การศึกษาทดลองกระบวนการหมักเอทานอลจากฟางข้าวและชานอ้อย
An Exploratory Study of Ethanol Fermentation from Rice Straws and Bagasse

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์[1] วัฒนา วิริวุฒิกร[2]
Pongsri Siwarasak[1] Wattana Wirivutthikorn[2]

บทคัดย่อ

เซลลูโลสจากฟางข้าวและชานอ้อยมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 60.02 และ 54.30 เป็น 99.27 และ 99.01 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ หลังจากผ่านการปรับสภาพที่อัตราส่วนฟางข้าวและชานอ้อยต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 M เท่ากับ 1:10 (w/v) น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายเซลลูโลสที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 3.760 ด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 ใช้อัตราส่วนฟางข้าวและชานอ้อยต่ออาหารเหลวที่มีเชื้อราเท่ากับ 1:20 (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เท่ากับ 0.1680 และ 0.1740 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และความเป็นกรด-ด่าง 7.752 และ 7.276 ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายเซลลูโลสที่ความเป็นกรด-ด่าง 5 ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ความเข้มข้น 5% (v/v) ในระบบไม่ใช้ออกซิเจน คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักเท่ากับ 2.58 และ 3.00 mg/mL และเปอร์เซ็นต์ (w/w) ของเอทานอลจากการหมักเท่ากับ 5.16 และ 6.00 จากฟางข้าวและชานอ้อย ตามลำดับ

คำสำคัญ : เซลลูโลส น้ำตาลรีดิวซ์ กระบวนการหมัก เอทานอล
Keywords : Celluloses, reducing sugar, fermentation, ethanol

---

[1]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คลองหก ธัญบุรี ปทุมธานี

[2]อาจารย์ สถาบันวิจัยเคมี สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คลองหก ธัญบุรี ปทุมธานี

[1]Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Rajamangala Institute of Technology, Klong 6, Thanyaburi, Phathum Thani. E-maill : pongsri@access.rit.ac.th Tel : (66) 0 2549-9093

[2]Instructor, Chemical Research Institute (CRI), Rajamangala Institute of Technology, Klong 6, Thanyaburi, Phathum Thani

Abstract

Cellulose in rice straws and in bagasse were increased from 60.02 and 54.30 to 99.27 and 99.01 per cent dry matter respectively after treatment with 2.0 M NaOH (sodium hydroxide solution). The ratio of raw material to 2.0 M NaOH was 1:10 (w/v). Reducing sugars were obtained from rice straws and bagasse hydrolysis at initial pH 3.760 with *T. reesei* TISTR 3080. By using the ratio of materials to production medium of 1:20 (w/v) at 30°C, 150 rpm, and hydrolyzed time of 2 days, sugars received from rice straws and bagasse were 0.168 and 0.174 g per g substrate, with pH 7.75 and 7.28 respectively. The optimum conditions of reducing sugar fermentation from cellulose hydrolysis at initial pH 5 with 5% (v/v) of *S. cerevisiae* TISTR 5339 were at 37°C, 150 rpm in anaerobic system for 5 days. The ethanol concentrations from fermented rice straws and bagasse were 2.58 and 3.00 mg/mL, and their percentages were 5.16 and 6.00 (w/w) respectively.

บทนำ

ปัจจุบันแหล่งพลังงานจากปิโตรเลียมที่มีอยู่ซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปได้ลดปริมาณลงเป็นอย่างมาก พลังงานทดแทนต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้ได้อย่างยั่งยืนจึงกำลังเป็นที่สนใจเป็นอย่างยิ่ง การนำเอทานอลซึ่งได้จากการหมักผลิตผลทางการเกษตร ได้แก่ กากน้ำตาล มันสำปะหลัง มาเป็นส่วนผสมหนึ่งในน้ำมันเชื้อเพลิงเพื่อใช้เป็นพลังงานสีเขียวในการเพิ่มประสิทธิภาพและลดมลพิษที่เกิดจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ จากการวิจัยพบว่าสาร MTBE ซึ่งเป็นสารเติมแต่งประเภทออกซิเจนเนต (Oxygenate) ในน้ำมันเบนซินมีอันตรายที่กระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของสิ่งมีชีวิต เอทานอลจัดเป็นสารประเภทออกซิเจนเนตเช่นเดียวกับ MTBE จึงถือได้ว่าเป็นทางเลือกหนึ่งของการแก้ปัญหาวิกฤตการณ์น้ำมัน ราคาพืชผลทางการเกษตร และปัญหาสิ่งแวดล้อมของประเทศได้ (อมราวดี, 2543) นอกจากการผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักแล้วยังได้จากการสังเคราะห์เอธิลีนด้วยกระบวนการทางเคมี ซึ่งเป็นสารที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีได้ด้วยเช่นกัน (Austin, 1984) อย่างไรก็ตามเอทานอลจากการหมักผลิตผลทางการเกษตรมีต้นทุนสูงกว่าการสังเคราะห์ทางเคมี โดยกระบวนการผลิตแบ่งเป็นสามขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกการเตรียมวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของการหมักเอทานอลซึ่งคือน้ำตาลกลูโคส แบ่งออกได้เป็นสามกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรกจากพืชที่ให้น้ำตาล เช่น อ้อย กลุ่มที่สองจากพืชที่ให้แป้งและกลุ่มที่สามจากพืชที่ให้เส้นใยหรือเซลลูโลส ขั้นตอนที่สองคือการหมักทำการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลโดยอาศัยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติซึ่งนิยมใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำการหมักในสภาวะที่เหมาะสม ขั้นตอนที่สามคือ การกลั่นเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักซึ่งอยู่ระหว่าง 6-12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรเป็น 95-99.5 เปอร์เซ็นต์ การผลิตเอทานอลจากการหมักจึงมีต้นทุนสูง การศึกษาการหมักเอทานอลโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรเพื่อให้มีต้นทุนต่ำลงที่ผ่านมา ได้แก่ การผลิตเอทานอลจากการหมักโดยการใช้สิ่งเหลือทิ้งจากเกษตรกรรมพวกเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย และผักตบชวา ฯลฯ เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับยีสต์ (Tsao, 1985) การศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบเซลลูโลสจากฟางข้าวด้วยด่างและนำไปทำการย่อยสลายโดยใช้เซลลูเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้า น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายนำไปทำการหมัก

เพื่อผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (ระวีวรรณ, 2538) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* QM 6a ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และทำการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (อำนวย, 2538) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลที่ได้มีปริมาณต่ำและต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากการหมักยังคงสูงเมื่อเทียบกับราคาน้ำมันในขณะนั้น ปัจจุบันราคาน้ำมันมีค่าสูงขึ้นเป็นลำดับ ประกอบกับการห้ามใส่สารเติมแต่งที่มีตะกั่วในน้ำมันเบนซินเพื่อลดมลพิษทางอากาศและจากวิกฤตพลังงานทำให้มีความต้องการพลังงานทดแทนขึ้น จึงได้จัดทำการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากฟางข้าวและชานอ้อยในระดับห้องปฏิบัติการนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการปรับสภาพและย่อยสลายเซลลูโลสจากฟางข้าวและชานอ้อยโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อราและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการทดลอง คือ ฟางข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 จากอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี และชานอ้อยจากบริษัทอุตสาหกรรมน้ำตาล ที. เอ็น. จำกัด นำมาบดและร่อนผ่านตะแกรงมีขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร เก็บรักษาในขวดสะอาดที่อุณหภูมิห้อง

จุลินทรีย์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง คือ เชื้อรา *T. reesei.* TISTR 3080 และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ได้นำมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารเลี้ยงเชื้อราและยีสต์

อาหารเหลวพีดีเอ (Potato-Dextrose-Agar) การเตรียมอาหารเหลวพีดีเอโดยละลายพีดีเอ 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 อาศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารแข็งวายเอ็มเอ (Yeast-Malt-Agar) มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ (กรัม) ยีสต์ แอ็กซ์แทรค 3.0 มอลต์ แอ็กซ์แทรค 3.0 เบคโต-เปปโตน 5.0 กลูโคส 20.0 วุ้น 20.0 และน้ำกลั่น 1.0 ลิตร นำสารละลายไปนึ่งที่สภาวะเดียวกับพีดีเอ

อาหารเหลววายเอ็ม (Yeast-Malt) ใช้ส่วนประกอบเหมือนวายเอ็มเอ ยกเว้นไม่ใส่วุ้นและนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะเหมือนกัน

อาหารเหลวสำหรับเชื้อรา มีส่วนประกอบด้วยสารละลายเกลือแร่ดังต่อไปนี้ (กรัม/ลิตร) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 1.00 แคลเซียม-โพแทสเซียมฟอสเฟต ($CaKPO_4$) 0.05 แอมโมนียม-ไดซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 4.00 น้ำข้าวโพด (Corns steep liquor) 7.00 เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) 5.00 ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO$) 1.60 โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) 3.60 ทวีน 80 (Tween 80) 20.00 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 1 ลิตร นำสารละลายทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับค่า pH 5.5

วิธีการ

การปรับสภาพเซลลูโลส การปรับสภาพเซลลูโลสใช้อัตราส่วนวัตถุดิบต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยแช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหนึ่งคืน นำวัตถุดิบทั้งสองชนิดที่ผ่านการแช่มาต้มในสาร

ละลายด่างความเข้มข้นเท่าเดิมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสก่อนและหลังการปรับสภาพโดยใช้การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสตามวิธีทดสอบของ TAPP 203 om-88 เซลลูโลสที่ได้ถูกนำไปปรับสภาพให้เป็นกลาง (pH 7) ก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการย่อยสลายด้วยเชื้อราต่อไป

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา วิธีการเลี้ยงเชื้อรา *T. reesei.* TISTR 3080 โดยการนำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรพีดีเอและนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนได้สปอร์จำนวนมาก สังเกตการเจริญเติบโตเต็มที่ได้จากมีสีเขียวกระจายเต็มจานเพาะเชื้อ การถ่ายเชื้อโดยใช้คอร์ก บอเรอ (cork borer) ขนาด 0.5 เซนติเมตร ตัดเส้นใยบนอาหารแข็งจำนวน 5 ชิ้น นำไปใส่ในอาหารเหลวสำหรับเชื้อราที่เตรียมไว้ 5 ขวด ปริมาตรขวดละ 200 มิลลิลิตร (ใช้ขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร) ซึ่งมีเซลลูโลสจากการปรับสภาพอยู่ปริมาณ 5 10 15 20 และ 25 กรัม ในแต่ละขวดตามลำดับ นำเซลลูโลสในอาหารเหลวที่มีเชื้อรานี้ไปเลี้ยงในสภาพเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เปรียบเทียบการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเซลลูโลสในการย่อยสลายตามวิธีของ Chaptin และ Kennedy (1987) โดยหาน้ำตาลรีดิวซ์ใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในช่วง 5 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลาย วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงก์แทนสารละลายเอนไซม์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าพีเอชทุก 24 ชั่วโมง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายฟางข้าวและชานอ้อยด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา *T.reesei* TISTR 3080 สารตั้งต้นในการหมักเอทานอลคือสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายที่สภาวะเหมาะสมซึ่งถูกแยกออกจากเอนไซม์ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

การหมักเอทานอล การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 โดยนำเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งวายเอ็มเอมาเพิ่มปริมาณเชื้อให้สูงขึ้นโดยถ่ายลงในอาหารเหลววายเอ็มปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร) นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูการเจริญเติบโตและปริมาณเชื้อยีสต์ที่ติดสีของเมทิลีนบลูด้วยกล้องจุลทรรศน์

สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตรถูกปรับพีเอชเป็น 5.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติกและหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เติมเกลือแร่ คือ กรัมต่อลิตรของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 ถึง 0.5 แอมโมเนียมไดซัลเฟต 0.5 และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 สำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์ลงไปในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์แล้วจึงนำไปทำให้ปลอดเชื้อก่อนเติมหัวเชื้อยีสต์ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรและนำไปเลี้ยงในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Chaptin และ Kennedy (1987) และปริมาณเอทานอลใช้วิธี flash distillation ตามวิธีของ สิรินทรเทพ และสุรีลักษณ์ (2530) ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสารละลายเอทานอลในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงก์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณทุกวัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอล

ผลการทดลอง

1. เซลลูโลสที่ได้จากการปรับสภาพ

การปรับสภาพฟางข้าวและชานอ้อยด้วยการบดและใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ สามารถเพิ่มเซลลูโลสที่มีอยู่ในฟางข้าวและชานอ้อยขึ้นได้เป็น 99.27 และ 99.01 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ปริมาณของฟางข้าวและชานอ้อยที่หายไปหลังการปรับสภาพเท่ากับ 42 และ 54 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงใน Table 1, 2 และ Figure 1 ตามลำดับ ดังนั้น ปริมาณเซลลูโลสในตะกอนฟางข้าวและชานอ้อยที่ได้จากการคำนวณจึงเท่ากับ 57.58 และ 45.54 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 2

เมื่อเปรียบเทียบการปรับสภาพฟางข้าวและชานอ้อยโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ที่สภาวะเดียวกัน เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ได้จากฟางข้าวมีค่ามากกว่าจากชานอ้อย และจากการศึกษาที่ผ่านมา

Table 1 เซลลูโลสจากฟางข้าวและชานอ้อยก่อนและหลังการปรับสภาพ

สับสเตรท	เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)	
	ก่อนปรับสภาพ	หลังปรับสภาพ
ฟางข้าว	60.02	99.27
ชานอ้อย	54.30	99.01

Table 2 ปริมาณของฟางข้าวและชานอ้อยที่หายไปหลังการปรับสภาพ

สับสเตรท	น้ำหนัก (กรัม)		เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง)
	เริ่มต้น	สุดท้าย	
ฟางข้าว	100	58	42
ชานอ้อย	100	46	54

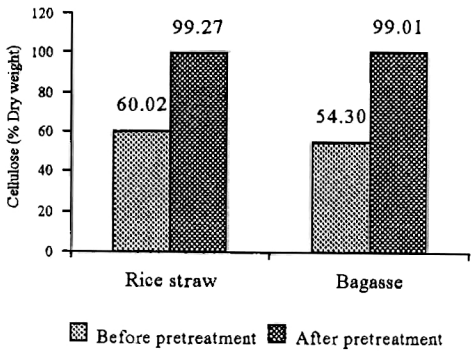

Figure 1 เซลลูโลส (กรัม/กรัมสับสเตรท) ของฟางข้าวและชานอ้อยก่อนและหลังการปรับสภาพ

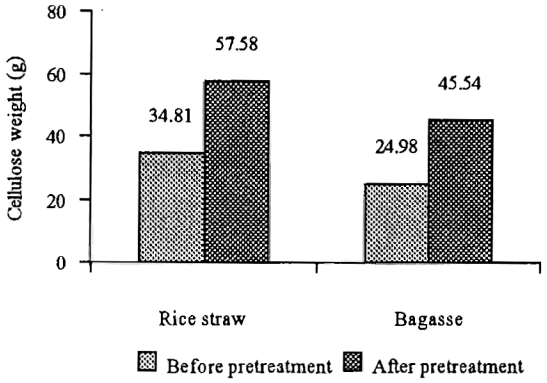

Figure 2 เซลลูโลส (กรัม) ในตะกอนของฟางข้าวและชานอ้อยก่อนและหลังการปรับสภาพ

2. น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสของฟางข้าวและชานอ้อยด้วยเซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei.* TISTR 3080

น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสของฟางข้าวและชานอ้อยด้วยเซลลูเลสจากเชื้อรา *T.reesei* TISTR 3080 มีค่าสูงสุดที่อัตราส่วนของสับสเตรทต่ออาหารเหลวเท่ากับ 1:20 (กรัม/มิลลิลิตร) ใช้เวลา 48 ชั่วโมง คือ 0.1680 และ 0.1740 กรัม/กรัมสับสเตรท และที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.752 และ 7.276 ดังแสดงใน Table 3, 4 และ Figure 3 ถึง 6 ตามลำดับ กิจกรรมของเซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 ในย่อยสลายเซลลูโลสในฟางข้าวและชานอ้อยจะลดลง เนื่องจากถูกยับยั้งด้วยน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลไปยับยั้งปฏิกิริยาต่อเนื่องทำให้ในระบบมีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มมากขึ้นและเซลโลไบโอสจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นโดกลูตาเนสและเอ็กโซกลูตาเนสทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายจึงลดลงหลังจาก 48 ชั่วโมง เป็นลำดับ เปรียบเทียบการย่อยสลายของฟางข้าวและชานอ้อยที่สภาวะเดียวกัน ใน Figure 3 และ 4 จะพบว่าชานอ้อยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าฟางข้าวเล็กน้อย เนื่องจากในชานอ้อยมีปริมาณเฮกโซเซนเท่ากับ 41.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนฟางข้าวมีอยู่เท่ากับ 36.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชานอ้อยจึงมากกว่าเพราะส่วนหนึ่งได้มาจากการที่เซลลูเลสย่อยสลายเฮกโซเซนเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส (Sitton, *et. al*, 1979) และค่าพีเอชจากการทดลองเพิ่มมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นโดยที่มีค่าสูงสุดในเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่าพีเอชจะลดลง จากการคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 ฟางข้าวและชานอ้อย 100 กรัม ถูกปรับสภาพได้ปริมาณเซลลูโลส 57.58 และ 45.54 กรัม ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากปริมาณเซลลูโลสดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 0.0967 กรัมของฟางข้าวและ 0.0792 กรัมของชานอ้อย น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยสลายฟางข้าวจึงมีปริมาณมากกว่าชานอ้อยเพียงเล็กน้อย เพราะเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งก่อนและหลังการปรับสภาพของเซลลูโลสในฟางข้าวมีค่ามากกว่าชานอ้อยรวมทั้งเปอร์เซ็นต์การหายไปของน้ำหนักตะกอนฟางข้าวน้อยกว่าชานอ้อย

Table 3 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว และชานอ้อยด้วยเชื้อรา *T.reesei* TISTR 3080 ที่อัตราส่วนต่างๆ ของสับสเตรทต่ออาหารเหลว (กรัม/มิลลิลิตร)

อัตราส่วนสับสเตรทต่ออาหารเหลว (กรัม/มิลลิลิตร) / ชั่วโมงที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/กรัมสับสเตรท)									
	ฟางข้าว					ชานอ้อย				
	1:8	1:10	1:13	1:20	1:40	1:8	1:10	1:13	1:20	1:40
0	0.0234	0.0234	0.0234	0.0234	0.0234	0.0234	0.0234	0.0234	0.0234	0.0234
24	0.0996	0.1168	0.1164	0.1160	0.0880	0.1040	0.1460	0.1248	0.1436	0.1068
48	0.1356	0.1412	0.1392	0.1680	0.1232	0.1656	0.1700	0.1724	0.1740	0.1368
72	0.0290	0.1120	0.0854	0.1480	0.0834	0.0914	0.0440	0.0564	0.1384	0.1164
96	0.0236	0.0496	0.0444	0.0904	0.0358	0.0146	0.0184	0.0172	0.0836	0.0606

Table 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างการย่อยสลายฟางข้าว และชานอ้อยด้วยเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 ที่อัตราส่วนต่างๆ ของสับสเตรทต่ออาหารเหลว (กรัม/มิลลิลิตร)

ชั่วโมงที่ \ อัตราส่วนสับสเตรทต่ออาหารเหลว (กรัม/มิลลิลิตร)	ความเป็นกรด - ด่าง									
	ฟางข้าว					ชานอ้อย				
	1:8	1:10	1:13	1:20	1:40	1:8	1:10	1:13	1:20	1:40
0	3.760	3.760	3.760	3.760	3.760	3.760	3.760	3.760	3.760	3.760
24	6.492	6.870	6.687	6.427	6.823	6.676	6.445	6.865	6.943	6.346
48	6.729	6.974	7.500	7.752	7.347	7.931	7.233	7.504	7.276	7.148
72	6.507	6.227	6.315	5.959	6.594	6.562	6.468	7.305	6.685	5.878
96	6.507	6.227	6.315	5.959	5.901	6.252	6.546	6.530	5.630	5.873

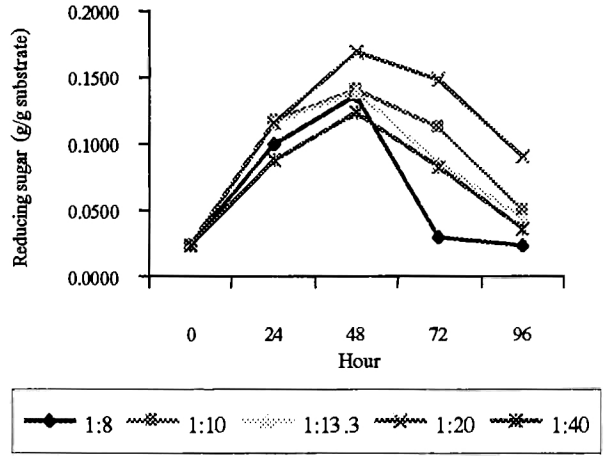

Figure 3 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 ที่อัตราส่วนต่างๆ ของสับสเตรทต่ออาหารเหลว (กรัม/มิลลิลิตร)

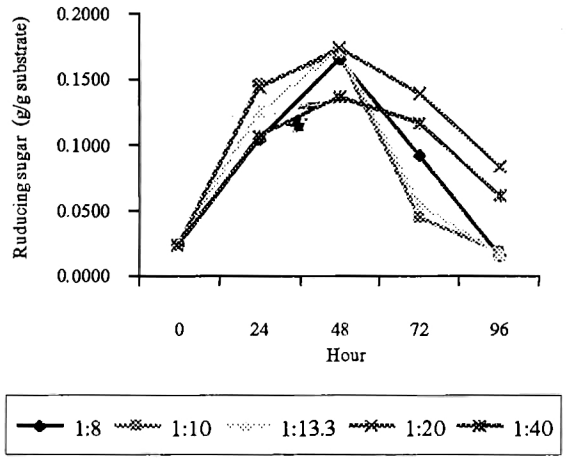

Figure 4 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายชานอ้อยด้วยเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 ที่อัตราส่วนต่างๆ ของสับสเตรทต่ออาหารเหลว (กรัม/มิลลิลิตร)

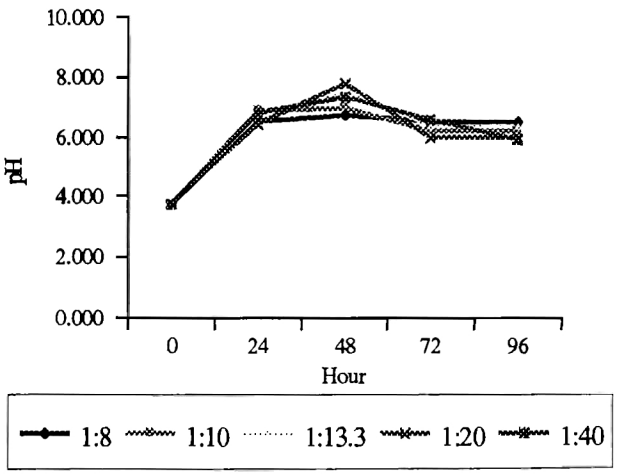

Figure 5 ค่าพีเอชของการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 ที่อัตราส่วนต่างๆ ของสับสเตรทต่ออาหารเหลว (กรัม/มิลลิลิตร)

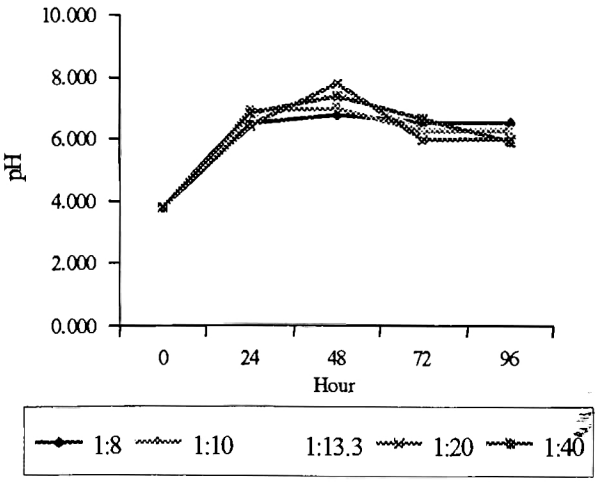

Figure 6 ค่าพีเอชของการย่อยสลายชานอ้อยด้วยเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3080 ที่อัตราส่วนต่างๆ ของสับสเตรทต่ออาหารเหลว (กรัม/มิลลิลิตร)

3. เอทานอลจากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339

สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากฟางข้าวหลังจากถูกนำไปหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 มีค่าลดลงจาก 0.1140 เป็น 0.0816 กรัม/กรัมสับสเตรท ในวันที่ 5 ของการหมักเอทานอล ผลของการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีทางสเปคโตรสโกปีที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 2.5800 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.0516 กรัม/กรัมสับสเตรท ดังแสดงใน Table 5 และ Figure 7 ตามลำดับ สำหรับสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชานอ้อยหลังการหมักด้วยเชื้อยีสต์นี้มีค่าลดลงจาก 0.1100 เป็น 0.0560 กรัม/กรัมสับสเตรทในวันที่ 5 ของการหมักเอทานอล และผลของการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีทางสเปคโตรสโกปีที่ความยาวคลื่น 600 นาโมเมตรได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.30000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.0600 กรัม/กรัมสับสเตรท ดังแสดงใน Table 6 และ Figure 8 ตามลำดับ

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายเซลลูโลสที่ความเป็นกรด-ด่าง 5 ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ซึ่งมีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเลี้ยงในสภาพเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากฟางข้าวและชานอ้อยได้เท่ากับ 0.0335 และ 0.0256 กรัมของค่าที่ควรผลิตได้ตามทฤษฎีตามลำดับ ผลผลิตร้อยละ (% yield) เทียบกับปริมาณเซลลูโลสในฟางข้าวและชานอ้อยเท่ากับ 0.0582 และ 0.0562 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 5 น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วย *T. reesei* TISTR 3080 และเอทานอลจากการหมักด้วย *S. cerevisiae* ของฟางข้าว

วัตถุดิบ / ผลิตภัณฑ์	จำนวนวัน							
	0	1	2	3	4	5	6	7
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/กรัมสับสเตรท)	0.1140	0.1028	0.0910	0.0918	0.0858	0.0816	0.0726	0.0770
เอทานอล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.0000	1.0700	1.4100	2.2400	2.3800	2.5800	2.6800	2.8800
เอทานอล (กรัม/กรัมสับสเตรท)	0.0000	0.0214	0.0282	0.0448	0.0476	0.0516	0.0536	0.0576

Table 6 น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วย *T. reesei* TISTR 3080 และเอทานอลจากการหมักด้วย *S. cerevisiae* ของชานอ้อย

วัตถุดิบ / ผลิตภัณฑ์	จำนวนวัน							
	0	1	2	3	4	5	6	7
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/กรัมสับสเตรท)	0.1100	0.0866	0.0864	0.0902	0.0668	0.0560	0.0660	0.0566
เอทานอล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.0000	1.2600	1.6000	2.0000	2.8200	3.0000	2.8500	2.9200
เอทานอล (กรัม/กรัมสับสเตรท)	0.0000	0.0252	0.0320	0.0400	0.0560	0.0600	0.0570	0.0584

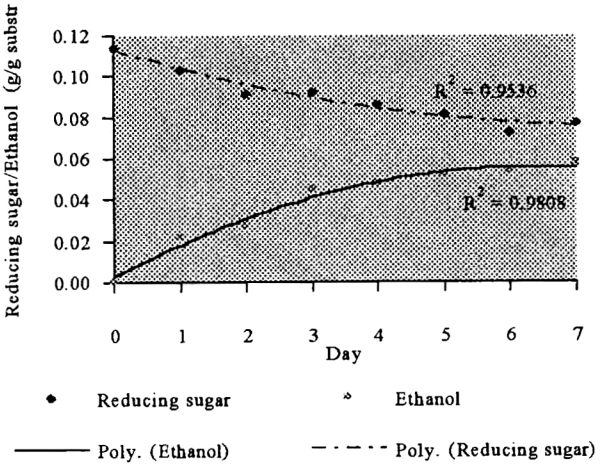

Figure 7 น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วย *T. reesei* TISTR 3080 และเอทานอลจากการหมักด้วย *S. cerevisiae* ของฟางข้าว

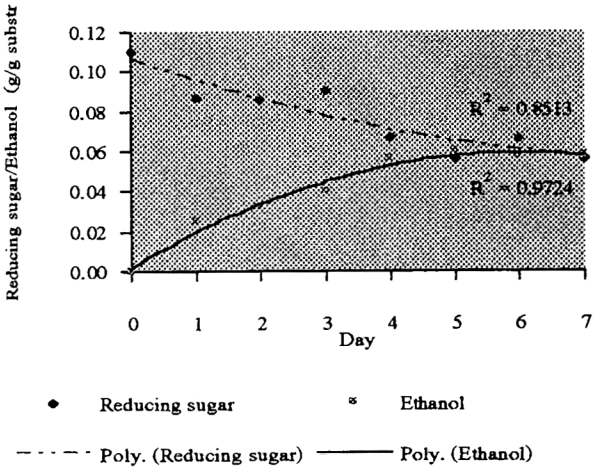

Figure 8 น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วย *T. reesei* TISTR 3080 และเอทานอลจากการหมักด้วย *S. cerevisiae* ของชานอ้อย

สรุปและอภิปรายผล

ในขั้นตอนของการปรับสภาพฟางข้าวและชานอ้อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เพื่อเตรียมเซลลูโลส ถึงแม้จะได้เซลลูโลสเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ก็ตาม แต่มีการสูญเสียเซลลูโลสในระหว่างกระบวนการในปริมาณมาก เนื่องจากขนาดของฟางข้าวและชานอ้อยที่นำมาปรับสภาพมีขนาดเล็กมาก จึงมีการสูญเสียในขั้นตอนของการกรองและการล้างเพื่อปรับสภาพเพื่อให้เป็นกลาง ดังนั้นขนาดของฟางข้าวและชานอ้อยที่เหมาะสมคือควรมีขนาดประมาณ 2 ถึง 5 เซนติเมตร ในขั้นตอนของการปรับสภาพฟางข้าวและชานอ้อยมีการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ในปริมาณมากต่อการปรับสภาพแต่ละครั้ง และไม่ได้นำกลับมาใช้ใหม่จึงเป็นการสิ้นเปลืองสารเคมีที่ใช้เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้ ขณะเดียวกันจากการทดลองต้องแช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้ร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงครึ่ง ในขั้นตอนนี้ใช้เวลาและพลังงานในการทำการปรับสภาพ จึงควรคำนึงถึงปัจจัยดังกล่าวด้วย

จากการศึกษาพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสจากเชื้อราขึ้นกับปัจจัยของการเจริญเติบโตของเชื้อราเป็นอย่างมาก ถ้าเชื้อรามีความแข็งแรงจะมีกิจกรรมในการย่อยสลายได้น้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณมาก ดังนั้นขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อราจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ปัญหาที่พบจากการทดลองนี้คือ การเลี้ยงเชื้อราใช้เวลานานมากและเชื้อราที่ได้ไม่มีความแข็งแรงเพียงพอ เนื่องจากเชื้อราถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น การใช้เชื้อราในการย่อยสลายเซลลูโลสจึงยากในการควบคุมความเข้มข้นของเชื้อราให้มีความสม่ำเสมอหรือคงที่ในแต่ละการทดลอง จึงเป็นสาเหตุหนึ่งของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีความเข้มข้นน้อยมากที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนของกระบวนการหมัก จากการทดลองในขั้นตอนการเตรียมน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในการหมักที่สภาวะที่

เหมาะสมจึงได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเซลลโลสด้วยเชื้อรา เพราะใช้เชื้อราที่เลี้ยงกันคนละครั้ง ส่วนปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเชื้อรา คือปริมาณอาหารเหลวของเชื้อราต่อปริมาณเซลลูโลส เนื่องจากเซลลูโลสมีค่าความหนาแน่นบัลค์ (Bulk density) มากจึงทำให้อาหารเหลวไม่ท่วมเซลลูโลสอย่างทั่วถึง ปัจจัยดังกล่าวทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักมีค่าน้อย เอทานอลที่ได้จากการหมักจึงน้อยมากตามไปด้วย การใช้เชื้อราในการย่อยสลายจึงต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถนำมาใช้เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์จากเซลลูโลสในปริมาณสูง เชื้อราสามารถถูกเลี้ยงในระยะเวลาอันสั้น และมีความแข็งแรง

บรรณานุกรม

ระวีวรรณ ขวัญเมือง. 2538. การหมักแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เซลลูโลสและ *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สิรินทรเทพ เต้าประยูร และสุรีลักษณ์ รอดทอง. 2530. บทปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม. สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

อมราวดี เนตรมุกดา. 2543. ตามติดเทคโนโลยี. คลื่นวิจัย. 4 (2) : 7-9.

อำนวย ขวัญเมือง. 2538. การหมักแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เซลลูโลสและ *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Austin, George T. 1984. Chemical Process Industries. 5th ed. McGraw-Hill, Singapore.

Chaptin, M.F., and Kennedy, J.F. 1987. Carbohydrate Analysis and Analytical Approch.

Sitton, O.C., Foutch, G.L., Book, N.L. and Gaddy, J.L. 1979. Ethanol from Agriculture Residues. Process Biochemistry. 4 (9) : 7-10.

Tsao, G.T., Ladish, M.R., Ladish, C., Hus T.A., Dale, B. and Chout, T. 1985. Ethanol and Chemical from Cellulose. pp. 117-183. Processing of the International Symposium : Alternative sources of energy for agriculture. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region.