

การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เป็นผลพลอยได้
จากการเพาะปลูกข้าวด้วยกระบวนการทางชีวภาพ



จันทร์จิรา สลับเชื้อ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พ.ศ. 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



**ETHANOL PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC MATERIALS
DERIVED FROM RICE BY-PRODUCT VIA BIOLOGICAL PROCESSES**

JANJIRA SALUBCHUAE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

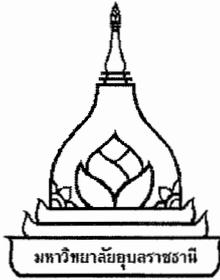
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

MAJOR IN BIOTECHNOLOGY FACULTY OF SCIENCE

UBON RAJATHANEE UNIVERSITY

YEAR 2007

COPYRIGHT OF UBON RAJATHANEE UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว
ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

ผู้วิจัย นางสาวจันทร์จิรา สลับเชื้อ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารีรัตน์ มุลใจ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภณ บุญถื่อ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชริตา ปุกหุด)

..... คณบดี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2550

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นาริรัตน์ มูลใจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชริดา ปุกหุด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ จัดหาเอกสาร วัสดุอุปกรณ์ ตลอดจนเครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์ อีกทั้งแก้ไขตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และให้การสนับสนุนทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภณ บุญถื้อ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำต่างๆ ตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยแก่ผู้วิจัยในการทำวิจัยบางส่วน

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สาวิตรี ลิ้มทอง ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ นักวิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ขอขอบคุณคุณจรัส แก้วแรมเรือนที่ได้ให้การช่วยเหลือในการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจสำคัญทำให้ผู้วิจัยทำงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วง และให้การสนับสนุนทุนการศึกษามาโดยตลอด

จันทร์จิรา สลับเชื้อ
(นางสาวจันทร์จิรา สลับเชื้อ)
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เป็นผลพลอยได้จากการ
เพาะปลูกข้าวด้วยกระบวนการทางชีวภาพ
โดย : จันทร์จิรา สลับเชื้อ
ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นาริรัตน์ มวลใจ

ศัพท์สำคัญ : เอทานอล ลิกโนเซลลูโลส ข้าว กระบวนการทางชีวภาพ

งานวิจัยนี้ ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวัสดุที่เป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว
ได้แก่ แกลบและรำ มาใช้เป็นวัสดุหมัก วัสดุเหล่านี้มีส่วนประกอบที่เป็นลิกโนเซลลูโลส สามารถ
นำมาใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลสำหรับนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ โดยกระบวนการผลิตเอทานอลด้วย
กระบวนการทางชีวภาพ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการปรับสภาพวัสดุหมักโดยใช้เชื้อ
เห็ดและเชื้อรา พบว่า เชื้อเห็ดคอบหรือเห็ดลม *Lentinus polychrous* Lev. LP-PT-01 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยง
ในวัสดุหมักที่อุณหภูมิ 35°C มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงและ
สามารถเปลี่ยนวัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ การทดลองขั้นที่ 2 ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่
สามารถหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40°C พบว่า เชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผึ้ง (HN) และเชื้อยีสต์
Kluyveromyces marxianus (KM) สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุด มีค่าเท่ากับ 1.04%v/v และ
1.03%v/v ตามลำดับ การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักร่วมกับการย่อยสลาย เมื่อ
ปรับสภาพวัสดุหมักด้วยเชื้อ *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 และใช้เชื้อ *K. marxianus* คบคู่
กับกระบวนการหมักเอทานอล พบว่าในการใช้แกลบและรำละเอียดในอัตราส่วน 70 : 30 โดย
น้ำหนัก เป็นวัสดุหมัก ความชื้นเท่ากับ 60% ระยะเวลาการหมัก 3 วัน สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด
เท่ากับ 0.10 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัสดุหมัก

ABSTRACT

TITLE : ETHANOL PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC MATERIALS
 DERIVED FROM RICE BY-PRODUCT VIA BIOLOGICAL PROCESSES
 BY : JANJIRA SALUBCHUAE
 DEGREE : MASTER OF SCIENCE
 MAJOR : BIOTECHNOLOGY
 CHAIR : ASST. PROF. NAREERAT MOONJAI, Ph. D.

KEYWORDS : ETHANOL / LIGNOCELLULOSE / RICE / BIOLOGICAL
 PROCESSES

The possibility of producing ethanol from rice husk and rice polish was investigated. These two materials contributed as a significant underutilized source of sugars, so-called lignocellulose, used for ethanol production. The study focuses on the production of ethanol via biological processes. Firstly, a fungal bio-treatment of lignocellulosic materials with the white-rot fungus *Lentinus polychrous* Lev. LP-PT-01 under solid-state fermentation was studied. This mushroom was grown on the lignocellulose at 35°C. The highest cellulase activity was measured after 4 days of cultivation and reducing sugars were released. The yeast strains were selected for the production of ethanol at 40°C. The strain isolated from honey (HN) and *Kluyveromyces marxianus* (KM) were found to produce high ethanol as concentration of 1.04% v/v and 1.03% v/v, respectively. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of the bio-pretreated rice husk and rice polish (70 : 30 by weight, 60% moisture content) were carried out using *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 and *K. marxianus* cells. It was found that ethanol yield was 0.10 g ethanol/100 g substrate after 3 days of fermentation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ บทที่	ญ
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 การตรวจเอกสาร	
2.1 พลังงานทดแทนจากเอทานอล	3
2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล	4
2.3 วัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล	5
2.4 ส่วนประกอบของเซลล์พืช	6
2.5 วัสดุเหลือใช้และผลพลอยได้ทางการเกษตร	10
2.6 วัสดุเหลือใช้และผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว	11
2.7 กระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	14
2.8 การย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	17
2.9 การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	19
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัสดุอุปกรณ์	24
3.2 วิธีการวิจัย	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา	30
4.2 การศึกษาการปรับสภาพวัสดุหมัก	31
4.3 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส	36
4.4 การตรวจสอบการเจริญของเชื้อเห็ดเห็ด <i>L. polychrous</i> Lev. LP-PT-01 บนแถบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราด (SEM)	38
4.5 การศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	40
4.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 40 °C และ 45 °C	42
4.7 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ที่ อุณหภูมิ 40 °C	42
4.8 การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักร่วมกับ การย่อยสลาย (Simultaneous saccharification and fermentation)	45
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	54
5.2 ข้อเสนอแนะ	55
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	
ก วิธีวิเคราะห์	63
ข สูตรอาหารและสารเคมี	69
ค ข้อมูลผลการทดลอง	73
ง ผลงานทางวิชาการที่เผยแพร่	85
ประวัติผู้วิจัย	89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	7
2.2	ศักยภาพของชีวมวลประเภทวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	10
2.3	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร) ต่อวัตถุดิบน้ำหนัก 1 ตัน	11
2.4	องค์ประกอบทางเคมีของแกลบจากข้าว	13
2.5	องค์ประกอบทางเคมีของรำหยาบและรำละเอียดจากข้าว	13
2.6	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากวัสดุทางการเกษตร	21
3.1	อัตราส่วนของวัสดุหมักที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบ SSF	28
4.1	แหล่งที่มาของเชื้อยีสต์	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กระบวนการหมักเอทานอลโดยการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์	5
2.2	โครงสร้างของผนังเซลล์พืช	7
2.3	โครงสร้างของเซลล์ลอส	8
2.4	โครงสร้างของเฮมิเซลล์ลอส	9
2.5	โครงสร้างของลิกนิน	9
2.6	โครงสร้างภายในของเมล็ดข้าว	12
2.7	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพืชในระหว่างการปรับสภาพ	15
4.1	การเจริญของเชื้อเห็ดและราระยะเวลา 3 วัน โดยเชื้อเห็ด <i>L. polychrous</i> Lev. LP-PT-01 เชื้อรา <i>A. oryzae</i> และเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. T-11 ที่อุณหภูมิ 35°C และเชื้อเห็ด <i>P. sajor-caju</i> ที่อุณหภูมิ 30°C	31
4.2	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักชนิดต่างๆ ที่ปรับสภาพด้วยความร้อน และไม่ปรับสภาพด้วยความร้อน ในวัสดุหมักที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเห็ดและรา และวัสดุหมักที่ปลูกเชื้อเห็ด <i>L. polychrous</i> Lev. LP-PT-01	34
4.3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักชนิดต่างๆ ที่ปรับสภาพด้วยความร้อน และไม่ปรับสภาพด้วยความร้อน ในวัสดุหมักที่ปลูกเชื้อรา <i>A. oryzae</i> และวัสดุหมักที่ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. T-11	35
4.4	โครงสร้างภายนอกของเกลบที่ยังไม่มีการเจริญของเส้นใยเห็ด <i>L. polychrous</i> Lev. LP-PT-01 ภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 100 เท่า	39
4.5	โครงสร้างภายนอกของเกลบที่มีการเจริญของเส้นใยเห็ด <i>L. polychrous</i> Lev. LP-PT-01 เป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 35°C ภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 100 เท่า	39
4.6	ลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร YPD medium เวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30°C ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	41
4.7	การเจริญของเชื้อยีสต์ที่มีในห้องปฏิบัติการบนอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 40 และ 45°C และแผนภาพแสดงตำแหน่งของเชื้อยีสต์	42
4.8	จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C	43
4.9	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.10	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C	44
4.11	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจากกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C	45
4.12	การเจริญของเชื้อเห็ด <i>L. polychrous</i> Lev. LP-PT-01 ในการปรับสภาพวัสดุหมักเป็นเวลา 7 วัน	46
4.13	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100% ความชื้นวัสดุหมัก 60%	47
4.14	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 90% ความชื้นวัสดุหมัก 60%	47
4.15	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 80% ความชื้นวัสดุหมัก 60%	48
4.16	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 70% ความชื้นวัสดุหมัก 60%	48
4.17	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100% ความชื้นวัสดุหมัก 70%	49
4.18	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 90% ความชื้นวัสดุหมัก 70%	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.19	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 80% ความชื้นวัสดุหมัก 70%	50
4.20	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 70% ความชื้นวัสดุหมัก 70%	51
4.21	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100% ความชื้นวัสดุหมัก 80%	52
4.22	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 90% ความชื้นวัสดุหมัก 80%	52
4.23	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 80% ความชื้นวัสดุหมัก 80%	53
4.24	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ <i>K. marxianus</i> ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 70% ความชื้นวัสดุหมัก 80%	53

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์	คำอธิบาย
°C	องศาเซลเซียส
% v/v	เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร
ml	มิลลิลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
μl	ไมโครลิตร
DNS	3,5 – Dinitrosalicylic acid
nm	นาโนเมตร
GC	Gas Chromatography
M	หน่วยความเข้มข้นเป็นโมลาร์
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
mm ³	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
U/ml	หน่วยต่อมิลลิลิตร
g/L	กรัมต่อลิตร
%w/v	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

ประเทศไทยมีการใช้พลังงานเชื้อเพลิงในภาคการขนส่งและอุตสาหกรรมค่อนข้างสูงในแต่ละปี พลังงานที่ใช้จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีมูลค่ามากกว่ารายได้จากการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรทั้งหมด โดยส่วนใหญ่นำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงในรูปของน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งในปัจจุบันมีปริมาณจำกัด และอาจจะหมดไปในอนาคตอันใกล้นี้ อีกทั้งการใช้พลังงานภายในประเทศมีความต้องการใช้พลังงานมากขึ้นสอดคล้องกับการขยายตัวทางเศรษฐกิจและจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ต้องหาแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงและพลังงานจากทรัพยากรภายในประเทศเพื่อทดแทนการนำเข้า เช่น การใช้ถ่านหิน พลังงานนิวเคลียร์ ก๊าซธรรมชาติ ซึ่งถือเป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัดเช่นกัน ดังนั้นจึงได้มีการวิจัยและพัฒนาในการหาแหล่งพลังงานอื่นๆ จากทรัพยากรที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น พลังงานจากแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ หรือพลังงานทดแทนจากพืชเกษตร โดยพืชหรือชีวมวลนั้นเป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด กล่าวคือพืชสามารถที่จะปลูกทดแทนหมุนเวียนกันได้ ตัวอย่างของการนำพืชเกษตรมาผลิตพลังงานก็คือการผลิตเอทานอลหรือแอลกอฮอล์ ซึ่งในบางประเทศมีการใช้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานในเครื่องยนต์หรือในอุตสาหกรรม เอทานอลที่ได้มาจากกระบวนการหมักผลผลิตทางการเกษตร เช่น อ้อย (กากน้ำตาล) มันสำปะหลัง หรือข้าวโพด เป็นต้น โดยกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นก็เนื่องมาจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์ รา หรือแบคทีเรีย

การผลิตเอทานอลที่ผ่านมาวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตจำกัดเฉพาะ น้ำตาล และแป้ง ซึ่งส่งผลให้วัตถุดิบเหล่านี้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น ปัจจุบันมีหลายหน่วยงานวิจัย พยายามพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากการเกษตร ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การทำปุ๋ยหมักหรือใช้เป็นพลังงานในการผลิตกระแสไฟฟ้า เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้นำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนหรือแหล่งพลังงานสำรองของน้ำมันปิโตรเลียมได้อีกด้วย

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีส่วนประกอบที่เป็นลิกโนเซลลูโลสอยู่เป็นจำนวนมาก การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทนี้ต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายเพื่อเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ กระบวนการย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนแรก เป็นการปรับสภาพวัสดุหมัก ที่เรียกว่าการพรีไฮโดรไลซิส (prehydrolysis) หรือการพรีทรีทเมนต์ (pretreatment) เพื่อแยกเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส และปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สองของกระบวนการย่อยสลาย ที่เรียกว่า การไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในขั้นตอนนี้เซลลูโลสจะถูกย่อยสลาย ส่วนลิกนินจะไม่ถูกย่อยและยังคงเหลือเป็นผลพลอยได้ อยู่ในสภาพของแข็ง (Olsson and Hahn-Hägerdal, 1996) การย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสส่วนใหญ่จะใช้กระบวนการทางเคมี โดยการใช้กรดหรือด่างเป็นตัวทำปฏิกิริยาในการย่อยสลาย นอกจากนี้การย่อยสลายยังเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์มาย่อยเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวัสดุเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าวซึ่งได้แก่ แกลบและรำ มาใช้เป็นวัสดุหมัก เพื่อนำมาผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ถือได้ว่าเป็นการนำเอาเทคโนโลยีสะอาดมาประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัดพลังงาน

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาวิธีการปรับสภาพวัสดุหมักประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว ด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์จากเชื้อราควบคู่กันกับการหมักเอทานอลโดยยีสต์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถพัฒนาวิธีการปรับสภาพวัสดุหมักประเภทลิกโนเซลลูโลส ด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส

1.3.2 สามารถพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์จากเชื้อราควบคู่กันกับการหมักเอทานอลโดยยีสต์

1.3.3 สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว

1.3.4 สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 พลังงานทดแทนจากเอทานอล

เอทานอล (ethanol) หรือ ไบโอดีเอทานอล (bioethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นเชื้อเพลิงสะอาด (Verma and Behera, 2003) ที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ เช่นเดียวกับกับพลังงานจากน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งน้ำมันปิโตรเลียมเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่ก่อให้เกิดมลภาวะทางอากาศ และมีปริมาณที่ลดลง ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาการนำเอทานอลมาใช้เป็นพลังงานทางเลือก เนื่องจากการผลิตเอทานอลมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า และเพื่อแก้ปัญหาวิกฤตราคาน้ำมันในปัจจุบัน โดยในการผลิตเอทานอลนั้นจะใช้วัตถุดิบประเภท น้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส (Verma and Behera, 2003)

ในต่างประเทศนั้นมีอยู่ 4 ประเทศที่มีการพัฒนาด้านพลังงานทดแทนไปมากแล้ว คือ บราซิล สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส และ สวีเดน โดยพลังงานทดแทนที่ใช้กันมากในประเทศดังกล่าวคือ การใช้พลังงานเชื้อเพลิงที่มีส่วนผสมของเอทานอล สำหรับประเทศบราซิลนั้นในปัจจุบันมีการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากอ้อยและกากน้ำตาล วันละกว่า 220,000 บาร์เรล หรือประมาณ 35 ล้านลิตรต่อวัน นับเป็น 42% ของพลังงานด้านขนส่งของทั้งประเทศ ปัจจุบันมีรถยนต์ที่ใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิง 100% ประมาณ 4 ล้านคัน และมีกฎหมายบังคับให้น้ำมันเบนซินต้องมีส่วนของเอทานอลผสมอย่างน้อย 24% ทั่วประเทศ ในบราซิลการใช้เอทานอลมีเป้าหมายหลักคือการใช้เอทานอลเป็นกลไกในการกำหนดราคาอ้อยและน้ำตาล โดยมีประโยชน์ด้านคุณภาพอากาศและลดการนำเข้าพลังงาน

ในสหรัฐอเมริกาปัจจุบันมีการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ หรือ หัวบีทรูท วันละกว่า 107,000 บาร์เรล หรือประมาณ 17 ล้านลิตรต่อวัน และมีการใช้น้ำมันผสมเอทานอล 10% (หรือที่เรียกว่าแก๊สโซฮอล์) เกือบทั่วประเทศและคิดเป็นสัดส่วนประมาณ 10% ของการใช้น้ำมันเบนซินทั่วประเทศ ในขณะเดียวกันก็มีการพัฒนารถยนต์และรถปิกอัพที่สามารถใช้น้ำมันผสมเอทานอลในอัตราตั้งแต่ 0 ถึง 85% หรือที่เรียกว่า FFV (Flexible Fuel Vehicle) ด้วยการใช้เอทานอลของสหรัฐอเมริกามีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการลดมลพิษทางอากาศและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ทางภาครัฐได้ใช้มาตรการภาษีการสนับสนุนอย่างเต็มที่ มีการออกกฎหมายบังคับทั้งทางด้านมลภาวะ มาตรฐานน้ำมัน และประเภทของยานยนต์ อีกทั้งมีการสนับสนุนการวิจัยและพัฒนาอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองใช้เอทานอล 95%

ในเครื่องยนต์ดีเซลซึ่งสามารถลดควันดำได้มากอีกด้วย แนวโน้มในอนาคตนั้นคงจะมีการใช้เอทานอลมากขึ้นเพราะจะมีการนำมาเป็นสารเพิ่มออกเทนหรือสารเพิ่มออกซิเจน(Oxygenates) แทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่งมีผลกระทบต่อการบินป้อนน้ำใต้ดินหลายแห่งในประเทศฝรั่งเศสมีการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากข้าวบาร์เลย์ หรือ หัวบีทรูท วันละกว่า 8,000 บาร์เรล หรือประมาณ 1.3 ล้านลิตรต่อวันแล้วนำไปผลิตเป็นสารเพิ่มออกเทนหรือสารเพิ่มออกซิเจน ในรูปของสาร ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) ในอัตราวันละประมาณ 3 ล้านลิตร

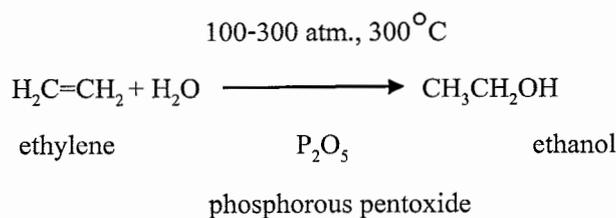
สำหรับประเทศสวีเดนนั้นได้มีการพัฒนาเชื้อเพลิงเอทานอลอย่างจริงจังและนำไปใช้ในยานยนต์ทั้งในรูปแบบของน้ำมันผสม และ FFV และรถดีเซลของระบบขนส่งมวลชนที่ใช้เอทานอล 95% ได้ผลดีอีกด้วย ประเทศสวีเดนมีเป้าหมายจะใช้เชื้อเพลิงเอทานอลในอัตรา 10% ของอัตราการใช้น้ำมันภายในประเทศภายในปี 2005 ด้วย สำหรับประเทศอื่นๆ ก็มีพัฒนาการด้านนี้เช่นกัน และมีการเริ่มเปิดโรงงานผลิตทั้งเชื้อเพลิงเอทานอลหรือสาร ETBE เช่น ประเทศสเปน อิตาลี เนเธอร์แลนด์ เม็กซิโก และแคนาดา ทำให้มั่นใจได้ว่าในอนาคตนั้นจะมีการใช้เชื้อเพลิงเอทานอลเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และน่าจะเป็นโอกาสในการส่งออกของประเทศไทยด้วยเพราะเรามีวัตถุดิบอยู่มาก แถมยังราคาถูกอีกด้วย การส่งออกน้ำมันนั้นแทบจะไม่มีประเทศใดกีดกันการนำเข้าเลย ซึ่งไม่เหมือนกับพืชผลทางการเกษตรดังที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งพลังงานในประเทศไทยมีเพียงร้อยละ 5 ที่เหลือเป็นการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ ทำให้สูญเสียเงินตราต่างประเทศไปกับการซื้อพลังงานประมาณปีละสองแสนล้านบาท การผลิตเอทานอลทำให้เกิดช่องทางการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรเพิ่มขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งพาวิธีการแปรรูปผลผลิตเป็นน้ำตาลทราย หรืออาหารสัตว์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังเป็นทางเลือกใหม่ให้เกษตรกรจำหน่ายผลผลิตได้หลายทาง ช่วยให้ผลผลิตมีราคาดีขึ้นและช่วยแก้ปัญหาหาราคาผลผลิตตกต่ำในระยะยาว

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

เอทานอล (ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) สูตรโมเลกุลคือ C_2H_5OH มีกระบวนการผลิตได้ 2 กระบวนการด้วยกันคือกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ หรือจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

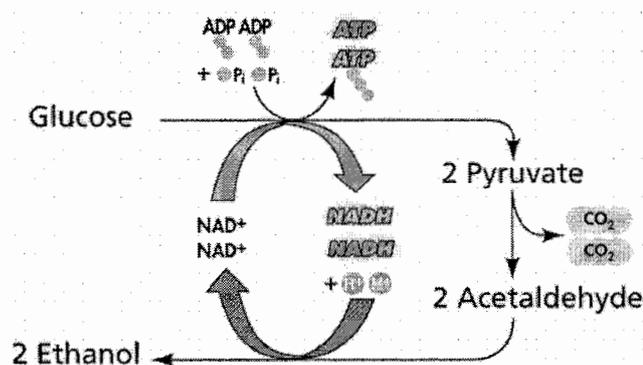
2.2.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

เอทานอลที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากการนำเอทิลีน (ethylene) มาทำปฏิกิริยากับน้ำภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูงและความดันสูง โดยมีตัวกระตุ้น (catalyst) เป็นทั้งสะเตนออกไซด์ (P_2O_5) ดังสมการ (Wade, 1995)



2.2.2 กระบวนการทางด้านชีวภาพ

การผลิตเอทานอลด้วยวิธีการทางด้านชีวภาพส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อยีสต์ เชื้อราหรือแบคทีเรีย ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้ โดยกระบวนการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลเรียกว่ากระบวนการหมัก (fermentation) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 กระบวนการหมักเอทานอลโดยการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ (Sadava and et al., 2008)

2.3 วัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล

2.3.1 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบประเภทน้ำตาล สามารถผลิตได้จากผลไม้ที่มีน้ำตาล เช่น น้ำองุ่น น้ำผึ้ง น้ำแอปเปิ้ล น้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet) น้ำตาลจากต้นอ้อย (sugar cane) กากน้ำตาล น้ำตาลจากข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) หัวผักกาดหวาน เป็นต้น หรือน้ำทิ้งจากโรงงานอาหารกระป๋องที่มีน้ำตาลปนอยู่

2.3.2 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

พืชที่ให้แป้งมีหลายชนิด เช่น ธัญพืชชนิดต่างๆ ซึ่งรวมทั้งข้าวโพด มันเทศ สาเก ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าว มันสำปะหลัง และเผือก สำหรับการผลิตเอทานอลในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาเหนือใช้ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว มันฝรั่ง และผักกาดหวาน เป็นวัตถุดิบ ในขณะที่ประเทศ

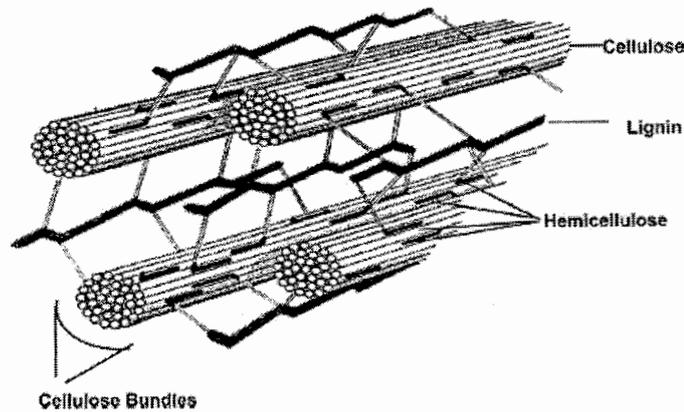
ในเขตร้อน เช่น บราซิล วัตถุดิบที่สำคัญสำหรับการผลิตเอทานอล คือ อ้อย กากน้ำตาล มันสำปะหลัง และมันเทศ ซึ่งมันสำปะหลัง (*Monihot esculenta*) มีชื่อเรียกหลายชื่อ คือ cassava, manioc หรือ tapioca เป็นพืชที่ปลูกมากในประเทศเขตร้อน หัวมันสำปะหลังประกอบด้วยแป้งร้อยละ 20-35 โดยน้ำหนัก และโปรตีนร้อยละ 1-2 เนื่องจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* หรือยีสต์ส่วนใหญ่ที่ใช้ผลิตเอทานอลไม่สามารถใช้แป้งได้โดยตรง ดังนั้นในการนำแป้งมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลจึงจำเป็น ต้องมีการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล ซึ่งการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลอาจทำได้โดยวิธีการใช้เอนไซม์ หรือวิธีการใช้กรด

2.3.3 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในพืชทุกชนิดโดยทั่วไป เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ซึ่งเป็นพืชที่ได้จากการเกษตร หรือไม้เยื่อของพืชต่างๆ ซึ่งองค์ประกอบของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน โดยอัตราส่วนขององค์ประกอบทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณที่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช การนำเอาวัสดุดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพคือการเปลี่ยนเป็นสารเคมีที่มีราคาสูงขึ้น ปัญหาในการนำมาใช้ประโยชน์เกิดขึ้นเนื่องจากพืชนั้นมักจะมีลิกนินเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรง เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จะเข้าไปย่อยสลาย การใช้ประโยชน์จากลิกโนเซลลูโลสต้องมีการแยกส่วนประกอบต่างๆ ออกจากกัน เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่มีมากและเป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตเมื่อนำมาผ่านการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ก็จะได้น้ำตาลกลูโคส และเมื่อนำเฮมิเซลลูโลสมาย่อยสลายก็จะได้น้ำตาลไซโลส ซึ่งน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดนี้ มีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง

2.4 ส่วนประกอบของเซลล์พืช

โครงสร้างของพืชโดยทั่วไปมีองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ซึ่งรวมเรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) (ภาพที่ 2.2) โดยองค์ประกอบที่มีมากที่สุดคือเซลลูโลสจะมีประมาณ 36-61% รองลงมาคือเฮมิเซลลูโลส ประมาณ 13-39% และลิกนิน 6-29% โดยน้ำหนักแห้ง (Olsson and Hahn-Hägerdal, 1996) ในปริมาณที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและส่วนต่างๆ ของพืช โดยโครงสร้างของผนังเซลล์พืชดังแสดงในตารางที่ 2.1



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช (Shleser, 1994)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

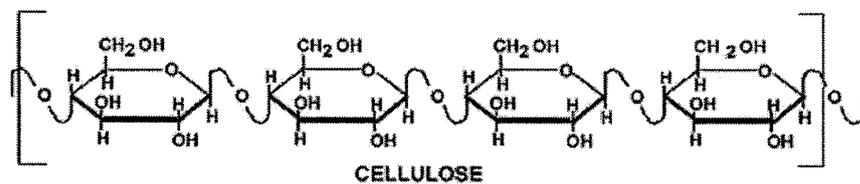
ชนิดของวัสดุ	ปริมาณองค์ประกอบ			
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	อ้างอิง
เหง้ามันสำปะหลัง (%)	82.14	11.41	6.45	พรรณวิไล, 2545
ฟางข้าว (%)	38.56	19.69	13.64	Zhu et al, 2005
ฟางข้าวสาลี (%)	48.57	27.70	8.17	Badal et al, 2005
หญ้าแฝกหอม (%)	34.41	34.04	15.95	อรุณวรรณ, 2547
ชานอ้อย (%w/w)	34.08	20.31	8.93	หรรษา และ เนริสา, มปป.
เปลือกถั่วลิสง (%w/w)	35.13	12.96	9.04	หรรษา และ เนริสา, มปป.
รำข้าวเจ้า (%w/w)	8.30	17.58	2.38	หรรษา และ เนริสา, มปป.
รำข้าวสาลี (%w/w)	9.07	26.10	2.74	หรรษา และ เนริสา, มปป.

2.4.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลส เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญ เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในผนังเซลล์พืช และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของไม้ (wood) ใยฝ้าย และพืชที่มีการเจริญเติบโตเร็ว เช่น หญ้า โดยเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่สามารถนำมาหมุนเวียนใช้ใหม่ได้ (renewable resource) เพราะพืชเป็นทรัพยากรที่สามารถปลูกทดแทนได้ อีกทั้งเซลลูโลสยังเป็นวัตถุดิบที่สามารถใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตอาหารและเชื้อเพลิงได้ด้วย

โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ (polymer) (ภาพที่ 2.3) สายตรงของ β -D-glucopyranose ที่เชื่อมต่อกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 โมเลกุลของเซลลูโลสเป็นเส้นตรง โดยมี

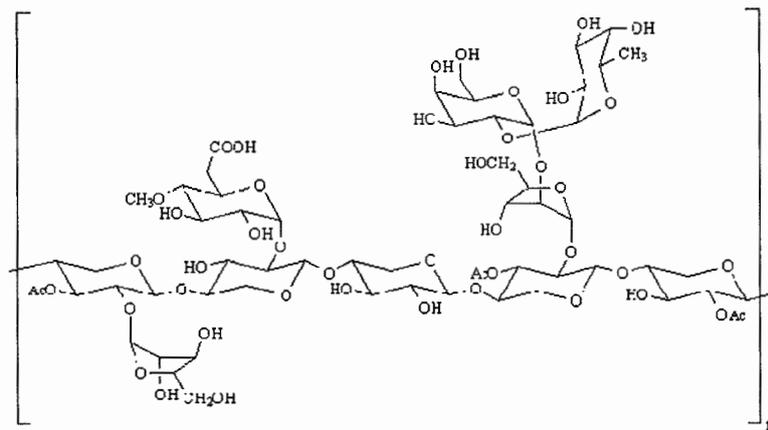
พันธะไฮโดรเจนเชื่อมภายในระหว่างโมเลกุล สายของกลูแคนมีแกนเป็นเกลียวพับสองทบซึ่งสมมาตรกันที่มีความคงตัวและแข็งแรงเนื่องจากพันธะภายในระหว่างโมเลกุล โดยปกติโมเลกุลของเซลลูโลสมีอยู่ในรูปของ Degree of polymerization (DP) คือจำนวนของเซลลูโลส 1 โมเลกุล (สาย) โดยทั่วไปสายของเซลลูโลสจะประกอบด้วยกลูโคส 8,000-12,000 หน่วย และเซลลูโลส 1 สายในพืชชั้นสูงมีค่า DP ได้สูงถึง 14,000 หน่วยองค์ประกอบของเซลลูโลสมี 2 รูปแบบ คือ crystalline cellulose เป็นบริเวณที่มีไฮโดรเจนหนาแน่นทำให้มีความต้านทานอย่างมากต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์และเอนไซม์จึงถูกย่อยสลายได้ยาก และส่วน amorphous cellulose เป็นบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นน้อยทำให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส (Shleser, 1994)

2.4.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

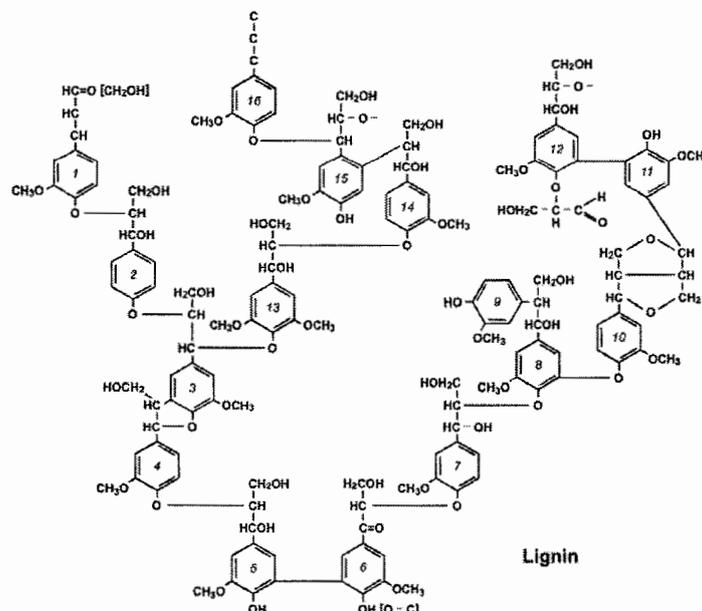
เฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสและอะราบิโนสซึ่งเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอน น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และแมนโนสซึ่งเป็นน้ำตาล 6 คาร์บอน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยส่วนที่ไม่ใช่ น้ำตาล เช่น หมู่อะซิทิล (acetyl groups) (ภาพที่ 2.4) และเนื่องจากเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกึ่งและมีรูปร่างเป็นอสัณฐาน (amorphous) ซึ่งทำให้ง่ายต่อการย่อยสลาย



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

2.4.3 ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินพบอยู่ในชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยทั่วไป มีอยู่ประมาณ 10-25% เพราะฉะนั้นในกระบวนการผลิตเอทานอลจะมีลิกนินเหลืออยู่ เนื่องจากลิกนินมีองค์ประกอบโพลีเมอร์ที่ซับซ้อนของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) และ หมู่เมทอกซี (methoxy groups) ลักษณะโครงสร้างของลิกนินแสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของลิกนิน

2.5 วัสดุเหลือใช้และผลพลอยได้ทางการเกษตร

วัสดุเหลือใช้และผลพลอยได้ทางการเกษตรสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ซึ่งศักยภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแสดงดังตารางที่ 2.2 โดยกระบวนการในการนำวัสดุเหลือใช้มาใช้ในการผลิตพลังงานนั้นส่วนใหญ่จะอาศัยกระบวนการทางเคมีโดยใช้ความร้อนร่วมด้วย

ในหลายประเทศทั่วโลกบริโภคน้ำข้าวเป็นอาหารหลักโดยเฉพาะประเทศไทยที่มีการบริโภคและเพาะปลูกข้าว การเพาะปลูกข้าวในแต่ละรอบการเพาะปลูกนอกจากจะได้ข้าวไว้บริโภคแล้วยังมีวัสดุเหลือใช้หรือผลพลอยได้อื่นๆ อีก เช่น ฟางข้าว แกลบ หรือรำข้าว ซึ่งวัสดุเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันไปเช่น การนำฟางข้าวมาใช้เป็นอาหารสัตว์ วัสดุเพาะปลูกพืช การใช้แกลบในการผลิตเชื้อเพลิง (ไฟฟ้า) และการสกัดน้ำมันจากรำข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ในการผลิตน้ำตาลจากอ้อยจะมีขานอ้อยเหลือทิ้งเป็นจำนวนมากซึ่งวัสดุเหลือทิ้งจากข้าวและอ้อยมีศักยภาพสูงและมีการนำมาใช้เพื่อผลิตพลังงานทดแทนอยู่แล้ว

ตารางที่ 2.2 ศักยภาพของชีวมวลประเภทวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2546)

ผลผลิตทางการเกษตร	ปริมาณผลผลิต (พันตันต่อปี)	ประเภทชีวมวล	ปริมาณชีวมวล (พันตันต่อปี)	เปอร์เซ็นต์ที่เหลือเพื่อผลิตพลังงาน
ข้าว	26,057	ฟางข้าว	11,647	70
		แกลบ	5,993	50
อ้อย	74,258	ต้นและใบ	22,426	98
		ขาน	21,610	20
ปาล์มน้ำมัน	4,605	ทะลาย	1,971	60
		เส้นใย	677	13
		กะลา	226	4
ข้าวโพด	4,230	ซัง	1,155	65
มันสำปะหลัง	16,868	ต้น	1,484	40
มะพร้าว	1,418	เปลือก	148	60
		กะลา	94	40

การผลิตเอทานอลจากพืชนั้นสามารถนำมาผลิตได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาใช้เป็นวัสดุเริ่มแรก ซึ่งถ้าหากผลิตจากส่วนของพืชที่ให้น้ำตาลได้เลยขั้นตอนการผลิตก็ไม่ซับซ้อน เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลจากส่วนที่เป็นเส้นใยของพืช เนื่องจากจะต้องมี

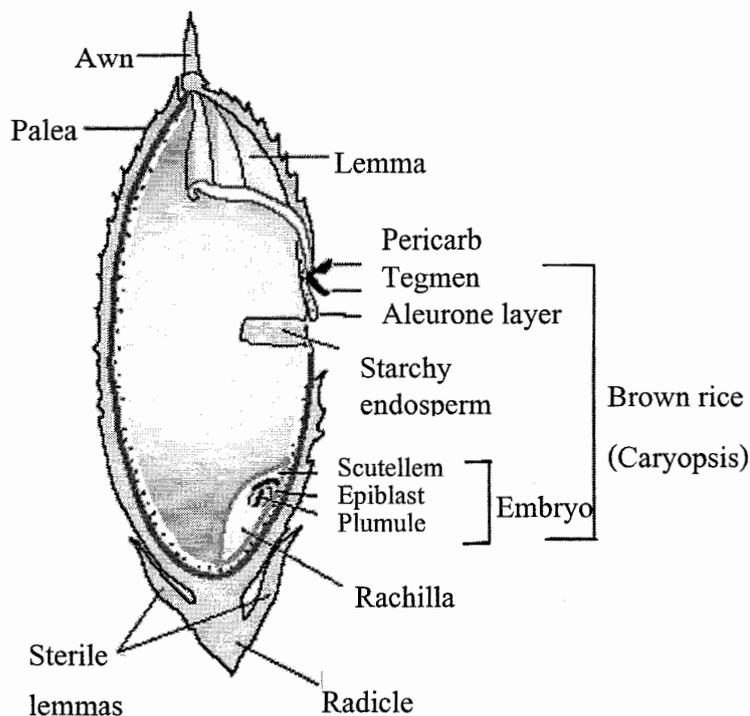
กระบวนการเปลี่ยนเส้นใยให้ได้เป็นน้ำตาลก่อนจึงจะสามารถหมักด้วยเชื้อยีสต์ให้ได้เป็นเอทานอลต่อไป โดยปริมาณการผลิตเอทานอลจากพืช 1 ตัน แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร) ต่อวัตถุดิบน้ำหนัก 1 ตัน

ตัวอย่างพืช (น้ำหนัก 1 ตัน)	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร)
ข้าวฟ่าง	70
น้ำมะพร้าว	83
มันสำปะหลัง	155
กากน้ำตาล	250
ธัญพืช (ข้าว, ข้าวโพด)	385

2.6 วัสดุเหลือใช้และผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว

หลังจากการเก็บเกี่ยวแล้วข้าวเปลือกจะถูกนำมาทำให้แห้งโดยการตากหรือการใช้เครื่องอบและนำมาสีเพื่อนำส่วนเปลือกที่นำมารับประทานไม่ได้ซึ่งส่วนนี้เรียกว่า แกลบ และมีส่วนของรำอยู่ประมาณ 6-7 เปอร์เซ็นต์ เอนโดสเปิร์ม 90 เปอร์เซ็นต์ และเอมบริโอ 2-3 เปอร์เซ็นต์ (Chen et al., 1998) โครงสร้างของเมล็ดข้าวแสดงดังภาพที่ 2.6 โดยเฉลี่ยข้าวขาวที่ผ่านการสีหรือการกะเทาะเปลือกส่วนที่เป็นชั้นของรำออกแล้วจากข้าวเปลือก 100 กิโลกรัม จะได้ข้าวขาวประมาณ 60 กิโลกรัม ข้าวหักหรือปลายข้าว 10 กิโลกรัม รำและแฉียง 10 กิโลกรัม และแกลบ 20 กิโลกรัม (FAO, 1994) โดยทั่วไปแล้วการสีข้าวหรือการขัดข้าวมีหลายระดับเพื่อให้ได้เป็นข้าวขาวหรือข้าวกล้อง ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้บริโภค ข้าวขาวจะถูกขัดเอาส่วนที่เป็นรำออก 8-10 เปอร์เซ็นต์ ในระหว่างการสีข้าว ซึ่งในขั้นตอนนี้เองทำให้เกิดการสูญเสียส่วนของวิตามินและแร่ธาตุ การศึกษาปริมาณวิตามินและแร่ธาตุจากการขัดสีข้าวในประเทศอินเดียพบว่า สูญเสียโทอะมิน ไปมากถึง 65 เปอร์เซ็นต์ และฟอสฟอรัส 40 เปอร์เซ็นต์ (Rao et al., 1960) และสูญเสียโปรตีนประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ (Malik and Chaudhary, in press)



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างภายในของเมล็ดข้าว

2.6.1 แกลบ

อรอนงค์ นัยวิกุล (2547) ได้อธิบายไว้ว่า แกลบ คือส่วนเปลือกแข็งหุ้มเมล็ดข้าว ได้จากกระบวนการกะเทาะเปลือกข้าวให้เป็นข้าวโดยโรงสีสามารถนำแกลบมาใช้ประโยชน์ได้หลายลักษณะ เช่น เป็นเชื้อเพลิงในการให้ความร้อนหม้อต้มไอน้ำเพื่อใช้ในการสกัดน้ำมันรำ และผลิตไฟฟ้า องค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ คือ เส้นใยหยาบ และแร่ธาตุหลักคือ ซิลิกา โดยซิลิกามีราคาสูงเนื่องจากใช้ในอุตสาหกรรมหลายแขนง องค์ประกอบทางเคมีของแกลบจากข้าวดังแสดงในตารางที่ 2.4

2.6.2 รำข้าว

อรอนงค์ นัยวิกุล (2547) ได้อธิบายไว้ว่า รำ หมายถึง ส่วนเยื่อหุ้มผล เยื่อหุ้มเมล็ด นิวเซลลัส ชั้นอะลิวโรน และชั้นสับอะลิวโรนและมักจะรวมส่วนของคัพภะด้วย เนื่องจากในกระบวนการขัดสีข้าวกล้องให้เป็นข้าวสาร คัพภะจะหลุดออกจากเนื้อเมล็ด ดังนั้นปริมาณชนิดของโครงสร้าง และองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวที่ได้จากการสีข้าว หลังจากที่ถูกกะเทาะเปลือกหุ้มแข็ง (แกลบ) ออกไปแล้ว จะขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว และสภาวะแวดล้อมที่ปลูก โดยทั่วไปแบ่งชนิดของ

รำเป็น 2 ส่วนคือ รำหยาบ (bran) และรำละเอียด (polish) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของรำหยาบและรำละเอียดจากข้าวจะแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบทางเคมีของแกลบจากข้าว (Juliano,1972)

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (%)
โปรตีน	1.9 – 3.0
ไขมัน	0.3 – 0.8
เส้นใยหยาบ	34.5 – 45.9
คาร์โบไฮเดรต	26.5 – 29.8
เถ้า	13.2 – 21.0
ซิลิกา	18.8 – 22.3
แคลเซียม	0.6 – 1.3
ฟอสฟอรัส	0.3 – 0.7
ลิกนิน	9 – 20
เซลลูโลส	28 – 36
เพนโตแซน	21 – 22
เฮมิเซลลูโลส	12
อื่นๆ	9.3 – 9.5

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของรำหยาบและรำละเอียดจากข้าว (Luh et al., 1991)

องค์ประกอบทางเคมี (ที่ความชื้น 14%)	รำหยาบ	รำละเอียด
โปรตีน (%N×6.25)	12.0-15.6	11.8-13.0
ไขมัน (%)	15.0-19.7	10.1-12.4
เส้นใยหยาบ (%)	7.0-11.4	2.3-3.2
คาร์โบไฮเดรต (%)	34.1-52.3	51.1-55.0
เถ้า (%)	6.6-9.9	5.2-55.0

2.7 กระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัสดุหมักประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic materials) โดยส่วนใหญ่จะเป็นพวก เศษไม้ กระจาด ฟางข้าว เศษหญ้า เป็นต้น ซึ่งสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น การทำปุ๋ยหมัก หรือใช้เป็นพลังงานในการผลิตกระแสไฟฟ้า นอกจากนั้นยังสามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนหรือแหล่งพลังงานสำรองของน้ำมันปิโตรเลียม โดยการผลิตเอทานอลจากวัสดุหมักประเภทนี้นั้นมักมีต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นกับเทคโนโลยีที่ใช้ และปัญหาที่พบคือในการผลิตจะได้ปริมาณผลผลิตต่ำอีกทั้งต้นทุนในกระบวนการไฮโดรไลซิสสูง (Sun and Cheng, 2002)

จุดประสงค์ของการปรับสภาพวัสดุหมักประเภทลิกโนเซลลูโลส เพื่อกำจัดลิกนิน (lignin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลดลักษณะที่เป็นผลึก (crystallinity) ของเซลลูโลส (cellulose) (ภาพที่ 2.7) นอกจากนั้นยังเป็นการปรับโครงสร้างของวัสดุให้เอนไซม์สามารถเข้าทำการย่อยสลายได้ง่าย โดยยังมีวัตถุประสงค์อื่นๆ คือ

(1) เพื่อให้วัสดุหมักสามารถที่จะเปลี่ยนรูปไปเป็นน้ำตาลได้ง่ายโดยการทำงานของเอนไซม์

(2) หลีกเลี่ยงการย่อยหรือการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต

(3) หลีกเลี่ยงการเกิดการยับยั้งของผลพลอยได้หลังจากกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และกระบวนการหมัก

(4) เพื่อลดปัญหาเรื่องต้นทุนในการผลิต

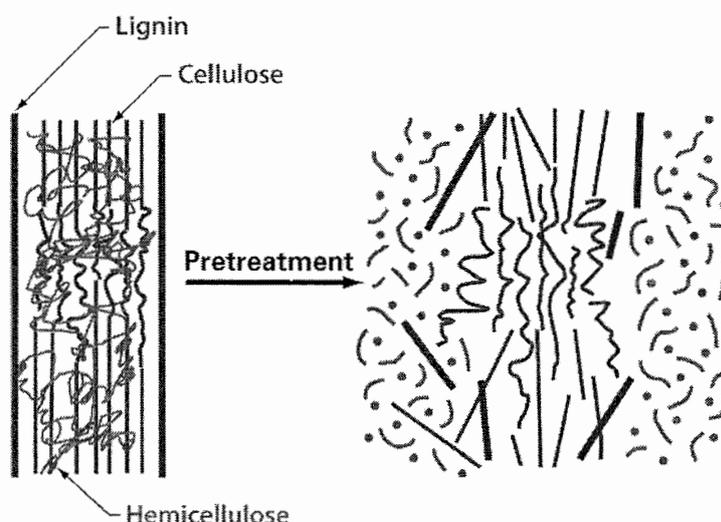
โดยกระบวนการปรับสภาพที่ใช้กับวัสดุหมักหรือชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยวิธีการฟิสิกส์ทางด้านกายภาพ (physical) ด้านเคมีกายภาพ (physico-chemical) ด้านเคมี (chemical) และทางด้านชีวภาพ (biological)

2.7.1 การปรับสภาพทางกายภาพ

Mechanical pre-treatment วิธีการนี้เป็นวิธีการลดลักษณะโครงสร้างที่เป็นผลึก (crystallinity) ของวัสดุโดยการตัด บด หรือ โม่บด ซึ่งขนาดของวัสดุที่ได้จากการตัดจะมีขนาด 10-30 มิลลิเมตรและหลังจากการโม่หรือบดจะมีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร

Pyrolysis หรือกระบวนการกลั่นสลายเป็นกระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยอาศัยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 300°C สารประกอบที่สำคัญที่ได้จากกระบวนการนี้คือ ก๊าซ น้ำมันและถ่าน

Wet oxidation เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นจากการให้ความร้อนกับวัสดุที่อุณหภูมิ 120°C ในน้ำหรือสภาวะที่มีออกซิเจนภายใต้ความดันสูง



ภาพที่ 2.7 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพืชในระหว่างการปรับสภาพ (Mosier et al., 2005)

2.7.2 การปรับสภาพทางเคมีกายภาพ

Steam explosion กระบวนการนี้เป็นวิธีการที่ทำให้วัสดุที่ผ่านการตัดแล้วอิมด้วด้วยน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูงและลดความดันลงทันที ทำให้น้ำระเหยออกอย่างรวดเร็ว โครงสร้างของผนังเซลล์พืชเกิดการเสียหาย โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้เริ่มแรกเท่ากับ 160-260°C ความดัน 0.69-4.83 Mpa

Ammonia fiber explosion (AFEX) เป็นวิธีการหนึ่งของการปรับสภาพทางด้านเคมีกายภาพซึ่งวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจะถูกรวมด้วยแอมโมเนียเหลวที่ความดันและอุณหภูมิสูงตามระยะเวลาที่กำหนด หลังจากนั้นความดันจะลดลงทันที ซึ่งหลักการคล้ายกับวิธี steam explosion โดยในกระบวนการ AFEX ปริมาณของแอมโมเนียเหลวที่ใช้จะอยู่ที่ระดับ 1-2 กรัมแอมโมเนียต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง

2.7.3 การปรับสภาพทางเคมี

Ozonolysis โอโซนสามารถใช้ในการเปลี่ยนสภาพของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้ ซึ่งข้อดีของการใช้วิธีนี้คือ

- (1) มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดลิกนิน
- (2) หลังจากกระบวนการแล้วไม่มีสารพิษตกค้าง
- (3) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ความดันและอุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีต้นทุนค่อนข้างสูงเนื่องจากต้องใช้โอโซนในปริมาณมาก

Acid hydrolysis กรดเข้มข้น เช่น กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ถูกนำมาใช้ในกระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งการใช้กรดมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพเซลลูโลส แต่กรดเข้มข้นมีความเป็นพิษ กัดกร่อนได้ดีและอันตรายถึงปฏิกิริยาที่ใช้ต้องมีความทนทานต่อกรด ดังนั้นในการใช้จึงต้องมีการเจือจางก่อน ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัสดุได้ดีเช่นกัน

Alkaline hydrolysis สารเคมีที่มีความเป็นเบสบางชนิดสามารถนำมาใช้ในการปรับสภาพได้และผลกระทบของการใช้เบสขึ้นกับปริมาณของลิกนินในวัสดุ การใช้เบสเจือจางทำให้โครงสร้างวัสดุที่ยึดกันแน่นคลายออกจากกัน ทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้น ลดลักษณะที่เป็นผลึกแยกโครงสร้างที่เชื่อมต่อกันของลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และทำลายโครงสร้างของลิกนิน

ในงานวิจัยของ Karimi et al. (2005) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลและชีวมวลของเชื้อ *Mucor indicus* เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อยีสต์ *Pichia stipitis* โดยใช้สับสเตรทที่เป็นฟางข้าวที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง พบว่าจากการใช้ฟางข้าว 1 กิโลกรัมเมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสแล้วจะได้น้ำตาลไซโลส (xylose) 189 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 29 กรัม และในสถานการณ์หมักแบบไม่มีอากาศเชื้อ *M. indicus* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้เป็นเอทานอลเท่ากับ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส

2.7.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ

ในกระบวนการปรับสภาพทางชีวภาพโดยส่วนใหญ่จะเป็นการใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม brown-, white- และ soft-rot fungi ในการย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่ง brown rots มีประสิทธิภาพดีเฉพาะเซลลูโลส ส่วน white- และ soft-rot fungi มีประสิทธิภาพต่อเซลลูโลสและลิกนิน โดยเฉพาะ white- rot fungi มีความเหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพโดยวิธีการทางชีวภาพ

กลุ่มของเชื้อราที่มีการรายงานว่าสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ประกอบด้วย *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* และเชื้อในสปีชีส์ *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* และ *Penicillium* โดยเฉพาะเชื้อราในกลุ่ม *Trichoderma* ที่มีการศึกษากระบวนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

Akin et al. (1993) พบว่าการใช้ white rot fungi ย่อยอาหารสำหรับเลี้ยงปลุสัตว์โดยการใช้เชื้อ *Ceriporiopsis subvermispora* fp-90031 สามารถทำให้หญ้า Bermuda ถูกย่อยได้ถึง 80% ในเวลา 72 ชั่วโมง สภาพที่ใช้ในการทดลองจำลองจากการย่อยอาหารในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้องและพบว่าเชื้อชนิดอื่นๆ คือ *Phellinus pini* RAB-83-19, *P. chrysosporium* K-3 และมิวแทนท์ของ 3113 และ 85118 ที่มาจากเชื้อ K-3 สามารถย่อยสลายลิกนินในหญ้า Bermuda ได้

Keller et al. (2003) ได้ศึกษาการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยเชื้อจุลินทรีย์เพื่อลดปัญหาของการปรับสภาพโดยใช้ความร้อนและพลังงานในการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภท

ลิกโนเซลลูโลสโดยใช้เชื้อ *Cyathus stercoreus* พบว่าประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์ทางการค้า ย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพโดยเชื้อ *C. stercoreus* เพิ่มขึ้นถึง 3-5 เท่า และจากการใช้เชื้อรา *P. chrysosporium* ในการปรับสภาพซังข้าวโพดสามารถลดแรงดึงของซังข้าวโพดได้ 10-100 เท่า

Hadar et al. (1993) รายงานว่ากากฝ้ายสามารถกำจัดลิกนินออกได้ด้วยการย่อยของเห็ดที่สามารถกินได้ คือ *Pleurotus ostreatus* ในเวลา 36 ชั่วโมง และสภาวะการทดลองในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง พบว่าสารอินทรีย์เพิ่มขึ้นจากการใช้วิธีนี้ 2.2 เท่าจากสภาวะที่ไม่ได้ใช้เชื้อเห็ดในการปรับสภาพวัสดุหมัก

2.8 การย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

2.8.1 การย่อยสลายด้วยสารเคมี (พรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2546)

การย่อยสลายด้วยสารเคมีสามารถทำได้โดยการใช้กรดหรือด่าง ซึ่งจะไปทำลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน โดยส่วนใหญ่การย่อยสลายด้วยสารเคมีนี้ต้องการสภาวะที่รุนแรงในการเกิดปฏิกิริยา

2.8.1.1 การย่อยสลายด้วยกรด (Acid Hydrolysis) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการคือ

1) Homogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลกลูโคส แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ จะต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้ และการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ (recycle) รวมทั้งปัญหาการสูญเสียกรดไปกับส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย และการผุกร่อนของเครื่องมือจากการใช้กรดเข้มข้น

2) Heterogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดอ่อนแต่ต้องใช้ในสภาวะอุณหภูมิสูงกว่า 180°C ผลของการย่อยคือ เซลลูโลสยังมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่ (Fibrous structure) วิธีการนี้จะไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ แต่จะถูกทำให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

2.8.1.2 การย่อยสลายด้วยด่าง (Alkaline hydrolysis) ด่างที่นิยมใช้คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทิลีนไดอะมีน และแอมโมเนีย เป็นต้น โดยจะมีผลทำให้สายโพลีแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 180°C และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อยซึ่งจะนำไปใช้ในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส

2.8.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การใช้เอนไซม์ในการปรับสภาพหรือการย่อยสลาย (hydrolysis) เซลลูโลส ส่วนใหญ่เอนไซม์ที่ใช้คือเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งมีความจำเพาะสูง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสจะเป็นน้ำตาลรีดิวิซ์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซึ่งในด้านค่าใช้จ่ายโดยการใช้เอนไซม์จะต่ำกว่าการใช้กรดหรือเบสเนื่องจากไม่ต้องคำนึงถึงปัญหาจากการกัดกร่อนโดยเอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา โดยปกติในกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 3 กลุ่ม คือ

2.8.2.1 endoglucanase (EG, endo-1,4-D-glucanohydrolase หรือ

EC 3.2.1.4) เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยาในบริเวณที่มีลักษณะที่เป็นผลึกต่ำของเซลลูโลส

2.8.2.2 exoglucanase หรือ cellobiohydrolase (CHB, 1,4-β-D-glucan

cellobiohydrolase หรือ EC 3.2.1.91 เป็นเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสให้เป็นเซลโลไบโอส (cellobiose)

2.8.2.3 β-glucosidase (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยเซลโลไบโอสให้

เป็นกลูโคส

การนำวัสดุประเภทที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล จำเป็นที่จะต้องมีการย่อย (hydrolysis) เซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวิซ์หรือกลูโคสก่อน จากนั้นจึงมีกระบวนการเปลี่ยนจากกลูโคสไปเป็นเอทานอลโดยการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์

Ballesteros et al. (2004) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากชีวมวลที่ได้จากพืช (*Populus nigra* and *Eucalyptus globulus*) ฟางข้าวสาธิต กากข้าวฟ่างหวาน และ *Brassica carinata* ที่เหลือจากการบีบน้ำมันแล้ว โดยใช้กระบวนการย่อยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าร่วมกับการใช้ยีสต์ *Kleuyveromyces marxiaus* CECT 10875 ที่อุณหภูมิ 42°C ปริมาณวัสดุหมักที่ใช้คือ 10% (w/v) ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้เท่ากับ 15 FPU/กรัมวัสดุหมัก พบว่าวัสดุหมักที่ใช้สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณ 16-19 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาของ Pukahuta et al. (2005) โดยการใช้ white rot mushroom ในการย่อยสลายแกลบและฟางข้าวโดยใช้เชื้อเห็ด *Lentinus* spp. 5 สายพันธุ์ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า เชื้อเห็ดมีกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่มีแกลบ 0.2% มากกว่าอาหารที่มีฟางข้าว 2% ซึ่งเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 141.64 U mg protein⁻¹ ภายในเวลา 4 วัน คือ เชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ที่ pH เท่ากับ 5.0

2.9 การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ กระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นเซลลูโลส และกระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอล Philipidis (1996) รายงานถึงกระบวนการที่ใช้ในการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอลประกอบด้วย 3 กระบวนการคือ

2.9.1 การย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)

เป็นกระบวนการที่แยกขั้นตอนระหว่างการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ให้ได้กลูโคสก่อน แล้วจึงนำไปหมักต่อเพื่อให้ได้เอทานอล ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถแยกขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน $40-60^{\circ}\text{C}$ และการหมักที่มีอุณหภูมิ 30°C เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเจริญของยีสต์ แต่กระบวนการนี้มีข้อเสียที่สำคัญคือ กลูโคสที่เกิดขึ้นที่มีปริมาณมากถึงจุดหนึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β -glucosidase ในระหว่างการย่อยสลาย จึงทำให้ต้องใช้วัสดุหมักปริมาณไม่มากแต่ใช้เอนไซม์ปริมาณมากเพื่อที่จะให้ได้ผลผลิตเป็นเอทานอลในปริมาณที่ยอมรับได้

2.9.2 การเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยจุลินทรีย์โดยตรง (Direct Microbial Conversion, DMC)

เป็นวิธีการที่รวมเอาการผลิตเซลลูโลส การย่อยสลาย และกระบวนการหมักอยู่ในขั้นตอนเดียวกันซึ่งเป็นการประหยัดต้นทุนได้ เพราะลดจำนวนถังปฏิกรณ์และท่อส่งได้ อย่างไรก็ตาม ผลผลิตเอทานอลที่ได้ค่อนข้างต่ำมีผลิตภัณฑ์พลอยได้หลายชนิด และจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการนี้มีความทนทานต่อเอทานอลต่ำ จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอลได้โดยตรง เช่น *Candida thermocellum*, *C. thermohydrosulfuricum*, *Toruopsis ethanolicus* และ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น

2.9.3 กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)

เป็นกระบวนการที่รวมเอาการย่อยสลายเซลลูโลสและการหมักไว้ในขั้นตอนเดียวกัน กลูโคสที่เกิดขึ้นในระบบจะถูกใช้ไปในการหมักโดยจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่อง จึงพบว่ามีเซลโลไบโอสและกลูโคสอยู่ในระบบต่ำมาก ด้วยเหตุนี้จึงช่วยลดปัญหาของการยับยั้งการทำงานของเซลลูเลสโดยน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นได้ และช่วยลดปริมาณเอนไซม์ที่ต้องใช้ได้อีกด้วยอย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการนี้อยู่ที่ประมาณ $37-38^{\circ}\text{C}$ และจะดีที่สุดในช่วงประมาณ

40-60°C เพราะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้นในการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ สายพันธุ์ที่ใช้จะต้องมีความทนร้อนจึงจะได้ผลิตภัณฑ์เอทานอลที่ดีเมื่อใช้ อุณหภูมิตั้งแต่ 40°C ขึ้นไป

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทแป้งและวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส แสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากวัสดุทางการเกษตร

กระบวนการหมักที่นำมาใช้ศึกษา	วัตถุดิบที่ใช้	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษา	อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมัก	ผลผลิตเอทานอลที่ได้	เอกสารอ้างอิง
1. กระบวนการหมักเอทานอลในกระบวนการหมักแบบแข็งโดยใช้วัสดุสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง	เมล็ดข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum)	<i>S. cerevisiae</i> (VS3)	37°C	5 กรัมเอทานอล/100 กรัม สับสเตรท	Sree et al. (1999)
	มันเทศ (sweet potato)	<i>Bacillus</i> sp. (VB9)	42°C	3.5 กรัมเอทานอล/100 กรัม สับสเตรท	
2. การผลิตเอทานอล โดยกระบวนการหมักร่วมกับกระบวนการย่อยสลาย โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สองชนิด	เมล็ดข้าวฟ่างหัก	<i>A. niger</i> (NCIM1248)	-	2.90% w/v จากเมล็ดข้าวฟ่าง	Suresh et al. (1999)
	เมล็ดข้าวหัก	<i>S. cerevisiae</i> VSJ1		2.09% w/v จากเมล็ดข้าว	
3. การหาสภาพที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลเชิงมวลประเภทลิก โบนเซลลูโลส โดยกระบวนการหมักควบคู่กับกระบวนการย่อยสลาย	ใบของพืช <i>Antigonum leptopus</i> (Linn)	<i>S. cerevisiae</i> NRRL-Y-132	38.5°C	3.02 %w/v	Krishna and Chowdary (2000)
4. การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักร่วมกับการย่อยสลาย โดยใช้เชื้อยีสต์ร่วมกับเอนไซม์อะไมโลกูโคซิเดส	แป้งสาลีดิบ	<i>S. cerevisiae</i>	-	67 กรัมต่อลิตร-	Montesions and Navaro (2000)
5. การผลิตเอทานอล โดยกระบวนการหมักร่วมโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สองชนิด	แป้งคิงที่ไม้ผ่านการย่อย	<i>S. cerevisiae</i> 21 <i>S. diastaticus</i>	-	24.8 กรัมต่อลิตร	Verma et al. (2000)

ตารางที่ 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากวัสดุทางการเกษตร (ต่อ)

กระบวนการหมักที่นำมาใช้ศึกษา	วัตถุดิบที่ใช้	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษา	อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมัก	ผลผลิตเอทานอลที่ได้	เอกสารอ้างอิง
6. การผลิตเอทานอล โดยกระบวนการหมักควบคู่กับกระบวนการย่อยสลายจากวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง	ใบอ้อย	<i>S. cerevisiae</i> NRRL-Y-132	40°C	2.5-3.5 % w/v จากการใช้เชื้อผสม 2 ชนิด	Krishna et al. (2001)
	ใบของพืช <i>Antigonum leptopus</i>	<i>K. fragilis</i> NICM 3358	43°C		
7. การเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบ SHF และ SSF เพื่อการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ <i>Aspergillus niger</i> และ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	แป้งมันสำปะหลัง	<i>A. niger</i>	30°C	การหมักแบบ SHF 4.92% w/v (แบบแยกเซลล์ <i>A. niger</i>)	รัฐพงษ์ (2002)
		<i>S. cerevisiae</i>		4.96% w/v (แบบไม่แยกเซลล์ <i>A. niger</i>)	
8. การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักควบคู่กับกระบวนการย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยใช้เชื้อ <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875	พืช <i>Populus nigra</i> <i>Eucalyptus globulus</i> <i>Brassica carinata</i> ฟางข้าวสาลี ข้าวฟ่างหวาน ชานอ้อย	<i>K. marxianus</i> CECT 10875	42°C	การหมักแบบ SHF 2.90% w/v	Ballesteros et al. (2004)
				16-19 กรัมต่อลิตร	

ตารางที่ 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากวัสดุทางการเกษตร (ต่อ)

กระบวนการหมักที่ใช้ศึกษา	วัตถุดิบที่ใช้	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษา	อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมัก	ผลผลิตเอทานอลที่ได้	เอกสารอ้างอิง
9. การผลิตเอทานอลจาก industrial wastes โดยกระบวนการควบคู่กับกระบวนการย่อยสลาย	Old corrugated cardboard (OCC) paper sludge	<i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i>	40°C	0.31-0.34 กรัมเอทานอล/กรัมเซลลูโลส	Kádár et al. (2004)
10. การผลิตเอทานอลจากส่วนที่เป็น non starch carbohydrate ของรำข้าวสาลี	รำข้าวสาลี	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	Palmarola-Adrados et al. (2005)
11. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางจากกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ควบคู่กับกระบวนการหมัก	ฟางข้าวสาลี	รีคอมบิแนนต์ <i>E. coli</i> FBR5	35°C	13-17 กรัมต่อลิตร	Saha et al. (2005)
12. การผลิตเอทานอลจาก com stover ที่ปรับสภาพด้วยเอนไซม์จากกระบวนการหมักควบคู่กับการย่อยสลาย	com stover	<i>S. cerevisiae</i>	30°C	25 กรัมต่อลิตร	Öhgren et al. (2006)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Kleuyveromyces marxianus* ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.สาวิตรี ลิ้มทอง และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นาริรัตน์ มูลใจ

เชื้อเห็ดคุดหรือเห็ดลม *Lentinus polychrous* Lev.LP-PT-01 และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชรีดา ปุกหุด

เชื้อเห็ดนางฟ้า *Pleurotus sajor-caju* ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เชื้อรา *Aspergillus oryzae* ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3.1.2 วัสดุหมัก

วัสดุหมักที่ใช้ในการทดลองนี้คือ แกลบ ปลายข้าว รำหยาบและรำละเอียด ที่ได้ จากข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพาะปลูกในเดือนสิงหาคม 2548 และเก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน 2548 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากแปลงนาข้าวทดลอง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3.1.3 สารเคมี

	บริษัทผู้ผลิต
3.1.3.1 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS)	Fluka
3.1.3.2 Sodium hydroxide	Ajax
3.1.3.3 Potassium sodium tartrate	Fluka
3.1.3.4 Sodium sulphite anhydrous	CARLO ERBA
3.1.3.5 Sulfuric acid	J.T.Baker
3.1.3.6 Peptone from casein	CRITERION
3.1.3.7 Yeast extract powder	Himedia

3.1.3.8 D(+)-Glucose monohydrate	Fluka
3.1.3.9 Potassium hydroxide	CARLO ERBA
3.1.3.10 Methylene blue	Riedel-de Haën
3.1.3.11 Citric acid monohydrate	Fluka
3.1.3.12 95% ethanol	

3.1.4 อุปกรณ์

	บริษัทผู้ผลิต
3.1.4.1 กล้องจุลทรรศน์	Nikon
3.1.4.2 Hemocytometer	BOECO
3.1.4.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ รุ่น ALP KT-30L	ALP
3.1.4.4 เครื่องผสมตัวอย่าง รุ่น Vortex Genie2 [®]	Scientific Industries
3.1.4.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert
3.1.4.6 ไมโครปีเปต	BIOHIT
3.1.4.7 ตู้บ่มอุณหภูมิสูง	CONTHERM
3.1.4.8 ตู้บ่มอุณหภูมิต่ำ รุ่น 610 RHS:P6	CONTHERM
3.1.4.9 ตู้บ่มแบบเขย่า	SANYO
3.1.4.10 ตู้อบลมร้อน รุ่น Thermotec 2000	CONTHERM
3.1.4.11 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น CP 3202 S Sartorius	
3.1.4.12 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A	Precisa
3.1.4.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น 1610 Universal 32 R	Hettich

3.1.5 เครื่องมือวิเคราะห์

	บริษัทผู้ผลิต
3.1.5.1 เครื่องวัดพีเอช รุ่น 713	Metrohm
3.1.5.2 เครื่อง UV/Vis spectrometer รุ่น Lambda 25	Perkin Elmer
3.1.5.3 เครื่อง Gas Chromatography รุ่น GC 17A	SHIMADZU

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา

3.2.1.1 นำเชื้อราหรือเชื้อเห็ดจาก stock culture เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมไว้ตามวิธีในภาคผนวก ข โดยใช้ที่เจาะชิ้นวุ้น (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง

0.6 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายของเส้นใยเชื้อราหรือเชื้อเห็ด จากนั้นนำมาวางบนอาหารแข็ง PDA งานใหม่บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน

3.2.1.2 เก็บเชื้อที่เจริญเต็มงานอาหารที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไปและต้องปลูกเชื้อใหม่หากเก็บเชื่อนานเกิน 1 เดือน

3.2.2 การเตรียมวัสดุหมัก

นำเกลบที่ได้มาคัดแยกเศษหญ้าหรือฟาง ก่อนหลังจากนั้นนำมาล้างฝุ่นที่ปนเปื้อนด้วยน้ำประปา ทิ้งให้เกลบสะเด็ดน้ำและนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมงและเก็บไว้ในที่แห้ง สำหรับรำนาร้อนแยกส่วนของปลายข้าวด้วยตะแกรงร่อนขนาด 16 mesh และเก็บไว้ในที่แห้งเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและป้องกันการเหม็นหืน

3.2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา

ศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดหรือเชื้อราที่อุณหภูมิแตกต่างกัน นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.2.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA โดยใช้ที่เจาะขึ้นวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เจาะลงบนงานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่และใช้เข็มเขี่ยปลายอดักขึ้นวุ้นวางลงในงานอาหารใหม่จำนวน 1 ขึ้นวุ้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40°C เป็นเวลา 2-3 วัน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อที่เจริญและสังเกตลักษณะการเจริญของเส้นใย

3.2.4 การศึกษาการปรับสภาพวัสดุหมัก

วัสดุหมักที่ใช้ในการทดลองเป็นผลพลอยได้จากการปลูกข้าวได้แก่ เกลบ ปลายข้าว และรำ โดยจะใช้เกลบเป็นวัตถุดิบหลักและปลายข้าวหรือรำที่เดิมเข้าไปเป็นวัสดุรองในอัตราส่วนร้อยละ 50 ต่อ 50 โดยน้ำหนักในการทดลองจะใช้ปริมาณของวัสดุหมักทั้งหมด 10 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งจะแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลองคือ ชุดที่ 1 วัสดุหมักทั้งหมดไม่มีการปรับสภาพด้วยความร้อน ส่วนการทดลองชุดที่ 2 จะทำการนำวัสดุหมักทั้งหมดไปนึ่งที่ 121°C เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นปลูกเชื้อโดยนำงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเต็ม ใช้ที่เจาะขึ้นวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร โดยเจาะในบริเวณที่มีการเจริญของเส้นใย จากนั้นปลูกเชื้อในปริมาณ 20 ขึ้นวุ้นต่อขวด และปิดฝาขวดด้วยจุกสำลี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดสกัดตัวอย่างด้วยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อขวด คนให้วัสดุหมักกระจายและนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 20°C นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS ตามวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก

3.2.5 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเอนไซม์สกัดหยาบจึงต้องมีการศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสบนอาหารแข็งและหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) โดยนำวัสดุหมักที่ได้จากข้อ 3.2.2 มาจำนวน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×200 มิลลิเมตร ซึ่งปริมาณของวัสดุหมัก ที่เป็นเกลบต่อรำละเอียดเท่ากับเกลบ 100 : 0, 90 : 10, 80 : 20 และ 70 : 30 ตามลำดับ และเติมน้ำ กลั่นในวัสดุหมักให้มีความชื้นเท่ากับ 60% ซึ่งปริมาณความชื้นในวัสดุหมักคำนวณได้จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ต้องการ} = \left[\frac{\text{ปริมาณน้ำที่ต้องเติม (ml)}}{\text{ปริมาณน้ำที่ต้องเติม (ml) + น้ำหนักวัสดุหมัก (g)}} \right] \times 100$$

จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.2.1 เจาะด้วยที่เจาะชั้นวุ้นขนาด 0.6 เซนติเมตร และปลูกเชื้อเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 และเชื้อรา *A. oryzae* (ลงในหลอดทดลอง) จำนวน 1 ชั้นวุ้น เนื่องจากเชื้อ มีการสร้างสปอร์ ส่วนเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 และเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* ใช้จำนวน 3 ชั้นวุ้น และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือเชื้อรา *Trichoderma* sp. เชื้อรา *A. oryzae* และเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* บ่มที่ อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 14 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 2 วันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ เซลลูเลสตามวิธีในภาคผนวก ก

3.2.6 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

3.2.6.1 ใช้ห้วงเชื้อยีสต์จาก stock culture มาลากบนอาหารแข็ง YPD ที่ เตรียมไว้ตามวิธีในภาคผนวก ข บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อยีสต์จะเจริญ จนสังเกตเห็นโคโลนีสีขาวนวล

3.2.6.2 นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.6.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร YPD ผิวหน้าเอียงและนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไปและต้องปลูกเชื้อใหม่หากเก็บเชื้อนานเกิน 1 เดือน

3.2.7 การศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ มาลากบนอาหารแข็ง YPD นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ จากนั้นใช้ห้วงเชื้อ เชื้อโคโลนีเดี่ยวที่เจริญ บนผิวหน้าอาหาร YPD ลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำกลั่นอยู่ และเกลี่ยเซลล์ให้กระจาย ปิดด้วยกระจกปิด

สไลด์ นำไปส่องดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา สังเกตดูลักษณะรูปร่างและการแบ่งเซลล์

3.2.8 การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 40°C และ 45°C

นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ มาลาคบนอาหารแข็ง YPD นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อยีสต์ จากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และสังเกตการเจริญของเชื้อยีสต์

3.2.9 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40°C

ศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C โดยนำเชื้อยีสต์จากผลการทดลองในข้อ 3.2.8 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ได้มาตรวจนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมักโดยใช้ Hemocytometer ตามวิธีในภาคผนวก ก และนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บน้ำหมักส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่ได้โดยใช้เครื่อง GC ตามวิธีในภาคผนวก ก

3.2.10 การศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักร่วมกับการย่อยสลาย (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักร่วมกับการย่อยสลาย (SSF) โดยเตรียมวัสดุหมักจากเกลบที่ผ่านการบดและร่อนให้มีขนาด 16 mesh และรำละเอียดที่ร่อนแยกปลายข้าวออกแล้ว จากนั้นนำเกลบและรำละเอียดที่ได้มาผสมกันในอัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนของวัสดุหมักที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบ SSF

สถานะที่	อัตราส่วน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	
	เกลบ	รำละเอียด
1	100	0
2	90	10
3	80	20
4	70	30

ในการทดลองนี้จะใช้เชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ในขั้นตอนของการปรับสภาพ และกระบวนการย่อยวัสดุหมัก และศึกษาผลของการปรับปริมาณความชื้นในวัสดุหมักในปริมาณที่ต่างกันคือ 60, 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะใช้วัสดุหมักตามอัตราส่วนในตารางที่ 3.2 จำนวน 1.5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20×150 มิลลิเมตร และปรับปริมาณความชื้นในปริมาณต่างๆ นำวัสดุหมักที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ปลูกเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ลงในวัสดุหมักที่เตรียมไว้นี้ โดยใช้ชั้นวุ้นที่เจาะด้วยที่เจาะชั้นวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร จำนวน 1 ชั้นวุ้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำวัสดุหมักที่มีการเจริญของเส้นใยมาเขี่ยให้กระจายออกจากกัน วัสดุหมักที่ได้จากการปรับสภาพด้วยเชื้อเห็ดดังกล่าวจะไม่ได้นำมาทำลายเชื้อเห็ดที่เจริญอยู่ เนื่องจากในขั้นตอนการย่อยสลายวัสดุหมักให้ได้เป็นน้ำตาลโดยอาศัยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อเห็ด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีเซลล์ยีสต์อยู่จำนวน 1.2×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และนำไปบ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS และหาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยเครื่อง GC ตามวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก

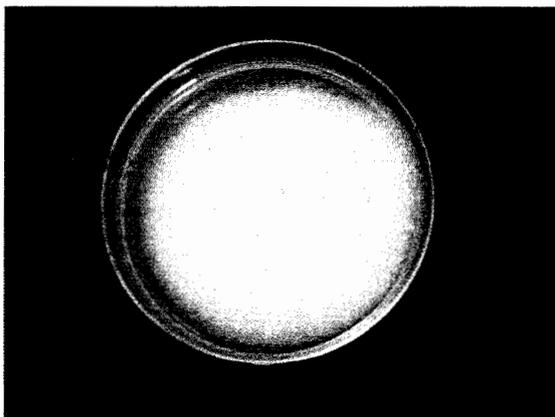
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

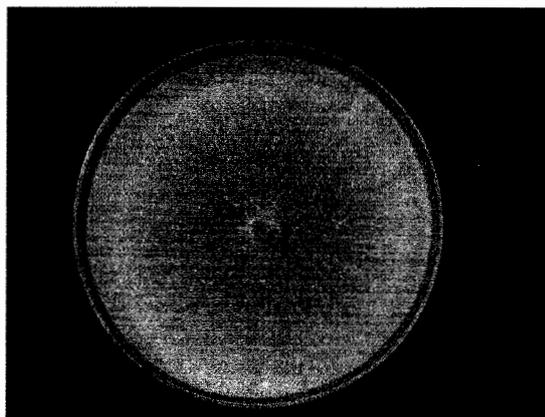
4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา

การศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev.LP-PT-01 เชื้อเห็ด *P. sajor-caju* เชื้อรา *A. oryzae* และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40°C เป็นเวลา 2-3 วัน บนอาหารแข็ง PDA ผลการศึกษาพบว่าเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev.LP-PT-01 สามารถเจริญได้ทุกอุณหภูมิแต่ลักษณะการเจริญของเส้นใยต่างกันคือที่อุณหภูมิ 35°C เส้นใยมีลักษณะฟูและหนาแน่นกว่าเส้นใยที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C (ภาพที่ 4.1) ลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* พบว่าที่ระยะเวลา 3 วัน อุณหภูมิ 30°C เชื้อสามารถเจริญได้แต่เจริญได้ช้าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev.LP-PT-01 ส่วนที่อุณหภูมิ 35 และ 40°C เชื้อไม่สามารถเจริญได้ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* โดยลักษณะทางธรรมชาติเชื้อจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงเชื้อจึงไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากในกระบวนการหมักร่วมกับกระบวนการย่อยสลายต้องการอุณหภูมิต่ำ เพื่อให้การทำงานของเอนไซม์เซลล์ทำงานได้ดีจึงต้องมีกระบวนการปรับสภาพในสถานะที่มีอุณหภูมิต่ำ ดังนั้นเชื้อที่ใช้ในขั้นตอนของการปรับสภาพนั้นควรมีคุณสมบัติในการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำด้วย การใช้เชื้อเห็ด *P. sajor-caju* จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในขั้นตอนของการปรับสภาพวัสดุหมักด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. oryzae* พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ทุกอุณหภูมิแต่เมื่อสังเกตลักษณะของสปอร์ที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 35°C ปริมาณของสปอร์จะหนาแน่นกว่าและสปอร์มีสีเขียวที่เข้มกว่าสีของสปอร์ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C แต่ที่อุณหภูมิ 40°C เชื้อจะเจริญได้ช้าเมื่อเทียบกับการเจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C และการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ทุกอุณหภูมิแต่ลักษณะของเส้นใยจะแตกต่างกันคือที่อุณหภูมิ 30°C เส้นใยเชื้อเจริญแนบไปกับผิวหน้าอาหารเส้นใยไม่ฟู แตกต่างจากการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 35 และ 40°C ที่จะสังเกตเห็นเส้นใยที่ฟูและหนาแน่น แต่ที่อุณหภูมิ 35°C การเจริญของเส้นใยมีลักษณะการเจริญที่สม่ำเสมอกว่าเส้นใยที่เจริญที่อุณหภูมิ 40°C



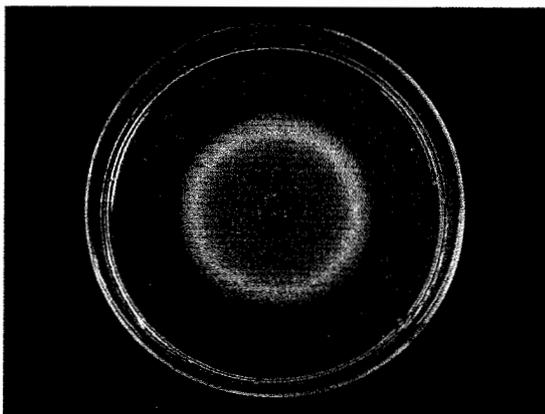
L. polychrous Lev. LP-PT-01



Trichoderma sp. T-11



P. sajor-caju



A. oryzae

ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อเห็ดและเชื้อราระยะเวลา 3 วัน โดยเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev.

LP-PT-01 เชื้อรา *A. oryzae* และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 ที่อุณหภูมิ 35°C และเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* ที่อุณหภูมิ 30°C

4.2 การศึกษาการปรับสภาพวัสดุหมัก

การศึกษาการปรับสภาพวัสดุหมักที่เป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว 4 ชนิด ได้แก่ แกลบ ปลาขี้ขาว รำละเอียด และรำหยาบ โดยปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนร่วมด้วยโดยจะนำวัสดุหมักมาให้ความร้อนโดยนำมานึ่งในหม้อหนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที และวัสดุหมักที่ไม่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมด้วยจะทดลองควบคู่กันจากนั้นนำเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 เชื้อรา *A. oryzae* และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 ปลุกเชื้อลงในวัสดุหมักเพื่อให้เชื้อเจริญและย่อยสลายวัสดุหมักซึ่งในขั้นตอนนี้จะเป็นการปรับสภาพด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

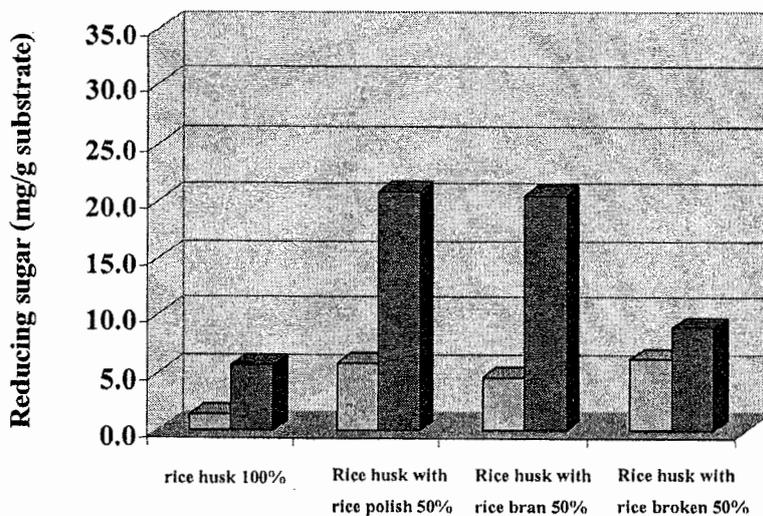
จากการศึกษาการปรับสภาพวัสดุหมักด้วยความร้อนร่วมด้วยพบว่าในวัสดุหมักชุดควบคุมที่ไม่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักเท่ากับ 1.44, 5.78, 4.55 และ 6.21 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก จากวัสดุหมักที่เป็นเกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ เกลบต่อรำละเอียด 50 : 50 เกลบต่อรำหยาบ 50 : 50 และเกลบต่อปลายข้าว 50 : 50 ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักที่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.70, 20.95, 20.64 และ 8.98 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5) ดังนั้นเมื่อทำการปรับสภาพวัสดุหมักด้วยความร้อนจะทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ในการทดลองต่อไปเมื่อนำวัสดุหมักดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาควรจะนำวัสดุหมักมาให้ความร้อนโดยการนำมาึ่งในหม้อนึ่งความดันไอก่อน

ในกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับการปรับสภาพทางด้านชีวภาพ จากผลของการใช้เชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 หลังจากเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนวัสดุหมักที่ไม่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมด้วย เป็นเวลา 7 วัน และนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าจากวัสดุหมักที่เป็นเกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ เกลบต่อรำละเอียด 50 : 50 เกลบต่อรำหยาบ 50 : 50 และเกลบต่อปลายข้าว 50 : 50 ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักที่ไม่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.10, 5.36, 3.95 และ 2.61 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักที่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับการปรับสภาพด้วยเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.79, 33.74, 13.03 และ 33.51 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6)

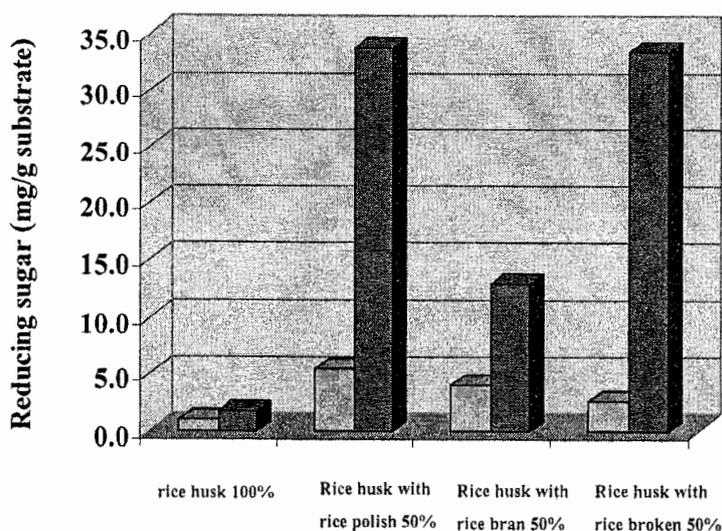
ในกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับการปรับสภาพทางด้านชีวภาพ จากผลของการใช้เชื้อรา *A. oryzae* หลังจากเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนวัสดุหมักที่ไม่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมด้วย เป็นเวลา 7 วัน และนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักที่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.77, 3.36 และ 6.35 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก จากวัสดุหมักที่เป็น เกลบต่อรำละเอียด 50 : 50 เกลบต่อรำหยาบ 50 : 50 และเกลบต่อปลายข้าว 50 : 50 ตามลำดับ ในกรณีวัสดุหมักเป็นเกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบน้ำตาลรีดิวซ์จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักที่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับการปรับสภาพด้วยเชื้อ *A. oryzae* จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.50 4.15 4.08 และ 7.18 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ จากวัสดุหมักที่เป็นเกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ เกลบต่อรำละเอียด 50 : 50 เกลบต่อรำหยาบ 50 : 50 และเกลบต่อปลายข้าว 50 : 50 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) เนื่องจากเชื้อรา *A. oryzae* เป็นเชื้อราที่สามารถใช้แป้งได้ดี และมีการใช้น้ำตาลที่ได้จากขั้นตอนของการปรับด้วยความร้อน ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยเชื้อรา *A. oryzae* มีปริมาณน้อย ฉะนั้นการนำเชื้อรา *A. oryzae* มาใช้จึงไม่เหมาะสมในกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ

ในกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับการปรับสภาพทางด้านชีวภาพ จากผลของการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 หลังจากเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนวัสดุหมักที่ไม่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมด้วย เป็นเวลา 7 วัน และนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าจากวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ แกลบต่อรำละเอียด 50 : 50 แกลบต่อรำหยาบ 50 : 50 และแกลบต่อปลายข้าว 50 : 50 ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักที่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.48, 6.47, 3.39 และ 15.56 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักที่มีการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับการปรับสภาพด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 2.32, 17.96, 12.32 และ 11.62 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8)

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะสังเกตเห็นว่าในการใช้วัสดุหมักที่เป็นแกลบและรำละเอียดเป็นวัสดุหมักในการศึกษาการปรับสภาพด้วยความร้อนมีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดการใช้วัสดุหมักหลักในการทดลองเป็นแกลบและใช้รำละเอียดเป็นแหล่งสารอาหารเพิ่มเติม มีความเหมาะสมที่จะนำแกลบและรำละเอียดไปใช้ในการทดลองต่อไป เมื่อทำการปรับสภาพด้วยเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งในการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 และเชื้อรา *A. oryzae* มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง อาจเนื่องจากการนำไปใช้ในการเจริญของเชื้อดังกล่าว

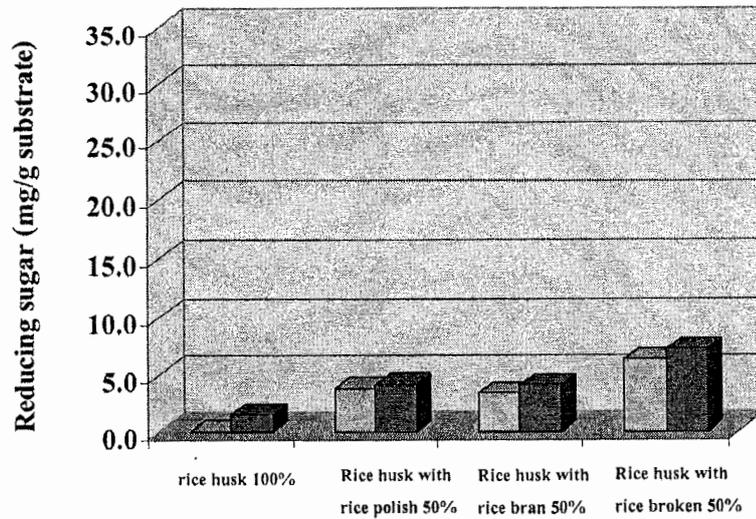


ก. วัสดุหมักที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเห็ดและรา (control)

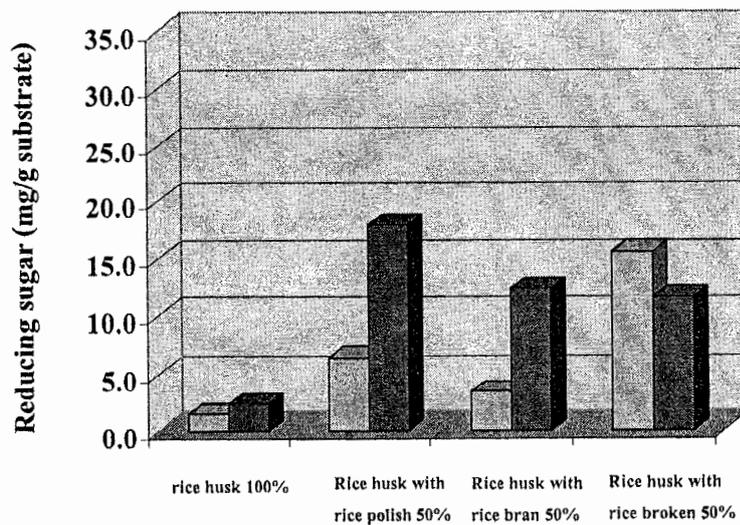


ข. วัสดุหมักที่ปลูกเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01

ภาพที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักชนิดต่างๆ ที่ปรับสภาพด้วยความร้อน (■) และไม่ปรับสภาพด้วยความร้อน (□) ในวัสดุหมักที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเห็ดและรา (ก) และวัสดุหมักที่ปลูกเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 (ข)



ก. วัสดุหมักที่ปลูกเชื้อรา *A. oryzae*



ข. วัสดุหมักที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11

ภาพที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวัสดุหมักชนิดต่างๆ ที่ปรับสภาพด้วยความร้อน (■) และไม่ปรับสภาพด้วยความร้อน (□) ในวัสดุหมักที่ปลูกเชื้อรา *A. oryzae* (ก) และวัสดุหมักที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 (ข)

4.3 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ 4 ชนิดคือเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 เชื้อเห็ด *P. sajor-caju* เชื้อรา *A. oryzae* และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 บนวัสดุหมักที่ใช้ในการทดลองนี้คือแกลบที่เติมรำละเอียดในอัตราส่วนต่างๆ คือ (1) แกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ (2) แกลบ 90 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 10 เปอร์เซ็นต์ (3) แกลบ 80 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 20 เปอร์เซ็นต์ และ (4) แกลบ 70 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรา *A. oryzae* เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 14 วันในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100 เปอร์เซ็นต์และวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 90 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 10 เปอร์เซ็นต์ และแกลบ 70 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วัน มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.13, 0.12 และ 0.13 U/ml ตามลำดับ สำหรับวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 80 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 20 เปอร์เซ็นต์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.15 U/ml ในวันที่ 12 ข้อมูลผลการทดลองแสดงดังตารางในภาคผนวก ซึ่งจากการสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. oryzae* ที่เจริญบนวัสดุหมักดังกล่าวพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีและเริ่มสังเกตเห็นการสร้างสปอร์เป็นจำนวนมากในวันที่ 2 ของการบ่มเชื้อบนวัสดุหมัก กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *A. oryzae* บนวัสดุหมักมีปริมาณสูงแต่ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อมีระยะเวลาที่นานเกินไป อาจเนื่องจากในช่วงแรกของการเจริญเชื้อนำน้ำตาล (สารอาหาร) ที่มีอยู่แล้วในวัสดุหมักมาใช้ในการเจริญ เมื่อสารอาหารหมดเชื้อจึงสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยวัสดุหมัก และอาจทำให้ปริมาณน้ำตาลหรือสารอาหารในวัสดุหมักมีปริมาณเหลืออยู่น้อย อีกทั้งเชื้อยังมีการสร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก ทำให้ยากต่อการแยกสปอร์ออกจากสารละลายเอนไซม์ ดังนั้นเชื้อรา *A. oryzae* จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในขั้นตอนของการปรับสภาพและกระบวนการย่อยสลายวัสดุหมัก

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* พบว่าเมื่อบ่มเชื้อเห็ดที่อุณหภูมิ 28°C ในวัสดุหมักที่ใช้ในการทดลองนี้คือแกลบที่เติมรำละเอียดในอัตราส่วนต่างๆ คือ (1) แกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ (2) แกลบ 90 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 10 เปอร์เซ็นต์ (3) แกลบ 80 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 20 เปอร์เซ็นต์ และ (4) แกลบ 70 เปอร์เซ็นต์ต่อรำละเอียด 30 เปอร์เซ็นต์ ดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 10 วัน เชื้อเห็ดสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 0.12 U/ml เท่ากัน ในวัสดุหมักอัตราส่วนต่างๆ จากการสังเกตลักษณะของเส้นใยเชื้อเห็ดที่เจริญบนวัสดุหมักพบว่าเส้นใยของเชื้อเจริญได้แต่เส้นใยหนาแน่นน้อยเมื่อเทียบกับการเจริญของเส้นใยของเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 อีกทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* ใช้เวลานาน และเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30°C แต่สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง การใช้เชื้อเห็ด *P. sajor-caju* ในการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในกระบวนการย่อยสลายวัสดุหมักจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 พบว่าเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 14 วัน บนวัสดุหมักอัตราส่วนเช่นเดียวกับการใช้เชื้อเห็ดและรดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเท่ากับ 0.04, 0.11 และ 0.04 U/ml ตามลำดับ สำหรับวัสดุหมักที่เป็นแกลบต่อรำละเอียด 70 : 30 เปอร์เซ็นต์เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเท่ากับ 0.05 U/ml ในวันที่ 8 และลักษณะการเจริญของเชื้อบนวัสดุหมักพบว่าสามารถเจริญได้ดี และมีการสร้างสปอร์ในวันที่ 2 ของการบ่มเชื้อและจากการสังเกตสีของสปอร์ พบว่าสีของสปอร์มีสีเขียวเข้มขึ้นเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลานานบนวัสดุหมักที่มีส่วนผสมของรำละเอียดทั้งนี้อาจเนื่องจากมีปริมาณของสปอร์จำนวนมาก

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 พบว่าเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 14 วัน บนวัสดุหมักอัตราส่วนเช่นเดียวกับการใช้เชื้อเห็ดและรดังกล่าวข้างต้น พบว่าเชื้อเห็ดมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 4 ของการบ่มเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.04 U/ml เท่ากัน ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100, 90 และ 80 % และ 0.03 U/ml ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 70% การสังเกตการเจริญของเชื้อที่เจริญบนวัสดุหมักพบว่าเชื้อมีการเจริญของเส้นใยได้ดี โดยเส้นใยเจริญหนาแน่นมากและความหนาแน่นของเส้นใยเพิ่มมากขึ้นเมื่อวัสดุหมักมีรำละเอียดเป็นส่วนผสม

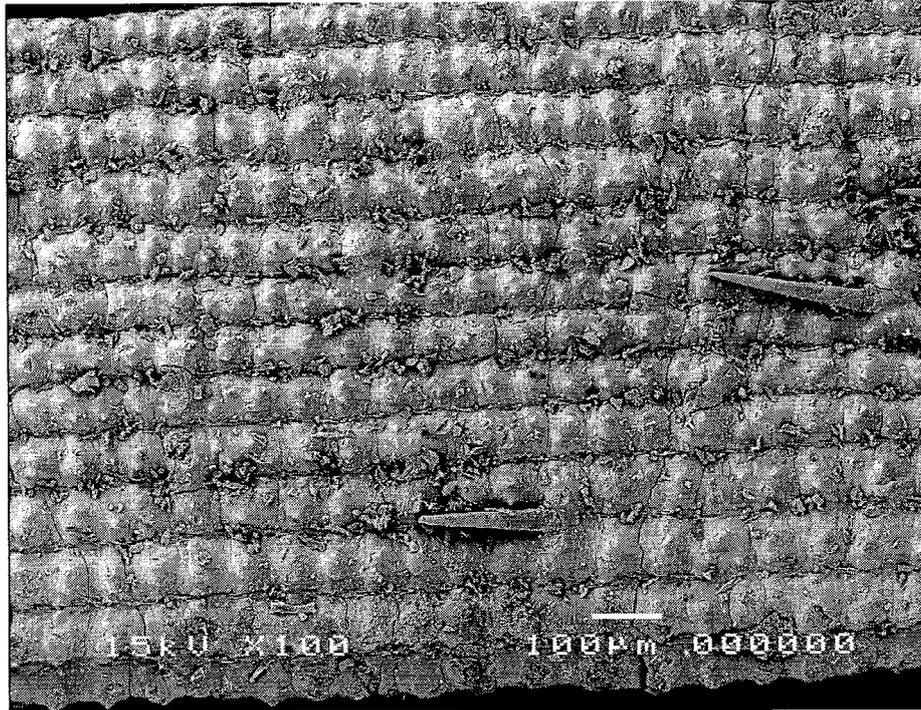
และจากการศึกษาของโสภา อาจทวีกุล (2544) ซึ่งศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อเห็ด *Lentinus* sp. จำนวน 45 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 5 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดคือ LP-PT-01, LP-SM-12, LP-SN-51, LP-SW-3 และ LP-YD-2 โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์วิเคราะห์ตามวิธีของ Nelson-Somogyi มีค่าเท่ากับ 36.6, 35.9, 40.7, 33.6 และ 32.3 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยสภาวะที่เหมาะสมคือ การใช้ Citrate buffer pH 5.0 อุณหภูมิ 50°C เวลา 5 นาที พบว่าเชื้อราหัส LP-PT-01 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในอาหารที่มี carboxymethyl cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 มีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* เชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 และเชื้อรา *A. oryzae* อีกทั้งยังพบว่าเชื้อรา 2 สายพันธุ์หลังที่กล่าวถึงในการนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ยังมีการสร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก ซึ่งถ้าหากนำเชื้อดังกล่าวมาใช้ในขั้นตอนของกระบวนการหมักควบคู่กับกระบวนการย่อยสลายเชื้ออาจจะมีการใช้สารอาหารที่ได้มาใช้ในการเจริญออกเป็นเส้นใยได้ ดังนั้นเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 น่าจะมีคุณสมบัติที่เหมาะสม สามารถนำมาใช้ในการปรับสภาพวัสดุหมักและการย่อยสลายวัสดุหมัก

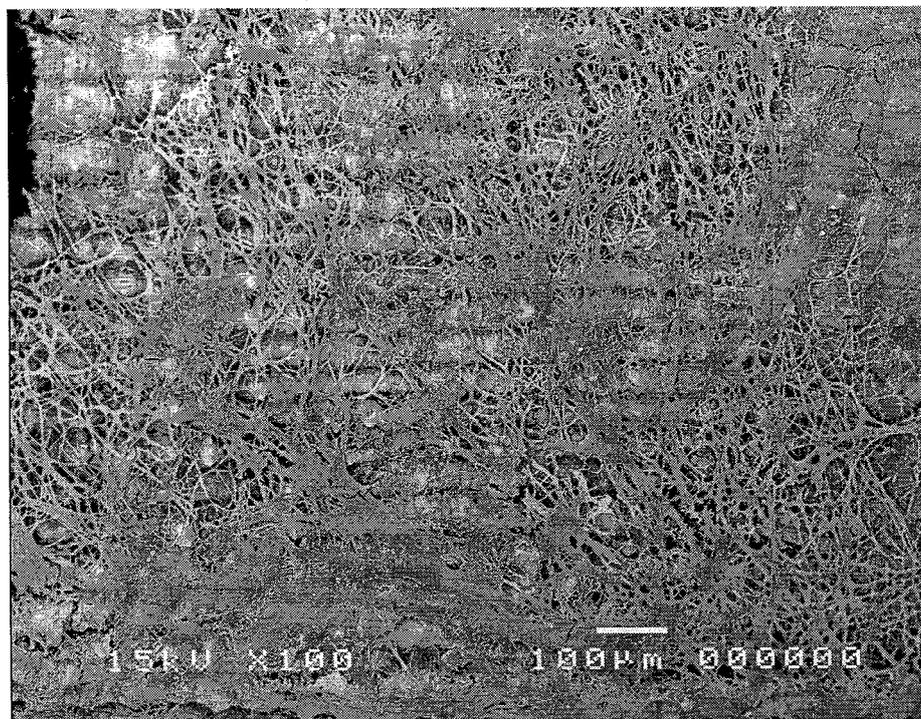
เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-40°C และมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในการเจริญของเชื้อเห็ดภายในระยะเวลา 4 วัน

4.4 การตรวจสอบการเจริญของเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 บนแกลบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการตรวจสอบการเจริญของเส้นใยเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ที่เจริญบนวัสดุหมักที่เป็นแกลบหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 35°C ด้วยกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่า เชื้อเห็ดสามารถที่จะเจริญปกคลุมพื้นผิวของแกลบ และมีการเจริญของเส้นใยที่หนาแน่น (ภาพที่ 4.5) ซึ่งในงานวิจัยของจรัส แก้วแรมเรือน (2548) ได้ตรวจสอบการถูกทำลายของผนังเซลล์แกลบจากเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในวันที่ 2, 4 และ 6 วัน พบว่าในบริเวณที่มีเส้นใยของเห็ดปกคลุมผนังของแกลบภายนอกจะมีการลอกและแตกร้าว โดยในบริเวณเซลล์ที่มีลักษณะนูนออกมาจะมีรอยผุร่อน ซึ่งจากผลดังกล่าวเกิดจากการทำลายของเอนไซม์เซลลูเลสที่หลั่งออกมาจากเส้นใยเห็ด โดยลักษณะของผนังเซลล์แกลบในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงพบว่า จะสามารถมองเห็นผลึกซิติคาซึ่งจะมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวแตกออกมาจากส่วนของโครงสร้างแกลบภายนอกบริเวณผนังเซลล์แกลบที่นูนออกมา



ภาพที่ 4.4 โครงสร้างภายนอกของแกลบที่ยังไม่มีการเจริญของเส้นใยเห็ด *L. polychrous* Lev.
LP-PT-01 ภายใต้อุปกรณ์ SEM กำลังขยาย 100 เท่า



ภาพที่ 4.5 โครงสร้างภายนอกของแกลบที่มีการเจริญของเส้นใยเห็ด *L. polychrous* Lev.
LP-PT-01 เป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 35°C ภายใต้อุปกรณ์ SEM กำลังขยาย 100 เท่า

4.5 การศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อยีสต์ที่มีในห้องปฏิบัติการ ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ (ตารางที่ 4.1) โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD พบว่าหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 28-30°C) จนสังเกตเห็นเชื้อเจริญเป็นโคโลนีสีขาวนวล จากนั้นใช้ห้วงเขี่ยเชื้อเกลี่ยลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำกลั่นอยู่และเกลี่ยเชื้อให้กระจาย ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และนำไปตรวจดูลักษณะรูปร่างของเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ดังภาพที่ 4.4

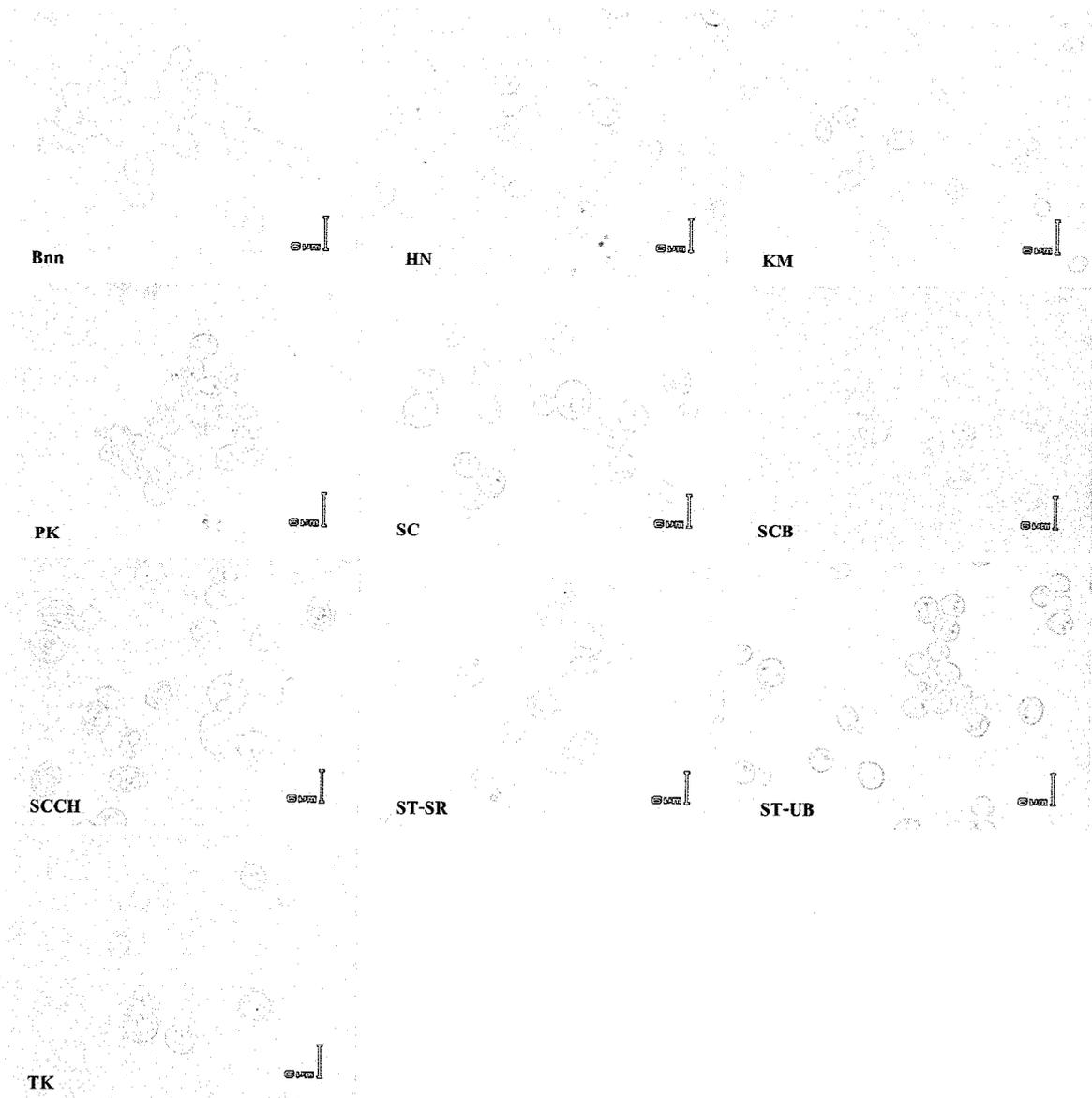
พบว่าเชื้อยีสต์ *K. marxianus* (KM) มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งอื่นๆ และลักษณะของเซลล์จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ สังเกตพบการเจริญแบ่งเซลล์ของเชื้อแบบแตกหน่อ (budding) เชื้อยีสต์ที่แยกจากสาโทจากจังหวัดสุรินทร์ (ST-SR) และสาโทจากจังหวัดอุบลราชธานี (ST-UB) พบว่ามีลักษณะของเซลล์คล้ายกันคือ มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน รูปร่างของเซลล์กลมรี สังเกตพบการเจริญแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ เชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผลตะขบ (TK) มีขนาดของเซลล์ใหญ่กว่าเชื้อยีสต์ *K. marxianus* แต่มีขนาดเล็กกว่าเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากสาโทเซลล์จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว และสังเกตพบการเจริญแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ เชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผึ้ง (HN)

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของเชื้อยีสต์

เชื้อยีสต์	แหล่งที่มา
<i>S. cerevisiae</i>	อ.นาริรัตน์ มูลใจ
<i>S. cerevisiae</i> B	อ.นาริรัตน์ มูลใจ
<i>S. cerevisiae champagne</i>	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
Bnn	กล้วยตากอบน้ำผึ้ง
HN	น้ำผึ้ง
PK	น้ำตาลปึก
TK	ผลตะขบ
ST-UB	สาโทจากจังหวัดอุบลราชธานี
ST-SR	สาโทจากจังหวัดสุรินทร์
<i>K. marxianus</i>	อ.สาวิตรี ลิ้มทอง

ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่แยกจากน้ำตาลปึก (PK) จะมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อยีสต์ที่แยกจากผลตะขบแต่มีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย มีการเจริญแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ แต่เซลล์ที่ได้จากการแตกหน่อจะยังคงติดอยู่กับเซลล์แม่ ทำให้สังเกตเห็นเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ และเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จาก

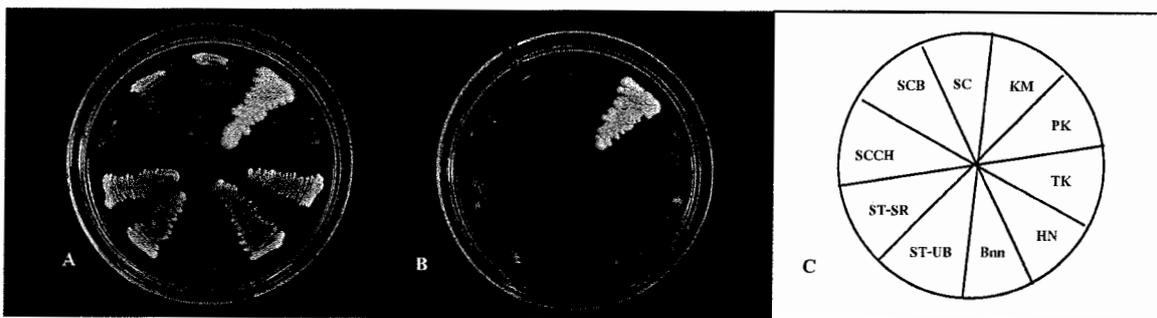
กล้วยตากอบน้ำผึ้ง (Bnn) ลักษณะของเซลล์มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผลตะขบ แต่เมื่อเซลล์มีการเจริญแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ เซลล์ใหม่หลุดออกจากเซลล์แม่ทำให้เซลล์อยู่กันเป็นกลุ่ม แต่ละกลุ่มเซลล์มีขนาดเล็กกว่ากลุ่มเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำตาลปึก (PK)



ภาพที่ 4.6 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร YPD medium เวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30°C ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

4.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 40°C และ 45°C

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD พบว่าหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40°C พบว่าเชื้อที่แยกได้จากผลตะขบ (TK) น้ำผึ้ง (HN) สาโทจากจังหวัดอุบลราชธานี (ST-UB) สาโทจากจังหวัดสุรินทร์ (ST-SR) และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* (SC) สามารถเจริญได้ ส่วนเชื้อที่แยกจากน้ำตาลปึก (PK) กล้วยตากอบน้ำผึ้ง (Bnn) และเชื้อ *S. cerevisiae champagne* (SC.CH) ไม่สามารถเจริญได้ (ภาพที่ 4.7) จากนั้นนำเชื้อที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C มาทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 45°C บนอาหารแข็ง YPD พบว่าหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45°C เชื้อดังกล่าวข้างต้นไม่สามารถเจริญได้ แต่เชื้อ *K. marxianus* (KM) และเชื้อ *S. cerevisiae* B (SCB) สามารถเจริญได้

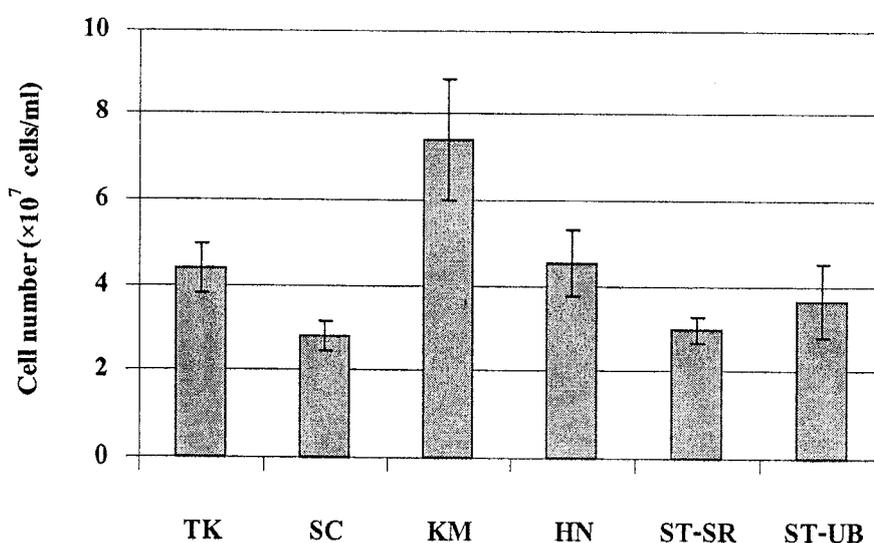


ภาพที่ 4.7 การเจริญของเชื้อยีสต์ที่มีในห้องปฏิบัติการบนอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 40°C (A) 45°C (B) และแผนภาพแสดงตำแหน่งของเชื้อยีสต์ (C)

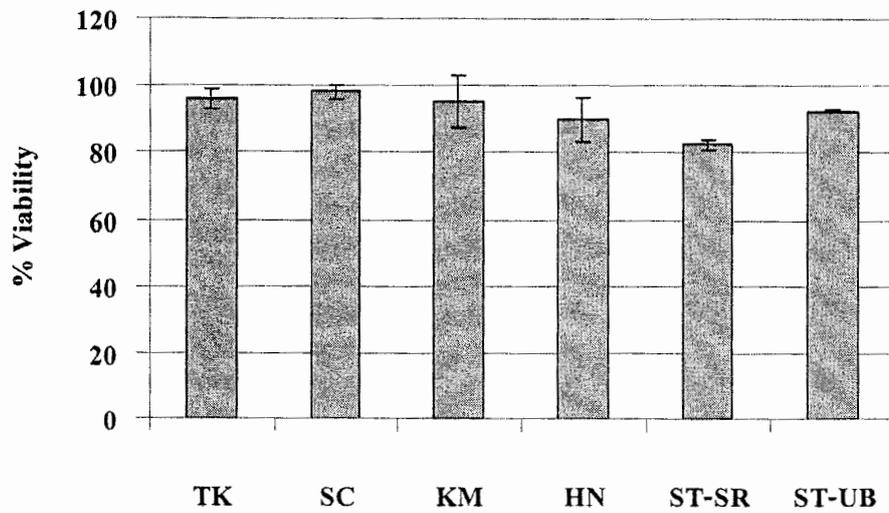
4.7 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 40°C

จากการศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลของเซลล์ยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD (จากผลการทดลองในข้อ 4.6) โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อนำตัวอย่างมาทำการเจือจางใน Methylene blue และนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Heamacytometer ตามวิธีในภาคผนวก ก เชื้อที่มีการเจริญมากที่สุดคือเชื้อ (KM) มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 7.4×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเชื้อที่มีจำนวนเซลล์น้อยที่สุดคือเชื้อ (SC) มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.8×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงดังภาพที่ 4.8 และเมื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตพบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นเชื้อ (ST-SR) มีเปอร์เซ็นต์

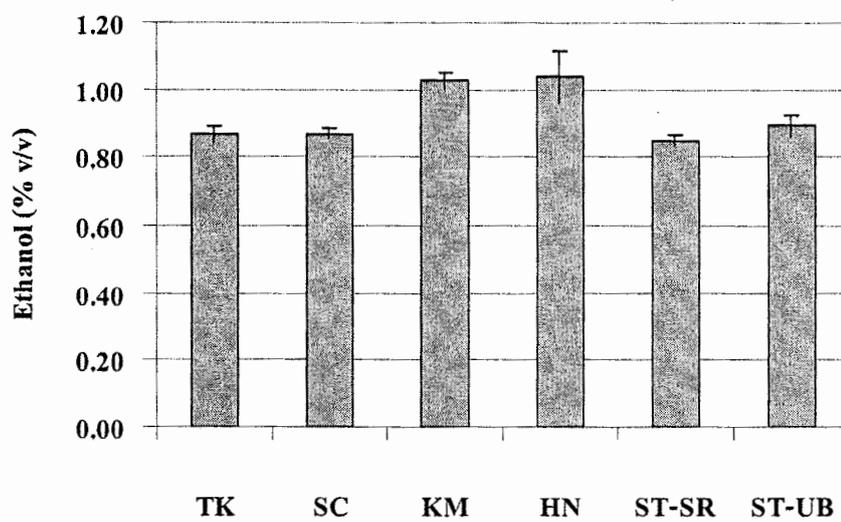
การรอดชีวิตเท่ากับ 83.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.9) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่อง GC และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี DNS ตามวิธีในภาคผนวก ก พบว่าเชื้อยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอทานอลได้ เชื้อ (HN) และเชื้อ (KM) มีปริมาณเอทานอลสูงสุด มีค่าเท่ากับ 1.04 และ 1.03 %v/v ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือหลังการหมัก มีค่าไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.11) ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในปริมาณสูงสุดจากเชื้อที่แยกได้จากน้ำผึ้ง (HN) และเชื้อ *K. marxianus* (KM) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง



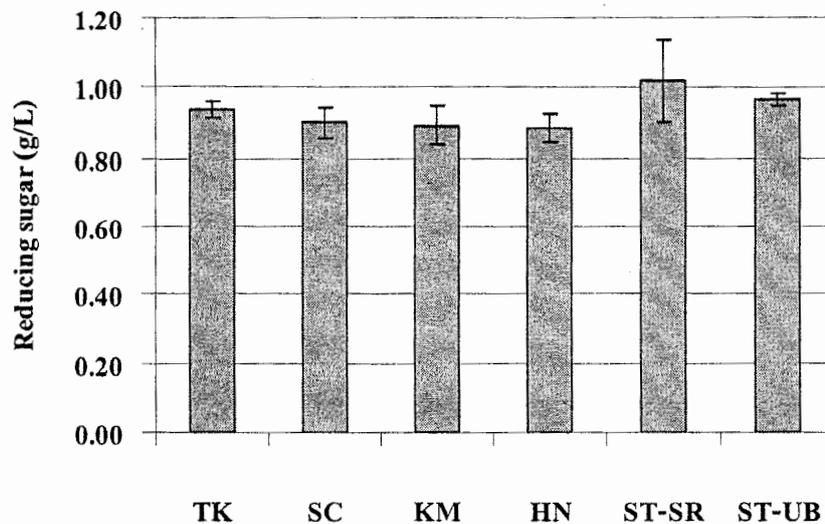
ภาพที่ 4.8 จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C



ภาพที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C



ภาพที่ 4.10 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C



ภาพที่ 4.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจากกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C

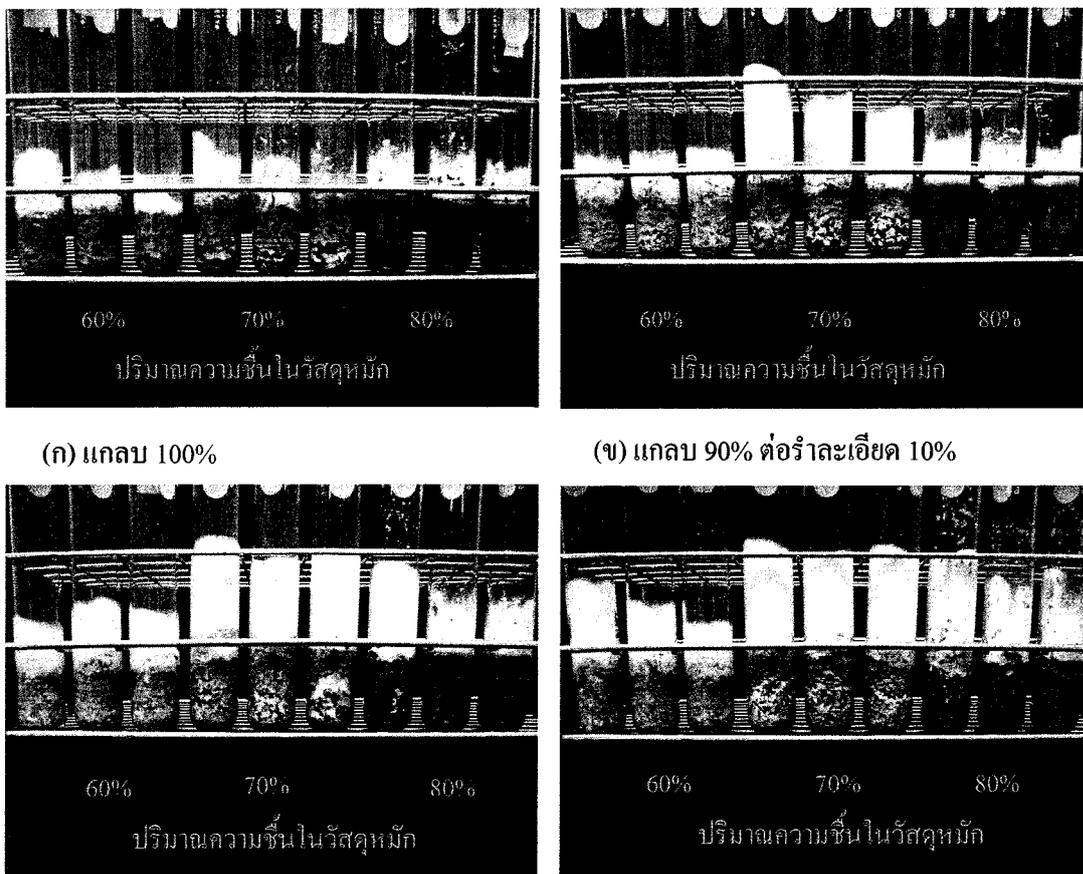
4.8 การศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักร่วมกับการย่อยสลาย (Simultaneous saccharification and fermentation)

4.8.1 การศึกษากระบวนการหมักแบบ SSF โดยปรับความชื้นวัสดุหมักเท่ากับ 60%

ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักร่วมกับการย่อยสลาย (SSF) ซึ่งในขั้นตอนการปรับสภาพ (pretreatment) และกระบวนการย่อยสลาย (hydrolysis) ใช้เชื้อ *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ในวัสดุหมัก 4 อัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 3.2 และทำการปรับความชื้นวัสดุหมักเป็น 60, 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก พบว่าจากการใช้เชื้อยีสต์ *K. marxianus* ในขั้นตอนกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 21 วัน ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า การปรับสภาพความชื้นในวัสดุหมักเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ในวัสดุหมัก พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีและมีการเจริญของเส้นใยปกคลุมวัสดุหมัก แต่ความหนาแน่นของเส้นใยจะมีความหนาแน่นมากขึ้นเมื่อวัสดุหมักมีการเติมรำละเอียดในอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้น และเมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC ตามวิธีในภาคผนวก ก พบว่าในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบเอทานอลจากการตรวจวิเคราะห์ด้วย GC (ภาพที่ 4.13) ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 90 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.04 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัสดุหมัก เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 4 วัน (ภาพที่ 4.14) และในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดย

น้ำหนัก สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 0.07 และ 0.10 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน (ภาพที่ 4.15 และ 4.16)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างกระบวนการหมักร่วมกับกระบวนการย่อยสลายวัสดุหมักที่ปรับความชื้นวัสดุหมักเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ในขั้นตอนของการปรับสภาพ พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์มีการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นและลดลงในแต่ละวัน พบว่าในวัสดุหมักที่เป็น แกลบ 100, 90, 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก เมื่อนำน้ำหนักมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สะสมสูงสุดในวันที่ 12 ของกระบวนการหมักเท่ากับ 0.56, 0.90, 1.05 และ 1.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในวันที่ 21 ของการหมัก เมื่อนำน้ำหนักมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ไม่พบน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS



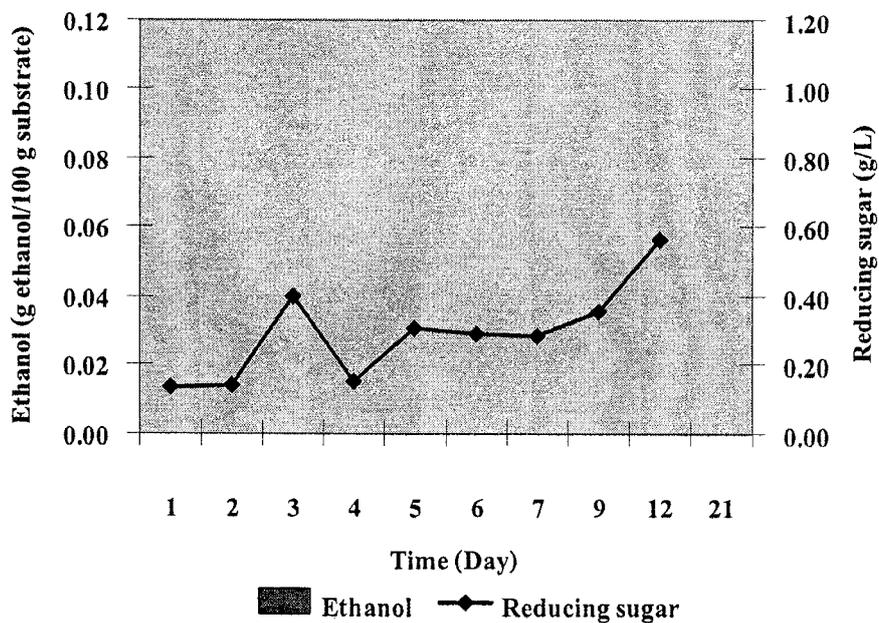
(ก) แกลบ 100%

(ข) แกลบ 90% ต่อรำละเอียด 10%

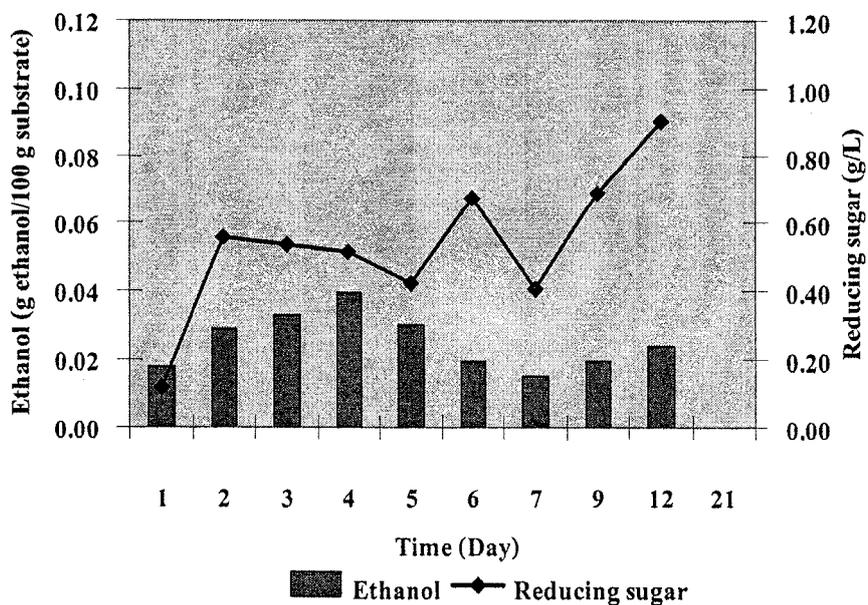
(ค) แกลบ 80% ต่อรำละเอียด 20

(ง) แกลบ 70% ต่อรำละเอียด 30%

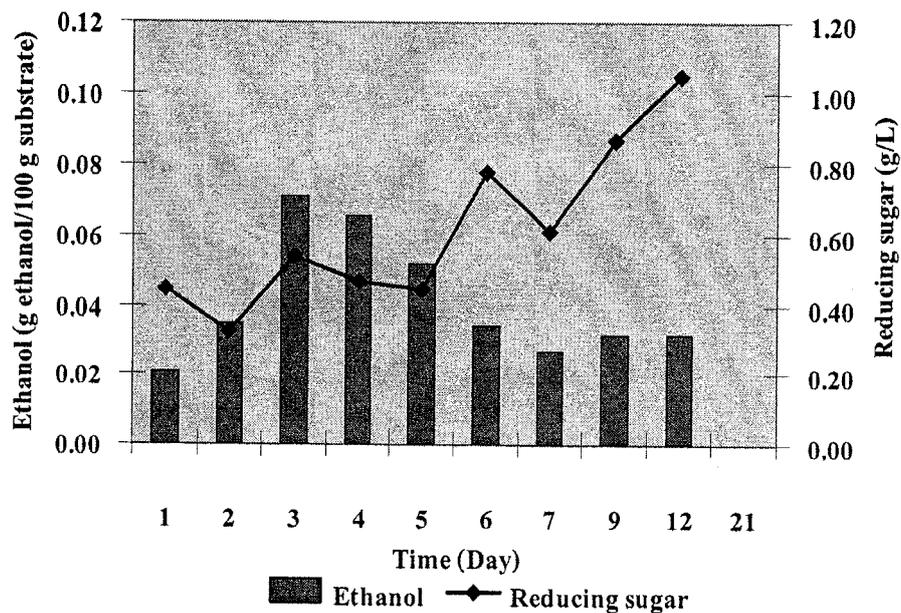
ภาพที่ 4.12 การเจริญของเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ในขั้นตอนการปรับสภาพวัสดุหมักเป็นเวลา 7 วัน



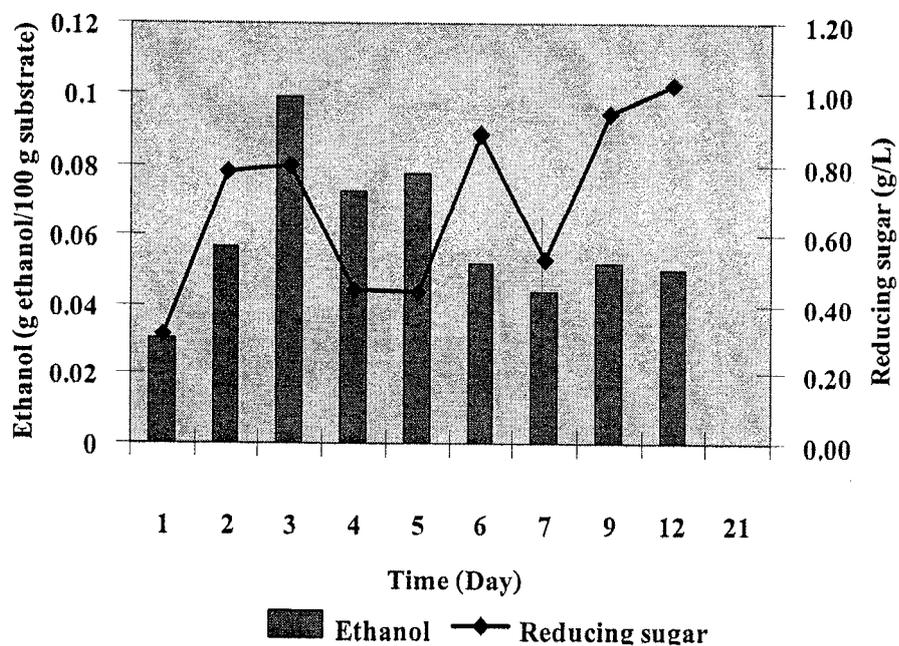
ภาพที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นกลีบ 100% ความชื้น 60%



ภาพที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นกลีบ 90% ความชื้น 60%



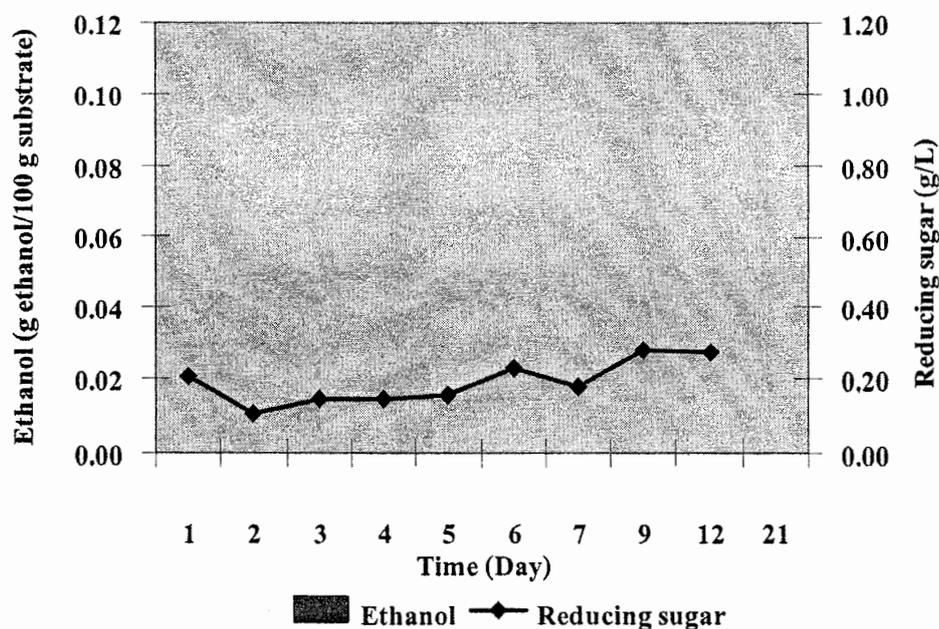
ภาพที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 80% ความชื้น 60%



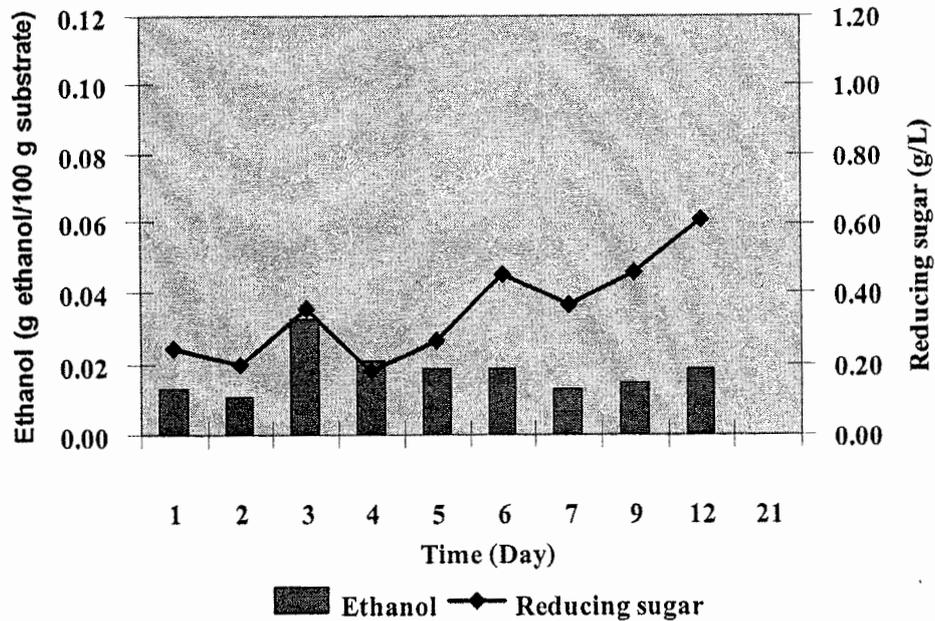
ภาพที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 70% ความชื้น 60%

4.8.2 การศึกษากระบวนการหมักแบบ SSF โดยปรับความชื้นวัสดุหมักเท่ากับ 70%

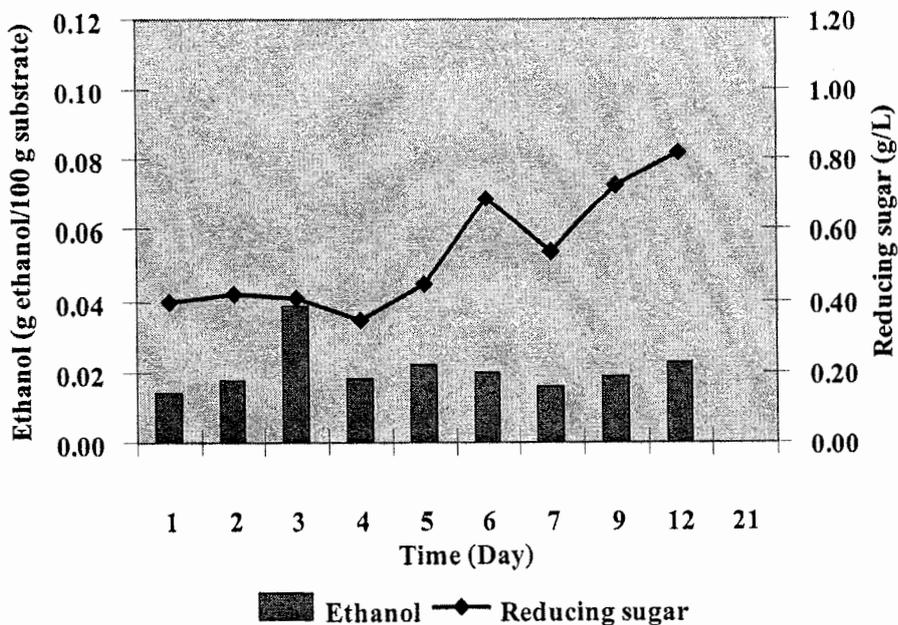
เมื่อเพิ่มปริมาณความชื้นให้กับวัสดุหมักในขั้นตอนของการปรับสภาพด้วยเชื้อเห็ด *L. polycchrous* Lev. LP-PT-01 เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์และทำการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักเป็นเวลา 21 วัน มาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล พบว่าไม่สามารถตรวจพบปริมาณเอทานอลได้ (ภาพที่ 4.17) และในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 90, 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน สามารถตรวจพบปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.03, 0.04 และ 0.08 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18-4.20) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างกระบวนการหมักร่วมกับกระบวนการย่อยสลายวัสดุหมักที่ปรับความชื้นวัสดุหมักเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ในขั้นตอนของการปรับสภาพในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100, 90, 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก เมื่อนำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สะสมสูงสุดในวันที่ 12 ของกระบวนการหมักเท่ากับ 0.27, 0.61, 0.82 และ 0.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในวันที่ 21 ของการหมัก เมื่อนำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าไม่สามารถตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ (ภาพที่ 4.17-4.20)



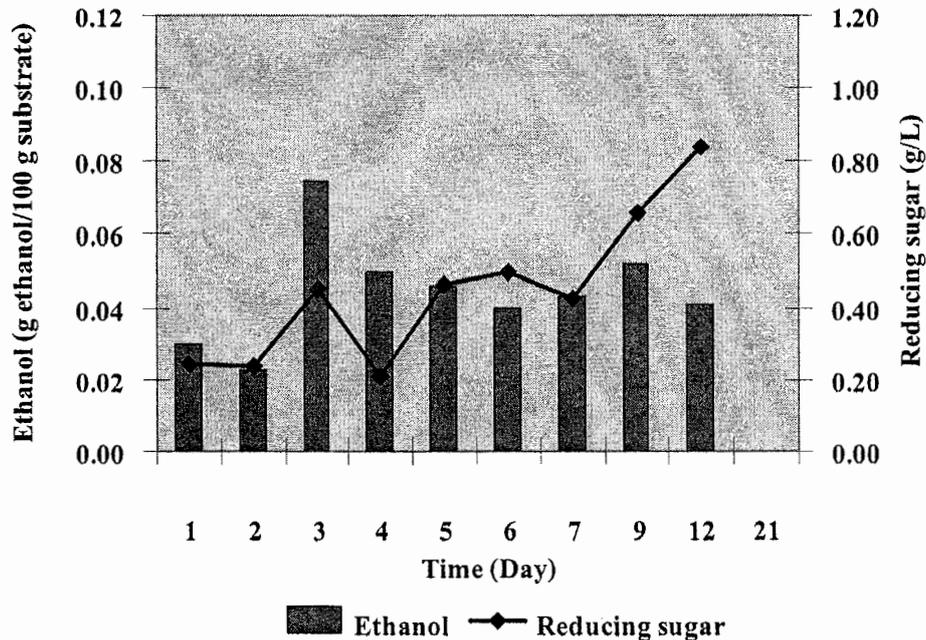
ภาพที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100% ความชื้น 70%



ภาพที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นกลีบ 90% ความชื้น 70%



ภาพที่ 4.19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นกลีบ 80% ความชื้น 70%

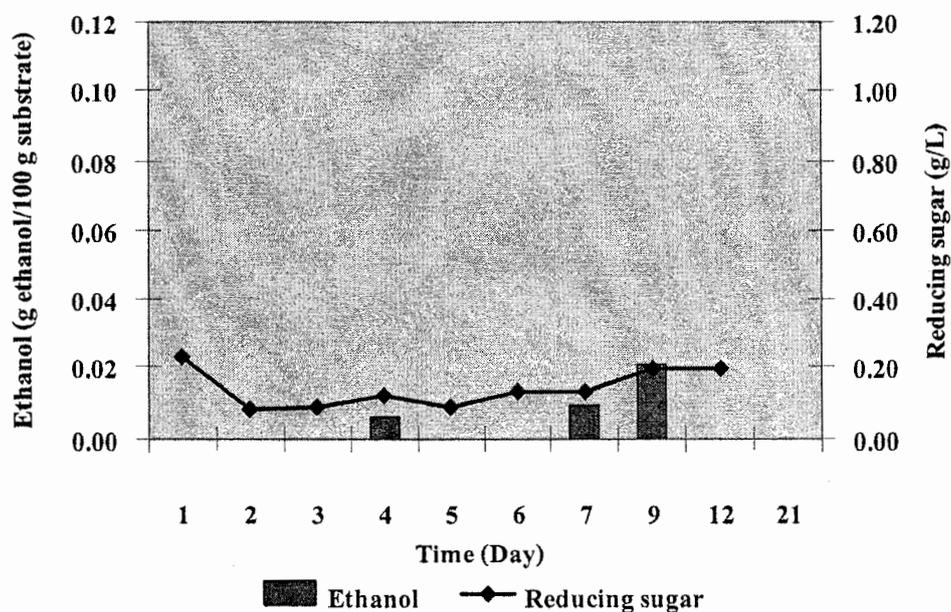


ภาพที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 70% ความชื้น 70%

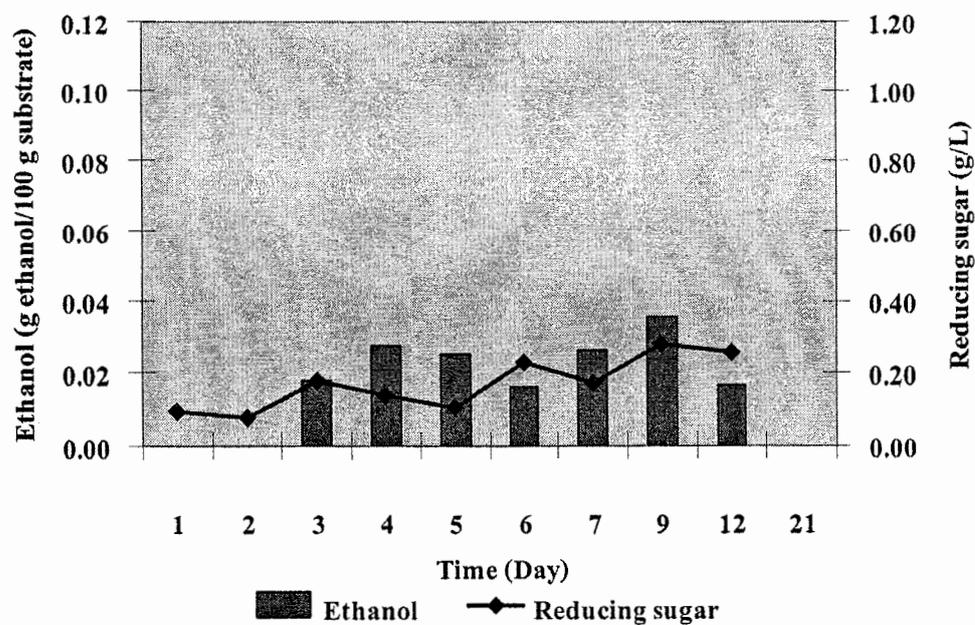
4.8.3 การศึกษากระบวนการหมักแบบ SSF โดยปรับความชื้นวัสดุหมักเท่ากับ 80%

เมื่อเพิ่มปริมาณความชื้นให้กับวัสดุหมักในขั้นตอนของการปรับสภาพด้วยเชื้อเห็ด *L. polycchrous* Lev. LP-PT-01 เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ดในวัสดุหมัก เชื้อจะเจริญอยู่เฉพาะบริเวณผิวหน้าของวัสดุหมักเท่านั้น และหมักแบบ SSF ต่อด้วยเชื้อ *K. marxianus* พบว่าในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100 และ 90 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก เมื่อหมักเป็นเวลา 9 วัน และนำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล มีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.02 และ 0.04 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ (ภาพที่ 4.21 และ 4.22) และในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก จะมีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.05 และ 0.10 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัสดุหมัก (ภาพที่ 4.23-4.24) เมื่อหมักเป็นเวลา 4 วัน เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างกระบวนการหมักร่วมกับกระบวนการย่อยสลายวัสดุหมักที่ปรับความชื้นวัสดุหมักเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ในขั้นตอนของการปรับสภาพในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 100, 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก เมื่อนำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สะสมในน้ำหมักสูงสุดในวันที่ 9 ของกระบวนการหมักเท่ากับ 0.20, 0.37 และ 0.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.21, 4.23 และ 4.24) และในวันที่ 21 ของการหมักเมื่อนำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าไม่สามารถตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ และในวัสดุหมักที่

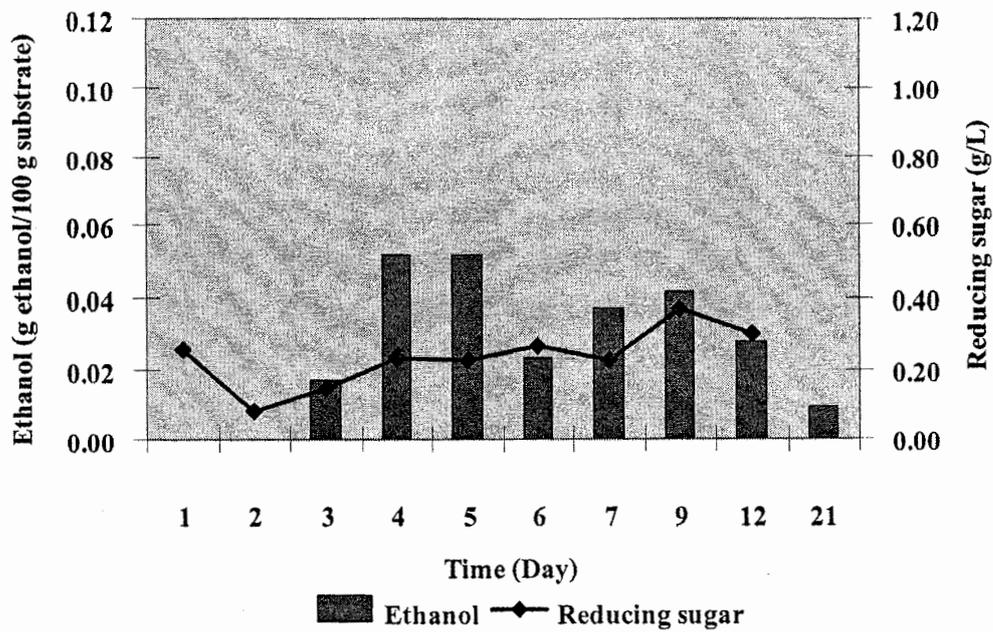
เป็นแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก พบว่าในวันที่ 12 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สะสมอยู่สูงสุดเท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.22)



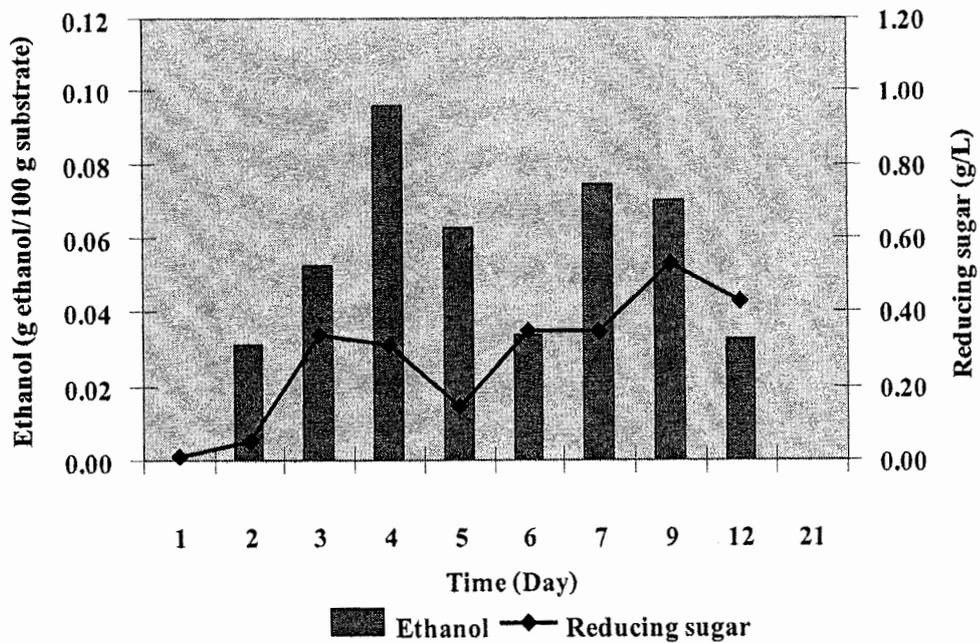
ภาพที่ 4.21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแอลกอฮอล์ 100% ความชื้น 80%



ภาพที่ 4.22 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแอลกอฮอล์ 90% ความชื้น 80%



ภาพที่ 4.23 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 80% ความชื้น 80%



ภาพที่ 4.24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อ *K. marxianus* ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบ 70% ความชื้น 80%

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญพบว่าเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 เชื้อรา *A. oryzae* และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40°C แต่ที่อุณหภูมิ 35°C เชื้อเจริญได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30°C ที่อุณหภูมิ 35 และ 40°C ไม่สามารถเจริญได้

5.1.2 การศึกษาการปรับสภาพวัสดุหมัก พบว่าการปรับสภาพวัสดุหมักที่เป็นแกลบและรำละเอียดทางกายภาพโดยใช้ความร้อนทำให้มีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการไม่ปรับสภาพด้วยความร้อน และเมื่อทำการปรับสภาพวัสดุหมักทางชีวภาพร่วมด้วย พบว่าการใช้เชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 ทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 และเชื้อรา *A. oryzae* พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง

5.1.3 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส จากการใช้เชื้อเห็ดและราชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบแต่ละเชื้อ สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในวัสดุหมักที่เป็นแกลบและรำ โดยเชื้อเห็ด *P. sajor-caju* และเชื้อรา *A. oryzae* มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 10 และ 12 วัน ตามลำดับ ส่วนเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 และ 8 ของการบ่มเชื้อ ตามลำดับ

5.1.4 การศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ายีสต์ที่นำมาศึกษามีรูปร่างกลมรี ขนาดแตกต่างกัน เชื้อยีสต์ที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ *K. marxianus* (KM) และเชื้อยีสต์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือเชื้อ *S. cerevisiae* B ยีสต์ที่คัดแยกได้จากกล้วยตากอบน้ำผึ้ง และน้ำตาลปึก (PK) พบว่าเซลล์จะอยู่กันเป็นกลุ่ม

5.1.5 การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 40 และ 45°C พบว่าเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C ได้แก่ เชื้อยีสต์ *K. marxianus* (KM) เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* B เชื้อที่คัดแยกจากผลตะขบ (TK) เชื้อที่แยกจากน้ำผึ้ง (HN) เชื้อที่คัดแยกจากสาโทจังหวัดสุรินทร์ (ST-SR) ยีสต์ที่คัดแยกจากสาโทจังหวัดอุบลราชธานี (ST-UB) และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และเมื่อนำเชื้อยีสต์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C มาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 45°C พบว่า เชื้อ *K. marxianus* (KM) เท่านั้นที่สามารถเจริญได้

5.1.6 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 40°C พบว่าเชื้อยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอทานอลได้ โดยที่เชื้อที่แยกได้จากน้ำผึ้ง (HN) และเชื้อ *K. marxianus* (KM) สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.04 และ 1.03%v/v ตามลำดับ

5.1.7 การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักร่วมกับการย่อยสลาย เมื่อปรับสภาพวัสดุหมักด้วยเชื้อเห็ด *L. polychrous* Lev.LP-PT-01 และใช้เชื้อ *K. marxianus* ควบคุมในการหมักเอทานอล ในการใช้วัสดุหมักที่เป็นแกลบและรำละเอียดในอัตราส่วน 70 : 30 โดยน้ำหนัก ความชื้นวัสดุหมักเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.01 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัสดุหมัก

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุหมักประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าวด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยงานวิจัยนี้ใช้วัสดุหมักที่เป็นแกลบและใช้รำละเอียดเป็นส่วนผสมเพื่อเป็นแหล่งของสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ จากการทดลองพบว่า วัสดุหมักดังกล่าวสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ แต่ผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอทานอล (product yield, g ethanol/g substrate) มีค่าค่อนข้างต่ำ อาจเป็นผลมาจากปัจจัยหลายๆ ประการ เช่น วัสดุหมักที่นำมาใช้ศึกษานั้นจะใช้แกลบเป็นหลัก ซึ่งองค์ประกอบของแกลบอาจจะมีเซลลูโลสอยู่ในปริมาณน้อยทำให้ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการย่อยสลายด้วยเชื้อเห็ดและปริมาณเอทานอลที่ได้ในกระบวนการหมักมีปริมาณที่น้อยตามไปด้วย หรือในขั้นตอนของการปรับสภาพโดยใช้เชื้อเห็ดรา เชื้ออาจจะมีการนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญสร้างเป็นเส้นใย (fungal biomass) ทำให้สารอาหารที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเป็นเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์มีปริมาณลดลง และในขั้นตอนของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อราและการหมักด้วยเชื้อยีสต์ต้องกระทำควบคู่กันภายใต้สภาวะเดียวกัน เช่น ที่อุณหภูมิสูง (40°C) เพื่อให้เกิดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ดี ในขณะที่การหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์อาจจะดำเนินไปได้ไม่สมบูรณ์ จึงส่งผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้อยู่ในระดับต่ำ ดังนั้น จำเป็นต้องศึกษาหาแนวทางแก้ไขปรับปรุงกระบวนการผลิตและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เพื่อให้สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- จำรัส แก้วแรมเรือน. 2548. กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ด *Lentinus spp.* ในอาหารเหลือ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรบัณฑิต : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัฐพงศ์ ปกแก้ว. 2545. การเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบ SHF และ SSF เพื่อการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- โตภา อาทวิกุล. 2544. Effect of pH and temperature on cellulase activity in white-rot fungi. *Lentinus spp.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรบัณฑิต : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ เนริสา คุณประทุม. มปป. การผลิตเอนไซม์จากวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นแนวทางการใช้ในอาหารสัตว์ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
<http://www.vet.chula.ac.th/~nuclear/symposium44/Hunsa.htm>. October, 2007.
- อรุณวรรณ นุชพ่วง. 2547. การย่อยสลายหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* Nash โดยใช้เชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Akin, D.E. and et al. 1993. Applied Environmental Microbiology. 59(12); 4274-4282.
- Ballesteros, M. and et al. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluveromyces marxianus* CECT 10875. Process Biochemistry. 39; 1843-1848.
- Chen, H., Siebenmorgen, T. and Griffin, K. 1998. Quality characteristics of long-grain rice milled in two commercial systems. Cereal Chemistry, (75)4; 560-565.
- FAO. 1994. African experience in the improvement of post-harvest techniques. Synthesis based on the workshop held in Accra, Ghana, 4-8 July 1994. FAO Agricultural Support Systems Division, Rome.
- Hadar, Y., Karen, Z. and Gorodecki, B. 1993. Journal of Biotechnology. 30; 133-139.
- Haktakka, A.I. 1983. Pretreatment of wheat straw by white rot-fungi for enzymatic saccharification of cellulose. Applied Microbiology and Biotechnology. 18; 350-357.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Juliano, B.O. 1972. The rice caryopsis and its composition. In D.F. Houston (ed.), Rice chemistry and technology. American Association of Cereal Chemistry, Inc., St. Paul, Minnesota. P 16 – 74.
- Karimi, K., Emtiazi, G. and Taherzadeh, M.J. 2005. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. Process Biochemistry. (in press)
- Keller, F.A., Hamilton, J.E. and Nguyen, Q. A. 2003. Microbial pre-treatment of biomass potential for reducing severity of thermochemical biomass pre-treatment. Applied Biochemistry and Biotechnology. 105; 27-41.
- Krishna, S. H., Reddy, T. J., and chowdary, G. V. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. Bioresource Technology. 77; 193-196.
- Luh, B.S., S. Barder and C. Benedito de Barder. 1991. Rice bran: chemistry and technology, pp. 313-362. In B.S. Luh, ed. Rice: Utilization. Volume II . 2nd edition. New York : AVI. Van Nostrand Reinhold.
- Malik, S. & Chaudhary, P. Non-conventional tools in the improvement of aromatic rices. In Specialty rices of the world: breeding, production and marketing. pp. 207-222. (In press)
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31; 426-428.
- Montesinos, T., and Navaro, J. M. 2000. Production of ethanol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 27; 362-370.
- N. Mosier et al. 2005. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Bioresource Technology 96(3), 673–86.
<http://genomics.energy.gov/gallery/biomass/detail.np/detail-09.html>. October, 2007.
- Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B. 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme and Microbial Technology. 18; 312-331
- Philipidis, G.P. 1996. Cellulose bioconversion technology. In C.E. Wyman (ed.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, pp. 253-255. Washington, DC :Taybr & Francis.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Pukahuta, C., Kaewraemruaen, C., Palasarn, W. and Pimmongkol, A. 2005. Degradation of rice husk and rice straw by white rot mushroom, *Lentinus* spp. 31st Congress on Science and Technology of Thailand. 72.
- Rao, G., Desikachar, H. & Subrahmanyam, V. 1960. The effect of the degree of polishing of rice on nitrogen and mineral metabolism in human subjects. Cereal Chemistry, 37: 71-77.
- Reshamwala, S., Shaeky, B.T., Dale, B.E. 1995. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. Applied Biochemistry and Biotechnology. 51/52; 43-55.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A. and Wu, Y.V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Process Biotechnology, 40; 3693-3700.
- Sakkas, T. 2002. A techno-economic-environmental analysis of the potential for gasification and ethanol production technologies in the Republic of Ireland. Thesis submitted in candidature for the Degree of Master of engineering, Cork Institute of Technology, Bishopstown, Cork, Ireland. October, 2007.
- Shleser, R. 1994. Ethanol production in Hawaii: processes, feedstocks, and current economic feasibility of fuel-grade ethanol production in Hawaii, State of Hawaii. Department of Business, Economic Development & Tourism; July. 15-119.
- Sree, N. K., Sridhar, M., Rao, L. V. and Pandey, A. 1999. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. Process Biochemistry. 34: 1
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. Bioresource Technology. 83: 1-11.
- Suresh, K., Sree, N. K., and Rao, L. V. 1999. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. Bioresource Technology. 68: 301-304.
- Varma, A. and Behera, B. 2003. Green energy: Biomass Processing and Technology. New Delhi Kolkata Bangalore: Capital Publishing Company.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Verma, G., Nigam, P., Singh, D., and Chaudhry, K. 2000. Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amyolytic yeast and *Saccharomyces cerevisiae* 21. *Bioresourse Technology*. 72: 261-266.
- Wade, Jr.,L.G. 1995. Structure and synthesis of alcohols. In *Organic Chemistry*.3rd ed. P.400. NewJersey: Prentice-Hall.
- Zhu, S. et al. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to ethanol. *Biosystem Engineering*. 92(2); 229-235.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์

ภาคผนวก ก

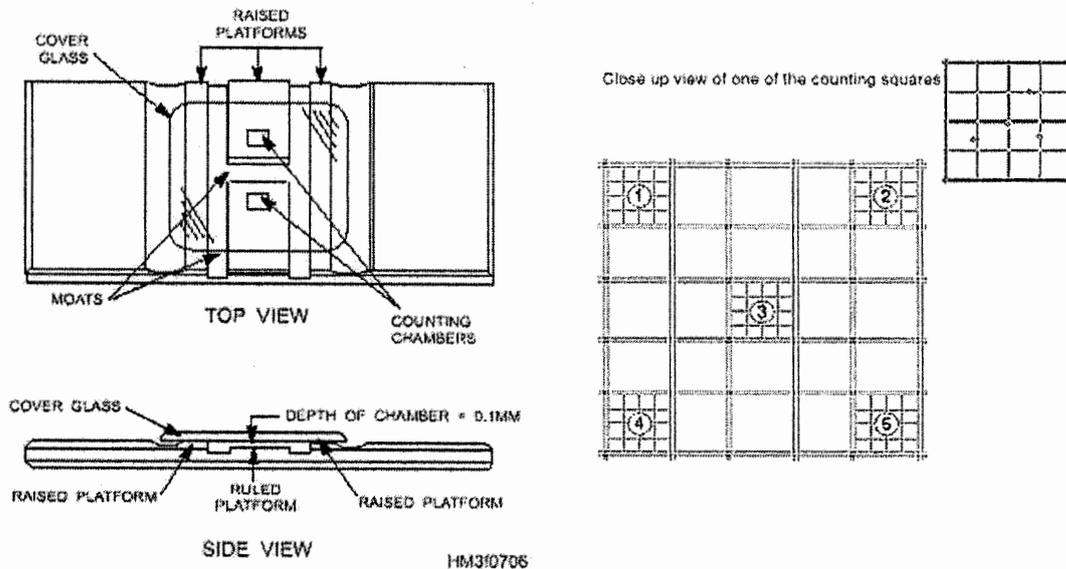
วิธีวิเคราะห์

1. การนับจำนวนเซลล์ที่แขวนลอยในน้ำหมักโดยใช้ Hemocytometer

1.1 เจือจางสารละลายตัวอย่าง (น้ำหมัก) ด้วยสารละลาย methylene blue ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม

1.2 หยดตัวอย่างสารละลายที่เจือจางลงบน Hemocytometer

1.3 นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับจำนวนเซลล์ใน 5 ช่องเล็ก (ภาพที่ 1) บน Hemocytometer



ก. ลักษณะของ Hemocytometer

ข. ตารางของ Hemocytometer สำหรับนับเซลล์

ภาพที่ 1 ลักษณะของ Hemocytometer ด้านบนและด้านข้าง (ก) และตารางของ Hemocytometer แสดงช่องหมายเลข 1-5 สำหรับนับเซลล์ (ข)

วิธีการคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ที่นับได้

เมื่อนับจำนวนเซลล์ครบ 5 ช่อง แล้วนำมาคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรตามความสัมพันธ์ดังนี้

$$\begin{aligned}
 1 \text{ ช่อง มีปริมาตร} &= 1/5 \times 1/5 \times 1/10 \text{ mm}^3 \\
 &= 1/250 \text{ mm}^3
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น 5 ช่อง มีปริมาตร} &= 5(1/250) && \text{mm}^3 \\ &= 1/50 && \text{mm}^3 \\ \text{นับ 5 ช่อง มีจำนวนเซลล์} &= X && \text{cells} \end{aligned}$$

นั่นคือ ปริมาตร $1/50 \text{ mm}^3$ มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $X \text{ cells}$

$$\begin{aligned} \text{ถ้าปริมาตร } 10^3 \text{ mm}^3 (1 \text{ ml}) \text{ จะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ } &50 \times 10^3 X && \text{cells} \\ &= 5X \times 10^4 && \text{cells/ml} \end{aligned}$$

แต่ตัวอย่างผ่านการเจือจาง

$$\text{ดังนั้น จำนวนเซลล์ทั้งหมด} = 5X \times 10^4 \times \text{dilution factor} \quad \text{cells/ml}$$

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Measurement of Cellulase Activity)

2.1 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 1.0 กรัม ละลายใน 0.05 M citrate buffer ปริมาตร
สุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมา
เจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 2-6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคสเข้มข้น (10.0 mg/ml) (ml)	0.05 M citrate buffer (ml)	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (mg/ml)
1	1.0	4.0	2.0
2	1.0	2.0	3.3
3	1.0	1.0	5.0
4	1.0	0.5	6.7

2.2 สารละลายเบลงค์และสารละลายควบคุม

2.2.1 สารละลายเบลงค์ : 0.05 M citrate buffer ปริมาตร 1.5 ml

2.2.2 สารละลายเอนไซม์เอนไซม์ควบคุม : 0.05 M citrate buffer ปริมาตร 1.5 ml

เติมเอนไซม์ปริมาตร 0.5 ml

2.2.3 สับสเตรทควบคุม : เติม 0.05 M citrate buffer ปริมาตร 1.5 ml ลงในหลอด

ทดลองที่มี avicel 50 มิลลิกรัม

2.3 วิธีการวิเคราะห์

2.3.1 ชั่ง avicel น้ำหนัก 50 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร

2.3.2 เติม 0.05 M citrate buffer ปริมาตร 1.0 ml จากนั้นนำแต่ละหลอดไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50°C พร้อมกับสารละลายแบดจ์ สารละลายเอนไซม์เอนไซม์ควบคุม สับสเตรทควบคุม จนอุณหภูมิของสารละลายในหลอดทดลองเท่ากับอุณหภูมิของอ่างน้ำอุ่น

2.3.3 เติมเอนไซม์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่แช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50°C บ่มให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 60 นาที

2.3.4 พอลบเวลาหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำมาแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที

2.3.5 นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

2.4 การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสหาได้จากการแทนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสดังสมการ

$$X_1 = aX + b$$

เมื่อ

a = ความชันของกราฟ

b = ค่าคงที่

X = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

และแทนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ของสับสเตรทควบคุม สารละลายเอนไซม์เอนไซม์ควบคุม และสารละลายเอนไซม์จากนั้นนำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาแทนค่าในสมการ

$$X_4 = X_3 - X_2 - X_1$$

เมื่อ

X_2 = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสับสเตรทควบคุม

X_3 = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลายเอนไซม์เอนไซม์ควบคุม

X_1 = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลายเอนไซม์

จากนั้นนำค่า X_4 ที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากสมการ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = X_4 * 0.185 \text{ U/ml}$$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

3.1 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคสเข้มข้น (1.0 mg/ml) (ml)	น้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (mg/ml)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 ดูดสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเซลล์ออกแล้ว) หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0.0-1.0 mg/ml) ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.2.2 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร

3.2.3 ปิดฝาหลอดโดยคลายเกลียวให้หลวม (หรือปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว) แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

3.2.4 แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็นทันทีเป็นเวลา 5 นาที

3.2.5 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

3.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักด้วย Gas chromatography (GC)

4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.1.1 เตรียมสารละลาย Ethanol และ Butanol 1% (w/v หรือ v/v)

4.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

1% Ethanol (μl)	Distilled water (μl)	1% Butanol (μl)	% Ethanol (v/v)
100	400	500	0.2
200	300	500	0.4
300	200	500	0.6
400	100	500	0.8
500	0	500	1.0

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง

4.2.1 เจือจางตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 500 μl กับ 1% Butanol ปริมาตร 500 μl

4.2.2 ฉีดสารละลายตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ด้วย GC โดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางในข้อ 1 ปริมาตร 2 μl

สภาวะที่ใช้ คือ

Column oven ที่อุณหภูมิ 100°C

Injection port ที่อุณหภูมิ 150°C

Detector ที่อุณหภูมิ 180°C

Detector ที่ใช้คือ FID

Carrier gas ที่ใช้คือ Helium

Internal standard ที่ใช้คือ 1% butanol

4.3 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์

4.3.1 เตรียมกราฟสารละลายมาตรฐานของเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0% (v/v) โดยให้แกน x แทนค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟของบิวทานอล (Ethanol/Butanol peak area ratio) และแกน y แทนค่าความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v)

4.3.2 เปรียบเทียบค่า ethanol/butanol peak area ratio ของตัวอย่างกับกราฟสารละลายมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอลในสารละลายตัวอย่าง

ภาคผนวก ข
สูตรอาหารและสารเคมี

ภาคผนวก ข
สูตรอาหารและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ให้มีขนาดด้านละประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักให้ได้ตามสูตร นำไปต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้น้ำเดือดประมาณ 10-15 นาที ระวังขณะคนอย่าให้เนื้อมันฝรั่งและ กรองเอาน้ำส่วนใสโดยใช้ผ้าขาวบาง จากนั้นชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรส และ วนให้ได้น้ำหนักตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยตั้งไฟให้ร้อนเพื่อให้วนสุก ผสมน้ำต้มมันฝรั่งและน้ำต้มวนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร บรรจุลงในขวดเตรียมอาหารและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose medium (YPD medium)

Yeast extract	20	กรัม
Peptone from casein	20	กรัม
Dextrose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น คนด้วยแท่งแก้วให้ส่วนประกอบของอาหารละลาย และใช้ความร้อนช่วยให้ละลายได้ง่าย ปรับปริมาตรให้ครบตามสูตรด้วยน้ำกลั่นบรรจุลงในขวดเตรียมอาหารและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose agar (YPD agar)

Yeast extract	20	กรัม
Peptone from casein	20	กรัม
Dextrose	10	กรัม

Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น (ยกเว้นผงวุ้น) คนด้วยแท่งแก้วให้ส่วนประกอบของอาหารละลาย จากนั้นเติมวุ้นคนให้ละลายนำไปตั้งไฟให้เดือดจนกระทั่งวุ้นสุก ปรับปริมาณให้ครบตามสูตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุลงในขวดเตรียมอาหารและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Methylene blue solution

1% Potassium hydroxide (1% KOH)	1	มิลลิลิตร
Methylene blue ที่อิมตัวใน 95% ethanol	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เตรียม 1% KOH โดยชั่ง KOH น้ำหนัก 0.25 กรัมละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรปรับให้ครบตามปริมาณด้วยขวดปรับปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำ 1% KOH มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติม Methylene blue ที่อิมตัวใน 95% ethanol ปริมาตร 30 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 0.05 M citrate buffer

Citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	210	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH)	50-60	กรัม
น้ำกลั่น	750	มิลลิลิตร

ละลาย Citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) จำนวน 210 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร เติม NaOH ประมาณ 50-60 กรัม วัดค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 4.3 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 4.5 จะได้สารละลาย 1 M citrate buffer เมื่อต้องการใช้ให้นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 M ค่าพีเอชเท่ากับ 4.8

6. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0%

3-5, Dinitrosalicylic acid (DNS)	10	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH)	16	กรัม
Potassium sodium tartrate	300	กรัม
Sodium sulphite	0.5	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง DNS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลละลายต่างที่ละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน จนกระทั่งได้น้ำตาลละลายใส จากนั้นเติม Potassium sodium tartrate ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม เติม Sodium sulphite 0.5 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวด สีชาที่อุณหภูมิห้อง

7. Ethanol ความเข้มข้น 1% v/v และ Butanol ความเข้มข้น 1% v/v

Ethyl alcohol anhydrous (C_2H_5OH) เข้มข้น 99.8 %

iso- Butanol เข้มข้น 99 %

เตรียม 1% Ethanol หรือ 1% Butanol โดยจุด Ethyl alcohol anhydrous เข้มข้น 99.8 % หรือ iso-Butanol เข้มข้น 99 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในตู้เย็น

ภาคผนวก ก
ข้อมูลผลการทดลอง

ภาคผนวก ค
ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิ 40°C

เชื้อยีสต์	จำนวนเซลล์ $\times 10^7$ (cells/ml)	เปอร์เซ็นต์การ รอดชีวิต	ปริมาณเอทานอล (%v/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (g/L)
TK	4.4±0.57	94.2±4.74	0.87±0.02	0.94±0.02
SC	2.8±0.35	99.0±1.65	0.85±0.24	0.90±0.05
KM	7.4±1.41	99.7±0.38	1.03±0.02	0.89±0.05
HN	4.55±0.78	93.2±3.19	1.04±0.08	0.89±0.04
ST-SR	2.97±0.32	83.5±1.85	0.85±0.02	1.02±0.12
ST-UB	4.15±0.21	93.0±3.83	0.90±0.03	0.97±0.02

ตารางที่ 2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *A. oryzae* ที่เจริญในวัสดุหมัก
อัตราส่วนต่างๆ

วันที่	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	อัตราส่วนวัสดุหมัก (แกลบ:รำ) %			
	100:0	90:10	80:20	70:30
0	0.01	0.02	0.03	0.027
2	0.03	0.01	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.02	0.05	0.06	0.09
8	0.06	0.06	0.04	0.04
10	0.13	0.12	0.12	0.13
12	0.06	0.04	0.15	0.12
14	0	0.02	0.03	0.02

ตารางที่ 3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อเห็ด *Pleurotus* sp. ที่เจริญในวัสดุหมักอัตราส่วนต่างๆ

วันที่	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	อัตราส่วนวัสดุหมัก (แกลบ:รำ) %			
	100:0	90:10	80:20	70:30
0	0.02	0.02	0.05	0.04
2	0.02	0.02	0.02	0.02
4	0.01	0.01	0.00	0.01
6	0.07	0.03	0.02	0.04
8	0.06	0.06	0.05	0.06
10	0.12	0.12	0.12	0.12
12	0.09	0.06	0.08	0.02
14	0.01	0.01	0.01	0.02

ตารางที่ 4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-11 ที่เจริญในวัสดุหมักอัตราส่วนต่างๆ

วันที่	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	อัตราส่วนวัสดุหมัก (แกลบ:รำ) %			
	100:0	90:10	80:20	70:30
0	0.03	0.02	0.02	0.02
2	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.04	0.11	0.04	0.00
6	0.00	0.00	0.03	0.04
8	0.02	0.06	0.03	0.05
10	0.01	0.02	0.02	0.01
12	0.02	0.01	0.03	0.02
14	0.02	0.03	0.02	0.03

ตารางที่ 5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อเห็ด *L. polycchrous* Lev. LP-PT-01
ที่เจริญในวัสดุหมักอัตราส่วนต่างๆ

วันที่	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	อัตราส่วนวัสดุหมัก (แกลบ:รำ) %			
	100:0	90:10	80:20	70:30
0	0.01	0.02	0.03	0.02
2	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.04	0.04	0.04	0.03
6	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.01	0.03	0.02	0.03
12	0.03	0.02	0.01	0.01
14	0.02	0.04	0.01	0.03

ตารางที่ 6 ปริมาณน้ำตาสิริวิฑ์ในวัสดุหมักชนิดต่างๆ ในขั้นตอนการศึกษการปรับสภาพด้วยเชื้อเห็ดและรา

ชนิดวัสดุหมัก	ปริมาณน้ำตาสิริวิฑ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก)									
	Control		<i>A. oryzae</i>		<i>Trichoderma sp. T-11</i>		<i>L. polycchrous Lev. LP-PT-01</i>			
	ไม่ปรับสภาพ	ปรับสภาพ	ไม่ปรับสภาพ	ปรับสภาพ	ไม่ปรับสภาพ	ปรับสภาพ	ไม่ปรับสภาพ	ปรับสภาพ		
แกลบ 100%	1.44±0.15	5.70±0.14	0	1.50±0.46	1.48±0.01	2.32±0.25	1.09±0.11	1.79±0.30		
แกลบ 50%: วัสดุเห็ด50%	5.78±0.84	20.95±1.18	3.77±0.42	4.15±0.61	6.47±0.14	17.96±1.13	5.36±0.77	33.74±4.52		
แกลบ 50%: รำหยาบ 50%	4.55±0.96	20.64±1.62	3.36±0.06	4.08±0.29	3.39±0.07	12.32±0.67	3.95±0.28	13.03±0.88		
แกลบ 50%: ปลายข้าว 50%	6.21±1.06	8.98±0.07	6.35±0.67	7.18±0.00	15.56±0.89	11.62±0.22	2.61±0.45	33.51±0.10		

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในกระบวนการย่อยสลายความถี่กับกระบวนการหมัก โดยเชื้อยีสต์ *K. marxianus*

ปริมาณ แอลกอฮอล์ (%)	ปริมาณ ความชื้น (%)	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล (กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุหมัก) วันที่												
		1	2	3	4	5	6	7	9	12	21			
100	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90		0.02±0.00	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0
80		0.02±0.01	0.04±0.01	0.07±0.02	0.07±0.04	0.05±0.00	0.03±0.00	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0
70		0.03±0.02	0.06±0.01	0.10±0.01	0.07±0.01	0.08±0.02	0.05±0.03	0.04±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0
100	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90		0.01±0.00	0.01±0.00	0.03±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0
80		0.01±0.01	0.02±0.00	0.04±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0
70		0.03±0.01	0.02±0.00	0.08±0.02	0.05±0.00	0.05±0.02	0.04±0.02	0.04±0.00	0.04±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0
100	80	0	0	0	0.01±0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90		0	0	0.02±0.01	0.03±0.00	0.03±0.01	0.03±0.00	0.02±0.01	0.03±0.02	0.04±0.00	0.04±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01	0
80		0	0	0.02±0.01	0.05±0.02	0.05±0.01	0.05±0.02	0.02±0.01	0.04±0.02	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.01±0.01
70		0	0.03±0.04	0.05±0.00	0.10±0.02	0.06±0.04	0.10±0.02	0.03±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00	0

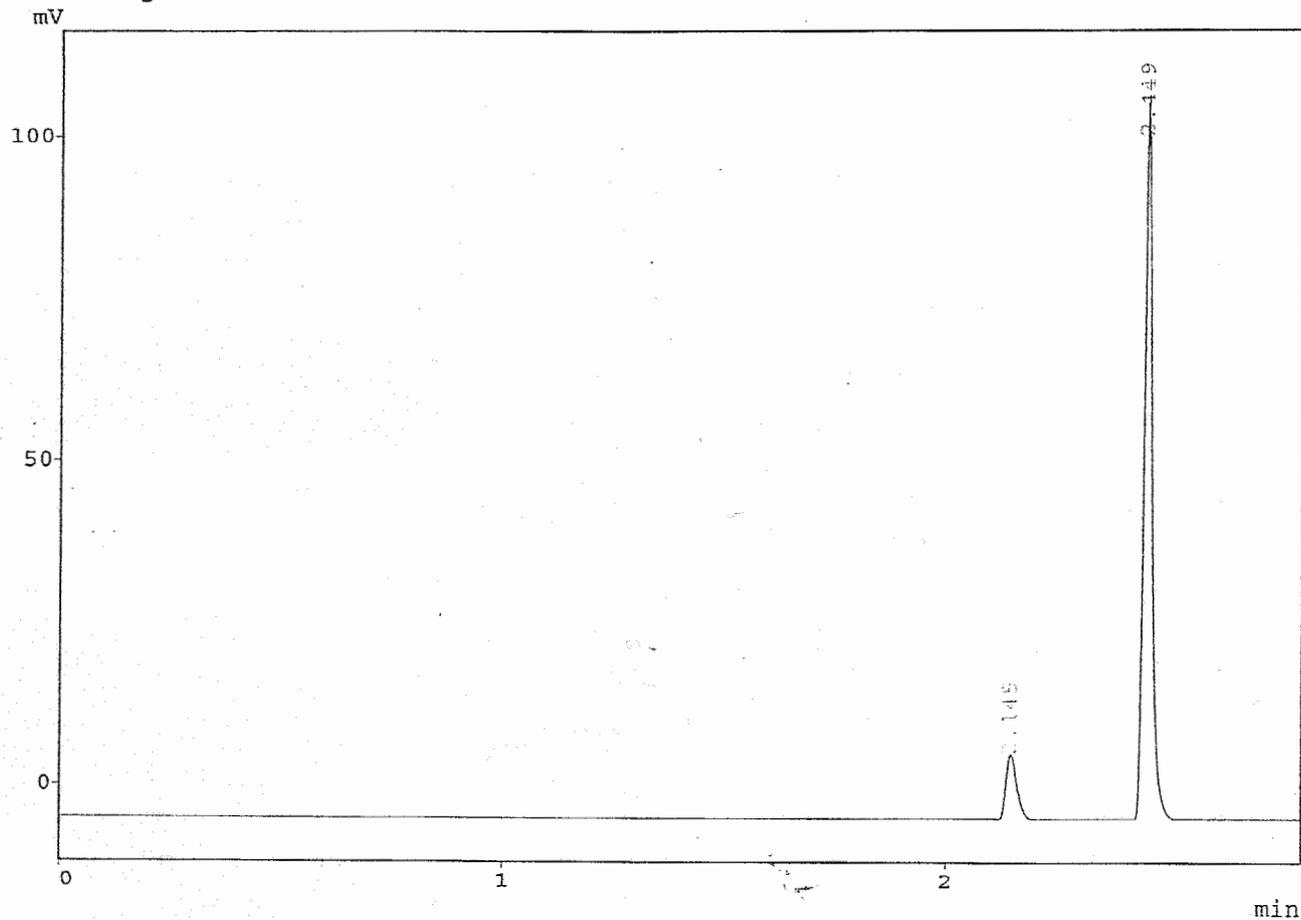
ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาคลอริดิวซ์ที่เหลือในกระบวนการย่อยสลายความถูกต้องกับกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์ *K. marxianus*

ปริมาณ แกลบ (%)	ปริมาณ ความชื้น (%)	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาคลอริดิวซ์ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อกรัมสดหมัก) วันที่												
		1	2	3	4	5	6	7	9	12				
100	60	0.13±0.00	0.14±0.04	0.40±0.02	0.15±0.02	0.31±0.02	0.29±0.02	0.28±0.05	0.35±0.01	0.56±0.04				
90		0.12±0.03	0.56±0.06	0.54±0.01	0.52±0.01	0.42±0.03	0.68±0.03	0.41±0.02	0.69±0.02	0.90±0.00				
80		0.45±0.06	0.33±0.01	0.54±0.05	0.47±0.03	0.45±0.04	0.78±0.04	0.61±0.01	0.87±0.01	1.05±0.13				
70		0.32±0.10	0.79±0.09	0.80±0.04	0.45±0.05	0.44±0.04	0.88±0.12	0.53±0.01	0.94±0.01	1.02±0.05				
100	70	0.20±0.01	0.11±0.02	0.15±0.03	0.15±0.03	0.16±0.02	0.23±0.06	0.18±0.03	0.28±0.05	0.27±0.04				
90		0.25±0.01	0.20±0.02	0.36±0.03	0.18±0.01	0.27±0.03	0.46±0.06	0.37±0.04	0.46±0.05	0.61±0.01				
80		0.40±0.00	0.42±0.05	0.41±0.02	0.35±0.02	0.45±0.05	0.69±0.07	0.54±0.00	0.72±0.06	0.82±0.04				
70		0.24±0.20	0.24±0.03	0.45±0.01	0.21±0.00	0.46±0.05	0.50±0.10	0.43±0.03	0.66±0.05	0.84±0.03				
100	80	0.23±0.08	0.08±0.01	0.09±0.03	0.12±0.01	0.09±0.01	0.13±0.00	0.13±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01				
90		0.10±0.00	0.08±0.00	0.18±0.03	0.14±0.03	0.11±0.02	0.23±0.04	0.17±0.03	0.28±0.02	0.26±0.03				
80		0.26±0.15	0.01±0.00	0.15±0.03	0.24±0.02	0.23±0.02	0.27±0.04	0.230±0.031	0.373±0.018	0.306±0.029				
70		0.01±0.00	0.05±0.00	0.34±0.06	0.31±0.03	0.14±0.01	0.35±0.03	0.346±0.040	0.532±0.039	0.429±0.041				

CLASS-GC10 Ver.=2.01 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=2 DATA=JANJIRA1.D02 01/03/03 20:38:36

Sample :
 ID :
 Dilution Factor: 1
 Type : Unknown
 Detector : FID
 Operator : Janjira

*** Chromatogram *** Filename:JANJIRA1.C02



*** Peak Report ***

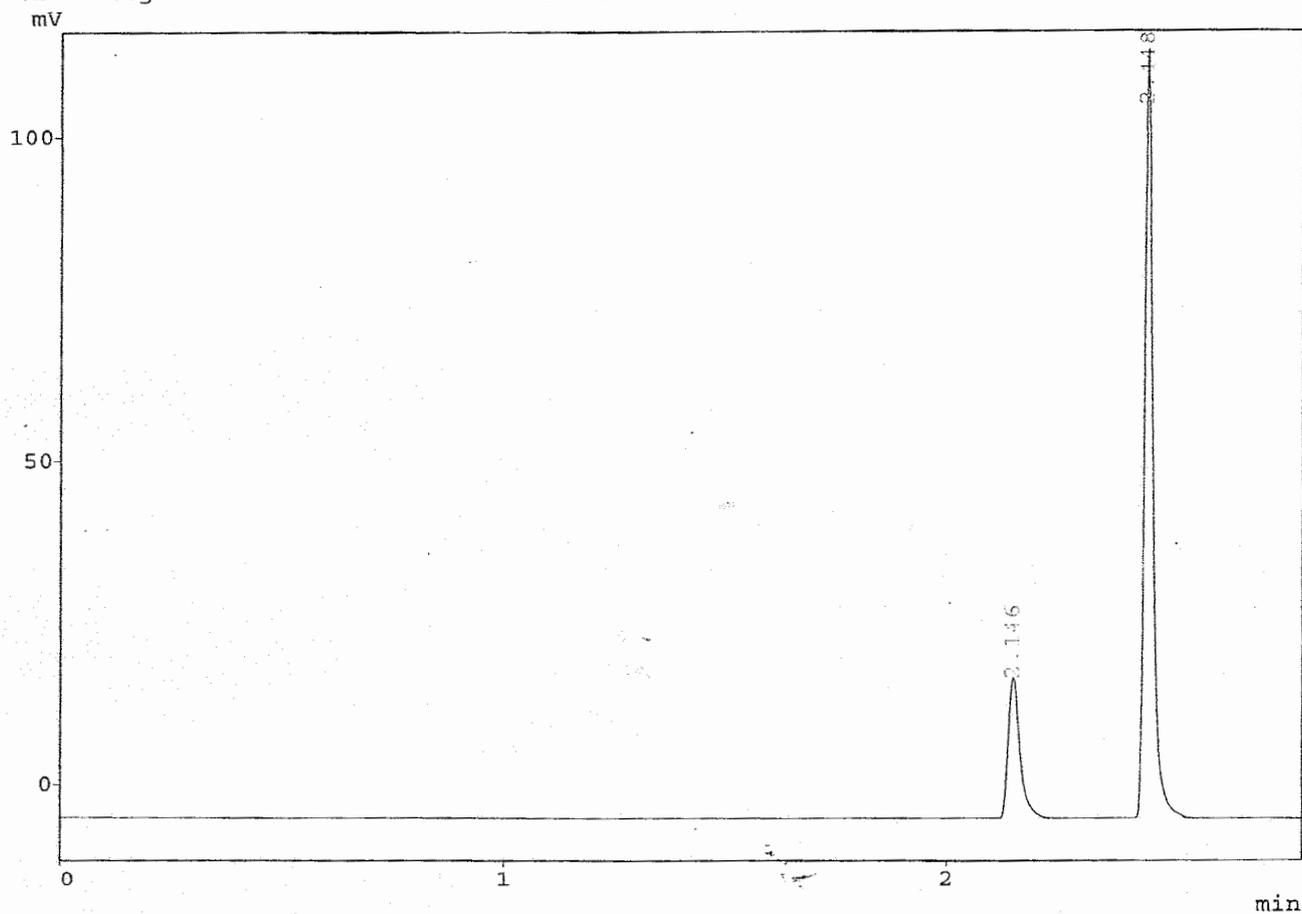
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.145	16252	9958	E		10.4906	
2	2.449	138667	110064	E		89.5094	
		154918	120022			100.0000	

ภาพที่ 1 Chromatogram ของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.2%v/v
 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

CLASS-GC10 Ver.=2.01 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=4 DATA=JANJIRA1.D04 01/03/03 20:48:22

Sample :
 ID :
 Dilution Factor: 1
 Type : Unknown
 Detector : FID
 Operator : Janjira

*** Chromatogram *** Filename:JANJIRA1.C04



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.146	39171	21446	E		20.1104	
2	2.448	155607	118480	E		79.8896	
		194777	139926			100.0000	

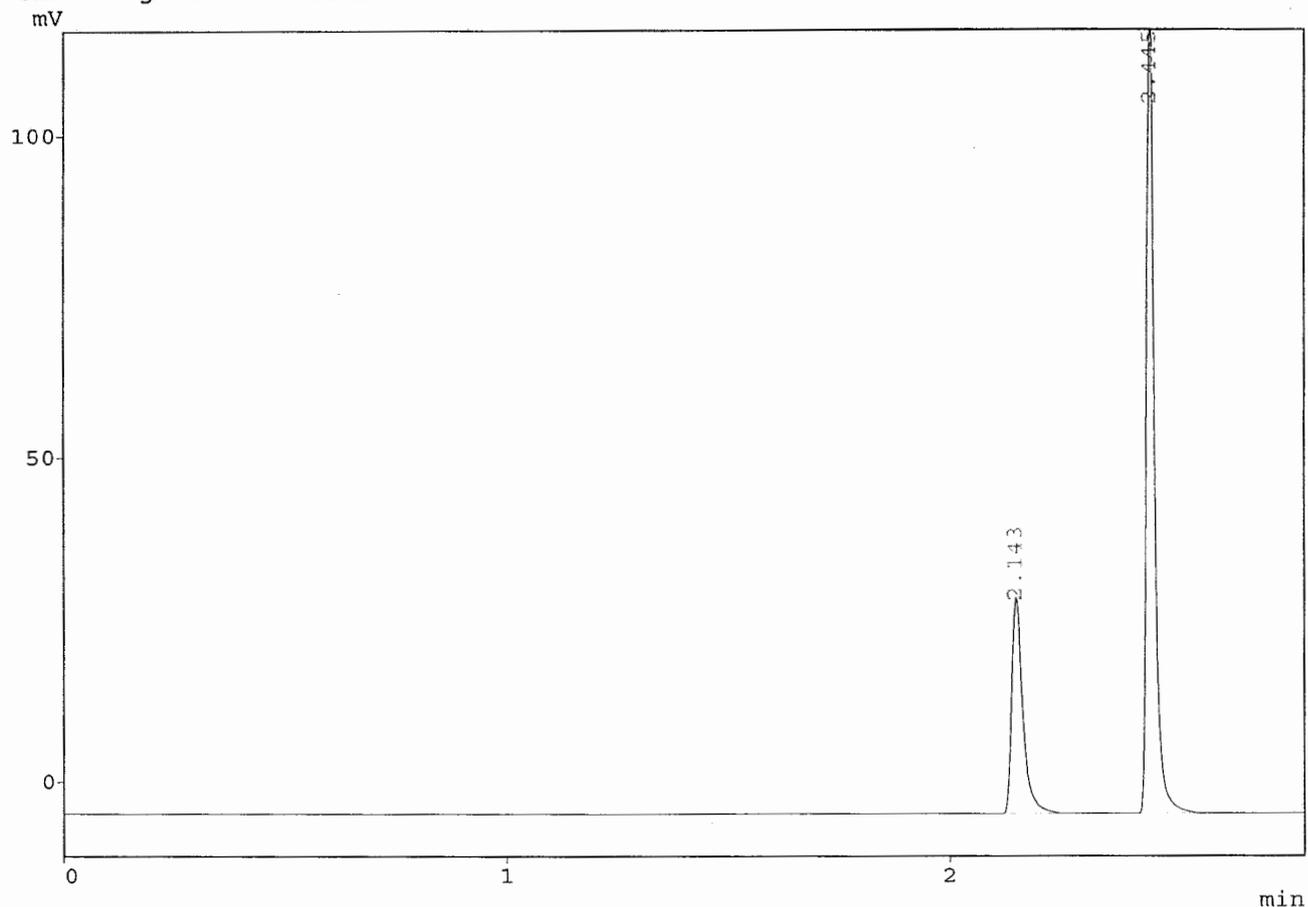
ภาพที่ 2 Chromatogram ของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.4%v/v

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

CLASS-GC10 Ver.=2.01 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=7 DATA=JANJIRA1.D07 01/03/03 20:57:38

Sample :
 ID :
 Dilution Factor: 1
 Type : Unknown
 Detector : FID
 Operator : Janjira

*** Chromatogram *** Filename:JANJIRA1.C07



*** Peak Report ***

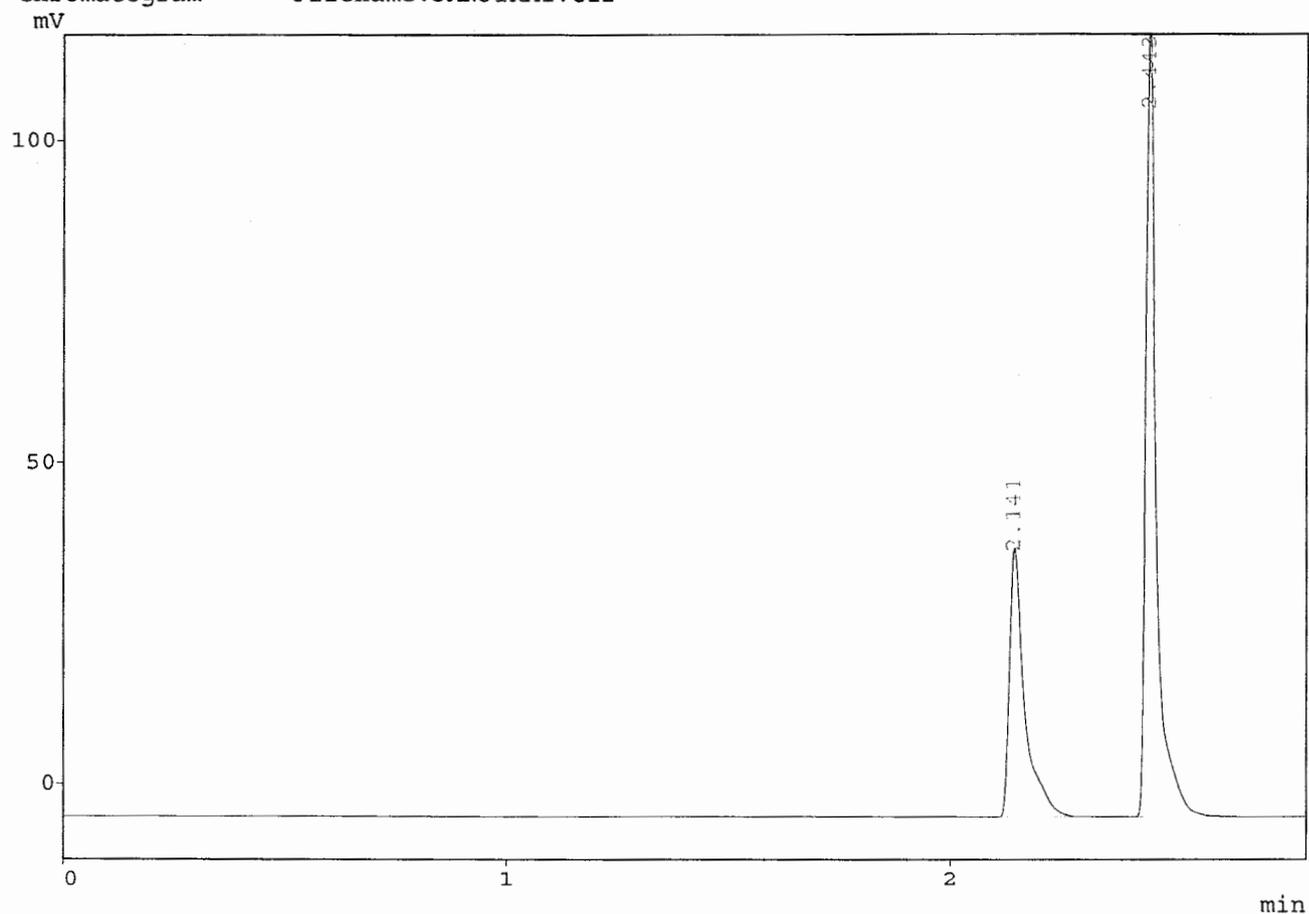
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.143	58140	33504	E		27.2313	
2	2.445	155364	128272	E		72.7687	

		213503	161776			100.0000	
--	--	--------	--------	--	--	----------	--

ภาพที่ 3 Chromatogram ของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.6%v/v
 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

CLASS-GC10 Ver.=2.01 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=12 DATA=JANJIRA1.D12 01/03/03 21:17:04
 Sample :
 ID :
 Dilution Factor: 1
 Type : Unknown
 Detector : FID
 Operator : Janjira

*** Chromatogram *** Filename:JANJIRA1.C12



*** Peak Report ***

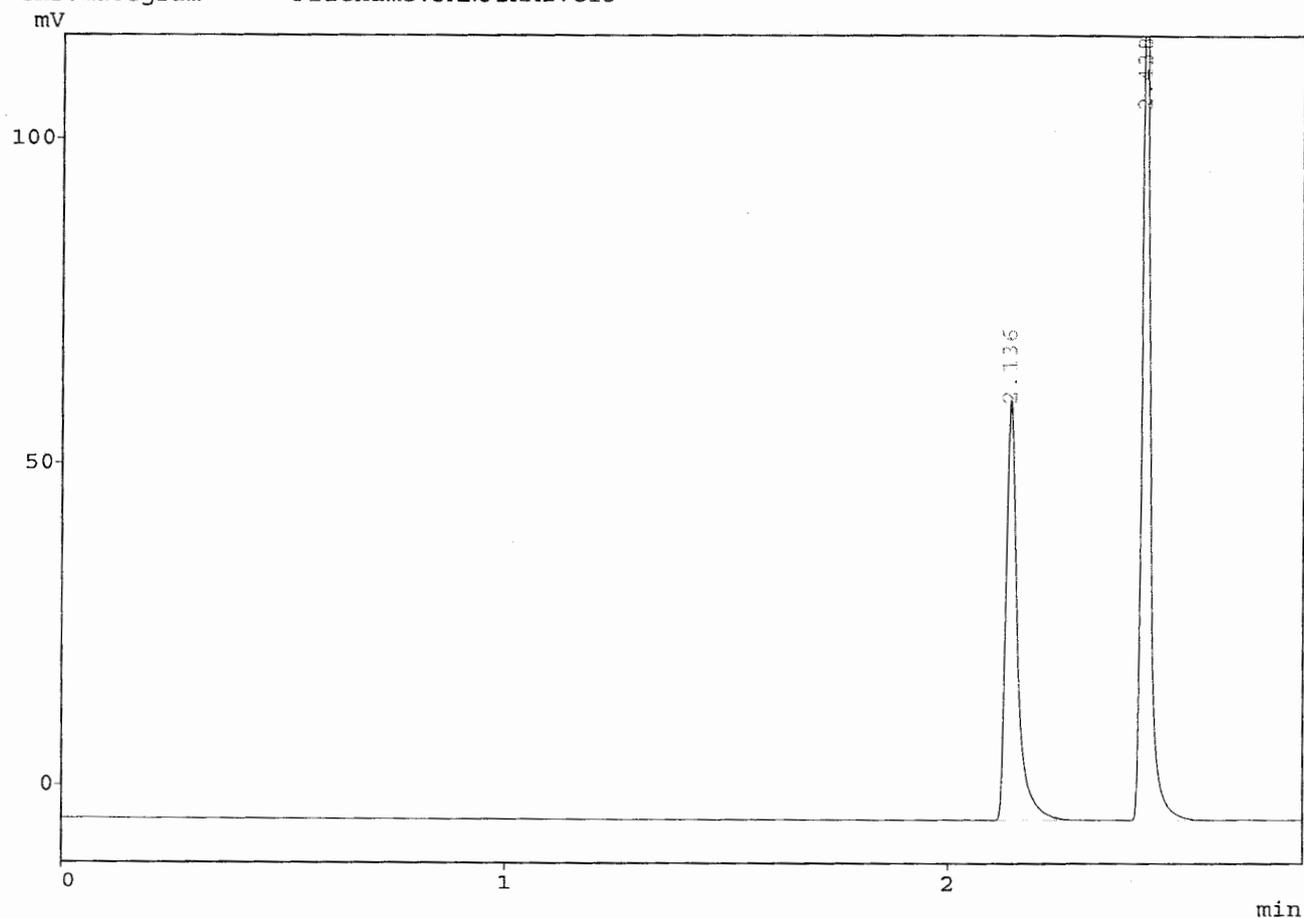
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.141	98771	41664	E		32.7039	
2	2.443	203245	124000	E		67.2961	

		302017	165664			100.0000	
--	--	--------	--------	--	--	----------	--

ภาพที่ 4 Chromatogram ของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.8%v/v
 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

CLASS-GC10 Ver.=2.01 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=13 DATA=JANJIRA1.D13 01/03/03 21:20:14
 Sample :
 ID :
 Dilution Factor: 1
 Type : Unknown
 Detector : FID
 Operator : Janjira

*** Chromatogram *** Filename:JANJIRA1.C13



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.136	116236	65008	E		39.4926	
2	2.438	178088	144032	E		60.5074	

		294324	209040			100.0000	
--	--	--------	--------	--	--	----------	--

ภาพที่ 5 Chromatogram ของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 1.0%v/v
 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

ภาคผนวก ง
ผลงานทางวิชาการที่เผยแพร่

ภาคผนวก ง
ผลงานทางวิชาการที่เผยแพร่

เสนอผลงานแบบ โปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

The 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Added

Agricultural Products Khon Khan Thailand

ระหว่างวันที่ 23-25 พฤษภาคม 2550

Simultaneous saccharification and fermentation of fungal bio-pretreated rice husk and rice polish to ethanol

Nareerat Moonjai*, Charida Pukahuta and Janjira Salubchua

Department of Biological Sciences, Faculty of science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190 Thailand.

*Corresponding Author: nareerat@sci.ubu.ac.th

Abstract: The possibility of producing ethanol from rice husk and rice polish was investigated. These two materials, produced in large quantities as by-products of the rice milling industry, constitute a significant underutilized source of sugars, so-called lignocellulose. This study focuses on the potential of a fungal bio-treatment of lignocellulosic materials with the white-rot fungus *Lentinus polychrous* Lev. LP-PT-01 under solid-state fermentation (80% moisture content). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of the bio-pretreated rice husk and rice polish were carried out at 40°C using *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 cellulase and *Saccharomyces cerevisiae* cells. It was found that ethanol yield under the fermentation condition with 100% rice husk was 0.50 g ethanol/100 g substrate. The ethanol yield increased to 1.53 g ethanol/100 g substrate with the increasing of rice polish percentage (up to 30% rice polish). The biological pretreatment was an efficient pretreatment method of rice husk for its ethanol production.

Keywords: Ethanol, Simultaneous saccharification and fermentation, *Lentinus polychrous*, rice husk

Introduction: Lignocellulosic biomass is an abundant renewable resource on earth and includes various agricultural and forestry residues, food wastes, and wastes from the pulp and paper industry. Ethanol production from lignocellulosics has gained increasing research attention due to their abundance and immense potential for conversion into sugars and fuels. Several technologies available for the conversion of lignocellulosics to fuel ethanol involved various steps such as pretreatment, enzymatic hydrolysis (saccharification) and fermentation. Pretreatment can be performed by mechanical, physico-chemical, and biological or a combination of these processes. In the

biological pretreatment processes, white-rot fungi are the most effective basidiomycetes for biological pretreatment of lignocellulosic materials (Fan et al., 1987). Pretreatment of wheat straw with white-rot fungi, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus* sp. 535, *Pycnoporus cinnabarinus* 115 and *Ischnoderma benzoinum* 108 resulted in increased the susceptibility of straw to enzymatic hydrolysis (Hatakka, 1983). Pukahuta et al. (2005, 2006) studied the degradation of lignocellulosics, rice husks by white-rot mushroom, *Lentinus* spp. and they found that *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 grown on rice husk expressed high cellulolytic enzyme activity.

In this work, we investigated the white-rot fungal bio-pretreatment of lignocellulosic materials and its subsequent enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production by a simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process.

Materials and Methods

Preparation of white-rot fungi

The white-rot fungi used in this study was *Lentinus polychrous* Lev. LP-PT-01. This strain was obtained through the courtesy of Assist. Prof. Dr. Charida Pukahuta, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University. It was cultured on potato dextrose agar at 35°C for 3-5 days and stored at 4°C.

Substrates and pretreatment

Rice husk and rice polish were obtained from the rice milling plant, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University. Before pretreatment of rice husk, it was washed thoroughly with tap water, dried in a forced-air oven at 65°C for 6-8 h and milled to pass through a 16-mesh sieve. The fungal bio-pretreatment of 4 different substrate mixtures was carried out as followed: (1) 100% rice husk; (2) 90% rice husk with 10% rice polish; (3) 80% rice husk with 20% rice polish and (4) 70% rice husk with 30% rice polish. Pretreatments were carried out in 250-ml Erlenmeyer flasks, each containing 10 g of substrate mixtures. The initial moisture content of substrates was adjusted to 80% by adding distilled water. The substrates were autoclaved for 20 min at 121°C. After cooling, each flask was incubated with five pieces (0.6 cm in diameter) of white-rot fungal mycelial agar block and incubated at 35°C for 7 days (see Fig. 1 A-E).

Preparation of yeast inoculum

The yeast, *Saccharomyces cerevisiae* was used throughout this study. Active cultures for inoculation were prepared by growing the organism on a rotary shaker at 150 rpm for 24-48 h at 30°C, in a YPG medium containing: yeast extract 10g l⁻¹, peptone 20g l⁻¹ and glucose 20 g l⁻¹.

Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

SSF reaction mixtures contained the fungal pretreated substrates, *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 cellulase produced, yeast inoculum (the inoculation concentration was 1.5×10⁷ cells ml⁻¹) and 100 ml of distilled water. The reaction mixtures were incubated at 40°C under static condition for 5 days (see Fig. 1 F).

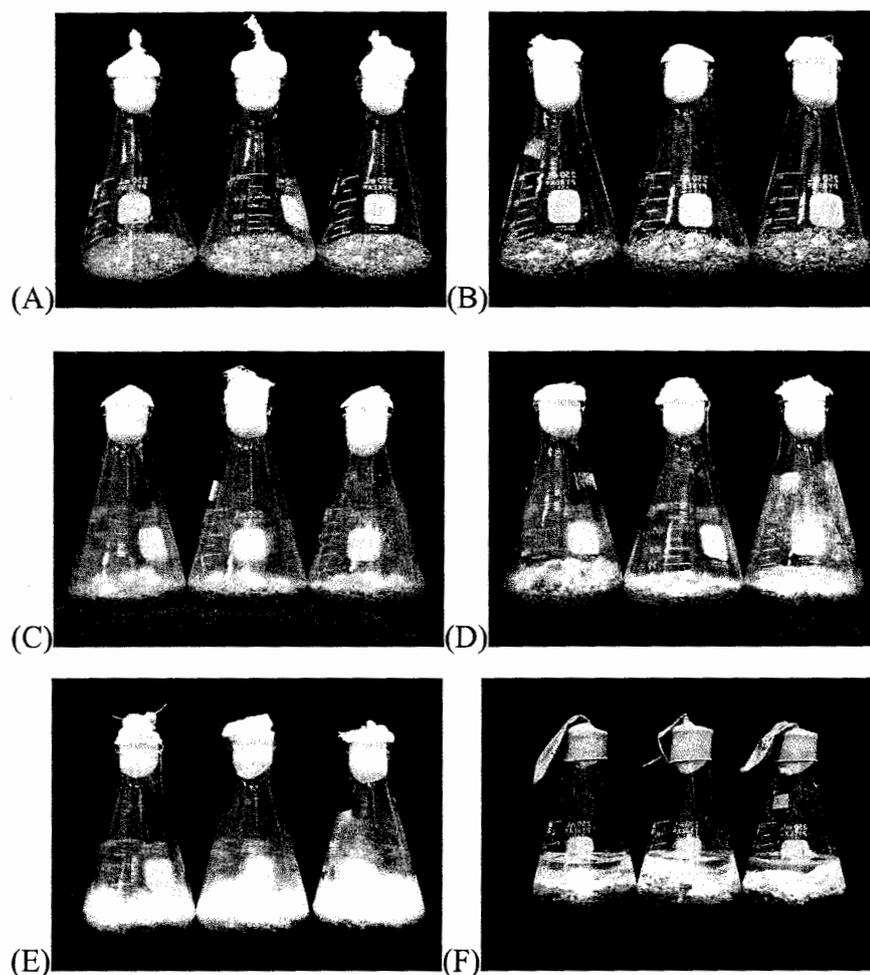


Fig 1 Substrate pretreatment with *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 at different incubation time. (A) 0 day, (B) 1 day, (C) 3 days, (D) 5 days, (E) 7 days, and (F) simultaneous saccharification and fermentation.

Analytical methods

The samples taken from the SSF were centrifuged and the supernatants were used to analyze the reducing sugar and ethanol contents. The reducing sugar concentration was determined using the DNS method (Miller, 1959). The ethanol content was determined by gas chromatography using a flame ionization detector. All experiments were carried out in triplicate.

Results, Discussion, and Conclusion

Ethanol production by the SSF of fungal pretreated rice husk and rice polish were carried out using *L. polychrous* Lev. LP-PT-01 cellulase and *S. cerevisiae* cells. Pretreatment of 100% rice husk with white-rot fungi resulted in a low amount of reducing sugar in fermentation medium. However, the concentration of reducing sugars produced on enzymatic hydrolysis increased with increasing rice polish percentage. Maximum ethanol yields of 0.50, 0.72, 1.14 and 1.53 g ethanol/100 g original dry substrate were reached in SSF experiments with 100% rice husk, 90% rice husk + 10% rice polish, 80% rice husk + 20% rice polish and 70% rice husk + 30% rice polish, respectively (Table 1). These yields were achieved in 2 days from the beginning of

fermentation. It can be seen that ethanol yield increased with the increasing of rice polish percentage. It seems likely that supplementation of rice husk with rice polish could support the cellulase production so that ethanol production could be enhanced, consequently. It can be concluded that the biological pretreatment was an efficient pretreatment method of rice husk for its ethanol production.

Table 1. Maximum sugar and ethanol yields in simultaneous saccharification and fermentation process of different substrate mixtures after white-rot fungal pretreatment

Substrates	Yield g/100g original dry substrate ^a	
	Reducing sugar	Ethanol
100% rice husk	0.14	0.50
90% rice husk + 10% rice polish	0.25	0.72
80% rice husk + 20% rice polish	0.37	1.14
70% rice husk + 30% rice polish	0.40	1.53

^a Means of three separate experiments

Acknowledgments

The authors are thankful to the Office of the National Research Council of Thailand and the Energy Policy and Planning Office, Ministry of Energy, Thailand for the financial support.

References

1. Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1987. In: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, p. 57.
2. Hatakka, A.I., 1983. Pretreatment of Wheat Straw by White-Rot Fungi for Enzymic Saccharification of Cellulose. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 18: 350-357.
3. Miller, G.L., 1959. Use of Dinitro Salicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.
4. Pukahuta, C., Jitcharoen, J. and Pimmongkol, A., 2006. Biological Degradation of Rice Husks by Cellulolytic Fungi. *The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*, Nakhon Ratchasima, Thailand.
5. Pukahuta, C., Kaewraemruaen, J., Palasarn, W. and Pimmongkol, A. 2005. Degradation of Rice Husk and Rice Straw by White Rot Mushroom, *Lentinus* spp. *The 31st Congress on Science and Technology of Thailand*. Bangkok, Thailand.

ประวัติผู้วิจัย



- ชื่อ** นางสาวจันทร์จิรา สลับเชื้อ
- ประวัติการศึกษา** สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, พ.ศ. 2547
- ประวัติการวิจัย**
1. Salubchua, J., Sraekaw, K. and Moonjai, N. 2005. "Primary study of rice beer fermentation" 31th Congress on Science and Technology of Thailand.
 2. Moonjai, N., Pukahuta, C., Sraekaw, K. and Salubchua, J. 2006. "The feasibility study of bio-ethanol production from rice crop by-products" 32th Congress on Science and Technology of Thailand.
 3. Moonjai, N., Pukahuta, C. and Salubchua, J. 2007. "Simultaneous saccharification and fermentation of fungal bio-pretreated rice husk and rice polish to ethanol" The 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. Thailand
- ทุนการศึกษา/ ทุนวิจัยที่ได้รับ**
1. ได้รับทุนเรียนดี ระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
 2. ได้รับทุนเพื่อการพัฒนาวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา ภาคต้นปีการศึกษา 2549 จากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
 3. ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงานภายใต้แผนพลังงานทดแทนจากสำนักงานนโยบายพลังงานแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2549
 4. ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
- ที่อยู่ปัจจุบัน** 52 หมู่ที่ 4 ถนนแจ้งสนิท ตำบลหนองขอน อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000