

การคัดกรองยีสต์ที่ร้อนที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล

พนิดา สุริยะพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

SCREENING OF THERMOTOLERANT XYLOSE-UTILIZING YEASTS
FOR ETHANOL PRODUCTION

Miss Panida Suriyapan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองยีสต์ที่ร้อนที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล
โดย	นางสาวพนิดา สุริยะพันธ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมภูษ วิภูวนานนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จันทรเพ็ญ จันทรเจ้า)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. วราภรณ์ จันทรจำนงค์)

พนิดา สุริยะพันธ์ : การคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล (SCREENING OF THERMOTOLERANT XYLOSE-UTILIZING YEASTS FOR ETHANOL PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.ดร.สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล, 108 หน้า.

การศึกษายีสต์ทนร้อนเพื่อการผลิตเอทานอลเป็นไปอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยีสต์ทนร้อนสามารถเจริญและทำให้เกิดกระบวนการหมักได้ดีในประเทศเขตร้อน วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสในการผลิตเอทานอลได้โดยใช้อาหาร Yeast-malt extract medium ที่อุณหภูมิ 35, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถคัดกรองยีสต์ทนร้อนได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท และมี 7 ไอโซเลทที่สามารถใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ยีสต์ไอโซเลท SKN 2-1 คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลนครบุรี จังหวัดนครราชสีมา สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.66 และ 0.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 7.67 และ 10.10 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยใช้ฟางข้าวที่ประกอบด้วยเซลลูโลส 37.67 ± 0.31 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 33.36 ± 1.96 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 4.12 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์เป็นวัตถุดิบ จากการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26s rDNA ของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท 2-1 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกับยีสต์สายพันธุ์ *Ogataea polymorpha* 99.83% โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา.....2554.....

ลายมือชื่อ.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5172373423: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: THERMOTOLERANT YEASTS/ ALKALINE PEROXIDE PRETREATMENT/
CELLULASE/ XYLANASE/ SSCF

PANIDA SURIYAPAN: SCREENING OF THERMOTOLERANT XYLOSE-
UTILIZING YEASTS FOR ETHANOL PRODUCTION. ADVISOR: ASSOC. PROF.
WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., CO- ADVISOR: ASSIST. PROF.
SUPHANG CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., pp. 108

Ethanol production by thermotolerant yeasts have been extensively studied, because thermotolerant yeasts are capable of growth and fermentation during the summer months in non-tropical countries as well as under tropical climates. The aim of this study was to screen thermotolerant xylose-utilizing yeasts for ethanol production. Yeast-malt extract medium was used to isolate thermotolerant yeasts at 35, 37, 40, 45 and 50 °C. Twenty five isolate of thermotolerant yeasts were isolated and 7 isolate could use xylose as substrate to produce ethanol. SKN 2-1 was isolated from sugarcane bagasse that was collected from Khonburi Sugar factory in Nakhonratchasima province showing producing highest yield of ethanol compared to other isolates. SKN 2-1 could grow and produce ethanol at 40 and 45 °C. The thermotolerant yeast isolate SKN 2-1 produced the highest concentration of ethanol 0.66 and 0.87 g L⁻¹ which was equivalent 7.67 and 10.10 of the theoretical ethanol yield in 5 L bioreactor at 40 and 45 °C using rice straw contained cellulose 37.67 ± 0.31%, hemicelluloses 33.36 ± 1.96% and lignin 4.12 ± 0.36% as substrate. From analysis of D1/D2 26s rDNA sequence of SKN 2-1, it was found that the nucleotide sequence showed high homology with 99.83% identity to *Ogataea polymorpha* and had the different in 1 position when compared with this species.

Field of Study :.....Biotechnology.....

Student's Signature

Academic Year :.....2011.....

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆ ฝ่าย ผู้วิจัยขอกราบ
ขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้
คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสิ ประธานกรรมการสอบ
วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. จันทรพิชญ์ จันทรเจ้า อาจารย์ ดร. ชมพูนุช วิรุณานนท์และ
อาจารย์ ดร. วราภรณ์ จันทรจันงค์ ที่กรุณาสละเวลามารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์พร้อมให้
ข้อเสนอแนะรวมถึงข้อคิดเห็นที่มีส่วนสำคัญในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มาก
ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับความช่วยเหลือดีจากเจ้าหน้าที่ทุกๆ
ท่าน จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ
สำหรับความรู้และประสบการณ์รูปแบบต่างๆ ตลอดจนทุนสนับสนุนการวิจัย สถานที่ อุปกรณ์
และเครื่องมือทั้งหมดในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆและเพื่อนๆในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่ง
ปฏิกิริยาชีวภาพที่คอยเอื้อเฟื้อและช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไป
ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่และครอบครัวที่คอยให้ความรักให้กำลังใจ
และความห่วงใยเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เอทานอล.....	4
2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล.....	5
2.2.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี.....	5
2.2.2 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ.....	6
2.3 ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ.....	7
2.3.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล.....	8
2.3.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง.....	9
2.3.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส.....	12
2.4 องค์ประกอบของชีวมวลพืชในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส.....	13
2.4.1 เซลลูโลส.....	15
2.4.2 เฮมิเซลลูโลส.....	19
2.4.3 ลิกนิน.....	21
2.5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส.....	22

2.5.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ.....	23
2.5.2 การย่อยสลาย.....	27
2.5.3 กระบวนการหมัก.....	35
2.5.4 การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว.....	41
2.5.5 ยีสต์ทนร้อน.....	42
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	44
วัตถุประสงค์.....	44
เคมีภัณฑ์.....	45
วิธีดำเนินการวิจัย.....	47
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	47
3.2 คัดกรองยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล.....	48
3.2.1 คัดกรองยีสต์ทั้งหมด.....	47
3.2.2 คัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล.....	48
3.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (starter culture).....	48
3.2.2.2 การคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลส.....	48
3.2.3 คัดกรองยีสต์ทนร้อน.....	48
3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน.....	49
3.4 การศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ทนร้อน.....	49
3.5 ผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ทนร้อนที่คัดกรองได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรโดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิต.....	49
3.5.1 ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในงานวิจัย.....	49
3.5.1.1 การเก็บตัวอย่าง.....	49
3.5.1.2 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ.....	49
3.5.1.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมี.....	50
3.5.1.4 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์.....	50
3.5.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช.....	51
3.5.2 การผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร.....	51

3.5.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก.....	51
3.5.2.2 การเก็บรักษาเชื้อ.....	52
3.5.2.3 การศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มี ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล.....	52
3.5.2.4 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีก่อนใช้ใน กระบวนการ SSF.....	52
3.5.2.5 การเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของ ยีสต์.....	52
3.5.2.6 การเตรียมเอนไซม์.....	53
3.5.2.7 การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยกระบวนการ SSF...	53
3.5.2.7.1 การเลี้ยงกล้าเชื้อ.....	53
3.5.2.7.2 การเติมเอนไซม์.....	53
3.5.2.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	54
3.6 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก.....	55
3.7 ปังชี้สายพันธุ์ของยีสต์ที่หมัก.....	55
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	56
4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	56
4.2 การคัดกรองยีสต์ที่หมักที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการ ผลิตเอทานอล.....	57
4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่หมัก.....	67
4.4 การศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ที่หมัก.....	69
4.5 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่หมักในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร.....	72
4.5.1 ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในการทดลอง.....	72
4.5.2 การผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	74
4.6 ปังชี้สายพันธุ์ยีสต์ที่หมัก.....	78
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	80
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	91
ภาคผนวก ก.....	92

ภาคผนวก ข.....	94
ภาคผนวก ค.....	97
ภาคผนวก ง.....	100
ภาคผนวก จ.....	104
ภาคผนวก ฉ.....	107
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	108

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเอทานอล.....	4
2.2	ผลผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชีวมวลประเภทต่างๆ.....	8
2.3	ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญ.....	10
2.4	องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในวัสดุชนิดต่างๆ.....	14
2.5	ส่วนของพืชชนิดต่างๆ ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ.....	17
2.6	จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส.....	18
2.7	เปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลส.....	27
2.8	ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรด.....	28
2.9	ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์.....	29
2.10	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้.....	31
2.11	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซลานเนสได้.....	34
2.12	ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการ SHF, SSF และ CBP.....	41
4.1	จำนวนยีสต์ทั้งที่สามารถคัดกรองได้จากตัวอย่าง.....	57
4.2	ลักษณะรูปร่าง ระดับความหนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี.....	58
4.3	ลักษณะรูปร่าง ระดับความหนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี.....	59
4.4	ลักษณะรูปร่าง ระดับความหนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างอ้อยจากโรงงานน้ำตาลนครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา.....	62
4.5	ลักษณะรูปร่าง ระดับความหนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างจากไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา..	63
4.6	การเจริญของยีสต์ที่ร้อนที่สามารถใช้ไซโลสได้ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	64
4.7	จำนวนยีสต์ที่ร้อนที่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	67
4.8	ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ที่ร้อนผลิตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....	68
4.9	ปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าว (เปอร์เซ็นต์).....	72
4.10	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร.....	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แผนภูมิการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังในโรงงานอุตสาหกรรม.....	7
2.2	กระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย.....	9
2.3	โครงสร้างของอะไมโลส (บน) และอะไมโลเพคติน (ล่าง).....	11
2.4	การหมักเอทานอลจากแป้ง.....	11
2.5	โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสที่พบในเซลล์พืช.....	14
2.6	โครงสร้างของเซลลูโลส.....	16
2.7	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส.....	20
2.8	โครงสร้างของกาแลกโตกลูโคแมนแนนในไม้เนื้ออ่อน.....	20
2.9	โครงสร้างของอะราบีโนกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน.....	21
2.10	โครงสร้างของกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง.....	21
2.11	ลักษณะโครงสร้างของลิกนิน.....	22
2.12	ลักษณะของลิกโนเซลลูโลสภายหลังจากการปรับสภาพ.....	23
2.13	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด.....	28
2.14	ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส.....	30
2.15	การทำงานของเอนไซม์เชิงซ้อน (complex enzyme) ในการย่อยสลายเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืช โดยจะทำงานร่วมกันในรูปแบบที่เรียกว่า synergistic action.....	31
2.16	การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสที่ตำแหน่งต่างๆ ของเฮมิเซลลูโลส...	34
2.17	กระบวนการ SHF.....	37
2.18	กระบวนการ SSF.....	38
2.19	กระบวนการ SSCF.....	39
2.20	กระบวนการ CBP หรือ DMC.....	40
2.21	ลักษณะเซลล์ของยีสต์ (ก) <i>Kluyveromyces marxianus</i> (ข) <i>K. lactis</i>	43
3.1	ลักษณะฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ.....	50
3.2	ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช.....	51
3.3	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการผลิตเอทานอล.....	54
4.1	ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ.....	56

4.2	ลักษณะของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายที่เก็บจากเกาะ แสมสาร จังหวัดชลบุรี.....	59
4.3	ลักษณะของยีสต์ทั้ง 28 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากเขาวัง เขมร จังหวัดกาญจนบุรี.....	61
4.4	ลักษณะของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บจาก โรงงานน้ำตาลนครบุรี จังหวัดนครราชสีมา.....	63
4.5	ลักษณะของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานที่ เก็บจากไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา.....	64
4.6	การเจริญของเชื้อในอาหารเหลวไซโลส.....	66
4.7	ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ทนร้อนผลิตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....	68
4.8	ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1.....	69
4.9	ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ซึ่งทำการทดลองในอาหารไซโลส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	70
4.10	ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1	71
4.11	ลักษณะฟางข้าวที่การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีและย่อยสลายด้วย เอนไซม์แล้ว.....	72
4.12	การเจริญเติบโตของ <i>P. stipitis</i> ที่เวลา 0 - 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส.....	75
4.13	การเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ที่เวลา 0 - 65 ชั่วโมง ใน อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส.....	75
4.14	ปริมาณปริมาณเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของ <i>P.stipitis</i> และยีสต์ทนร้อนไอโซเลท 2-1.....	76
4.15	Phylogenetic tree สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 ของ large subunit rDNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 และ สปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนหรือใกล้เคียงที่สุด.....	79

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

FPU	หน่วยหรือยูนิตของเซลล์เลสที่ได้จากการวัดด้วยวิธี Filter paper unit assay
GC	แก๊สโครมาโทกราฟี
SHF	กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบไม่ต่อเนื่อง
SSF	กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่อง
SSCF	กระบวนการย่อยสลายและหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาสภาวะโลกร้อนและการลดลงอย่างต่อเนื่องของแหล่งน้ำมันดิบในปัจจุบันส่งผลให้ราคาน้ำมันดิบมีราคาสูงขึ้น ดังนั้นการหาแหล่งพลังงานใหม่หรือการผลิตเชื้อเพลิงขึ้นมาทดแทนจึงได้รับความสนใจมากขึ้น ทำให้พลังงานทางเลือกใหม่ๆ เช่น แก๊สโซฮอลล์ ดีเซลชีวภาพถูกพัฒนาขึ้นอย่างกว้างขวางดังนั้นจึงมีการพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอล ซึ่งใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตแก๊สโซฮอลล์มากขึ้นตามลำดับด้วยเช่นกัน กระบวนการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจะพิจารณาถึงความคุ้มค่าทางด้านเศรษฐศาสตร์ ด้านสิ่งแวดล้อม และด้านพลังงาน (Chandel และคณะ, 2007) ปัจจัยที่มีผลต่อราคาของกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลนั้น มาจากวัตถุดิบซึ่งมีผลประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (Hamelinck และคณะ, 2005) ปัจจุบันมีการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลหรือแป้งที่ได้จากพืชหลายชนิด เช่น อ้อย ข้าวโพด และมันสำปะหลัง อย่างไรก็ตาม เอทานอลที่ผลิตได้ยังมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานจากแหล่งน้ำมันดิบ ดังนั้นจึงเลือกใช้ผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งวัสดุเหล่านี้เรียกว่าวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ชานอ้อย เศษไม้ ชังข้าวโพด ฟางข้าว (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549) เป็นต้น

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่อย่างเหลือเฟือเพื่อมีราคาต่ำ ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในอัตราส่วนที่ต่างกันไปตามชนิดของวัตถุดิบ เช่น ฟางข้าว ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส 39 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 27 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 12 เปอร์เซ็นต์ (Kaur และคณะ, 1997) ซึ่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลที่สามารถนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์แล้วให้ผลผลิตเป็นเอทานอลได้ น้ำตาลที่ได้จากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสซึ่งมีคาร์บอน 6 และ 5 อะตอมตามลำดับ ซึ่งในวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจะมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์และมีน้ำตาลไซโลสประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Thomas และ Yong-su, 2000) แต่ด้วยธรรมชาติของยีสต์จะสามารถนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อได้ผลผลิตเป็นเอทานอลได้มากกว่าการใช้น้ำตาลไซโลส ดังนั้นการคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตเอทานอลได้นั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญ

ในยีสต์ดีไซโลสจะถูกรีดิวซ์โดย D-xylose reductase ได้เป็นไซลิทอลและจะถูกออกซิไดซ์โดย xylitol dehydrogenase ได้เป็นดีไซลูโลสจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น glyceraldehyde-3-phosphate และ fructose-6-phosphate เข้าสู่กระบวนการหมักตามปกติ (Hahn-Hägerdal และคณะ, 1994) ยีสต์ที่สามารถนำน้ำตาลไซโลสเข้าสู่กระบวนการหมักที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายและสามารถหมักน้ำตาลไซโลสแล้วได้เอทานอลออกมาเป็นผลิตภัณฑ์อย่างเดียว คือสายพันธุ์ *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* และ *Pichia stipitis*

ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปจะประกอบด้วย การเตรียมวัตถุดิบการหมัก (fermentation) การกลั่น (distillation) และการกำจัดน้ำ (dehydration) ซึ่งในกรณีที่วัตถุดิบที่เป็นแป้งหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส จะต้องมีขั้นตอนการย่อย (hydrolysis) เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลก่อนการหมัก (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549) ซึ่งการย่อยวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสามารถทำได้โดยใช้กรดหรือเอนไซม์ การใช้กรดนั้นมีข้อเสีย คือ ในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงปฏิกิริยาเกิดขึ้นรุนแรงและเป็นการย่อยที่ไม่เฉพาะเจาะจงเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อนของกรดได้ซึ่งมีราคาแพง และต้องมีการกำจัดน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการซึ่งมีกรดเจือปนอยู่ ดังนั้นการใช้เอนไซม์จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะสูง ปฏิกิริยาเกิดที่สภาวะเป็นกลางไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการเหมือนกับการใช้กรด ทำให้ค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียลดลง (Wyman, 1994) และกระบวนการผลิตเอทานอลที่นิยมในปัจจุบันคือ กระบวนการผลิตแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) โดยรวมขั้นตอนการย่อยครั้งสุดท้ายเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล พร้อมกับการหมักด้วยยีสต์ในขั้นตอนเดียวกัน แต่กระบวนการ SSF มีการใช้อุณหภูมิสูงซึ่งสามารถทำลายเซลล์ยีสต์ได้ เพราะฉะนั้นยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักควรมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงจะทำให้ประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้นดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดเพื่อทำการคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดกรองสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในการนำน้ำตาลไซโลสเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอล และคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่พบที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุดมาใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะคัดกรองสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์ยีสต์ที่พบที่มีประสิทธิภาพสูงในการนำน้ำตาลไซโลสเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอล

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย
2. คัดกรองยีสต์ที่พบที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล
3. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่พบ
4. ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่พบ
5. ผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ที่พบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรโดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิต
6. ปังชี้สายพันธุ์ของยีสต์ที่พบ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล

เอทานอล (ethanol หรือ ethyl alcohol) เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติติดไฟง่าย ไม่มีสี เป็นสารประกอบเคมีที่เป็นพิษอ่อนๆ ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ หรือ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ประโยชน์ของเอทานอลที่เห็นในชีวิตประจำวันมีด้วยกันหลายอย่าง อาทิเช่น ใช้ในการผลิตเครื่องดื่ม ใช้ในการผลิตยา เป็นตัวทำละลาย ใช้เป็นตัวกลางในการถ่ายเทความร้อน ใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง และในปัจจุบันเอทานอลยังสามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนในเครื่องยนต์ โดยนำมาใช้ได้ 3 รูปแบบ ได้แก่

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล
2. ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่าดีโซฮอล์ (diesohol)
3. ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนของน้ำมันให้กับเครื่องยนต์

การใช้เอทานอลบริสุทธิ์เพื่อเป็นเชื้อเพลิงพบในหลายประเทศ เช่นบราซิลมีการใช้เอทานอลความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 20-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สหรัฐอเมริกามีการใช้เอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินไร้สารตะกั่วในอัตราส่วน 10 : 90 ออสเตรเลียมีการใช้เอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 15 : 85 และใช้เป็นเชื้อเพลิงของรถยนต์ในชื่อผลิตภัณฑ์ pretranol ส่วนประเทศไทย เอทานอลถูกนำมาผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 10 : 90 ใช้เป็นเชื้อเพลิงของรถยนต์ เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ และอัตราส่วน 20 : 80 เรียกว่า E20 และอัตราส่วน 85 : 15 เรียก E85 เป็นต้น (นคร ทิพย์าวงศ์, 2553) คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของ เอทานอลแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเอทานอล (นคร ทิพย์าวงศ์, 2553)

คุณสมบัติ	เอทานอล
สถานะ	ของเหลว
สี	ใส ไม่มีสี

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเอทานอล (ต่อ)

คุณสมบัติ	เอทานอล
กลิ่น	เฉพาะตัว
น้ำหนักโมเลกุล	46.07
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	78
จุดหลอมเหลว/จุดเยือกแข็ง (องศาเซลเซียส)	-114
ความถ่วงจำเพาะ	0.789
ความหนาแน่นไอ	1.6
ความหนืด (MPa.s)	1.41
ความดันไอ (มม.ปรอท)	43 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความสามารถในการละลายน้ำ (กรัม/100 มล.)	100

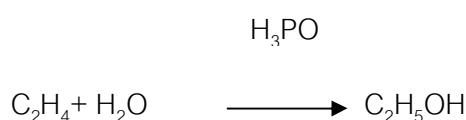
2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ด้วยกัน คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และกระบวนการทางชีวภาพ (fermentation)

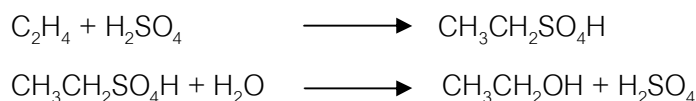
2.2.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

เป็นการผลิตจากอนุพันธ์ของสารปิโตรเลียม เช่น เอทิลีนเอทานอลที่ได้ เรียกว่า เอทานอลสังเคราะห์ (สภาผู้แทนราษฎร, คณะกรรมาธิการการพลังงาน, 2545) วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่

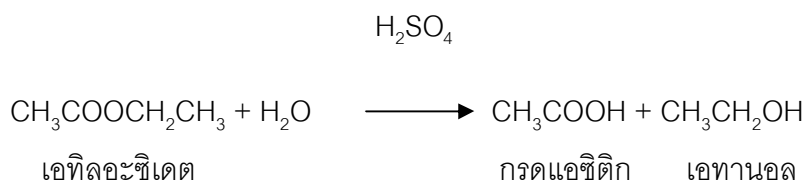
1. การผลิตเอทานอลจากกระบวนการไฮเดรชันของเอทิลีน (Ethylene hydration) โดยตรง โดยมีกรดฟอสฟอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ความดันและอุณหภูมิสูง โดยทั่วไปมักใช้ที่ 1000 psi และ 300 องศาเซลเซียส (Plotkin, 2006) สมการของการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังนี้



2. การผลิตเอทานอลจากกระบวนการไฮเดรชันของเอทิลีน (Ethylene hydration) โดยอ้อม โดยมีกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้ได้เอทิลซัลเฟตซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นเอทานอล (Demirbas, 2005) สมการของการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังนี้



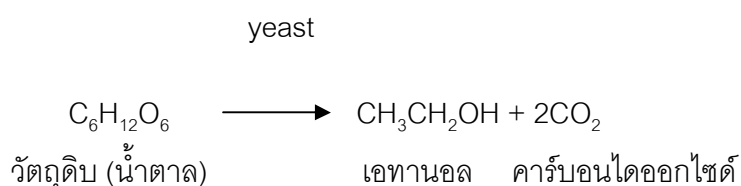
ในการเกิดปฏิกิริยา Ethylene hydration นี้จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทิลซัลเฟต ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SO}_4\text{H}$) ขั้นต่อมานำเอทิลซัลเฟตไปทำปฏิกิริยากับน้ำจะได้เอทานอลกับกรดซัลฟิวริก จากนั้นทำการสกัดให้ได้เอทานอลออกมา



วิธีการสังเคราะห์เอทานอล ทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมาแต่เดิมนิยมใช้กันมากเพราะเป็นกระบวนการที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก กระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับปัจจัยเพียงไม่กี่อย่าง แต่เนื่องจากวิธีการสังเคราะห์ดังกล่าวต้องใช้สารเริ่มต้นที่เป็นผลผลิตจากปิโตรเลียม ทำให้ต้นทุนการผลิตของทั้งสองวิธีนี้สูงขึ้นมากจึงทำให้มีการผลิตเอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพแทน

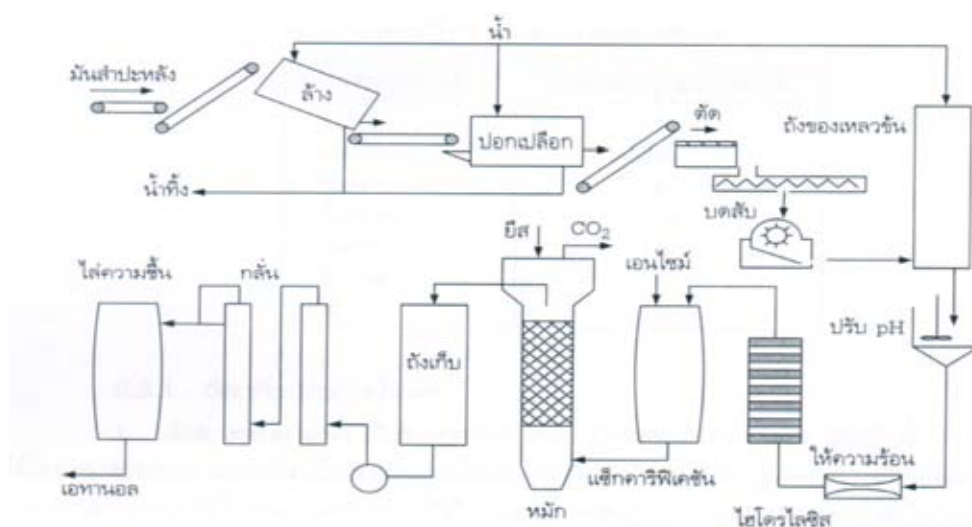
2.2.2 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ

เป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลโดยอาศัยกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ เข้ามาเกี่ยวข้อง ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก ยีสต์จะใช้น้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosaccharide) เป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มีสมการการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล ดังนี้



ตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 100 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซ็นต์และเอทานอล 51.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่นๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ของยีสต์ทำให้ได้เอทานอลเพียง 50-90 เปอร์เซ็นต์ทางทฤษฎี เมื่อได้เอทานอลแล้ว ขั้นตอนที่ 2 จึงเป็นการทำให้เอทานอลมีความเข้มข้น และบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยการกลั่น

ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมทั่วโลกมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ จะใช้กระบวนการทางชีวภาพมากกว่ากระบวนการทางเคมี ซึ่งวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจะเป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล เช่น กากน้ำตาล แป้ง หรือ วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งกระบวนการแปลงสภาพวัตถุดิบไปเป็นเอทานอลของวัตถุดิบแต่ละชนิดจะมีวิธีการในการเตรียมวัตถุดิบและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวไม่เหมือนกัน ตัวอย่างการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพในโรงงานอุตสาหกรรมแสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แผนภูมิการผลิตเอทานอลจากมันส์ปะหลังในโรงงานอุตสาหกรรม

(นคร ทิพย์าวงศ์, 2553)

2.3 ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

วัตถุดิบที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพมี 3 ประเภท คือ น้ำตาล แป้ง และวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยแต่ละประเภทต้องนำไปผ่านกระบวนการปรับปรุงต่าง ๆ ก่อนที่จะนำไปหมักเพื่อให้เป็นเอทานอล วัตถุดิบประเภทน้ำตาลสามารถนำไปหมักได้โดยตรง แต่วัตถุดิบประเภทอื่น ๆ ไม่สามารถหมักได้โดยตรง เพราะวัตถุดิบ

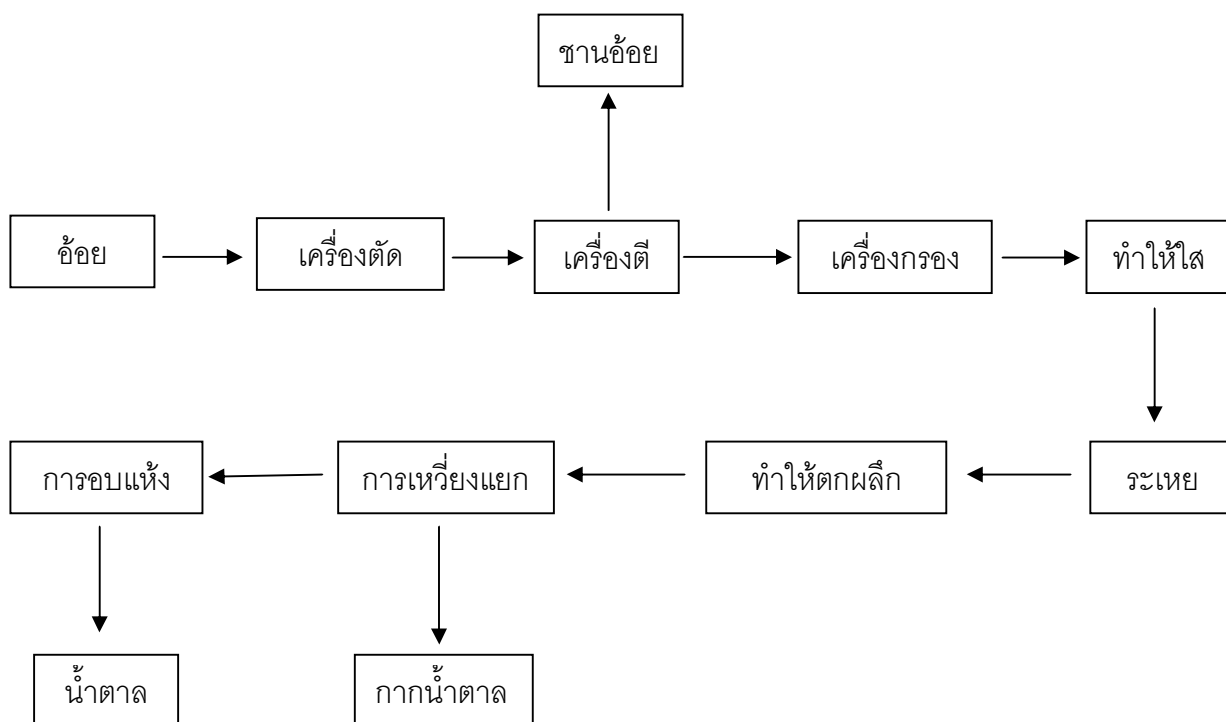
บางอย่างยังเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่หรือมีส่วนผสมของสารชนิดอื่นอยู่มากมาย เช่น วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งต้องผ่านกระบวนการเตรียม (pretreatment) และกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ก่อนนำไปหมัก ส่วนแป้งต้องผ่านกระบวนการทำให้เป็น ของเหลว (liquefaction) และการละลายเป็นน้ำตาล (saccharification) ก่อนจะนำไปหมักโดยผลผลิตเอทานอลต่อน้ำหนักของวัตถุดิบชีวมวลตั้งต้น โดยเฉลี่ยแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชีวมวลประเภทต่างๆ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549)

วัตถุดิบชีวมวล	ผลผลิตเอทานอล (กิโลกรัมต่อเอทานอล 1 ลิตร)
อ้อย	12.7-14.3
กากน้ำตาล	4-6
ข้าวฟ่างหวาน	14
หัวบีท	10.3
มันสำปะหลัง	6.50-5.45
มันฝรั่ง	8.50
ข้าวสาลี	2.60
ข้าวฟ่าง	2.30
ไม้	3.85

2.3.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบหลักๆ ที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอล คือ อ้อยซึ่งอยู่ในรูปของน้ำอ้อยหรือผลผลิตพลอยได้ที่เป็นกากน้ำตาล (molasses) (Sánchez และ Cardona, 2008) ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีวัตถุดิบอื่นๆ ที่มีน้ำตาลมากซึ่งสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบได้เช่นกัน ได้แก่ หัวบีทหรือหัวผักกาดหวาน (sugar beet) ข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) และผลไม้ต่างๆ (Badger, 2002) สองในสามของการผลิตน้ำตาลทั่วโลกจะมาจากอ้อย และหนึ่งในสามจะมาจากหัวบีท (Kumar และคณะ, 2006 อ้างถึงใน Balat และคณะ, 2008) ซึ่งกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยมีกระบวนการดังแสดงในภาพ 2.2



ภาพที่ 2.2 กระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย

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

2.3.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น (สภาผู้แทนราษฎร, คณะกรรมาธิการการพลังงาน, 2545)

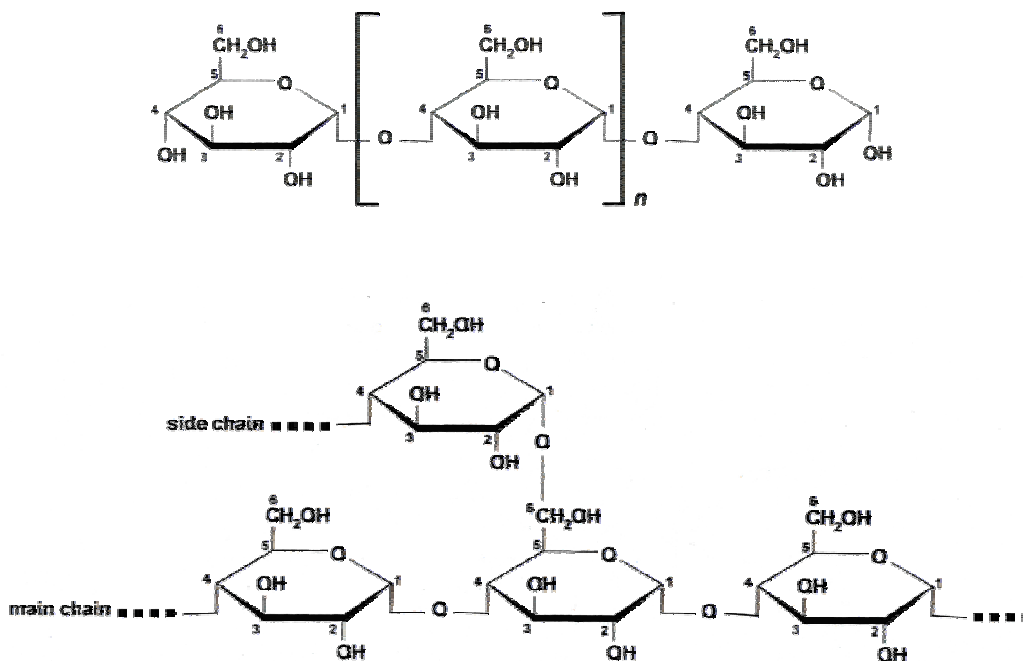
แป้งเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่หรือเรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ ประกอบด้วยน้ำตาลเชิงเดี่ยวมากกว่า 10 โมเลกุลขึ้นไป

(100-1,000 โมเลกุล) เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) อาจมีแขนงหรือไม่มีก็ได้ ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญ ได้แก่ แป้ง เดกซ์ทรีน ไกลโคเจน และเซลลูโลส ทั้งหมดมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบแต่มีโครงสร้างแตกต่างกัน ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญในชีวิตประจำวันแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญ

พอลิแซ็กคาไรด์	คุณสมบัติ
เซลลูโลส	โครงสร้างเป็นสายยาว ไม่แตกแขนง เป็นสารโครงสร้างของพืช โดยเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ร่างกายคนไม่มีเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส ไม่มีประโยชน์ในแง่ของอาหาร แต่เป็นกากอาหารกระตุ้นการขับถ่าย
แป้ง	โครงสร้างเป็นสายยาว หรือมีแตกแขนงเป็นสายยาวไม่กี่แขนง เป็นแหล่งอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำเย็น แต่ละลายในน้ำร้อน แป้งเมื่อถูกย่อยสลายจะกลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลง ดังนี้ แป้ง → เดกซ์ทรีน → มอลโทส → กลูโคส
ไกลโคเจน	โครงสร้างเป็นสายยาว มีการแตกแขนงเป็นสายสั้นจำนวนมาก ร่างกายสัตว์สำรองไกลโคเจนไว้ที่ตับและกล้ามเนื้อสำหรับใช้ในยามขาดแคลนอาหาร

การผลิตเอทานอลในทวีปอเมริกาเหนือและยุโรปมักจะใช้ข้าวโพดและข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบ ส่วนประเทศในเขตร้อนมักใช้พวกพืชหัวเป็นวัตถุดิบ (Cardona และ Sánchez, 2007) แป้งจัดเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวคือน้ำตาลกลูโคส แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิดที่มีสัดส่วนแตกต่างกัน คือ อะไมโลส (16 - 30 เปอร์เซ็นต์) และอะไมโลเพคติน (65 - 85 เปอร์เซ็นต์) อะไมโลสเป็นโพลีเมอร์ของดี-กลูโคสในรูปแอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิกเป็นโพลีเมอร์ที่มีสายตรงซึ่งจะมีลักษณะขดเป็นเกลียว (helix) ส่วนอะไมโลเพคตินเป็นโพลีเมอร์ที่มีกลูโคสมาต่อกันพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิกและมีการแตกกิ่งแขนงโดยมีน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก (Prasad และคณะ, 2007) ดังแสดงในภาพที่ 2.3

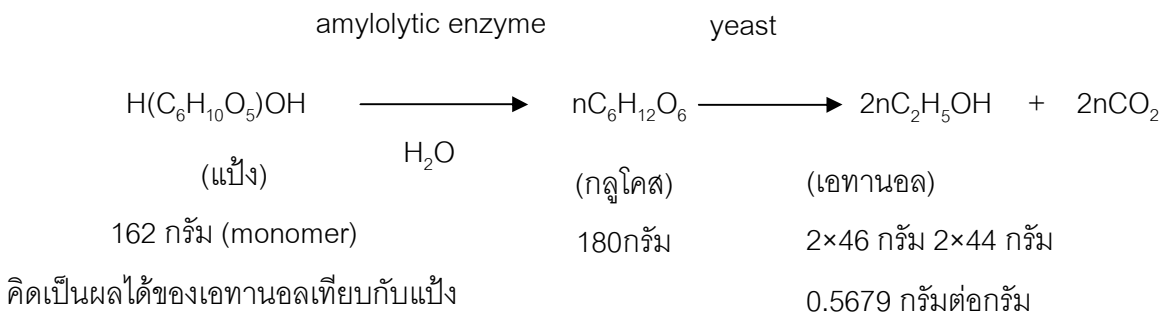


ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของอะไมโลส (บน) และอะไมโลเพคติน (ล่าง) (Casey และคณะ, 2006)

การนำวัตถุดิบประเภทแป้งมาใช้ต้องมีการย่อยสลายแป้งเพื่อให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส สำหรับใช้ในการหมัก กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลจะมีขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ

1. การย่อยแป้งครั้งที่หนึ่งหรือการทำให้แป้งเหลว (liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส ย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียสใช้เวลานาน 1-2 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าเดกซ์ทริน (Dextrin)

2. การย่อยแป้งครั้งที่สองหรือการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์ Amyloglucosidase ย่อยเดกซ์ทรินที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียสให้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งยีสต์สามารถใช้หมักเป็นเอทานอลได้โดยกระบวนการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 การหมักเอทานอลจากแป้ง

เมื่อได้เป็นน้ำตาลแล้วจึงเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป

ประเทศไทยนิยมใช้หัวมันสำปะหลังสดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลซึ่งมีข้อดีคือ มีสัดส่วนของแป้งสูงและเส้นใยต่ำ ให้ปริมาณเอทานอลต่อพื้นที่เพาะปลูกสูง สามารถปลูกได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ส่วนข้อเสีย คือ ต้องมีขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนนำไปหมัก

การนำวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้งซึ่งยังคงเป็นอาหารของมนุษย์มาใช้ในการผลิตเอทานอลอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทำให้วัตถุดิบมีราคาสูงขึ้นได้ เนื่องจากมีปริมาณไม่เพียงพอและในที่สุดอาจเกิดสภาวะขาดแคลนอาหารขึ้น ดังนั้นการนำวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

2.3.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด และเศษไม้ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบที่เป็น เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) หลายชนิด เช่น ไชโลส (xylose) แมนโนส (mannose) และอาราบินอส์ (arabinose) เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ใช้สำหรับผลิตเอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม (Sánchez และ Cardona, 2008) ดังนี้

(1) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (crop residue หรือ agricultural waste) ได้แก่ ฟางข้าว สาลี ฟางข้าวบาร์เลย์ ฟางข้าวเจ้า แกลบ ชานอ้อยใบข้าวโพด ลำต้นข้าวโพดและชังข้าวโพดซึ่งรวมเรียกส่วนต่างๆ ของข้าวโพดนี้ว่า คอรันสโตเวอร์

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

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

(4) ไม้เนื้อแข็ง (hardwood) ได้แก่ ต้นแอสเพนต้นป็อปลาร์

(5) ไม้เนื้ออ่อน (softwood) ได้แก่ ต้นสน

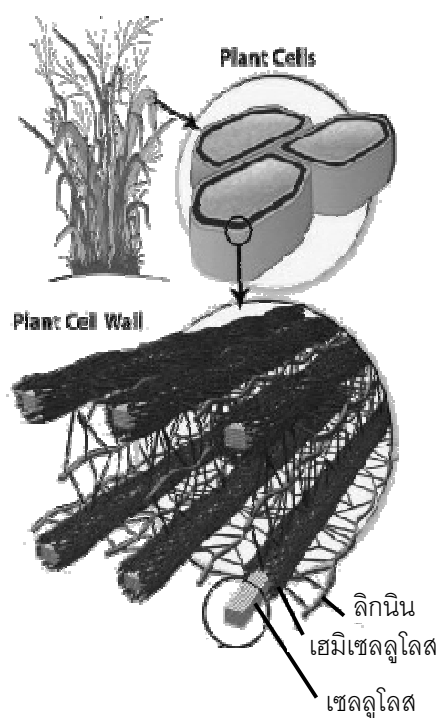
(6) พืชล้มลุก (herbaceous biomass) ได้แก่ หญ้าชนิดต่างๆ เช่น หญ้าสวิตช์หญ้ารีดคาแนรีหญ้าเบอร์มิวดาและหญ้าทิโมธี เป็นต้น

ขั้นตอนในการผลิตเอทานอล โดยทั่วไปจะประกอบด้วยการเตรียมวัตถุดิบ (raw material preparation) การหมัก (fermentation) การกลั่น (distillation) และการกำจัดน้ำ (dehydration) ซึ่งในกรณีที่วัตถุดิบที่เป็นแป้งหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจะต้องมีขั้นตอนการย่อยเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลก่อนการหมัก (hydrolysis) (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549)

ข้อดีของการใช้วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส คือ เป็นวัตถุดิบที่มีเป็นปริมาณมาก หาได้ง่าย ราคาถูก และสามารถเกิดขึ้นมาทดแทนได้อยู่เสมอ ส่วนข้อเสียคือ ต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสยังค่อนข้างสูงอยู่เมื่อใช้เทคโนโลยีที่มีอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายได้ผลผลิตต่ำและใช้ต้นทุนสูง (Sun และ Cheng, 2002)

2.4 องค์ประกอบของชีวมวลพืชในวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของชีวมวลที่พบในผนังเซลล์ของพืช ประกอบด้วยเซลลูโลสซึ่งเป็นไมโครไฟบริลฝังอยู่ในเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ดังแสดงในภาพที่ 2.5 จึงเรียกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินรวมกันว่า ลิกโนเซลลูโลส นอกจากนี้ในวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสยังพบสารประกอบอื่นๆ ที่เรียกว่า สารแทรก (extractive) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ใช่องค์ประกอบของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เรซิน ไขมัน กรดไขมัน ฟีนอลิก ไฟโตสเตอรอล เกลลิ่ง และแร่ธาตุ เป็นต้น (Lee และคณะ, 2007) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดจะมีสัดส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินแตกต่างกันไป (Prasad และคณะ, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 2.4



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของลิกนินเซลลูโลสที่พบในเซลล์พืช (Ritter, 2008)

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของลิกนินเซลลูโลสในวัตถุดิบชนิดต่างๆ (Sun และ Cheng, 2002)

วัตถุดิบประเภทลิกนินเซลลูโลส	เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	เฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	ลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)
ลำต้นไม้เนื้อแข็ง	40 - 55	24 - 40	18 - 25
ลำต้นไม้เนื้ออ่อน	45 - 50	25 - 35	25 - 35
เปลือกถั่ว	25 - 30	25 - 30	30 - 40
ซังข้าวโพด	45	35	15
กระดาศ	85 - 99	0	0 - 15
ฟางข้าวสาลี	30	50	15
ฟางข้าวเจ้า	32.1	24.0	18.0
กระดาศหนังสือพิมพ์	40 - 55	25 - 40	18 - 30
ของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ	60 - 70	10 - 20	5 - 10
ชานอ้อย	33.4	30.0	18.9
หญ้าเบอร์มิวดา	25.0	35.7	6.4

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในวัตถุดิบชนิดต่างๆ (ต่อ)

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	เฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	ลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)
หญ้าสวิตช์	45.0	31.4	12.0
หญ้าออร์ชาร์ด	32.0	40.0	4.7
หญ้า (ค่าเฉลี่ยสำหรับหญ้าชนิดต่างๆ)	25 - 40	25 - 50	10 - 30

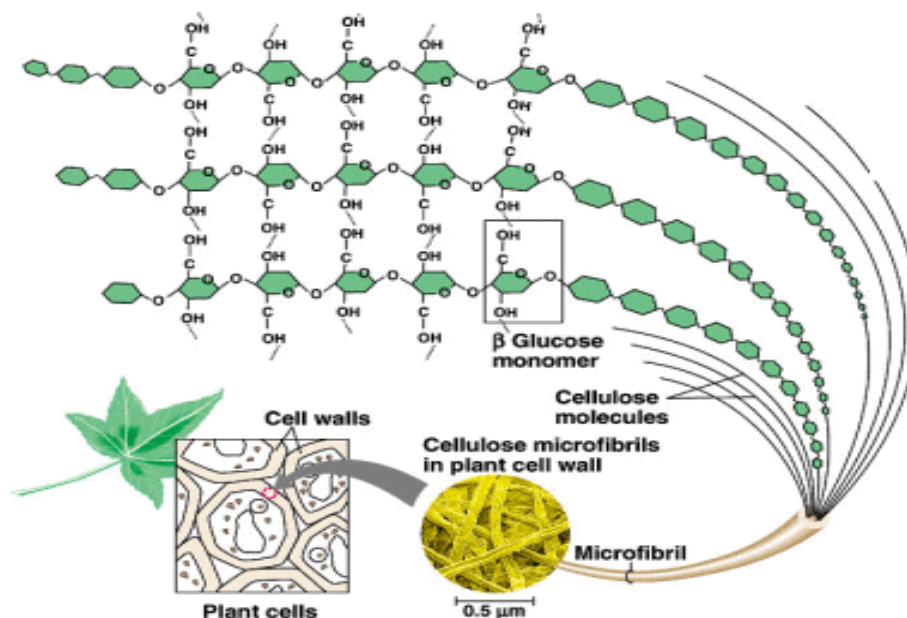
2.4.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสมีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติโดยเฉพาะเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืชชั้นสูง โดยอาจจะพบในสภาพเซลลูโลสที่บริสุทธิ์ เช่น ในฝ้าย หรืออาจจะเกิดร่วมกับสารประกอบอื่นๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเนื้อเยื่อของพืช เซลลูโลสที่พบในพืชอาจจะมาจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เนื้อแข็ง ฟาง เยื่อ ลำต้น เปลือก ฯลฯ เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีมากที่สุด ในองค์ประกอบของพืช (วิทยา มะเสนา, 2530) โดยจะมีปริมาณต่ำประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ในพืชที่มีอายุน้อยและจะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ในช่วงที่มีอายุมากขึ้น โดยเฉลี่ยแล้วพืชมีเซลลูโลสประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง (Hamelinck และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังพบเซลลูโลสในสาหร่าย เส้นใยเชื้อราและผนังเซลล์ของโปรโตซัวบางชนิด (จักรกฤษณ์ หอมจันทร์, 2529)

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียว คือ โมเลกุลของดี-กลูโคสในรูปเบตา-ดี-กลูโคไพราโนสหลายโมเลกุลเรียงต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิก โดยมีการตั้งโมเลกุลของน้ำออกจึงมีสูตรทางเคมีเป็น $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนของโมเลกุลกลูโคสที่มาเรียงต่อกัน โดยกลูโคส 2 โมเลกุลจะเรียงต่อกันเป็นไดเมอร์ เรียกว่า เซลโลไบโอสซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของเซลลูโลสในการมาต่อซ้ำๆ กันเป็นโครงสร้างสายยาวคล้ายลูกโซ่ ไม่มีการแตกกิ่งแขนง ซึ่งแตกต่างจากแป้งที่กลูโคสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิก ทำให้เซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงแต่แป้งจะมีโครงสร้างที่เป็นโซ่เกลียว ส่งผลให้เซลลูโลสมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลจำนวนมากจึงมีลักษณะเป็นมัดเส้นใยที่เป็นระเบียบซึ่งมีความแข็งแรงและทนต่อการย่อยสลายได้มากกว่าแป้ง (Ritter, 2008)

เซลลูโลสที่มาจากแหล่งต่างๆ มีโครงสร้างทางเคมีที่เหมือนกัน กล่าวคือ มีส่วนที่เป็นแอนไฮโดรกลูโคสโดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะประกอบด้วยสาย เบตา-กลูโคไพราโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตาที่อะตอมของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่าเซลลูโลส 1 โมเลกุล จะประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสมากถึง 1,400 - 10,000 โมเลกุล ที่เชื่อมต่อกันเป็น

สายยาวและน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูโลสจะมีตั้งแต่ 200,000 – 2,000,000 ดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของเซลลูโลส

ลักษณะการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตาที่เป็นสายยาวและไม่มีกิ่งก้านสาขาทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นแบบเบตา-คอนฟิวกูเลชันส่งผลให้เซลลูโลสมีลักษณะเป็น rigid และ straight เพราะมี intra-inter molecule hydrogen bond จึงทำให้เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ในขณะที่พันธะแอลฟา-1-4-ไกลโคซิดิกในอะไมโลสจะละลายน้ำได้ดี (กาพย์พร กลางสาทร, 2529) นอกจากนี้โมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงกันอยู่เป็นมัดๆ ที่เรียกว่าไฟบริล (fibril) เมื่อนำแต่ละไฟบริลมาขยายพบว่าจะประกอบด้วยส่วนที่อยู่รวมกันเป็นกระจุกเรียกว่า crystalloid และส่วนที่อยู่รวมกันแบบหลวมๆ เรียกว่า amorphous โดยส่วนของไฟบริลต่างๆ ที่อยู่รวมกันเป็นโมเลกุลเซลลูโลส จะพบได้ในผนังเซลล์พืชที่มีลักษณะเป็นแท่งเล็กๆ เรียกว่า micelles และเมื่อรวมกันเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า microfibril นอกจากนี้ยังพบว่าในผนังเซลล์พืช จะแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ (Norkrans, 1967 ; Regura และ Leschine, 2001) คือ

1. Fringe micelles ใน microfibril ประกอบด้วยส่วน crystalloid และ amorphous โดยส่วนของ crystalloid เป็นบริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลอย่างเป็นระเบียบซึ่งมีอยู่ประมาณ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนบริเวณ amorphous เป็นบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่าบริเวณ crystalloid

2. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

3. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นหนาเกิดจากการม้วนไปมา โดยตั้งฉากกับแกนริบบิ้น และแถบของริบบิ้นที่จะม้วนเป็นเกลียว

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเซลลูโลสที่พบในองค์ประกอบของพืชชนิดต่างๆ จะมีมากน้อยแตกต่างกันตามชนิด อายุ ฤดูกาลการเก็บเกี่ยวของพืช รวมทั้งเซลลูโลสที่พบในแต่ละส่วนของพืช ยกตัวอย่างเช่น เปลือก ใบ เมล็ด ก็มีปริมาณที่แตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ส่วนของพืชชนิดต่างๆ ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (ธงชัย คัมภีร์ และคณะ, 2532)

พืช	ส่วนของต้นพืช	ปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)
ข้าว	แกลบ	42
ข้าว	ฟางข้าว	32.1
ข้าวโพด	ใบ	36.43
ถั่วเหลือง	ใบ	36-43
ถั่วเหลือง	เปลือก	31
ถั่วลิสง	เปลือก	52
ฝ้าย	เปลือกเมล็ดฝ้าย	49
ส้ม	เปลือก	60
อ้อย	ชานอ้อย	48-62

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

- (1) แอลฟา-เซลลูโลส จัดเป็นเซลลูโลสที่แท้จริง เป็นเซลลูโลสที่ไม่สามารถละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- (2) เบตา-เซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสแต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่เป็นกรด

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

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ถูกเรียกว่า cellulolytic microorganism ซึ่งส่วนมากอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซิทีส โดยพบทั่วไปในดิน เนื่องจากจะมีสารประกอบพวกเซลลูโลสในดินจึงเป็นการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์พวกที่ย่อยสลายของเซลลูโลส (แสวง รวยสูงเนิน, 2523; กนก รัตนกนกชัย, 2528) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. Aerobic mesophilic microflora เป็นกลุ่มจุลินทรีย์จำพวกที่ต้องการออกซิเจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 15-45 องศาเซลเซียสและเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส
2. Anaerobic mesophilic microflora เป็นกลุ่มจุลินทรีย์จำพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน สามารถเจริญได้ดีในขอบเขตของอุณหภูมิเช่นเดียวกับกลุ่ม aerobic mesophilic microflora
3. Thermophilic microflora เป็นกลุ่มจุลินทรีย์จำพวกที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 45-65 องศาเซลเซียสโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่แบ่งได้ดังกล่าว สามารถจำแนกเป็นชนิดต่างๆ ได้ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส (Alexander, 1976; Alexander, 1977; Reicheil, 1983)

รา	แบคทีเรีย	แอคติโนมัยซิทีส
<i>Alternaria Phoma</i> (1)	<i>Achromobacter</i> (1)	<i>Micromonospora</i> (1,2)
<i>Aspergillus</i> (1) <i>Polyporus</i>	<i>Angiococcus</i> (1)	<i>Nocardia</i> (1)
<i>Cheetomium</i> (1) <i>Rhizoctonia</i>	<i>Bacillus</i> (1)	<i>Streptomyces</i> (1)
<i>Coprinus Rhizopus Curvularia</i> (1)	<i>Cellfacticula</i> (1)	<i>Streptasporangium</i> (1)
<i>Sporotrichum Foames</i> (2)	<i>Cellulomonas</i> (1)	
<i>Thielavia</i> (1) <i>Fusarium</i> (1)	<i>Cellvibrio</i> (1)	
<i>Trametes</i>	<i>Clostridium</i> (2,3)	

ตารางที่ 2.6 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส (ต่อ)

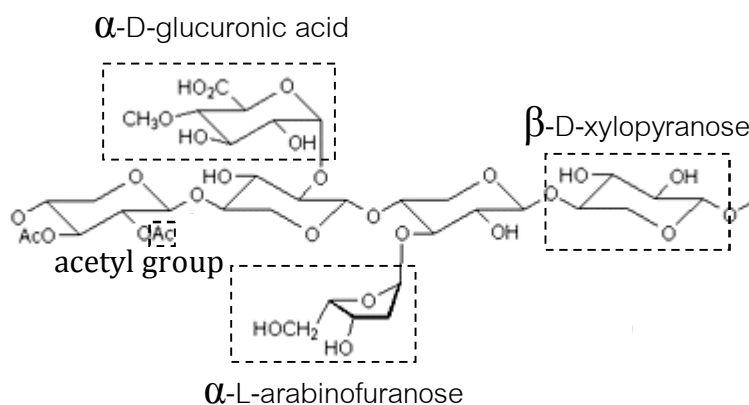
รา	แบคทีเรีย	แอกติโนมัยซีตัส
<i>Memnoniella</i> (1)	<i>Cytophage</i> (1)	
<i>Trichoderma</i> (1)	<i>Polyangium</i> (1)	
<i>Merulius</i> (2)	<i>Pseudomonas</i> (1)	
<i>Trichoderthecium</i>	<i>Sorangium</i>	
<i>MyrotheciumbVerticillium</i>	<i>Sporocytophage</i> (1)	
<i>Penicillium Zygorhynchus</i>	<i>Vibrio</i> (1)	

หมายเหตุ : 1, 2, 3 หมายถึง

- 1 แสดงถึง Aerobic mesophilic microflora
- 2 แสดงถึง Anaerobic mesophilic microflora
- 3 แสดงถึง Thermophilic microflora

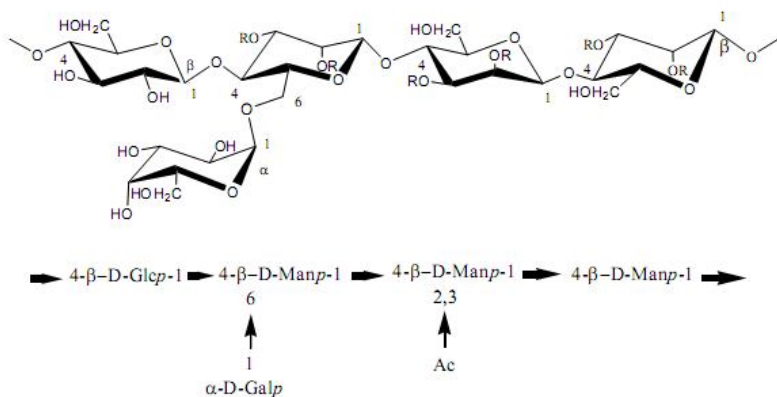
2.4.2 เหมิเซลลูโลส

เหมิเซลลูโลสพบประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง (Hamelinck และคณะ, 2005) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลสทำหน้าที่เสริมสร้างผนังเซลล์พืชให้แข็งแรงมีลักษณะเป็นเฮทเทอโรพอลิเมอร์ซึ่งแตกต่างจากเซลลูโลสที่เป็นโฮโมพอลิเมอร์ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดเช่น น้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอม (ดี-ไซโลส แอล-แรมโนส และแอล-อะราบิโนส) น้ำตาลคาร์บอนหกอะตอม (ดี-กลูโคส ดี-แมนโนส และ ดี-กาแลกโตส) และกรดยูโรนิก (4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิดดี-กลูคูโรนิกแอซิดและ ดี-กาแลกทูโรนิกแอซิด) สายหลักของเหมิเซลลูโลสอาจเป็นโฮโมพอลิเมอร์ หรือเฮทเทอโรพอลิเมอร์ที่มีกิ่งก้านๆ ที่ตำแหน่งพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกหรือบางครั้งอาจเป็นพันธะเบตา-1,3-ไกลโคซิดิก นอกจากนี้ยังมีหมู่อะซิติลมาเกาะอีกด้วย (Purwadi, 2006) โครงสร้างของเหมิเซลลูโลสแสดงดังภาพที่ 2.7



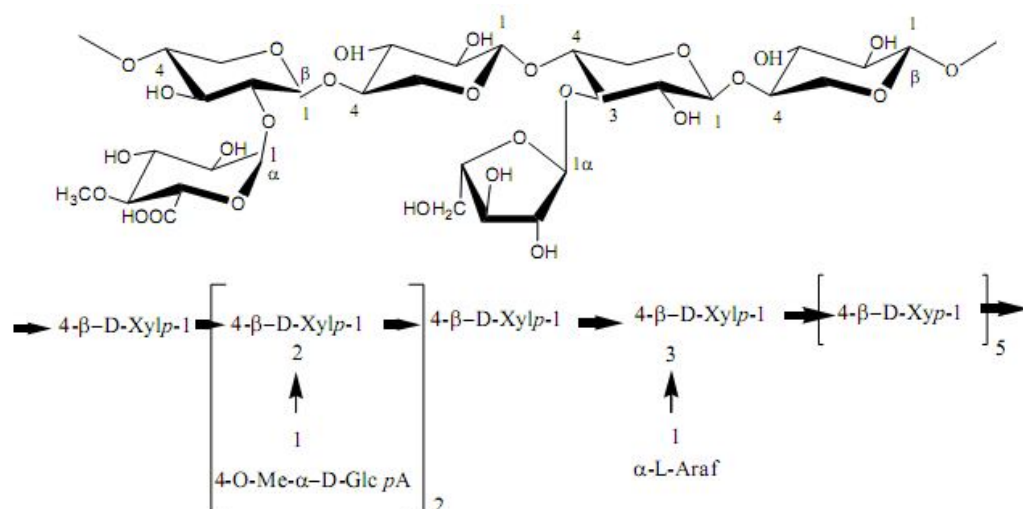
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Fort, 2006)

เฮมิเซลลูโลสมีค่า DP ต่ำกว่าเซลลูโลสมาก โดยมีค่าประมาณ 50- 300 จากการที่เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างที่มีกิ่งจึงทำให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่จะเป็นโพลีเมอร์ชนิดกาแลกโตกลูโคแมนแนน (ภาพที่ 2.8) และอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (ภาพที่ 2.9) ในขณะที่ไม้เนื้อแข็งจะเป็นกลูคูโรโนไซแลน (ภาพที่ 2.10) (Ragauskas, 2008)



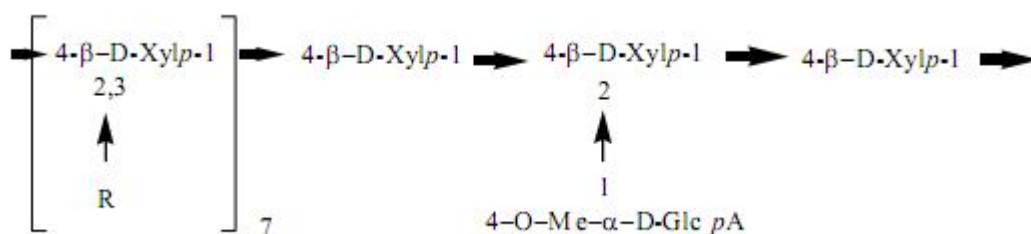
ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของกาแลกโตกลูโคแมนแนนในไม้เนื้ออ่อน (Ragauskas, 2008)

เมื่อ Glcp คือเบตา-ดี-กลูโคไพรานอส Manp คือเบตา-ดี-แมนโนไพรานอส Galp คือเบตา-ดี-กาแลกโตไพรานอส และ R คือ CH_3CO หรือ H



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของอะราบินอกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (Ragauskas, 2008)

เมื่อ Xylp คือเบตา-ดี-ไซโลไฟรานอส Glcp A คือ 4-โอ-เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไฟรานอไซลูโรนิกแอซิดและ Araf คือ แอลฟา-แอล-อะราบินอฟูรานอส



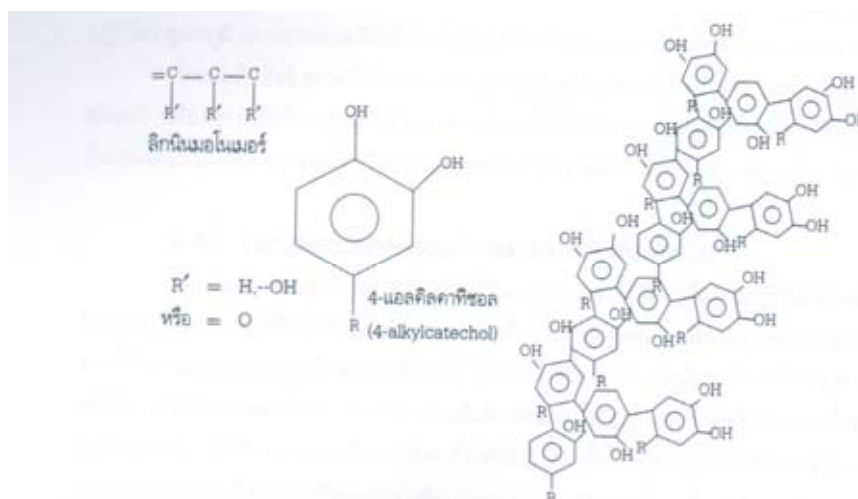
ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Ragauskas, 2008)

เมื่อ Xylp คือเบตา-ดี-ไซโลไฟรานอส Glcp A คือ 4-โอ-เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไฟรานอไซลูโรนิกแอซิด และ R คือหมู่อะซิติล (CH_3CO)

2.4.3 ลิกนิน

ลิกนินมีประมาณ 10 - 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง (Hamelinck และคณะ, 2005) พบอยู่ในช่องว่างของผนังเซลล์ระหว่างเซลล์ลูโลสเฮมิเซลล์ลูโลสและเพคติน โดยจะเชื่อมกับ

เฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะโควาเลนต์ ลิกนินจะทำหน้าที่คล้ายกาวในการยึดองค์ประกอบต่างๆ ของ ลิกโนเซลลูโลสเข้าด้วยกัน จึงช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์และต้านทานการบุกรุกของ แมลงและเชื้อโรคต่างๆ (Ritter, 2008) มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 ลักษณะโครงสร้างของลิกนิน (นคร ทิพยาวงศ์, 2553)

2.5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

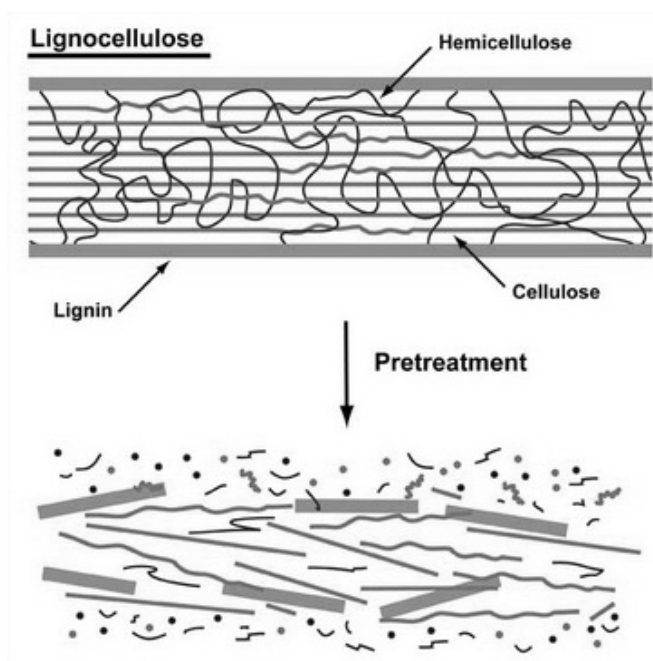
ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมวัตถุดิบ (pretreatment) เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของ เซลลูโลส เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถเข้าถึงและย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น สามารถทำได้ทั้ง วิธีทางเคมี ได้แก่ การย่อยด้วยกรดเจือจาง การย่อยด้วยกรดเข้มข้น และการย่อยด้วยด่าง และ วิธีทางกายภาพ ได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำ เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 2 การทำปฏิกิริยาย่อย (hydrolysis) มี 2 วิธี คือ การใช้กรดหรือการใช้เอนไซม์ ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีมาใช้มากมาย ทั้งทางกายภาพและทางเคมีเพื่อเพิ่มความพรุนของ เนื้อวัตถุดิบปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน การย่อยด้วยกรดจะมี 2 ช่วง ช่วงแรกจะเป็นการย่อย เฮมิเซลลูโลสให้น้ำตาลเพนโตส จากนั้นช่วงที่สองจะเป็นการย่อยเซลลูโลสให้น้ำตาลกลูโคส ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์ จะใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เล็กที่สุด

ขั้นตอนที่ 3 การหมัก (fermentation) ให้เป็นเอทานอลเมื่อวัตถุดิบกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสแล้ว สามารถทำการหมักให้เป็นเอทานอลได้ด้วยการใช้จุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์หรือแบคทีเรียต่อไป

2.5.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ

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



ภาพที่ 2.12 ลักษณะของลิกโนเซลลูโลสหลังจากการปรับสภาพ (Hector และคณะ, 2008)

การปรับสภาพที่ดีต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้ (Sun และ Cheng, 2002)

- (1) เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ในกระบวนการต่อไปได้
- (2) หลีกเลี่ยงการทำลายคาร์โบไฮเดรต
- (3) หลีกเลี่ยงการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวบั่นยั้งกระบวนการย่อยสลายและกระบวนการหมักในภายหลัง
- (4) มีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงจนเกินไป

การปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งได้ 4 วิธีหลักๆ ดังนี้

1. การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) เป็นการลดขนาดและเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบเพื่อให้เอนไซม์สามารถเข้าย่อยสลายได้ดีขึ้น วัตถุดิบสามารถถูกบดให้ละเอียดได้โดยการใช้หลายวิธีรวมกัน คือ การตัด การบด และการโม่โดยปกติภายหลังจากการตัดแล้ววัตถุดิบจะมีขนาด 10 - 30 มิลลิเมตร และหลังจากการบดหรือโม่แล้ววัตถุดิบจะมีขนาด 0.2 - 2 มิลลิเมตร (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) ยังเป็นการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพอีกวิธีหนึ่งที่สามารถแยกสลายเซลลูโลสได้อย่างรวดเร็วโดยใช้อุณหภูมิสูง (Sánchez และ Cardona, 2008) ในการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ หากมีการลดขนาดของวัตถุดิบแล้วตามด้วยการปรับสภาพด้วยวิธีอื่นๆ จะทำให้เกิดการย่อยสลายได้ดีขึ้น ดังนั้นถ้าไม่มีการปรับสภาพก่อนจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ของค่าที่ได้ตามทฤษฎี ในขณะที่หากมีการปรับสภาพก่อนจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงขึ้น 90 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า (Brown, 2003)

2. การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (physico-chemical pretreatment) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีทางกายภาพโดยวิธี steam explosion หรือ autohydrolysis เป็นวิธีที่มีการศึกษามากที่สุด ในกระบวนการนี้จะใช้ไอน้ำที่ความดันสูงทำให้เกิดปฏิกิริยา autohydrolysis (Sánchez และ Cardona, 2008) วิธีนี้จะใช้อุณหภูมิ 160 - 260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69 - 4.83 MPa เป็นเวลาไม่กี่วินาทีจนถึง 2 - 3 นาที ก่อนที่วัตถุดิบจะกลับสู่ความดันบรรยากาศ เมื่อความดันลดลงอย่างรวดเร็วจะทำให้วัตถุดิบนั้นแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (Sun และ Cheng, 2002) ทำให้เฮมิเซลลูโลสเกิดการย่อยสลาย สามารถแยกเซลลูโลสออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายเซลลูโลส ปัจจัยที่ส่งผลต่อการปรับสภาพด้วยวิธี steam explosion คือ ระยะเวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของวัตถุดิบ และปริมาณความชื้น วิธีนี้เป็นหนึ่งในวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับใช้ในการปรับสภาพไม้เนื้อแข็งและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่มีประสิทธิภาพน้อยในไม้เนื้ออ่อน (Sánchez และ Cardona, 2008) การเติมกรดซัลฟิวริก (อาจเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์) หรือคาร์บอนไดออกไซด์ ลงใน steam explosion สามารถเพิ่มการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดการเกิดสารยับยั้ง และสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น (Morjanoff และ Gray, 1987) นอกจากนี้ ammonia fiber explosion (AFEX) จัดเป็นการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์อีกวิธีหนึ่งซึ่งวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจะอยู่ในแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิและความดันสูงเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่ความดันจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Sun และ Cheng, 2002)

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

3.1 การปรับสภาพด้วยกรด แบ่งออกเป็น

3.1.1 การใช้กรดเข้มข้นเช่น กรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริก แม้ว่าจะเป็นสารที่ทำให้เกิดการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี แต่กรดที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษ มีฤทธิ์กัดกร่อนรุนแรง จึงต้องการภาชนะที่ทนต่อการกัดกร่อนได้ นอกจากนี้ยังต้องมีกระบวนการนำกรดเข้มข้นกลับมาใช้ใหม่ภายหลังจากการย่อยสลายแล้วเพื่อให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ (Sivers และ Zacchi, 1995)

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

3.2 การปรับสภาพด้วยต่างวิธีนี้ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำกว่าการปรับสภาพด้วยวิธีอื่นๆ สามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิต่ำแต่ใช้ระยะเวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน การปรับสภาพด้วยต่างเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิว ลดปริมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในชีวมวลโดยทำลายพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลสและพันธะระหว่างลิกนินที่เชื่อมกับคาร์โบไฮเดรต (Balat และคณะ, 2008) สามารถกำจัดลิกนินได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบอื่นๆ (McMillan, 1997) การปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางจะทำให้วัตถุดิบเกิดการบวมพองส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น เกิดการลดลงของ degree of polymerization สามารถแยกลิกนินออกจากคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เป็นการทำลายโครงสร้างของลิกนิน (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การปรับสภาพด้วยต่างอาจใช้แอมโมเนียหรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ได้เช่นกัน

3.3 การกำจัดลิกนินด้วยการออกซิไดซ์ (oxidative delignification) นิยมใช้เป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีความเป็นด่าง (pH 11.5) หรือเรียกว่าอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ เป็นวิธีที่

สามารถละลายส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ และสามารถลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลสลง จากการศึกษาของ Saha และ Cotta (2006, 2007) พบว่า ฟางข้าวสาลีและแกลบที่ได้รับการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ เมื่อถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่ใช้ในการหมักได้ถึง 97 และ 96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และไม่เกิดสารยับยั้งที่เป็นเพอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล

3.4 การใช้โอโซน (ozonolysis) โอโซนสามารถย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ การปรับสภาพด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถกำจัดลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษในกระบวนการ และสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่มีความดันและอุณหภูมิห้อง (Vidal และ Molinier, 1988) แต่ข้อเสียคือ ต้องใช้โอโซนปริมาณมากทำให้กระบวนการนี้มีต้นทุนสูง

3.5 กระบวนการ organosolv เป็นวิธีที่มีการผสมตัวทำละลายอินทรีย์กับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริก เพื่อทำลายลิกนินและพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลส ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการนี้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลีนไกลคอล ไตรเอทิลีนไกลคอล และเตตระไฮโดรเพอร์ฟูรัลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้กรดอินทรีย์ เช่น กรดออกซาลิก กรดอะซิติกซาลิไซลิก และกรดซาลิไซลิก สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการ organosolv ได้เช่นกัน ตัวทำละลายที่ใช้ในกระบวนการนี้ต้องมีการกำจัดออก อาจเป็นการระเหยและควบแน่นเพื่อหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ซึ่งการลดต้นทุนได้ การกำจัดตัวทำละลายออกจากระบบเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากตัวทำละลายเป็นสารยับยั้งกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (Sun และ Cheng, 2002)

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

2.5.2 การย่อยสลาย

การย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลสำหรับใช้ในกระบวนการหมักนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมีโดยการใช้กรด และวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์

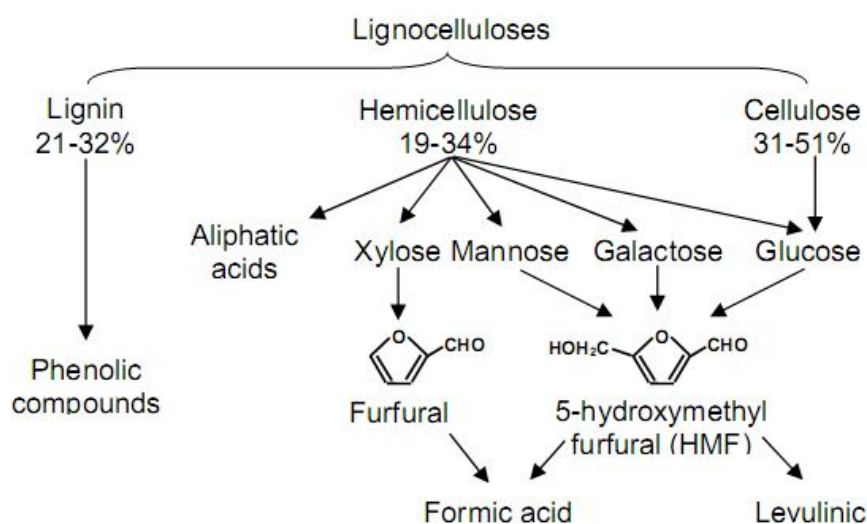
1. การย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมี (chemical hydrolysis) วิธีที่นิยมใช้ คือ การย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis) สามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและกรดเจือจางในการย่อยสลายกรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก การใช้กรดเข้มข้น เช่น กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้องจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่สูงมากถึงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่ได้ตามทฤษฎี แต่การใช้กรดในปริมาณมากนี้จำเป็นที่จะต้องมีการบวนการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ ส่วนการใช้กรดเจือจาง เช่น ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นการที่ใช้ปริมาณของกรดน้อยกว่าแต่ใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลเพียง 55 - 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่ได้ตามทฤษฎีเท่านั้น (Silverstein, 2004) Hamelinck และคณะ (2005) ได้รายงานการเปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลส ดังตารางที่ 2.7 จะเห็นได้ว่าการใช้กรดเจือจางจะใช้อุณหภูมิต่ำกว่าและใช้เวลาน้อยกว่าการใช้กรดเข้มข้น แต่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการใช้กรดเข้มข้นจะมีค่าสูงกว่า

ตารางที่ 2.7 เปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลส

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

ในระหว่างการย่อยสลายด้วยกรด เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินจะถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนสหรือน้ำตาลไซโลส และสารประกอบฟีนอลิก ตามลำดับ ในขณะที่เกิดโมโนเมอร์ชนิดต่างๆ ขึ้นนี้ จะมีการย่อยสลายเกิดขึ้นต่อไปทำให้ได้สารต่างๆ เช่น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (HMF) จากน้ำตาลคาร์บอนหกอะตอม และเฟอร์ฟูรัลจากน้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอม ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จะถูกย่อยสลายกลายเป็นกรดลิวลินิกและกรดฟอร์มิกต่อไป นอกจากนี้กรดอะซิติกยังสามารถถูกปล่อยออกมาจากหมู่อะซิติกที่อยู่ในเฮมิเซลลูโลสได้อีกด้วย ในขณะที่ลิกนินจะถูกย่อยสลายและปล่อยสารประกอบฟีนอลิกออกมา (Purwadi, 2006)

ดังแสดงในภาพที่ 2.13 ผลพลอยได้ต่างๆ ที่เกิดขึ้นมาในระหว่างการย่อยสลายด้วยกรดนี้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการหมักเนื่องจากเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ใช้ในการหมัก



ภาพที่ 2.13 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด (Purwadi, 2006)

2. การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อราและแบคทีเรีย การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปฏิกริยาเกิดขึ้นไม่รุนแรง เป็นการย่อยสลายแบบเฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์กับวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรดกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แสดงดังตารางที่ 2.8 และ 2.9

ตารางที่ 2.8 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรด (Woodward, 1987; Parisi, 1989; Lu และ Mosier, 2004)

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สารเคมีที่ใช้มีราคาถูก	1. ต้องมีการปรับสภาพน้ำตาลให้เป็นกลางก่อนนำไปหมัก (neutralization)
2. เป็นกระบวนการที่ทำได้ง่าย	2. ต้องมีกระบวนการนำกรดกลับมาหมวนเวียนใช้ใหม่
3. วัตถุดิบไม่ต้องผ่านการปรับสภาพ	
4. ปฏิกริยาเกิดเร็ว ใช้เวลาน้อย	

ตารางที่ 2.8 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรด (ต่อ)

ข้อดี	ข้อเสีย
5. ปฏิกริยาเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ (กรณีใช้กรดเข้มข้น)	3. ใช้อุณหภูมิสูง (กรณีใช้กรดอ่อน)
6. ให้ปริมาณน้ำตาลสูง (กรณีใช้กรดเข้มข้น)	4. ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นไม่เฉพาะเจาะจง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์
	5. น้ำตาลที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสารอื่น เช่น เพอร์ฟิวรัล ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก
	6. กรดที่ถูกทิ้งออกมาก่อนทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม
	7. ต้องใช้เครื่องมือที่ทนต่อการกัดกร่อนของกรดได้ซึ่งมีราคาแพง

ตารางที่ 2.9 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Woodward, 1987; Parisi, 1989; Lu และ Mosier, 2004)

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สภาพที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างไม่รุนแรง	1. เอนไซม์มีราคาสูง
2. ปฏิกริยาที่มีความเฉพาะเจาะจงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง	2. นำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ยาก
3. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น	3. ต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน
4. สามารถหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยได้	4. ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถยับยั้งปฏิกริยาที่เกิดขึ้น (product inhibition)
5. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน	5. อาจเกิดการสูญเสียเอนไซม์ไป เนื่องจากถูกดูดซับบนวัสดุที่ไม่ย่อย
	6. เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์
	7. ถ้าระบบมีสารที่ขัดขวางปฏิกริยา เช่น เฮมิเซลลูโลส หรือลิกนิน จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกริยาช้าลง

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส คือ เอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส

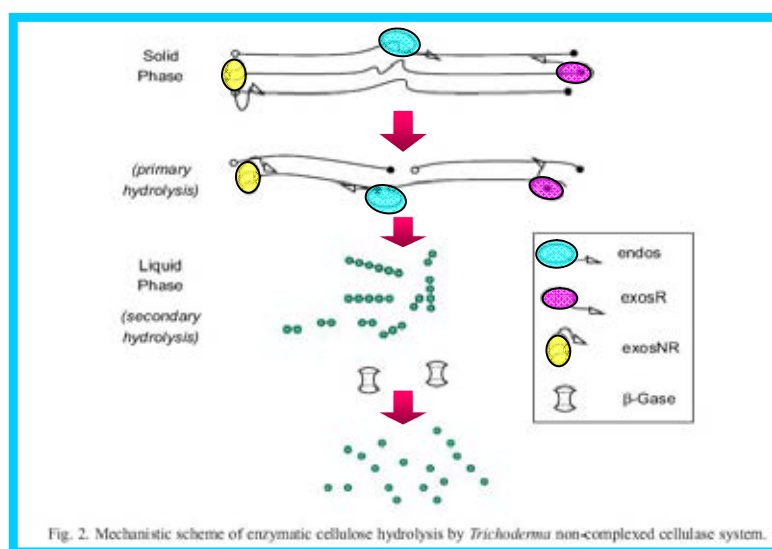
1. เซลลูเลส

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส เรียกว่าเซลลูเลส พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (Complex enzyme) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกันคือ C_x [เอนโดกลูคาเนส (EG หรือ เอนโด-1,4-เบตา-กลูคาเนส หรือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส: EC 3.2.1.4)], C_1 [เอกโซกลูคาเนส (CBH หรือ เอกโซ-1,4-เบตา-กลูคาเนส หรือ เซลโลไบโอไฮโดรเลส: EC 3.2.1.91)] และ เบตา-กลูโคซิเดส (BGL หรือ เซลโลไบเอส: EC 3.2.1.21) ดังแสดงในภาพที่ 2.14 และ 2.15

- เอกโซกลูคาเนส (C_1) จะย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์ไปเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยด้านปลายของสายเซลลูโลส
- เอนโดกลูคาเนส (C_x) จะย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยจะย่อยสลายด้านในของสายเซลลูโลสแบบสุ่ม (Random)
- เบตา-กลูโคซิเดสจะย่อยสลายเซลโลไบโอสเป็นกลูโคส



ภาพที่ 2.14 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส (ดวงกมล ปรุณวิทยา, 2549)



ภาพที่ 2.15 การทำงานของเอนไซม์เชิงซ้อน (complex enzyme) ในการย่อยสลายเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืช โดยจะทำงานร่วมกันในรูปแบบที่เรียกว่า synergistic action (Zhang และ คณะ, 2006)

การทำงานของเซลลูเลสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นจะยับยั้งเบตา-กลูโคซิเดสส่งผลให้ในระบบมีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้นซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส ทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดช้าลงและยุติในที่สุด ได้มีการศึกษาวิธีที่จะลดผลการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว เช่น การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้น การเติมเบตา-กลูโคซิเดสในระหว่างการย่อยสลาย และการนำน้ำตาลออกในขณะที่มีการย่อยสลายด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันหรือใช้กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่อง (SSF) เป็นต้น (Sun และ Cheng, 2002)

เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด อาจเป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ใช้ออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจน (Sun และ Cheng, 2002) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้แสดงในตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้ (Sun และ Cheng, 2002)

จุลินทรีย์	อ้างอิง
เชื้อรา	
<i>Aspergillus</i> spp.	Sternberg(1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)
<i>Penicillium</i> spp.	Sternberg(1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Sternberg(1976); Fan และคณะ (1987); Duff และ Murray (1996)

ตารางที่ 2.10 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้ (ต่อ)

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

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียกับเชื้อรา พบว่าแบคทีเรียผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า (Persson และคณะ, 1991) แบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจนมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำและต้องการสภาวะในการเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาการผลิตเซลลูเลสในทางการค้าจะมุ่งเน้นไปที่เชื้อรา (Duff และ Murray, 1996) เชื้อรา *Trichoderma* สายพันธุ์ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *T. reesei* และสายพันธุ์ที่เป็นมิวแทนต์ เป็นเชื้อที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเซลลูเลส เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสได้ดีเหมาะสำหรับใช้ในการย่อยสลาย (Balat และคณะ, 2008)

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

2. เฮมิเซลลูโลส

เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขาและประกอบด้วยน้ำตาลหลาย ๆ ชนิด ดังนั้น เอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสให้สมบูรณ์จึงมีมากกว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส เอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจะเรียกว่า เฮมิเซลลูเลส ซึ่งได้แก่ แอล-อะลาบีนาเนส, ดี-กลูแลกตาเนส, ดี-แมนนาเนส, ดี-ไซลาเนสและอื่นๆ เป็นต้น โดยทั่วไปเฮมิเซลลูโลสในพืชจะมีโครงสร้างหลักเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วย 1, 4-เบตา-ลิงค์เกจ โดยมี Branch chain เป็นน้ำตาลเพนโทส, เฮกโซสหรือกรดยูโธนิคการย่อยสลายโครงสร้างหลักที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันจะต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ทำงานร่วมกันคือ

- เอนโดไซลาเนส (1, 4-เบตา-ดี-ไซแลน ไซโลโนไฮโดรเลส: EC 3.2.1.8) การเข้าทำการย่อยสลายพันธะเบตา-1, 4-ไกลโคซิดิกในไซแลนของ เบตา-ดี-ไซโลพิลานโซไซด์บริเวณด้านในของสายไซแลนปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อสับสเตอร์จะขึ้นอยู่กับความยาวของสายพอลิเมอร์น้ำตาลไซโลสผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ชนิดนี้คือ ไซโลไบโอส, ไซโลทริโอสและไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์

- เอกไซลาเนส (1, 4-เบตา-ดี-ไซแลน ไซโลโนไฮโดรเลส; EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายไซแลนและไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่มีสายยาวไปเป็นไซโลสได้ดี แต่จะย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่เป็นสายสั้น ๆ ได้น้อย

-เบตาไซโลซิเดส (1, 4-เบตา-ดี-ไซแลน ไซโลไฮโดรเลส: EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่มีสายสั้น ๆ ไปเป็นไซโลส

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสชนิดอื่นๆ ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลส (Shallom และ Shoham, 2003) ได้แก่

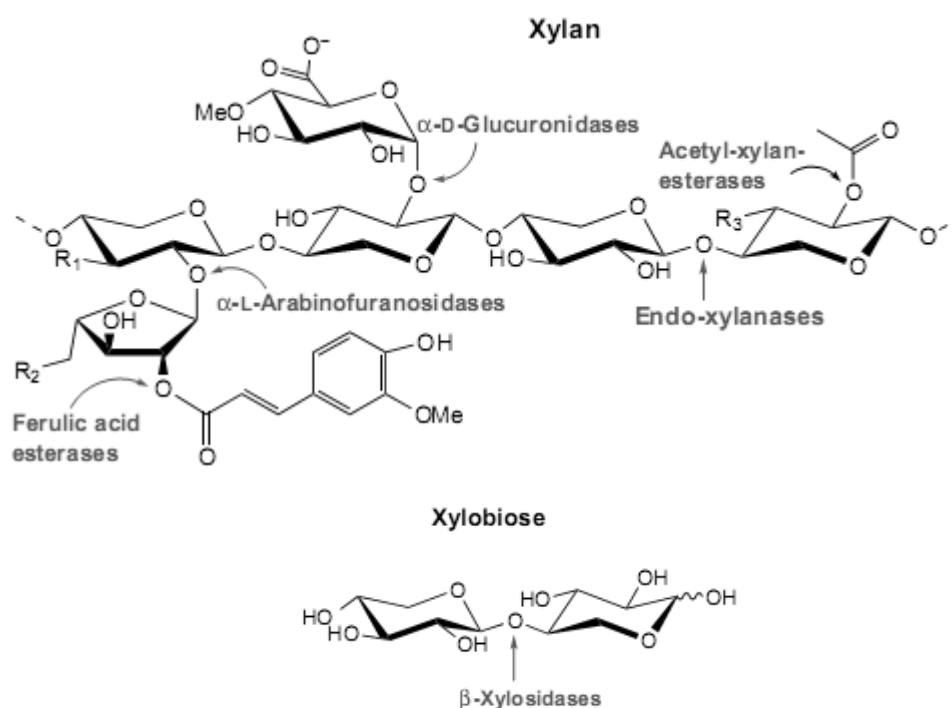
(1) แอลฟา-แอล-อะราบินอฟูรานซิเดส (EC 3.2.1.55) ทำหน้าที่ย่อยสลายหมู่อะราบินโนฟิวรานซิลในเฮมิเซลลูโลส ได้น้ำตาลอะราบินโนสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

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

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

(4) เฟอร์ูโลซิลเอสเทอเรส (EC 3.1.1.73) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างอะราบินโนสกับกรดเฟอร์ูลิก ทำให้เฮมิเซลลูโลสกับลิกนินแยกออกจากกันได้

การทำงานของเอนไซม์แสดงดังภาพที่ 2.16



ภาพที่ 2.16 การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสที่ตำแหน่งต่างๆ ของเฮมิเซลลูโลส (Shallom และ Shoham, 2003)

ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซลานเนสได้แสดงในตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซลานเนสได้

จุลินทรีย์	อ้างอิง
เชื้อรา	
<i>Aspergillus caespitosus</i>	Guimarães และคณะ (2006)
<i>A. niger</i>	Guimarães และคณะ (2006)
<i>A. phoenicis</i>	Guimarães และคณะ (2006)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Tanaka, Muguruma และ Ohta (2006)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Christakopoulos และคณะ (1996)
<i>Neurospora. crassa</i>	Guimarães และคณะ (2006)
<i>Paecilomyces variotii</i>	Guimarães และคณะ (2006)

ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซลาลเนสได้ (ต่อ)

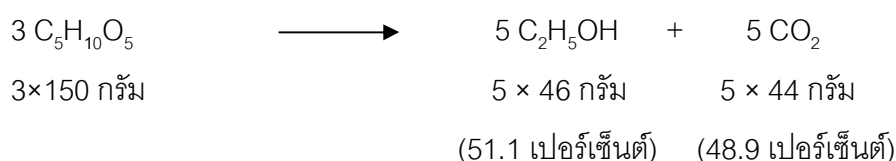
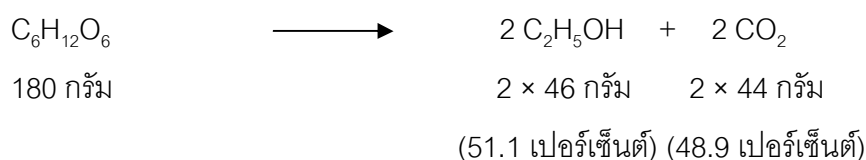
จุลินทรีย์	อ้างอิง
เชื้อรา	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Belancic และคณะ (1995)
<i>T. reesei</i>	Guimarães และคณะ (2006)
แบคทีเรีย	
<i>Bacillus circulans</i> D1	Bocchini และคณะ (2005)
<i>Bacillus</i> sp. strain K-1,	Ratanakhanokchai, Kyu และ Tanticharoen (1999)
แอคติโนมัยซีต	
<i>Streptomyces caelestis</i> SN83	Ninawe และ Kuhad (2005)
<i>S.cyaneus</i> SN32	Ninawe และ Kuhad (2005)
<i>S. tendae</i> SN77	Ninawe และ Kuhad (2005)
<i>Thermomonospora curvata</i>	Stutzenberger (1994)

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

2.5.3 กระบวนการหมัก

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

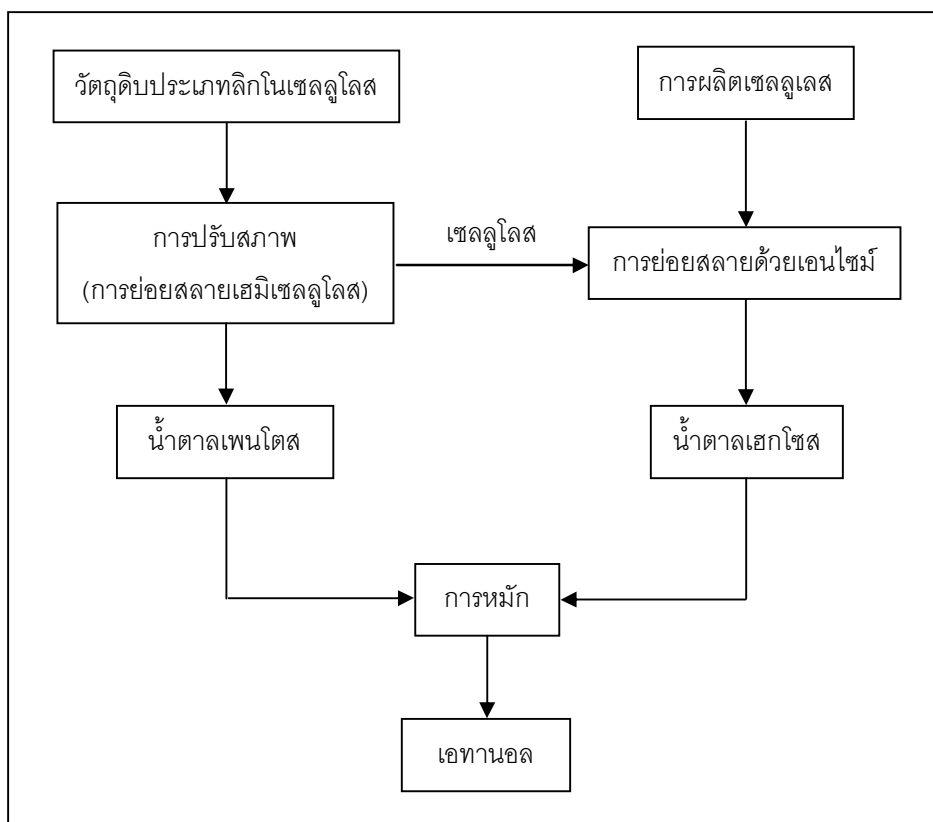
ในทางทฤษฎียีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสและไซโลสไปเป็นเอทานอลได้ 51.1 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซ็นต์ ดังสมการ



แต่ในทางปฏิบัตินั้นจะได้เอทานอลอยู่ในช่วงไม่เกิน 90 - 95 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี เนื่องจากยีสต์จะนำน้ำตาลบางส่วนไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต และเปลี่ยนเป็นผลผลิตพลอยได้อื่นๆทำให้เอทานอลที่ได้มีค่าต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎีเสมอ โดยในการหมักน้ำตาลด้วยยีสต์จะได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังนี้ เอทานอล 48.4 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ 46.5 เปอร์เซ็นต์ อะซิทัลดีไฮด์ 0 - 0.03 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 0.05 - 0.25 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 2.5 - 3.6 เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติก 0 - 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดซัคซินิก 0.5 - 0.77 เปอร์เซ็นต์ ฟิวเซลอยล์ 0.25 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเพอร์ฟูรัลจำนวนเล็กน้อย (Paturau, 1969)

ในกระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่

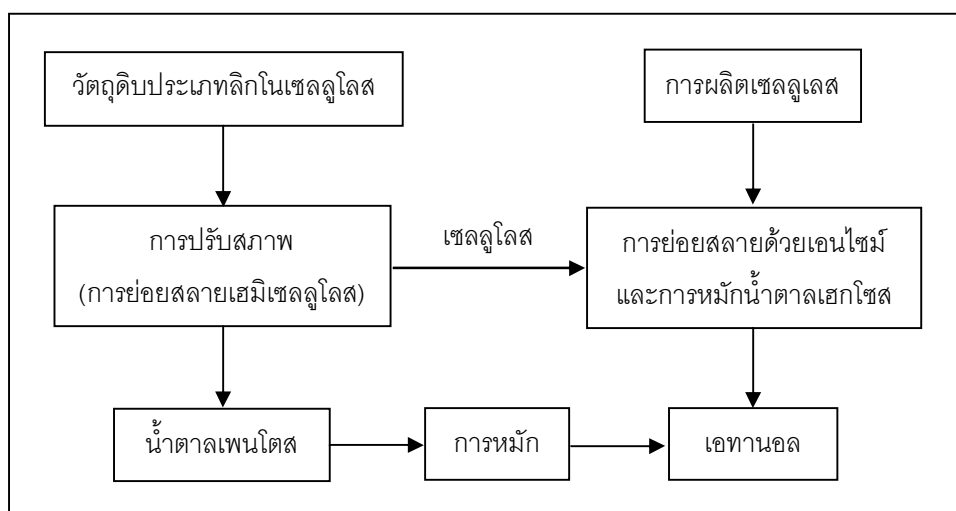
(1) กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (separate hydrolysis and fermentation: SHF) เป็นกระบวนการที่มีการแยกขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และการหมักออกจากกัน เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโตสตามลำดับ แล้วค่อยนำเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป ซึ่งอาจเป็นการหมักแบบแยกกันหรือหมักแบบร่วมกันก็ได้ ดังตัวอย่างขั้นตอนที่แสดงในภาพที่ 2.17 ข้อดีของกระบวนการนี้คือ การย่อยสลายและการหมักสามารถเกิดได้ในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกระบวนการ แต่ข้อเสียคือ เซลลูเลสจะถูกยับยั้งได้ด้วยกลูโคสและเซลโลไบโอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Hahn-Hägerdal และคณะ, 2006)



ภาพที่ 2.17 กระบวนการ SHF

Gupta และคณะ (2009) ได้ศึกษาการใช้ *Prosopis juliflora* หรือ Mesquite ซึ่งเป็นไม้พุ่มผลัดใบ มีหนาม อายุหลายปี มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SHF โดยมีการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นในส่วนไฮโดรไลเซตด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ส่วนของแข็งที่เหลือซึ่งเป็นเซลลูโลสจะนำไปกำจัดลิกนินด้วยโซเดียมซัลไฟด์และโซเดียมคลอไรด์ แล้วนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือ เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *T. reesei* (ATCC26921) ซึ่งมีแอกทิวิตีเป็น 6.5 FPU/มิลลิกรัมของเอนไซม์ และเบตา-กลูโคซิเดส (Novozyme188) ที่ผลิตจาก *A. niger* ซึ่งมีแอกทิวิตีเป็น 250 ยูนิต/กรัมของเอนไซม์ จากนั้นนำไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 18.24 กรัม/ลิตร ไปหมักโดยใช้ *P. stipitis* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 37.47 กรัม/ลิตร ไปหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 7.13 และ 18.52 กรัม/ลิตรหรือคิดเป็น 0.39 และ 0.49 กรัม/กรัมของน้ำตาลตามลำดับ

(2) กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่อง (simultaneous saccharification and fermentation: SSF) ซึ่งเป็นกระบวนการที่รวมเอาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์กับการหมักน้ำตาลกลูโคสเข้าไว้ด้วยกัน สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้อย่างต่อเนื่อง ทำให้ลดการสะสมของน้ำตาลซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้จึงมีผลผลิตของเอทานอลสูงกว่ากระบวนการ SHF (Wyman และคณะ, 1992) ตัวอย่างกระบวนการ SSF แสดงในภาพที่ 2.18

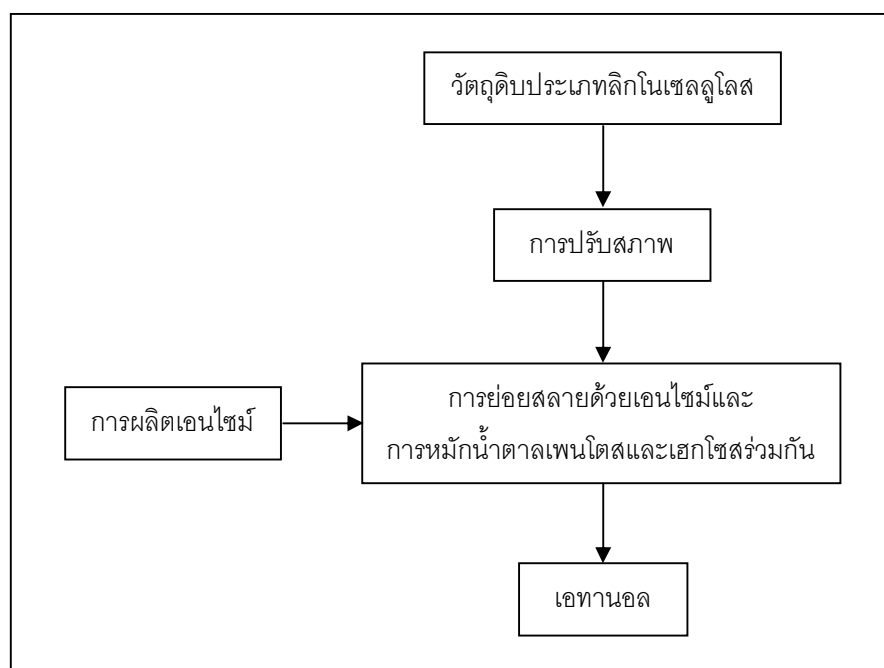


ภาพที่ 2.18 กระบวนการ SSF

Chang และคณะ (2001) ได้นำหญ้าสวิตช์คอร์นสโตเวอร์และไม้ปอพลาร์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยปฏิกิริยาเคมีมาใช้ในกระบวนการ SSF ที่มีการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสทางการค้า (Spezyme-CP) ซึ่งมีแอกติวิตี 59 FPU/มิลลิลิตร ร่วมกับการหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* พบว่าได้ปริมาณเอทานอลเป็น 72, 62 และ 73 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎีตามลำดับ

Linde และคณะ (2008) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธี steam explosion โดยมีการเติมกรดซัลฟิวริกเจือจางลงไป ในการหมักด้วยกระบวนการ SSF จะใช้เอนไซม์ทางการค้าคือ Celluclast 1.5 ลิตร (เซลลูเลส) และ Novozyme188 (เบตา-กลูโคซิเดส) ในการย่อยสลายร่วมกับการหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* พบว่าได้ผลผลิตเป็น เอทานอล 13.2 กรัมต่อฟางข้าวสาลี 100 กรัม หรือคิดเป็น 67 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

(3) กระบวนการย่อยสลายและหมักร่วมกันแบบต่อเนื่อง (simultaneous saccharification and co-fermentation: SSCF) เป็นกระบวนการที่พัฒนามาจาก SSF แต่แตกต่างกันตรงที่ได้รวมเอาการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์กับการหมักน้ำตาลเฮกไซสและเพนโตสเข้าไว้ด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.19



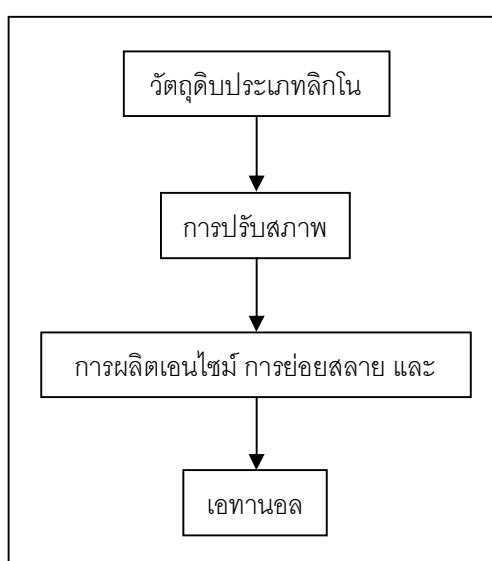
ภาพที่ 2.19 กระบวนการ SSCF

Wayman และคณะ (1987) ได้ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยกระบวนการ SSCF ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากไม้เนื้อแข็ง คือ ต้น aspen และไม้เนื้ออ่อน จำพวกสน โดยใช้เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสในการย่อยสลายร่วมกับการใช้ *P. stipitis* และ *Brettanomyces clausenii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสได้ พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลเป็น 369 และ 360 ลิตรต่อตันของวัตถุดิบที่ใช้หรือคิดเป็น 76 และ 75 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

Kim และ Lee (2005) ได้ศึกษาการหมักเอทานอลจากคอร์นสโตเวอร์ โดยใช้การปรับสภาพด้วยวิธี soaking in aqueous ammonia (SAA) แล้วนำไปเข้าสู่กระบวนการ SSCF โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสลายกลูแคนและไซแลน คือ เซลลูเลส (Spezyme-CP) ซึ่งมีแอกทิวิตีของไซลาเนสอยู่ด้วย และเบตา-กลูโคซิเดส (Novozyme188) ร่วมกับการใช้ recombinant

E. coli (KO11) ที่มีความสามารถในการหมักทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลสผลที่ได้พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลเป็น 77 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

(4) กระบวนการเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสไปเป็นเอทานอลด้วยจุลินทรีย์โดยตรง (consolidated bioprocessing: CBP หรือเรียกว่า direct microbial conversion: DMC) เช่น การใช้ *C. thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถทั้งในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลและนำน้ำตาลไปหมักเป็นเอทานอลได้ ดังแสดงขั้นตอนในภาพที่ 2.20



ภาพที่ 2.20 กระบวนการ CBP หรือ DMC

เมื่อเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของกระบวนการผลิตเอทานอลทั้ง 4 วิธี จะสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.12 ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการ SHF, SSF และ CBP

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

2.5.4 การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว

ฟางข้าวเป็นผลิตผลพลอยได้ทางการเกษตรที่มีมากในประเทศไทยซึ่งองค์ประกอบของฟางข้าวจะมีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส 39 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 27 เปอร์เซ็นต์และลิกนิน 12 เปอร์เซ็นต์ (Kaur และคณะ, 1997) ซึ่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยต่างหรือเอนไซม์แล้วจะได้น้ำตาลที่สามารถนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์แล้วให้ผลผลิตเป็นเอทานอลได้

Yoswathana และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษากระบวนการหมักเอทานอล โดยใช้วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีและย่อยสลาย

ด้วยเอนไซม์ร่วมกับการหมักด้วย *S. cerevisiae* ซึ่งผลการทดลองพบว่า สามารถเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลได้ 55-65 เปอร์เซ็นต์ และมีเอทานอลเกิดขึ้นในวันที่ 3 ของการหมัก สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.69 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ระยะเวลาการหมัก 6 วัน นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยหลายท่านที่ศึกษาวิธีการปรับสภาพฟางข้าวที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลมากขึ้น

Chadha และคณะ (1995) ได้ศึกษาวิธีการปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้วิธีการ physicochemical pretreatment ซึ่งใช้สารประกอบ oxidizing agent, peracetic acid, alkali-peroxide และ manganese-peroxide ในการทดลอง พบว่า วิธีการปรับสภาพโดยใช้ alkali-peroxide มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนองค์ประกอบของฟางข้าวไปเป็นน้ำตาล เมื่อใช้ร่วมกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยการศึกษาครั้งนี้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 2.9 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

2.5.5 ยีสต์ทนร้อน

การใช้ยีสต์ทนร้อนในกระบวนการผลิตเอทานอลกำลังได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง เพราะยีสต์ทนร้อนสามารถเจริญได้ดีในกระบวนการหมักของประเทศในเขตร้อน (Ueno และคณะ, 2002) และการใช้ยีสต์ทนร้อนในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลนั้นจะส่งผลถึงต้นทุนการผลิต เนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้กระบวนการหล่อเย็นเพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งค่าใช้จ่ายในกระบวนการหล่อเย็นมีต้นทุนสูง ดังนั้นการใช้ยีสต์ทนร้อนในกระบวนการผลิตสามารถลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการหล่อเย็นและกระบวนการกลั่นลงได้ (Sree และคณะ, 1999) การนำยีสต์ที่ไม่มีความสามารถในการทนร้อนมาใช้ในกระบวนการหมักซึ่งมีอุณหภูมิสูงนั้นเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก เพราะอุณหภูมิสูงจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Anderson และคณะ, 1986) เนื่องจากยีสต์ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 28-38 องศาเซลเซียส ดังนั้นกระบวนการผลิตเอทานอลในถังหมักส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาของ Anderson และคณะ (1986) พบว่ายีสต์ทนร้อนสามารถเพิ่มผลผลิตของเอทานอลได้มากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ยีสต์ทนร้อนที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางคือ *Kluyveromyces* โดย Kurtzman และ Fell (1997) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Kluyveromyces* spp. พบว่ามีลักษณะเซลล์เป็นรูปไข่ ทรงรี และทรงกระบอก ซึ่งแสดงดังภาพที่ 2.21



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.21 ลักษณะเซลล์ของยีสต์ (ก) *Kluveromyces marxianus* (ข) *K. lactis*

จากการศึกษาของ Hacking และคณะ (1984) พบว่า *Kluveromyces* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส Banat และคณะ (1992) ทำการคัดกรองยีสต์สายพันธุ์ *Kluveromyces* sp. และ *K. Marxianus* จากตัวอย่างดินซึ่งเจริญเติบโตและเกิดกระบวนการหมักได้ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส มีการรายงานว่ายีสต์สายพันธุ์ *K. marxianus* IMB3 สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสในอาหารที่มีกลูโคส เซลโลไบโอส (Barron และคณะ, 1994) ซูโครส (Flaming และคณะ, 1993) และ แล็กโทส (Brady และคณะ, 1994) และจากการศึกษาของ Brady และคณะในปี 1994 พบว่าเมื่อ *K. marxianus* IMB3 เจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 8.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 83 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์ 1	(Whatman, England)
กระบอกฉีดยา (Syringe, 3 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร)	(Nipro, Thailand)
กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200	(Olympus, Japan)
เข็มฉีดยา (Needle, 18Gx1)	(Nipro, Thailand)
ครุฑิเบิลชนิด sintered glass crucible	(ROBU, Germany)
เครื่อง Gas chromatography รุ่น GC-2010A	(Shimadzu, Japan)
เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก (hotplate stirrer) รุ่น PC-420	(Corning, USA)
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) รุ่น VS-8480SFN	(Vision Scientetic, Korea)
เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) รุ่น KMC-1300V	(Vision Scientetic, Korea)
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 1000C	(Precisa, Switzerland)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น AG285	(Mettler Toledo, USA)
เครื่องดูดสุญญากาศ (suction pump) รุ่น DOA-V502-BN	(GAST, USA)
เครื่องปั่น (blender)	(Moulinex, France)
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Universal 32R	(Hettich, Germany)
เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (Waterbath)	(Mettler, Germany)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate Spectrophotometer)	(ANTHOS Zenyth 200, USA)
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น PP-50	(Sartorius, Germany)

เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader)	
รุ่น Zenyth 200 rt	(Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography)	(GC-2010A Shimadzu, Japan)
ตะแกรงร่อน (test sieve) ขนาดรู มีลลิเมตร 0.4	(ไ้้วฮวดหญ่, ประเทศไทย)
ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น Clean model: BC	(แลบเซอร์วิส, ประเทศไทย)
ตู้บ่มเชื้อ (incubater)	(EHRET, Germany)
ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	(Mettler, Germany)
เตาเผาถ้ำ (muffle furnace)	(Fisher scientific, USA)
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor)	(Gibthai, Thailand)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SA-500K	(Sturdy industrial, Taiwan)
อ่างน้ำควบคุมความเย็น (cooling bath)	(ซัซริย์โฮลดิ้ง, ประเทศไทย)
อุปกรณ์รีฟลักซ์	(เอ็น เค ซัพพลาย, ประเทศไทย)

เคมีภัณฑ์

กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)	(Labscan, Ireland)
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	(Merck, Germany)
กลาเซียลอะซิติกแอซิด (CH_3COOH)	(BDH, England)
กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	(Fisher scientific, UK)
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	(Univar, Australia)
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	(Merck, Germany)
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	(Univar, Australia)
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	(Scharlau, Spain)
ซिटริกแอซิดโมโนไฮเดรต ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	(Univer, Australia)
ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4)	(Merck, Germany)
ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$)	(BDH, England)
เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)	
($C_{19}H_{42}BrN$)	(Acros, USA)
เซลลูโลส	(Sigma Chemical, USA)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Univar, Australia)
โซเดียมคาร์บอเนต(Na_2CO_3)	(Scharlau, Spain)
โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3)	(Merck, Germany)
โซเดียมเตตระโบรมาเตอะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	(Univar, Australia)
โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	(Univar, Australia)
โซเดียมลิวริลซัลเฟต ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$)	(Carlo Erba, Italy)
โซเดียมไฮดรอกไซด์) NaOH)	(Univar, Australia)
โซลานอส	(Fluka, Switzerland)
ไซแลน (birchwood xylan)	(Sigma Chemical, USA)
ไซโลส ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$)	(Fluka, Switzerland)
เดคะไฮโดรแนพทาลีน ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}$)	(Carlo Erba, Italy)
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (Na_2HPO_4)	(Carlo Erba, Italy)
3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$)	(Fluka, Switzerland)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	(Scharlau, Spain)
ไตรโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	(Univar, Australia)
เทอร์เชียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ ($(\text{CH}_3)_3\text{COH}$)	(Carlo Erba, Italy)
เปปโติน (peptone from casein)	(Scharlau, Spain)
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	(Merck, Germany)
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{O}_2\text{H}$)	(Univar, Australia)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Univar, Australia)
โพแทสเซียมเปอร์แมงกานेट (KMnO_4)	(Univar, Australia)
โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK)	(Univar, Australia)
1-โพรพานอล ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$)	(Carlo Erba, Italy)
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	(Univar, Australia)
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	(Univar, Australia)
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	(Univar, Australia)
วุ้นผง (agar)	(วุ้นบริสุทธิ์, ประเทศไทย)
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	(Hi media, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Bio Basic Inc., Canada)
ออกซาลิกแอซิดไดไฮเดรต ($(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	(Carlo Erba, Italy)

อะซิโตน (C_3H_6O)	(Burdick & Jackson, Korea)
2- เอทอกซีเอทานอล ($C_4H_{10}O_2$)	(Carlo Erba, Italy)
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (C_2H_5OH)	(องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol)	(Merck, Germany)
เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดไฮเดรียมไดไฮเดรต ($C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot 2H_2O$)	(Amresco, USA)
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	(Scharlau, Spain)
แอลฟา-เซลลูโลส	(Sigma Chemical, USA)
ไฮดรอกไซด์ไนเตรตไนอะไฮเดรต ($Fe(NO_3)_2 \cdot 9H_2O$)	(Univar, Australia)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	(Fisher scientific, UK)

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

เก็บตัวอย่างทราย ตัวอย่างดิน ตัวอย่างกากอ้อย และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่าง จากจังหวัด ชลบุรี กาญจนบุรี และนครราชสีมา ตามลำดับ จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างใส่ ถุงพลาสติกที่สะอาด ดังนี้

1. ตัวอย่างทรายจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างจากชายหาดของ เกาะซึ่งขุดลึกลงไป 10 เซนติเมตรในบริเวณที่ต่างกัน 8 จุด
2. ตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี ทำการเก็บตัวอย่างดินซึ่งขุดลึกลงไป 10 เซนติเมตรในบริเวณที่ต่างกัน 3 จุด
3. กากอ้อยจากโรงงานน้ำตาลนครบุรี จังหวัดนครราชสีมา โดยทำการเก็บตัวอย่างจาก กองกากอ้อยที่เหลือจากการหีบนำออกและเก็บไว้เป็น เวลานานไม่เกิน 3 เดือนทำการ เก็บตัวอย่างกากอ้อยซึ่งขุดลึกลงไป 10 เซนติเมตรจำนวนทั้งสิ้น 3 ตัวอย่าง
4. น้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KRU40 จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณ) จังหวัดนครราชสีมาโดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างคั้นสด เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทั้งนี้เพื่อรักษาคุณภาพของตัวอย่าง

3.2 คัดกรองยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล

3.2.1 คัดกรองยีสต์ทั้งหมด

คัดกรองยีสต์โดยชั่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมา 10 กรัม ใส่ลงในสารละลายไซโตียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ทำ serial dilutions จากนั้นปิเปตความเจือจางที่เหมาะสมมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยทั่วผิวหน้าอาหาร yeast extract-malt extract (YM) agar (Laplace และคณะ, 1993) (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร มาเชื่อมบนอาหารชนิดเดิม เพื่อแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

3.2.2 คัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล

3.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (starter culture)

นำยีสต์ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.2.1 เลี้ยงใน YM medium นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลายไซโตียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4

3.2.2.2 การคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลส

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารไซโลส (xylose medium) (ภาคผนวก ก) บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.2.3 คัดกรองยีสต์ทนร้อน

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารไซโลสนำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อวัดการเจริญเติบโต ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน

ใช้อาหารไซโลสซึ่งปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารให้เท่ากับ 5.5 ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน โดยถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารไซโลส นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1960) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) รุ่น GC-2010A (Shimadzu, Japan)

3.4 การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารไซโลสนำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อวัดการเจริญเติบโต ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography)

3.5 ผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ทนร้อนที่คัดกรองได้ในถังปฏิกรณ์

ชีวภาพขนาด 5 ลิตรโดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิต

3.5.1 ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในงานวิจัย

3.5.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างฟางข้าวจากจังหวัดสุรินทร์ นำตัวอย่างฟางข้าว ที่ได้มาล้างให้สะอาด และนำไปปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพต่อไป

3.5.1.2 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ

นำฟางข้าวไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นตัดให้มีขนาดเล็กกลง บดด้วยเครื่องปั่นและเครื่องบดละเอียดตามลำดับ แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรง

ร้อนที่มีรูขนาด 0.4 มิลลิเมตร จนได้เป็นผงออกมาซึ่งจะนำไปใช้ ในการทดลองต่อไป สำหรับส่วนที่อยู่บนตะแกรงร้อนจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของชีวมวลพืชลักษณะของฟางข้าวที่ผ่านการการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพแล้วแสดงดังภาพที่ 3.1



(ก)

(ข)

ภาพที่ 3.1 ลักษณะฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ

(ก) ฟางข้าวที่นำไปใช้ในกระบวนการหมัก

(ข) ฟางข้าวนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของชีวมวลพืช

3.5.1.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมี

นำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพในข้อ 3.5.1.2 จนได้เป็นผงมาปริมาณ 0.6 กรัม ใส่ลงไปในพลาสติกขนาด 200 มิลลิลิตร ทำการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้วิธี alkaline peroxide pretreatment (Saha และ Cotta, 2007) โดยเติมอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ pH 11.5 ลงไปในพลาสติกการเตรียมเติมอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์สำหรับเติมใน 1 พลาสติก จะใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร (15 เปอร์เซ็นต์โดยมวลของพืชที่ใช้/ปริมาตรของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์) แล้วปรับ pH ให้เป็น 11.5 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นก่อนนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต่อไป

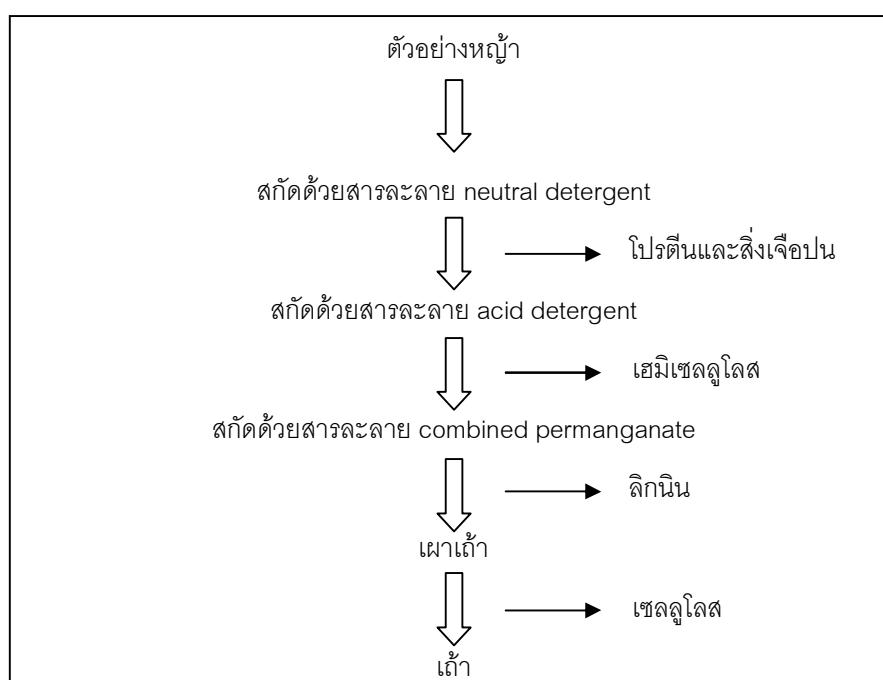
3.5.1.4 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

เติมเซลลูเลสจำนวน 18 ยูนิต (คิดเป็น 30 ยูนิต/กรัมของวัตถุดิบ) ไชลานเนสจำนวน 10.8 ยูนิต (คิดเป็น 18 ยูนิต/กรัมของวัตถุดิบ) (ดัดแปลงมาจาก Saha และ Cotta, 2007) และสารละลายโซเดียมซิทเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8

(ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปในพลาสติกที่มี หญ้าและพลาสติกที่เป็น ชุดควบคุมซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีในข้อ 3.5.1.3 นำไปป้อนในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.5.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

นำฟางข้าวที่บดและร่อนเอาส่วนละเอียดออกไปแล้วมาหาปริมาณองค์ประกอบของ ชีวมวลพืชตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) ดังแสดงในภาคผนวก ค วิเคราะห์หาค่าต่างๆ คือ ปริมาณ neutral detergent fiber (NDF) ปริมาณ acid detergent fiber (ADF) ปริมาณ permanganate lignin (PML) และปริมาณเถ้า เพื่อนำไปคำนวณหา ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของชีวมวลพืช โดยหญ้าแต่ละชนิดจะวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

3.5.2 การผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

3.5.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยมียีสต์ 2 ชนิด คือ

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

3.5.2.2 การเก็บรักษาเชื้อ

ถ่ายเชื้อโดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อมาลากลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สูตร YMA (Laplace และคณะ, 1993) ดังแสดงในภาคผนวก ก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุก 3 เดือน

3.5.2.3 การศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

1. การศึกษาการเจริญของเชื้อ *P. stipitis*

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารไซโลส บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเก็บตัวอย่างทุกๆ หนึ่งชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญเติบโต ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2. การศึกษาการเจริญของยีสต์ที่ร้อน

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารไซโลส บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเก็บตัวอย่างทุกๆ หนึ่งชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญเติบโต

3.5.2.4 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีก่อนใช้ในกระบวนการ SSF

นำฟางข้าวที่บดเป็นผงแล้วมา 21 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 2 ลิตรทำการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีตามข้อ 3.5.1.3 ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นก่อนนำไปใช้ในการหมักต่อไป

3.5.2.5 การเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์

เทฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีในข้อ 3.5.1.3 ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมสารอาหารลงไปโดยเติมสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 6 กรัม สารสกัดจากมอลต์ปริมาณ 6 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 10 กรัม โดยละลายในสารละลายไซเดียมซัลเฟต

บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,800 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปิดฝาถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.2.6 การเตรียมเอนไซม์

ใช้เซลลูเลสและไซลาเนสทางการค้า คือ Sigma C2730 และ Fluca 95595 ตามลำดับโดยเซลลูเลสมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไซลาเนสมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 296.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งวิธีการหากิจกรรมของเอนไซม์แสดงดังภาคผนวก ง นำเอนไซม์แต่ละชนิดที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสารเพื่อให้ปลอดเชื้อ โดยใช้เซลลูโลสอะซิเตตเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน เป็นตัวกรอง

3.5.2.7 การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยกระบวนการ SSF

3.5.2.7.1 การเลี้ยงกล้าเชื้อ

เลี้ยงกล้าเชื้อ *P. stipites* และยีสต์ทนร้อน โดยเลี้ยงเชื้อตามอายุที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3.5.2.3 จากนั้นถ่ายยกกล้าเชื้อชนิดละ 200 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ได้จากข้อ 3.5.2.5

3.5.2.7.2 การเติมเอนไซม์

เติมเซลลูเลสและไซลาเนสที่ผ่านการกรองแล้วปริมาณ 630 และ 378 ยูนิต ตามลำดับ ลงไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นนำถังปฏิกรณ์ชีวภาพไปต่อกับจอบควบคุม โดยตั้งค่าใบพัดให้มีความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ตั้งอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสสำหรับ *P. stipites* และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสำหรับยีสต์ทนร้อน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 8 วัน โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแสดงดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 ถึงปฏิกิริยชีวภาพที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

3.5.2.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เก็บตัวอย่างในข้อ 3.5.2.7.2 มาวิเคราะห์ โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดโดยใช้วิธี DNS method (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959) นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท เติมสารละลาย DNS reagent ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับแบลนด์ คือ ใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง จากนั้นปิดฝาไมโครเพลทแล้วนำไปป้อนในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการเจือจางสารในไมโครเพลทดังกล่าวก่อนที่จะนำไปวัด โดยดูดสารนั้นขึ้นมา 50 ไมโครลิตร นำไปใส่ไมโครเพลทอีกอัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไป แล้วผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 - 2.0 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาคผนวก จ

3.6 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก

ในกระบวนการหมัก ตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร จะถูกเก็บที่แต่ละช่วงเวลาของการหมัก เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตของเอทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-2010A Shimadzu, Japan) ด้วยคอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) อุณหภูมิคอลัมน์ หัวฉีด (Injector) และตัวตรวจจับ (Detector) เท่ากับ 45, 250 และ 260 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวนำ (carrier gas) ผลผลิตรวมของผลิตภัณฑ์คำนวณออกมาเป็นกรัมต่อลิตร

3.7 การบ่งชี้สายพันธุ์ยีสต์ที่ร้อน

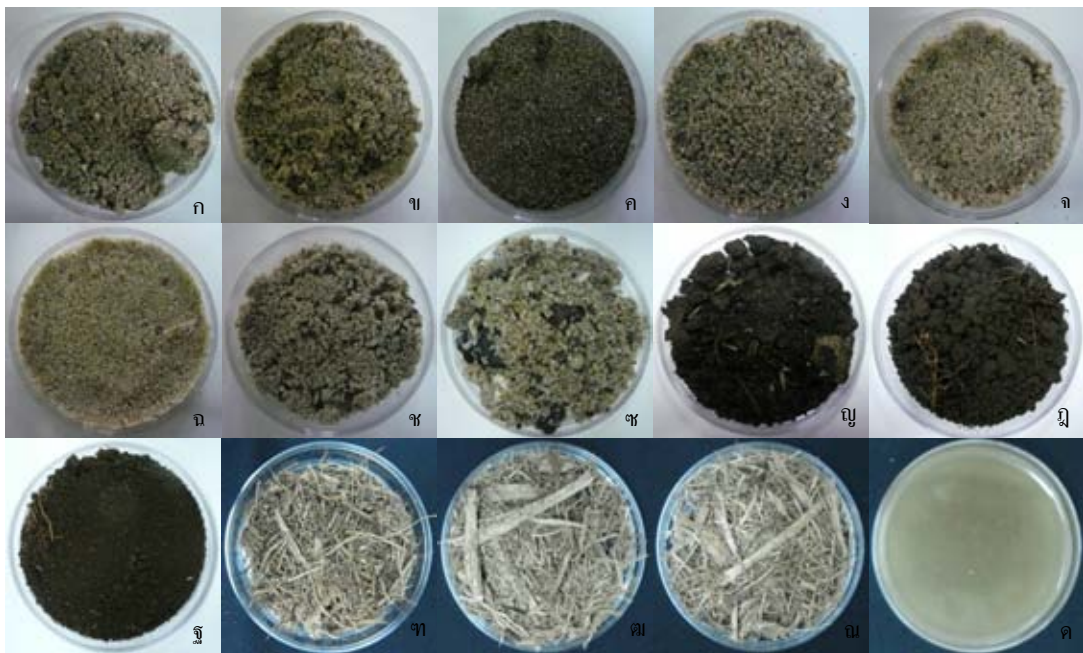
นำยีสต์ที่ร้อนที่สามารถคัดกรองได้ทำการบ่งชี้สายพันธุ์ตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 ของ Large subunit (LSU) rDNA gene และนำไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank โดย Blast Homology Search Program for Nucleotide (BLASTn) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ยีสต์ที่ร้อนมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank โดย multiple alignment-program CLUSTAL_X version 1.81 (Thompson และคณะ, 1997) สร้าง phylogenetic tree จาก evolutionary distance data ด้วย Kimura's two-parameter correction (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou และ Nei, 1987) ความเชื่อมั่นประเมินจาก bootsrap analysis 1000 ซ้ำ

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างทรายจากเกาะเสม็ดสาร จังหวัดชลบุรี จำนวน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างกากอ้อยจาก โรงงานน้ำตาลครบุรี อําเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานจากไร่สุวรรณ อําเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยลักษณะของตัวอย่างแต่ละชนิดแสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ

ก-ข : ตัวอย่างทรายที่เก็บจากเกาะเสม็ดสาร จังหวัดชลบุรี

ญ-ฐ : ตัวอย่างดินที่เก็บมาจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

ฑ-ณ : ตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บมาจากโรงงานน้ำตาลครบุรี อําเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

ด : ตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างที่เก็บมาจากไร่สุวรรณ อําเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการคัดกรองยีสต์ต่อไป

4.2 การคัดกรองยีสต์ที่ร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล

การคัดกรองยีสต์ที่ร้อนจากตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารไซโลส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถคัดกรองยีสต์ได้ทั้งหมด 73 ไอโซเลท โดยจำนวนของยีสต์ที่คัดกรองได้ทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 4.1 ซึ่งลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายจากเกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี จำนวน 8 ตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 4.2 และลักษณะของยีสต์ที่คัดกรองได้แสดงดังภาพที่ 4.2 สามารถคัดกรองยีสต์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท มี 12 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารไซโลส

ตารางที่ 4.1 จำนวนยีสต์ทั้งที่สามารถคัดกรองได้จากตัวอย่าง

แหล่งที่มา	จำนวนยีสต์ทั้งหมด
เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี	20
เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี	28
โรงงานน้ำตาลนครบุรี จังหวัดนครราชสีมา	20
ไร่อุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา	5
รวม	73

ตารางที่ 4.2 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของ ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายจากเกาะเสม็ดสาร จังหวัดชลบุรี

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยา						การเจริญในอาหารไฮโดลิส
	เส้นผ่านศูนย์กลาง	รูปร่าง (Form)	ระดับความนูน (Elevation)	ลักษณะผิวหน้า (Surface)	ขอบ (Margin)	สี	
KCH 1-42	0.5	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
KCH 086-41-1	0.8	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ
KCH 086-41-2	0.3	circular	flat	smooth	entire	yellow	ไม่เจริญ
KCH 086-3-1	0.1	circular	convex	smooth	entire	orange	ไม่เจริญ
KCH 086-8-1	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
KCH 086-6-2	1.0	circular	convex	rough	undulate	white	เจริญ
KCH 086-2-1	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
KCH 086-41	0.9	circular	convex	rough	undulate	white	เจริญ
KCH 086-40-1	0.3	circular	convex	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
KCH 086-40-2	0.6	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
SRY 19-3-2	0.6	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
SRY 19-3-3	0.9	circular	flat	rough	entire	ping	เจริญ
SRY 4-3	0.5	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ
SRY 6-2	1.0	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ
SRY 3-2	0.4	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ
SRY 3-3	0.3	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ
SRY 6-3	0.1	circular	flat	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
SRY 14-3	0.3	circular	flat	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
SRY 19-3	0.2	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ
SRY 19-3-3	0.4	circular	flat	smooth	entire	white	ไม่เจริญ



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลขที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายที่เก็บจากเกาะเสม็ดสาร จังหวัดชลบุรี

ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 4.3 และลักษณะของยีสต์ที่คัดกรองได้แสดงดังภาพที่ 4.3 สามารถคัดกรองยีสต์ได้ทั้งหมด 28 ไอโซเลข มี 13 ไอโซเลขสามารถเจริญได้ในอาหารไซโลส

ตารางที่ 4.3 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

ไอโซเลข	ลักษณะสัณฐานวิทยา						การเจริญในอาหารไซโลส
	เส้นผ่านศูนย์กลาง	รูปร่าง (Form)	ระดับความนูน (Elevation)	ลักษณะผิวหน้า (Surface)	ขอบ (Margin)	สี	
WKA 3-1	0.3	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 3-2	0.3	circular	convex	rough	entire	orange	ไม่เจริญ
WKA 2-5	0.5	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ

ตารางที่ 4.3 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของ
ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยา						การ เจริญใน อาหาร ไซโลส
	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง	รูปร่าง (Form)	ระดับ ความนูน (Elevation)	ลักษณะ ผิวหน้า (Surface)	ขอบ (Margin)	สี	
WKA 2-6	0.5	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ
WKA 2-7	0.3	circular	convex	smooth	entire	yellow	ไม่เจริญ
WKA 2-9	0.1	circular	convex	rough	entire	white	ไม่เจริญ
WKA 2-10	0.9	circular	flat	smooth	undulate	white	เจริญ
WKA 2-11	0.1	circular	convex	rough	entire	white	ไม่เจริญ
WKA 3-13	0.8	circular	flat	smooth	undulate	white	เจริญ
WKA 3-14	0.5	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 3-15	0.3	circular	convex	rough	entire	white	ไม่เจริญ
WKA 3-18	0.2	circular	convex	smooth	entire	orange	ไม่เจริญ
WKA 3-19	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
WKA 3-20	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 1-21	0.3	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 1-23	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
WKA 1-24	0.1	circular	convex	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
WKA 1-21	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 3-25-2	0.3	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 1-27	0.4	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 1-28	0.3	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 3-29-1	0.3	circular	convex	smooth	entire	yellow	ไม่เจริญ
WKA 3-29-2	0.1	circular	flat	smooth	entire	orange	ไม่เจริญ
WKA 3-32	0.4	circular	convex	smooth	entire	white	ไม่เจริญ
WKA 3-34	0.1	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ
WKA 3-36	0.3	circular	flat	rough	entire	white	ไม่เจริญ
WKA 3-37	0.4	circular	flat	smooth	entire	white	ไม่เจริญ

ตารางที่ 4.3 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของ ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยา					ขอบ	สี	การเจริญในอาหารไฮโดส
	เส้นผ่านศูนย์กลาง	รูปร่าง (Form)	ระดับ (Elevation)	ลักษณะผิวหน้า (Surface)	ลักษณะ			
WKA 3-38	0.2	circular	flat	smooth	entire	white	ไม่เจริญ	



ภาพที่ 4.3 ลักษณะของยีสต์ทั้ง 28 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อยจากโรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 ตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 4.4 และลักษณะของยีสต์ที่คัดกรองได้แสดงดังภาพที่ 4.4 สามารถคัดกรองยีสต์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท มี 18 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารไฮโดส

ตารางที่ 4.4 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของ ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างอ้อยจากโรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

ไอโซเลท	ลักษณะพื้นฐานวิทยา					ขอบ (Margin)	สี	การ เจริญใน อาหาร ไซโลส
	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง	รูปร่าง (Form)	ระดับ ความนูน (Elevation)	ลักษณะ ผิวหน้า (Surface)				
SKN 1-2	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ	
SKN 1-3	0.4	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 1-5	0.3	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 1-8	0.1	circular	convex	rough	entire	white	ไม่เจริญ	
SKN 1-17	0.2	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ	
SKN 1-18	0.2	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ	
SKN 1-21	0.3	circular	flat	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 1-29	0.3	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 1-30	0.4	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 2-1	0.4	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 2-2	0.5	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 2-3	0.4	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 2-7	0.3	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 2-10	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ	
SKN 2-11	0.2	circular	flat	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 3-1	0.2	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	
SKN 3-2	0.2	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ	
SKN 3-3	0.2	circular	flat	smooth	entire	white	เจริญ	
SKN 3-4	0.1	circular	flat	smooth	entire	white	ไม่เจริญ	
SKN 3-5	0.3	circular	convex	rough	entire	white	เจริญ	



ภาพที่ 4.4 ลักษณะของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลขที่คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลนครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างจากไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 4.5 และลักษณะของยีสต์ที่คัดกรองได้แสดงดังภาพที่ 4.5 สามารถคัดกรองยีสต์ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลขท มี 2 ไอโซเลขทสามารถเจริญได้ในอาหารไซโลส

ตารางที่ 4.5 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างจากไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา

ไอโซเลขท	ลักษณะสัณฐานวิทยา						การเจริญในอาหารไซโลส
	เส้นผ่านศูนย์กลาง	รูปร่าง (Form)	ระดับความนูน (Elevation)	ลักษณะผิวหน้า (Surface)	ขอบ (Margin)	สี	
RWS 1-12	0.3	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
RWS 1-13	0.1	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ
RWS 1-14	0.2	circular	flat	smooth	entire	white	ไม่เจริญ

ตารางที่ 4.5 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของ ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างจากไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยา					ขอบ	สี	การเจริญในอาหารไฮโดส
	เส้นผ่านศูนย์กลาง	รูปร่าง (Form)	ระดับ (Elevation)	ลักษณะผิวหน้า (Surface)	ลักษณะ			
RWS 1-23	0.2	circular	Flat	rough	entire	white	ไม่เจริญ	
RWS 1-27	0.1	circular	convex	smooth	entire	white	เจริญ	



ภาพที่ 4.5 ลักษณะของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานที่เก็บจากไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา

จากตัวอย่างยีสต์ที่คัดกรองได้สามารถใช้น้ำตาลไฮโดสได้ทั้งหมด 45 ไอโซเลท ลักษณะการเจริญของยีสต์ในอาหารไฮโดสแสดงดังภาพที่ 4.6 และเมื่อทำการทดลองเพื่อคัดกรองยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่ามียีสต์ทั้งหมด 25 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทราย 7 ไอโซเลท และเป็นยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อย 20 ไอโซเลท เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส มียีสต์เจริญได้ 13 และ 9 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 การเจริญของยีสต์ที่ร้อนที่สามารถใช้ไฮโดสได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

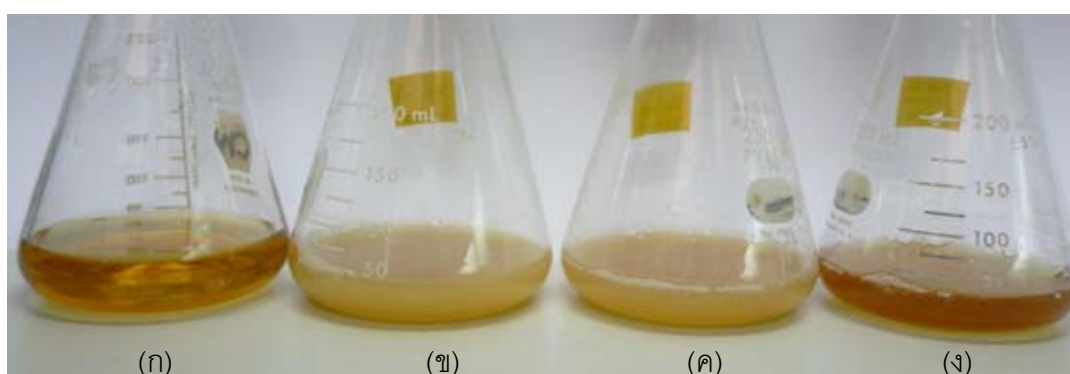
แหล่งที่มา	ไอโซเลท	อุณหภูมิ			
		35° C	40° C	45° C	50° C
เกาะเสม็ดสาร	KCH 1-42	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
จังหวัดชลบุรี	KCH 086-41-1	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	KCH 086-6-2	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ

ตารางที่ 4.6 การเจริญของยีสต์ที่ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสได้ที่อุณหภูมิต่างๆ (ต่อ)

แหล่งที่มา	ไอโซเลข	อุณหภูมิ			
		35° C	40° C	45° C	50° C
เกาะเสมสาร	KCH 086-41	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
จังหวัดชลบุรี	KCH 086-40-2	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	SRY 19-3-2	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	SRY 19-3-3	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	SRY 4-3	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	SRY 6-2	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	SRY 3-2	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	SRY 3-3	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	SRY 19-3	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	เชาวังเขมร	WKA 3-1	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
จังหวัดกาญจนบุรี	WKA 2-5	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 2-6	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 2-10	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 3-13	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 3-14	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 3-20	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 1-21	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 1-21	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 3-25-2	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 1-27	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 1-28	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	WKA 3-34	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	โรงงานน้ำตาลนครบุรี	SKN 1-2	เจริญ	เจริญ	เจริญ
จังหวัดนครราชสีมา	SKN 1-3	เจริญ	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ
	SKN 1-5	เจริญ	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ
	SKN 1-17	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	SKN 1-18	เจริญ	เจริญ	เจริญ	เจริญ

ตารางที่ 4.6 การเจริญของยีสต์ที่ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสได้ที่อุณหภูมิต่างๆ (ต่อ)

แหล่งที่มา	ไอโซเลข	อุณหภูมิ				
		35° C	40° C	45° C	50° C	
โรงงานน้ำตาลนครบุรี	SKN 1-21	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	เจริญ	
จังหวัดนครราชสีมา	SKN 1-29	เจริญ	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	
	SKN 1-30	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	
	SKN 2-1	เจริญ	เจริญ	เจริญ	เจริญ	
	SKN 2-2	เจริญ	เจริญ	เจริญ	เจริญ	
	SKN 2-3	เจริญ	เจริญ	เจริญ	เจริญ	
	SKN 2-7	เจริญ	เจริญ	เจริญ	เจริญ	
	SKN 2-10	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	
	SKN 2-11	เจริญ	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	
	SKN 3-1	เจริญ	เจริญ	เจริญ	เจริญ	
	SKN 3-2	เจริญ	เจริญ	เจริญ	เจริญ	
	SKN 3-3	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	
	SKN 3-5	เจริญ	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ	
	ไร่สุวรรณ	RWS 1-13	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
	จังหวัดนครราชสีมา	RWS 1-27	เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ



ภาพที่ 4.6 การเจริญของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวไซโลส

(ก) : ชุดควบคุม

(ข) : ตัวควบคุมบวก (positive control) (*P. stipitis*)

(ค) : ตัวอย่าง

(ง) : ตัวควบคุมลบ (negative control) (*S. cerevisiae*)

การคัดกรองยีสต์ที่ร้อนจากตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่า ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายและตัวอย่างกากอ้อยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากอุณหภูมิของตัวอย่างเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ยีสต์มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ตัวอย่างทรายที่ความลึก 10 เซนติเมตรจะมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25-34 องศาเซลเซียส ตัวอย่างดินที่ความลึก 10 เซนติเมตรจะมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25-35 องศาเซลเซียส (ยุพาพร ทิพย์จรรย์อุดม, 2547) ตัวอย่างกากอ้อยที่ความลึก 10 เซนติเมตรจะมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานที่หีบใหม่จะมีอุณหภูมิเฉลี่ย 28-30 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยของ อภิวัติศรีวิกรมย์รักษ์ (2549) ซึ่งทำการคัดกรองยีสต์ที่ร้อนจากตัวอย่างหญ้าหมัก ตัวอย่างแบ่งจากโรงงานอุตสาหกรรม และตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อน สามารถคัดกรองยีสต์ที่ร้อนได้ 1, 3 และ 9 ไอโซเลท ตามลำดับ

4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ร้อน

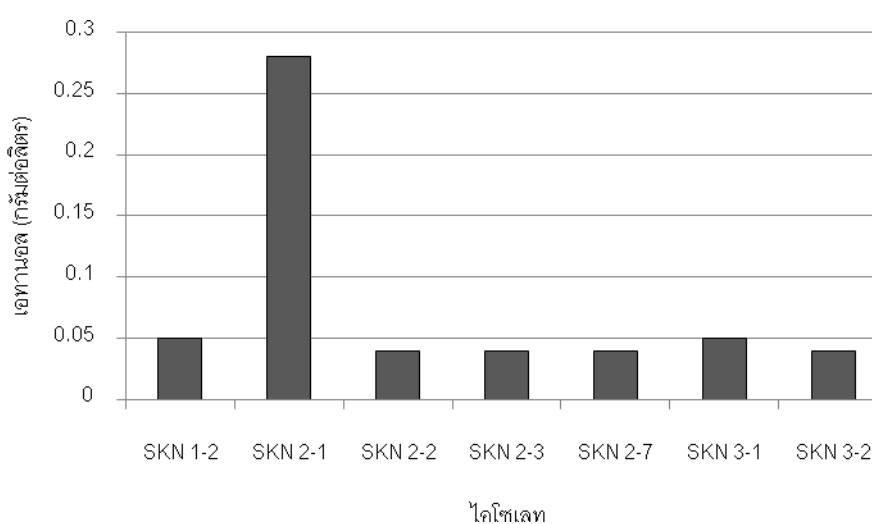
ยีสต์ที่ร้อนที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสขึ้นไปถูกเลือกมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดยเลือกยีสต์ที่ร้อนทั้งหมด 25 ไอโซเลท มาทดสอบในอาหารไซโลสซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันเพื่อให้เกิดการหมักและผลิตเอทานอล พบว่าจากยีสต์ที่ร้อนทั้งหมด 25 ไอโซเลท มีเพียง 7 ไอโซเลทสามารถใช้ไซโลสและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิมี 3 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและยีสต์ทั้งหมดไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสแสดงดังตารางที่ 4.7 ยีสต์ที่ร้อนทั้ง 7 ไอโซเลทเป็นยีสต์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บมาจากโรงงานน้ำตาลนครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.7 โดยยีสต์ที่ร้อนสามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.7 จำนวนยีสต์ที่ร้อนที่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	จำนวน ไอโซเลท	จำนวน	
		สามารถผลิตเอทานอล	ไม่สามารถผลิตเอทานอล
40	27	7	20
45	13	3	10
50	9	0	9

ตารางที่ 4.8 ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ทนร้อนผลิตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ไอโซเลข	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	กรัมของเอทานอล ต่อกรัมของน้ำตาล	ethanol yield (เปอร์เซ็นต์)
SKN 1-2	0.05±0.01	1.26±0.00	18.74	0.003	0.58
SKN 2-1	0.28±0.00	1.20±0.01	18.80	0.015	2.94
SKN 2-2	0.04±0.01	1.20±0.01	18.80	0.004	0.20
SKN 2-3	0.04±0.00	1.14±0.00	18.86	0.002	0.10
SKN 2-7	0.04±0.01	1.15±0.01	18.85	0.002	0.39
SKN 3-1	0.05±0.00	1.28±0.01	18.72	0.003	0.59
SKN 3-2	0.04±0.00	1.22±0.02	18.78	0.002	0.39



ภาพที่ 4.7 ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ทนร้อนผลิตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักของทั้ง 7 ไอโซเลขเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างปริมาณเอทานอลเป็นเปอร์เซ็นต์พบว่าไอโซเลข SKN 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลข SKN 2-1 แสดงดังภาพที่ 4.8



(ก)

(ข)

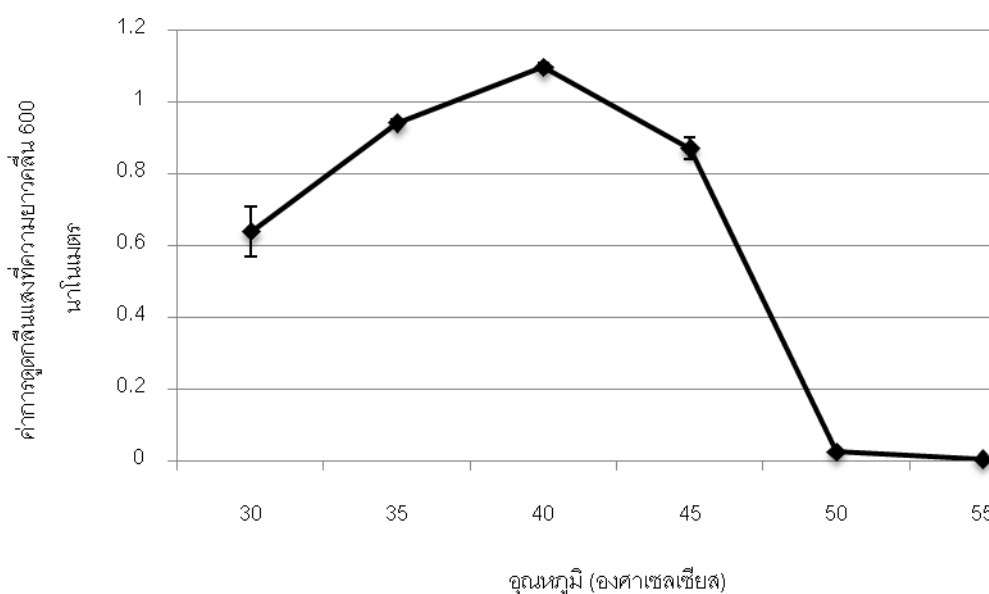
ภาพที่ 4.8 ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1

(ก) บนผิวหน้าอาหารแข็ง YM

(ข) ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

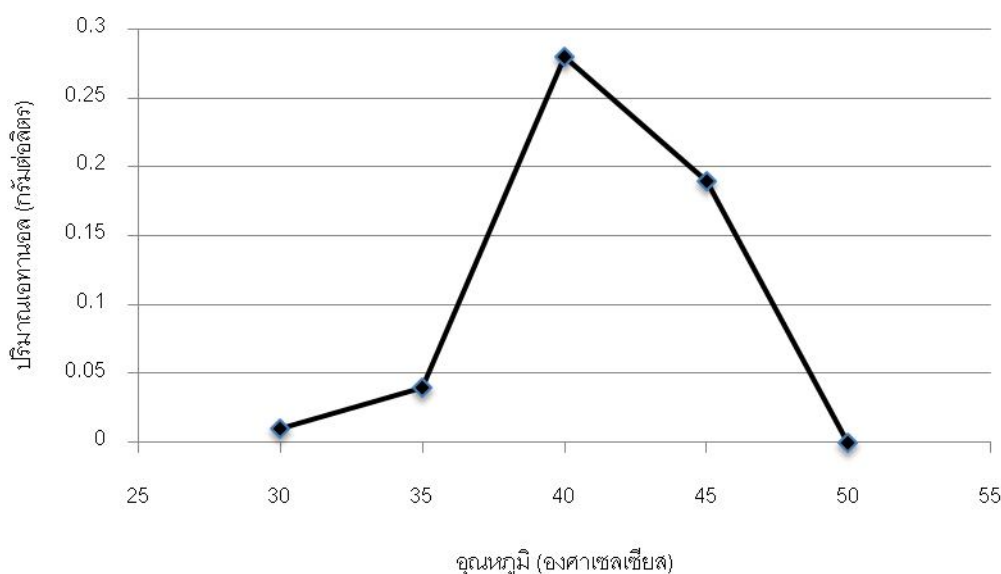
4.4 การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน

การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ SKN 2-1 ทำการทดลองในช่วง อุณหภูมิระหว่าง 35 – 55 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.9 ผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่ยีสต์ทนร้อนมีการเจริญเติบโตมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสโดยดูจากค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อน จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากปัจจุบันการใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะใช้อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส (Laluce และคณะ, 1987) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ จึงทำให้ผลผลิตของเอทานอลที่ได้มีปริมาณน้อย และการใช้ยีสต์ทนร้อนในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลนั้นจะส่งผลถึงต้นทุนการผลิตเนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้กระบวนการหมักเพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งค่าใช้จ่ายในกระบวนการหมักมีต้นทุนสูง ดังนั้นการใช้ยีสต์ทนร้อนในกระบวนการผลิตสามารถลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการหมักและกระบวนการกลั่นได้ (Sree และคณะ, 1999) จากการศึกษาของ Anderson และคณะ (1986) พบว่ายีสต์ทนร้อนสามารถเพิ่มผลผลิตของเอทานอลได้มากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.9 ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ซึ่งทำการทดลองในอาหารไซโลส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 โดยทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ทนร้อนไอโซเลท 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและสามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 50 องศาเซลเซียส ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท 2-1 ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1

การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 พบว่ายีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผลิตเอทานอลในภูมิภาคของประเทศในเขตร้อน โดยส่วนใหญ่การผลิตเอทานอลใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ในกระบวนการผลิต โดยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี แต่เป็นสายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง ถึงแม้ว่าบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส แต่การหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิเพียง 33-35 องศาเซลเซียส (สาวิตรี ลิ้มทอง และคณะ, 2545) ซึ่งไม่ดีพอสำหรับการหมักเอทานอลในประเทศไทยที่อุณหภูมิสูงสุดตลอดปี โดยความร้อนที่สูงนั้นนอกจากจะมาจากอุณหภูมิของสภาพอากาศร้อนแล้วในการหมักเอทานอลเมื่อมีอัตราการหมักสูงจะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูงด้วย การผลิตเอทานอลด้วยยีสต์สายพันธุ์ทั่วไปซึ่งมักเป็นยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการผลิตเอทานอลจะลดลง ดังนั้นการใช้ยีสต์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงขึ้น และประโยชน์ของการใช้ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม คือ ลดการใช้ระบบหล่อเย็น ซึ่งทำให้ค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลดลงเป็นผลให้ต้นทุนการผลิตโดยรวมลดลงด้วย นอกจากนี้การหมักในอุณหภูมิสูงยีสต์จะมีอัตราการหมักสูง ทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้เร็ว ยิ่งไปกว่านั้นยังช่วยลดปัญหาการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการผลิตเอทานอล (Seki และคณะ, 1983; Limtong, 1987; Sree และคณะ, 1999)

4.5 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

4.5.1 ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในการทดลองจะผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมีโดยใช้ฮัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 และหาองค์ประกอบของฟางข้าวด้วยวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) ซึ่งองค์ประกอบของฟางข้าวแสดงดังตารางที่ 4.9 และฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีและย่อยสลายด้วยเอนไซม์แล้วแสดงดังภาพที่ 4.11

ตารางที่ 4.9 ปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าว (เปอร์เซ็นต์)

	ปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าว (เปอร์เซ็นต์)				
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	อื่นๆ
ฟางข้าว	37.67 ± 0.31	33.36 ± 1.96	4.12 ± 0.36	0.02 ± 0.01	25.40 ± 2.35



ภาพที่ 4.11 ลักษณะฟางข้าวที่การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีและย่อยสลายด้วยเอนไซม์แล้ว

การปรับสภาพฟางข้าวด้วยวิธีทางกายภาพโดยการตัดและบดให้ละเอียดจะทำให้ฟางข้าวมีขนาดเล็กลงเป็นการช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อไป ในงานวิจัยนี้ได้นำ

ฟางข้าวที่ผ่านการบดจากเครื่องบดละเอียดซึ่งยังมีทั้งส่วนที่ละเอียดและหยาบปะปนกันมาร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มีรูพรุนขนาด 0.4 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ฟางข้าวที่มีขนาดเล็กและมีขนาดสม่ำเสมอเพื่อนำไปใช้ในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต่อไป สำหรับส่วนที่ค้างอยู่บนตะแกรงร่อนจะมีขนาดใหญ่กว่าจึงนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าวต่อไป

การนำวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน (Cara และคณะ, 2006) วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพ คือ เพื่อที่จะเปลี่ยนแปลงหรือกำจัดองค์ประกอบของโครงสร้างพืชเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และเพิ่มผลผลิตของน้ำตาลที่ใช้ในการหมักซึ่งได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้สูงขึ้น (Mosier และคณะ, 2005) งานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพตามด้วยวิธีทางเคมี คือ บดให้ฟางข้าวกลายเป็นผงก่อนแล้วตามด้วยการใช้อัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์วิธีนี้ไม่ทำให้เกิดเพอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัลขึ้นในระหว่างการปรับสภาพ (Saha และ Cotta, 2007) ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้มักเกิดขึ้นในกระบวนการที่มีการใช้กรดปรับสภาพหรือใช้กรดในการย่อยสลาย จัดเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล (Purwadi, 2006)

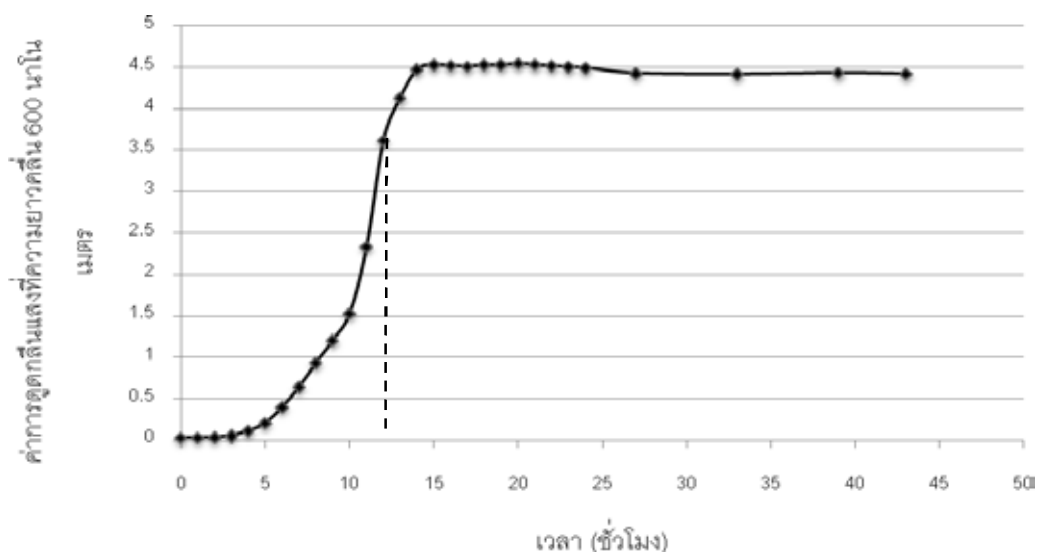
การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธีได้แก่ proximate analysis แต่เนื่องจากในขั้นตอนของการวิเคราะห์ทำให้ได้ค่าเยื่อใย (crude fiber) ผิดความเป็นจริงนอกจากนี้ยังไม่สามารถแยกชนิดของเยื่อใยหรือองค์ประกอบของชีวมวลพืชได้จึงทำให้วิธีนี้ใช้ประโยชน์ได้น้อยลง (สายัณห์ทัศนศรี, 2540) ดังนั้นจึงได้ใช้วิธี detergent fiber analysis หรือ forage fiber analysis แทนซึ่งพัฒนาโดย Goering และ Van Soest (1970) เพื่อให้สามารถแยกปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชได้วิธีการวิเคราะห์แบบนี้สามารถแบ่งองค์ประกอบของพืชได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆคือส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (cell content หรือ neutral detergent soluble หรือ NDS) เป็นส่วนสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกลาง (neutral detergent) ประกอบด้วยโปรตีนคาร์โบไฮเดรตเช่นแป้งและน้ำตาลไขมันกรดอินทรีย์ต่างๆสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนวิตามินเพคตินและสารที่ละลายน้ำได้เป็นต้น (วารุณี พานิชผลและคณะ, 2537) อีกส่วนหนึ่งคือส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall constituents หรือ neutral detergent fiber หรือ NDF) เป็นส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในสารละลาย neutral detergent ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสเซลลูโลส ลิกนินและเถ้า (Lee และคณะ, 2007) โดย NDF ยังสามารถแบ่งออกได้เป็นส่วนที่ละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรด (acid detergent) เรียกว่า acid detergent soluble (ADS) คือเฮมิเซลลูโลสและส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในสารละลาย acid detergent เรียกว่า acid detergent fiber (ADF) ได้แก่เซลลูโลสลิกนินและเถ้าดังนั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวลพืชจึงได้ใช้

สารละลายneutral detergent ในการสกัดก่อนเพื่อสกัดเอาส่วน NDS จากพืชออกไปจึงเหลือส่วนที่เป็น NDF (เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนินและเถ้า) เอาไว้ในการสกัดครั้งต่อมาจึงใช้สารละลาย acid detergent เพื่อสกัดเอาเฮมิเซลลูโลสออกไปจึงเหลือส่วนที่เป็น ADF (เซลลูโลส ลิกนินและเถ้า) เอาไว้ดังนั้นก็จึงหาปริมาณของเฮมิเซลลูโลสได้จากผลต่างของปริมาณ NDF และ ADF จากนั้นจึงใช้สารละลาย combined permanganate ในการสกัดเอาลิกนินออกไปจึงเหลือส่วนที่เป็น PML (permanganate lignin) ที่ประกอบด้วยเซลลูโลสและเถ้าดังนั้นก็จึงหาปริมาณของลิกนินได้จากผลต่างของปริมาณ ADF และ PML ขั้นตอนสุดท้ายเมื่อนำไปเผาจึงเหลือเฉพาะส่วนของเถ้าทำให้หาปริมาณของเซลลูโลสได้จากผลต่างของปริมาณ PML และเถ้าส่วนของเถ้าที่เหลือนั้นจะเป็นพวกสารประกอบอนินทรีย์และแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ซิลิกาอะลูมิเนียมแคลเซียมแมกนีเซียมโพแทสเซียมและโซเดียมเป็นต้น (Lee และคณะ, 2007) และปริมาณของสารอื่นๆที่พบ นอกเหนือจากเซลลูโลสเฮมิเซลลูโลสลิกนินและเถ้าก็คือปริมาณ NDS นั้นเอง

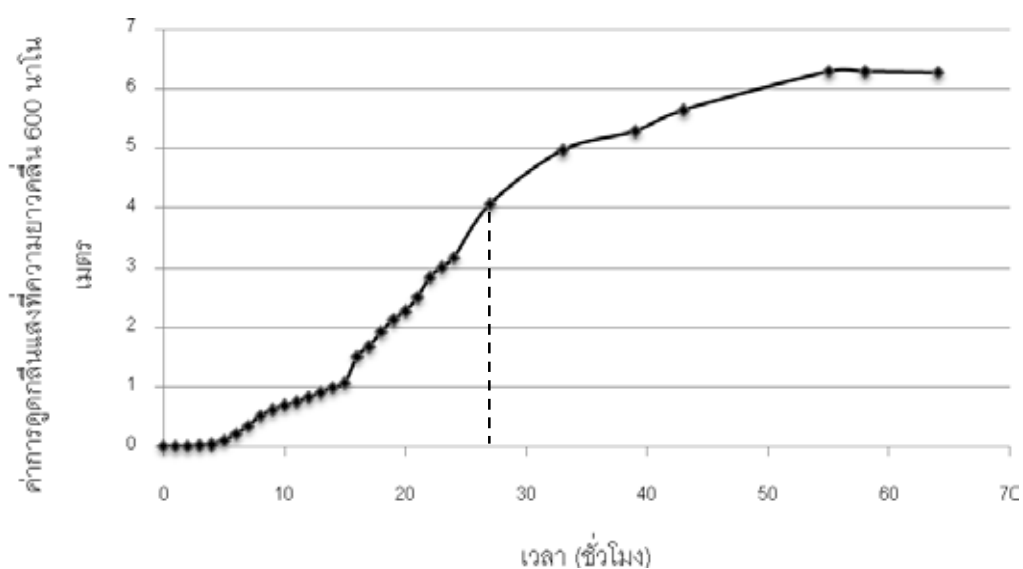
จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าว พบว่า มีปริมาณเซลลูโลสโดยเฉลี่ย 37.67 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณเฮมิเซลลูโลส 33.36 เปอร์เซ็นต์และมีปริมาณลิกนินโดยเฉลี่ยในช่วง 4.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งฟางข้าวมีปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสค่อนข้างสูงดังนั้นก็ในการหาค่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีจึงคิดจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในฟางข้าว เพื่อคำนวณปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักฟางข้าวหากมีการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์และน้ำตาลที่ได้สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ทั้งหมด สามารถคำนวณหาประมาณกลูโคสและไซโลส (ภาคผนวก ข) ได้เท่ากับ 41.85 และ 37.90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณเอทานอลที่ได้จากการคำนวณทางทฤษฎีเท่ากับ 0.41 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (ภาคผนวก ข)

4.5.2 การผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล พบว่าเมื่อเลี้ยง *P. stipitis* ในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดังภาพที่ 4.12 โดยมีระยะแล็กที่เวลา 0 - 5 ชั่วโมง ระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่เวลา 5 - 12 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะสเตชันนารีที่เวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป ซึ่งช่วงเวลาที่เชื้อเข้าสู่ระยะสเตชันนารี จะมีการเจริญเติบโตน้อย ส่วนยีสต์ที่นอนที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดังภาพที่ 4.13 โดยไม่เกิดระยะแล็กจึงเริ่มระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่เวลา 0 - 24 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงเชื้อมีการเจริญลดลง ดังนั้นอายุของกล้าเชื้อ *P. stipitis* และยีสต์ที่นอนไอโซเลท SKN 2-1 ที่เหมาะสม คือ ที่ระยะเวลา 12 และ 28 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 4.12 การเจริญเติบโตของ *P. stipitis* ที่เวลา 0 - 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส



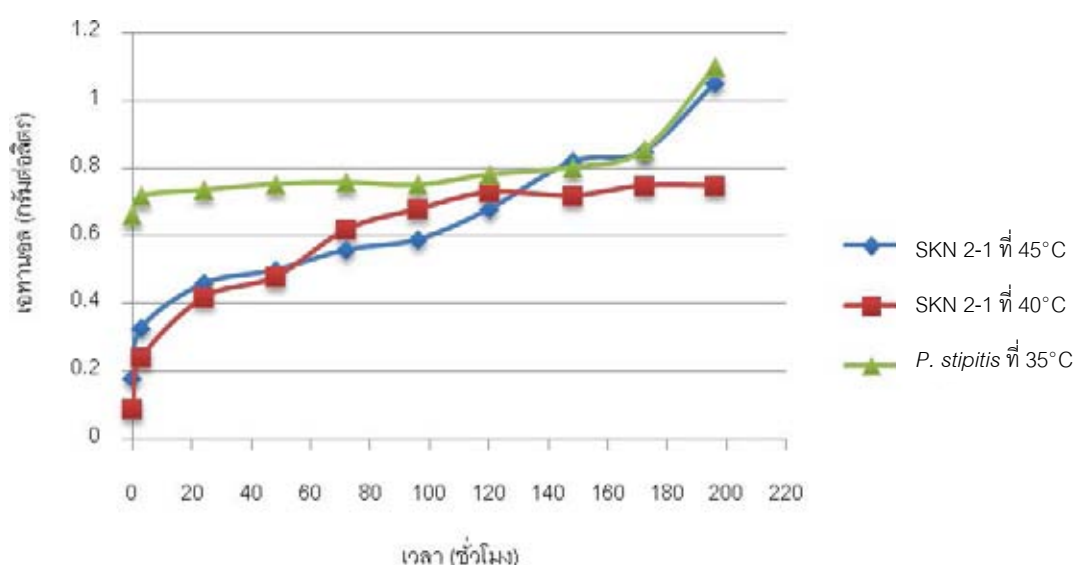
ภาพที่ 4.13 การเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ที่เวลา 0 - 65 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส

เมื่อนำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วหมักด้วยกระบวนการ SSF โดยใช้ยีสต์ 2 ชนิดคือ *P. stipitis* และยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 โดยเลี้ยงกล้าเชื้อที่ระยะเวลาที่เหมาะสมดังกล่าวเติมเอนไซม์ 2 ชนิดที่ผลิตจาก *T. reesei* TISTR 3081 คือ

เซลลูโลสและไซลาลินสลงไปแล้วหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสสำหรับ *P.stipitis* และอุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส สำหรับยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 เป็นเวลา 7 วันจะได้ปริมาณเอทานอลแสดงดังตารางที่ 4.10 ปริมาณการเกิดเอทานอลที่เวลาต่างๆของ *P.stipitis* และ ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 แสดงดังภาพที่ 4.14

ตารางที่ 4.10 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	SKN 2-1			<i>P. stipitis</i>		
	ปริมาณ เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรัมเอทานอล ต่อกรัม วัตถุดิบ	Ethanol yield (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณ เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรัมเอทานอล ต่อกรัม วัตถุดิบ	Ethanol yield (เปอร์เซ็นต์)
35	-	-	-	0.44	0.021	5.11
40	0.66	0.031	7.67	-	-	-
45	0.87	0.041	10.10	-	-	-



ภาพที่ 4.14 ปริมาณเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของ *P.stipitis* และยีสต์ทนร้อนไอโซเลท 2-1

การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่มอดค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จำเป็นต้องมีการย่อยสลายองค์ประกอบดังกล่าวเพื่อให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลที่จะได้จากการย่อยสลายเป็นส่วนใหญ่ เพื่อที่จะนำน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้มาหมักเป็น

เอทานอลและใช้ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 หมักที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส และใช้ *P. stipitis* หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ผลิตได้โดยยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 เท่ากับ 0.66 และ 0.87 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส คิดเป็น 7.67 และ 10.10 เปอร์เซ็นต์เอทานอลเมื่อเทียบกับกาคำนวณทางทฤษฎี และปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ผลิตได้โดย *P. stipitis* เท่ากับ 0.44 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 5.11 เปอร์เซ็นต์เอทานอลเมื่อเทียบกับกาคำนวณทางทฤษฎี เมื่อนำปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท 2-1 สามารถผลิตได้มาเปรียบเทียบกับปริมาณเอทานอลที่ *P. stipitis* พบว่ายีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่า *P. stipitis* คิดเป็น 50.59 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับจากการศึกษาของ Anderson และคณะ (1986) ได้ทำการศึกษผลกระทบของอุณหภูมิต่อกระบวนการหมักเอทานอล โดยอุณหภูมิที่ใช้คือ 25, 39 และ 47 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส ยีสต์จะมีการผลิตเอทานอลประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังจากทำการหมัก 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ยีสต์จะผลิตเอทานอลประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการหมัก 20 ชั่วโมง และที่ 25 องศาเซลเซียสเอทานอลจะถูกผลิตหลังจากทำการหมักไปแล้ว 60 ชั่วโมง

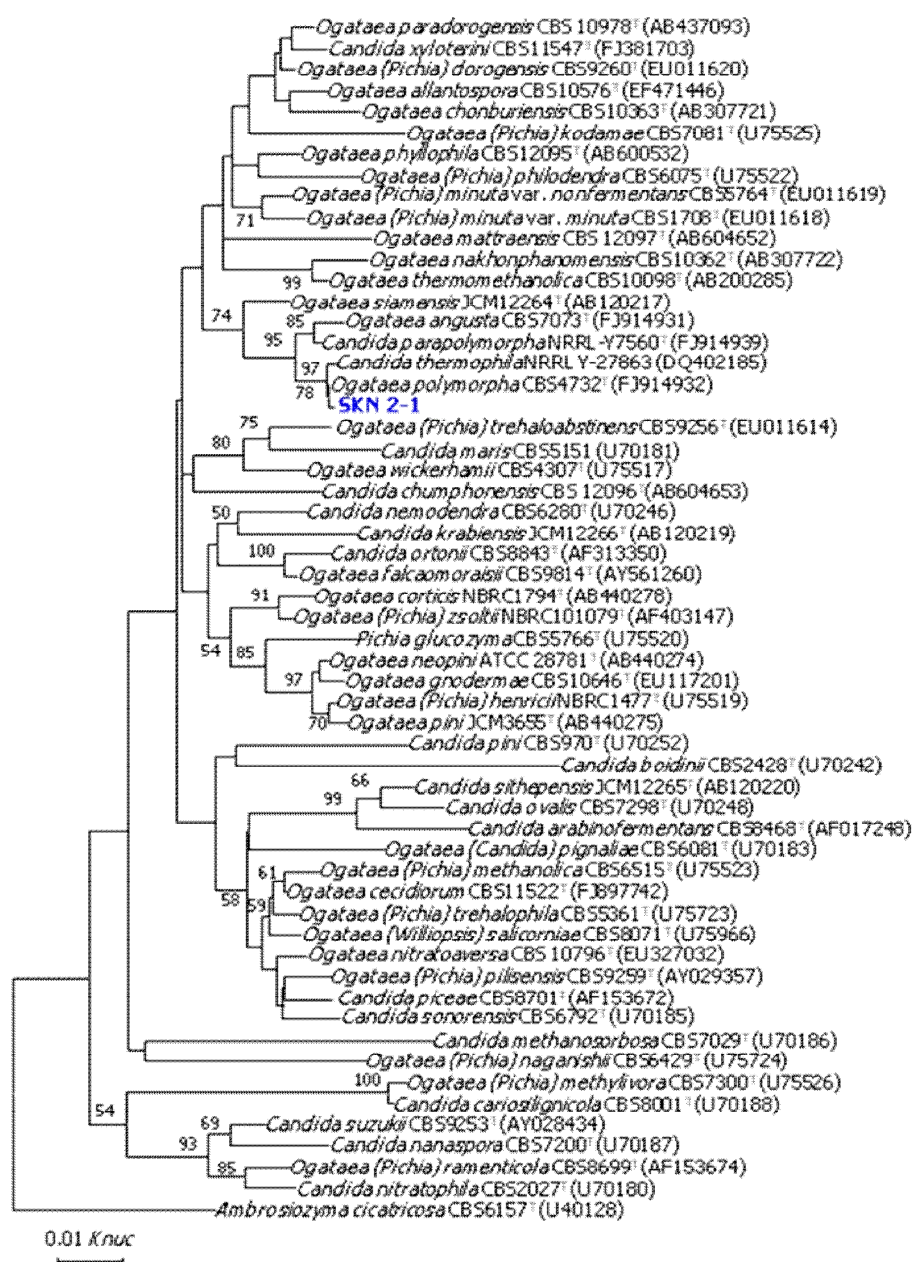
ในงานวิจัยที่มีการศึกษาการนำยีสต์ทนร้อนมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการ SSF พบว่า Boyle และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษการหมักฟางข้าวบาร์เลย์โดยใช้ยีสต์ *K. marxinus* IMB3 ในกระบวนการหมักแบบ SSF ซึ่งทำการหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีฟางข้าวบาร์เลย์ที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 2, 3 และ 3.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลมีความเข้มข้น 20 กรัมต่อ 100 กรัมของวัตถุดิบ

การลดต้นทุนการผลิตเอทานอลสามารถทำได้โดยการลดต้นทุนของวัตถุดิบหรือเอนไซม์ที่นำมาใช้ การใช้วัตถุดิบที่มีการปรับปรุงทางพันธุกรรมเพื่อให้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงร่วมกับการพัฒนาในเรื่องของการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลจะสามารถลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้ (Wooley และคณะ, 1999) ส่วนการลดต้นทุนของการผลิตเอนไซม์นับได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญของการย่อยสลายวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ในการโคลนยีนเซลลูเลสเข้าสู่แบคทีเรีย ยีสต์ และรา จะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์และแยกทิวติได้สูงขึ้น (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลายชนิด การทนต่อเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงๆ หรือความสามารถในการย่อยสลายและหมักวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ใน

คราวเดียวกัน ถือได้ว่าเป็นสิ่งที่ควรจะทำต่อไปในอนาคตหากต้องการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

4.6 บ่งชี้สายพันธุ์ยีสต์ที่ร้อน

นำยีสต์ที่ร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ทำการบ่งชี้สายพันธุ์ตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 ของ Large subunit (LSU) rDNA gene และนำไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank โดย Blast Homology Search Program for Nucleotide (BLASTn) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ยีสต์ที่ร้อนมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank โดย multiple alignment-program CLUSTAL_X version 1.81 (Thompson และคณะ, 1997) สร้าง phylogenetic tree จาก evolutionary distance data ด้วย Kimura's two-parameter correction (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou และ Nei, 1987) ความเชื่อมั่นประเมินจาก bootsrap analysis 1000 ซ้ำ พบว่ายีสต์ที่ร้อนไอโซเลท 2-1 เหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ *Ogataea polymorpha* 99.83 เปอร์เซ็นต์โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.15 Phylogenetic tree สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 ของ large subunit rDNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนหรือใกล้เคียงที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดกรองยีสต์ที่ร้อนที่สามารถใช้ไซโลสจากตัวอย่างทราย ตัวอย่างดิน ตัวอย่างกากอ้อย และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างจาก 3 จังหวัดในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง สามารถคัดกรองยีสต์ที่ร้อนได้ทั้งสิ้น 73 ไอโซเลท โดยมี 45 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ในอาหารไซโลส และ 25 ไอโซเลท เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายที่เก็บจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี 7 ไอโซเลท และคัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา 18 ไอโซเลท นำทั้ง 25 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลในอาหารไซโลส พบว่า มี 7 ตัวอย่างที่สามารถใช้ไซโลสในกระบวนการหมักเอทานอลได้ โดยไอโซเลท SKN 2-1 ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อย สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น

การศึกษากลักษณะของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ร้อน ไอโซเลท SKN 2-1 ที่อุณหภูมิ 35, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ที่ร้อนไอโซเลท SKN 2-1 เจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้ฟางข้าวที่มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส 37.67 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 33.63 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 4.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมีด้วย alkaline peroxide และย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสแล้ว พบว่ายีสต์ที่ร้อนไอโซเลท SKN 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดปริมาณ 0.66 และ 0.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 7.67 และ 10.10 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ

ทำการบ่งชี้สายพันธุ์ยีสต์โดยวิธีการเปรียบเทียบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26s Ribosomal DNA กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน Genbank พบว่ายีสต์ที่ร้อนไอโซเลท 2-1 เหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ *Ogataea polymorpha* 99.83 เปอร์เซ็นต์โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาแหล่งคัดกรองใหม่ๆที่มีความหลากหลายเพิ่มขึ้นเพื่อค้นหาเชื้อใหม่ๆที่สามารถและผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงๆ
2. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อให้เชื้อที่คัดกรองได้ผลิตเอทานอลได้เต็มประสิทธิภาพ
3. ควรศึกษาแหล่งที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมเพื่อให้การผลิตเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- กนก รัตน์กนกชัย. 2528. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมกรมการเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 1-5.
- กาพย์พร กลางสาทร. 2529. การแยกเส้นใยเซลลูโลสออกจากเนื้อไม้เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม. รายงานประจำปีการศึกษา 2529 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จักรกฤษณ์ หอมจันทร์. 2529. จุลชีววิทยาของดิน (ฉบับจุลภาค- รวมแก่นวิชา). ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ดวงกมล ปรงุวิทยา. 2549. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เบตาไกลูโคซิเดสสำหรับกระบวนการเปลี่ยนสารชีวมวลให้เป็นน้ำตาลกลูโคส. โครงการปัญหาพิเศษ, หน้า 1-5.
- ธงชัย คัมภีร์, น้อย เกษมสุขสกุล และพูนพิไล สุวรรณฤทธิ์. 2532. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสเพื่อเป็นตัวเร่งในการทำปุ๋ยหมัก. ว.ดินและปุ๋ย, หน้า 111-118.
- นคร ทิพยาวงค์. 2553. การผลิตเอทานอล. เทคโนโลยีการแปลงสภาพชีวมวล, หน้า 121-149
- ยุพาพร ทิพย์เจริญอุดม. 2547. การวัดอุณหภูมิดิน. วารสารการศึกษาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยี, หน้า 23-26.
- วารุณี พานิชผล, สมพล ไวปัญญา, เมธิณี ศิริวงศ์ และเฉลียว ศรีชู. 2537. การศึกษาคุณค่าทางอาหารของหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides* Nash.) เพื่อใช้เป็นพืชอาหารสัตว์. ในรายงานผลงานวิจัยและรายงานประจำปี 2537, หน้า 158-182. (ม.ป.ท.).
- วิทยา มะเสนา. 2530. จุลชีววิทยาทางดิน. ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สภาผู้แทนราษฎร. คณะกรรมาธิการการพลังงาน. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. กรุงเทพมหานคร: แปลนพริ้นท์ติ้ง.
- สายัณห์ ทัดศรี. 2540. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน: การผลิตและการจัดการ. กรุงเทพมหานคร: รั้วเขียว.

สาวิตรี ลิ้มทอง, วิเชียร ยงมานิตชัย, ศศิวิมล ชื่นอ้อม, เหมือนเดือน พิศาสดพงษ์, นันทนา สีสุข, สมคิด ธรรมรัตน์, สิริพร สอนเสาวภาคย์ และ อะเคื้อ บุญญสิริ. 2545. การปรับปรุงการผลิตแอลกอฮอล์ของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว).

แสวง รวยสูงเนิน. 2523. จุลชีววิทยาของดิน. ภาควิชาปฐพีศาสตร์. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อภิรดี ศรีภิรมย์รักษ์ . 2549 .การคัดแยกและแสดงลักษณะเฉพาะของยีสต์ที่ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอล สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ . คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาษาอังกฤษ

Alexander M. 1976. Introduction to soil microbiology. New York: John Wiley & Sons. Inc.

Alexander M. 1977. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons. Inc.

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

Anderson, P. J., McNeil, K., and Watson, K. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at the temperature above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. Journal of Applied and Environmental Microbiology 51(6): 1314-1320.

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

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

Banat, I. M., Nigam, P., and Marchat, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 259-263.

- Barron, N., Marchant, R. McHale, L., and McHale, A. P. 1994. Growth of a thermotolerant ethanol-producing strain of *Kluyveromyces marxianus* on cellobiose-containing media. Biotechnology Letter 16: 625-630.
- Boyle, M., Barron, N., and McHale, A. P. 1997. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB 3. Biotechnology Letter 19: 49-51.
- Brady, D., Marchant, R., McHale, L., and McHale, A. P. 1994. Production of ethanol by the thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. Biotechnology Letter 16: 737-740.
- Brown, R. 2003. Biorenewable resources: Engineering new products from agriculture. Ames, IA: Iowa State Press.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M., and Castro, E. 2006. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. Process Biochemistry 41: 423-429.
- Cardona, C. A., and Sánchez, O. J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. Bioresource Technology 98: 2415-2457.
- Casey, et al. 2006. Starch structure [Online]. Available from: <http://www.jic.ac.uk/STAFF/cliff-hedley/Starch.html> [2012, March 27]
- Chadha, B. S., Kanwar, S. S., and Garcha, H. S. 1995. Simultaneous saccharification and fermentation of rice straw into ethanol. Acta Microbiology Immunology Hungary 42(1): 71-76.
- Chandel, A. K., Chan, E. S., Rudravaram, R., Narasu, M. L., Rao, L. V., and Ravindra, P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. Biotechnology and Molecular Biology Review 2(1): 14-32.
- Chang, V. S., Kaar, W. E., Burr, B., and Holtzapple, M. T. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. Biotechnology Letters 23: 1327-1333.
- Demirbas, A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass. Energy Sources 21:327-337.

- Dominguez, H., Nunez, M. J., Chamy, R., and Lema, J. 1993. Determination of kinetic parameters of fermentation processes by a continuous unsteady-state method: Application to the alcoholic fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis*. Biotechnology and Bioengineering 41: 1129-1132.
- Duff, S. J. B., and Murray, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. Bioresource Technology 55: 1-33.
- Fleming, M., Barron, N., Marchant, R., McHale, L., and McHale, A. P. 1993. Studie on the growth of a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. Biotechnology Letter 16: 1195-1198.
- Fort, R. 2006. Xylanases [Online]. Available from: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood14.html> [2012, March 27]
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulose activities. International Union of Pure and Applied Chemistry 59: 257-268.
- Goering, H. K. and Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures, and some applications). In Agricultural Handbook No. 379, pp. 1-20. Washington, DC: US Government Printing Office.
- Gupta, R., Sharma, K. K., and Kuhad, R. C. 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. Bioresource Technology 100: 1214-1220.
- Hacking, A. J., Taylor, I. W. F., and Hanas, C. M. 1984. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C. Applied Microbiology and Biotechnology 19: 361.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., and Zacchi, G. 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends in Biotechnology 24: 549-556.
- Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., and Prior, B. A. 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. Enzyme and Microbial Technology 16: 933-943.

- Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., and Faaij, A. P. C. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle-, and long-term. Biomass Bioenergy 22: 384-410.
- Hector, R., Hughes, S., and Liang-Li, X. 2008. Developing yeast strains for biomass-to-ethanol production [Online]. Available from: http://www.biomassmagazine.com/article.jsp?article_id=1533&q=&page=2 [2012, March 29]
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., and Viikari, L. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochemistry 40: 3519-3525.
- Kaur, P. P., Arneja, J. S., and Singh, J. 1997. Enzymatic hydrolysis of rice straw by crude cellulase from *Trichoderma reesei*. Bioresorce Technology 66: 267-269.
- Kim, T. H., and Lee, Y. Y. 2005. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. Applied Biochemistry and Biotechnology 124: 1119-1131.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. 16: 111-120.
- Kumar, N. V., Linoj Dhavala, P., Goswami, A., and Maithel, S. 2006. Liquid biofuels in South Asia: Resources and technologies. Asian Biotechnology and Development Review 8: 31-49.
- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. 1997. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4 th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company.
- Laluce, C., Bertolini, M. C., Hernandez, J., Martini, A., and Vaughan Martini, A. E. 1987. Screening survey for yeasts that ferment sucrose at relatively high temperature. Annals of Microbiology 37: 151-159.
- Laplace, J. M., Delgenes, J. P., Molettal, R., and Navarro, J. M. 1993. Cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* co-cultivated with a xylose-fermenting yeast. Journal of Fermentation and Bioengineering 75: 207-212.

- Lee, D., Owens, V. N., Boe, A., and Jeranyama, P. 2007. Composition of herbaceous biomass feedstocks [Online]. Available from: <http://ncsungrant.sdstate.org/uploads/publications/SGINC1-07.pdf> [2012, January 8]
- Limtong, S. 1987. Ethanol fermentation by flocculant yeast. Ph. D. Thesis Osaka University. Japan.
- Linde, M., Jakobsson, E. L., Galbe, M., and Zacchi, G. 2008. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. Biomass and Bioenergy 32: 326-332.
- Lu, Y., and Mosier, N. S. 2004. Enzyme mimetics for bioprocessing agricultural residues [Online]. Available from: [http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/presentations/doc/enzyme%20mimetic-mosier%20\(ACS%202004\).pdf](http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/presentations/doc/enzyme%20mimetic-mosier%20(ACS%202004).pdf) [2012, March 10]
- McMillan, J. D. 1997. Bioethanol production: status and prospects. Renewable Energy 10: 295-302.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry 31: 426-428.
- Morjanoff, P. J., and Gray, P. P. 1987. Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. Biotechnology and Bioengineering 29: 733-741.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., and Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 96: 673-686.
- Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. Advances in Applied Microbiology 9: 91-130.
- Parisi, F. 1989. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 38: 53-87.
- Paturau, J. M. 1969. By-products of the cane sugar industry: An introduction to their industrial utilization. Amsterdam: Elsevier.
- Persson, I., Tjerneld, F., and Hahn-Hägerdal, B. 1991. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. Process Biochemistry 26: 65-74.

- Plotkin, J. F. 2006. PERF program-ethanol new report alert [Online]. Available from:
<http://www.chemsystems.com/reports/search/docs/abstracts/0405-8-abs.pdf>
[2009, January 9]
- Prasad, S., Singh, A., and Joshi, H. C. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues. Resources, Conservation and Recycling 50: 1-39.
- Purwadi, R. 2006. Continuous Ethanol Production from Dilute-acid Hydrolyzates: Detoxification and Fermentation Strategy. Doctoral dissertation. Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology.
- Ragauskas, A. J. 2008. Chemical Composition of Wood [Online]. Available from:
http://www.ipst.gatech.edu/faculty_new/faculty_bios/ragauskas/technical_revies/Chemical%20Overview%20of%20Wood.pdf [2012, March 20]
- Reguera, G., and Leschine, S. B., 2001. Chitin degradation by cellulolytic anaerobes and facultative aerobes from soils and sediments. FEMS Microbiol Letters 204: 367–74
- Reicheil, J. 1983. Toxicology: Industrial enzymology. The Application of Enzymatic in Industry. New York: The nature Press.
- Ritter, S. K. 2008. Lignocellulose: A complex biomaterial. Plant Biochemistry 86: 15.
- Saha, B. C., and Cotta, M. A. 2006. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. Biotechnology Progress 22: 449-453.
- Saha, B. C., and Cotta, M. A. 2007. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. Enzyme and Microbial Technology 41: 528-532.
- Sánchez, O. J., and Cardona, C. A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstock. Bioresource Technology 99: 5270-5295.
- Seki, T., Myoga, S., Limtong, S., Uedono, Kummnuata, J., and Taguchi, H. 1983. Genetic construction of yeast stain for high ethanol production. Biotechnology Letter 5: 351-356
- Shallom, D., and Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. Current Opinion in Microbiology 6: 219-228.

- Silverstein, R. A. 2004. A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol. Master's Thesis. Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University.
- Sivers, M. V., and Zacchi, G. 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. Bioresource Technology 51: 43-52.
- Sree, N.K., Sridhar, M., Rao, L. V., and Pandey, A. 1999. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. Process Biochemistry. 34: 115-119.
- Sun, Y., and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology 83: 1-11.
- Thomas, W. J., and Yong-su, J. 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. Advance in Applied Microbiology. 47: 221-268.
- Thomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. C. 1997. The clustal_x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. Nucleic acids research 24: 4876-4882
- Ueno, R., Urano, N., and Kimura, S. 2002. Effect of temperature and cell density on ethanol fermentation by a thermotolerant aquatic yeast strain isolated from hot spring environment. Fisheries Science. 68: 571-578.
- Vidal, P.F., and Molinier, J. 1988. Ozonolysis of lignin—improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. Biomass16: 1-17.
- Wayman, M., Parekh, R. S., and Parekh, S. R. 1987. Simultaneous saccharification and fermentation by mixed cultures of *Brettanomyces clausenii* and *Pichia stipitis* R of SO₂-prehydrolysed wood. Biotechnology Letters 9: 435-440.
- Woodward, J. 1987. Utilization of cellulose as a fermentation substrate: Problems and potential. Special Publications of the Society for General Microbiology 21: 45-46.
- Wooley, R., Ruth, M., Glassner, D., and Sheehan, J., 1999. Process design and costing of bioethanol technology: A tool for determining the status and direction of research and development. Biotechnology Progress 15: 794-803.

- Wyman, C. E., Spindler, D. D., and Grohmann, K. 1992. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. Biomass and Bioenergy 3: 301-307.
- Yoswathana, N., Phuriphat, P., Treyawutthiwat, P., and Eshtiaghi, N. 2010. Bioethanol production from rice straw. Energy Resource. J 1: 26-31.
- Zhang, Y. HP., Himmel, M. E., Mielenz, J. R. 2006. Outlook for cellulose improvement : Screening and selection strategies. Biotechnology Advances 24: 452-481.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. yeast malt agar (YMA) (Laplaceและคณะ, 1993)

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นผงวุ้นในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตรปรับ pH เป็น 5.0 แล้วค่อยเติมวุ้นผงลงไป จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรต้มให้วุ้นละลายนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. yeast malt broth (YMB) (Laplaceและคณะ, 1993)

สารสกัดจากยีสต์	3.0 กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3.0 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	5.0 กรัม
น้ำตาลไซโลส	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตรปรับ pH เป็น 5.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารไซโลส (xylose medium)

สารสกัดจากยีสต์	3.0 กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3.0 กรัม
เปปโตน	5.0 กรัม
น้ำตาลไซโลส	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตรปรับ pH เป็น 5.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของชีวมวลพืช

1.1 สารละลาย neutral detergent

(1) ชั่งเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดไฮเดรต ปริมาณ 16.18 กรัมและโซเดียมเตตระโบเรตเดคะไฮเดรต ปริมาณ 6.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 400 มิลลิลิตร นำไปต้มจนละลายหมด

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

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

(4) ชั่งไดไฮเดรตไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส ปริมาณ 4.56 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนละลายหมดแล้วนำไปผสมกับสารละลายในข้อ (3) ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.9 - 7.1 แล้วปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลาย acid detergent

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

(2) ชั่งเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ปริมาณ 20 กรัม ละลายในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอร์มัลแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยกรดนี้

1.3 สารละลาย saturated potassium permanganate

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

1.4 สารละลาย lignin buffer

ชั่งไฮดรอกไซด์ไนเตรตไนอะไฮเดรต ปริมาณ 6 กรัมและซิลเวอร์ไนเตรตปริมาณ 0.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตรจากนั้นเติมกรดอะซิติก ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โฟแทสเซียมอะซิเตต ปริมาณ 5 กรัมและเทอร์เชียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้ว ผสมให้เข้ากัน

1.5 สารละลาย combined permanganate

ผสมสารละลาย saturated potassium permanganate กับ lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดแก้วสีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นถ้าสารละลาย กลายเป็นสีแดงจะไม่สามารถใช้ได้

1.6 สารละลาย demineralizing

ชั่งออกซาลิกแอซิดไดไฮเดรต ปริมาณ 50 กรัมละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลาย DNS reagent สำหรับวัดแอกทิวิตี (Ghose, 1987)

น้ำกลั่น	1416.0 มิลลิลิตร
3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด	10.6 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	19.8 กรัม
ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วเติม	
โฟแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต	306.0 กรัม
โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์	8.3 กรัม

เมื่อผสมเข้ากันดีแล้ว นำสารละลาย DNS reagent ที่ได้ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

3. สารละลายโซเดียมซิทเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 หรือ 5.0

ชั่งไตรโซเดียมซิทเรตไดไฮเดรตปริมาณ 14.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตรปรับ pH เป็น 4.8 หรือ 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 3 โมลาร์ ปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร

ซังไซแลน (birchwood xylan) ปริมาณ 1 กรัม ละลายในสารละลายไซเดียมซิทเรต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 ปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำไปตั้งบนเครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก ให้ความร้อนจนเดือด แล้วปล่อยให้เย็นลงโดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลา 1 คืน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยสารละลายไซเดียมซิทเรต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8

5. สารละลายสำหรับการปรับสภาพวัตถุดิบ

5.1 สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตวงสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยมวลปริมาตร 313.14 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

5.2 สารละลายไซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ซังไซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร

5.3 สารละลายไซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4 โมลาร์ (ใช้สำหรับปรับ pH) ซังไซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 160 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร

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

น้ำกลั่น	1 ลิตร
3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด	10 กรัม
ไซเดียมไฮดรอกไซด์	16 กรัม
โพแทสเซียมไซเดียมทาร์เทรต	300 กรัม

เมื่อผสมเข้ากันดีแล้ว นำสารละลาย DNS reagent ที่ได้ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

7. สารละลายไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตรซังไซเดียมคลอไรด์ ปริมาณ 9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตร

ภาคผนวก ค

การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลของพืช

การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลของพืช (Goering และ Van Soest, 1970)

1. การวิเคราะห์หา neutral detergent fiber (NDF)

1.1 นำครุชชีเบิล (sintered glass crucible) เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปล้างให้สะอาด แล้วอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักครุชชีเบิลด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 1 กรัม ใส่ในพลาสติกก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร

1.3 เติมสารละลาย neutral detergent ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ดังแสดงใน (ภาคผนวก ง) โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ปริมาณ 0.5 กรัม และเคอะไฮโดรเนพทาซีน ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}$) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปรีฟลักซ์ด้วยชุดอุปกรณ์รีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

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

1.5 ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครุชชีเบิลด้วยอะซิโตนประมาณ 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้งหรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครุชชีเบิลไม่มีสี โดยการดูดสารละลายออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศจนแห้งจากนั้นนำครุชชีเบิลไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.6 นำครุชชีเบิลออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครุชชีเบิลที่รวมกับน้ำหนัก NDF ดังนั้นจึงคำนวณหาปริมาณ neutral detergent fiber (NDF) ได้ดังสมการ

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

2. การวิเคราะห์หา acid detergent fiber (ADF)

2.1 นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วยสารละลาย neutral detergent มาใส่ในฟลาสก์ก้นกลมเพื่อทำการรีฟลักซ์ด้วยสารละลาย acid detergent (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเดคะไฮโดรแนพทาดีน ปริมาตร 2 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

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

2.3 ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครุชชีเบลด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 50 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้งหรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครุชชีเบลไม่มีสี โดยการดูดสารละลายออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศจนแห้งจากนั้นนำครุชชีเบลไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.4 นำครุชชีเบลออกมาตั้งทิ้งไว้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครุชชีเบลที่รวมกับน้ำหนัก ADF ดังนั้นจึงคำนวณหาปริมาณ acid detergent fiber (ADF) และปริมาณเฮมิเซลลูโลสได้ดังสมการ

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

$$\text{ปริมาณเฮมิเซลลูโลส(เปอร์เซ็นต์)} = \text{ปริมาณ NDF} - \text{ปริมาณ ADF}$$

3. การวิเคราะห์หา permanganate lignin (PML)

3.1 เติมสารละลาย combined permanganate (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในครุชชีเบลที่มีตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วยสารละลาย acid detergent แต่ครุชชีเบลลงในภาชนะที่มีน้ำเย็นบรรจุอยู่สูงประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้แท่งแก้วคนตัวอย่างเพื่อไม่ให้จับตัวเป็นก้อนตั้งทิ้งไว้ 45 นาที คนเป็นบางครั้ง จากนั้นดูดสารละลายออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศแล้วเติมสารละลาย combined permanganate ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงในครุชชีเบลอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้อีก 45 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกให้หมดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ

3.2 เติมสารละลาย demineralizing (ภาคผนวก ง) ลงในครุชชีเบลให้ท่วมตัวอย่างพืชที่อยู่ในครุชชีเบล ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วดูดสารละลายออกทำซ้ำจนตัวอย่างพืชเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ

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

3.4 นำครุชชีเบลออกมาตั้งทิ้งให้ไว้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครุชชีเบลที่รวมกับน้ำหนักของตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดเอาลิคินินออกแล้ว (PML) ดังนั้นจึงคำนวณหาปริมาณลิคินิน (เปอร์เซ็นต์) ได้ดังสมการ

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

4. การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

นำครุชชีเบลที่มีตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการสกัดลิคินินออกแล้วในข้อไปเผาในเตาเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตั้งทิ้งให้ไว้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครุชชีเบลรวมกับน้ำหนักเถ้าที่เหลือจากการเผา ดังนั้นจึงคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) ได้ดังสมการ

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

ภาคผนวก ง

การวัดแอกทिवิตีของเซลล์และไซลาเนส

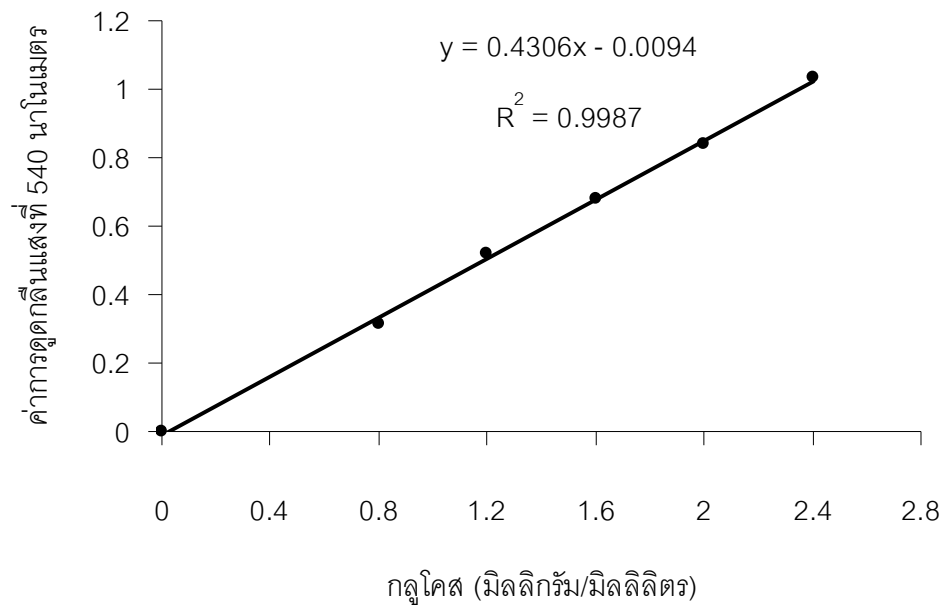
1. การวัดแอกทिवิตีของเซลล์ (FPU assay)

1.1 วิธีกรวัด

- (1) นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
- (2) เติมสารละลายโซเดียมซิทเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH4.8 (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน
- (3) นำไปปั่นในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- (4) เติมสารละลาย DNS reagent สำหรับวัดแอกทिवิตี (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- (5) ดูดสารในหลอดทดลองข้อ (4) มาปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทโดยใช้สารละลายโซเดียมซิทเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.8 - 2.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์

1.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์แอกทिवิตีของเซลล์

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 และ 2.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิทเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH4.8 เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีข้อ 1.1 โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนเอนไซม์ แต่ไม่ต้องใส่กระดาษกรองและไม่ต้องนำไปปั่น เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ (5) นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส



กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

1.3 การคำนวณหาค่าแอกทิวิตีของเซลล์

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็น กลูโคส 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

$$1 \text{ ยูนิตของเอนไซม์} = 1 \text{ ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที}$$

$$= 0.180 \text{ มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที}$$

กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{5.556}$ ไมโครโมล

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

นั่นคือระยะเวลา 60 นาที จะมีกลูโคสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ $5.556X$ ไมโครโมล

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

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จะมีกลูโคสเท่ากับ $0.0926X$ ไมโครโมล/นาที

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

ซึ่งเท่ากับ $0.185X$ ยูนิต/มิลลิลิตร (FPU/มิลลิลิตร)

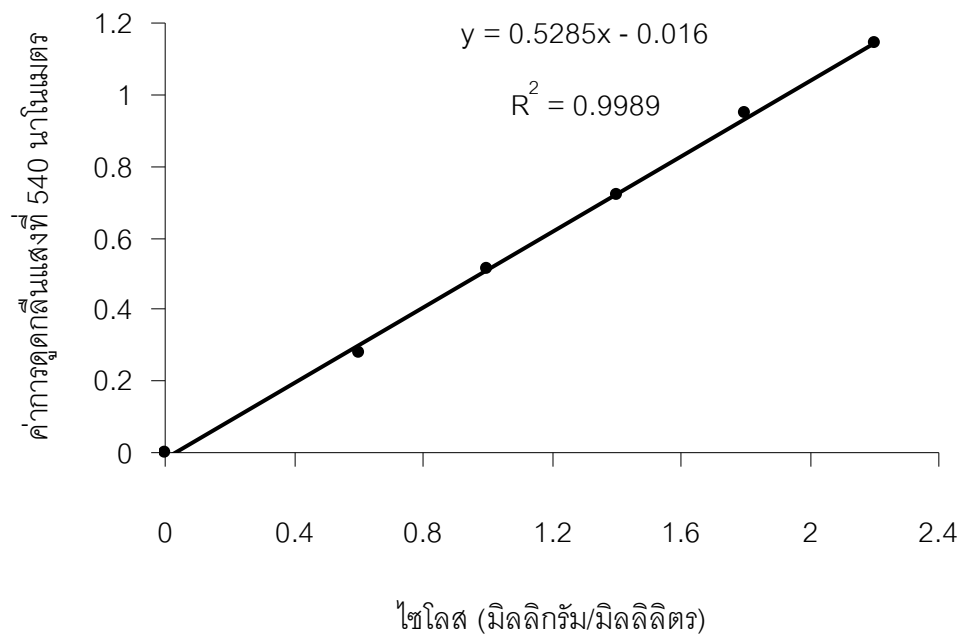
2. การวัดแอกทिवิตีของไซลาเนส

2.1 วิธีวัด

- (1) นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
- (2) เติมสารละลายไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร (ภาคผนวก ง) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- (3) นำไปป้อนในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- (4) เติมสารละลาย DNS reagent สำหรับวัดแอกทिवิตีปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- (5) ดูดสารในหลอดทดลองข้อ (4) มาปริมาตร 75 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทโดยใช้สารละลายไซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.6 - 2.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์

2.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลสสำหรับวิเคราะห์แอกทिवิตีของไซลาเนส

เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 และ 2.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายไซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH4.8 เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สารละลายน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนเอนไซม์ แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 2.1 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลส



กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลส

2.3 การคำนวณหาค่าเอกทิวติของไซลาเนส

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

$$\begin{aligned}
 1 \text{ ยูนิตของเอนไซม์} &= 1 \text{ ไมโครโมลของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที} \\
 &= 0.150 \text{ มิลลิกรัมของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที}
 \end{aligned}$$

ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{6.667}$ ไมโครโมล

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

นั่นคือระยะเวลา 30 นาที จะมีไซโลสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ $6.667Y$ ไมโครโมล

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

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จะมีไซโลสเท่ากับ $0.222Y$ ไมโครโมล/นาที

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

ซึ่งเท่ากับ $0.444Y$ ยูนิต/มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

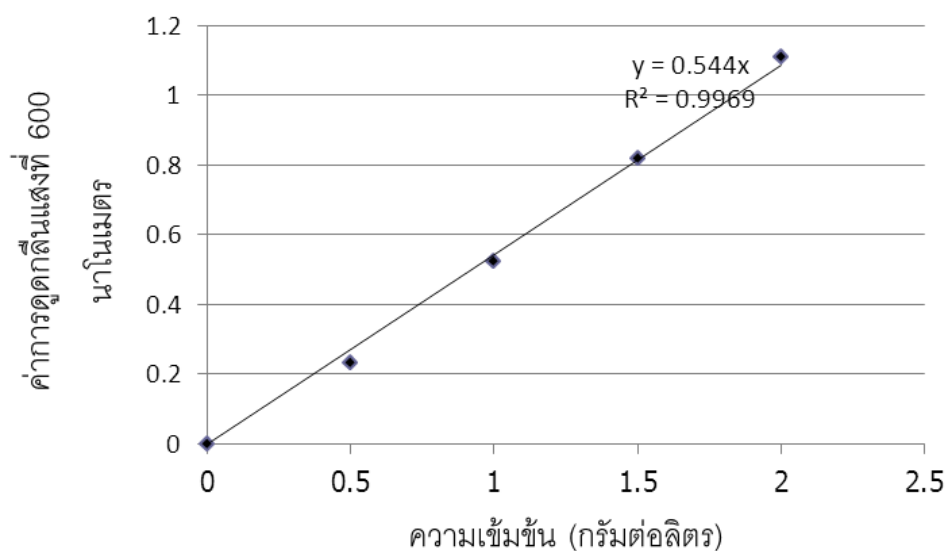
วิธีการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959)

(1) เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเจือจางจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

(2) เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดของไมโครเพลท

(3) เติมสารละลาย DNS reagent ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับแบลนด์ คือ ใช้ น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส

(4) ปิดฝาไมโครเพลทแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการเจือจางสารในไมโครเพลทดังกล่าวก่อนที่จะนำไปวัด โดยดูดสารนั้นขึ้นมา 50 ไมโครลิตร นำไปใส่ไมโครเพลทอีกอัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไป แล้วผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-2.0 กรัมต่อลิตร



กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

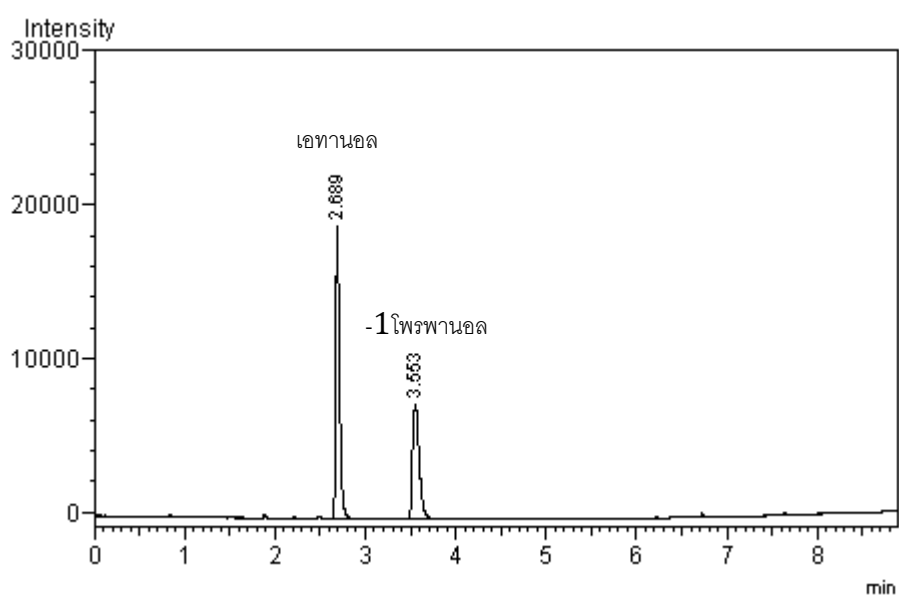
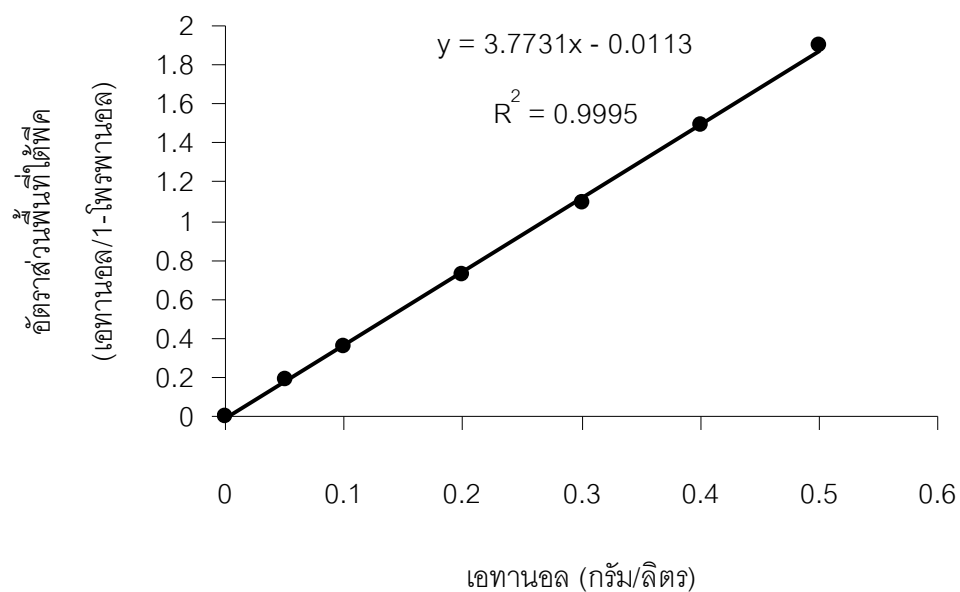
2. กราฟมาตรฐานเอทานอล

วิธีการทำกราฟมาตรฐานเอทานอล

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

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

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



ตัวอย่างโครมาโทแกรมของเอทานอลและ 1-โพรพานอล

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

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณ
น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

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

กำหนดให้ D คือปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลาย (กรัม/
กรัมของฟางข้าวแห้ง)

E คือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย (กรัม/กรัมของ
ฟางข้าวแห้ง)

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีเมื่อคำนวณจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายของฟางข้าวมาคำนวณหา
ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎีดังสมการ

$$\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี} = \frac{F \times 0.511}{0.789}$$

กำหนดให้ F คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพนิดา สุริยะพันธ์ เกิดวันที่ 14 มกราคม พ.ศ. 2529 ที่โรงพยาบาลมหาราช นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา ระดับปริญญาตรีสำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2550 จากนั้นได้เข้าศึกษา ต่อระดับปริญญาโทในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2554 ได้เผยแพร่ ผลงานวิจัยบางส่วนในงานประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 49 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัด กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 โดยนำเสนอแบบโปสเตอร์ในหัวข้อเรื่อง การคัดแยกยีสต์ที่ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล และได้ตีพิมพ์ฉบับสมบูรณ์ใน รายงานการประชุม นอกจากนี้ได้นำเสนอด้วยโปสเตอร์ในงาน 15th Biological Sciences Graduate Congress ณ University of Malaya ประเทศมาเลเซีย ระหว่างวันที่ 15-17 ธันวาคม พ.ศ. 2551 ในหัวข้อเรื่อง Screening of Xylose-Utilizing Yeasts from Soils in Thailand for Ethanol Production