน และเทคนิคยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ (Sánchez และ Cardona, 2008)

น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอมที่มีปริมาณมากที่สุดในเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้อแข็งและส่วนที่เหลือจากผลิตผลทางการเกษตร และมีปริมาณในธรรมชาติมากเป็นอันดับที่สองรองจากน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นการนำน้ำตาลไซโลสมาใช้นอกเหนือจากน้ำตาลกลูโคสจะสามารถลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้ (Olsson และ Hahn-Hagerdal, 1996)

ข้อดีของการใช้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส คือ เป็นวัตถุดิบที่มีเป็นปริมาณมาก หาได้ง่าย ราคาถูก และสามารถเกิดขึ้นมาทดแทนได้อยู่เสมอ ส่วนข้อเสียคือ ต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสยังค่อนข้างสูงอยู่เมื่อใช้เทคโนโลยีที่มีอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายได้ผลผลิตต่ำและใช้ต้นทุนสูง (Sun และ Cheng, 2002)

2.3 องค์ประกอบของชีวมวลพืชในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของชีวมวลที่พบในผนังเซลล์ของพืช ประกอบด้วยเซลลูโลสซึ่งเป็นไมโครไฟบริลฝังอยู่ในเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ดังแสดงในภาพที่ 2.2 จึงเรียกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินรวมกันว่า ลิกโนเซลลูโลส นอกจากนี้ในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสยังพบสารประกอบอื่นๆ ที่เรียกว่า สารแทรก (extractive) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ใช่องค์ประกอบของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เรซิน ไขมัน กรดไขมัน ฟีโนลิก ไฟโตสเตอรอล เกลือ และแร่ธาตุ เป็นต้น (Lee และคณะ, 2007) วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดจะมีสัดส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินแตกต่างกันไป (Prasad และคณะ, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 2.1



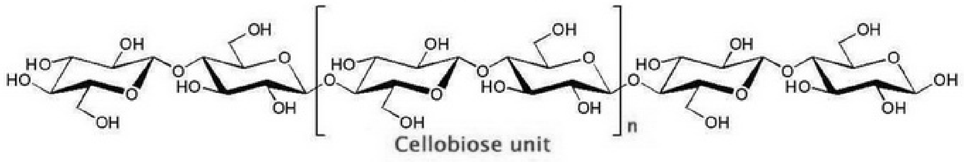
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสที่พบในเซลล์พืช (Ritter, 2008)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในวัสดุชนิดต่างๆ (Sun และ Cheng, 2002)

วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	เฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	ลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)
ลำต้นไม้เนื้อแข็ง	40 - 55	24 - 40	18 - 25
ลำต้นไม้เนื้ออ่อน	45 - 50	25 - 35	25 - 35
เปลือกถั่ว	25 - 30	25 - 30	30 - 40
ซังข้าวโพด	45	35	15
กระดาษ	85 - 99	0	0 - 15
ฟางข้าวสาลี	30	50	15
ฟางข้าวเจ้า	32.1	24.0	18.0
กระดาษหนังสือพิมพ์	40 - 55	25 - 40	18 - 30
ของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ	60 - 70	10 - 20	5 - 10
ชานอ้อย	33.4	30.0	18.9
หญ้าเบอร์มิวดา	25.0	35.7	6.4
หญ้าสวิตช์	45.0	31.4	12.0
หญ้าออร์ชาร์ด	32.0	40.0	4.7
หญ้า (ค่าเฉลี่ยสำหรับหญ้าชนิดต่างๆ)	25 - 40	25 - 50	10 - 30

2.3.1 เซลลูโลส

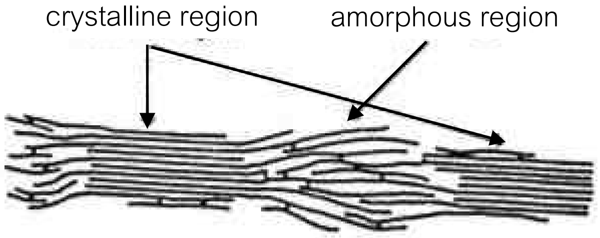
เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในผนังเซลล์พืช มีประมาณ 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง (Hamelinck, van Hooijdonk และ Faaij, 2005) เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียว คือ โมเลกุลของดี-กลูโคสในรูปเบตา-ดี-กลูโคไพราโนสหลายโมเลกุลเรียงต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิก โดยมีการดึงโมเลกุลของน้ำออกจึงมีสูตรทางเคมีเป็น $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนของโมเลกุลกลูโคสที่มาเรียงต่อกัน โดยกลูโคส 2 โมเลกุลจะเรียงต่อกันเป็นไดเมอร์ เรียกว่า เซลโลไบโอสซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของเซลลูโลสในการมาต่อซ้ำๆ กันเป็นโครงสร้างสายยาวคล้ายลูกโซ่ ไม่มีการแตกกิ่งแขนง ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ซึ่งแตกต่างจากแป้งที่กลูโคสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิก ทำให้เซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงแต่แป้งจะมีโครงสร้างที่เป็นโซ่เกลียว ส่งผลให้เซลลูโลสมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลจำนวนมากจึงมีลักษณะเป็นมัดเส้นใยที่เป็นระเบียบซึ่งมีความแข็งแรงและทนต่อการย่อยสลายได้มากกว่าแป้ง (Ritter, 2008) จำนวนโมเลกุลของกลูโคสที่มาเรียงต่อกัน เรียกว่า degree of polymerization หรือ DP ซึ่งในเนื้อไม้ตามธรรมชาติจะมีค่าประมาณ 10,000 หน่วย (Ragauskas, 2008)



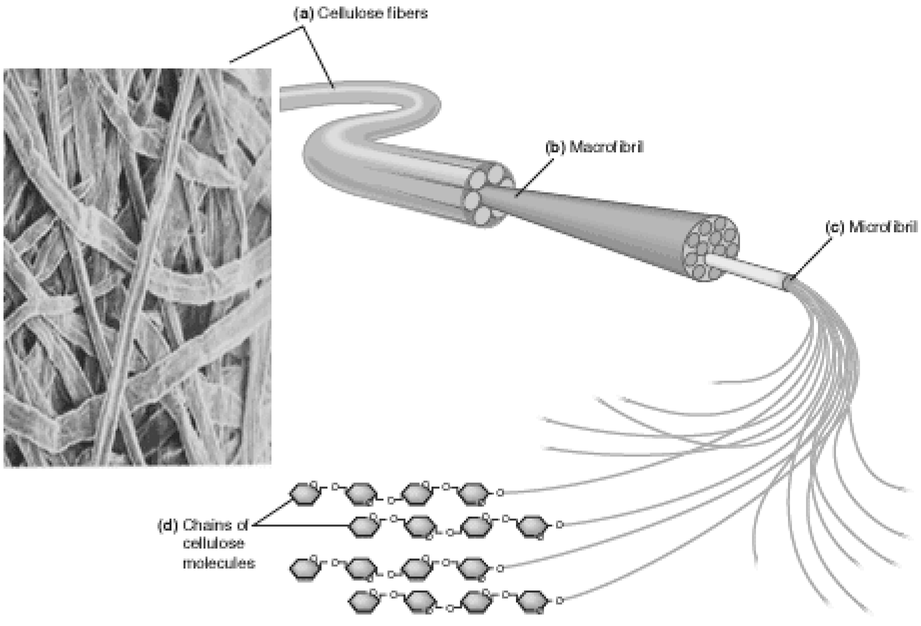
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส (Campbell, 2008)

เซลลูโลสแต่ละสายที่ขนานกันจะมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็นมัดของไมโครไฟบริลซึ่งแต่ละมัดจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 - 6 นาโนเมตร (U.S. Department of Energy, 2007) โดยเรียกบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นว่า บริเวณคริสตัลไลน์ซึ่งเป็นบริเวณที่เซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบ ส่วนบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นน้อย เรียกว่า บริเวณอะมอร์ฟัสหรือพาราคริสตัลไลน์ซึ่งเป็นบริเวณที่เซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวหลวมๆ อย่างไม่เป็นระเบียบ ดังแสดงในภาพที่ 2.4 ดังนั้นการย่อยสลายจะเกิดขึ้นที่บริเวณอะมอร์ฟัสได้ง่ายและรวดเร็ว การย่อยสลายจึงเกิดขึ้นที่บริเวณคริสตัลไลน์ก่อน (Lee, Pagan และ Rogers, 1983)

ไมโครไฟบริลแต่ละมัดจะรวมกันเป็นมาโครไฟบริล หลายๆ มาโครไฟบริลจึงรวมกันเป็นเส้นใยของเซลลูโลส ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.4 บริเวณคริสตัลไลน์และบริเวณอะมอร์ฟัสในเซลลูโลส (van der Reyden, 1992)



ภาพที่ 2.5 การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส (Carbohydrates, 2006)

เส้นใยของเซลลูโลสมีความแข็งแรงมาก ไม่ละลายในน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรดหรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรดหรือด่างได้เป็น 3 ชนิด (American Paper and Pulp Association, 1965) คือ

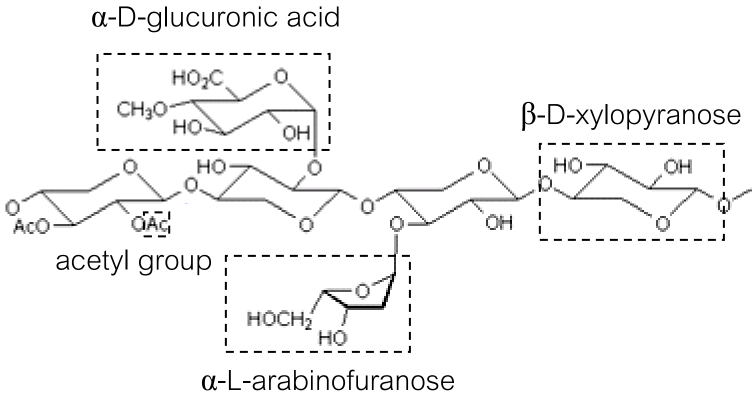
(1) แอลฟา-เซลลูโลส จัดเป็นเซลลูโลสที่แท้จริง เป็นเซลลูโลสที่ไม่สามารถละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

(2) เบตา-เซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่เป็นกรด

(3) แกมมา-เซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ดีทั้งในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และสารละลายกรดเจือจาง แต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

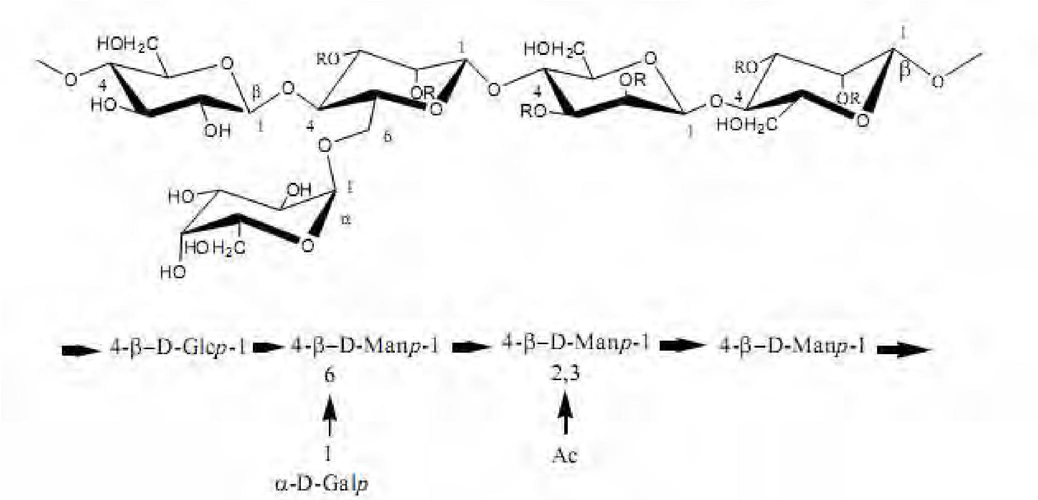
2.3.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสพบประมาณ 20 - 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง (Hamelinck และคณะ, 2005) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ทำหน้าที่เสริมสร้างผนังเซลล์พืชให้แข็งแรง มีลักษณะเป็นเฮทเทอโรพอลิเมอร์ซึ่งแตกต่างจากเซลลูโลสที่เป็นโฮโมพอลิเมอร์ ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น น้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอม (ดี-ไซโลส แอล-แรมโนส และแอล-อะราบิโนส) น้ำตาลคาร์บอนหกอะตอม (ดี-กลูโคส ดี-แมนโนส และดี-กาแลกโตส) และกรดยูโรนิก (4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิด ดี-กลูคูโรนิกแอซิด และดี-กาแลกทูโรนิกแอซิด) สายหลักของเฮมิเซลลูโลสอาจเป็นโฮโมพอลิเมอร์หรือเฮทเทอโรพอลิเมอร์ที่มีกิ่งสั้นๆ ที่ตำแหน่งพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกหรือบางครั้งอาจเป็นพันธะเบตา-1,3-ไกลโคซิดิก นอกจากนี้ยังอาจมีหมู่อะซิติลมาเกาะอีกด้วย (Purwadi, 2006) โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสแสดงดังภาพที่ 2.6



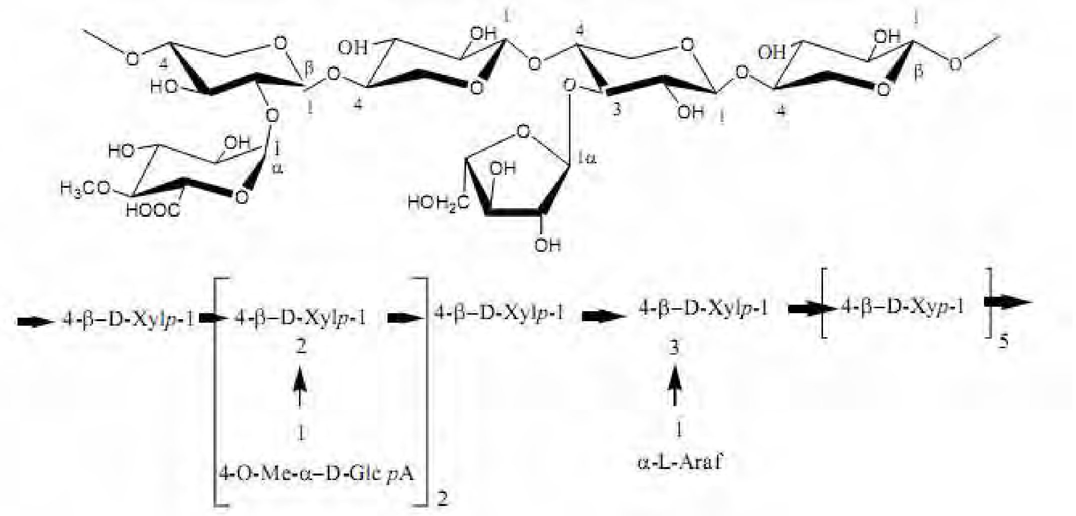
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Fort, 2006)

เฮมิเซลลูโลสมีค่า DP ต่ำกว่าเซลลูโลสมาก โดยมีค่าประมาณ 50 - 300 จากการที่เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างที่มีกิ่งจึงทำให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่จะเป็นโพลิเมอร์ชนิดกาแลกโตกลูโคแมนแนน (ภาพที่2.7) และอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (ภาพที่ 2.8) ในขณะที่ไม้เนื้อแข็งจะเป็นกลูคูโรโนไซแลน (ภาพที่ 2.9) (Ragauskas, 2008)



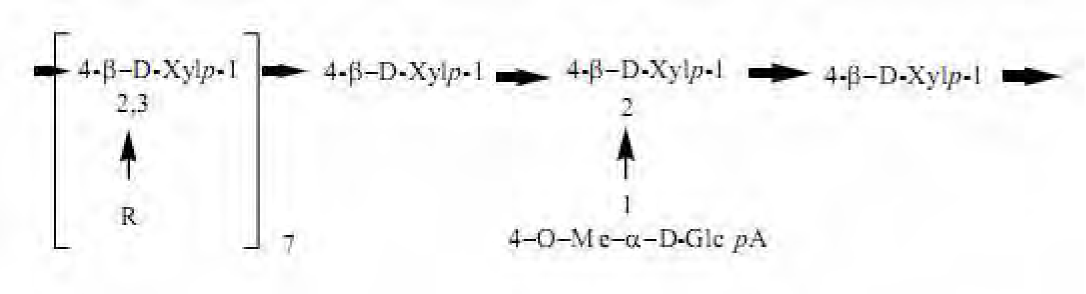
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของกาแลกโตกลูโคแมนแนนในไม้เนื้ออ่อน (Ragauskas, 2008)

เมื่อ Glcp คือ เบตา-ดี-กลูโคไพราโนส Manp คือ เบตา-ดี-แมนโนไพราโนส Galp คือ เบตา-ดี-กาแลกโตไพราโนส และ R คือ CH_3CO หรือ H



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (Ragauskas, 2008)

เมื่อ Xylp คือ เบตา-ดี-ไซโลไพราโนส GlcpA คือ 4-โอ-เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซลูโรนิกแอซิด และ Araf คือ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนส

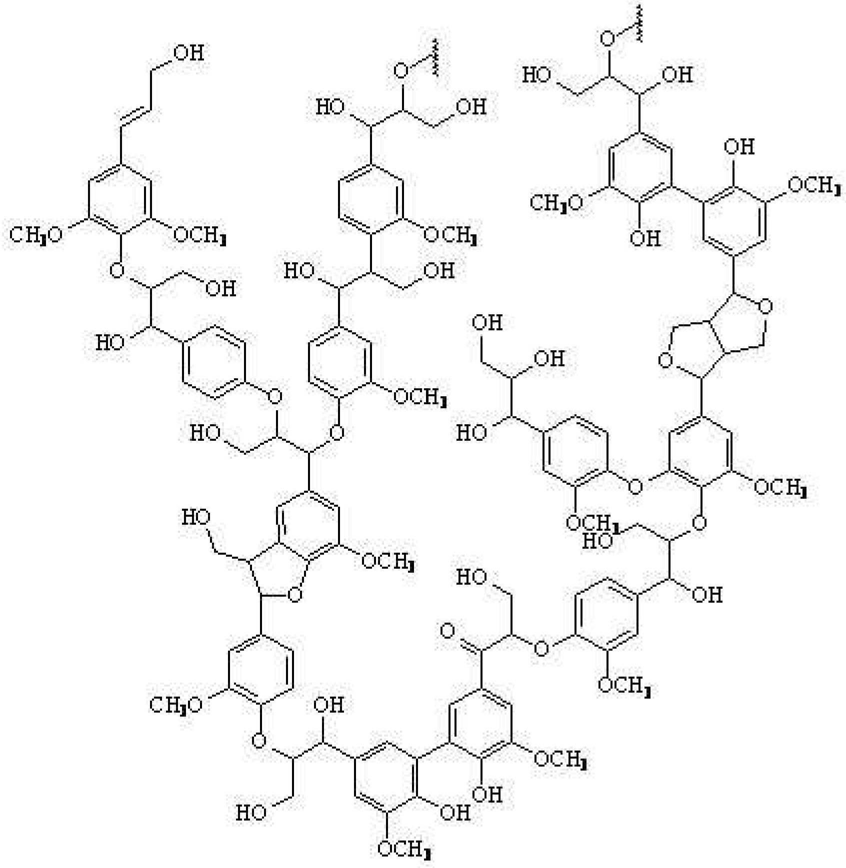


ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Ragauskas, 2008)
เมื่อ Xylp คือ เบตา-ดี-ไซโลไพราโนส GlcpA คือ 4-โอ-เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซลูโรนิก แอซิด และ R คือ หมู่อะซิติล (CH_3CO)

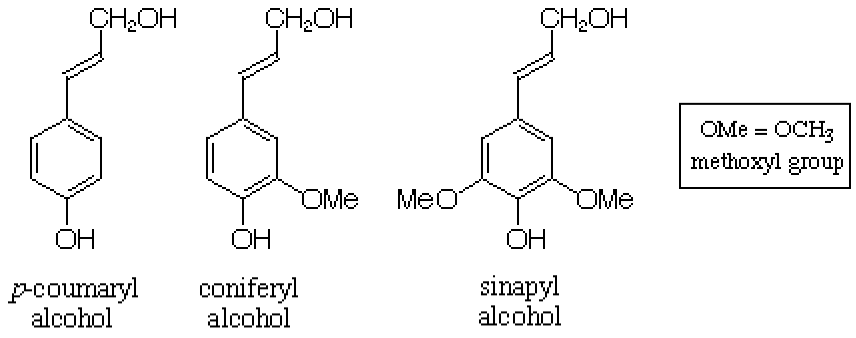
2.3.3 ลิกนิน

ลิกนินมีประมาณ 10 - 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง (Hamelinck และคณะ, 2005) พบอยู่ในช่องว่างของผนังเซลล์ระหว่างเซลลูโลสเฮมิเซลลูโลสและเพคติน โดยจะเชื่อมกับเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะโควาเลนต์ ลิกนินจะทำหน้าที่คล้ายกาวในการยึดองค์ประกอบต่างๆ ของลิกโนเซลลูโลสเข้าด้วยกัน จึงช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์และต้านทานการบุกรุกของแมลงและเชื้อโรคต่างๆ (Ritter, 2008)

ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่มีความซับซ้อนดังแสดงในภาพที่ 2.10 เป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีหน่วยย่อยเป็นฟีนิลโพรเพนมาเรียงต่อกันแบบสุ่ม ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ C-O-C หรือพันธะ C-C ลิกนินจะสังเคราะห์มาจากสารตั้งต้น 3 ชนิด คือ พารา-คูมาริลแอลกอฮอล์ โคนิเฟอริลแอลกอฮอล์ และซินาพิลแอลกอฮอล์ (ภาพที่ 2.11) ซึ่งจะเกิดเป็นหน่วยของโมโนเมอร์ 3 ชนิด คือ พารา-ไฮดรอกซีฟีนิล กัวเอซิล และไซรินกิล ตามลำดับ พืชแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของโมโนเมอร์ที่มาต่อกันเป็นลิกนินแตกต่างกันไป



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของลิกนิน (Gregory, 2007)



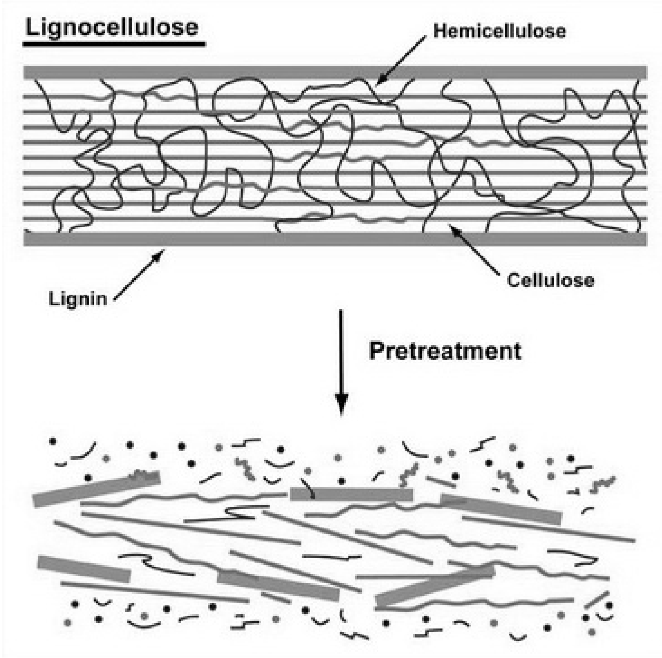
ภาพที่ 2.11 สารตั้งต้น 3 ชนิด ที่ใช้ในการสังเคราะห์ลิกนิน (Richard, 2000)

2.4 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยกระบวนการที่สำคัญ 3 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) การย่อยสลาย (hydrolysis) และกระบวนการหมัก (fermentation)

2.4.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ

การปรับสภาพวัตถุดิบเป็นการแยกส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสออกจากกันเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Silverstein, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 2.12 วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพ คือ เพื่อที่จะกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลส เพิ่มรูพรุนและพื้นที่ผิวให้กับวัตถุดิบ ทำให้วัตถุดิบถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น (Sun และ Cheng, 2002; Silverstein, 2004)



ภาพที่ 2.12 ลักษณะของลิกโนเซลลูโลสภายหลังจากการปรับสภาพ (Hector, Hughes และ Liang-Li, 2008)

การปรับสภาพที่ดีต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้ (Sun และ Cheng, 2002)

(1) เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ได้

(2) หลีกเลี่ยงการทำลายคาร์โบไฮเดรต

(3) หลีกเลี่ยงการเกิดผลิตภัณฑ์ที่จะเป็นตัวยับยั้งกระบวนการย่อยสลายและกระบวนการหมักในภายหลัง

(4) มีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงจนเกินไป

วิธีการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแบ่งเป็น 4 วิธี ดังต่อไปนี้

1. การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) เป็นการลดขนาดและเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบเพื่อให้เอนไซม์สามารถเข้าย่อยสลายได้ดีขึ้น วัตถุดิบสามารถถูกบดให้ละเอียดได้โดยการใช้หลายวิธีรวมกัน คือ การตัด การบด และการโม่ โดยปกติภายหลังจากการตัดแล้ววัตถุดิบจะมีขนาด 10 - 30 มิลลิเมตร และหลังจากการบดหรือโม่แล้ววัตถุดิบจะมีขนาด 0.2 - 2 มิลลิเมตร (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) ยังเป็นการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพอีกวิธีหนึ่งที่สามารถแยกสลายเซลลูโลสได้อย่างรวดเร็วโดยใช้อุณหภูมิสูง (Sánchez และ Cardona, 2008)

ในการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ หากมีการลดขนาดของวัตถุดิบแล้วตามด้วยการปรับสภาพด้วยวิธีอื่นๆ จะทำให้เกิดการย่อยสลายได้ดีขึ้น ดังนั้นถ้าไม่มีการปรับสภาพต่อจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ของค่าที่ได้ตามทฤษฎี ในขณะที่หากมีการปรับสภาพต่อจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงขึ้น 90 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า (Brown, 2003)

2. การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (physico-chemical pretreatment) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีทางกายภาพ โดยวิธี steam explosion หรือ autohydrolysis เป็นวิธีที่มีการศึกษามากที่สุด ในกระบวนการนี้จะใช้ไอน้ำที่ความดันสูงทำให้เกิดปฏิกิริยา autohydrolysis (Sánchez และ Cardona, 2008) วิธีนี้จะใช้อุณหภูมิ 160 - 260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69 - 4.83 MPa เป็นเวลาไม่กี่วินาทีจนถึง 2 - 3 นาที ก่อนที่วัตถุดิบจะกลับสู่ความดันบรรยากาศ เมื่อความดันลดลงอย่างรวดเร็วจะทำให้วัตถุดิบนั้นแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (Sun และ Cheng, 2002) ทำให้เฮมิเซลลูโลสเกิดการย่อยสลาย สามารถแยกเซลลูโลสออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายเซลลูโลส ปัจจัยที่ส่งผลต่อการปรับสภาพ

ด้วยวิธี steam explosion คือ ระยะเวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของวัตถุดิบ และปริมาณความชื้น วิธีนี้เป็นหนึ่งในวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับใช้ในการปรับสภาพไม้เนื้อแข็งและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่มีประสิทธิภาพน้อยในไม้เนื้ออ่อน (Sánchez และ Cardona, 2008)

การเติมกรดซัลฟิวริก (อาจเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์) หรือคาร์บอนไดออกไซด์ ลงใน steam explosion สามารถเพิ่มการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดการเกิดสารยับยั้ง และสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น (Morjanoff และ Gray, 1987)

นอกจากนี้ ammonia fiber explosion (AFEX) จัดเป็นการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์อีกวิธีหนึ่งซึ่งวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจะอยู่ในแอมโนเนียเหลวที่อุณหภูมิและความดันสูงเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่ความดันจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Sun และ Cheng, 2002)

3. การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment) มีการใช้สารเคมีต่างๆ ในการปรับสภาพวัตถุดิบ Sun และ Cheng (2002) ได้แบ่งการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีออกเป็น 5 วิธี คือ

3.1 การปรับสภาพด้วยกรด แบ่งออกเป็น

3.1.1 การใช้กรดเข้มข้น เช่น กรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอกริก แม้ว่าจะเป็นสารที่ทำให้เกิดการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี แต่กรดที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษ มีฤทธิ์กัดกร่อนรุนแรง จึงต้องการภาชนะที่ทนต่อการกัดกร่อนได้ นอกจากนี้ยังต้องมีกระบวนการนำกรดเข้มข้นกลับมาใช้ใหม่ภายหลังจากการย่อยสลายแล้ว เพื่อให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ (Sivers และ Zacchi, 1995)

3.1.2 การใช้กรดเจือจาง เป็นหนึ่งในวิธีการปรับสภาพที่มีการศึกษามากที่สุด เกิดขึ้นที่อุณหภูมิปานกลางโดยมีการใช้กรดเจือจาง เช่น กรดซัลฟิวริก กรดฟอสฟอริกและกรดไนตริก แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้กรดซัลฟิวริกเจือจาง หน้าที่ของกรดอ่อน คือ จะไปย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาล หรืออาจจะกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินบางส่วนออกไปเพื่อให้เซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น แม้ว่าการใช้กรดอ่อนในการปรับสภาพจะสามารถเพิ่มการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี แต่การใช้วิธีนี้จะมีต้นทุนสูงกว่าการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์บางวิธี เช่น steam explosion หรือ AFEX เนื่องจากต้องมีการทำให้ pH เป็นกลางซึ่งมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และกระบวนการหมัก (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การใช้กรดอ่อนยังก่อให้เกิดการสร้างสารประกอบ เช่น กรดอะซิติกและเฟอร์ฟูรัลขึ้นในไฮโดรไลเสตซึ่งมีความเป็นพิษต่อเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก

3.2 การปรับสภาพด้วยด่าง วิธีนี้ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำกว่าการปรับสภาพด้วยวิธีอื่นๆ สามารถเกิดขึ้นได้ที่สภาวะห้องแต่ใช้ระยะเวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน การปรับสภาพด้วยด่างเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิว ลดปริมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในชีวมวลโดยทำลายพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลสและพันธะระหว่างลิกนินที่เชื่อมกับคาร์โบไฮเดรต (Balat และคณะ, 2008) สามารถกำจัดลิกนินได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบอื่นๆ (McMillan, 1997) การปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางจะทำให้วัตถุดิบเกิดการบวมพองส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น เกิดการลดลงของ degree of polymerization สามารถแยกลิกนินออกจากคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เป็นการทำลายโครงสร้างของลิกนิน (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การปรับสภาพด้วยด่างอาจใช้เป็นแอมโนเนียหรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ได้เช่นกัน

3.3 การกำจัดลิกนินด้วยการออกซิไดซ์ (oxidative delignification) นิยมใช้เป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีความเป็นด่าง (pH 11.5) หรือเรียกว่าอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ เป็นวิธีที่สามารถละลายส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ และสามารถลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลสลง จากการศึกษาของ Saha และ Cotta (2006, 2007) พบว่า ฟางข้าวสาลีและแกลบที่ได้รับการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ เมื่อถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่ใช้ในการหมักได้ถึง 97 และ 96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และไม่เกิดสารยับยั้งที่เป็นเฟอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล

3.4 การใช้โอโซน (ozonolysis) โอโซนสามารถย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลสวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ การปรับสภาพด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถกำจัดลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษในกระบวนการ และสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่ความดันและอุณหภูมิห้อง (Vidal และ Molinier, 1988) แต่ข้อเสียคือ ต้องใช้โอโซนปริมาณมากทำให้กระบวนการนี้มีต้นทุนสูง

3.5 กระบวนการ organosolv เป็นวิธีที่มีการผสมตัวทำละลายอินทรีย์กับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดอนินทรีย์ เช่น กรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอกริก เพื่อทำลายลิกนินและพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลส ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการนี้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลีนไกลคอล ไตรเอทิลีนไกลคอล และเตตระไฮโดรเฟอร์ฟูริลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้กรดอินทรีย์ เช่น กรดออกซาลิก กรดอะซิติลซาลิไซลิก และกรดซาลิไซลิก สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการ organosolv ได้เช่นกัน ตัวทำละลายที่ใช้ในกระบวนการนี้ต้องมีการกำจัดออก อาจเป็นการระเหยและควบแน่นเพื่อหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ซึ่งการลดต้นทุนได้ การกำจัดตัวทำละลายออกจากระบบเป็นสิ่งที่จำเป็น เนื่องจากตัวทำละลายเป็นสารยับยั้งในกระบวนการย่อย

สลายด้วยเอนไซม์และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (Sun และ Cheng, 2002)

4. การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment) เป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น brown-rot fungi, white-rot fungi และ soft-rot fungi ในการย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ส่วนใหญ่ brown-rot fungi จะย่อยเซลลูโลส ในขณะที่ white-rot fungi และ soft-rot fungi จะย่อยทั้งเซลลูโลสและลิกนิน white-rot fungi เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพ (Sun และ Cheng, 2002) การย่อยสลายลิกนินด้วย white-rot fungi มักจะใช้เชื้อซึ่งได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* และ *Trametes versicolor* เป็นต้น โดยราเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (ligninase) ได้แก่ ลิกนินเพอร์ออกซิเดส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และแลคเคส ข้อดีของการปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ คือ ใช้พลังงานน้อย และสามารถเกิดได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง แต่ข้อเสีย คือ ต้องใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลายลิกนิน (Silverstein, 2004)

2.4.2 การย่อยสลาย

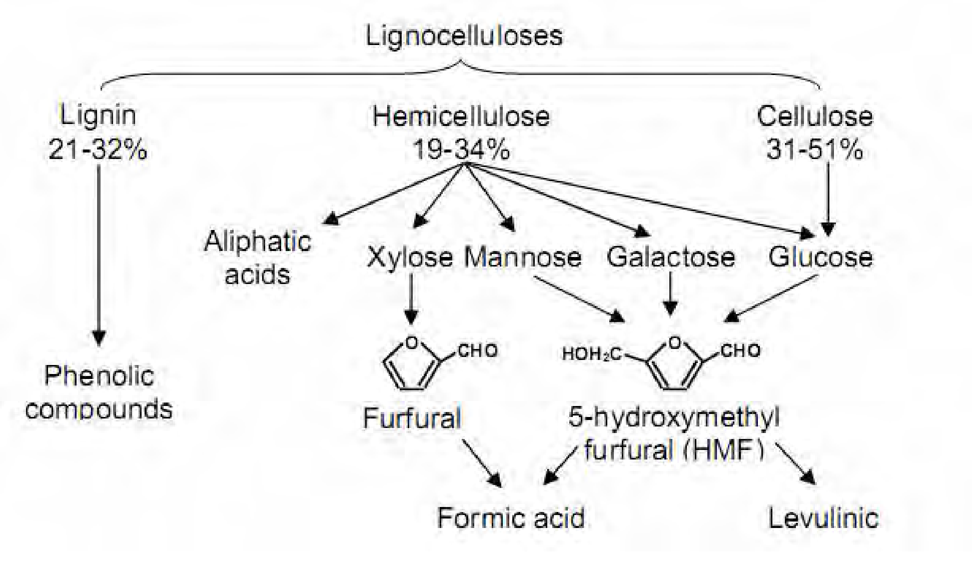
การย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลสำหรับใช้ในกระบวนการหมักนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมีโดยการใช้กรด และวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์

1. การย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมี (chemical hydrolysis) วิธีที่นิยมใช้ คือ การย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis) สามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและกรดเจือจางในการย่อยสลาย กรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก การใช้กรดเข้มข้น เช่น กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้องจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่สูงมากถึงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่ได้ตามทฤษฎี แต่การใช้กรดในปริมาณมากนี้จำเป็นที่จะต้องมีกระบวนการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ ส่วนการใช้กรดเจือจาง เช่น ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นการใช้ปริมาณของกรดน้อยกว่าแต่ใช้อุณหภูมิที่สูง ซึ่งทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลเพียง 55 - 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่ได้ตามทฤษฎีเท่านั้น (Silverstein, 2004) Hamelinck และคณะ (2005) ได้รายงานการเปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลส ดังตารางที่ 2.2 จะเห็นได้ว่าการใช้กรดเจือจางจะใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าและใช้เวลาน้อยกว่าการใช้กรดเข้มข้น แต่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการใช้กรดเข้มข้นจะมีค่าสูงกว่า

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลส

กรดซัลฟิวริก	ความเข้มข้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ใช้	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (เปอร์เซ็นต์)
เจือจาง	น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์	215	3 นาที	50 - 70
เข้มข้น	30 - 70 เปอร์เซ็นต์	40	2 - 6 ชั่วโมง	90

ในระหว่างการย่อยสลายด้วยกรด เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินจะถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนสหรือน้ำตาลไซโลส และสารประกอบฟีโนลิก ตามลำดับ ในขณะที่เกิดโมโนเมอร์ชนิดต่างๆ ขึ้นนี้ จะมีการย่อยสลายเกิดขึ้นต่อไปทำให้ได้สารต่างๆ เช่น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (HMF) จากน้ำตาลคาร์บอนหกอะตอม และเฟอร์ฟูรัลจากน้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอม ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จะถูกย่อยสลายกลายเป็นกรดลีวูลินิกและกรดฟอร์มิกต่อไป นอกจากนี้กรดอะซิติกยังสามารถถูกปล่อยออกมาจากหมู่อะซิติลที่อยู่ในเฮมิเซลลูโลสได้อีกด้วย ในขณะที่ลิกนินจะถูกย่อยสลายและปล่อยสารประกอบฟีโนลิกออกมา (Purwadi, 2006) ดังแสดงในภาพที่ 2.13 ผลพลอยได้ต่างๆ ที่เกิดขึ้นมาในระหว่างการย่อยสลายด้วยกรดนี้ส่งผลต่อกระบวนการหมักเนื่องจากเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ใช้ในการหมัก



ภาพที่ 2.13 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด (Purwadi, 2006)

2. การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อราและแบคทีเรีย การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่รุนแรง เป็นการย่อยสลายแบบเฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์กับวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรดกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แสดงดังตารางที่ 2.3 และ 2.4

ตารางที่ 2.3 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรด (Woodward, 1987; Parisi, 1989; Lu และ Mosier, 2004)

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สารเคมีที่ใช้มีราคาถูก 2. เป็นกระบวนการที่ทำได้ง่าย 3. วัตถุดิบไม่ต้องผ่านการปรับสภาพ 4. ปฏิกิริยาเกิดเร็ว ใช้เวลาสั้น 5. ปฏิกิริยาเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ (กรณีใช้กรดเข้มข้น) 6. ให้ปริมาณน้ำตาลสูง (กรณีใช้กรดเข้มข้น)	1. ต้องมีการปรับสภาพน้ำตาลให้เป็นกลางก่อนนำไปหมัก (neutralization) 2. ต้องมีกระบวนการนำกรดกลับมาหมุนเวียนใช้ใหม่ 3. ใช้อุณหภูมิสูง (กรณีใช้กรดอ่อน) 4. ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เฉพาะเจาะจง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์ 5. น้ำตาลที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสารอื่น เช่น เฟอร์ฟูรัล ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก 6. กรดที่ถูกทิ้งออกมาก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม 7. ต้องใช้เครื่องมือที่ทนต่อการกัดกร่อนของกรดได้ซึ่งมีราคาแพง

ตารางที่ 2.4 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Woodward, 1987; Parisi, 1989; Lu และ Mosier, 2004)

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สภาวะที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างไม่รุนแรง	1. เอนไซม์มีราคาสูง
2. ปฏิกิริยามีความเฉพาะเจาะจงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง	2. นำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ยาก
3. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น	3. ต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน
4. สามารถหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยได้	4. ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (product inhibition)
5. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน	5. อาจเกิดการสูญเสียเอนไซม์ไป เนื่องจากถูกดูดซับบนวัสดุที่ไม่ย่อย
	6. เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์
	7. ถ้าระบบมีสารที่ขัดขวางปฏิกิริยา เช่น เฮมิเซลลูโลส หรือลิกนิน จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าลง

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส คือ เอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส

1. เซลลูเลส

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายแตกต่างกันมาทำงานร่วมกัน สามารถแบ่งเอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลสออกเป็น 3 ชนิด (Coughlan และ Ljungdahl, 1988 อ้างถึงใน Sun และ Cheng, 2002) คือ

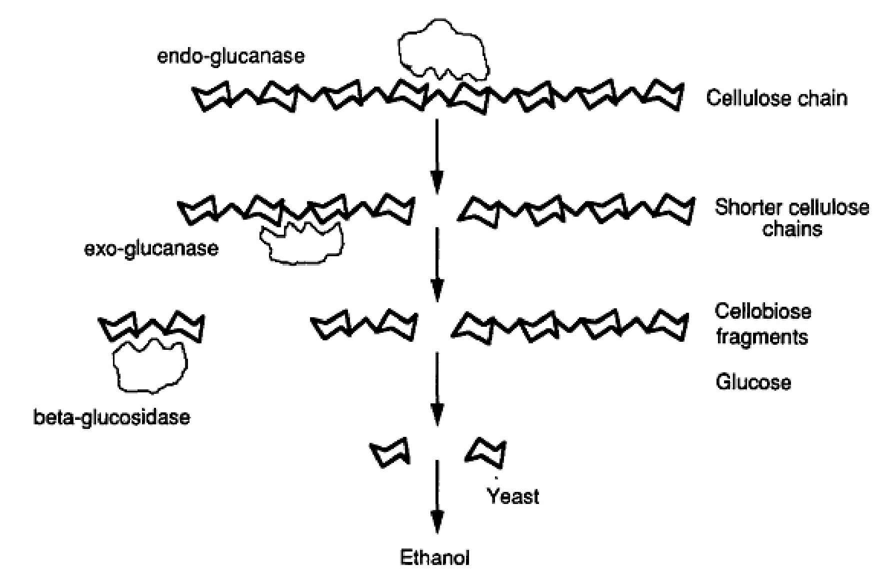
(1) เอนโดกลูคาเนส (EG หรือ เอนโด-1,4-เบตา-กลูคาเนส หรือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส: EC 3.2.1.4) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่มภายในบริเวณที่เป็นอะมอร์ฟัสของเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ กลูโคส เซลโลไบโอส และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ โดยกลูโคสจะได้ในปริมาณที่น้อยมาก

(2) เอกโซกลูคาเนส (CBH หรือ เอกโซ-1,4-เบตา-กลูคาเนส หรือ เซลโลไบโอไฮโดรเลส: EC 3.2.1.91) เป็นเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา โดยมีปริมาณ 40 - 70 เปอร์เซ็นต์ของเซลลูเลสทั้งหมด (Esterbauer และคณะ, 1991) ทำหน้าที่ตัด

พันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกจากปลายด้านที่เป็นนอน-รีดิวซ์ซิงของสายเซลลูโลส และสามารถย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณที่มีความเป็นคริสตัลไลน์สูงได้ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและเซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่

(3) เบตา-กลูโคซิเดส (BGL หรือ เซลโลไบเอส: EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสที่ได้จากการทำงานของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

การทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดแสดงดังภาพที่ 2.14



ภาพที่ 2.14 การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่ตำแหน่งต่างๆ ของเซลลูโลส (Wyman, 1994)

การทำงานของเซลลูเลสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นจะยับยั้งเบตา-กลูโคซิเดส ส่งผลให้ในระบบมีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้นซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส ทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดช้าลงและยุติในที่สุด ได้มีการศึกษาวิธีที่จะลดผลการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว เช่น การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้น การเติมเบตา-กลูโคซิเดสในระหว่างการย่อยสลาย และการนำน้ำตาลออกในขณะที่มีการย่อยสลายด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันหรือใช้กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่อง (SSF) เป็นต้น (Sun และ Cheng, 2002)

เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด อาจเป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ใช้ออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจน (Sun และ Cheng, 2002) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้แสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้ (Sun และ Cheng, 2002)

จุลินทรีย์	อ้างอิง
เชื้อรา	
Aspergillus spp.	Sternberg (1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)
Penicillium spp.	Sternberg (1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)
Phanerochaete chrysosporium	Sternberg (1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)
Schizophyllum spp.	Sternberg (1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)
Sclerotium rolfsii	Sternberg (1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)
Trichoderma spp.	Sternberg (1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)
แบคทีเรีย	
Acetovibrio	Bisaria (1991)
Bacillus spp.	Bisaria (1991)
Bacteriodes cellulosolvens	Duff และ Murray (1996)
Cellulomonas fimi	Sun และ Cheng (2002)
Clostridium thermocellum	Duff และ Murray (1996)
Erwinia	Bisaria (1991)
Microbispora	Bisaria (1991)
Ruminococcus	Bisaria (1991)
แอคติโนมัยซีส	
Streptomyces spp.	Bisaria (1991)
Thermomonospora fusca	Sun และ Cheng (2002)

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียกับเชื้อรา พบว่า แบคทีเรียผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า (Persson, Tjerneld และ Hahn-Hägerdal, 1991) แบคทีเรียชนิดแอนแอโรบมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำและต้องการสภาวะในการเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาการผลิตเซลลูเลสในทางการค้าจะมุ่งเน้นไปที่เชื้อรา (Duff และ Murray, 1996) เชื้อรา *Trichoderma* สายพันธุ์ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *T. reesei* และสายพันธุ์ที่

เป็นมิวแทนต์ เป็นเชื้อที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต เซลลูเลส เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสได้ดีเหมาะสำหรับใช้ในการย่อยสลาย (Balat และคณะ, 2008)

ข้อดีของเซลลูเลสที่ได้จาก *T. reesei* คือ สามารถผลิตเอนไซม์ครบทั้งสามชนิด เอนไซม์มีความทนต่อสารยับยั้ง และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าเซลลูเลสที่ได้จากเชื้อราชนิดอื่นๆ (Silverstein, 2004) แม้ว่า *T. reesei* จะผลิตเบตา-กลูโคซิเดสได้ แต่แอกทิวิตีมีค่าไม่สูงมากนัก ดังนั้นจึงอาจจะต้องมีการเติมเบตา-กลูโคซิเดสจากแหล่งอื่นเข้าไปเพื่อให้เซลลูเลสของเชื้อราชนิดนี้ทำงานได้อย่างสมบูรณ์ (Sánchez และ Cardona, 2008)

2. เฮมิเซลลูเลส

เฮมิเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายพันธะในเฮมิเซลลูโลส โดยปกติแล้วมักพบไซแลนเป็นองค์ประกอบที่มีมากที่สุดในเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นการย่อยสลายไซแลนเพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสจะต้องใช้เอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิดมาทำงานร่วมกัน คือ

(1) เอนโดไซแลเนส (1,4-เบตา-ดี-ไซแลน ไซแลโนไฮโดรเลส: EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกในไซแลนแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไซโลสและไซโลโอลิโกเมอร์สายสั้นๆ

(2) เบตาไซโลซิเดส (1,4-เบตา-ดี-ไซแลน ไซโลไฮโดรเลส: EC 3.2.1.37) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกของไซโลไบโอสหรือจากปลายด้านนอน-รีดิวซ์ของไซโลโอลิโกเมอร์สายสั้นๆ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไซโลส

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสชนิดอื่นๆ ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลส (Shallom และ Shoham, 2003) ได้แก่

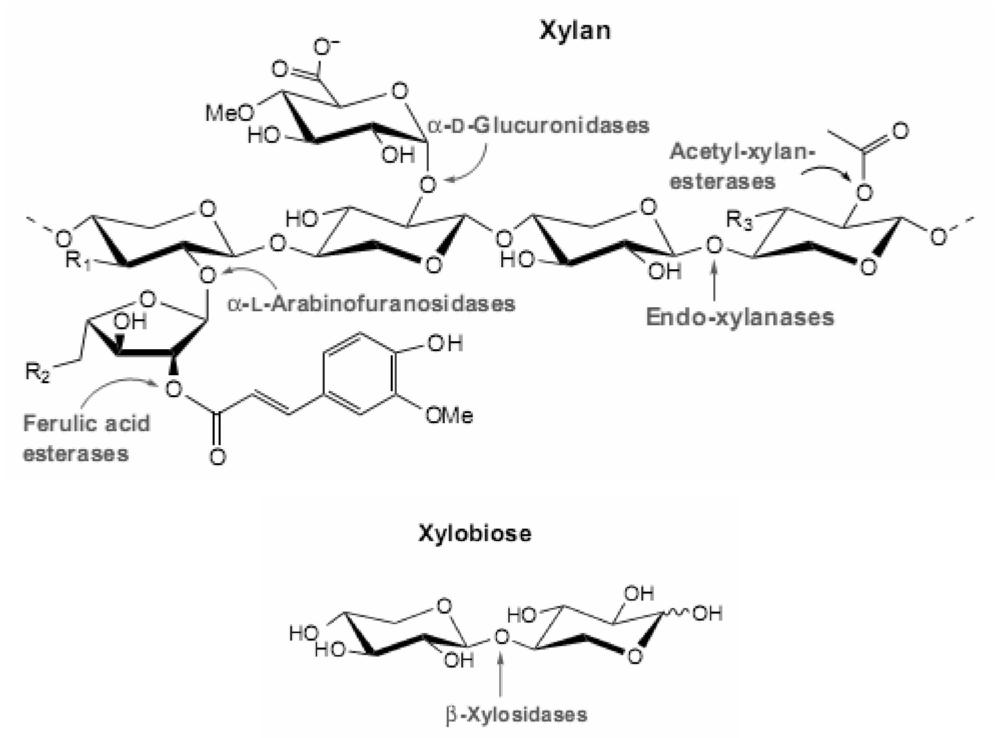
(1) แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (EC 3.21.55) ทำหน้าที่ย่อยสลายหมู่อะราบิโนฟิวราโนซิลในเฮมิเซลลูโลส ได้น้ำตาลอะราบิโนสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

(2) แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส (EC 3.2.1.139) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2-ไกลโคซิดิก ใน 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิดซึ่งเป็นโซ่ข้าง (sidechain) ของไซแลน ทำให้ได้ 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิดเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

(3) อะซิติลไซแลนเอสเทอเรส (EC 3.1.1.72) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งโอ-2 และโอ-3 ที่เชื่อมหมู่อะซิติลกับไซแลน ได้กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

(4) เฟอรูโลอิลเอสเทอเรส (EC 3.1.1.73) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างอะราบิโนสกับกรดเฟอรูลิก ทำให้เฮมิเซลลูโลสกับลิกนินแยกออกจากกันได้

การทำงานของเอนไซม์แสดงดังภาพที่ 2.15



ภาพที่ 2.15 การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสที่ตำแหน่งต่างๆ ของเฮมิเซลลูโลส (Shallom และ Shoham, 2003)

ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซแลเนสได้แสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซแลเนสได้

จุลินทรีย์	อ้างอิง
เชื้อรา	
Aspergillus caespitosus	Guimarães และคณะ (2006)
A. niger	Guimarães และคณะ (2006)
A. phoenicis	Guimarães และคณะ (2006)
Aureobasidium pullulans	Tanaka, Muguruma และ Ohta (2006)
Fusarium oxysporum	Christakopoulos และคณะ (1996)
Neurospora. crassa	Guimarães และคณะ (2006)
Paecilomyces variotii	Guimarães และคณะ (2006)
Penicillium purpurogenum	Belancic และคณะ (1995)
T. reesei	Guimarães และคณะ (2006)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

จุลินทรีย์	อ้างอิง
แบคทีเรีย	
Bacillus circulans D1	Bocchini และคณะ (2005)
Bacillus sp. strain K-1,	Ratanakhanokchai, Kyu และ Tanticharoen (1999)
แอคติโนมัยซีส	
Streptomyces caelestis SN83	Ninawe และ Kuhad (2005)
S. cyaneus SN32	Ninawe และ Kuhad (2005)
S. tendae SN77	Ninawe และ Kuhad (2005)
Thermomonospora curvata	Stutzenberger (1994)

T. reesei สามารถผลิตได้ทั้งเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส (Juhász และคณะ, 2005) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เพราะทำให้ไม่ต้องใช้เชื้อหลายตัวในการผลิตเอนไซม์

2.4.3 กระบวนการหมัก

การหมัก คือ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอล ได้แก่ *S. cerevisiae*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Kluveromyces marxianus*, *K. fragilis*, *Zymomonas mobilis* และ *C. thermocellum* เป็นต้น สำหรับ *S. cerevisiae* นั้นเป็นยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดชนิดหนึ่ง ข้อดี คือ สามารถผลิตเอทานอลได้สูง ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่นๆ และมีความทนต่อเอทานอลสูงกว่าพวกแบคทีเรีย ดังนั้นการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ส่วนจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นเอทานอล ได้แก่ *P. stipitis*, *Candida shehatae* และ *Pachysolen tannophilus* เป็นต้น (Hahn-Hägerdal และคณะ, 1994) โดย *P. stipitis* ได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมมากเพราะสามารถหมักน้ำตาลไซโลสได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงและไม่เกิดเป็นไซลิทอล (Dominguez, 1993)

ในทางทฤษฎียีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสและไซโลสไปเป็นเอทานอลได้ 51.1 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซ็นต์ ดังสมการ

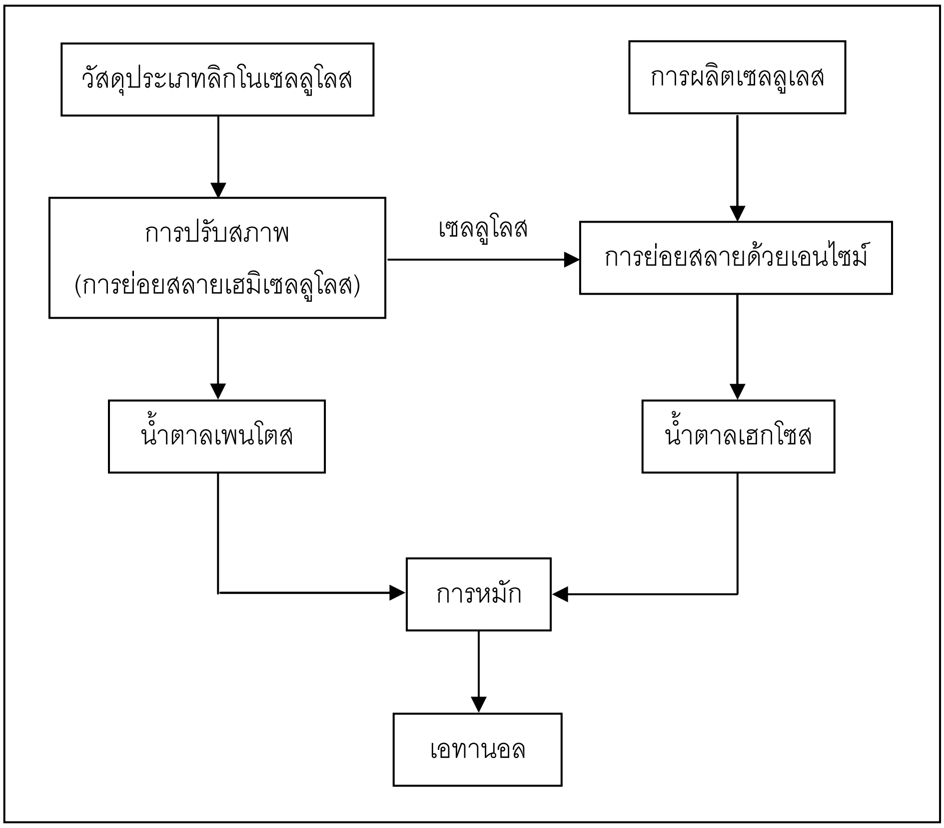
$C_6H_{12}O_6$	$\longrightarrow$	$2\ C_2H_5OH$	+	$2\ CO_2$
180 กรัม		2 × 46 กรัม		2 × 44 กรัม
		(51.1 เปอร์เซ็นต์)		(48.9 เปอร์เซ็นต์)

$3\ C_5H_{10}O_5$	$\longrightarrow$	$5\ C_2H_5OH$	+	$5\ CO_2$
3 × 150 กรัม		5 × 46 กรัม		5 × 44 กรัม
		(51.1 เปอร์เซ็นต์)		(48.9 เปอร์เซ็นต์)

แต่ในทางปฏิบัตินั้นจะได้เอทานอลอยู่ในช่วงไม่เกิน 90 - 95 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี เนื่องจากยีสต์จะนำน้ำตาลบางส่วนไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต และเปลี่ยนเป็นผลผลิตพลอยได้อื่นๆ ทำให้เอทานอลที่ได้มีค่าต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎีเสมอ โดยในการหมักน้ำตาลด้วยยีสต์จะได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังนี้ เอทานอล 48.4 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ 46.5 เปอร์เซ็นต์ อะซิทัลดีไฮด์ 0 - 0.03 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 0.05 - 0.25 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 2.5 - 3.6 เปอร์เซ็นต์ กรดแลกติก 0 - 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดซักซินิก 0.5 - 0.77 เปอร์เซ็นต์ ฟูเซลออยล์ 0.25 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเฟอร์ฟูรัลจำนวนเล็กน้อย (Paturau, 1969)

ในกระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

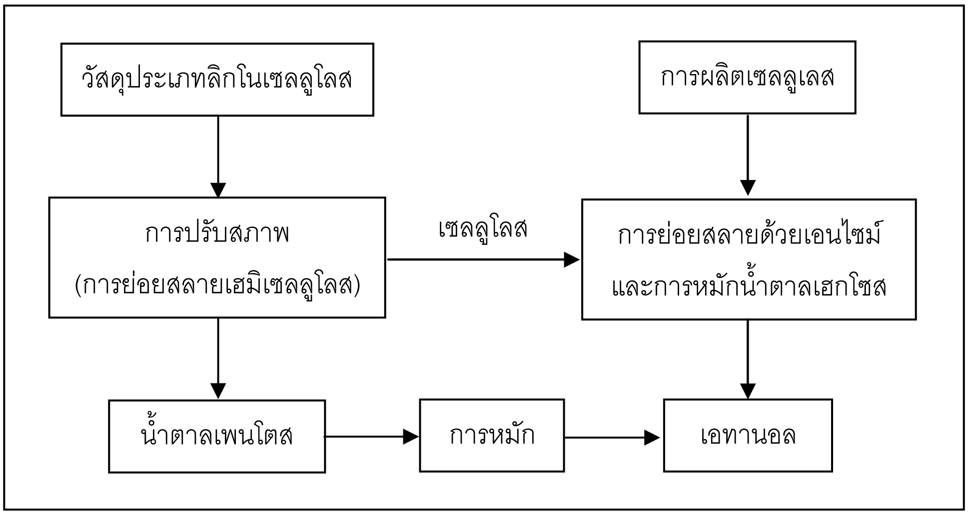
(1) กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (separate hydrolysis and fermentation: SHF) เป็นกระบวนการที่มีการแยกขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และการหมักออกจากกัน เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโตสตามลำดับ แล้วค่อยนำเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป ซึ่งอาจเป็นการหมักแบบแยกกันหรือหมักแบบร่วมกันก็ได้ ดังตัวอย่างขั้นตอนที่แสดงในภาพที่ 2.16 ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ การย่อยสลายและการหมักสามารถเกิดได้ในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกระบวนการ แต่ข้อเสีย คือ เซลลูเลสจะถูกยับยั้งได้ด้วยกลูโคสและเซลโลไบโลสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Hahn-Hägerdal และคณะ, 2006)



ภาพที่ 2.16 กระบวนการ SHF

Gupta, Sharma และ Kuhad (2009) ได้ศึกษาการใช้ *Prosopis juliflora* หรือ Mesquite ซึ่งเป็นไม้พุ่มผลัดใบ มีหนาม อายุหลายปี มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SHF โดยมีการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นในส่วนไฮโดรไลเสตด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ส่วนของแข็งที่เหลือซึ่งเป็นเซลลูโลสจะนำไปกำจัดลิกนินด้วยโซเดียมซัลไฟต์และโซเดียมคลอไรต์ แล้วนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือ เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *T. reesei* (ATCC 26921) ซึ่งมีแอกทิวิตีเป็น 6.5 FPU/มิลลิกรัมของเอนไซม์ และเบตา-กลูโคซิเดส (Novozyme 188) ที่ผลิตจาก *A. niger* ซึ่งมีแอกทิวิตีเป็น 250 ยูนิต/กรัมของเอนไซม์ จากนั้นนำไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 18.24 กรัม/ลิตร ไปหมักโดยใช้ *P. stipitis* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 37.47 กรัม/ลิตร ไปหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 7.13 และ 18.52 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็น 0.39 และ 0.49 กรัม/กรัมของน้ำตาล ตามลำดับ

(2) กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่อง (simultaneous saccharification and fermentation: SSF) ซึ่งเป็นกระบวนการที่รวมเอาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์กับการหมักน้ำตาลกลูโคสเข้าไว้ด้วยกัน สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้อย่างต่อเนื่อง ทำให้ลดการสะสมของน้ำตาลซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ จึงมีผลผลิตของเอทานอลสูงกว่ากระบวนการ SHF (Wyman, Spindler และ Grohmann, 1992) ตัวอย่างกระบวนการ SSF แสดงในภาพที่ 2.17

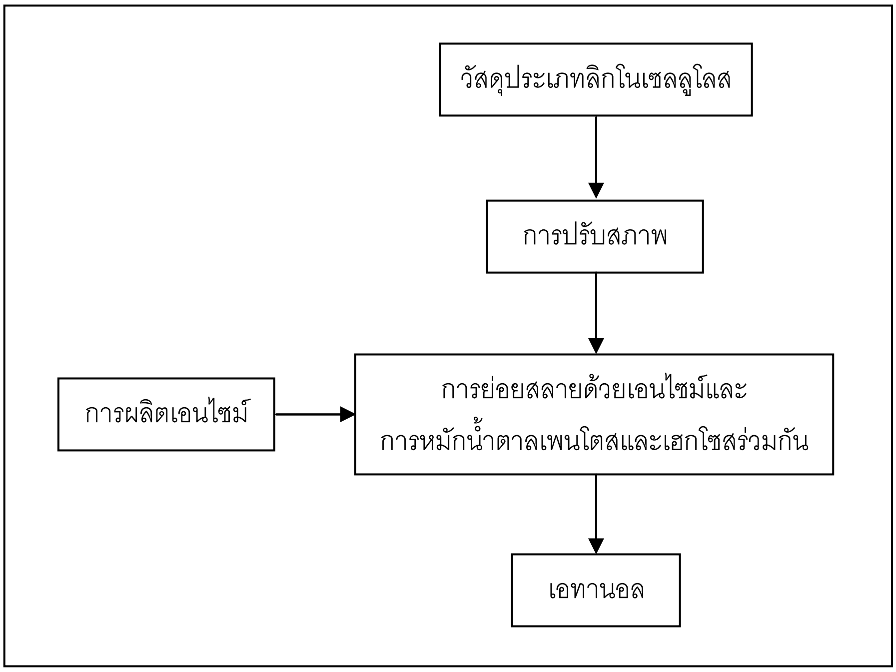


ภาพที่ 2.17 กระบวนการ SSF

Chang และคณะ (2001) ได้นำหญ้าสวิตช์ คอร์นสโตเวอร์ และไม้ปอพลาร์ ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยปูนขาวมาใช้ในกระบวนการ SSF ที่มีการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสทางการค้า (Spezyme-CP) ซึ่งมีแอคติวิตี 59 FPU/มิลลิลิตร ร่วมกับการหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* พบว่าได้ปริมาณเอทานอลเป็น 72, 62 และ 73 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีตามลำดับ

Linde และคณะ (2008) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธี steam explosion โดยมีการเติมกรดซัลฟิวริกเจือจางลงไป ในการหมักด้วยกระบวนการ SSF จะใช้เอนไซม์ทางการค้า คือ Cellucalst 1.5 L (เซลลูเลส) และ Novozyme 188 (เบตา-กลูโคซิเดส) ในการย่อยสลายร่วมกับการหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* พบว่า ได้ผลผลิตเป็นเอทานอล 13.2 กรัมต่อฟางข้าวสาลี 100 กรัม หรือคิดเป็น 67 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

(3) กระบวนการย่อยสลายและหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง (simultaneous saccharification and co-fermentation: SSCF) เป็นกระบวนการที่พัฒนามาจาก SSF แต่แตกต่างกันตรงที่ได้รวมเอาการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์กับการหมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตสเข้าไว้ด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.18



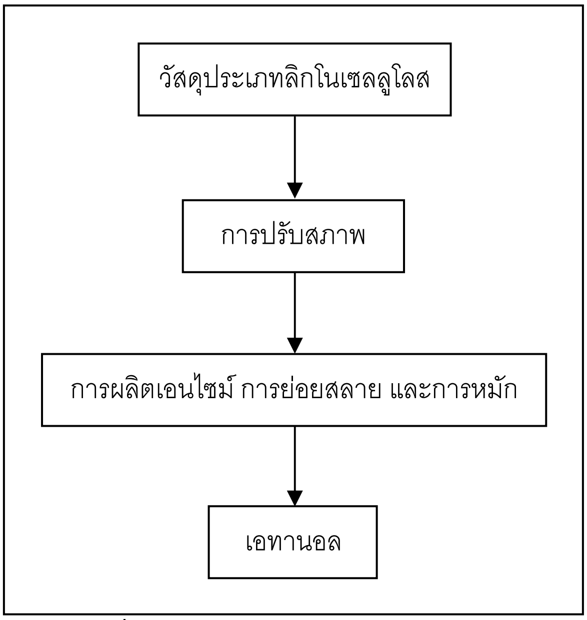
ภาพที่ 2.18 กระบวนการ SSCF

Wayman, Parekh และ Parekh (1987) ได้ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยกระบวนการ SSCF ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากไม้เนื้อแข็ง คือ ต้น aspen และไม้เนื้ออ่อนจำพวกสน โดยใช้เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสในการย่อยสลายร่วมกับการใช้ *P. stipitis* และ *Brettanomyces clausennii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสได้ พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลเป็น 369 และ 360 ลิตรต่อตันของวัตถุดิบที่ใช้ หรือคิดเป็น 76 และ 75 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

Kim และ Lee (2005) ได้ศึกษาการหมักเอทานอลจากคอร์นสโตเวอร์ โดยใช้การปรับสภาพด้วยวิธี soaking in aqueous ammonia (SAA) แล้วนำไปเข้าสู่กระบวนการ SSCF โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสลายกลูแคนและไซแลน คือ เซลลูเลส (Spezyme-CP) ซึ่งมีแอกทิวิตีของไซแลเนสอยู่ด้วย และเบตา-กลูโคซิเดส (Novozyme 188) ร่วมกับการใช้

recombinant *E. coli* (KO11) ที่มีความสามารถในการหมักทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ผลที่ได้พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลเป็น 77 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

(4) กระบวนการเปลี่ยนวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสไปเป็นเอทานอลด้วยจุลินทรีย์โดยตรง (consolidated bioprocessing: CBP หรือเรียกว่า direct microbial conversion: DMC) เช่น การใช้ *C. thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถทั้งในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลและนำน้ำตาลไปหมักเป็นเอทานอลได้ ดังแสดงขั้นตอนในภาพที่ 2.19



ภาพที่ 2.19 กระบวนการ CBP หรือ DMC

เมื่อเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของกระบวนการผลิตเอทานอลทั้ง 4 วิธี จะสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการ SHF, SSF และ CBP

กระบวนการ	ข้อดี	ข้อเสีย
SHF	1. การย่อยสลายและการหมักเกิดขึ้นแยกกันจึงสามารถทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกระบวนการได้ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ คือ 40-50 °C แต่การหมัก คือ 30 °C	1. เมื่อมีกลูโคสและเซลโลไบโอสสะสมอยู่ในระบบ จะไปยับยั้งการทำงานเซลลูเลส (product inhibition) ทำให้อัตราการย่อยสลายลดลง 2. กระบวนการใช้ระยะเวลานาน 3. ใช้ถังปฏิกรณ์หลายใบ
SSF	1. การย่อยสลายและการหมักเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์เดียวกัน 2. ไม่เกิด product inhibition ทำให้อัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อที่ใช้ในการหมักนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไปใช้ได้ทันที 3. ใช้เอนไซม์ปริมาณน้อยกว่า SHF 4. ได้ปริมาณเอทานอลสูง 5. ใช้ระยะเวลาสั้นกว่า SHF	1. สภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายและการหมักมีความแตกต่างกัน 2. เอทานอลอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้
CBP	1. ใช้ถังปฏิกรณ์เพียงใบเดียว 2. ไม่ต้องมีขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากเชื้อที่ใช้สามารถผลิตเอนไซม์ได้อยู่แล้ว	1. ได้ปริมาณเอทานอลต่ำ เนื่องจากเกิดผลพลอยได้ชนิดอื่นมากกว่า เช่น กรดอะซิติก และกรดแลกติก 2. เชื้อที่ใช้มีความทนต่อเอทานอลต่ำ

2.4.4 **การผลิตเอทานอลจากหญ้า**

หญ้าเป็นหนึ่งในพืชพลังงานที่มีความน่าสนใจในการนำมาใช้ผลิตเอทานอล ข้อดี คือ หญ้าเป็นพืชที่เจริญเติบโตเร็ว มีอายุหลายปี หลังจากเก็บเกี่ยวแล้วสามารถเจริญเติบโตขึ้นมาได้ใหม่จึงเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง ทำให้ไม่ต้องปลูกทดแทนใหม่บ่อยๆ ในปัจจุบันพบว่าหญ้าสวิตช์ (*Panicum virgatum* L.) ซึ่งเป็นหญ้าพื้นเมืองของทวีปอเมริกาเหนือ เป็นหญ้าที่มีศักยภาพในการนำมาเป็นพืชพลังงานเพื่อผลิตเอทานอล จึงมีการศึกษาหญ้าชนิดนี้เป็นจำนวนมาก หญ้าชนิดนี้มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี แต่เดิมนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารสัตว์ ต่อมาจึงได้มี

การศึกษาเพื่อนำไปใช้เป็นพืชพลังงาน กระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกาได้นำหญ้าสวิตช์มาเป็นต้นแบบของพืชพลังงาน (McLaughlin, 1993) ปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกาได้ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล จึงมีความวิตกกังวลถึงราคาของข้าวโพดที่อาจสูงขึ้นในอนาคต อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารคนและอาหารสัตว์ ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจึงได้รับความสนใจ การใช้พืชพลังงานเช่นหญ้าสวิตช์นี้จึงถูกมองว่าเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลในระยะยาวแทนการใช้ข้าวโพดในปัจจุบันได้ (Keshwani และ Cheng, 2009)

Isci และคณะ (2008) ได้ศึกษากระบวนการหมักแบบ SSF ในหญ้าสวิตช์ โดยใช้วิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยมวล ใช้เซลลูเลสทางการค้า คือ Spezyme CP ซึ่งมีแอกทิวิตีเป็น 77 FPU/มิลลิลิตร ในการย่อยสลายร่วมกับการหมักด้วย *S. cerevisiae* D_5A เป็นเวลา 10 วัน ผลที่ได้พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 72 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

นอกจากหญ้าสวิตช์แล้วยังมีการศึกษาการผลิตเอทานอลในหญ้าชนิดอื่นๆ อีก เช่น หญ้าแพรกหรือหญ้าเบอร์มิวดา (*Cynodon dactylon*) (Sun และ Cheng, 2005) หญ้าซิลเวอร์ (*Miscanthus floridulus*) (Guo และคณะ, 2008) เป็นต้น

Robert (1994) รายงานว่า หญ้าเนเปียร์เป็นหนึ่งในพืชพลังงานที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตเป็นเอทานอลในฮาวายได้

นอกจากนี้ยังพบว่า หญ้าแฝกมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพได้โดยการนำไปเผาไหม้เป็นเชื้อเพลิงในโรงไฟฟ้าชีวมวล หรือสามารถนำไปผลิตเป็นเอทานอลได้เช่นกัน (Grimshaw, 2006)

2.5 หญ้าที่พบในประเทศไทย

ประเทศไทยมีหญ้าขึ้นกระจัดกระจายทั่วไป ทั้งที่เป็นหญ้าที่ขึ้นเองตามธรรมชาติซึ่งมักเป็นหญ้าพื้นเมือง เช่น หญ้าคา หญ้าเพ็ก และหญ้าเจ้าชู้ เป็นต้น และหญ้าที่มีการปลูกขึ้นมาเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ หญ้าที่นิยมปลูกในประเทศไทยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ หญ้าอาหารสัตว์ (forage grass) และหญ้าแฝก (vetiver grass)

1. หญ้าอาหารสัตว์

หญ้าอาหารสัตว์ที่นิยมปลูกในประเทศไทยมักเป็นหญ้าที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ เนื่องจากมีการปรับตัวได้ดีและให้ผลผลิตที่สูงกว่าหญ้าพื้นเมือง ที่นิยมปลูกกันในปัจจุบัน ได้แก่ หญ้าขน หญ้ารูซี่ หญ้ากินนี หญ้าเนเปียร์ หญ้าพลิแคทูลัม หญ้าแพงโกล่า หญ้าอะตราตัม หญ้าซิกแนลเลื้อย และหญ้าโร้ด เป็นต้น

ข้อมูลในปี 2549 ของกรมปศุสัตว์ ที่ดำเนินการสำรวจโดย สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด 76 จังหวัด และรวบรวมโดยกลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ รายงานว่า ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกหญ้าและพืชอาหารสัตว์ ทั้งหมด 1,873,373.66 ไร่ และมีพื้นที่ทุ่งหญ้าสาธารณะทั้งหมด 3,152,715.97 ไร่ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมปศุสัตว์, กองอาหารสัตว์, 2551)

2. หญ้าแฝก

เป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย มีลักษณะเด่น คือ มีระบบรากยาว หยั่งลึก และแพร่กระจายเป็นลักษณะตาข่ายลงไปในดินเป็นแนวดิ่ง ขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ เมล็ดจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ จึงไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้รวดเร็วเหมือนวัชพืช นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์ดินและน้ำ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมพัฒนาที่ดิน, สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน, 2546)

หญ้าแฝกที่พบในประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

(1) หญ้าแฝกหอมหรือแฝกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides* Nash)

(2) หญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* A. Camus)

ได้มีการรวบรวมหญ้าแฝกจากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศ และสำรวจคัดเลือกหญ้าแฝกตามสภาพทางนิเวศวิทยาที่พบในธรรมชาติซึ่งมีสภาพทางกายภาพของพื้นที่แตกต่างกัน เช่น ความสูงต่ำของพื้นที่ เนื้อดิน สภาพการระบายน้ำ เป็นต้น หญ้าแฝกในธรรมชาติที่มีสภาพทางกายภาพแตกต่างกันจะมีความแตกต่างในลักษณะทางกลุ่มพันธุ์ (อีโคไทป์) และการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม เพื่อคัดเลือกกลุ่มพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ในที่ดินประเภทต่าง ๆ เช่น ดินร่วน ดินทราย และดินเหนียว เป็นต้น จึงใช้ชื่อจังหวัดที่พบเป็นกลุ่มพันธุ์ ในประเทศไทยพบว่ามีทั้งหมด 28 กลุ่มพันธุ์ แบ่งเป็นหญ้าแฝกหอมหรือแฝกลุ่ม 11 กลุ่มพันธุ์ และหญ้าแฝกดอน 17 กลุ่มพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.8 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมพัฒนาที่ดิน, 2541)

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างหญ้าแฝก 28 กลุ่มพันธุ์ ในประเทศไทย

หญ้าแฝกหอม	หญ้าแฝกดอน
กำแพงเพชร 2	อุดรธานี 1
สงขลา 1	อุดรธานี 2
สงขลา 2	นครพนม 1
สงขลา 3	นครพนม 2
สุราษฎร์ธานี	ร้อยเอ็ด
ตรัง 1	ชัยภูมิ
ตรัง 2	เลย
ศรีลังกา	สระบุรี 1
เชียงใหม่	สระบุรี 2
แม่ฮ่องสอน	ห้วยขาแข้ง
	กาญจนบุรี
	นครสวรรค์
	ประจวบคีรีขันธ์
	ราชบุรี
	จันทบุรี
	พิษณุโลก
	กำแพงเพชร 1

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์ 1	(Whatman, England)
กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200	(Olympus, Japan)
ครูซิเบิลชนิด sintered glass crucible	(ROBU, Germany)
เครื่อง Gas chromatography รุ่น GC-2010A	(Shimadzu, Japan)
เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก (hotplate stirrer)	
รุ่น PC-420	(Corning, USA)
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)	
รุ่น VS-8480SFN	(Vision Sciencetific, Korea)
เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)	
รุ่น KMC-1300V	(Vision Sciencetific, Korea)
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 1000C	(Precisa, Switzerland)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285	(Mettler Toledo, USA)
เครื่องดูดสุญญากาศ (suction pump) รุ่น DOA-V502-BN	(GAST, USA)
เครื่องบดละเอียด (milling machine)	(โง้วฮวดหยู, ประเทศไทย)
เครื่องปั่น (blender)	(Moulinex, France)
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	
รุ่น Universal 32R	(Hettich, Germany)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น DR/2010	(HACH, USA)
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	(Sartorius, Germany)
เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader)	
รุ่น Zenyth 200 rt	(Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)
ชุดกรองสาร (reusable bottle-top filter)	(Nalgene, USA)
เซลลูโลสอะซิเทตเมมเบรน ขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน	(Sartorius, Germany)

ตะแกรงร่อน (test sieve) ขนาดรู 0.4 มิลลิเมตร (โง้วฮวดหยู, ประเทศไทย)

ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น Clean model: BC (แลบ เซอร์วิส, ประเทศไทย)

ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (EHRET, Germany)

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Memmert, Germany)

เตาเผาเถ้า (muffle furnace) (Fisher scientific, USA)

เตาหลุมให้ความร้อน (heating mantle) รุ่น MS-E103 (MTOPS, Korea)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SA-500K (Sturdy industrial, Taiwan)

อ่างน้ำควบคุมความเย็น (cooling bath) (ชัชรีย์โฮลดิ้ง, ประเทศไทย)

อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, Germany)

อุปกรณ์นับเชื้อจุลินทรีย์ (haemacytometer) (Brand, Germany)

อุปกรณ์รีฟลักซ์ (เอ็น เค ซัพพลาย,ประเทศไทย)

เคมีภัณฑ์

กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) (Labscan, Ireland)

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Merck, Germany)

กลาเซียลอะซิติกแอซิด (CH_3COOH) (BDH, England)

กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) (Fisher scientific, UK)

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Univar, Australia)

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Merck, Germany)

โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) (Univar, Australia)

ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Scharlau, Spain)

ซิตริกแอซิดโมโนไฮเดรต ($C_6H_8O_7.H_2O$) (Univar, Australia)

ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) (Merck, Germany)

ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) (BDH, England)

เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)

($C_{19}H_{42}BrN$) (Acros, USA)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Univar, Australia)

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Scharlau, Spain)

โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) (Merck, Germany)

โซเดียมเตตระบอเรตเดคะไฮเดรต ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)	(Univar, Australia)
โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ($Na_2S_2O_5$)	(Univar, Australia)
โซเดียมลัวริลซัลเฟต ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$)	(Carlo Erba, Italy)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Univar, Australia)
ไซแลน (birchwood xylan)	(Sigma Chemical, USA)
ไซโลส ($C_5H_{10}O_5$)	(Fluka, Switzerland)
เดคะไฮโดรแนพทาลีน ($C_{10}H_{18}$)	(Carlo Erba, Italy)
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (Na_2HPO_4)	(Carlo Erba, Italy)
3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด ($C_7H_4N_2O_7$)	(Fluka, Switzerland)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	(Scharlau, Spain)
ไตรโซเดียมซิเทรตไดไฮเดรต ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	(Univar, Australia)
เทอร์เชียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ ($(CH_3)_3COH$)	(Carlo Erba, Italy)
โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (BSA)	(Merck, Germany)
เปปโตน (peptone from casein)	(Scharlau, Spain)
พอลิเปปโตน (universal peptone)	(Merck, Germany)
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	(Merck, Germany)
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)	(Univar, Australia)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Univar, Australia)
โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$)	(Univar, Australia)
โพแทสเซียมอะซิเทต (CH_3COOK)	(Univar, Australia)
1-โพรพานอล (C_3H_7OH)	(Carlo Erba, Italy)
ฟีนอล (C_6H_5OH)	(Merck, Germany)
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	(Univar, Australia)
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	(Univar, Australia)
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4.H_2O$)	(Univar, Australia)
ยูเรีย (NH_2CONH_2)	(Univar, Australia)
วุ้นผง (agar)	(วุ้นบริสุทธิ์, ประเทศไทย)
สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)	(Carlo Erba, Italy)
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	(Hi media, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Bio Basic Inc., Canada)

ออกซาลิกแอซิดไดไฮเดรต ((COOH)$_2$.2H$_2$O) (Carlo Erba, Italy)
อะซิโตน (C_3H_6O) (Burdick & Jackson, Korea)
2-เอทอกซีเอทานอล ($C_4H_{10}O_2$) (Carlo Erba, Italy)
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (C_2H_5OH) (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol) (Merck, Germany)
เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมไดไฮเดรต
($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) (Amresco, USA)
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (Scharlau, Spain)
แอลฟา-เซลลูโลส (Sigma Chemical, USA)
ไอออนไนเตรตโนนะไฮเดรต ($Fe(NO_3)_2.9H_2O$) (Univar, Australia)
ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Fisher scientific, UK)
corn steep liquor (Sigma Chemical, USA)
potato dextrose agar (PDA) (Difco, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างหญ้าที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหญ้าสดจำนวน 18 ชนิด จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง ราชบุรี และเพชรบุรี โดยแบ่งออกเป็น หญ้าอาหารสัตว์จำนวน 8 ชนิด และหญ้าแฝกจำนวน 10 กลุ่มพันธุ์ (อีโคไทป์) แบ่งตัวอย่างหญ้าสดแต่ละชนิดไว้หาปริมาณความชื้น ส่วนที่เหลือจะนำไปปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพต่อไป

3.1.2 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ

นำหญ้าสดไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นตัดให้มีขนาดเล็กลง บดด้วยเครื่องปั่นและเครื่องบดละเอียดตามลำดับ แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มี

รูขนาด 0.4 มิลลิเมตร จนได้เป็นผงออกมาซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับส่วนที่อยู่บนตะแกรงร่อนจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของชีวมวลพืช

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

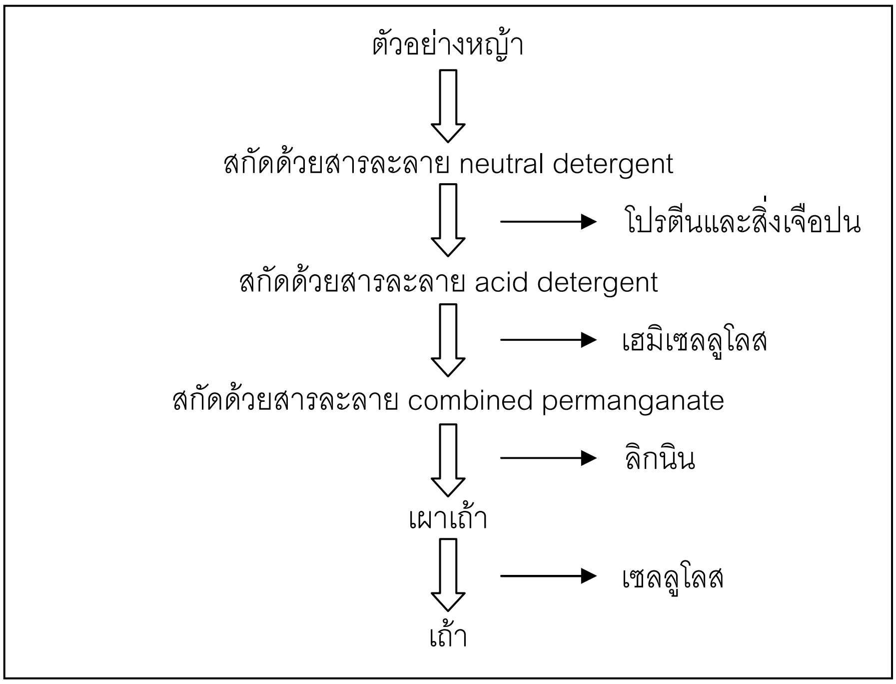
หาปริมาณความชื้นตามวิธี TAPPI T 210 cm-86 (Technical Association of Pulp and Paper Industry [TAPPI], 1986) โดยนำถาดหุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักถาดไว้ ใส่หญ้าสดหนักประมาณ 2 กรัม ลงไปในถาดที่อบและชั่งน้ำหนักแล้ว โดยบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของหญ้าสดเอาไว้ นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ในเย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของหญ้าหลังอบแห้ง แล้วคำนวณปริมาณความชื้นดังสมการ ซึ่งหญ้าแต่ละชนิดจะวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{น้ำหนักหญ้าก่อนอบแห้ง} - \text{น้ำหนักหญ้าหลังอบแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักหญ้าก่อนอบแห้ง}}$$

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

นำหญ้าที่บดและร่อนเอาส่วนละเอียดออกไปแล้วมาหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) ดังแสดงในภาคผนวก จ วิเคราะห์หาค่าต่างๆ คือ ปริมาณ neutral detergent fiber (NDF) ปริมาณ acid detergent fiber (ADF) ปริมาณ permanganate lignin (PML) และปริมาณเถ้า เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของชีวมวลพืช โดยหญ้าแต่ละชนิดจะวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

นำปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของหญ้าแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี เมื่อคิดในกรณีที่สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลสได้อย่างสมบูรณ์ และน้ำตาลที่ได้สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ทั้งหมด โดยมีวิธีคำนวณดังนี้

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (เปอร์เซ็นต์) = ปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) × 1.111

ปริมาณน้ำตาลไซโลส (เปอร์เซ็นต์) = ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) × 1.136

กำหนดให้ A คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสรวมกับไซโลส (เปอร์เซ็นต์)

B คือ ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (กิโลกรัม/กิโลกรัม)

C คือ ผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) (ภาคผนวก ข)

$$B = \frac{A}{100} \times 0.511$$

$$\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี)} = \frac{B \times C}{0.789}$$

เมื่อ ความหนาแน่นของเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.789 กรัม/มิลลิลิตร

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลส คำนวณมาจากสมการดังต่อไปนี้

n $C_6H_{10}O_5$	+ n H_2O	$\longrightarrow$	n $C_6H_{12}O_6$
เซลลูโลส			กลูโคส
162 กรัม	18 กรัม		180 กรัม
1 กรัม	0.111 กรัม		1.111 กรัม
n $C_5H_8O_4$	+ n H_2O	$\longrightarrow$	n $C_5H_{10}O_5$
ไซแลน			ไซโลส
132 กรัม	18 กรัม		150 กรัม
1 กรัม	0.136 กรัม		1.136 กรัม

เนื่องจากไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักที่มีมากที่สุดในเฮมิเซลลูโลส จึงใช้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสแทนไซแลนในการคำนวณหาปริมาณน้ำตาลไซโลสโดยประมาณ

ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีของน้ำตาลกลูโคสและไซโลส คำนวณมาจากสมการดังต่อไปนี้

$C_6H_{12}O_6$	$\longrightarrow$	2 C_2H_5OH	+ 2 CO_2
3 $C_5H_{10}O_5$	$\longrightarrow$	5 C_2H_5OH	+ 5 CO_2
น้ำตาล		เอทานอล	คาร์บอนไดออกไซด์
1 กรัม		0.511 กรัม	0.489 กรัม

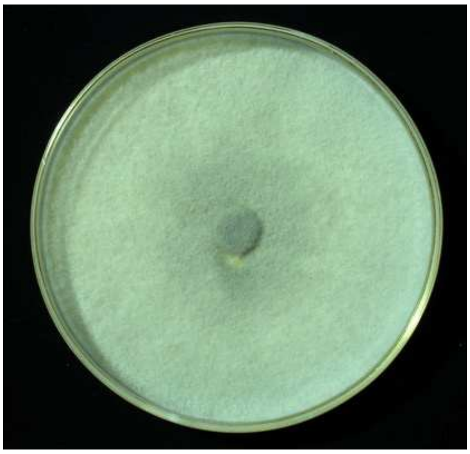
3.4 การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส

3.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ เชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 (*T. reesei* QM 9414) ซื้อมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4.1.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เจาะปลายเส้นใยของเชื้อรา 1 ชิ้น โดยใช้แท่งเจาะ (cork borer) เบอร์ 10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำปลายเส้นใยไปวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารกึ่งแข็งสูตร PDA (ภาคผนวก ค) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน จะมีลักษณะดังภาพที่ 3.2 แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้



ภาพที่ 3.2 ลักษณะของเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 อายุ 8 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA

3.4.1.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเจาะปลายเส้นใยของเชื้อรา 1 ชิ้น นำไปเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารกึ่งแข็งสูตร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นเจาะปลายเส้นใยจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงไปในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์แต่ละชนิด

3.4.2 การผลิตเซลลูเลสและการวัดแอกทิวิตี

นำปลายเส้นใยจำนวน 5 ชิ้นที่ได้ในข้อ 3.4.1.2 ใส่ลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเซลลูเลส (ดัดแปลงมาจากสูตรของ Mandels และ Weber, 1969) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟา-เซลลูโลส นำเชื้อไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 7 วัน แล้วกรองแยกเส้นใยออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของเซลลูเลสโดยวัดแอกทิวิตีด้วย FPU assay ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Ghose (1987) ที่มีสารตั้งต้นเป็นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1 × 6 เซนติเมตร ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์หรือยูนิต มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน

3.4.3 การผลิตไซแลเนสและการวัดแอกทิวิตี

นำปลายเส้นใยจำนวน 5 ชิ้นที่ได้ในข้อ 3.4.1.2 ใส่ลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไซแลเนส (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลน นำเชื้อไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน กรองแยกเส้นใยออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของ ไซแลเนสโดยวัด แอกทิวิตีด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ghose (1987) โดยมีสารตั้งต้นเป็นสารละลายไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์หรือยูนิต มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน

3.4.4 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี micro Lowry’s assay (Held และ Hurley, 2001) โดยเติมสารละลายไบยูเรต (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท แล้วเติมสารตัวอย่างที่เป็น crude enzyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน สำหรับแบลงค์จะใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อ

ครบเวลาเติมสารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมของไมโครเพลท ผสมสารให้เข้ากัน บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (BSA) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 - 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาคผนวก ช แล้วคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ดังสมการ

$$\text{แอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์} = \frac{\text{แอกทิวิตีของเอนไซม์ (ยูนิต)}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)}}$$

3.5 การศึกษาการย่อยสลายหญ้าชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์เพื่อคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมไปใช้ในกระบวนการหมัก

3.5.1 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมี

นำหญ้าชนิดต่างๆ ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพในข้อ 3.1.2 จนได้เป็นผงมาปริมาณ 0.6 กรัม ใส่ลงไปในฟลาสก์ขนาด 200 มิลลิลิตร และใช้แอลฟา-เซลลูโลสผสมกับไซแลนอย่างละ 0.3 กรัม เป็นตัวเปรียบเทียบ ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้วิธี alkaline peroxide pretreatment (Saha และ Cotta, 2007) โดยเติมอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ pH 11.5 ลงไปในฟลาสก์ การเตรียมเติมอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์สำหรับเติมใน 1 ฟลาสก์จะใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ภาคผนวก ง) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร (15 เปอร์เซ็นต์โดยมวลของพืชที่ใช้/ปริมาตรของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์) แล้วปรับ pH ให้เป็น 11.5 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ภาคผนวก ง) จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปรับ pH เป็น 4.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นก่อนนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต่อไป

3.5.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

เติมเซลลูเลสจำนวน 36 ยูนิต (คิดเป็น 60 ยูนิต/กรัมของวัตถุดิบ) ไซแลเนสจำนวน 720 ยูนิต (คิดเป็น 1200 ยูนิต/กรัมของวัตถุดิบ) (ดัดแปลงมาจาก Saha และ Cotta, 2007) และสารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปในฟลาสก์ที่มีหญ้าและฟลาสก์ที่เป็นชุดควบคุมซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีในข้อ 3.5.1 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เก็บตัวอย่างในข้อ 3.5.2 มาวิเคราะห์ โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดโดยใช้วิธี DNS method (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959) นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท เติมสารละลาย DNS reagent ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับแบลงค์ คือ ใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง จากนั้นปิดฝาไมโครเพลทแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการเจือจางสารในไมโครเพลทดังกล่าวก่อนที่จะนำไปวัด โดยดูดสารนั้นขึ้นมา 50 ไมโครลิตร นำไปใส่ไมโครเพลทอีกอัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 - 2.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาคผนวก ช และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาล (percent conversion) ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาล} = \frac{E}{D} \times 100$$

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (กิโลกรัม/ไร่/ปี)} = \frac{E \times C}{1000}$$

คัดเลือกหญ้าที่มีความสามารถในการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ดีมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SSCF ต่อไป โดยดูจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ดังสมการ

กำหนดให้ D คือ ปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลาย (มิลลิกรัม/กรัมของหญ้าแห้ง)

E คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (มิลลิกรัม/กรัมของหญ้าแห้ง)

C คือ ผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) (ภาคผนวก ข)

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

นำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าแต่ละชนิดมาคำนวณหาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี)} = \frac{F \times 0.511}{0.789}$$

กำหนดให้ F คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (กิโลกรัม/ไร่/ปี)

3.6 การผลิตเอทานอล

3.6.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยมียีสต์ 2 ชนิด คือ

(1) *S. cerevisiae* TISTR 5339 ซื้อมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

(2) *P. stipitis* CBS 5773 ได้รับมาจาก Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ประเทศเนเธอร์แลนด์

3.6.1.1 **การเก็บรักษาเชื้อ**

ถ่ายเชื้อโดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อมาลากลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สูตร YMA (Laplace และคณะ, 1993) ดังแสดงในภาคผนวก ค นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุก 3 เดือน

3.6.1.2 **การเตรียมหัวเชื้อ** (inoculum) **สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ** (starter culture)

นำเชื้อจากอาหารแข็งเอียงมาลากลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร (ภาคผนวก ง) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4

3.6.2 การศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

3.6.2.1 **การศึกษาการเจริญเติบโตของ** *S. cerevisiae*

ถ่ายหัวเชื้อ *S. cerevisiae* จากข้อ 3.6.1.2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส (Laplace และคณะ, 1993) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเชื้อไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 9, 12, 18, 24, 30, 36 และ 48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์ในแต่ละชั่วโมงด้วย haemacytometer (ภาคผนวก ซ) แล้วนำจำนวนเซลล์ที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา เลือกอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) ดังสมการ

$$\text{อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

เมื่อ X_t คือ จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เวลา t ใดๆ (เซลล์/มิลลิลิตร)

X_0 คือ จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เวลาเริ่มต้น (เซลล์/มิลลิลิตร)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

3.6.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *P. stipitis*

ถ่ายหัวเชื้อ *P. stipitis* จากข้อ 3.6.1.2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส (Laplace และคณะ, 1993) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเชื้อไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 68 และ 92 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์ในแต่ละชั่วโมงด้วย haemacytometer แล้วนำจำนวนเซลล์ที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา เลือกอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากอัตราการเจริญจำเพาะ ดังสมการในข้อ 3.6.2.1

3.6.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีก่อนใช้ในกระบวนการ SSCF

นำหญ้าที่บดเป็นผงแล้วมา 1.2 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และใช้แอลฟา-เซลลูโลสผสมกับไซแลนอย่างละ 0.6 กรัม เป็นตัวเปรียบเทียบ ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีตามข้อ 3.5.1 แต่ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นก่อนนำไปใช้ในการหมักต่อไป

3.6.4 การเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์

เติมสารอาหารลงไปในแต่ละฟลาสก์ที่ได้จากข้อ 3.6.3 ซึ่งประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.45 กรัม สารสกัดจากมอลต์ปริมาณ 0.45 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.75 กรัม โดยละลายในสารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.0 (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.6.5 การเตรียมเอนไซม์

ผลิตเซลลูเลสและไซแลเนสตามวิธีในข้อ 3.4.2 และ 3.4.3 ตามลำดับ นำ crude enzyme แต่ละชนิดที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสารเพื่อให้ปลอดเชื้อ โดยใช้เซลลูโลสอะซิเทต เมมเบรน ที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน เป็นตัวกรอง

3.6.6 การผลิตเอทานอลจากหญ้าชนิดต่างๆ ด้วยกระบวนการ SSCF

3.6.6.1 การเลี้ยงกล้าเชื้อ

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* โดยเลี้ยงเชื้อตามอายุที่เหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 3.6.2 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อชนิดละ 7.5 มิลลิลิตร (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ลงในฟลาสก์ที่ได้จากข้อ 3.6.4

3.6.6.2 การเติมเอนไซม์

เติมเซลลูเลสและไซแลเนสที่ผ่านการกรองแล้วปริมาณ 72 และ 1440 ยูนิต ตามลำดับ ลงไปในแต่ละฟลาสก์ แล้วปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 150 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปิดปากฟลาสก์ด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์แล้วรัดยางเพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้า จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

3.6.7 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาล

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* โดยเลี้ยงเชื้อตามอายุที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3.6.2 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อชนิดละ 7.5 มิลลิลิตร (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร YMB ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลดังต่อไปนี้

(1) น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 3 กรัม + *S. cerevisiae*

(2) น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 3 กรัม + *P. stipitis*

(3) น้ำตาลไซโลสปริมาณ 3 กรัม + *S. cerevisiae*

(4) น้ำตาลไซโลสปริมาณ 3 กรัม + *P. stipitis*

(5) น้ำตาลกลูโคสผสมกับน้ำตาลไซโลสอย่างละ 3 กรัม + เชื้อทั้ง 2 ชนิด

โดยที่ปริมาตรรวมของเชื้อและอาหารแต่ละชนิดเป็น 150 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์ด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์แล้วรัดยางเพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้า นำเชื้อไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

3.6.8 การวิเคราะห์เอทานอลที่ผลิตได้จากการหมัก

เก็บตัวอย่างที่ได้จากการหมักในข้อ 3.6.6 และ 3.6.7 มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสปริมาตร 420 ไมโครลิตร มาเติม internal standard ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นสารละลาย 1-โพรพานอล ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ง) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC โดยใช้คอลัมน์ชนิด DB-WAX และมี detector แบบ flame ionization detector (FID) ฉีดตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ลงในเครื่อง GC นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (เอทานอล/1-โพรพานอล) กับความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร) ดังแสดงในภาคผนวก ช และคำนวณหาปริมาณเอทานอลโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้จริงเมื่อเทียบกับค่าของเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (จากการคำนวณในข้อ 3.3.2) ดังสมการ

กำหนดให้ G คือ ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จริง (กิโลกรัม/กิโลกรัม)

C คือ ผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) (ภาคผนวก ข)

$$\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จริง (ลิตร/ไร่/ปี)} = \frac{G \times C}{0.789}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จริง} \times 100}{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี}}$$

เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลของหญ้าที่ได้จากการหมักกับปริมาณเอทานอลของหญ้าที่ได้ทางทฤษฎีซึ่งได้มาจากการคำนวณ 2 วิธี คือ

(1) จากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในหญ้าแต่ละชนิด (ดูในข้อ 3.3.2)

(2) จากการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (ดูในข้อ 3.5.4)

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองซึ่งแต่ละการทดลองจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 15.0

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ตัวอย่างหญ้าที่ใช้ในงานวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างหญ้าจากแหล่งต่างๆ สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่า มีจำนวนทั้งหมด 18 ชนิด โดยแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ หญ้าอาหารสัตว์จำนวน 8 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และหญ้าแฝกจำนวน 10 กลุ่มพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ส่วนรูปและรายละเอียดของหญ้าแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ก

ตารางที่ 4.1 หญ้าอาหารสัตว์จำนวน 8 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่เก็บ	ส่วนของพืชที่นำมาใช้
เนเปียร์	*Pennisetum purpureum*	จังหวัดลำปาง[1]	ใบ
เนเปียร์แคระ	*P. purpureum* cv. Mott	จังหวัดลำปาง[1]	ใบ
เนเปียร์ยักษ์	*P. Purpureum* cv. King Grass	จังหวัดเพชรบุรี[2]	ใบ
บาน่า	*P. Purpureum* x *P. Americanum*	จังหวัดลำปาง[1]	ใบ
กินนีสีม่วง	*Panicum maximum* TD 58	จังหวัดเพชรบุรี[2]	ใบและลำต้น
รูซี่	*Brachiaria ruziziensis*	จังหวัดเชียงใหม่[3]	ใบและลำต้น
แพงโกล่า	*Digitaria decumbens*	จังหวัดเพชรบุรี[2]	ใบและลำต้น
อะตราตัม	*Paspalum atratum*	จังหวัดลำปาง[1]	ใบและลำต้น

[1]ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ลำปาง

[2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบุรี

[3]ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

ตารางที่ 4.2 หญ้าแฝกจำนวน 10 กลุ่มพันธุ์ (อีโคไทป์) ที่ใช้ในงานวิจัย

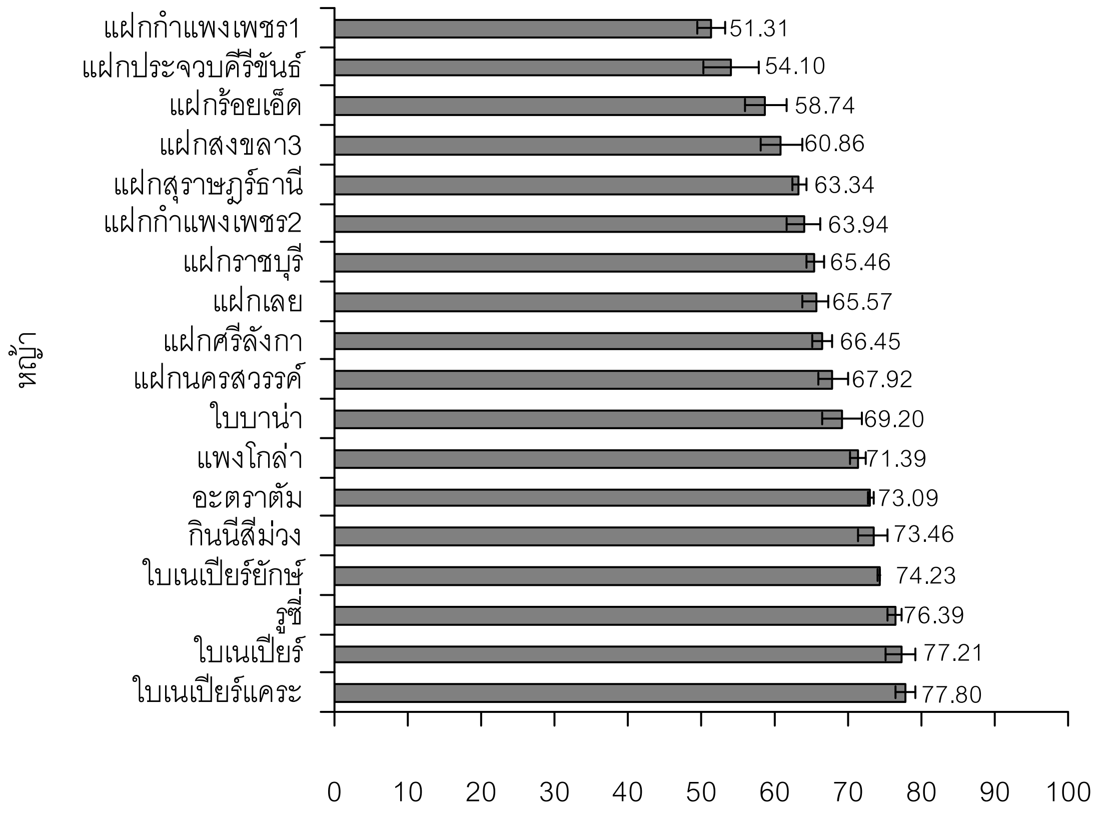
ประเภทของหญ้าแฝก	กลุ่มพันธุ์ (อีโคไทป์)
แฝกลุ่ม, แฝกหอม	กำแพงเพชร 2
(*Vetiveria zizanioides* Nash)	สงขลา 3
	สุราษฎร์ธานี
	ศรีลังกา
แฝกดอน	ร้อยเอ็ด
(*Vetiveria nemoralis* A. Camus)	เลย
	นครสวรรค์
	ประจวบคีรีขันธ์
	ราชบุรี
	กำแพงเพชร 1

หมายเหตุ : หญ้าแฝกทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ เก็บมาจากสถานีพัฒนาที่ดินราชบุรี

ผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าอาหารสัตว์และหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ต่างๆ ได้ข้อมูลมาจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมปศุสัตว์ (2549) และ วารุณี พานิชผล และคณะ (2537) ตามลำดับ โดยแสดงในภาคผนวก ข พบว่า หญ้าแพงโกล่ามีผลผลิตน้ำหนักแห้งสูงที่สุด คือ 6,000 กิโลกรัม/ไร่/ปี รองลงมาเป็นหญ้าเนเปียร์ หญ้าเนเปียร์แคระ หญ้าเนเปียร์ยักษ์ และหญ้าบาน่า ซึ่งมีผลผลิตเท่ากัน คือ 3,500 กิโลกรัม/ไร่/ปี ซึ่งเป็นผลผลิตของลำต้นและใบรวมกัน แต่ในการทดลองได้ใช้เฉพาะส่วนของใบเท่านั้น ดังนั้นผลผลิตในส่วนของใบจะมีค่าเป็น 1,225 กิโลกรัม/ไร่/ปี สำหรับใบหญ้าเนเปียร์ ใบหญ้าเนเปียร์ยักษ์ และใบหญ้าบาน่า (มีน้ำหนักใบเป็น 35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งทั้งหมดโดยประมาณ) และมีค่าเป็น 2,800 กิโลกรัม/ไร่/ปี สำหรับใบหญ้าเนเปียร์แคระ (มีน้ำหนักใบเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งทั้งหมดโดยประมาณ) หญ้าในกลุ่มแฝกจะมีผลผลิตน้อยกว่าหญ้าอาหารสัตว์มาก โดยหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์มีผลผลิตสูงที่สุด คือ 1,352 กิโลกรัม/ไร่/ปี ส่วนหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ร้อยเอ็ดมีผลผลิตต่ำที่สุด คือ 566 กิโลกรัม/ไร่/ปี

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

จากการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของหญ้าทั้ง 18 ชนิด พบว่า หญ้าอาหารสัตว์ทั้ง 8 ชนิด มีปริมาณความชื้นสูงกว่าหญ้าแฝกทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ โดยปริมาณความชื้นของใบหญ้าเนเปียร์แคระและใบหญ้าเนเปียร์มีค่าสูงที่สุดเป็น 77.80 ± 1.36 และ 77.21 ± 2.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์กำแพงเพชร 1 มีปริมาณความชื้นน้อยที่สุดเป็น 51.31 ± 1.89 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.1



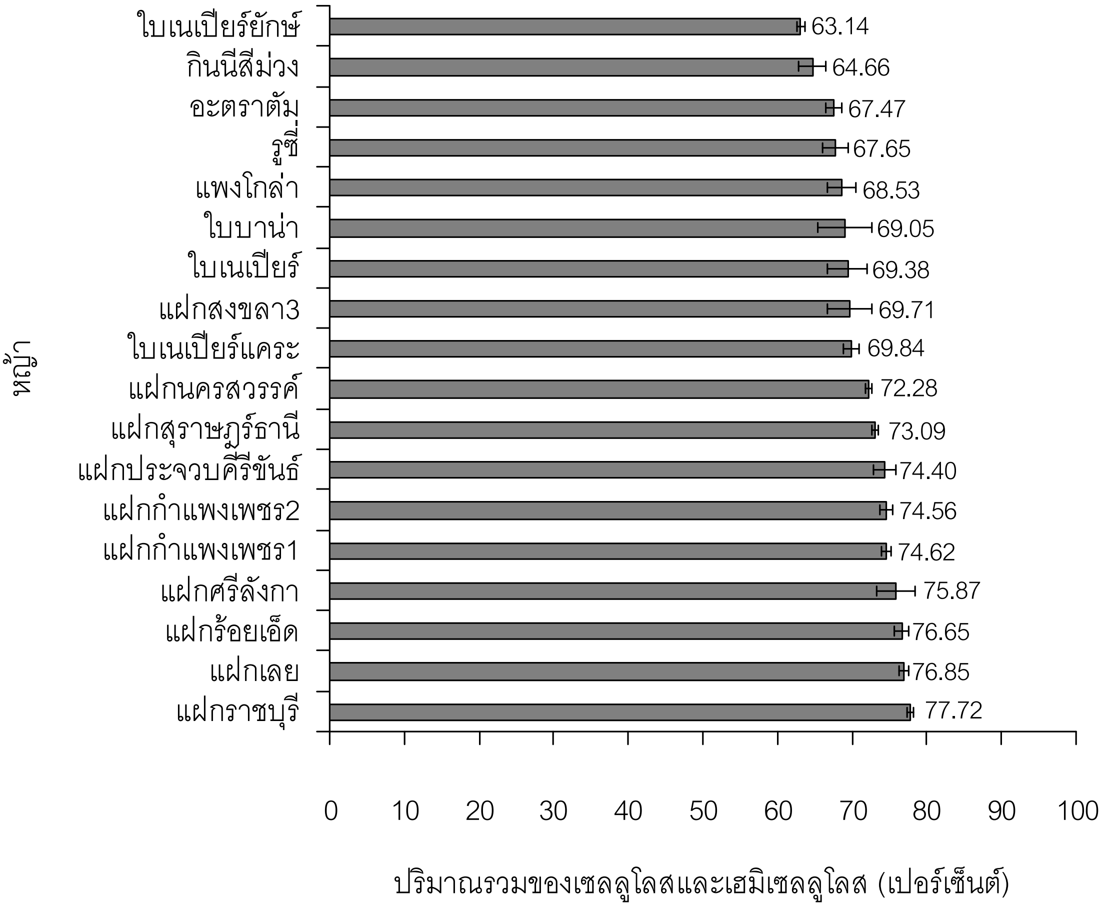
ภาพที่ 4.1 ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ของหญ้าทั้ง 18 ชนิด

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน ส่วนที่เหลือจะเป็นปริมาณของเถ้าและสารอื่นๆ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ พบว่า หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรีมีปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุดเป็น 38.51 ± 0.35 เปอร์เซ็นต์ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา 3 มีปริมาณเซลลูโลสต่ำที่สุดเป็น 31.85 ± 1.83 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณเฮมิเซลลูโลส พบว่า หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ร้อยเอ็ดและกลุ่มพันธุ์เลยมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงที่สุดเป็น 42.61 ± 1.17 และ 42.43 ± 1.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใบหญ้าเนเปียร์ยักษ์และหญ้ากินนีสีม่วงมีปริมาณของเฮมิเซลลูโลสต่ำที่สุดเป็น 31.13 ± 0.57 และ 31.26 ± 1.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมารวมกัน (ภาพที่ 4.2) พบว่า หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรีมีปริมาณรวมสูงที่สุดเป็น 77.72 ± 0.45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบหญ้าเนเปียร์ยักษ์มีปริมาณรวมต่ำที่สุดเป็น 63.14 ± 0.49 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณลิกนิน พบว่า หญ้าอะตราตัมมีปริมาณสูงที่สุดเป็น 5.64 ± 0.22 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบหญ้าเนเปียร์ยักษ์มีปริมาณต่ำที่สุดเป็น 3.10 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์

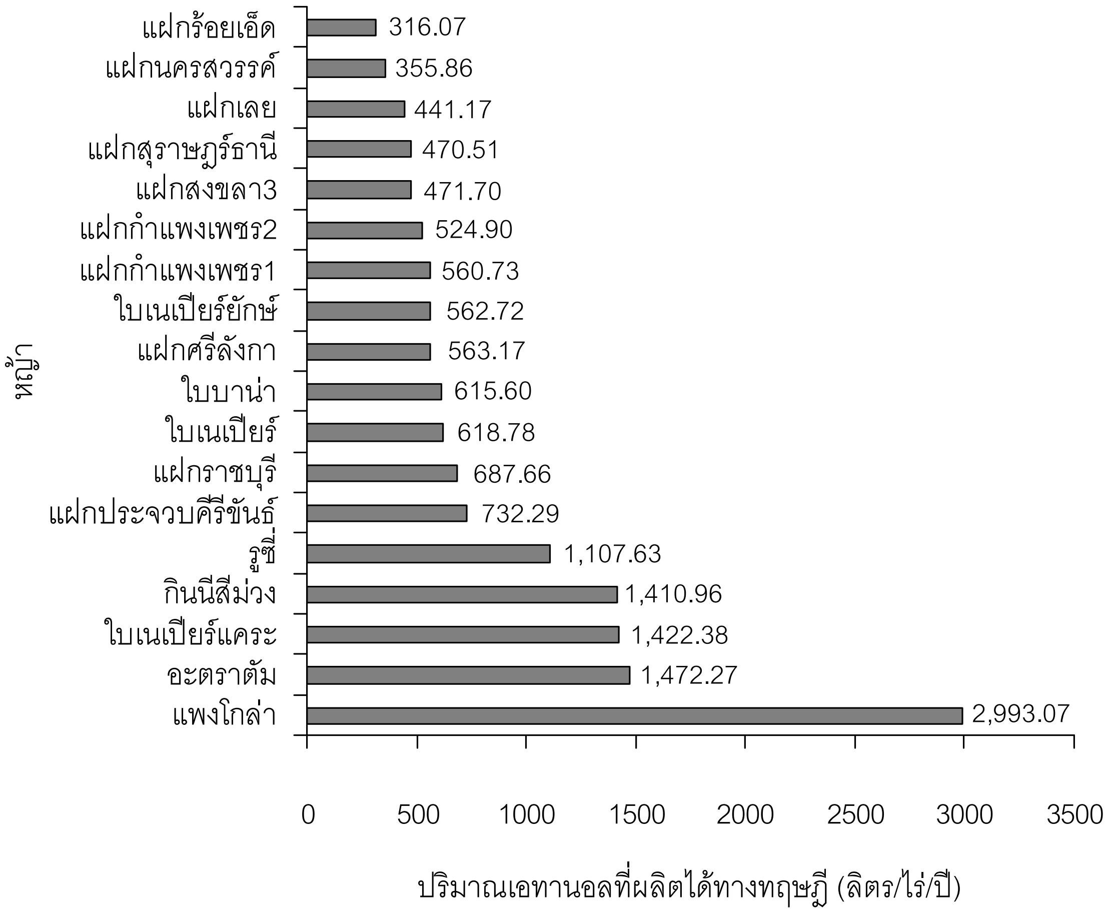
ตารางที่ 4.3 ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลในหญ้าแต่ละชนิด

หญ้า	ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวล (เปอร์เซ็นต์)				
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	อื่นๆ
ใบเนเปียร์	32.92 ± 1.48	36.46 ± 1.19	3.60 ± 0.67	0.33 ± 0.14	26.69 ± 3.04
ใบเนเปียร์แคระ	35.64 ± 0.21	34.19 ± 1.24	3.66 ± 0.20	0.13 ± 0.12	26.38 ± 1.38
ใบเนเปียร์ยักษ์	32.01 ± 0.14	31.13 ± 0.57	3.10 ± 0.04	1.65 ± 0.04	32.11 ± 0.53
ใบบาน่า	33.93 ± 2.27	35.12 ± 1.62	3.55 ± 0.34	0.18 ± 0.01	27.21 ± 3.71
กินนีสีม่วง	33.40 ± 0.74	31.26 ± 1.91	4.00 ± 0.54	0.61 ± 0.08	30.73 ± 2.10
รูซี่	33.64 ± 0.92	34.01 ± 0.81	4.56 ± 0.17	0.27 ± 0.12	27.52 ± 1.67
แพงโกล่า	33.07 ± 0.70	35.46 ± 1.27	4.47 ± 0.61	0.28 ± 0.01	26.72 ± 1.60
อะตราตัม	34.87 ± 0.61	32.60 ± 0.53	5.64 ± 0.22	0.31 ± 0.14	27.75 ± 0.97
แฝกกำแพงเพชร2	35.54 ± 0.38	39.02 ± 0.89	4.36 ± 0.78	0.07 ± 0.04	19.72 ± 0.61
แฝกสงขลา3	31.85 ± 1.73	37.87 ± 1.59	4.67 ± 0.49	0.26 ± 0.16	25.67 ± 2.69
แฝกสุราษฎร์ธานี	33.97 ± 1.16	39.12 ± 1.57	3.67 ± 0.70	0.09 ± 0.03	22.16 ± 0.74
แฝกศรีลังกา	37.54 ± 0.45	38.33 ± 2.07	3.99 ± 0.31	0.08 ± 0.01	20.38 ± 2.81
แฝกร้อยเอ็ด	34.04 ± 0.27	42.61 ± 1.17	4.83 ± 0.24	0.04 ± 0.04	19.32 ± 0.88
แฝกเลย	34.42 ± 0.99	42.43 ± 1.32	5.09 ± 0.56	0.08 ± 0.07	18.23 ± 0.98
แฝกนครสวรรค์	32.67 ± 1.31	39.60 ± 1.25	4.96 ± 1.18	0.06 ± 0.04	22.57 ± 0.94
แฝกประจวบคีรีขันธ์	35.53 ± 1.52	38.87 ± 0.09	4.65 ± 1.52	0.19 ± 0.11	20.44 ± 2.26
แฝกราชบุรี	38.51 ± 0.25	39.21 ± 0.70	4.79 ± 0.48	0.05 ± 0.01	17.58 ± 0.87
แฝกกำแพงเพชร1	34.95 ± 0.58	39.67 ± 0.18	5.06 ± 0.70	0.12 ± 0.10	20.47 ± 1.39



ภาพที่ 4.2 ปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) ของหญ้าทั้ง 18 ชนิด

จากการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในหญ้าแต่ละชนิด พบว่า หญ้าแพงโกล่ามีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีสูงที่สุดเป็น 2,993.07 ลิตร/ไร่/ปี รองลงมาเป็นหญ้าอะตราตัม ใบหญ้าเนเปียร์แคระ และหญ้ากินนีสีม่วง ซึ่งมีค่าเป็น 1,472.07 1,422.38 และ 1,410.96 ลิตร/ไร่/ปี ตามลำดับ ส่วนหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ร้อยเอ็ดมีค่าต่ำที่สุดเป็น 316.07 ลิตร/ไร่/ปี (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี) เมื่อคำนวณจากปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสของหญ้าทั้ง 18 ชนิด

4.4 การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส

เมื่อนำเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 มาผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟา-เซลลูโลส และไซแลเนสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลน แล้ววัดค่าแอกทิวิตี พบว่า เซลลูเลสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 0.948 ± 0.05 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 1.09 ± 0.09 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไซแลเนสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 92.13 ± 6.86 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 65.32 ± 1.59 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 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	0.948 ± 0.05	0.88 ± 0.10	1.09 ± 0.09
ไซแลเนส	92.13 ± 6.86	1.41 ± 0.11	65.32 ± 1.59

หมายเหตุ : ค่าที่ได้มาจากการเฉลี่ย 3 ซ้ำ และกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์หรือยูนิตของเซลลูเลส มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายกระดาษกรองให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ และ 1 หน่วยเอนไซม์หรือยูนิตของไซแลเนส มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ให้เป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

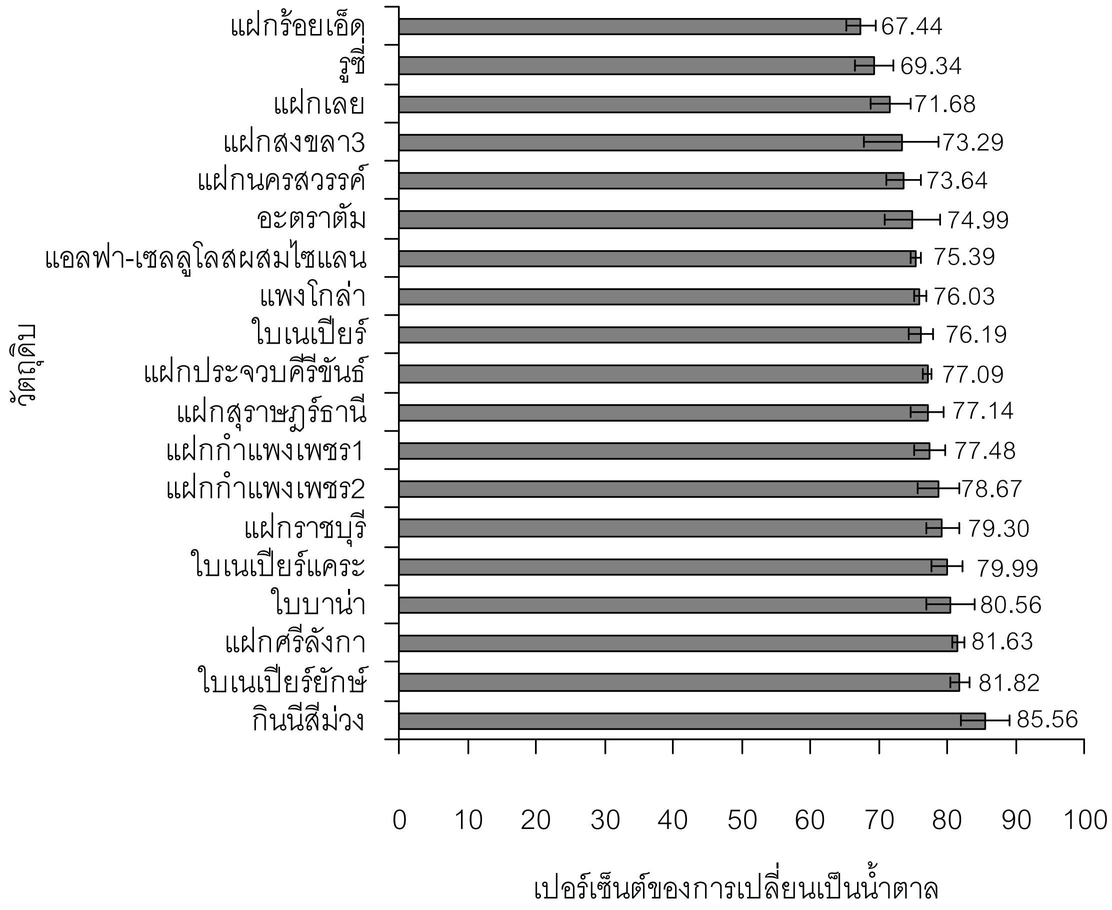
4.5 การศึกษาการย่อยสลายหญ้าชนิดต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์เพื่อคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมไปใช้ในกระบวนการหมัก

จากการย่อยสลายหญ้าจำนวน 18 ชนิด โดยใช้วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้อัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายของหญ้าแต่ละชนิดมีค่าดังแสดงในตารางที่ 4.5 โดยหญ้าส่วนใหญ่จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 500 - 600 มิลลิกรัม/กรัมของวัตถุดิบ ซึ่งเป็นความเข้มข้นประมาณ 4 - 5 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอลฟา-เซลลูโลสผสมกับไซแลน พบว่า หลังการย่อยสลายมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่าหญ้าทั้ง 18 ชนิด เป็น 753.94 ± 6.89 มิลลิกรัม/กรัมของวัตถุดิบ และ 8.76 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในหญ้าทั้ง 18 ชนิดที่มีก่อนการย่อยสลาย เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้น หลังการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้อัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนส

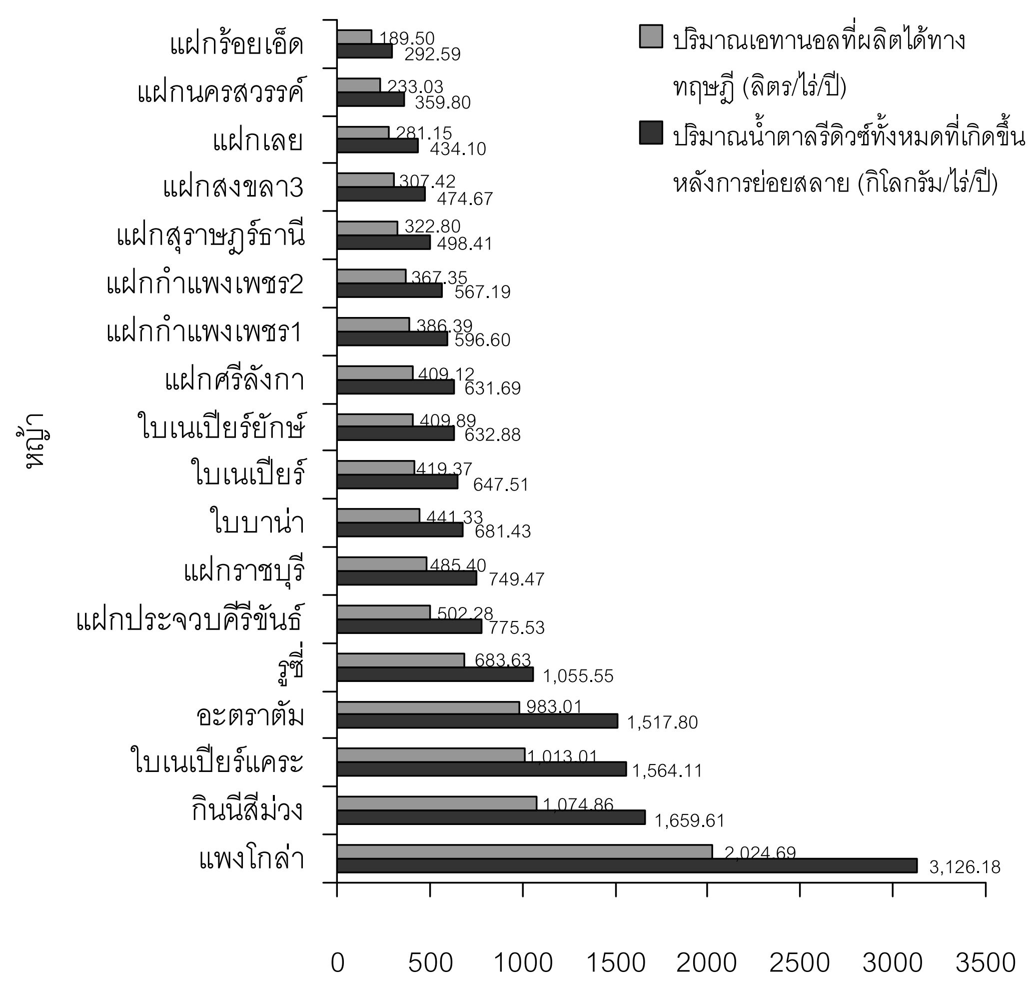
วัตถุดิบ	ปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลาย (มิลลิกรัม/กรัมของวัตถุดิบ)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย	
		มิลลิกรัม/กรัมของวัตถุดิบ	กรัม/ลิตร
ใบเนเปียร์	693.76 ± 26.67	528.58 ± 11.76	4.14 ± 0.34
ใบเนเปียร์แคระ	698.37 ± 10.78	558.61 ± 15.58	4.13 ± 0.34
ใบเนเปียร์ยักษ์	631.40 ± 4.91	516.63 ± 8.82	4.04 ± 0.32
ใบบาน่า	690.54 ± 36.65	556.27 ± 24.94	4.36 ± 0.46
กินนีสีม่วง	646.60 ± 17.78	553.20 ± 22.22	4.34 ± 0.54
รูซี่	676.53 ± 17.24	469.13 ± 19.09	3.97 ± 0.61
แพงโกล่า	685.30 ± 19.62	521.03 ± 5.78	4.09 ± 0.39
อะตราตัม	674.70 ± 11.09	505.93 ± 27.58	4.01 ± 0.53
แฝกกำแพงเพชร 2	745.60 ± 7.74	586.55 ± 22.59	4.60 ± 0.56
แฝกสงขลา 3	697.13 ± 29.98	510.94 ± 37.41	3.98 ± 0.20
แฝกสุราษฎร์ธานี	730.90 ± 4.13	563.81 ± 18.02	4.42 ± 0.50
แฝกศรีลังกา	758.70 ± 25.11	619.31 ± 6.38	4.85 ± 0.42
แฝกร้อยเอ็ด	766.50 ± 9.15	516.95 ± 16.35	3.81 ± 0.33
แฝกเลย	768.53 ± 6.05	550.89 ± 22.62	4.31 ± 0.27
แฝกนครสวรรค์	722.70 ± 4.20	532.25 ± 17.80	4.37 ± 0.58
แฝกประจวบคีรีขันธ์	744.05 ± 14.42	573.62 ± 4.92	4.31 ± 0.19
แฝกราชบุรี	777.20 ± 4.50	616.34 ± 18.36	4.54 ± 0.25
แฝกกำแพงเพชร 1	746.17 ± 7.01	578.10 ± 16.80	4.52 ± 0.28
แอลฟา-เซลลูโลสผสมไซแลน	1,000.00 ± 0.00	753.94 ± 6.89	8.76 ± 0.06

เมื่อนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายไปเปรียบเทียบกับปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลายแล้วคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (ภาพที่ 4.4) พบว่า หญ้าส่วนใหญ่จะสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 70 - 80 เปอร์เซ็นต์ โดยหญ้ากินนีสีม่วงมีค่าสูงที่สุดเป็น 85.56 ± 3.44 เปอร์เซ็นต์ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ร้อยเอ็ดมีค่าต่ำที่สุดเป็น 67.44 ± 2.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแอลฟา-เซลลูโลสผสมกับไซแลนมีค่าเป็น 75.39 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลในหญ้า 18 ชนิด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนส

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าหญ้าแต่ละชนิดมีเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลค่อนข้างใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นในการพิจารณาเพื่อเลือกชนิดของหญ้าเพื่อนำไปหมักต่อไปจะนำผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าทั้ง 18 ชนิด (ภาคผนวก ข) มาคำนวณร่วมด้วย ผลการคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (กิโลกรัม/ไร่/ปี) และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี) เมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แสดงในภาพที่ 4.5 โดยหญ้าแพงโกล่ามีค่าสูงที่สุด ดังนั้นจึงได้เลือกหญ้าจำนวน 11 ชนิด ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดเกิน 630 กิโลกรัม/ไร่/ปี หรือมีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเกิน 408 ลิตร/ไร่/ปี เรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ หญ้าแพงโกล่า หญ้ากินนีสีม่วง ใบหญ้าเนเปียร์แคระ หญ้าอะตราตัม หญ้ารูซี่ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรี ใบหญ้าบาน่า ใบหญ้าเนเปียร์ ใบหญ้าเนเปียร์ยักษ์ และหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกา ตามลำดับ ไปทำการศึกษาในขั้นตอนการหมักต่อไป

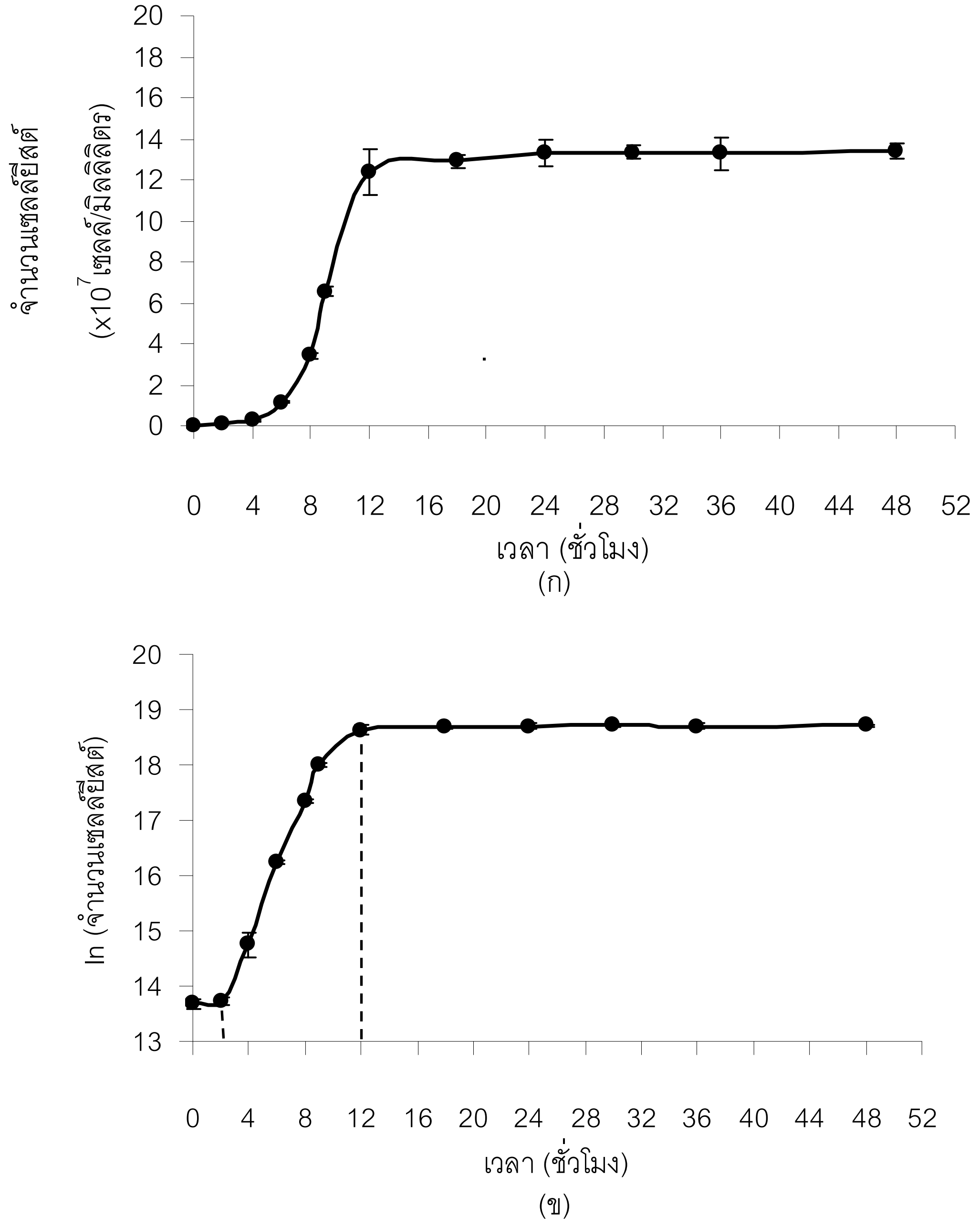


ภาพที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (กิโลกรัม/ไร่/ปี) และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี) เมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในหญ้า 18 ชนิด

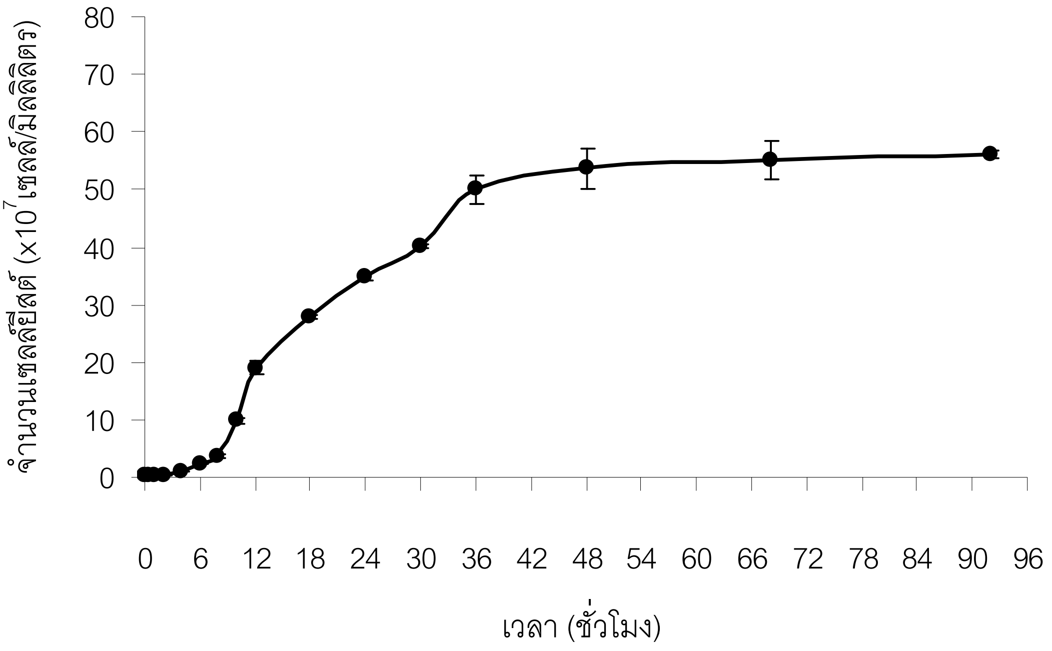
4.6 การผลิตเอทานอล

จากการศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล พบว่าเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดังภาพที่ 4.6 (ก) โดยมีระยะแล็กที่เวลา 0 - 2 ชั่วโมง ระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่เวลา 2 - 12 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะสเตชันนารีที่เวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป (ภาพที่ 4.6 (ข)) เมื่อคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (ตารางที่ 4.6) พบว่า ที่เวลา 9 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด เป็น 0.48 ต่อชั่วโมง ส่วน *P. stipitis* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญ

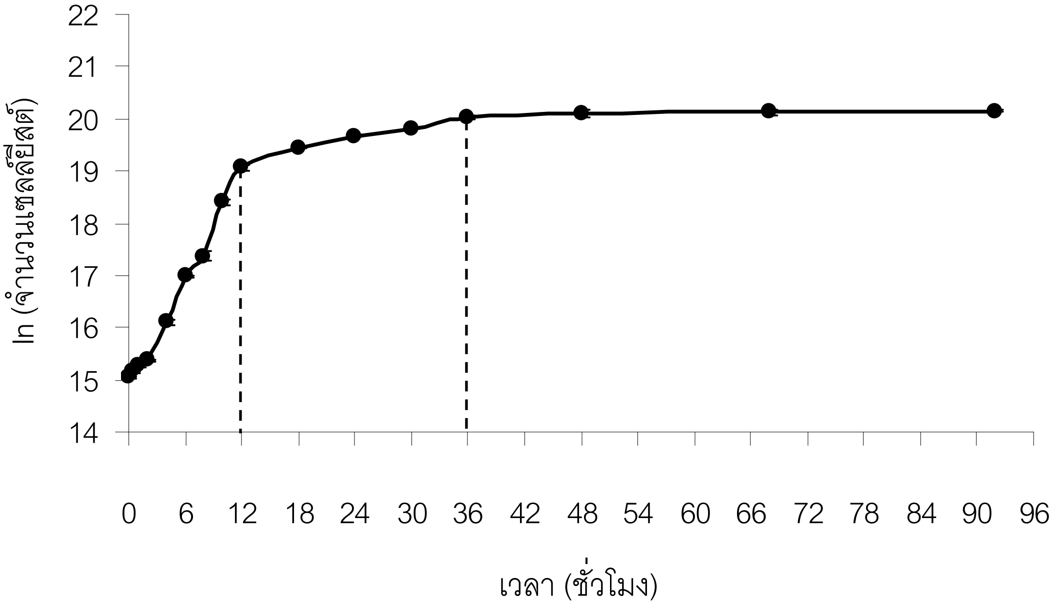
ดังภาพที่ 4.7 (ก) โดยไม่เกิดระยะแล็กจึงเริ่มระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่เวลา 0 - 1 2 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ ระยะสเตชันนารีที่เวลา 36 ชั่วโมงเป็นต้นไป (ภาพที่ 4.7 (ข)) เมื่อคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (ตารางที่ 4.6) พบว่า ที่เวลา 10 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด เป็น 0.34 ต่อชั่วโมง ดังนั้นอายุของกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ที่เหมาะสม คือ ที่ระยะเวลา 9 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 4.6 การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* ที่เวลา 0 - 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส (ก) จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อเวลา (ข) ln (จำนวนเซลล์ยีสต์) ต่อเวลา



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.7 การเจริญเติบโตของ *P. stipitis* ที่เวลา 0 - 92 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส (ก) จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อเวลา (ข) ln (จำนวนเซลล์ยีสต์) ต่อเวลา

ตารางที่ 4.6 อัตราการเจริญจำเพาะ(μ) ของ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ที่เวลาต่างๆ

เวลา(ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	
	S. cerevisiae	*P. stipitis*
0	-	-
0.5	-	0.21
1	-	0.23
2	0.02	0.16
4	0.27	0.27
6	0.43	0.32
8	0.46	0.29
9	0.48	-
10	-	0.34
12	0.41	0.33
18	0.28	0.24
24	0.21	0.19
30	0.17	0.16
36	0.14	0.14
42	0.10	-
48	-	0.11
68	-	0.07
92	-	0.05

เมื่อนำหญ้าจำนวน 11 ชนิดที่ผ่านการคัดเลือกในเบื้องต้นมาทำการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วหมักด้วยกระบวนการ SSCF โดยใช้ยีสต์ 2 ชนิด คือ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* โดยเลี้ยงกล้าเชื้อที่ระยะเวลาที่เหมาะสมดังกล่าว เมื่อใช้ปริมาตรของกล้าเชื้อชนิดละ 7.5 มิลลิลิตร จะมีปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้นประมาณ 5×10^8 และ 7.5×10^8 เซลล์ ตามลำดับ เมื่อเติมเอนไซม์ 2 ชนิดที่ผลิตจาก *T. reesei* TISTR 3081 คือ เซลลูเลสและไซแลเนสลงไป แล้วหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะได้ปริมาณเอทานอลของวัตถุดิบชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.7 โดยพบว่า หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกามีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 1.14 ± 0.09 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับ 0.14 ± 0.01 กรัม/กรัมของวัตถุดิบ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมี

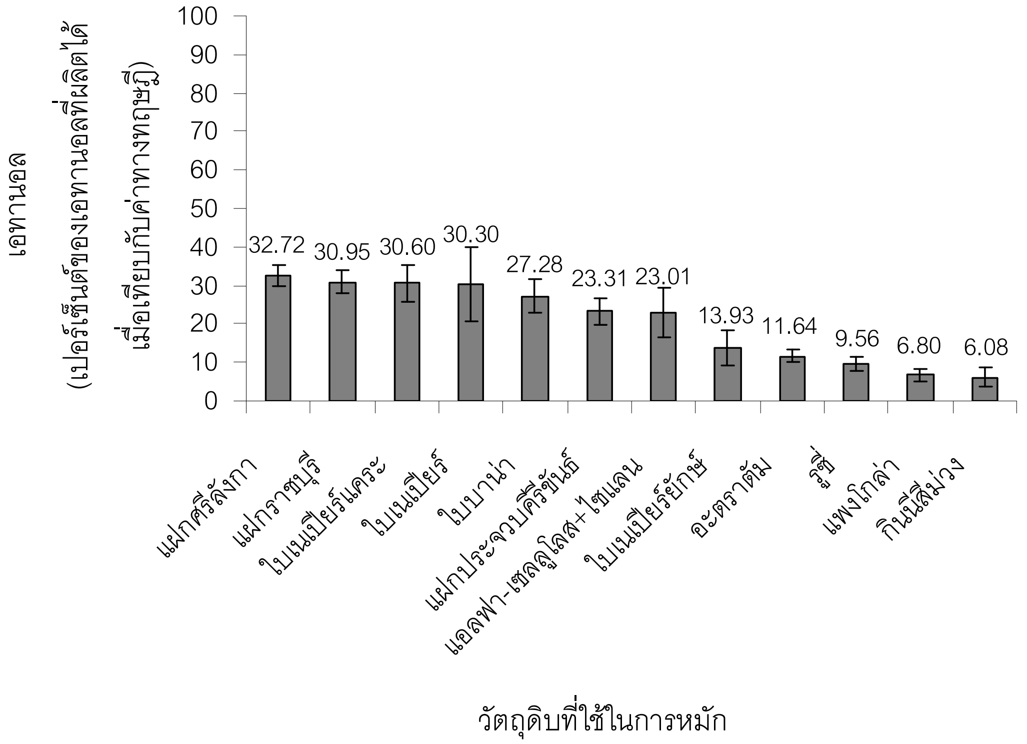
นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับวัตถุดิบอีก 5 ชนิด คือ ใบหญ้าเนเปียร์ ใบหญ้าเนเปียร์แคระ ใบหญ้าบาน่า หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรี และแอลฟา-เซลลูโลสผสมกับไซแลน

ตารางที่ 4.7 ปริมาณเอทานอลจากกระบวนการ SSCF ของวัตถุดิบชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ	ปริมาณเอทานอล	
	กรัม/ลิตร	กรัม/กรัมของวัตถุดิบ
แฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกา	1.14 ± 0.09[a]	0.14 ± 0.01[a]
แฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรี	1.10 ± 0.10[a]	0.14 ± 0.01[a]
แอลฟา-เซลลูโลส 0.6 กรัม+ไซแลน 0.6 กรัม	1.06 ± 0.30[a,b]	0.13 ± 0.04[a,b]
ใบเนเปียร์แคระ	0.98 ± 0.16[a,b]	0.12 ± 0.02[a,b]
ใบเนเปียร์	0.97 ± 0.31[a,b]	0.12 ± 0.04[a,b]
ใบบาน่า	0.87 ± 0.14[a,b]	0.11 ± 0.02[a,b]
แฝกกลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์	0.80 ± 0.12[b]	0.10 ± 0.01[b]
ใบเนเปียร์ยักษ์	0.40 ± 0.13[c]	0.05 ± 0.02[c]
อะตราตัม	0.36 ± 0.05[c]	0.05 ± 0.01[c]
รูซี่	0.30 ± 0.06[c]	0.04 ± 0.01[c]
แพงโกล่า	0.21 ± 0.05[c]	0.03 ± 0.01[c]
กินนีสีม่วง	0.18 ± 0.07[c]	0.02 ± 0.01[c]

หมายเหตุ : ตัวอักษร a b c d หมายถึง ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เรียงลำดับจากค่ามากไปหาน้อย โดยเปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบ 12 ชนิด ซึ่งได้จากการวิเคราะห์แบบ Duncan’s Multiple Range Test (DMRT) (ภาคผนวก ฌ)

เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้จริงเทียบกับค่าของเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีดังภาพที่ 4.8 พบว่า เอทานอลที่ผลิตได้จากหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกามีค่าสูงที่สุดคิดเป็น 32.72 ± 2.69 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับวัตถุดิบอีก 4 ชนิด คือ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรี ใบหญ้าเนเปียร์แคระ ใบหญ้าเนเปียร์ และใบหญ้าบาน่า



ภาพที่ 4.8 ปริมาณเอทานอลของวัตถุดิบชนิดต่างๆ จากกระบวนการ SSCF โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

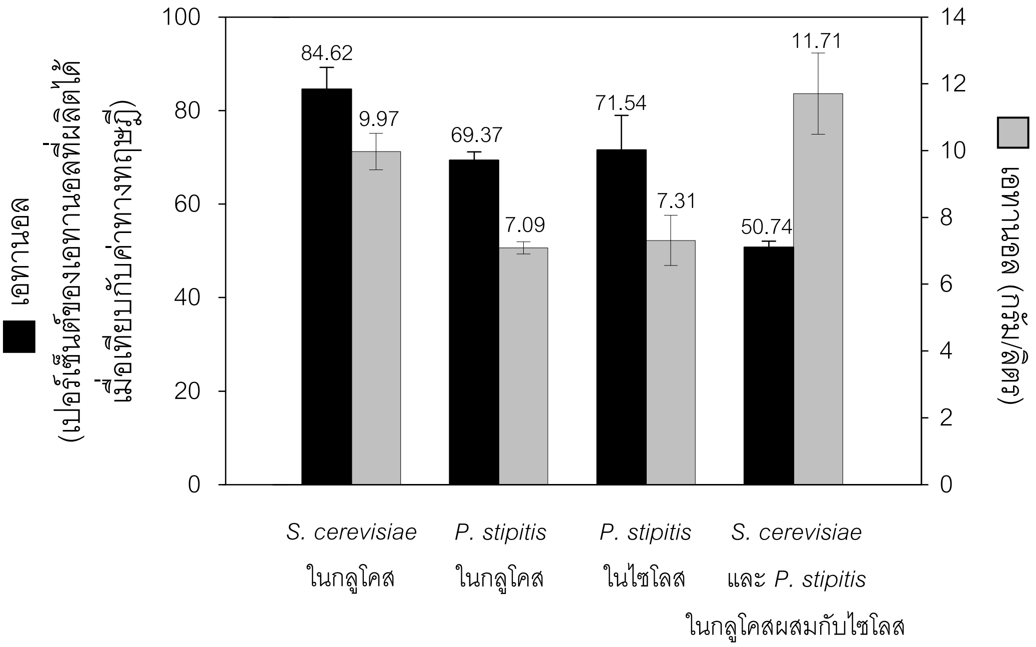
เมื่อพิจารณาผลผลิตน้ำหนักแห้งของหญ้าแต่ละชนิด (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ร่วมด้วยจะได้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักด้วยกระบวนการ SSCF (ลิตร/ไร่/ปี) มีค่าดังแสดงในตารางที่ 4.8 จากการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลของหญ้าจำนวน 11 ชนิด ที่ผลิตได้จากการหมักกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี) พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของหญ้าที่มีค่าสูงสุด 5 อันดับแรก เป็นหญ้าแพงโกล่าซึ่งมีค่าสูงที่สุดเป็น 2,993.07 ลิตร/ไร่/ปี รองลงมาเป็นหญ้าอะตราตัม ใบหญ้าเนเปียร์แคระ หญ้ากินนีสีม่วง และหญ้ารูซี่ ตามลำดับ ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับปริมาณเอทานอล

ที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยหญ้าแพงโกล่ามีค่าสูงที่สุด เป็น 2,024.69 ลิตร/ไร่/ปี รองลงมาเป็นหญ้ากินนีสีม่วง ใบหญ้าเนเปียร์แคระ หญ้าอะตราตัม และหญ้ารูซี่ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามีการสลับอันดับเฉพาะหญ้าอะตราตัมกับหญ้ากินนีสีม่วง แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีจากการคำนวณทั้งสองวิธีกับปริมาณเอทานอลของหญ้าที่ผลิตได้จากการหมัก พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมาก โดยใบหญ้าเนเปียร์แคระมีค่าสูงที่สุดเป็น 435.29 ลิตร/ไร่/ปี ซึ่งมีค่าสูงกว่าหญ้าชนิดอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด ส่วนหญ้าจำนวน 7 ชนิดที่มีค่ารองลงมา ซึ่งเป็นหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรี หญ้าแพงโกล่า ใบหญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกา หญ้าอะตราตัม หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ และใบหญ้าบาน่า พบว่า ปริมาณเอทานอลของหญ้า 7 ชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนหญ้ารูซี่ หญ้ากินนีสีม่วง และใบหญ้าเนเปียร์ยักษ์มีปริมาณเอทานอล (ลิตร/ไร่/ปี) ต่ำที่สุด และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ดูภาคผนวก ฌ)

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักด้วยกระบวนการ SSCF ในหญ้า 11 ชนิด

ลำดับที่	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี (ลิตร/ไร่/ปี)				ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักด้วยกระบวนการ SSCF (ลิตร/ไร่/ปี)	
	คำนวณจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส		คำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์			
1	แพงโกล่า	2,993.07	แพงโกล่า	2,024.69	ใบเนเปียร์แคระ	435.29
2	อะตราตัม	1,472.27	กินนีสีม่วง	1,074.86	แฝกราชบุรี	212.81
3	ใบเนเปียร์แคระ	1,422.38	ใบเนเปียร์แคระ	1,013.01	แพงโกล่า	203.52
4	กินนีสีม่วง	1,410.96	อะตราตัม	983.01	ใบเนเปียร์	187.47
5	รูซี่	1,107.63	รูซี่	683.63	แฝกศรีลังกา	184.27
6	แฝกประจวบคีรีขันธ์	732.29	แฝกประจวบคีรีขันธ์	502.28	อะตราตัม	171.39
7	แฝกราชบุรี	687.66	แฝกราชบุรี	485.40	แฝกประจวบคีรีขันธ์	170.68
8	ใบเนเปียร์	618.78	ใบบาน่า	441.33	ใบบาน่า	167.93
9	ใบบาน่า	615.60	ใบเนเปียร์	419.37	รูซี่	105.85
10	แฝกศรีลังกา	563.17	ใบเนเปียร์ยักษ์	409.89	กินนีสีม่วง	85.83
11	ใบเนเปียร์ยักษ์	562.72	แฝกศรีลังกา	409.12	ใบเนเปียร์ยักษ์	78.37

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4.9) พบว่า การใช้เชื้อ 2 ชนิดร่วมกันในการหมักทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลสทำให้ได้ปริมาณเอทานอลคิดเป็นความเข้มข้น 11.71 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับ 50.74 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีซึ่งมีปริมาณเอทานอลน้อยกว่าการใช้เชื้อแบบแยกกันในการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส เมื่อรวมปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสและไซโลสด้วย *P. stipitis* พบว่า มีปริมาณเอทานอลสูงกว่าเป็น 14.40 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีแต่เมื่อรวมปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วย *S. cerevisiae* กับการหมักน้ำตาลไซโลสด้วย *P. stipitis* พบว่า มีผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดเป็น 17.28 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับประมาณ 78 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี สำหรับการหมักน้ำตาลไซโลสด้วย *S. cerevisiae* พบว่า ไม่มีปริมาณเอทานอลเกิดขึ้น



ภาพที่ 4.9 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักน้ำตาลที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คิดเป็นความเข้มข้นในหน่วยกรัม/ลิตร และเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี โดยใช้ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดเป็น 3 กรัม และมีปริมาตรรวมของเชื้อและอาหารเป็น 150 มิลลิลิตร

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ตัวอย่างหญ้าที่ใช้ในงานวิจัย

หญ้าอาหารสัตว์และหญ้าแฝกที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นหญ้าที่มีความสูงตั้งแต่ 1 เมตรขึ้นไป ข้อดี คือ เมื่อนำมาทำเป็นหญ้าแห้งจะได้ปริมาณของมวลที่มากซึ่งเหมาะในการนำมาใช้ประโยชน์ สำหรับหญ้าแฝกทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ที่คัดเลือกมาใช้นั้น เป็นกลุ่มพันธุ์ที่กรมพัฒนาที่ดินส่งเสริมให้ปลูก (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมพัฒนาที่ดิน, สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน, 2546) จึงได้เลือกหญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ หญ้าจัดเป็นพืชพลังงานที่น่าสนใจเนื่องจากหญ้าเป็นพืชที่มีอายุหลายปี (perennial plant) และใน 1 ปี สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลายครั้ง จึงไม่จำเป็นต้องปลูกทดแทนใหม่บ่อยๆ หญ้าแพงโกล่ามีผลผลิตน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเป็น 6,000 กิโลกรัม/ไร่/ปี (ภาคผนวก ข) ซึ่งสูงกว่าหญ้าอีก 17 ชนิดที่ได้นำมาทดลอง เนื่องจากใน 1 ไร่จะมีปริมาณหญ้าแพงโกล่าขึ้นอยู่อย่างหนาแน่นเมื่อเปรียบเทียบกับหญ้าชนิดอื่นจึงทำให้ได้ผลผลิตมาก

หญ้ากินนีสีม่วง หญ้ารูซี่ หญ้าแพงโกล่า หญ้าอะตราตัม และหญ้าแฝก เป็นหญ้าที่มีลำต้นเล็กและมีส่วนใบมากกว่าลำต้นมากจึงได้ใช้ทั้งส่วนใบและลำต้นในการทดลอง ส่วนหญ้าเนเปียร์ทั้ง 4 ชนิดที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นเป็นหญ้าที่ศูนย์วิจัยปลูกไว้เป็นเวลานานแล้วจึงทำให้ลำต้นมีความแข็งมาก หากจะนำส่วนของลำต้นนี้มาใช้จำเป็นที่จะต้องมีเครื่องมือช่วยในการตัดและบดส่วนที่แข็งนี้ได้เป็นอย่างดี แต่เครื่องมือที่มีอยู่นั้นไม่สามารถทำได้ ด้วยข้อจำกัดของเครื่องมือดังกล่าว ในการทดลองนี้จึงได้เลือกเฉพาะส่วนใบมาใช้ และในการคำนวณที่มีค่าของผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) มาเกี่ยวข้องจะหักน้ำหนักของลำต้นออกไปจึงทำให้ปริมาณผลผลิตของหญ้าเนเปียร์ทั้ง 4 ชนิดมีค่าลดลง

การทำหญ้าให้แห้งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ ตากหรือผึ่งแดดให้แห้ง และใช้เครื่องมือช่วยทำให้แห้ง การใช้เครื่องมือเพื่อช่วยอบพืชให้แห้งสามารถช่วยพืชแห้งได้เร็วแต่ต้นทุนค่าเครื่องมือสูงไม่คุ้มค่าที่จะนำมาใช้ วิธีการลดความชื้นที่ง่ายที่สุดและถูกที่สุด คือ การผึ่งแดด โดยพยายามเกลี่ยให้ส่วนของพืชกระจายอย่างสม่ำเสมอ ไม่หนาจนเกินไป จะทำให้หญ้าแห้งได้เร็วและพร้อมกัน ในพืชสดหนัก 1 ตัน พบว่า การผึ่งแดดจัดเป็นเวลา 3 - 4 วัน สามารถลดความชื้นจาก 80 เปอร์เซ็นต์

ให้เหลือน้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ได้ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมปศุสัตว์, 2549) ดังนั้นในการนำหญ้ามาใช้จริงจึงควรใช้วิธีผึ่งแดดเพื่อลดต้นทุน

การปรับสภาพหญ้าด้วยวิธีทางกาพภาพโดยการตัดและบดให้ละเดียดจะทำให้หญ้ามีขนาดเล็กลงเป็นการช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อไป ในงานวิจัยนี้ได้นำหญ้าที่ผ่านการบดจากเครื่องบดละเอียดซึ่งยังมีทั้งส่วนที่ละเอียดและหยาบปะปนกันมาร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มีรูพรุนขนาด 0.4 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ผงหญ้าที่มีขนาดเล็กและมีขนาดสม่ำเสมอกันเพื่อนำไปใช้ในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต่อไป สำหรับส่วนที่ค้างอยู่บนตะแกรงร่อนจะมีขนาดใหญ่กว่าจึงนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ปริมาณความชื้นจะส่งผลต่อปริมาณวัตถุแห้งที่มีในพืชแต่ละชนิด โดยปริมาณวัตถุแห้งจะคำนวณจากการที่ปริมาณความชื้นรวมกับปริมาณวัตถุแห้งจะเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ พืชที่มีปริมาณความชื้นน้อยก็จะมีเปอร์เซ็นต์ของปริมาณวัตถุแห้งมาก หญ้าที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงประมาณ 50 - 80 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือจะมีปริมาณวัตถุแห้งคิดเป็น 20 - 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำหญ้าไปทำให้แห้งก็จะใช้เวลาที่สั้นกว่าและได้ปริมาณน้ำหนักแห้งที่สูงกว่าพืชที่มีปริมาณความชื้นสูงเมื่อใช้ปริมาณน้ำหนักสดที่เท่ากัน เช่น ผักตบชวาซึ่งมีปริมาณความชื้น 92.8 - 95.0 เปอร์เซ็นต์ (Nigam, 2002) นอกจากนี้ในพืชชนิดเดียวกันจะมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ฤดูกาลที่ปลูก ปริมาณน้ำที่ให้ และอายุของพืช เป็นต้น จากข้อมูลของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมปศุสัตว์ (2549) พบว่า เมื่อปลูกหญ้าอาหารสัตว์ในสภาพพื้นที่และการจัดการที่เหมาะสม หญ้าอาหารสัตว์ทั้ง 8 ชนิดจะมีปริมาณวัตถุแห้ง 20 - 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ ส่วนหญ้าแฝกทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์นั้นจากงานวิจัยของวารุณี พานิชผล และคณะ (2537) พบว่า หญ้าแฝกหอม 4 กลุ่มพันธุ์ (กำแพงเพชร 2 สงขลา 3 สุราษฎร์ธานี และศรีลังกา) และหญ้าแฝกดอน 6 กลุ่มพันธุ์ (ร้อยเอ็ด เลย นครสวรรค์ ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี และกำแพงเพชร 1) ที่มีอายุการตัดทุกๆ 4 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ยปริมาณวัตถุแห้งเป็น 32.9 และ 40.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนค่าปริมาณวัตถุแห้งของหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอนที่ได้จากงานวิจัยนี้จะมีค่าเฉลี่ยเป็น 36.35 และ 39.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นที่หญ้าแฝกหอมจะมีปริมาณวัตถุแห้งต่ำกว่าหญ้าแฝกดอน แม้ว่าหญ้าแฝกจะมีปริมาณวัตถุแห้งสูงกว่าหญ้าอาหารสัตว์แต่จากการที่หญ้าอาหารสัตว์มีผลผลิตน้ำหนักสดต่อไร่สูงกว่าหญ้าแฝกมากจึงทำให้มีผลผลิตน้ำหนักแห้งต่อไร่สูงกว่า

การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ได้แก่ proximate analysis แต่เนื่องจากในขั้นตอนของการวิเคราะห์ทำให้ได้ค่าเยื่อใย (crude fiber) ผิดความเป็นจริง นอกจากนี้ยังไม่สามารถแยกชนิดของเยื่อใยหรือองค์ประกอบของชีวมวลพืชได้ จึงทำให้วิธีนี้ใช้ประโยชน์ได้น้อยลง (สายัณห์ ทัดศรี, 2540) ดังนั้นจึงได้ใช้วิธี detergent fiber analysis หรือ forage fiber analysis แทน ซึ่งพัฒนาโดย Goering และ Van Soest (1970) เพื่อให้สามารถแยกแยะปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชได้ วิธีการวิเคราะห์แบบนี้สามารถแบ่งองค์ประกอบของพืชได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (cell content หรือ neutral detergent soluble หรือ NDS) เป็นส่วนสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกลาง (neutral detergent) ประกอบด้วย โปรตีน คาร์ไฮเดรต เช่น แป้งและน้ำตาล ไขมัน กรดอินทรีย์ต่างๆ สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน วิตามิน เพคติน และสารที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น (วารุณี พานิชผล และคณะ, 2537) อีกส่วนหนึ่ง คือ ส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall constituents หรือ neutral detergent fiber หรือ NDF) เป็นส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในสารละลาย neutral detergent ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า (Lee และคณะ, 2007) โดย NDF ยังสามารถแบ่งออกได้เป็นส่วนที่ละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรด (acid detergent) เรียกว่า acid detergent soluble (ADS) คือ เฮมิเซลลูโลส และส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในสารละลาย acid detergent เรียกว่า acid detergent fiber (ADF) ได้แก่ เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ดังนั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวลพืชจึงได้ใช้สารละลาย neutral detergent ในการสกัดก่อนเพื่อสกัดเอาส่วน NDS จากพืชออกไป จึงเหลือส่วนที่เป็น NDF (เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า) เอาไว้ ในการสกัดครั้งต่อมาจึงใช้สารละลาย acid detergent เพื่อสกัดเอาเฮมิเซลลูโลสออกไป จึงเหลือส่วนที่เป็น ADF (เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า) เอาไว้ ดังนั้นจึงหาปริมาณของเฮมิเซลลูโลสได้จากผลต่างของปริมาณ NDF และ ADF จากนั้นจึงใช้สารละลาย combined permanganate ในการสกัดเอาลิกนินออกไป จึงเหลือส่วนที่เป็น PML (permanganate lignin) ที่ประกอบด้วย เซลลูโลสและเถ้า ดังนั้นจึงหาปริมาณของลิกนินได้จากผลต่างของปริมาณ ADF และ PML ขั้นตอนสุดท้ายเมื่อนำไปเผาจึงเหลือเฉพาะส่วนของเถ้าทำให้หาปริมาณของเซลลูโลสได้จากผลต่างของปริมาณ PML และเถ้า ส่วนของเถ้าที่เหลือนั้นจะเป็นพวกสารประกอบอนินทรีย์และแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ ซิลิกา อะลูมิเนียม แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และโซเดียม เป็นต้น (Lee และคณะ, 2007) และปริมาณของสารอื่นๆ ที่พบนอกเหนือจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ก็คือ ปริมาณ NDS นั่นเอง

หญ้าแต่ละชนิดจะมีปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชแตกต่างกันไป แม้แต่หญ้าชนิดเดียวกันก็อาจมีปริมาณองค์ประกอบที่แตกต่างกันได้หากปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันหรือมีอายุไม่เท่ากัน ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของหญ้า ได้แก่ พันธุ์พืชที่ใช้ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน การจัดการปลูกดูแลรักษา ปริมาณและการแพร่กระจายของฝน รวมทั้งการตัดนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากการตัดส่วนของต้นและใบพืชไปใช้ ทำให้พื้นที่สังเคราะห์แสงของพืชลดลง ส่งผลให้มีการสะสมคาร์โบไฮเดรทน้อยลงด้วย (Brown และ Blaser, 1965) นอกจากนี้การตัดหญ้าบ่อยครั้งก็ส่งผลให้มีปริมาณผลผลิตและสารเยื่อใยลดลง แต่จะมีปริมาณของโปรตีนเพิ่มขึ้น (Middleton, 1982)

จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชในหญ้าทั้ง 18 ชนิดที่นำมาทดลอง พบว่า หญ้าทั้ง 18 ชนิดมีปริมาณเซลลูโลสโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 31.85 - 38.51 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 31.13 - 42.61 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณลิกนินโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.10 - 5.64 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชสามารถใช้บ่งบอกถึงศักยภาพของหญ้าได้เบื้องต้นว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นพืชพลังงานได้หรือไม่ โดยหญ้าทั้ง 18 ชนิดที่ทำการศึกษาเป็นพืชที่มีปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสค่อนข้างสูงอยู่ในช่วงประมาณ 60 - 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการหาค่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี จึงคิดจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในหญ้าแต่ละชนิด เพื่อคำนวณหาว่าหญ้าแต่ละชนิดจะสามารถผลิตเอทานอลได้เท่าไหร่หากมีการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์และน้ำตาลที่ได้สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ทั้งหมด ในการวิเคราะห์หาศักยภาพของหญ้าที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปปลูกเป็นพืชพลังงานจึงต้องมีการนำผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าแต่ละชนิดมาคำนวณร่วมด้วย โดยพบว่า หญ้าแพงโกล่ามีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีสูงที่สุดเป็น 2,993.07 ลิตร/ไร่/ปี เนื่องจากมีผลผลิตน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเป็น 6,000 กิโลกรัม/ไร่/ปี ทำให้เมื่อพิจารณาจากค่าดังกล่าวจึงคาดว่าหากสามารถผลิตเอทานอลจากหญ้าแพงโกล่าได้เป็นไปตามทฤษฎีจริง หญ้าแพงโกล่าน่าจะมีความเหมาะสมสำหรับนำไปปลูกเป็นพืชพลังงานเพื่อใช้ผลิตเอทานอลได้ อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ประกอบอีก เช่น พื้นที่ที่ใช้ในการปลูก ความยากง่ายในการปลูก การดูแลรักษา และในองค์ประกอบของหญ้านั้นอาจมีสารยับยั้งที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์และการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการหมักได้อาจส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายและปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักจริงไม่เป็นไปตามทฤษฎีได้ เป็นต้น จึงต้องมีการศึกษาการย่อยสลายองค์ประกอบชีวมวลของพืช และการผลิตเอทานอลเพื่อดูปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจริง ดังนั้นเมื่อมีการวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อไปอาจจะมีหญ้าชนิดอื่นที่มีความเหมาะสมได้เช่นกัน

การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส

เชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตเซลลูเลสและไซแลเนสได้ดี อาหารเหลวสำหรับผลิตเซลลูเลสได้ดัดแปลงมาจากสูตรของ Mandels และ Weber (1969) ที่ได้เปลี่ยนจากการใช้ Solka Floc ซึ่งเป็นลิกโนเซลลูโลสที่ได้กำจัดลิกนินออกไปแล้ว โดยใช้ปริมาณ 7.5 กรัม/ลิตร มาเป็นแอลฟา-เซลลูโลสปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ส่วนอาหารเหลวสำหรับผลิตไซแลเนสจะใช้สูตรของสุมาลี อิ้งใจธรรม (2539) แต่ได้ปรับ pH จาก 9.0 เป็น 5.0 เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา สำหรับการวัดแอกทิวิตีของเซลลูเลสจะใช้วิธี FPU assay เนื่องจากเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดมาทำงานร่วมกัน คือ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส ดังนั้นจึงได้วัดเป็นแอกทิวิตีโดยรวมของเซลลูเลสซึ่งจะใช้กระดาษกรองเป็นสารตั้งต้นในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคส ส่วนการย่อยสลายพวกเฮมิเซลลูโลสนั้นจะใช้ไซแลเนสในการย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลไซโลส โดยทั่วไปในเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้อแข็งจะมีปริมาณของไซแลนมากกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่น ยกตัวอย่างเช่น ฟางข้าวสาลีมีปริมาณของไซแลน กาแลกแตน อะราบิแนน และแมนแนน เป็น 20.1, 0.8, 3.3 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Linde และคณะ, 2008) และคอร์นสโตเวอร์มีปริมาณของไซแลน กาแลกแตน อะราบิแนน และแมนแนน เป็น 21.4, 2.5, 3.5 และ 1.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Öhgren และคณะ, 2007) จะเห็นได้ว่าในเฮมิเซลลูโลสมีไซแลนเป็นปริมาณมากที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจเฉพาะการย่อยสลายไซแลนเท่านั้น และในการวัดแอกทิวิตีจะวัดจากเอนโดไซแลเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของเฮมิเซลลูเลส จากการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดและปริมาณโปรตีน พบว่า เมื่อผลิตเซลลูเลสโดยใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้เซลลูเลสที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 1.09 ± 0.09 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เมื่อผลิตไซแลเนสโดยใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ไซแลเนสมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 65.32 ± 1.59 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาการผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส จากงานวิจัยของ Szakacs และ Tengerdy (1997) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูเลสของเชื้อราชนิดต่างๆ ในอาหาร 2 ชนิดที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน และมีสารอาหารอื่นๆ ต่างจากของ Mandels และ Weber เล็กน้อย เมื่อใช้เชื้อรา *T. reesei* RUT C30 มาผลิตเซลลูเลสโดยมี Solka Floc ปริมาณ 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนจะได้เซลลูเลสที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 0.70 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน งานวิจัยของ Juhász และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* RUT C30 เมื่อใช้ Solka Floc 7.5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ และวัดเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลลูเลสและ

เฮมิเซลลูเลส พบว่า เมื่อวัดโดยใช้วิธี FPU assay จะได้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 0.58 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และได้ไซแลเนสที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 119 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน

เซลลูเลสและไซแลเนสที่ผลิตได้จะนำไปใช้ในการย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสต่อไป การผลิตเอนไซม์ที่มีค่าแอกทิวิตีสูงๆ จะทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น และสามารถใช้ในปริมาณที่น้อยๆ ได้ ดังนั้นการปรับปรุงสูตรอาหาร แหล่งคาร์บอนที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงจะส่งผลให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีค่าแอกทิวิตีได้สูงขึ้น นอกจากนี้การพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อราด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์นับได้ว่าเป็นวิธีที่น่าสนใจอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มความสามารถของเชื้อเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ที่มีค่าแอกทิวิตีสูงขึ้น

การศึกษาการย่อยสลายหญ้าชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์เพื่อคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมไปใช้ในกระบวนการหมัก

การนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน (Cara และคณะ, 2006) วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพ คือ เพื่อที่จะเปลี่ยนแปลงหรือกำจัดองค์ประกอบของโครงสร้างพืชเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และเพิ่มผลผลิตของน้ำตาลที่ใช้ในการหมักซึ่งได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้สูงขึ้น (Mosier และคณะ, 2005) งานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกาพภาพตามด้วยวิธีทางเคมี คือ บดให้หญ้ากลายเป็นผงก่อนแล้วตามด้วยการใช้อัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ วิธีนี้ไม่ทำให้เกิดเฟอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลขึ้นในระหว่างการปรับสภาพ (Saha และ Cotta, 2007) ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้มักเกิดขึ้นในกระบวนการที่มีการใช้กรดปรับสภาพหรือใช้กรดในการย่อยสลาย จัดเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล (Purwadi, 2006)

ในงานวิจัยนี้ได้สนใจเฉพาะน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสและน้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนด้วยไซแลเนสเท่านั้น เพราะไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักที่พบมากที่สุดในเฮมิเซลลูโลส การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายหญ้าแต่ละชนิดจะดูจากเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากหญ้าแต่ละชนิดมีปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสแตกต่างกัน ผลการย่อยสลายหญ้าทั้ง 18 ชนิด ด้วยเซลลูเลสและไซแลเนส โดยใช้ปริมาณหญ้าแห้งที่บดเป็นผงแล้ว 0.6 กรัม พบว่า หญ้าส่วนใหญ่จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 500 - 600 มิลลิกรัม/กรัมของวัตถุดิบ และมีเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลอยู่ในช่วง 70 - 80 เปอร์เซ็นต์ โดยหญ้ากินนีสีม่วงมีค่าสูงที่สุดเป็น 85.56 ±

3.44 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังได้มีการใช้แอลฟา-เซลลูโลสผสมกับไซแลนเพื่อเปรียบเทียบผลด้วย เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่พบอยู่ในส่วนประกอบของหญ้าเช่นเดียวกัน แต่ไม่ได้อยู่รวมกันเหมือนกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่พบในหญ้าจึงน่าจะย่อยสลายได้ง่าย ทำให้บอกได้ว่าเอนไซม์ที่ใช้สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดีหรือไม่ ผลการใช้แอลฟา-เซลลูโลสผสมกับไซแลนอย่างละ 0.3 กรัม พบว่า หลังการย่อยสลายมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่าหญ้าทั้ง 18 ชนิด เป็น 753.94 ± 6.89 มิลลิกรัม/กรัมของวัตถุดิบ แต่เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลจะเท่ากับ 75.39 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าหญ้าส่วนใหญ่ เนื่องจากได้ใช้แอลฟา-เซลลูโลสและไซแลนในปริมาณ 1,000 มิลลิกรัม/กรัมของวัตถุดิบ ซึ่งสูงกว่าที่พบในหญ้าที่ใช้ในการทดลองซึ่งมีค่าประมาณ 700 มิลลิกรัม/กรัมของวัตถุดิบ จึงส่งผลให้ย่อยสลายออกมาแล้วมีปริมาณน้ำตาลน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณของเซลลูโลสและไซแลนที่ใช้ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่าวิธีการปรับสภาพและเอนไซม์ที่ใช้สามารถย่อยสลายหญ้าได้ดี

เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Saha และ Cotta (2006) ซึ่งใช้วิธีการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์โดยใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 2.15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร pH 11.5 เขย่าโดยใช้ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าสามารถย่อยสลายฟางข้าวสาลีซึ่งมีปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็น 69.47 ± 0.39 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็นน้ำตาลได้ 672 ± 4 มิลลิกรัม/กรัมของฟางข้าว หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลเท่ากับ 96.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Saha และ Cotta (2007) ยังได้มีการศึกษาในแกลบโดยใช้วิธีการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ คือ ใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร pH 11.5 เขย่าโดยใช้ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า สามารถย่อยสลายแกลบซึ่งมีปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็น 47.58 ± 0.85 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็นน้ำตาลได้ 457 ± 0 มิลลิกรัม/กรัมของแกลบ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก Saha และ Cotta ได้ใช้เอนไซม์ทางการค้า 3 ชนิด คือ Celluclast 1.5 L (เซลลูเลส) Novozyme 188 (เบตา-กลูโคซิเดส) และ Viscostar 150 L (ไซแลเนส) ซึ่งมีแอกทิวิตีสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. reesei* ในงานวิจัยนี้มาก อีกทั้งยังมีการใช้เบตา-กลูโคซิเดสร่วมด้วยซึ่งส่งผลทำให้ย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดี จึงทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสูงกว่า

เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลของหญ้าแต่ละชนิดมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกันทำให้การตัดสินใจเพื่อคัดเลือกชนิดของหญ้าที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมักต่อไปเป็นไปได้ยาก ดังนั้นจึงได้นำข้อมูลผลผลิตน้ำหนักแห้งของหญ้าแต่ละชนิดซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้มาจากการปลูกในสภาพพื้นที่ที่มีความเหมาะสมกับหญ้าชนิดนั้นๆ มาใช้ในการคำนวณร่วมกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และคำนวณหาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดังกล่าว เพื่อเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตเอทานอลหากมีการนำหญ้าที่มีการปลูกและได้ผลผลิตตามนั้นจริงๆ มาทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยพบว่าหญ้าแพงโกล่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงกว่าหญ้าชนิดอื่นๆ มาก คิดเป็น 3,126.18 กิโลกรัม/ไร่/ปี และ 2,024.69 ลิตร/ไร่/ปี ตามลำดับ จากการพิจารณาผลที่ได้จากคำนวณจึงได้คัดเลือกหญ้าจำนวน 11 ชนิด ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดเกิน 630 กิโลกรัม/ไร่/ปี หรือมีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเกิน 408 ลิตร/ไร่/ปี ไปศึกษาในขั้นตอนการหมักต่อไป แบ่งเป็นหญ้าอาหารสัตว์ 8 ชนิด คือ ใบหญ้าเนเปียร์ ใบหญ้าเนเปียร์แคระ ใบหญ้าเนเปียร์ยักษ์ ใบหญ้าบาน่า หญ้ากินนีสีม่วง หญ้ารูซี่ หญ้าแพงโกล่า และหญ้าอะตราตัม ส่วนหญ้าแฝกมี 3 กลุ่มพันธุ์ คือ กลุ่มพันธุ์ศรีลังกา กลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ และกลุ่มพันธุ์ราชบุรี

การผลิตเอทานอล

ในการผลิตเอทานอลจากหญ้าที่มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจำเป็นต้องมีการย่อยสลายองค์ประกอบดังกล่าวเพื่อให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลที่จะได้จากการย่อยสลายเป็นส่วนใหญ่ เพื่อที่จะนำน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้มาหมักเป็นเอทานอลจึงได้ใช้ยีสต์ 2 ชนิด คือ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ซึ่งมีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้แตกต่างกัน โดย *S. cerevisiae* สามารถใช้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสได้เท่านั้น จึงได้นำ *P. stipitis* มาใช้ในการหมักร่วมด้วย ซึ่ง *P. stipitis* สามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างไรก็ตามเชื้อชนิดนี้มีอัตราการหมักน้ำตาลกลูโคสต่ำกว่า *S. cerevisiae* (Taniguchi และคณะ, 1997) ก่อนที่จะนำเชื้อมาใช้จึงได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ในอาหารสูตร YMB ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลสตามลำดับ เพื่อเลือกอายุของเชื้อที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตเอทานอล เมื่อนำค่า ln ของจำนวนเซลล์ยีสต์กับเวลาไปสร้างกราฟจะได้กราฟที่มีการเจริญเป็นแบบแบตซ์ (typical batch growth curve) เนื่องจากเป็นการเลี้ยงเชื้อในระบบที่ไม่มีการเติมสารอาหารลงไปในระหว่างที่เชื้อ

มีการเจริญเติบโต ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าต่อหน่วยเวลา เป็นช่วงที่กราฟมีลักษณะเป็นเส้นตรงที่มีความชันมากที่สุด โดยค่าของความชันนี้ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ จึงเป็นช่วงที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด ดังนั้นในการศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจึงพิจารณาจากระยะเอกซ์โพเนนเชียล ผลการศึกษาพบว่า *P. stipitis* ไม่เกิดระยะแล็ก แสดงว่าเชื้อที่ใช้สามารถเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลสได้ทันที ในขณะที่ *S. cerevisiae* ยังคงมีระยะแล็กเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ระยะเวลา 9 ชั่วโมง *S. cerevisiae* มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด เป็น 0.48 ต่อชั่วโมง และที่ระยะเวลา 10 ชั่วโมง *P. stipitis* มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด เป็น 0.34 ต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล โดยเซลล์ยีสต์จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดจึงได้ใช้เชื้อที่อายุดังกล่าวมาเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักต่อไป เมื่อใช้ปริมาตรของกล้าเชื้อชนิดละ 7.5 มิลลิลิตร จะทำให้มีปริมาณเซลล์ของ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* เริ่มต้นประมาณ 5×10^8 และ 7.5×10^8 เซลล์ ตามลำดับ จากการศึกษาของปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ (2547) ที่ได้ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดยใช้ *S. cerevisiae* SKP1 พบว่า การใช้อาหาร BSM medium ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ จะทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง คิดเป็น 0.176 ต่อชั่วโมง

ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสนอกจากจะต้องมีการปรับสภาพและย่อยสลายวัตถุดิบแล้ว ในขั้นตอนการหมักถือว่าเป็นส่วนสำคัญเช่นเดียวกัน การหมักสามารถทำได้หลายกระบวนการ แต่การใช้กระบวนการย่อยสลายและหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง (SSCF) เป็นกระบวนการที่มีข้อดี คือ สามารถย่อยสลายวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตสแล้วหมักน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้ให้เป็นเอทานอลได้ในขั้นตอนเดียว ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ค่อยๆ ปล่อยออกมาจากการย่อยสลายจะถูกนำไปใช้ในการหมักอย่างต่อเนื่องจึงทำให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่ำส่งผลให้มีการหมักน้ำตาลไซโลสได้ดีขึ้น (Öhgren และคณะ, 2006) จากการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SSCF โดยใช้เซลลูเลสและไซแลเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. reesei* ในการย่อยสลายและใช้ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ในการหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง โดยใช้วัตถุดิบเป็นหญ้า 11 ชนิดที่ได้คัดเลือกมา ซึ่งเป็นหญ้าอาหารสัตว์ 8 ชนิดและหญ้าแฝก 3 กลุ่มพันธุ์ กับแอลฟา-เซลลูโลสผสมกับไซแลนเป็นวัตถุดิบในการหมักเพื่อเปรียบเทียบด้วย วัตถุดิบทั้งหมดจะนำไปผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ก่อนเข้าสู่กระบวนการ SSCF ผลที่ได้พบว่า หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกามีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 1.14 ± 0.09 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับ 0.14 ± 0.01 กรัม/กรัมของวัตถุดิบ ซึ่งคิดเป็น 32.72 ±

2.69 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี แต่เมื่อนำผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าแต่ละชนิดมาคำนวณร่วมด้วย พบว่า ใบหญ้าเนเปียร์แคระมีปริมาณเอทานอลสูงที่สุดเป็น 435.29 ลิตร/ไร่/ปี สำหรับหญ้ากินนีสีม่วงและหญ้าแพงโกล่า พบว่า มีปริมาณเอทานอลต่ำที่สุดคิดเป็น 6.08 และ 6.80 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีตามลำดับ ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาผลการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในเบื้องต้นที่พบว่าหญ้ากินนีสีม่วงมีเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสูงที่สุดเป็น 85.56 ± 3.44 เปอร์เซ็นต์ และหญ้าแพงโกล่ามีเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลเป็น 76.03 ± 0.84 เปอร์เซ็นต์ซึ่งค่อนข้างสูง แสดงว่าอาจเกิดจากการที่หญ้าสองชนิดนี้มีสารบางอย่าง เช่น แทนนินหรือซิลิกา ในปริมาณที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์และการเจริญเติบโตของยีสต์จึงทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ในการหมักมีค่าต่ำที่สุด นอกจากนี้สารประกอบอื่นๆ ที่มีความเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ เช่น อนุพันธ์ของลิกนินที่เป็นสารประกอบฟีโนลิกอาจส่งผลให้ความสามารถในการหมักลดลง (Nigam, 2001) ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาถึงผลของสารยับยั้งดังกล่าว ดังนั้นหากจะมีการวิจัยต่อไปจึงควรมีการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของสารยับยั้งที่เกิดขึ้น รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและการกำจัดลิกนิน เพื่อให้เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น นอกจากนี้ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ก็ส่งผลต่อความสามารถในการย่อยสลายด้วย จึงควรมีการศึกษาถึงผลของปริมาณเอนไซม์เช่นกัน

ในงานวิจัยที่มีการศึกษาการผลิตเอทานอลจากหญ้า พบว่า Isci และคณะ (2008) ได้ศึกษากระบวนการหมักแบบ SSF ในหญ้าสวิตช์ โดยใช้วิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายแอมโมเนีย พบว่าสามารถกำจัดลิกนินได้ 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณของเซลลูโลสยังคงไม่เปลี่ยนแปลง แต่ปริมาณของเฮมิเซลลูโลสลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ มีการใช้เซลลูเลสทางการค้า คือ Spezyme CP ซึ่งมีแอกทิวิตีเป็น 77 FPU/มิลลิลิตร ในการย่อยสลายร่วมกับการหมักด้วย *S. cerevisiae* D_5A เป็นเวลา 10 วัน ผลที่ได้พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 72 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ตรงที่ได้มีการแยกเอาส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินซึ่งเป็นสารยับยั้งในกระบวนการหมักออกไป แล้วใช้ส่วนที่เป็นเซลลูโลสในการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลลูเลสในการย่อยสลายและใช้เชื้อเพียงชนิดเดียวในการหมักแบบ SSF เท่านั้น จึงทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า

จากการศึกษาการหมักน้ำตาลกลูโคสและไซโลสในเชื้อทั้งสองชนิดเพื่อดูประสิทธิภาพของเชื้อในการหมัก พบว่า การใช้เชื้อ 2 ชนิดร่วมกันในการหมักทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลสทำให้ได้ปริมาณเอทานอลเพียง 50.74 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีซึ่งน้อยกว่าการใช้เชื้อแบบแยกกันในการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสซึ่งได้ปริมาณเอทานอลรวมกันเป็น

78 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี แสดงให้เห็นว่าการใช้ยีสต์ร่วมกัน 2 ชนิด ทำให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลลดลง จึงส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าน้อยกว่าทางทฤษฎีมาก เอทานอลที่ลดลงอาจเกิดจากการที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงเกินไป จึงส่งผลให้ *P. stipitis* มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสได้น้อยลง และเชื้อทั้งสองชนิดอาจแข่งขันกันเองในการใช้สารอาหารเนื่องจาก *P. stipitis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้เช่นเดียวกับ *S. cerevisiae* นอกจากนี้ยังพบว่า *P. stipitis* จะใช้น้ำตาลกลูโคสก่อนเป็นอันดับแรกแล้วค่อยตามด้วยการใช้น้ำตาลไซโลส (Du preez, Bosch และ Prior, 1986) แสดงว่าการขนส่งของน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ถูกยับยั้งโดยน้ำตาลกลูโคส (Kilian และ van Uden, 1988) นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากเซลล์มีความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตแต่จะทำให้ลดการผลิตเอทานอลลง (Grootjen และคณะ, 1991) ในงานวิจัยจึงนี้ได้หมักในระบบที่ไม่มีการเติมออกซิเจนเข้าไป แม้ว่า *S. cerevisiae* จะสามารถหมักเอทานอลได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ *P. stipitis* ยังคงต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการหมักอยู่ จากการศึกษาของ Grootjen, van der Lans และ Luyben (1990) พบว่า การให้อากาศสามารถกระตุ้นการรับน้ำตาลเข้าสู่เซลล์และเกิดการผลิตเอทานอลได้ใน *P. stipitis* ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่อย่างจำกัดนี้จึงเป็นสาเหตุให้ *P. stipitis* ผลิตเอทานอลได้น้อยลง การศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) อุณหภูมิ ปริมาณของออกซิเจน สูตรอาหาร และปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ ที่ส่งผลต่อกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสและไซโลสจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้ทั้ง *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* สามารถหมักน้ำตาลร่วมกันได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากที่สุด

แม้ว่าจะมีงานวิจัยเป็นจำนวนมากที่ได้ศึกษาผลของการหมักน้ำตาลกลูโคสและไซโลสร่วมกันโดยใช้ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* แต่การศึกษาในการหมักวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยใช้เชื้อทั้งสองชนิดร่วมกันยังคงมีน้อยอยู่ ส่วนใหญ่มักใช้เชื้อแยกกันในการหมัก ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ได้ใช้เชื้อ 2 ชนิดดังกล่าวในการหมักร่วมกันแบบ SSCF จากงานวิจัยของ Gupta, Sharma และ Kuhad (2009) ได้ศึกษาการใช้ *Prosopis juliflora* หรือ Mesquite ซึ่งเป็นไม้พุ่มผลัดใบ มีหนาม อายุหลายปี มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SHF โดยมีการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง ทำให้เฮมิเซลลูโลสถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาล แล้วกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นในส่วนไฮโดรไลเสตนี้ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ส่วนของแข็งที่เหลือซึ่งเป็นเซลลูโลสจะนำไปกำจัดลิกนินด้วยโซเดียมซัลไฟต์และโซเดียมคลอไรต์ แล้วนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือ เซลลูเลสซึ่งมีแอกทิวิตีเป็น 6.5 FPU/มิลลิกรัมของเอนไซม์ และเบตา-กลูโคซิเดส (Novozyme 188) ซึ่งมีแอกทิวิตีเป็น 250 ยูนิต/กรัมของเอนไซม์ จากนั้นนำ

ไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 18.24 กรัม/ลิตร ไปหมักโดยใช้ *P. stipitis* และไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 37.47 กรัม/ลิตร ไปหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 7.13 และ 18.52 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็น 0.39 และ 0.49 กรัม/กรัมของน้ำตาล โดยใช้เวลา 24 และ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลที่ได้จากงานวิจัยของ Gupta และคณะที่ใช้ต้น Mesquite เป็นวัตถุดิบกับงานวิจัยนี้ที่ใช้หญ้าเป็นวัตถุดิบ พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้จากงานวิจัยของ Gupta และคณะมีค่าคิดเป็น 76 และ 96 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีเมื่อใช้ *P. stipitis* และ *S. cerevisiae* ในการหมักตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าในงานวิจัยนี้มากที่ได้ปริมาณเอทานอลเพียง 30 กว่าเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี เนื่องจากงานวิจัยของ Gupta และคณะมีการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสแยกกันโดยใช้กรดและเอนไซม์ทางการค้าตามลำดับ ส่งผลให้มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลที่จะใช้ในการหมักสูง อีกทั้งยังมีการหาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพและการหมัก จึงทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่า ต่างจากงานวิจัยนี้ที่ใช้กระบวนการ SSCF ซึ่งยังไม่ได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสม เมื่อสิ้นสุดกระบวนการแล้ววัตถุดิบอาจยังถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลไม่หมด และเชื้อทั้งสองชนิดที่ใช้ร่วมกันอาจอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมในการหมักเท่าที่ควรดังที่กล่าวข้างต้น ประสิทธิภาพในการหมักจึงลดลง ส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าน้อยกว่าที่ควรจะเป็น

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอล (ลิตร/ไร่/ปี) ของหญ้าจำนวน 11 ชนิด ที่ผลิตได้จากการหมักด้วยกระบวนการ SSCF พบว่า ใบหญ้าเนเปียร์แคระมีปริมาณเอทานอลสูงที่สุดเป็น 435.29 ลิตร/ไร่/ปี จึงเป็นหญ้าที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นพืชพลังงานสำหรับผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SSCF ได้ โดยจะต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักด้วยกระบวนการนี้ต่อไปเพื่อให้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้นและมีความใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี อย่างไรก็ตามหากจะนำหญ้าเนเปียร์แคระมาใช้จริงในอนาคตจึงควรที่จะเก็บเกี่ยวในช่วงอายุที่ไม่มากจนเกินไปเพื่อให้ใช้ประโยชน์ได้ทั้งต้นและใบ ซึ่งจะสามารถเก็บเกี่ยวได้ถึง 3 - 4 ครั้งใน 1 ปี เนื่องจากในการทดลองนี้ได้ใช้หญ้าที่มีอายุมากแล้วทำให้ลำต้นมีความแข็งมากจึงได้นำเฉพาะส่วนใบมาทดลองเท่านั้น ตามปกติในการนำหญ้าชนิดนี้มาใช้เป็นอาหารสัตว์มักจะตัดที่อายุประมาณ 30 - 45 วัน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมปศุสัตว์, 2549) ซึ่งจะใช้ทั้งส่วนลำต้นและใบรวมกันอยู่แล้ว ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำส่วนของลำต้นมาใช้ นอกจากนี้ยังต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการใช้ส่วนของลำต้นร่วมด้วยว่าส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้แตกต่างไปจากการใช้เฉพาะส่วนของใบอย่างเดียวมากน้อยเพียงใด นอกจากนี้หญ้าในกลุ่มเนเปียร์ยังมีข้อดีคือ สามารถทนต่อสภาพพื้นที่ปลูกที่เป็นดินกรดจัด ดินเหนียว ดินทราย

หรือพื้นที่แห้งแล้งได้ในระดับพอใช้ จึงน่าจะสามารถนำไปปลูกในพื้นที่ดังกล่าวได้ซึ่งจะไม่ไปแย่งพื้นที่ปลูกพืชชนิดอื่นที่มีอยู่แล้ว

หญ้าแพงโกล่าแม้ว่าจะมีปริมาณเอทานอล (ลิตร/ไร่/ปี) ที่ผลิตได้จากการหมักสูงเป็นลำดับที่ 3 แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้พบว่ามีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับหญ้าชนิดอื่น แสดงว่ากระบวนการหมักที่ใช้ในงานวิจัยนี้อาจยังไม่เหมาะสมกับหญ้าชนิดนี้ และในหญ้าอาจมีสารบางอย่างที่อาจส่งผลยับยั้งกระบวนการหมัก ดังนั้นหญ้าแพงโกล่าจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการหมักแบบ SSCF แต่จากการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีจากการคำนวณทั้งสองวิธี พบว่า หญ้าแพงโกล่ามีค่าสูงที่สุด และที่สำคัญคือเป็นหญ้าที่มีผลผลิตน้ำหนักแห้งสูงมาก เหมาะสำหรับทำหญ้าแห้ง สามารถขึ้นได้ดีในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว และทนแล้งได้ดี (จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์ และคณะ, 2545) หญ้าแพงโกล่าจึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นพืชพลังงานในประเทศไทยได้เช่นกัน ดังนั้นหากจะนำหญ้าชนิดนี้ไปพัฒนาเพื่อการผลิตเอทานอลต่อไปโดยให้มีค่าใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎีมากที่สุดจึงควรที่จะมีการศึกษาต่อไปโดยเปลี่ยนกระบวนการที่ใช้ในการหมัก เนื่องจากหญ้าชนิดนี้สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์แล้วได้ปริมาณน้ำตาลที่สูง จึงอาจนำไปหมักด้วยกระบวนการ SHF ได้

การลดต้นทุนการผลิตเอทานอลสามารถทำได้โดยการลดต้นทุนของวัตถุดิบหรือเอนไซม์ที่นำมาใช้ การใช้วัตถุดิบที่มีการปรับปรุงทางพันธุกรรมเพื่อให้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงร่วมกับการพัฒนาในเรื่องของการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลจะสามารถลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้ (Wooley และคณะ,1999) ส่วนการลดต้นทุนของการผลิตเอนไซม์นับได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญของการย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ในการโคลนยีนเซลลูเลสเข้าสู่แบคทีเรีย ยีสต์ และรา จะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์และแอกทิวิตีได้สูงขึ้น (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลายชนิด การทนต่อเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงๆ หรือความสามารถในการย่อยสลายและหมักวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ในคราวเดียวกัน ถือได้ว่าเป็นสิ่งที่ควรจะทำต่อไปในอนาคตหากต้องการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

หญ้าในประเทศไทยที่ได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 18 ชนิด แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ หญ้าอาหารสัตว์จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ หญ้าเนเปียร์แคระ หญ้าเนเปียร์ยักษ์ หญ้าบาน่า หญ้ากินนีสีม่วง หญ้ารูซี่ หญ้าแพงโกล่า และหญ้าอะตราตัม อีกประเภท คือ หญ้าแฝก จำนวน 10 กลุ่มพันธุ์ ซึ่งแบ่งได้เป็นหญ้าแฝกหอม 4 กลุ่มพันธุ์ (กำแพงเพชร 2 สงขลา 3 สุราษฎร์ธานี และศรีลังกา) และหญ้าแฝกดอน 6 กลุ่มพันธุ์ (ร้อยเอ็ด เลย นครสวรรค์ ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี และกำแพงเพชร 1) โดยหญ้าเนเปียร์ทั้ง 4 ชนิด ได้นำเฉพาะส่วนใบมาใช้ในการศึกษาเท่านั้น

เมื่อนำหญ้าทั้งหมด 18 ชนิดไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น พบว่า มีปริมาณความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 51.31 - 77.80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช พบว่า หญ้าทั้ง 18 ชนิด มีปริมาณเซลลูโลสโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 31.85 - 38.51 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 31.13 - 42.61 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณลิกนินโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.10 - 5.64 เปอร์เซ็นต์ จึงมีปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ค่อนข้างสูงคือประมาณ 60 - 80 เปอร์เซ็นต์

ในการศึกษาการย่อยสลายหญ้าชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์เพื่อคัดเลือกหญ้าที่มีความเหมาะสมไปใช้ในกระบวนการหมัก จะนำวัตถุดิบไปปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ก่อน แล้วใช้เอนไซม์ 2 ชนิดในการย่อยสลาย คือ เซลลูเลสและไซแลเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. reesei* ผลการคัดเลือกพบว่า ได้หญ้าจำนวน 11 ชนิด ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดเกิน 630 กิโลกรัม/ไร่/ปี ไปศึกษาในขั้นตอนการหมักต่อไปด้วยกระบวนการ SSCF ต่อไป ประกอบด้วยหญ้าอาหารสัตว์ทั้ง 8 ชนิด และหญ้าแฝก 3 กลุ่มพันธุ์ คือ กลุ่มพันธุ์ศรีลังกา กลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ และกลุ่มพันธุ์ราชบุรี โดยหญ้ากินนีสีม่วงสามารถเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงที่สุด คือ 85.56 ± 3.44 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อคิดเป็นปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ พบว่า หญ้าแพงโกล่ามีค่าสูงที่สุดคิดเป็น 2,024.69 ลิตร/ไร่/ปี ดังนั้นหากจะมีการศึกษาต่อไปในอนาคตหญ้าแพงโกล่าจึงเป็นหญ้าที่มีศักยภาพเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลก่อนแล้วค่อยนำไปเปลี่ยนเป็นเอทานอล

หญ้าจำนวน 11 ชนิด จากทั้งหมด 18 ชนิดที่ได้นำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SSCF โดยใช้เซลลูเลสและไซแลเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. reesei* ใน

การย่อยสลายและใช้ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ในการหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง โดยใช้กล้าเชื้อที่มีอายุ 9 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกาผลิตเอทานอลโดยมีความเข้มข้นสูงที่สุด เป็น 1.14 ± 0.09 กรัม/ลิตร หรือ 0.14 ± 0.01 กรัม/กรัมของวัตถุดิบ ซึ่งคิดเป็น 32.72 ± 2.69 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี แต่เมื่อคำนวณร่วมกับผลผลิตน้ำหนักแห้งพบว่ามีปริมาณเอทานอลเป็น 184.27 ลิตร/ไร่/ปี ในขณะที่หญ้าเนเปียร์แคระมีปริมาณเอทานอลสูงที่สุดคิดเป็น 435.29 ลิตร/ไร่/ปี โดยมีความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้เป็น 0.98 ± 0.16 กรัม/ลิตร หรือ 0.12 ± 0.02 กรัม/กรัมของหญ้าแห้ง ซึ่งคิดเป็น 30.60 ± 4.90 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ดังนั้นหญ้าเนเปียร์แคระจึงเป็นหญ้าที่มีศักยภาพเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SSCF ต่อไป

ในอนาคตหากจะนำหญ้าชนิดใดไปพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นพืชพลังงานสำหรับผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ จำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ มาประกอบการพิจารณาด้วย หญ้าแต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่แตกต่างกัน ผลผลิตน้ำหนักแห้งที่ได้ก็ยังมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีความเหมาะสมกับกระบวนการผลิตเอทานอลที่แตกต่างกันอีกด้วย ดังนั้นจึงควรที่จะมีการวิเคราะห์ในทางเศรษฐศาสตร์เพิ่มเติมถึงความคุ้มค่าและต้นทุนที่ใช้ในการปลูก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง และกระบวนการผลิตเป็นเอทานอล เพื่อให้ทราบว่าหญ้าชนิดใดมีความเป็นไปได้ที่จะนำหญ้ามาใช้เป็นพืชพลังงานได้จริง เมื่อได้ชนิดของหญ้าที่มีความเหมาะสมแล้ว จึงควรมีการศึกษาการปลูกหญ้าในพื้นที่ที่มีความแห้งแล้งเพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อการแย่งพื้นที่เพาะปลูกอาหารคนและอาหารสัตว์ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาในเรื่องเทคนิคการปลูกเพื่อให้หญ้าเจริญเติบโตในพื้นที่ดังกล่าวได้ การปรับปรุงพันธุ์พืชนับได้ว่าเป็นวิธีที่น่าสนใจอีกวิธีหนึ่งในการทำให้หญ้ามีผลผลิตต่อไร่ที่สูงขึ้น มีปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูง มีปริมาณของลิกนินต่ำ และมีความทนทานต่อสภาพพื้นที่ปลูกที่ไม่เหมาะสมได้ดีเพราะจะทำให้หญ้าชนิดนั้นๆ มีศักยภาพเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นพืชพลังงานมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้หากต้นทุนการผลิตเอทานอลยังมีค่าสูงก็ควรที่จะมีการปรับปรุงและพัฒนาในเรื่องต่างๆ ต่อไปเพื่อลดต้นทุนในการผลิต เช่น การพัฒนาเชื้อเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น การพัฒนาเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายและหมักเอทานอลได้ในคราวเดียวกัน และการหาสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของการผลิตเอทานอลจากหญ้าชนิดนั้นๆ เช่น การปรับสภาพวัตถุดิบ การผลิตเอนไซม์ และการหมักเพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดโดยมีค่าใช้จ่ายที่น้อยที่สุด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมปศุสัตว์. 2549. พืชอาหารสัตว์และอาหารโคเนื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมปศุสัตว์. กองอาหารสัตว์. 2551. สถิติพื้นที่ปลูกหญ้า/พืชอาหารสัตว์และทุ่งหญ้าสาธารณะ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/nutrition/Service_knowlage/data_stat/data_grass.htm [2 กันยายน 2551]

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมพัฒนาที่ดิน. 2541. ความรู้เรื่องหญ้าแฝก. (ม.ป.ท.).

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมพัฒนาที่ดิน. สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน. 2546. คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การขยายพันธุ์และการปลูกหญ้าแฝก. (ม.ป.ท.).

จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์ และคนอื่นๆ. 2545. หญ้าแพงโกล่า. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วารุณี พานิชผล, สมพล ไวปัญญา, เมธิน ศิริวงศ์ และเฉลียว ศรีชู. 2537. การศึกษาคุณค่าทางอาหารของหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides* Nash.) เพื่อใช้เป็นพืชอาหารสัตว์. ใน รายงานผลงานวิจัยและรายงานประจำปี 2537, หน้า 158-182. (ม.ป.ท.).

สภาผู้แทนราษฎร. คณะกรรมาธิการการพลังงาน. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. กรุงเทพมหานคร: แปลนพริ้นท์ติ้ง.

สายัณห์ ทัดศรี. 2540. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน: การผลิตและการจัดการ. กรุงเทพมหานคร: รั้วเขียว.

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

ภาษาอังกฤษ

American Paper and Pulp Association. 1965. The dictionary of paper, including pulp, paperboard, paper properties and related papermaking terms. 3 rd ed. New York: American Paper and Pulp Association.

Badger, P. C. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. In J. Janick and A. Whipkey (eds.),.Trends in new crops and new uses, pp. 17-21. Alexandria, VA: ASHS Press.

Balat, M., Balat, H., and Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science 34: 551-573.

Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Díaz, R., Steiner, J., and Eyzaguirre, J. 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: Purification and properties of two of the enzymes. Journal of Biotechnology 41: 71-79.

Bocchini, D. A., Oliveira, O. M. M. F., Gomes, E. Da Silva, R. 2005. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. Process Biochemistry 40: 3653-3659.

Brown, R. H., and Blaser, R. E. 1965. Relationships between reserve carbohydrate accumulation and growth rate in orchard grass and tall fescue. Crop Science 5: 577-581.

Brown, R. 2003. Biorenewable resources: Engineering new products from agriculture. Ames, IA: Iowa State Press.

Campbell, A. 2008. Plant structure and function [Online]. Available from: http://sci.waikato.ac.nz/farm/content/plantstructure.html [2009, March 12]

Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M., and Castro, E. 2006. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. Process Biochemistry 41: 423-429.

Carbohydrates [Online]. 2006. Available from: http://nutrition.jbpub.com/resources/chemistryreview9.cfm [2009, March 28]

Cardona, C. A., and Sánchez, O. J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. Bioresource Technology 98: 2415-2457.

Casey, et al. 2006. Starch structure [Online]. Available from: http://www.jic.ac.uk/STAFF/cliff-hedley/Starch.html [2009, March 27]

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.

Christakopoulos, P., Nerinckx, W., Kekosb, D., Macris, B., and Claeyssens, M. 1996. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. Journal of Biotechnology 51: 181-189.

Demirbas, A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass. Energy Sources 21: 327-337.

Dominguez, H., Nunez, M. J., Chamy, R., and Lema, J. 1993. Determination of kinetic parameters of fermentation processes by a continuous unsteady-state method: application to the alcoholic fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis*. Biotechnology and Bioengineering 41: 1129-1132.

Duff, S. J. B., Murray, W. D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: A review. Bioresource Technology 55: 1-33.

Du Preez, J. C., Bosch, M., and Prior, B. A. 1986. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Applied Microbiology and Biotechnology 23: 228-233.

Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A., and Hayn, M. 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. Bioresource technology 36: 51-65.

Fort, R. 2006. Xylanases [Online]. Available from: http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood14.html [2009, March 27]

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

Goering, H. K., and Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures, and some applications). In Agricultural Handbook No. 379, pp. 1-20. Washington, DC: US Government Printing Office.

Gregory, A. P. 2007. Green Energy [Online]. Available from: http://www.research.uky.edu/odyssey/winter07/green_energy.html [2009, March 28]

Grimshaw, R. G. 2006. Vetiver System: A Green Investment For Sustainable Development [Online]. Available from: http://www.vetiver.org/ICV4pdfs/ICV4-PROG-IN.htm [2009, March 3]

Grootjen, D. R. J., Jansen, M. L., van der Lans, R. G. J. M., and Luyben, K. Ch. A. M. 1991. Reactors in series for the complete conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology 13: 828-833.

Grootjen, D. R. J., van der Lans, R. G. J. M., and Luyben, K. Ch. A. M. 1990. Effects of the aeration rate on the fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis* CBS 5773. Enzyme and Microbial Technology 12: 20-23.

Guimarães, L. H. S., et al. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology 37: 474-480.

Guo, G. L., Chen, W. H., Chen, W. H., Men, L. C., and Hwang, W. S. 2008. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. Bioresource Technology 99: 6046-6053.

Gupta, R., Sharma, K. K., Kuhad, R. C. 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. Bioresource Technology 100: 1214-1220.

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., and Zacchi, G. 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends in Biotechnology 24: 549-556.

Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., and Prior, B. A. 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. Enzyme and Microbial Technology 16: 933-943.

Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G., and Faaij, A. PC. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. Biomass and Bioenergy 28: 384-410.

Hector, R., Hughes, S., and Liang-Li, X. 2008. Developing yeast strains for biomass-to-ethanol production [Online]. Available from: http://www.biomassmagazine.com/article.jsp?article_id=1533&q=&page=2 [2009, March 29]

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

Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E. L., and Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology 2: 602-619.

Isci, A., Himmelsbach, J. N., Pometto III,A. L., Raman, D. R., and Anex, R. P. 2008. Aqueous ammonia soaking of switchgrass followed by simultaneous saccharification and fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology 144: 69-77.

Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochemistry 40: 3519-3525.

Keshwani, D. R., and Cheng, J. J. 2009. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. Bioresource Technology 100: 1515-1523.

Kilian, S. G., and van Uden, N. 1988. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. Applied Microbiology and Biotechnology 27: 545-548.

Kim, T. H., and Lee, Y. Y. 2005. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. Applied Biochemistry and Biotechnology 124: 1119-1131.

Kumar, N. V., Linoj Dhavala, P., Goswami, A., and Maithel, S. 2006. Liquid biofuels in South Asia: Resources and technologies. Asian Biotechnology and Development Review 8: 31-49.

Laplace, J. M., Delgenes, J. P., Molettal, R., and Navarro, J. M. 1993. Cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* co-cultivated with a xylose-fermenting yeast. Journal of Fermentation and Bioengineering 75: 207-212.

Lee, D., Owens, V. N., Boe, A., and Jeranyama, P. 2007. Composition of herbaceous biomass feedstocks [Online]. Available from: http://ncsungrant.sdstate.org/ uploads/publications/SGINC1-07.pdf [2009, January 8]

Lee, J. H., Pagan, R. J., and Rogers, P. L. 1983. Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zymomonas mobilis*. Biotechnology and Bioengineering 25: 659-69.

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. Biomass and Bioenergy 32: 326-332.

Lu, Y., and Mosier, N. S. 2004. Enzyme mimetics for bioprocessing agricultural residues [Online]. Available from: http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/ presentations/doc/enzyme%20mimetic-mosier%20(ACS%202004).pdf [2009, March 10]

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

McLaughlin, S. B. 1993. New switchgrass biofuels research program for the southeast. In Proceedings of the Annual Automative Technology Development Contractor's Coordination Metting, pp. 111-115. (n. p.).

McMillan, J. D. 1997. Bioethanol production: status and prospects. Renewable Energy 10: 295–302.

Middleton, C. H. 1982. Dry matter and nitrogen changes in five tropical grasses as influenced by cutting height and frequency. Tropical Grassland 16: 112-117.

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

Morjanoff, P. J., and Gray, P. P. 1987. Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharfication. Biotechnology and. Bioengineering 29: 733-741.

Mosier, N., et al. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 96: 673-686.

Nigam, J. N. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. Journal of Biotechnology 87: 17-27.

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

Ninawe, S., and Kuhad, R. C. 2005. Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. Journal of Applied Microbiology 99: 1141-1148.

Öhgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J., and Zacchi, G. 2007. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. Process Biochemistry 42: 834-839.

Öhgren, K., et al. 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fibre content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. Journal of Biotechnology 26: 488-498.

Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B. 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme and Microbial Technology 18: 312-331.

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

Paturau, J. M. 1969. By-products of the cane sugar industry: An introduction to their industrial utilization. Amsterdam: Elsevier.

Persson, I., Tjerneld, F., and Hahn-Hägerdal, B. 1991. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. Process Biochemistry 26: 65-74.

Plotkin, J. F. 2006. PERF program-ethanol new report alert [Online]. Available from: http://www.chemsystems.com/reports/search/docs/abstracts/0405-8-abs.pdf [2009, January 9]

Prasad, S., Singh, A., and Joshi, H. C. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues. Resources, Conservation and Recycling 50: 1-39.

Purwadi, R. 2006. Continuous Ethanol Production from Dilute-acid Hydrolyzates: Detoxification and Fermentation Strategy. Doctoral dissertation. Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology.

Ragauskas, A. J. 2008. Chemical Composition of Wood [Online]. Available from: http://www.ipst.gatech.edu/faculty_new/faculty_bios/ragauskas/technical_revies/Chemical%20Overview%20of%20Wood.pdf [2009, March 20]

Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., and Tanticharoen, M. 1999. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. Applied and Environmental Microbiology 65: 694-697.

Richard, H. 2000. Wood chemistry, products and processes [Online]. Available from: http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869E/CHEM869ELinks/www.chem.vt.edu/chem-dept/helm/3434WOOD/info.html [2009, March 20]

Ritter, S. K. 2008. Lignocellulose: A complex biomaterial. Plant Biochemistry 86: 15.

Saha, B. C., and Cotta, M. A. 2006. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. Biotechnology Progress 22: 449-453.

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.

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

Shallom, D., and Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. Current Opinion in Microbiology 6: 219-228.

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.

Sivers, M. V., and Zacchi, G. 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. Bioresource Technology 51: 43-52.

Stutzenberger, F. 1994. Extracellular enzyme production by *Thermomonospora curvata* grown on bagasse. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 13: 35-42.

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

Sun, Y., and Cheng, J. J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. Bioresource Technology 96: 1599-1606.

Szakacs, G., and Tengerdy, R. P. 1997. Lignocellulolytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13: 487-490.

Tanaka, H., Muguruma, M. Ohta, K. 2006. Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene. Applied Microbiology Biotechnology 70: 202-211.

Taniguchi, M., Tohma, T., Itaya, T., and Fujii, M. 1997. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation and Bioengineering 83: 364-370.

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.

U. S. Department of Energy. 2007. Understanding biomass: plant cell walls [Online]. Available from: http://genomicsgtl.energy.gov/biofuels/placemat2.shtml [2009, March 16]

van der Reyden, D. 1992. Recent scientific research in paper conservation. Journal of the American Institute for Conservation 31: 117-138.

Vidal, P. F., and Molinier, J., 1988. Ozonolysis of lignin–improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. Biomass 16: 1-17.

Wayman, M., Parekh, R. S., and Parekh, S. R. 1987. Simultaneous saccharification and fermentation by mixed cultures of *Brettanomyces clausenii* and *Pichia stipitis* R of SO_2-prehydrolysed wood. Biotechnology Letters 9: 435-440.

Woodward, J. 1987. Utilization of cellulose as a fermentation substrate: Problems and potential. Special Publications of the Society for General Microbiology 21: 45-46.

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.

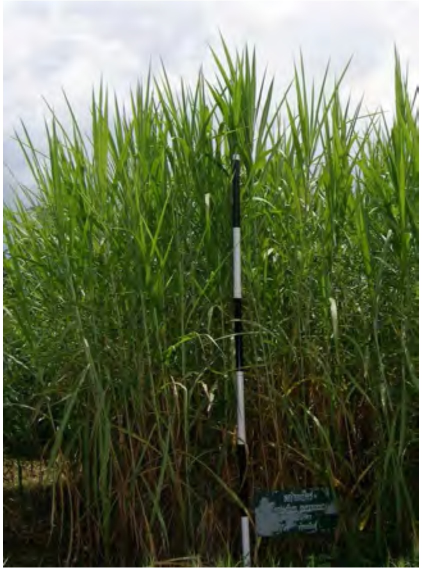
Wyman, C. E. 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. Bioresource Technology 50: 3-15.

Wyman, C. E., Spindler, D. D., and Grohmann, K. 1992. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. Biomass and Bioenergy 3: 301-307.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

หญ้าที่ใช้ในงานวิจัย



หญ้าเนเปียร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pennisetum purpureum*

ชื่อสามัญ หญ้าเนเปียร์ หรือ หญ้าเนเปียร์ธรรมดา (napier grass หรือ elephant grass)

แหล่งที่มา เป็นหญ้าพื้นเมืองของแอฟริกาเขตร้อน นำเข้าประเทศไทยเมื่อปีพ.ศ. 2472 จากประเทศมาเลเซียโดย นาย อาร์ .พี. โจนส์

ลักษณะทั่วไป เป็นหญ้าประเภทกอตั้ง มีอายุหลายปี ลำต้นมีขนาดใหญ่ แข็งแรง ประกอบด้วยลำต้นใต้ดินสั้นๆ และลำต้นที่ตั้งตรงขึ้นไปสูง 2 - 6 เมตร โดยแต่ละต้นจะมีจำนวนข้อประมาณ 15 - 20 ข้อ ใบมีสีเขียวอ่อนยาว 70 - 90 เซนติเมตร กว้าง 2 - 3 เซนติเมตร และมีเส้นกลางใบขนาดใหญ่ กาบใบมีขนเล็กๆ นุ่มมือ ลิ้นใบมีขนเล็กๆ สีขาวแข็ง ไม่มีเขี้ยวใบ ช่อดอกแบบ spike ยาวรูปทรงกระบอก ดอกย่อยอาจอยู่เดี่ยวหรือรวมกัน 2 - 3 กลุ่ม มีหางยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ช่อดอกมีสีเหลืองยาว 15 - 22 เซนติเมตร หนา 2 - 3 เซนติเมตร ติดเมล็ดน้อยมาก เมล็ดมีขนาดเล็กและมักไม่สมบูรณ์

แหล่งที่ปลูก ขึ้นได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย บริเวณที่จะปลูกควรเป็นบริเวณที่ไม่มีน้ำค้างแข็งหรืออุณหภูมิต่ำเกินไป หน้าดินควรลึก ดินควรระบายน้ำได้ดี ดินที่เหมาะสมควรเป็นดินร่วนซุย

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม ปรับตัวได้ดีในบริเวณที่มีฝนตกเฉลี่ย 1,000 มิลลิเมตรต่อปี เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 - 40 องศาเซลเซียส ทนแล้งได้ดีเนื่องจากมีระบบรากลึกแข็งแรงและหยั่งลึกลงไปในดิน ดินที่ปลูกควรเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง มีการระบายน้ำดี ไม่ชอบน้ำท่วมขังและไม่ทนทานต่อสภาพน้ำค้างแข็ง หญ้าเนเปียร์ทนทานต่อการถูกไฟเผาและบริเวณที่มีร่มเงาได้พอสมควร

หญ้าเนเปียร์แคระ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *P. purpureum* cv. Mott

ชื่อสามัญ หญ้าเนเปียร์แคระ (mott dwarf elephant grass)

แหล่งที่มา มีถิ่นกำเนิดในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา นำเข้ามาจากอเมริกาโดยองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) ในปีพ.ศ. 2531 และกรมปศุสัตว์ในปีพ.ศ. 2532

ลักษณะทั่วไป มีลักษณะเป็นกอตั้งรวมเป็นกลุ่ม มีหน่อที่แข็งแรง ส่วนของปล้องค่อนข้างสั้นและอวบน้ำ ลำต้นมีความสูงประมาณ 170 - 180 เซนติเมตรซึ่งเตี้ยกว่าหญ้าเนเปียร์ หน้าใบและหลังใบไม่มีขน กาบใบและขอบข้อมีขนหยาบปกคลุมชัดเจน มีสัดส่วนของใบมากกว่าลำต้นและออกดอกก่อนหญ้าเนเปียร์สายพันธุ์อื่นๆ

แหล่งที่ปลูก ในบริเวณภาคกลางสามารถขึ้นได้ดีในหลายพื้นที่ ดินไม่ควรเป็นดินเค็มและน้ำไม่ท่วมขังเป็นระยะเวลายาวนาน ในบริเวณภาคเหนือและภาคอีสานสามารถขึ้นได้แต่ต้องใส่ปุ๋ยเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ในขณะที่ภาคใต้ก็สามารถปลูกได้ดีเช่นกัน

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม หญ้าเนเปียร์แคระขึ้นได้ดีในดินหลายชนิด ตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว ชอบดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ทนแล้งได้ดีมากเนื่องจากมีระบบรากแข็งแรงและเหง้าใต้ดินขนาดใหญ่ ทนต่อสภาพน้ำขังได้นานแต่เจริญเติบโตไม่ดี ดังนั้นดินที่ปลูกจึงควรเป็นดินที่มีการระบายน้ำดี

หญ้าเนเปียร์ยักษ์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *P. purpureum* cv. King Grass

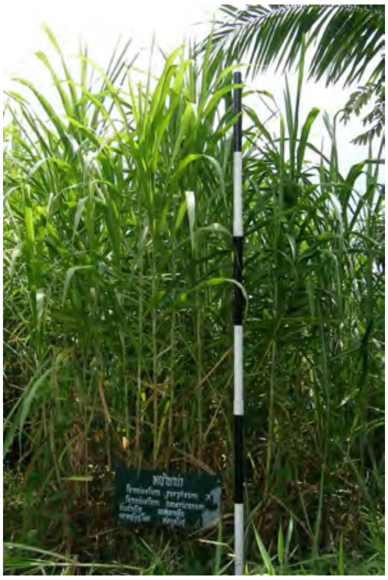
ชื่อสามัญ หญ้าเนเปียร์ยักษ์ (king grass)

แหล่งที่มา นำเข้ามาจากอินโดนีเซียในปีพ.ศ. 2533 โดยนายชาญชัย มณีดุลย์ เป็นหญ้าเนเปียร์ลูกผสมระหว่าง *P. Purpureum* กับ *P. americanum*

ลักษณะทั่วไป เป็นหญ้าประเภทกอตั้ง คล้ายอ้อย เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่สูง 3 - 4 เมตร มีความสูงมากกว่าหญ้าเนเปียร์ที่ปลูกในปัจจุบันยกเว้นหญ้าบาน่า

แหล่งที่ปลูก ควรเป็นพื้นที่ที่น้ำไม่ท่วมขัง ไม่ใช่ดินเค็มหรือดินลูกรัง หน้าดินลึก ในกรณีที่เป็นดินทรายควรมีการใช้ปุ๋ยคอกร่วมด้วย

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม หญ้าเนเปียร์ยักษ์ขึ้นได้ดีในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว ชอบดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงและดินต้องมีการระบายน้ำดี นอกจากนี้ยังสามารถทนแล้งได้ดีเพราะมีระบบรากลึก ไม่ชอบบริเวณร่มเงา



หญ้าบาน่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *P.purpureum x P.americanum*

แหล่งที่มา เป็นหญ้าเนเปียร์ลูกผสมระหว่าง *P. Purpureum* กับ *P. americanum*

ชื่อสามัญ หญ้าบาน่า (bana grass)

ลักษณะทั่วไป มีลักษณะเป็นกอใหญ่ลำต้นเป็นข้อ และปล้องคล้ายอ้อย ใบใหญ่ยาว มีขน เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่สูง 3 - 4 เมตร

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนปนทรายถึงดินเหนียว แต่ต้องการดินที่ระบายน้ำดี มีความอุดมสมบูรณ์สูง ไม่ทนต่อสภาพพื้นที่น้ำท่วมขัง เหมาะสำหรับปลูกในบริเวณพื้นที่มีฝนตกสม่ำเสมอเฉลี่ยมากกว่า 1,000 มิลลิเมตรต่อปี หรือมีการใช้น้ำชลประทานจะได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี

หญ้ากินนีสีม่วง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Panicum maximum* TD 58

ชื่อสามัญ หญ้ากินนีสีม่วง (purple guinea grass)

แหล่งที่มา เป็นหญ้าพื้นเมืองของแอฟริกาเขตร้อนและเขตอบอุ่น แต่ปลูกกันแพร่หลายในอเมริกาใต้ หมู่เกาะอินเดียตะวันตก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2444 โดยเจ้าพระยาสุริวงศ์

ลักษณะทั่วไป เป็นหญ้าที่มีอายุหลายปี ลำต้นตั้งตรง สูง 0.5 - 4.5 เมตร เจริญเติบโตแบบกอตั้ง ลำต้นแตกแขนงเป็นกอคล้ายกอตะไคร้ ที่ลำต้นมีไหลหรือแง่งอยู่ใต้ดินสั้นๆ สามารถแตกหน่อออก ทำให้มีลักษณะเป็นกอหรือพุ่ม ลำต้นที่ตั้งตรงประกอบด้วยข้อ 3 - 15 ข้อ ใบเรียวยาวตรง 12 - 40 เซนติเมตร กว้าง 35 มิลลิเมตร มีความสูง 2 - 3 เมตร หญ้ากินนีสีม่วงมีลักษณะเด่น คือ ส่วนของข้อ ปล้อง และเมล็ดมีสีม่วงอมเขียว ใบค่อนข้างใหญ่และดก สัดส่วนของใบมากกว่าลำต้น มีการแตกกอดี

แหล่งที่ปลูก หญ้ากินนีสีม่วงสามารถปลูกได้เกือบทุกสภาพพื้นที่ ซึ่งเป็นที่ดอนตั้งแต่ดินเหนียวจนถึงดินทรายที่มีการระบายน้ำดี ในสภาพดินค่อนข้างเค็มก็สามารถให้ผลผลิตได้

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีน้ำฝนเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 900 มิลลิเมตรต่อปี จึงทนแล้งได้บ้างถ้าระยะเวลาของความแห้งแล้งไม่นานเกินไป ขึ้นได้ในดินหลายชนิด แต่จะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีการระบายน้ำดี

หญ้ารูซี่

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brachiaria ruziziensis*

ชื่อสามัญ หญ้ารูซี่ หญ้าคองโก หรือหญ้าเคนเนดี้รูซี่ (ruzi grass)

แหล่งที่มา มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาแถบประเทศคองโก นำเข้าประเทศไทยครั้งแรกจากประเทศออสเตรเลียเมื่อปี พ.ศ. 2511 โดยฟาร์มโคนมไทย-เดนมาร์ค

ลักษณะทั่วไป เป็นหญ้าที่มีอายุหลายปี มีลักษณะการเจริญเติบโตเป็นแบบกึ่งเลื้อยกึ่งตั้ง คล้ายหญ้าขน ซึ่งจัดเป็นพวก stoloniferous สูงประมาณ 60 - 100 เซนติเมตร ลำต้นกลม แข็ง เรียวเล็ก แต่มีใบเล็กและดกกว่าหญ้าขน ปราศจากขนที่ลำต้น มีรากที่แตกแขนงบริเวณโคนต้น ใบสีเขียวอ่อนมีลักษณะคล้ายหอก อ่อนนุ่ม มีขนละเอียดคลุมทั้งด้านหน้าและหลังใบ ใบยาว 13 - 15 เซนติเมตร กว้าง 0.8 - 2.5 เซนติเมตร ลิ้นใบมีลักษณะแบบขนแข็ง (ciliate rim) มีช่อดอกแบบ raceme กลุ่มดอกมีขนปกคลุม และ low glume สั้น (ยาวไม่เกินครึ่งหนึ่งของดอก) ใน 1 กิโลกรัม มีเมล็ดประมาณ 270,000 เมล็ด

แหล่งที่ปลูก ปลูกแพร่หลายในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเนื่องจากแพร่พันธุ์ด้วยเมล็ด พื้นที่ปลูกควรเป็นพื้นที่ที่น้ำไม่ท่วมขัง ดินไม่เค็มและหน้าดินลึกพอสมควร

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้นที่มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 1,000 มิลลิเมตรขึ้นไป ชอบดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง และมีการระบายน้ำดี ไม่ทนต่อสภาพน้ำขังเป็นระยะเวลายาวนาน อยู่รอดได้ในช่วงฤดูแล้ง แต่ไม่ให้ผลผลิต

หญ้าแพงโกล่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Digitaria decumbens*

ชื่อสามัญ หญ้าแพงโกล่า (pangola grass)

แหล่งที่มา อยู่ในแถบกึ่งร้อนของแอฟริกา

ลักษณะทั่วไป มีลำต้นทอดนอนไปตามพื้นดิน แตกรากและหน่อตามข้อ ยอดที่แตกขึ้นมาเป็นลำต้นอาจจะตั้งตรงหรือกึ่งตั้ง เมื่ออายุมากขึ้นลำต้นจะทอดนอนไปตามผิวดิน ลักษณะของลำต้นเล็กไม่มีขน ยาว 40 - 64 เซนติเมตร มีปล้องจำนวน 7 - 13 ปล้อง ปล้องยาว 3 - 8 เซนติเมตร มีใบมาก ตัวใบมีลักษณะเรียว เล็ก ยาวประมาณ 12 - 19 เซนติเมตร กว้างประมาณ 4 มิลลิเมตร กาบใบยาว 2 - 6 เซนติเมตร

แหล่งที่ปลูก ขึ้นได้ดีในดินหลายชนิด ยกเว้นดินเค็ม ปรับตัวได้ดีเป็นพิเศษกับดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ มีน้ำท่วมขังในฤดูฝน เช่น ดินชุดร้อยเอ็ด ดินชุดโคราช ซึ่งคลุมพื้นที่ทั่วไปในอีสานใต้

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่ฝกตกเฉลี่ยมากกว่า 1,000 มิลลิเมตรต่อปี อุณหภูมิอยู่ในช่วง 19 - 35 องศาเซลเซียส ขึ้นได้ในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว ทนแล้งได้ดีแต่ก็สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ชื้นแฉะ ที่ชุ่มน้ำ ทนน้ำขัง เหมาะสำหรับปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงและสามารถควบคุมการให้น้ำได้ตลอดทั้งปี จึงสามารถปลูกได้ทั้งในพื้นที่ลุ่มและพื้นที่ดอน

หญ้าอะตราตัม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Paspalum atratum*

ชื่อสามัญ หญ้าอะตราตัม หรือหญ้าอุบลพาสพาลัม (atratum grass หรือ ubon paspalum grass)

แหล่งที่มา เป็นหญ้าพื้นเมืองที่พบในรัฐ Mato Grosso do sul รัฐ Goias และรัฐ Geriais ประเทศบราซิล นำเข้ามาในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2537

ลักษณะทั่วไป มีใบดก สีเขียวสดเป็นมัน ลักษณะลำต้นตั้งเป็นกอ มีระบบรากฝอยที่แน่นหนา ถ้าปล่อยทิ้งไว้ไม่ตัดต้นจะสูงถึง 2 เมตร แต่ละกอมีหน่อประมาณ 20 - 25 หน่อ แผ่นใบยาว 50 เซนติเมตร กว้าง 3 - 4 เซนติเมตร ใบไม่มีขน แต่กาบใบมีขนเล็กน้อย และเมื่อหญ้ามีอายุมากขึ้นขอบใบจะคม

แหล่งที่ปลูก ขึ้นได้ดีในดินหลายชนิด ยกเว้นดินเค็ม เช่น ดินชุดร้อยเอ็ด ดินชุดโคราช ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ทั่วไปในอีสานใต้

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม สามารถปรับตัวและเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ดินกรด และทนต่อสภาพน้ำท่วมขัง แต่ไม่ทนสภาพที่แห้งแล้งยาวนาน

หญ้าแฝก

หญ้าแฝกทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ที่ใช้ เป็นหญ้าแฝกหอมหรือหญ้าแฝกลุ่ม 4 กลุ่มพันธุ์ และเป็นหญ้าแฝกดอน 6 กลุ่มพันธุ์

หญ้าแฝกหอมหรือหญ้าแฝกลุ่ม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Vetiveria zizanioides* Nash

แหล่งที่มา นำมาจากอินเดีย ศรีลังกา และอินโดนีเซีย

ลักษณะทั่วไป หญ้าแฝกหอมมีใบยาว 45 - 100 เซนติเมตร กว้าง 0.6 - 1.2 เซนติเมตร มีหลังใบโค้งปลายใบแบนมีสีเขียวเข้ม เนื้อใบค่อนข้างเนียน มีไขเคลือบ (wax) มากทำให้ดูมัน ท้องใบออกสีขาวซีดกว่าด้านหลังใบ และเมื่อนำใบส่องดูกับแดดจะเห็นรอยกั้นขวางในเนื้อใบ (septum) ค่อนข้างชัดเจน โดยเฉพาะพื้นใบบริเวณส่วนโคนและกลางใบ เส้นกลางใบ (midrib) ฝังอยู่ในตัวแผ่นใบไม่โตหรือเด่นชัดเจน รากมีน้ำมันหอมระเหยอยู่เฉลี่ย 1.4 - 1.6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง หญ้าแฝกหอมที่อายุประมาณ 1 ปี จะมีรากที่หยั่งลึกได้ประมาณกว่า 1 เมตร ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพของดินและความสมบูรณ์ของพืชในสภาพธรรมชาติ ดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำได้ดีหญ้าแฝกจะให้รากยาวที่สุด

แหล่งที่ปลูก พบขึ้นอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ มีการกระจายขึ้นอยู่ในสภาพแวดล้อมต่างๆ

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีและเป็นไปได้ค่อนข้างรวดเร็ว

หญ้าแฝกหอมจำนวน 4 กลุ่มพันธุ์ ได้แก่

1. กลุ่มพันธุ์ศรีลังกา

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินลูกรังอากาศหนาวเย็น มีร่มเงา แตกกอ 10 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 11 เซนติเมตร สูง 101 เซนติเมตร แตกกอค่อนข้างหลวม หน่อกลม ยืดปล้องเร็ว โคนกอเล็ก ใบแก่ค่อนข้างเล็ก ท้องใบสีขาวน้อยใกล้เคียงไปทางด้านใบหญ้าแฝกดอน ดอกมีสีม่วง เริ่มออกดอกเมื่ออายุประมาณ 1 เดือนหลังจากปลูก ขยายพันธุ์ง่ายในสภาพที่มีความชื้นสูง

2. กลุ่มพันธุ์กำแพงเพชร 2

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินทรายถึงดินลูกรัง แตกกอ 18 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 8 เซนติเมตร สูง 94 เซนติเมตร แตกกอค่อนข้างหลวม หน่อกลมค่อนข้างเล็ก ยืดปล้องเร็ว ทรงพุ่มกาง ใบสีเขียวเข้ม ท้องใบสีขาวดอกสีม่วงแดง ออกดอกเมื่ออายุประมาณครึ่งเดือนหลังจากปลูกต้นโตปล้องไม่ตรงให้น้ำหนักสดสูง

3. กลุ่มพันธุ์สุราษฎร์ธานี

เจริญเติบโตในสภาพพื้นที่เป็นดินร่วนเหนียวและดินลูกรัง แตกกอ 22 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 13 เซนติเมตร สูง 108 เซนติเมตร แตกกอหลวม หน่อกลมอวบ ยืดปล้องเร็ว ทรงพุ่มกางมาก ใบสีเขียวอ่อน ท้องใบขาว ดอกสีม่วงแดง ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 1 เดือนหลังจากปลูก

4. กลุ่มพันธุ์สงขลา 3

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินร่วนเหนียวทรายถึงลูกรัง แตกกอ 24 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 13 เซนติเมตร สูง 112 เซนติเมตร แตกกอหลวม หน่อกลมอวบยืดปล้องเร็ว ใบสีเขียวอ่อน ท้องใบสีขาว ดอกสีม่วงแดง ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 1 เดือนครึ่งหลังจากปลูก

หญ้าแฝกดอน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Vetiveria nemoralis* A. Camus

แหล่งที่มา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศไทย ลาว เขมร เวียดนาม และมาเลเซีย

ลักษณะทั่วไป หญ้าแฝกดอนมีใบยาว 35 - 80 เซนติเมตร กว้าง 0.4 - 0.8 เซนติเมตร ใบสีเขียวซีด หลังใบพับเป็นสันสามเหลี่ยมเนื้อใบหยาบ สากคาย มีไขเคลือบน้อยทำให้ดูกร้านไม่เหลือบมัน ท้องใบสีเดียวกับด้านหลังใบแต่มีสีซีดกว่า แผ่นใบเมื่อส่องกับแดดไม่เห็นรอยกั้นในเนื้อใบ เส้นกลางใบสังเกตได้ชัดเจน มีลักษณะแข็งเป็นแกนนูนทางด้านหลังใบ ยอดกอส่วนปลายจะแผ่โค้งลง

คล้ายกอตะไคร้ไม่ตั้งมากเหมือนหญ้าแฝกหอม หญ้าแฝกดอนและหญ้าแฝกหอมที่มีอายุเท่ากัน หญ้าแฝกดอนจะมีรากที่สั้นกว่า โดยทั่วไปหญ้าแฝกที่มีอายุประมาณ 1 ปี จะมีรากลึกประมาณ 80 - 100 เซนติเมตร ช่อดอกของหญ้าแฝกดอนจะมีได้หลายสีซึ่งเป็นลักษณะปกติประจำถิ่น ที่พบทั่วไปได้แก่ ช่อดอกสีขาวครีมถึงสีม่วงอมแดง

แหล่งที่ปลูก พบได้ทั่วไปในที่ค่อนข้างแล้งหรือที่ดินระบายน้ำได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะในป่าเต็งรัง แต่จะมีน้อยในภาคใต้ สามารถขึ้นได้ดีในที่แดดปานกลาง

หญ้าแฝกดอนจำนวน 6 กลุ่มพันธุ์ ได้แก่

1. กลุ่มพันธุ์เลย

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินร่วนเหนียว แตกกอ 26 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 13 เซนติเมตร สูง 108 เซนติเมตร การแตกกอแน่น ตั้งตรง ใบสีเขียว กาบใบสีชมพู ดอกสีม่วง เริ่มออกดอกอายุประมาณ 1 เดือนหลังจากปลูก

2. กลุ่มพันธุ์นครสวรรค์

เจริญเติบโตในสภาพพื้นที่เป็นดินทรายถึงร่วนเหนียว แตกกอ 35 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 13 เซนติเมตร สูง 108 เซนติเมตร การแตกกอแน่น ตั้งตรง ใบสีเขียว กาบใบสีชมพู ดอกสีม่วง เริ่มออกดอกอายุประมาณ 1 เดือนหลังจากปลูก

3. กลุ่มพันธุ์กำแพงเพชร 1

เจริญเติบโตในสภาพพื้นที่เป็นดินทรายถึงดินร่วนเหนียว แตกกอ 34 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 12 เซนติเมตร สูง 106 เซนติเมตร แตกกอแน่น ตั้งตรง ใบสีเขียวนวล กาบใบสีฟ้านวล ดอกสีม่วง เริ่มออกดอกเมื่ออายุประมาณครึ่งเดือนหลังจากปลูก

4. กลุ่มพันธุ์ร้อยเอ็ด

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินทรายแตกกอ 26 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 7 เซนติเมตร สูง 70 เซนติเมตร แตกกอแน่น ตั้งตรง ใบสีเขียว ดอกสีน้ำตาล เริ่มออกดอกเมื่ออายุประมาณครึ่งเดือนหลังจากปลูก

5. กลุ่มพันธุ์ราชบุรี

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินทรายถึงดินร่วนเหนียว แตกกอ 32 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 12 เซนติเมตร สูง 110 เซนติเมตร แตกกอแน่น ตั้งตรง ใบสีเขียวอ่อน กาบใบออกสีน้ำตาล เริ่มออกดอกเมื่ออายุประมาณ 1 เดือนหลังจากปลูก เป็นกลุ่มพันธุ์ที่ให้น้ำหนักพืชสดดี

6. กลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินร่วนเหนียว และลูกรัง แตกกอ 26 ต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางกอ 14 เซนติเมตร สูง 112 เซนติเมตร แตกกอแน่น หน่อใหญ่ตั้งตรงใบหนาสีเขียวเข้ม ร่องโคนใบขาว กาบใบออกสีขาวนวล ออกดอกช้าบางแห่งใน 2 ปีแรกยังไม่ออกดอกหรือมีเปอร์เซ็นต์ออกดอกน้อย ดอกสีม่วงช่อดอกเล็ก

ความเหมาะสมของพันธุ์หญ้าแฝกในสภาพพื้นที่ต่าง ๆ

พื้นที่ดินทราย

- หญ้าแฝกดอน 4 กลุ่มพันธุ์ คือ นครสวรรค์, กำแพงเพชร 1, ร้อยเอ็ด และราชบุรี
- หญ้าแฝกหอม 2 กลุ่มพันธุ์ คือ กำแพงเพชร 2 และสงขลา 3

พื้นที่ดินร่วน-เหนียว

- หญ้าแฝกดอน 5 กลุ่มพันธุ์ คือ เลย, นครสวรรค์, กำแพงเพชร 1, ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์
- หญ้าแฝกหอม 2 กลุ่มพันธุ์ คือ สุราษฎร์ธานี และสงขลา 3

พื้นที่ดินลูกรัง

- หญ้าแฝกดอน 2 กลุ่มพันธุ์ คือ เลย และประจวบคีรีขันธ์
- หญ้าแฝกหอม 4 กลุ่มพันธุ์ คือ ศรีลังกา, กำแพงเพชร 2, สุราษฎร์ธานี และสงขลา 3

กลุ่มพันธุ์ที่เหมาะสำหรับภาคต่าง ๆ มีดังต่อไปนี้

ภาคเหนือ

- กลุ่มพันธุ์ที่เหมาะสมคือ ศรีลังกา นครสวรรค์ และกำแพงเพชร 1

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

- กลุ่มพันธุ์ที่เหมาะสมคือ ร้อยเอ็ด และสงขลา 3

ภาคกลางและภาคตะวันออก

- กลุ่มพันธุ์ที่เหมาะสมคือ ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี กำแพงเพชร 1 กำแพงเพชร 2 สุราษฎร์ธานี และสงขลา 3 ที่สามารถขึ้นได้ในสภาพดินเค็ม คือ ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้

- กลุ่มพันธุ์ที่เหมาะสมคือ สงขลา 3 และสุราษฎร์ธานี

ภาคผนวก ข

ผลผลิตน้ำหนักแห้งของหญ้าที่ใช้ในงานวิจัย

ผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าทั้ง 18 ชนิด

หญ้า	ผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่/ปี)
แพงโกล่า	6,000
เนเปียร์	3,500
เนเปียร์แคระ	3,500
เนเปียร์ยักษ์	3,500
บาน่า	3,500
กินนีสีม่วง	3,000
อะตราตัม	3,000
รูซี่	2,250
แฝกกลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์	1,352
แฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรี	1,216
แฝกกลุ่มพันธุ์กำแพงเพชร 1	1,032
แฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกา	1,020
แฝกกลุ่มพันธุ์กำแพงเพชร 2	967
แฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา 3	929
แฝกกลุ่มพันธุ์สุราษฎร์ธานี	884
แฝกกลุ่มพันธุ์เลย	788
แฝกกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์	676
แฝกกลุ่มพันธุ์ร้อยเอ็ด	566

หมายเหตุ : ข้อมูลของหญ้าอาหารสัตว์มาจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมปศุสัตว์ (2549) และข้อมูลของหญ้าแฝกมาจากวารุณี พานิชผล และคณะ (2537)

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. potato dextrose agar (PDA)

เติม potato dextrose agar สำเร็จรูป (ยี่ห้อ Difco) ปริมาณ 39 กรัม ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลวสำหรับผลิตเซลลูเลส (ดัดแปลงมาจากสูตรของ Mandels และ Weber, 1969)

แอลฟา-เซลลูโลส	10.0	กรัม
ยูเรีย	0.3	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.4	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.4	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.3	กรัม
เปบโตน	0.75	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.25	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	5.0	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	1.2	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.4	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	2.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นแอลฟา-เซลลูโลสในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ชั่งแอลฟา-เซลลูโลส 1 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมส่วนผสมทั้งหมดที่ละลายเข้ากันดีแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงไปในแต่ละฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเหลวสำหรับผลิตไซแลเนส (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539)

ไซแลน (birchwood xylan)	10.0	กรัม
corn steep liquor	5.0	กรัม
พอลิเปปโตน (universal peptone)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	4.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.02	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นไซแลนในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ชั่งไซแลน 1 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมส่วนผสมทั้งหมดที่ละลายเข้ากันดีแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงไปในแต่ละฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. yeast malt agar (YMA) (Laplace และคณะ, 1993)

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3.0	กรัม
เปบโตน	5.0	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นผงวุ้นในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.0 แล้วค่อยเติมวุ้นผงลงไป จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. yeast malt broth (YMB) (Laplace และคณะ, 1993)

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	5.0	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (สำหรับ *S. cerevisiae*)	20.0	กรัม
น้ำตาลไซโลส (สำหรับ *P. stipitis*)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 5.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวลพืช

1.1 สารละลาย neutral detergent

(1) ชั่งเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมไดไฮเดรต ปริมาณ 16.18 กรัม และโซเดียมเตตระบอเรตเดคะไฮเดรต ปริมาณ 6.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 400 มิลลิลิตร นำไปต้มจนละลายหมด

(2) ชั่งโซเดียมลัวริลซัลเฟต ปริมาณ 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 400 มิลลิลิตร แล้วเติม 2-เอทอกซีเอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป

(3) ผสมสารละลายในข้อ (1) และ (2) เข้าด้วยกัน

(4) ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส ปริมาณ 4.56 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนละลายหมดแล้วนำไปผสมกับสารละลายในข้อ (4) ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.9 - 7.1 แล้วปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลาย acid detergent

(1) เตรียมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล โดยตวงจากกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (98 เปอร์เซ็นต์โดยมวล) ปริมาตร 27.2 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดลงในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

(2) ชั่งเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ปริมาณ 20 กรัม ละลายในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยกรดนี้

1.3 สารละลาย saturated potassium permanganate

ชั่งโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ปริมาณ 50 กรัม และซิลเวอร์ซัลเฟต ปริมาณ 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดแก้วสีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

1.4 สารละลาย lignin buffer

ชั่งไอออนไนเตรตโนนะไฮเดรต ปริมาณ 6 กรัม และซิลเวอร์ไนเตรต ปริมาณ 0.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดอะซิติก ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โพแทสเซียมอะซิเทต ปริมาณ 5 กรัม และเทอร์เชียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

1.5 สารละลาย combined permanganate

ผสมสารละลาย saturated potassium permanganate กับ lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดแก้วสีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น ถ้าสารละลายกลายเป็นสีแดงจะไม่สามารถใช้ได้

1.6 สารละลาย demineralizing

ชั่งออกซาลิกแอซิดไดไฮเดรต ปริมาณ 50 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลาย DNS reagent สำหรับวัดแอกทิวิตี (Ghose, 1987)

น้ำกลั่น	1416.0	มิลลิลิตร
3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด	10.6	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	19.8	กรัม
ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วเติม		
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต	306.0	กรัม
ฟีนอล (เป็นของแข็งให้ละลายที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C)	7.6	มิลลิลิตร
โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์	8.3	กรัม

เมื่อผสมเข้ากันดีแล้ว นำสารละลาย DNS reagent ที่ได้ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

3. สารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 หรือ 5.0

ชั่งไตรโซเดียมซิเทรตไดไฮเดรตปริมาณ 14.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.8 หรือ 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 3 โมลาร์ ปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร

ชั่งไซแลน (birchwood xylan) ปริมาณ 1 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 ปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำไปตั้งบนเครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก ให้ความร้อนจนเดือด แล้วปล่อยให้เย็นลงโดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลา 1 คืน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยสารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8

5. สารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน

5.1 สารละลายไบยูเรต

1% คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.5	มิลลิลิตร
2% โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต	0.5	มิลลิลิตร
2% โซเดียมคาร์บอเนต ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์	50.0	มิลลิลิตร

5.2 สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์

โฟลินฟีนอลรีเอเจนท์	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

6. สารละลายสำหรับการปรับสภาพวัตถุดิบ

6.1 สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ตวงสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยมวล ปริมาตร 313.14 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

6.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร

6.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4 โมลาร์ (ใช้สำหรับปรับ pH)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 160 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร

7. สารละลาย DNS reagent สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959)

น้ำกลั่น	1	ลิตร
3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด	10	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	16	กรัม
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต	300	กรัม

เมื่อผสมเข้ากันดีแล้ว นำสารละลาย DNS reagent ที่ได้ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

8. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร

9. สารละลาย 1-โพรพานอล ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูด 1-โพรพานอล ความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 18.69 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย ultrapure water

ภาคผนวก จ

การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลของพืช

การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลของพืช (Goering and Van Soest, 1970)

1. **การวิเคราะห์หา** neutral detergent fiber (NDF)

1.1 นำครูซิเบิล (sintered glass crucible) เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปล้างให้สะอาดแล้วอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักครูซิเบิลด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 1 กรัม ใส่ในฟลาสก์ก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร

1.3 เติมสารละลาย neutral detergent ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ดังแสดงใน (ภาคผนวก ง) โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ปริมาณ 0.5 กรัม และเดคะไฮโดรแนพทาลีน ($C_{10}H_{18}$) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปรีฟลักซ์ด้วยชุดอุปกรณ์รีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

1.4 ถ่ายส่วนผสมที่รีฟลักซ์เสร็จแล้วลงในครูซิเบิลที่วางอยู่บนที่ยึด (crucible holder) ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิลด้วยน้ำร้อน (อุณหภูมิ 90 - 100 องศาเซลเซียส) ประมาณ 1,000 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะไล่สารละลายที่ใช้ออกจนหมด โดยการดูดน้ำออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ (suction pump)

1.5 ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิลด้วยอะซิโตนประมาณ 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิลไม่มีสี โดยการดูดสารละลายออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศจนแห้ง จากนั้นนำครูซิเบิลไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.6 นำครูซิเบิลออกมาตั้งทิ้งให้ไว้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครูซิเบิลที่รวมกับน้ำหนัก NDF ดังนั้นจึงคำนวณหาปริมาณ neutral detergent fiber (NDF) ได้ดังสมการ

$$\text{ปริมาณ NDF (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{[(\text{น้ำหนักครูซิเบิล} + \text{น้ำหนัก NDF}) - \text{น้ำหนักครูซิเบิล}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

2. การวิเคราะห์หา acid detergent fiber (ADF)

2.1 นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วยสารละลาย neutral detergent มาใส่ในฟลาสก์ก้นกลม เพื่อทำการรีฟลักซ์ด้วยสารละลาย acid detergent (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเดคะไฮโดรแนพทาลีนปริมาตร 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

2.2 กรองตัวอย่างพืชในครูซิเบิลใบเดิม ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิลด้วยน้ำร้อน (90 - 100 องศาเซลเซียส) ประมาณ 1,000 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะไล่สารละลายที่ใช้ออกจนหมด

2.3 ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิลด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิลไม่มีสี โดยการดูดสารละลายออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศจนแห้ง จากนั้นนำครูซิเบิลไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.4 นำครูซิเบิลออกมาตั้งทิ้งให้ไว้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครูซิเบิลที่รวมกับน้ำหนัก ADF ดังนั้นจึงคำนวณหาปริมาณ acid detergent fiber (ADF) และปริมาณเฮมิเซลลูโลสได้ดังสมการ

$$\text{ปริมาณ ADF (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{[(\text{น้ำหนักครูซิเบิล} + \text{น้ำหนัก ADF}) - \text{น้ำหนักครูซิเบิล}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) = ปริมาณ NDF - ปริมาณ ADF

3. การวิเคราะห์หา permanganate lignin (PML)

3.1 เติมสารละลาย combined permanganate (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในครูซิเบิลที่มีตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วยสารละลาย acid detergent แช่ครูซิเบิลลงในถาดที่มีน้ำเย็นบรรจุอยู่สูงประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้แท่งแก้วคนตัวอย่างเพื่อไม่ให้จับตัวเป็นก้อน ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที คนเป็นบางครั้ง จากนั้นดูดสารละลายออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ แล้วเติมสารละลาย combined permanganate ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในครูซิเบิลอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้อีก 45 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกให้หมดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ

3.2 เติมสารละลาย demineralizing (ภาคผนวก ง) ลงในครูซิเบิลให้ท่วมตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิล ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วดูดสารละลายออก ทำซ้ำจนตัวอย่างพืชเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ

3.3 ล้างตัวอย่างพืชด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง และตามด้วยอะซิโตนประมาณ 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วดูดสารละลายออกให้หมดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ จากนั้นนำครูซิเบิลไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.4 นำครูซิเบิลออกมาตั้งทิ้งให้ไว้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครูซิเบิลที่รวมกับน้ำหนักของตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดเอาลิกนินออกแล้ว (PML) ดังนั้นจึงคำนวณหาปริมาณลิกนิน (เปอร์เซ็นต์) ได้ดังสมการ

$$\text{ปริมาณลิกนิน} = \frac{[(\text{น้ำหนักครูซิเบิล} + \text{น้ำหนัก ADF}) - (\text{น้ำหนักครูซิเบิล} + \text{น้ำหนัก PML})] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

4. การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

นำครูซิเบิลที่มีตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการสกัดลิกนินออกแล้วในข้อไปเผาในเตาเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตั้งทิ้งให้ไว้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครูซิเบิลรวมกับน้ำหนักเถ้าที่เหลือจากการเผา ดังนั้นจึงคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) ได้ดังสมการ

$$\text{ปริมาณเซลลูโลส} = \frac{[(\text{น้ำหนักครูซิเบิล} + \text{น้ำหนัก PML}) - (\text{น้ำหนักครูซิเบิล} + \text{น้ำหนักเถ้า})] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

ภาคผนวก ฉ

การวัดแอกทิวิตีของเซลลูเลสและไซแลเนส

1. การวัดแอกทิวิตีของเซลลูเลส (FPU assay)

1.1 วิธีการวัด

(1) นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

(2) เติมสารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน

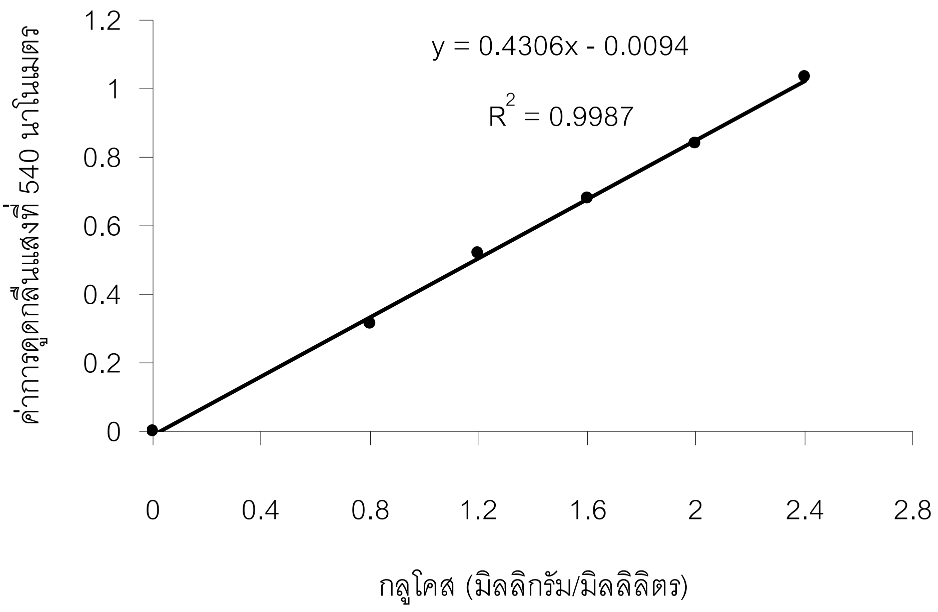
(3) นำไปบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(4) เติมสารละลาย DNS reagent สำหรับวัดแอกทิวิตี (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

(5) ดูดสารในหลอดทดลองข้อ (4) มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.8 - 2.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์

1.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์แอกทิวิตีของเซลลูเลส

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 และ 2.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีข้อ 1.1 โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนเอนไซม์ แต่ไม่ต้องใส่กระดาษกรองและไม่ต้องนำไปบ่ม เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ (5) นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส



กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

1.3 การคำนวณหาค่าแอกทิวิตีของเซลลูเลส

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 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

นั่นคือระยะเวลา 60 นาที จะมีกลูโคสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ 5.556X ไมโครโมล

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

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จะมีกลูโคสเท่ากับ 0.0926X ไมโครโมล/นาที

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

ซึ่งเท่ากับ 0.185X ยูนิต/มิลลิลิตร (FPU/มิลลิลิตร)

2. การวัดแอกทิวิตีของไซแลเนส

2.1 วิธีการวัด

(1) นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

(2) เติมสารละลายไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร (ภาคผนวก ง) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

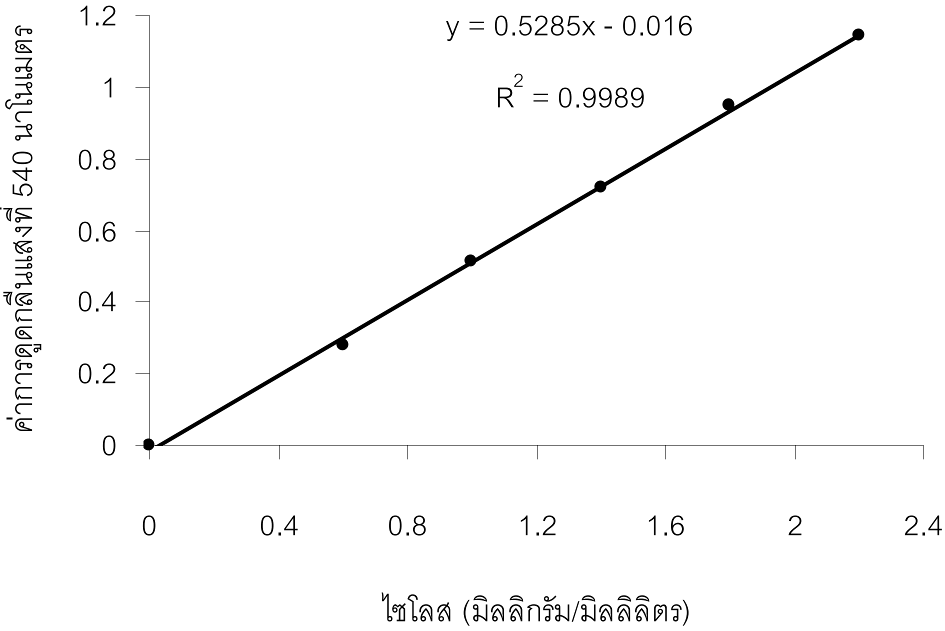
(3) นำไปบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(4) เติมสารละลาย DNS reagent สำหรับวัดแอกทิวิตี ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

(5) ดูดสารในหลอดทดลองข้อ (4) มาปริมาตร 75 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.6 - 2.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์

2.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลสสำหรับวิเคราะห์แอกทิวิตีของไซแลเนส

เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 และ 2.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเทรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สารละลายน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนเอนไซม์ แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 2.1 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลส



กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลส

2.3 การคำนวณหาค่าแอกทิวิตีของไซแลเนส

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

1 ยูนิตของเอนไซม์ = 1 ไมโครโมลของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 0.150 มิลลิกรัมของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม มีค่าเท่ากับ 1 ไมโครโมล

ถ้าเอนไซม์ย่อยสลายได้ไซโลส Y มิลลิกรัม จะมีค่าเท่ากับ $\frac{Y}{0.150}$ หรือ 6.667Y ไมโครโมล

นั่นคือระยะเวลา 30 นาที จะมีไซโลสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ 6.667Y ไมโครโมล

ระยะเวลา 1 นาที จะมีไซโลสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ $\frac{6.667Y}{30}$ หรือ 0.222Y ไมโครโมล/นาที

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จะมีไซโลสเท่ากับ 0.222Y ไมโครโมล/นาที

เมื่อใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร จะมีไซโลสเท่ากับ $\frac{0.222Y}{0.5}$ หรือ 0.444Y ไมโครโมล/นาที/มิลลิลิตร

ซึ่งเท่ากับ 0.444Y ยูนิต/มิลลิลิตร

ภาคผนวก ช

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (BSA)

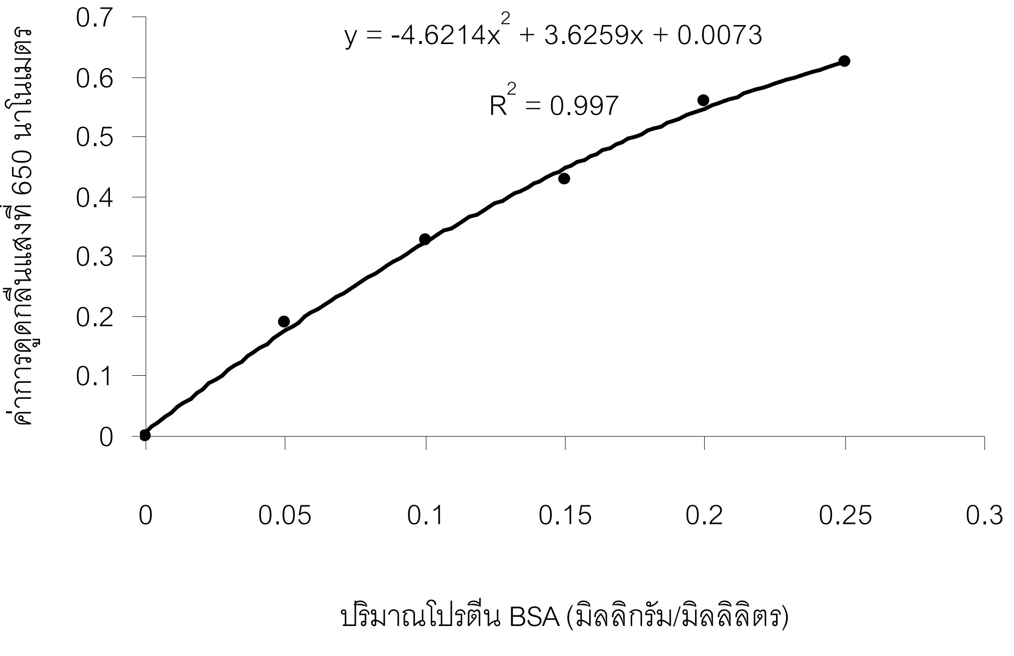
วิธีการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA

(1) เตรียมสารละลายโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท

(2) เติมสารละลายไบยูเรต (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

(3) เมื่อครบ 10 นาที เติมสารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงไป โดยผสมให้เข้ากันโดยเร็ว และบ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(4) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท และใช้น้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นแบลงค์แทนสารละลาย BSA นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA



กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA

2. กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

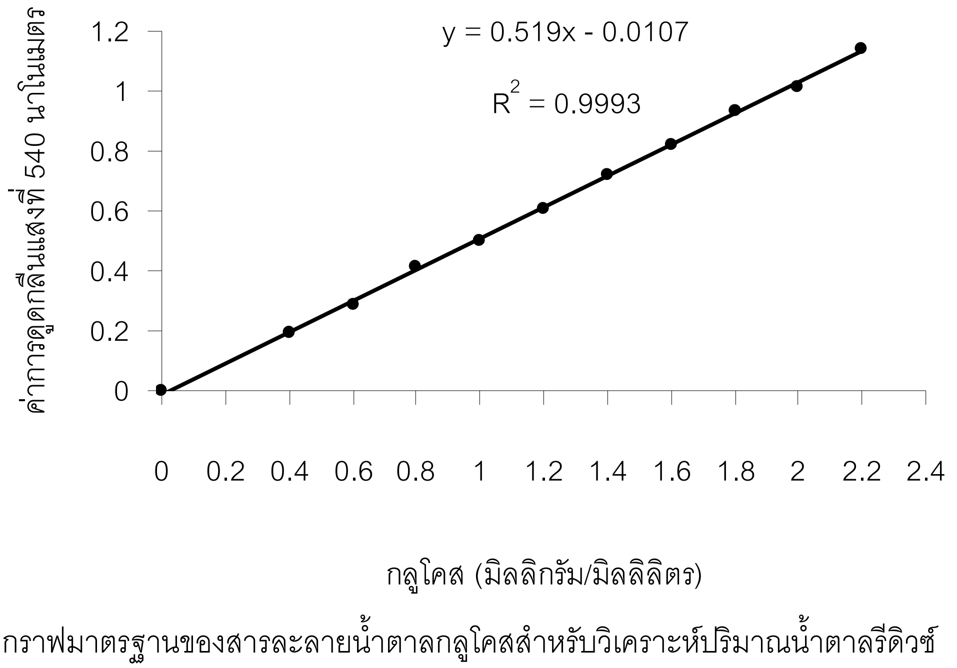
วิธีการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959)

(1) เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 และ 2.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

(2) เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท

(3) เติมสารละลาย DNS reagent ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับแบลงค์ คือ ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส

(4) ปิดฝาไมโครเพลทแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการเจือจางสารในไมโครเพลทดังกล่าวก่อนที่จะนำไปวัด โดยดูดสารนั้นขึ้นมา 50 ไมโครลิตร นำไปใส่ไมโครเพลทอีกอัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 - 2.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

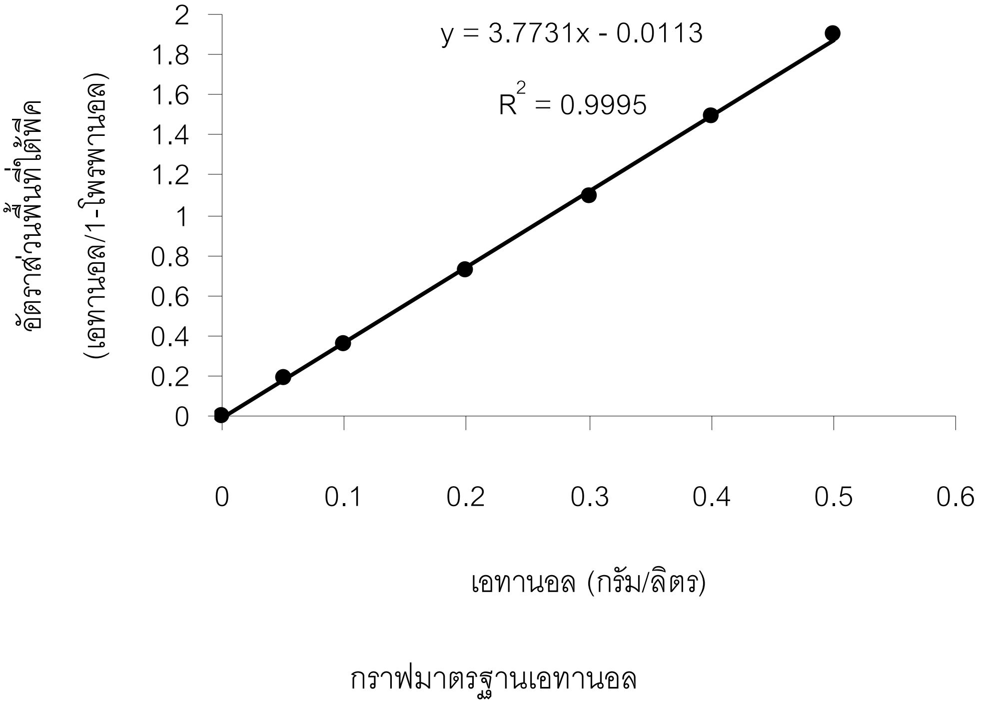
3. กราฟมาตรฐานเอทานอล

วิธีการทำกราฟมาตรฐานเอทานอล

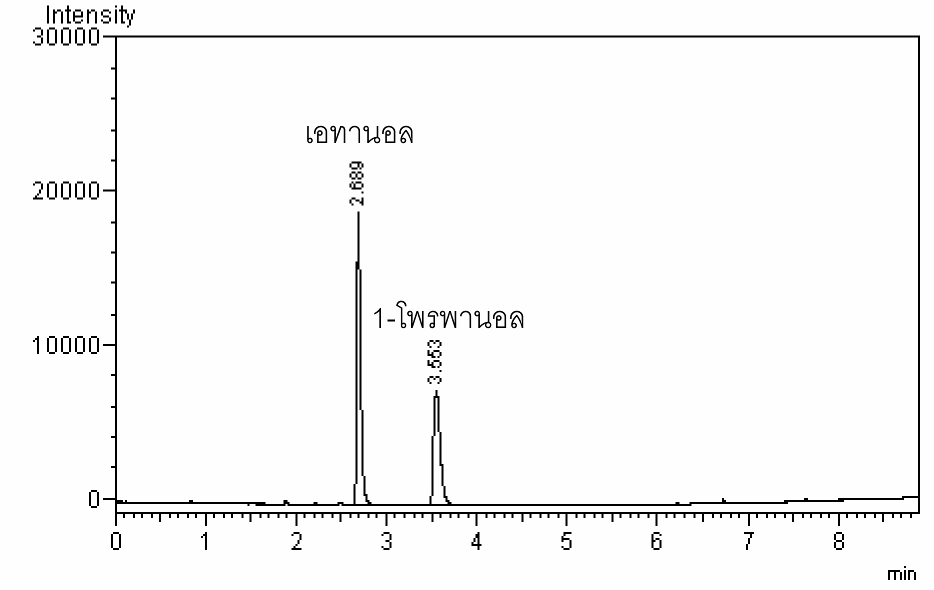
(1) เตรียมสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร จากเอทานอลความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ แล้วเจือจางให้เป็นความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัม/ลิตร

(2) นำสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ มาปริมาตร 420 ไมโครลิตร เติม internal standard ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นสารละลาย 1-โพรพานอล ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ง) ลงไปผสมให้เข้ากัน

(3) วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (เอทานอล/1-โพรพานอล) กับความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร)



กราฟมาตรฐานเอทานอล



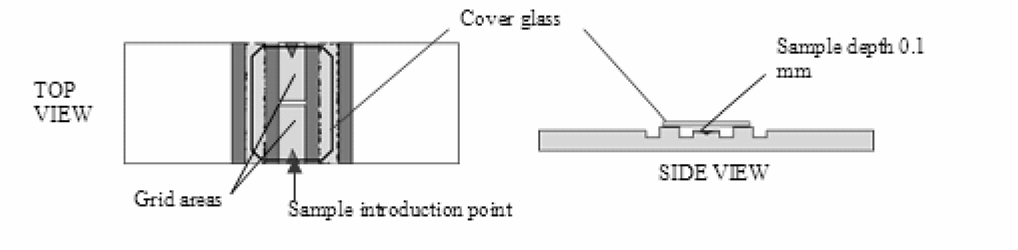
ตัวอย่างโครมาโทแกรมของเอทานอลและ 1-โพรพานอล

พีค	ชื่อสาร	ระยะเวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ (retention time)	พื้นที่	ความสูง
1	เอทานอล	2.689	55659.6	18895.3
2	1-โพรพานอล	3.553	39130.5	7439.8

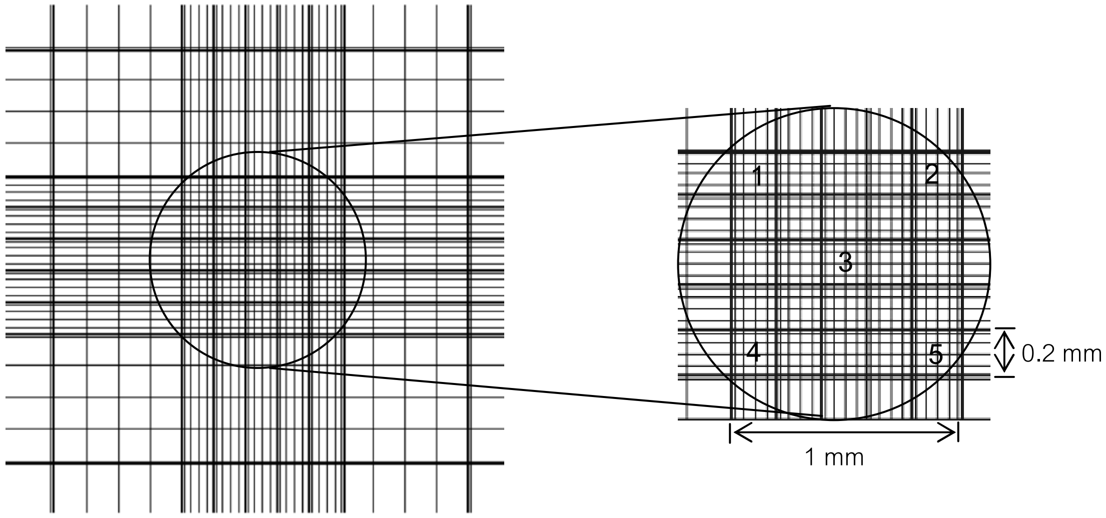
ภาคผนวก ซ

การนับจำนวนเซลล์ยีสต์

การนับจำนวนเซลล์จะใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า haemacytometer หรือ counting chamber เป็นสไลด์ที่ตรงกลางจะมีร่องเป็นรูปตัว H จึงแบ่งบริเวณที่ใช้นับเซลล์ออกเป็น 2 บริเวณ คือ ด้านบนกับด้านล่าง และมีความลึก 0.1 มิลลิลิตร เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นตารางตรงกลางที่มีขนาด 1×1 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่มีขีดแบ่งออกเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง ของเหลวที่บรรจุอยู่ภายในบริเวณสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ทั้ง 25 ช่อง จะมีปริมาตรเป็น 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (1×1×0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร)



ลักษณะของ haemacytometer และส่วนประกอบต่างๆ



ลักษณะของช่องที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์

การนับจำนวนเซลล์จะนับ 5 ช่อง จาก 25 ช่อง คือ ในบริเวณหมายเลข 1 - 5 ดังนั้นการคำนวณจำนวนเซลล์จะคำนวณ ดังนี้

กำหนดให้ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ทั้ง 5 ช่อง มีค่าเท่ากับ X เซลล์

นั่นคือ ปริมาตร 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จะมีจำนวนเซลล์ทั้งหมด = $25 \times X$ เซลล์

ปริมาตร 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จะมีจำนวนเซลล์ทั้งหมด = $250 \times X$ เซลล์

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร = 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ดังนั้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจะมีจำนวนเซลล์ทั้งหมด = $2.5 \times 10^4 \times X$ เซลล์/มิลลิลิตร

ภาคผนวก ณ

ตารางสถิติ

กำหนดให้	1 คือ ใบหญ้าเนเปียร์	7 คือ หญ้าแพงโกล่า
	2 คือ ใบหญ้าเนเปียร์แคระ	8 คือ หญ้าอะตราตัม
	3 คือ ใบหญ้าเนเปียร์ยักษ์	9 คือ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ศรีลังกา
	4 คือ ใบหญ้าบาน่า	10 คือ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์
	5 คือ หญ้ากินนีสีม่วง	11 คือ หญ้าแฝกกลุ่มพันธุ์ราชบุรี
	6 คือ หญ้ารูซี่	12 คือ แอลฟา-เซลลูโลส 0.6 กรัม+ไซแลน 0.6 กรัม

1. ปริมาณเอทานอลจากกระบวนการ SSCF ของวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ ในหน่วยกรัม/ลิตร

ANOVA

ethanol (g/l)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.624	11	.420	17.277	.000
Within Groups	.584	24	.024		
Total	5.208	35			

Duncan[a]

grasses	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5	3	.1800		
7	3	.2133		
6	3	.3000		
8	3	.3567		
3	3	.4033		
10	3		.7967	
4	3		.8667	.8667
1	3		.9633	.9633
2	3		.9800	.9800
12	3		1.0567	1.0567
11	3			1.1033
9	3			1.1400
Sig.		.128	.078	.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a]Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

2. ปริมาณเอทานอลจากกระบวนการ SSCF ของวัตถุดิบชนิดต่างๆ ในหน่วยกรัม/กรัมของวัตถุดิบ

ANOVA

ethanol (g/g substrate)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.073	11	.007	14.682	.000
Within Groups	.011	24	.000		
Total	.083	35			

Duncan[a]

grasses	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5	3	.0200		
7	3	.0233		
6	3	.0367		
8	3	.0467		
3	3	.0533		
10	3		.0967	
4	3		.1100	.1100
1	3		.1200	.1200
2	3		.1233	.1233
12	3		.1300	.1300
9	3			.1400
11	3			.1400
Sig.		.072	.072	.109

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a]Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

3. ปริมาณเอทานอลของวัตถุดิบชนิดต่างๆ จากกระบวนการ SSCF โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

ANOVA

ethanol (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3783.641	11	343.967	16.743	.000
Within Groups	493.048	24	20.544		
Total	4276.689	35			

Duncan[a]

grasses	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5	3	6.0800		
7	3	6.8000		
6	3	9.5567		
8	3	11.6433		
3	3	13.9300		
12	3		23.0100	
10	3		23.3067	
4	3		27.2767	27.2767
1	3		30.2967	30.2967
2	3		30.6033	30.6033
11	3		30.9467	30.9467
9	3			32.7200
Sig.		.066	.068	.198

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a]Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

4. ปริมาณเอทานอล (ลิตร/ไร่/ปี) จากกระบวนการ SSCF ของหญ้า 11 ชนิด

ANOVA

ethanol (litres/rai/year)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	277789.113	10	27778.911	16.694	.000
Within Groups	36608.668	22	1664.030		
Total	314397.781	32			

Duncan[a]

grasses	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
3	3	78.3700			
5	3	85.8333			
6	3	105.8467	105.8467		
4	3		167.9333	167.9333	
10	3		170.6767	170.6767	
8	3		171.3900	171.3900	
9	3			184.2700	
1	3			187.4667	
7	3			203.5200	
11	3			212.8067	
2	3				435.2867
Sig.		.409	.062	.214	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a]Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชินพร วงศ์วัฒนไพบูลย์ เกิดวันที่ 8 สิงหาคม พ.ศ. 2527 ที่เขตพญาไท จังหวัดกรุงเทพมหานคร ระดับปริญญาตรีสำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2549 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2551 โดยในขณะศึกษาได้รับทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) และได้เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในการประชุมวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 16 ประจำปี 2551 ระหว่างวันที่ 13 - 14 มีนาคม พ.ศ. 2551 โดยนำเสนอด้วยวาจาในหัวข้อเรื่อง Cellulosic ethanol production from grasses in Thailand by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* และในงานประชุมวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 4 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างวันที่ 28 - 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2551 โดยนำเสนอด้วยวาจาในหัวข้อเรื่อง การวิเคราะห์หญ้าในประเทศไทยสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล และได้ตีพิมพ์ฉบับสมบูรณ์ในรายงานการประชุม นอกจากนี้ได้นำเสนอด้วยโปสเตอร์ในงาน 13th Biological Sciences Graduate Congress ณ National University of Singapore ประเทศสิงคโปร์ ระหว่างวันที่ 15-17 ธันวาคม พ.ศ. 2551 ในหัวข้อเรื่อง Cellulosic ethanol production from grasses in Thailand by SSCF process