รายงานผลการดำเนินงาน
ปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลจากยีสต์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่โครงการ อพ.สธ.

ผู้รับผิดชอบโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชมภูนุช กลิ่นวงษ์

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ

สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การผลิตเซลลูโลสิ[illegible]อทานอลจากยีสต์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่โครงการ อพ.สธ

Cellulosic Ethanol Production Using Isolated Yeast from Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

ผู้ดำเนินโครงการวิจัย

รศ. ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชมภูนุช กลิ่นวงษ์

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่นำชีวมวลพืชมาทำการทดลองผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลด้วยยีสต์โดยนำหญ้ามาปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพจนได้เป็นผง จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น พบว่า ปริมาณความชื้นของหญ้าใบเนเปียร์แคระ มีค่าสูงที่สุด คือ 77.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนหญ้าบาน่ามีปริมาณความชื้นน้อยที่สุด องค์ประกอบของชีวมวลพืชประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ คือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน พบว่า หญ้าเนเปียร์ แพงโกล่า และ บาน่า มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงที่สุด ส่วนเนเปียร์ยักษ์และกินนีสีม่วง มีปริมาณของเฮมิเซลลูโลสต่ำที่สุด จากนั้นนำปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และคำนวณเป็นปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี พบว่าหญ้าแพงโกล่ามีค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีสูงที่สุด เอนไซม์เซลลูเลสผลิตด้วยเชื้อรา *T. reesei* ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟาเซลลูโลส และไซแลเนส การวัดค่าแอกทิวิตีเซลลูเลสโดยใช้ birchwood xylan เป็นสารตั้งต้น พบว่าเซลลูเลสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 1.190 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 1.071 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไซแลเนสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 86.961 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 56.866 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และจะนำเซลลูเลส และไซแลเนสไปย่อยสลายชีวมวลพืชต่อไป

การย่อยสลายหญ้าด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลเนส พบว่าเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในหญ้าจะสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 70-80 เปอร์เซ็นต์ การผลิตเอทานอลจากหญ้าด้วยการหมักด้วย *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* พบว่า ใบเนเปียร์ ใบเนเปียร์แคระ และใบบาน่า มีผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด คิดเป็น 20-30 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี เมื่อนำผลผลิตของหญ้ามาคำนวณ พบว่า ใบเนเปียร์แคระมีค่าสูงที่สุดเป็น 435.29 ลิตร/ไร่/ปี

คำสำคัญ : จุลินทรีย์เซลลูโลสิก หญ้า เซลลูโลสิกเอทานอล

สารบัญ

เนื้อหา **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ ..... ข

บทคัดย่อ ..... ค

สารบัญ ..... ง

1. บทนำ 1

2. วัตถุประสงค์ 1

3. วิธีดำเนินการวิจัยและแผนปฏิบัติงาน 2

3.1 วิธีการศึกษา 2

3.1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย 2

3.1.2 หาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบของชีวมวลพืช 2

3.1.3 วิเคราะห์ค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี 2

3.1.4. การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส 2

3.1.5. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 3

3.1.6 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF 4

4. สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล 4

5. ผลการดำเนินงาน 5

5.1 ตัวอย่างหญ้าที่ใช้ในงานวิจัย 5

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบของชีวมวลพืช 5

5.3 การวิเคราะห์ค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี 7

5.4 การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส 8

5.5 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 8

5.6 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการSSCF 10

6. สรุปและวิจารณ์ผล 12

7. เอกสารอ้างอิง 14

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลในหญ้าแต่ละชนิด 7
ตารางที่ 2 ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ของเซลลูเลสและไซแลเนสจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 8
ตารางที่ 3 ปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลายเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายในหญ้าแต่ละชนิด 9
ตารางที่ 4 ผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF ของใบเนเปียร์ ใบเนเปียร์แคระ ใบเนเปียร์ยักษ์ ใบบาน่า กินนีสีม่วง และแพงโกล่า 12

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ **หน้า**

ภาพที่ 1 ปริมาณความชื้นของหญ้าทั้ง 8 ชนิด.....6
ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเป็นน้ำตาลในหญ้า 8 ชนิด.....9
ภาพที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายในหญ้า 8 ชนิด 10
ภาพที่ 4 ผลผลิตเอทานอลคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมกับไซโลส.....11

1. บทนำ

ป่าธรรมชาติเป็นแหล่งของความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ในปัจจุบันป่าธรรมชาติได้ถูกทำลายจนเสื่อมโทรม จึงต้องวางแผนจัดการเพื่อปรับปรุงพื้นที่ป่าให้คืนสภาพ ซึ่งการปรับปรุงคุณภาพดินก็มีส่วนสำคัญ การที่ดินจะมีความสมบูรณ์ได้ ต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากอินทรีย์วัตถุที่ทับถมกันให้เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการฟื้นฟูสภาพดินให้มีความสมบูรณ์ ดังนั้นการศึกษากลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ในดินจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการจัดการปรับปรุงพื้นที่ป่า เพื่อแก้ไขสภาพป่าเสื่อมโทรมที่เป็นอยู่ให้มีสภาพดังเดิม จุลินทรีย์ต่างๆในดินจึงเป็นดัชนีที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของการฟื้นฟูสภาพดินว่ามีความสมบูรณ์และคงทนยาวนานเพียงใด นอกจากนี้เชื้อราในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายบางชนิด สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาพันธุศาสตร์และอาจนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์กับมนุษย์ได้ จุลินทรีย์เป็นทรัพยากรมีค่าชนิดหนึ่งในดินบทบาทของจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีความสำคัญและมีความหลากหลายโดยเฉพาะบทบาทการเป็นผู้ย่อยสลายและปรับปรุงดิน ให้มีสารอินทรีย์เหมาะกับการเจริญของพืชและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆที่อยู่ในดิน การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันมีความสำคัญเนื่องจากเป็นแหล่งพรรณพืชธรรมชาติและสัตว์ที่หายากต่างๆ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เมื่อประกอบกันเป็นระบบนิเวศในธรรมชาติและทั้งนี้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยเฉพาะที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซโลสในธรรมชาติมีความสำคัญมาก เนื่องจากวัสดุธรรมชาติที่พบในป่ามักจะประกอบไปด้วยวัสดุจากพืชซึ่งประกอบไปด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางเคมีและชีวภาพเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส และไซโลสน้ำตาลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการหมักต่อไปได้ การนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และศึกษาความหลากหลายนั้นหากต้องผ่านกระบวนการทางเคมีก่อนนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีอันตรายปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วย ดังนั้นกระบวนการทางชีวภาพจึงมีบทบาทสำคัญทางการเกษตรและการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อการประยุกต์ทางการเกษตรและการหมักจะเป็นหนทางหนึ่งในการพัฒนาการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืน เพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้มากขึ้น

2. วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสโดยใช้เซลลูโลสิกยีสต์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลจากยีสต์ที่คัดแยกได้ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

3.วิธีดำเนินการวิจัยและแผนปฏิบัติงาน

3.1วิธีการศึกษา

3.1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย

เก็บตัวอย่างหญ้าสดจำนวน 8 ชนิด นำไปปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ โดยนำตัวอย่างไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปตัดให้มีขนาดเล็กลงและบดด้วยเครื่องบดละเอียด แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 0.4 มิลลิเมตร จนได้เป็นผงออกมา

3.1.2 หาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบของชีวมวลพืช

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

3.1.3 วิเคราะห์ค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

นำปริมาณเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสของพืชแต่ละชนิดที่หาได้จากข้อ 3.1.2 มาคำนวณหาค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี ดังนี้

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

3.1.4. การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส

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

3.1.4.1 ผลิตเซลลูเลสใช้อาหารเหลวสูตร Mandels medium (Mandels & Weber, 1969) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟาเซลลูโลส บ่มเชื้อในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แยกเส้นใยออก นำส่วนใสที่เป็น crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของเซลลูเลสโดยวัดแอกทิวิตีด้วยวิธี FPU assay (Ghose, 1987) ที่มีสารตั้งต้นเป็นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์หรือยูนิต คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน)

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

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

3.1.5. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

3.1.5.1 นำพืชที่เป็นผงแล้วมา 0.6 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 200 มิลลิลิตร โดยทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ alkaline peroxide ซึ่งแต่ละฟลาสก์จะใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรปริมาณ 4 มิลลิลิตรที่มีการปรับ pH เป็น 11.5 ด้วย 0.5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อน แล้วค่อยเติม alkaline peroxide pH 11.5 ลงไปในฟลาสก์นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นปรับ pH เป็น 4.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Saha & Cotta, 2007)

3.1.5.2 เติม 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ (pH 4.8) 5 มิลลิลิตร เติมเซลลูเลสจำนวน 30 ยูนิต/มิลลิลิตร และไซแลเนสจำนวน 600 ยูนิต/มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.1.5.3 เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยปั่นเหวี่ยงแยกกากที่เหลือออกนำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดโดยใช้วิธี DNS method (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959)

3.1.5.4 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเป็นน้ำตาล (percent conversion) ดังนี้

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

3.1.5.5 คัดเลือกพืชที่มี percent conversion สูงที่สุดมาทำการการผลิตเอทานอลในกระบวนการ SSF และ SSCF ต่อไป

3.1.6 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF

3.1.6.1 นำพืชที่บดเป็นผงแล้วมา 1.5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ alkaline peroxide ตามวิธีในข้อ 5.1 แต่ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเติม 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ (pH 5.0) และเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ ประกอบด้วย yeast extract

3 g/l, malt extract 3 g/l และ $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความ ดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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

3.1.6.3 ผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF

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

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

3.1.6.5 เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้จริงเมื่อเทียบกับค่าของเอทานอลที่ผลิตได้ตามทฤษฎี ดังนี้

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

4.สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

นำตัวอย่างพืชมาทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.ผลการดำเนินงาน

5.1 ตัวอย่างหญ้าที่ใช้ในงานวิจัย

ได้ทำการเก็บตัวอย่างหญ้าชนิดต่าง ๆ

1. หญ้าอาหารสัตว์ 8 ชนิด

1.1 หญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*)

- เก็บมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ลำปาง

1.2 หญ้าเนเปียร์แคระ (*P. purpureum* cv. Mott)

- เก็บมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ลำปาง

1.3 หญ้าเนเปียร์ยักษ์ (*P. Purpureum x P. americanum*)

- เก็บมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบุรี

1.4 หญ้าบาน่า (*P. Purpureum x P. americanum*)

- เก็บมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ลำปาง

1.5 หญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum* TD 58)

- เก็บมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบุรี

1.6 หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*)

- เก็บมาจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

1.7 หญ้าแพงโกล่า (*Digitaria decumbens*)

- เก็บมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบุรี

1.8 หญ้าอะตราตั้ม (*Paspalum atratum*)

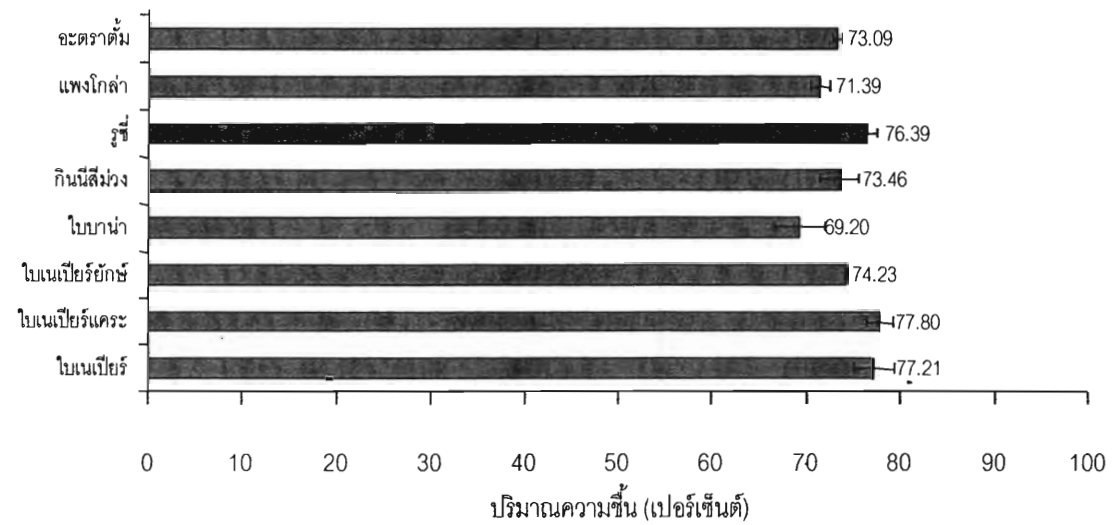
- เก็บมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ลำปาง

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและองค์ประกอบของชีวมวลพืช

จากตัวอย่างหญ้าทั้งหมด 8 ชนิด พบว่ามีหญ้า 4 ชนิด คือ เนเปียร์ เนเปียร์แคระ เนเปียร์ยักษ์ บาน่า มีลำต้นขนาดใหญ่และมีใบแยกออกจากลำต้นชัดเจนจึงใช้ส่วนของใบในการทดลองเท่านั้น ส่วนหญ้าชนิดอื่น ๆ ได้ใช้ทั้งใบและลำต้นรวมกัน เนื่องจากมีปริมาณของใบมากกว่าลำต้น และลำต้นมีขนาดเล็กมาก ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณความชื้นของหญ้าใบเนเปียร์แคระ มีค่าสูงที่สุด คือ 77.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนหญ้าบาน่ามีปริมาณความชื้นน้อยที่สุด คือ 69.2 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 1

ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ คือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าหญ้าเนเปียร์ แพงโกล่า และ บาน่า มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงที่สุดเป็น 36.46, 35.46 และ 35.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเนเปียร์ยักษ์และกินนีสีม่วง มีปริมาณของเฮมิเซลลูโลสต่ำที่สุดเป็น 31.13 และ 31.26 เปอร์เซ็นต์

ส่วนปริมาณลิกนินในหญ้าทั้ง 8 ชนิด พบว่า อะตราตั้ม มีปริมาณสูงที่สุดเป็น 5.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเนเปียร์ยักษ์มีปริมาณต่ำที่สุดเป็น 3.10 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 ปริมาณความชื้นของหญ้าทั้ง 8 ชนิด

ตารางที่ 1 ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลในหญ้าแต่ละชนิด

หญ้า	ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวล (เปอร์เซ็นต์)														
	เฮมิเซลลูโลส			เซลลูโลส			ลิกนิน			เถ้า			อื่นๆ		
ใบเนเปียร์	36.46	±	1.19	32.92	±	1.48	3.60	±	0.67	0.33	±	0.14	26.69	±	3.04
ใบเนเปียร์แคระ	34.19	±	1.24	35.64	±	0.21	3.66	±	0.20	0.13	±	0.12	26.38	±	1.38
ใบเนเปียร์ยักษ์	31.13	±	0.57	32.01	±	0.14	3.10	±	0.04	1.65	±	0.04	32.11	±	0.53
ใบบาน่า	35.12	±	1.62	33.93	±	2.27	3.55	±	0.34	0.18	±	0.01	27.21	±	3.71
กินนีสีม่วง	31.26	±	1.91	33.40	±	0.74	4.00	±	0.54	0.61	±	0.08	30.73	±	2.10
รูซี่	34.01	±	0.81	33.64	±	0.92	4.56	±	0.17	0.27	±	0.12	27.52	±	1.67
แพงโกล่า	35.46	±	1.27	33.07	±	0.70	4.47	±	0.61	0.28	±	0.01	26.72	±	1.60
อะตราตั้ม	32.60	±	0.53	34.87	±	0.61	5.6	±	0.22	0.31	±	0.14	27.75	±	0.97

5.3 การวิเคราะห์ค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี

ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าอาหารสัตว์ ได้ข้อมูลมาจากกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2549) และ วารุณี พานิชผล และคณะ (2537) ตามลำดับ พบว่า แพงโกล่ามีผลผลิตสูงที่สุด คือ 6,000 กิโลกรัม/ไร่/ปี รองลงมาเป็นเนเปียร์ เนเปียร์แคระ เนเปียร์ยักษ์ และบาน่า ซึ่งมีผลผลิตเท่ากัน คือ 3,500 กิโลกรัม/ไร่/ปี ซึ่งเป็นผลผลิตของลำต้นและใบรวมกัน แต่ในการทดลองได้ใช้เฉพาะส่วนของใบเท่านั้น ดังนั้นผลผลิตในส่วนของใบจะมีค่าเป็น 1,225 กิโลกรัม/ไร่/ปี สำหรับใบเนเปียร์ ใบเนเปียร์ยักษ์ และใบบาน่า (มีน้ำหนักใบเป็น 35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทั้งหมดโดยประมาณ) และมีค่าเป็น 2,800 กิโลกรัม/ไร่/ปี สำหรับใบเนเปียร์แคระ (มีน้ำหนักใบเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทั้งหมดโดยประมาณ) จากการศึกษาองค์ประกอบทางชีวมวลของหญ้าชนิดต่าง ๆ สามารถนำปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในหญ้าแต่ละชนิดมาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสได้ตามลำดับ (เซลลูโลส 1 กรัม เปลี่ยนเป็นกลูโคสได้ 1.111 กรัม และเฮมิเซลลูโลส 1 กรัม เปลี่ยนเป็นไซโลสได้ 1.136 กรัม) จากนั้นคำนวณเป็นปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี (น้ำตาล 1 กรัม เปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 0.51 กรัม) แล้วคูณด้วยผลผลิตของหญ้า (กิโลกรัม/ไร่/ปี) พบว่า หญ้าแพงโกล่ามีค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีสูงที่สุด คือ 2,361.54 กิโลกรัม/ไร่/ปี หรือเท่ากับ 2,993.08 ลิตร/ไร่/ปี รองลงมา คือ อะตราตั้ม เนเปียร์แคระ และกินนีสีม่วง โดยมีค่าเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีเป็น 1,161.62 1,122.26 และ 1,113.25 กิโลกรัม/ไร่/ปี ตามลำดับ หรือเท่ากับ 1,472.27 1,422.38 และ 1,410.96 ลิตร/ไร่/ปี ตามลำดับ

5.4 การผลิตเซลลูเลสและไซแลเนส

เมื่อนำเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 มาผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลสซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟาเซลลูโลส และไซแลเนส และวัดค่าแอกทิวิตี พบว่าเซลลูเลส มีค่าแอกทิวิตีเป็น 1.190 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 1.071 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไซแลเนสมีค่าแอกทิวิตีเป็น 86.961 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 56.866 ยูนิต/มิลลิกรัโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ของเซลลูเลสและไซแลเนสจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081

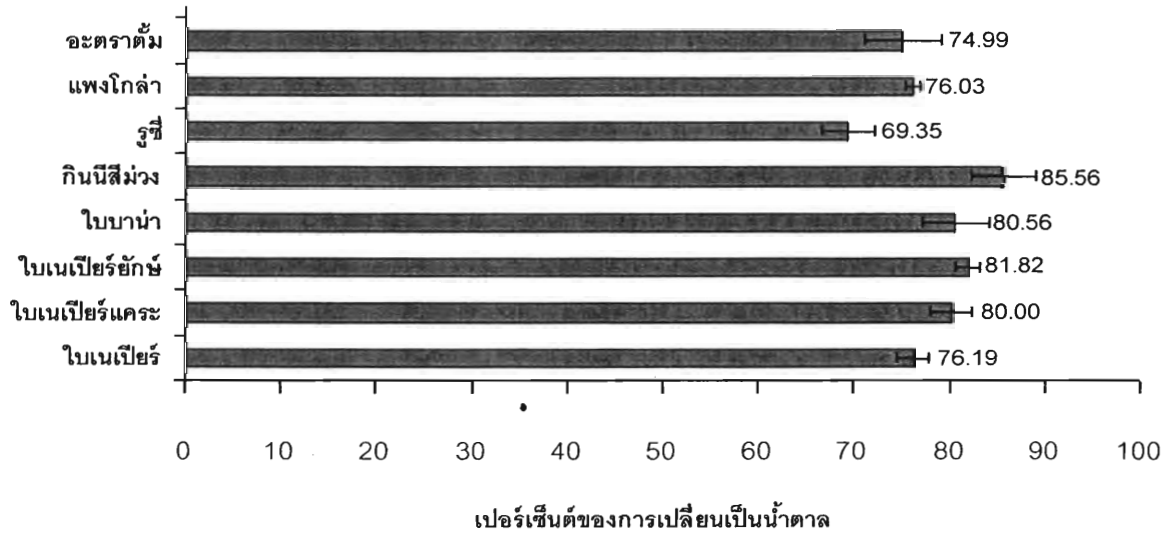
เอนไซม์	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
เซลลูเลส	1.190	1.111	1.071
ไซแลเนส	86.961	1.529	56.866

5.5 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

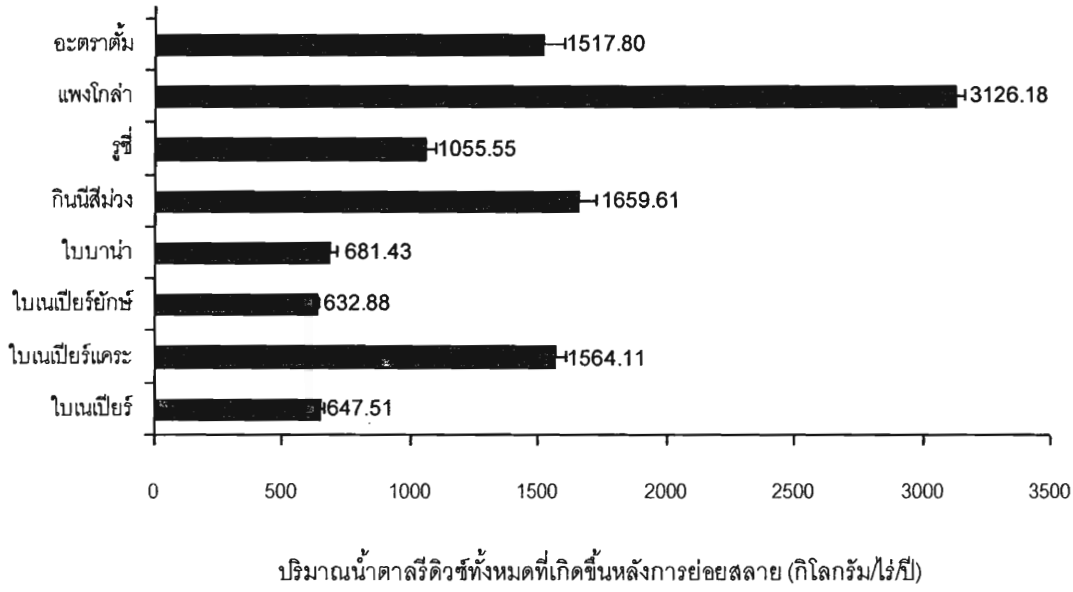
จากการย่อยสลายหญ้าจำนวน 8 ชนิด โดยใช้วิธีการปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางเคมีแล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนส พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายของหญ้าแต่ละชนิดมีค่าดังแสดงในตารางที่ 3 โดยหญ้าส่วนใหญ่จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วงระหว่าง 500 ถึง 600 มิลลิกรัม/กรัมของหญ้าแห้ง ซึ่งเป็นความเข้มข้นในช่วง 4-5 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลายแล้วคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (ภาพที่ 4) พบว่า ส่วนใหญ่จะสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 70-80 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้ค่อนข้างใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นในการพิจารณาเพื่อเลือกชนิดของหญ้าเพื่อนำไปหมักต่อไปจะนำผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ของหญ้าทั้ง 8 ชนิดมาคำนวณด้วย ผลการคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายแสดงในภาพที่ 3 ดังนั้นจึงได้เลือกหญ้าจำนวน 8 ชนิด ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดเกิน 630 กิโลกรัม/ไร่/ปี เรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ แพงโกล่า กินนีสีม่วง ใบเนเปียร์แคระ อะตราตั้ม รูซี่ ใบบาน่า ใบเนเปียร์ และใบเนเปียร์ยักษ์ ตามลำดับ มาทำการศึกษาในขั้นตอนการหมักต่อไป

ตารางที่ 3 ปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลายเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายในหญ้าแต่ละชนิด

หญ้า	ปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสที่มีก่อนการย่อยสลาย (มิลลิกรัม/กรัมของหญ้าแห้ง)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลาย					
				มิลลิกรัม/กรัมของหญ้าแห้ง			กรัม/ลิตร		
ใบเนเปียร์	693.80	±	26.70	528.58	±	11.76	4.14	±	0.34
ใบเนเปียร์แคระ	698.30	±	14.50	558.61	±	15.58	4.13	±	0.34
ใบเนเปียร์ยักษ์	631.40	±	7.10	516.63	±	8.82	4.04	±	0.32
ใบบาน่า	690.50	±	28.90	556.27	±	24.94	4.36	±	0.46
กินนีสีม่วง	646.60	±	26.50	553.20	±	22.22	4.34	±	0.54
รูซี่	676.50	±	17.30	469.13	±	19.09	3.97	±	0.61
แพงโกล่า	685.30	±	19.70	521.03	±	5.78	4.09	±	0.39
อะตราตั้ม	674.70	±	11.40	213.19	±	27.58	4.01	±	0.53



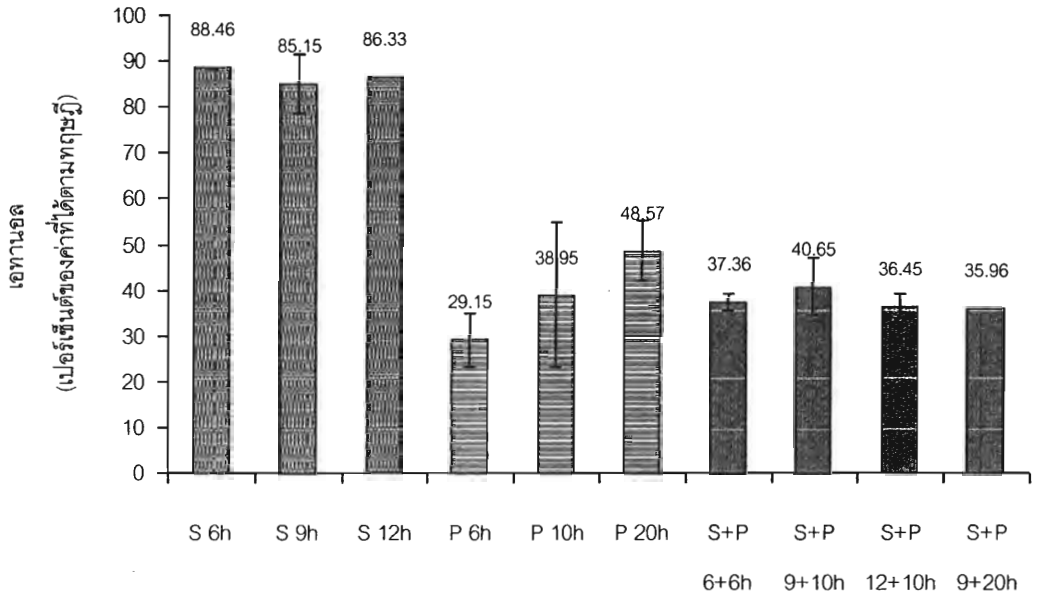
ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเป็นน้ำตาลในหญ้า 8 ชนิด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย alkaline peroxide (H_2O_2 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร; pH 11.5; 35 องศาเซลเซียส; 24 ชั่วโมง) แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสลายในหญ้า 8 ชนิด เมื่อคำนวณกับผลผลิตของหญ้าแต่ละชนิด (กิโลกรัม/ไร่/ปี)

5.6 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF

จากการศึกษาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล พบว่า ระยะเวลาการเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ที่แตกต่างกันส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลได้แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4 การใช้ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลา 9 ชั่วโมง ร่วมกับ *P. stipitis* ที่ระยะเวลา 10



ชั่วโมง ในการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมกับไซโลสอย่างละ 3.46 กรัม ทำให้ได้เอทานอลสูงที่สุด คือ 40.65 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์ที่อายุดังกล่าวมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตเอทานอลจากหญ้า ผลผลิตเอทานอลที่ได้มีค่าดังตารางที่ 4 ใบเนเปียร์ ใบเนเปียร์แคระ และใบบาน่า มีผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.71-0.98 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับ 0.09-0.12 กรัม/กรัมของพืช จากการคำนวณทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธี Duncan พบว่า หญ้าทั้ง 4 ชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05) เมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี พบว่า หญ้าทั้ง 4 ชนิดนี้มีผลผลิตเอทานอลอยู่ในช่วง 20-30 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี ส่วนการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมกับไซโลสอย่างละ 3 กรัม ได้ผลผลิตเอทานอลประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี เมื่อพิจารณาผลผลิตของหญ้าแต่ละชนิด (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ร่วมด้วยจะได้เอทานอล (ลิตร/ไร่/ปี) พบว่าใบเนเปียร์แคระมีค่าสูงที่สุดเป็น 435.29 ลิตร/ไร่/ปี

ภาพที่ 4 ผลผลิตเอทานอลคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมกับไซโลสอย่างละ 3.46 กรัม ปริมาตรฟลาสก์ละ 150 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* (S) และ *P. stipitis* (P) ที่อายุ 6, 9, 10,12 และ 20 ชั่วโมง (6h, 9h, 10h,12h และ 20h) ในการหมักแบบร่วมกัน (S+P) และไม่ร่วมกัน

ตารางที่ 4 ผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการ SSCF ของใบเนเปียร์ ใบเนเปียร์แคระ ใบเนเปียร์ยักษ์ ใบบาน่า กินนีสีม่วง และแพงโกล่า

หญ้า	ผลผลิตเอทานอล	
	กรัม/ลิตร	กรัม/กรัมของพืชหรือสับสเตรท
ใบเนเปียร์	0.97 ± 0.31[a]	0.12 ± 0.04[a]
ใบเนเปียร์แคระ	0.98 ± 0.16[a]	0.12 ± 0.02[a]
ใบเนเปียร์ยักษ์	0.40 ± 0.13[b,c]	0.05 ± 0.02[b,c]
ใบบาน่า	0.87 ± 0.14[a]	0.11 ± 0.02[a]
กินนีสีม่วง	0.18 ± 0.07[c]	0.02 ± 0.01[c]
แพงโกล่า	0.21 ± 0.05	0.03 ± 0.01[c]
น้ำตาล (กลูโคส 3 กรัม+ไซโลส 3 กรัม)	11.56 ± 1.46	0.09 ± 0.03[a,b]

ตัวอักษร a b c d หมายถึง ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 เรียงลำดับจากค่ามากไปหาน้อย โดยเปรียบเทียบระหว่างหญ้า 7 ชนิด

6. สรุปและวิจารณ์ผล

หญ้าที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นหญ้าที่มีความสูงตั้งแต่ 1 เมตรขึ้นไป ข้อดี คือ เมื่อนำมาทำเป็นหญ้าแห้งจะได้ปริมาณของมวลที่มากซึ่งเหมาะในการนำมาใช้ประโยชน์ หญ้าจัดเป็นพืชพลังงานที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลายครั้งใน 1 ปี จึงไม่จำเป็นต้องปลูกทดแทนใหม่บ่อย ๆ และใน 1 พื้นที่จะมีปริมาณหญ้าขึ้นอยู่เยอะเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นจึงทำให้ได้ผลผลิตมาก

หญ้าเนเปียร์ทั้ง 4 ชนิด ที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นเป็นหญ้าที่ปลูกไว้เป็นเวลานานแล้วจึงทำให้ลำต้นมีความแข็งมาก ในการทดลองจึงได้เลือกเฉพาะส่วนใบมาใช้ และในการคำนวณที่มีค่าของผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่/ปี) มาเกี่ยวข้องจะหักส่วนของลำต้นออกไปจึงทำให้ปริมาณผลผลิตของหญ้ามีค่าลดลง หากจะนำหญ้านี้มาใช้จริงต่อไปในอนาคตจึงควรที่จะเก็บเกี่ยวในช่วงอายุที่ไม่มากจนเกินไปเพื่อให้ใช้ประโยชน์ได้ทั้งต้น นอกจากนี้ยังจะสามารถเก็บเกี่ยวได้มากครั้งใน 1 ปีอีกด้วย

ปริมาณองค์ประกอบชีวมวลของพืชในหญ้าแต่ละชนิดค่อนข้างมีปริมาณของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสรวมกันสูงกว่าพืชชนิดอื่น ยกตัวอย่าง เช่น แกลบมีปริมาณรวมเป็น 47.58 ± 0.85 เปอร์เซ็นต์ (Saha และคณะ, 2005) แต่หญ้าที่ทำการศึกษาพบว่ามีปริมาณรวมของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสอยู่ในช่วง 60-80 เปอร์เซ็นต์ จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ย่อยสลายให้กลายเป็นน้ำตาลสำหรับหมักเป็นไบโอเอทานอล การนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน (Cara และคณะ, 2006) งานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี คือ บดให้หญ้ากลายเป็นผงก่อนแล้วตามด้วย alkaline peroxide pretreatment วิธีนี้ไม่ทำให้เกิด furfural และ hydroxymethyl furfural ขึ้นในระหว่างการปรับสภาพ (Saha และ Cotta, 2007) ซึ่งสารทั้ง 2 ตัวนี้มักเกิดขึ้นในกระบวนการที่มีการใช้กรดปรับสภาพหรือใช้กรดในการย่อยสลาย จัดเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล (Purwadi, 2006) ผลการย่อยสลายหญ้า พบว่า หญ้าส่วนใหญ่จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วงระหว่าง 500 ถึง 600 มิลลิกรัม/กรัมของหญ้าแห้ง และเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลอยู่ในช่วง 70-

80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Saha และ Cotta (2007) ที่สามารถเปลี่ยนแกลบไปเป็นน้ำตาลได้ 96 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ alkaline peroxide ที่มีสภาวะในการปรับสภาพเช่นเดียวกัน แต่ได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสูงกว่า เนื่องจากใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสลายซึ่งมีแอกทิวิตีสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. reesei* มาก

การหมักน้ำตาลกลูโคสผสมกับไซโลสอย่างละ 3.46 กรัม ได้ผลผลิตเอทานอลประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี จะเห็นได้ว่าการใช้ยีสต์ร่วมกัน 2 ชนิด ทำให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลลดลงเมื่อเทียบกับการใช้ *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียวที่อายุ 6, 9 และ 12 ชั่วโมง และการใช้ *P. stipitis* เพียงชนิดเดียวที่อายุ 20 ชั่วโมง ดังนั้นเอทานอลที่ลดลงอาจเกิดจากการที่เชื้อทั้ง 2 ชนิดแข่งขันกันเองในการใช้สารอาหารและออกซิเจน นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการหมักของยีสต์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันอาจยังไม่เหมาะสม เนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย เช่น ปริมาณของเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ สูตรอาหาร และความเข้มข้นของสารอาหาร เป็นต้น ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เอทานอลที่ได้ไม่เป็นไปตามทฤษฎี

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากหญ้า 6 ชนิด คือ ใบเนเปียร์ ใบเนเปียร์แคระ ใบเนเปียร์ยักษ์ ใบบาน่า กินนีสีม่วง และแพงโกล่า พบว่า ใบเนเปียร์ ใบเนเปียร์แคระ และใบบาน่า มีผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด คิดเป็น 20-30 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี เมื่อนำผลผลิตของหญ้ามาคำนวณ พบว่า ใบเนเปียร์แคระมีค่าสูงที่สุดเป็น 435.29 ลิตร/ไร่/ปี หรือคิดเป็น 30.6 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎี ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากหญ้า 6 ชนิดที่ได้ทำการหมักไปแล้ว ใบเนเปียร์แคระจึงน่าจะเป็นหญ้าที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการหมักได้ต่อไปในอนาคต และควรที่จะมีการวิจัยโดยนำหญ้าทั้งต้นมาใช้ในการหมักเพื่อดูผลผลิตเอทานอลที่เกิดขึ้นและปรับปรุงกระบวนการหมักเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อไปโดยอาจศึกษาวิธีการปรับสภาพพืชเพื่อให้เอนไซม์ย่อยได้ดียิ่งขึ้น เกิดสารยับยั้งน้อยหรือไม่เกิดเลย ปริมาณเอนไซม์และปริมาณบัฟเฟอร์ที่ใช้ เป็นต้น

7. เอกสารอ้างอิง

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

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.

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

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

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

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

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

Purwadi, R. 2006. Continuous Ethanol Production from Dilute-acid Hydrolyzates: Detoxification and Fermentation Strategy. Doctoral dissertation, Ph.D., Chalmers University of technology, Göteborg.

Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., and Wu, Y. V. 2005. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. Biotechnology Progress 21: 816-822.

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.

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

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ ภาษาไทย นาย วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

ภาษาอังกฤษ Mr. Warawut Chulalaksananukul

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3101502232077

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.

4.หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์: 02-2185482 โทรสาร: 02-2185482 E-mail : warawut.c@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญาและประกาศนียบัตร	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2523	ระดับปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	พันธุศาสตร์	พันธุศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ประเทศไทย
2532	ระดับปริญญาโท	D.E.A. (Microbiology)	Microbiology		INSA	France
2536	ระดับปริญญาเอก	Ph.D.	Microbiology-Biotechnology		INSA	France

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญนอกเหนือจากสาขาที่จบการศึกษา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ข้อเสนอการวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย -

ลำดับ	ชื่อเรื่อง	ปีที่พิมพ์	สถานภาพ

		ในการวิจัย
1	การผลิตอาหารสูตรผสมโปรไบโอติกแบคทีเรียและโปรตีนจากเมล็ดพืชเพื่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของปลาเก๋า ระยะที่ 2	หัวหน้าโครงการวิจัย
2	การผลิตไบโอดีเซลชุมชนเกาะสีชังจากน้ำมันที่ใช้แล้วระยะที่ 2	หัวหน้าโครงการวิจัย
3	โครงการจิตอาสาทำความดีตามรอยพ่อ:ต้นแบบคุ้มครองผู้บริโภคด้านอาหารสุขภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
4	โครงการสนับสนุนทางวิชาการเพื่อความปลอดภัยชีวภาพในกระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์และเทคโนโลยีชีวภาพของบริษัท พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด (มหาชน)	ผู้ร่วมโครงการวิจัย

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อเรื่องและสถานภาพในการทำวิจัย

ลำดับ	ชื่อเรื่อง	ปีที่พิมพ์	สถานภาพในการวิจัย
1	การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เซลลูโลสิกเพื่อการย่อยสลายเซลลูโลส		หัวหน้าโครงการย่อย
2	เซลลูโลสิกเพื่อการย่อยสลายเซลลูโลส: ปีที่ 3 การนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตร		หัวหน้าโครงการย่อย
3	การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยเซลลูโลสิกยีสต์ในถังหมัก 5 ลิตร		หัวหน้าโครงการย่อย

7.3งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

1. Theerachat, M., Tanapong, P. and **Chulalaksananukul, W.** "The culture or co-culture of Candida rugosa and Yarrowia lipolytica strain rM-4A, or incubation with their crude extracellular lipase and laccase preparations, for the biodegradation of palm oil mill wastewater." *Int. Biodeter. Biodegr.* 121 (2017) : 11-18.
2. Lertsriwong, S., Comwien, J., **Chulalaksananukul, W.** and Glinwong, C.

"Isolation and and identification of anaerobic bacteria from coconut wastewater factory for ethanol, butanol and 2, 3 butanediol production." *Int. Biodeter. Biodegr.* 119 (2017) : 461-466.

3. Wongwatanapaiboon, J., Klinbunga, S., Ruangchainikom, C., Thummadetsak, G., Chulalaksananukul, S., Marty, A. and **Chulalaksananukul, W.** Cloning, expression, and characterization of *Aureobasidium melanogenum* lipase in *Pichia pastoris. Biosci. Biotechnol. Biochem*, 80, 11 (2016) : 2231-2240.
4. Wongwatanapaiboon, J., Malilas, W., Ruangchainikom, C., Thummadetsak, G., Chulalaksananukul, S., Marty, A. and **Chulalaksananukul, W.** Overexpression of *Fusarium solani* lipase in *Pichia pastoris* and its application in lipid degradation. *Biotechnol. Biotechnol. Equip. Technological*,. 30, 5 (2016) : 885-893.
5. Orachun, S., Malilas, W., Boonvitthya, N., Burapatana, V. and **Chulalaksananukul, W.** "Low cost medium for recombinant endoglucanase II production by *Pichia pastoris*." *Afr. J. Microbiol. Res.* 8, 25 (2014) : 2474-2481.
6. Laungsuwon, R. and **Chulalaksananukul, W.** "Antioxidant and anticancer activities of freshwater green algae, *Cladophora glomerata* and *Microsporafloccosa*, from Nan River in northern Thailand." *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 7, 2 (2013) : 181-188.
7. Malilas, W., Kang, S.W., Kim, S.B., Yoo, H.Y., **Chulalaksananukul, W.** and Kim, S.W. "Lipase from *Penicillium camembertii* KCCM 11268 : Optimization of solid state fermentation and application to biodiesel production." *Korean J. Chem. Eng.* 30, 2 (2013) : 405-412.
8. Leelaruji, W., Piamtongkam, R., Chulalaksananukul, S. and **Chulalaksananukul, W.** "Biodiesel production from *Jatropha curcas* oil catalyzed by whole cells of *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3." *Afr. J. Biotechnol.* 12, 27 (2013) : 4380-4386.
9. Vitisant, T., Leelaruji, W., Chulalaksananukul, S., Wattayakorn, G. and **Chulalaksananukul, W.** "A high-activity lipolytic yeast isolated from Sichang Island, Thailand." *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 7, Special Issue (2013) : 96-105.

10. Virunanon, C., Ouephanit, C., Burapatana, V. and **Chulalaksananukul, W.** "Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources." *J. Clean. Prod.* 39 (2013) : 273-279.

11. Boonvitthya, N., Piapukiew, J., Glinwong, C. and **Chulalaksananukul, W.** "Genetic analysis of physic nut Jatropha curcas L. populations in Thailand using ISSR markers." *ICRERA 2013.* 6749836 (2013) : 656-661.

12. Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V., Inochanon, R., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T. and **Chulalaksananukul, W.** "The potential of cellulosic ethanol production from grasses in Thailand. J. Biomed. Biotechnol." *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) : 1-10.

13. Theerachat, M, Morel, S., Guieysse, D., Remaud-Simeon, M. and **Chulalaksananukul, W.** "Comparison of synthetic dye decolorization by whole cells and a laccase enriched extract from *Trametes versicolor* DSM11269." *Afr. J. Biotechnol.* 11, 8 (2012) : 1964-1969.

14. Theerachat, M., Emond, S., Cambon, E., Bordes, F., Marty, A., Nicaud, J.-M., **Chulalaksananukul, W.**, Guieysse, D., Remaud-Siméon, M. and Morel, S. "Engineering and production of laccase from *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica*." *Bioresour. Technol.* 125 (2012) : 267-274.

15. Suwannarangsee, S., Kim, S., Kim, O.-C., Oh, D.-B., Seo, J.-W., Kim, C.H., Rhee, S.K., Kang, H.A., **Chulalaksananukul, W.** and Kwon, O. "Characterization of alcohol dehydrogenase 3 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 3 (2012) : 697-709.

16. Boonvitthya, N., Tanapong, P., Kanngan, P., Burapatana, V. and **Chulalaksananukul, W.** "Cloning and expression of *Aspergillus oryzae* glucan 1,3-beta-glucosidase A (*exgA*) in *Pichia pastoris*." *Biotechnol. Lett.* 34, 10 (2012) : 1937-1943.

17. Boonvitthya, N., Bozonnet, S., Burapatana, V., O'Donohue, M. J. and **Chulalaksananukul, W.** "Comparison of the heterologous expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase II and cellobiohydrolase II in the yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*." *Mol. Biotechnol.* 54, 2 (2012) : 158-169.

18. Sukchum, P., **Chulalaksananukul, W.** and Chavalparit, O. "Effect of

thermo-chemical pretreatment on bioethanol production from corncobs." *Adv. Mat. Res.*347-353 (2012) : 2532-2535.

19. Laobussararak, B., **Chulalaksananukul, W.** and Chavalparit, O.

"Comparison of bacterial and yeast ethanol fermentation yield from rice straw." *Adv. Mat. Res.*347-353 (2012) : 2541-2544.

2. ผู้ร่วมโครงการ

1. ชื่อ ภาษาไทย นาง ชมภูนุช กลิ่นวงษ์

ภาษาอังกฤษ Mrs. Chompunuch Glinwong

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.

4.หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์: 02-2185482 โทรสาร: 02-2185482 E-mail : Chompunuch.V@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญาและประกาศนียบัตร	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2545	ระดับปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	พันธุศาสตร์		จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ประเทศไทย
2551	ระดับปริญญาเอก	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วท.ด.)	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ		จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ประเทศไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญนอกเหนือจากสาขาที่จบการศึกษา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ข้อเสนอการวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อเรื่องและสถานภาพในการทำวิจัย

ลำดับ	ชื่อเรื่อง	ปีที่พิมพ์	สถานภาพในการวิจัย

1	การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์	ผู้ร่วมโครงการวิจัย

7.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและทำเสร็จแล้ว: (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

1. Lertsriwong, S., Comwien, J., Chulalaksananukul, W. and **Glinwong, C.**

   "Isolation and and identification of anaerobic bacteria from coconut wastewater factory for ethanol, butanol and 2, 3 butanediol production." *Int. Biodeter. Biodegr.* 119 (2017) : 461-466.

2. Comwien, J., Boonvithaya, N., Chulaluksananukul, W., and **Glinwong, C.** 2015. Direct Production of Butanol and Ethanol from Cane Sugar Factory Wastewater and Cellulosic Ethanol Pilot Plant Wastewater by *Clostridium Beijerinckii* CG1. *Energy Procedia.* 79: 556-561.
3. **Virunanon, C.**, Ouephanit, C., Burapatana, V., and Chulalaksananukul, W. 2013. Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. *Journal of Cleaner Production.* 39: 273-279.
4. Boonvitthya, N., Piapukiew, J., **Glinwong, C.**, and Chulalaksananukul, W. (2013). *Genetic analysis of physic nut Jatropha curcas L. populations in Thailand using ISSR markers.* Paper presented at the Renewable Energy Research and Applications (ICRERA), 2013 International Conference on.
5. Booranasrisak, T., Phaonakrop, N., Jaresitthikunchai, J., **Virunanon, C.**, Roytrakul, S., and Chulalaksananukul, W. 2013. Proteomic evaluation of free fatty acid biosynthesis in *Jatropha curcas* L.(physic nut) kernel development. *African Journal of Biotechnology.* 12(21): 3132.
6. Puangkaew, J., Wattayakorn, G., **Virunanon, C.**, Chulalaksananukul, W., and Chulalaksananukul, S. 2013. Biodegradation of Benzo (a) pyrene by Marine Denitrifying Bacteria. *Journal of Selcuk University Natural and Applied Science*: 22-31.