การผลิตไบโอบิวทานอลจากสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ด้วยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ในกระบวนการหมักแบบแบทช์

Biobutanol Production from *Rhizoclonium* sp. by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 in Batch Fermentation

Prince of Songkla University
Pattani Campus

สูไฮลา สาและ
Suhaila Salaeh

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีประยุกต์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Applied Chemistry
Prince of Songkla University
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การผลิตไบโอบิวทานอลจากสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ด้วยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ในกระบวนการหมักแบบแบทช์

Biobutanol Production from *Rhizoclonium* sp. by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 in Batch Fermentation

Prince of Songkla University
Pattani Campus

สูไฮลา สาและ
Suhaila Salaeh

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีประยุกต์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Applied Chemistry
Prince of Songkla University
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอบิวทานอลจากสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ด้วยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ในกระบวนการหมักแบบแบทช์

ผู้เขียน นางสาวสูไฮลา สาและ

สาขาวิชา เคมีประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.รัตนา จริยาบูรณ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.ประวิทย์ คงจันทร์)

.....

(ดร.สมรักษ์ พันธ์ผล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอทอง)

.....กรรมการ

(ดร.รัตนา จริยาบูรณ์)

.....กรรมการ

(ดร.สมรักษ์ พันธ์ผล)

.....กรรมการ

(ดร.จุฑารัตน์ ทะสะระ)

.....กรรมการ

(ดร.ชัยสิทธิ์ นิยะสม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

Prince of Songkla University Pattani Campus

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....

(ดร. รัตนา จริยาบูรณ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(นางสาวสูไฮลา สาและ)

นักศึกษา

Prince of Songkla University Pattani Campus

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสูไฮลา สาและ)

(นักศึกษา)

Prince of Songkla University
Pattani Campus

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอบิวทานอลจากสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ด้วยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ในกระบวนการหมักแบบแบทช์
ผู้เขียน นางสาวสูไฮลา สาและ
สาขาวิชา เคมีประยุกต์
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

บิวทานอลเป็นพลังงานที่มีค่าพลังงานความร้อนสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล สาหร่ายขนาดใหญ่เป็นแหล่งวัตถุดิบที่ยั่งยืนที่กำลังได้รับความสนใจสำหรับผลิตไบโอบิวทานอล อย่างไรก็ตามโครงสร้างของผนังเซลล์สาหร่ายนั้นเป็นพอลิแซคคาร์ไรด์จึงมีความจำเป็นที่ต้องปรับสภาพเบื้องต้นเพื่อปรับโครงสร้างของพอลิแซคคาร์ไรด์ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสไปเป็นน้ำตาลที่หมักได้งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรับสภาพเบื้องต้นการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์และการหมักบิวทานอลด้วยแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ในการทดลองศึกษาผลของชนิดสารเคมี (H_2SO_4 และ NaOH) ความเข้มข้นสารเคมี (H_2SO_4 ร้อยละ 1-9 โดยปริมาตร) อุณหภูมิ (95 และ 121 องศาเซลเซียส) และเวลาในการปรับสภาพเบื้องต้น (30 และ 60 นาที) ของสาหร่ายต่อประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสในขั้นตอนต่อไป ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย H_2SO_4 ร้อยละ 3 โดยปริมาตรที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที สามารถผลิตน้ำตาลในขั้นตอนเอนไซม์ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ผสมทางการค้า (CELLIC C TEC2) ได้สูงสุด คือ 0.908 กรัมน้ำตาลต่อกรัมสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพ อย่างไรก็ตามผลได้ของน้ำตาลเมื่อเทียบกับน้ำหนักสาหร่ายที่ใช้เริ่มต้นมีค่าสูงสุดคือ 0.604 กรัมน้ำตาลต่อกรัมสาหร่าย ได้จากสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย H_2SO_4 ร้อยละ 3 โดยปริมาตรที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เนื่องจากสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพที่สภาวะนี้สามารถกู้คืนของแข็งในระหว่างการปรับสภาพได้สูง ในการหมัก อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (เอบีอี) พบว่าน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสของสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย H_2SO_4 ร้อยละ 3 โดยปริมาตรที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ถูกใช้โดยแบคทีเรียสูงถึงร้อยละ 94 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 0.54 กรัมบิวทานอลต่อกรัมน้ำตาลซึ่งเท่ากับ 0.17 กรัมบิวทานอลต่อกรัมสาหร่ายหรือ 0.33 กรัมเอบีอีต่อกรัมสาหร่าย งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงแนวทางที่เป็นไปได้ของการแปลงชีวมวลของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น

Thesis Title	Biobutanol Production from *Rhizoclonium* sp. by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 in Batch Fermentation
Author	Miss Suhaila Salaeh
Major Program	Applied Chemistry
Academic Year	2015

ABSTRACT

High specific energy of butanol is a proper choice of fuel as compared with ethanol. Macroalgae gain an increasing of interest as a feedstock for sustainable biobutanol production. However, macroalgae cell wall polysaccharide need to be proper pretreated for further efficient enzymatic hydrolysis to fermentable sugar. The objective of this study was to investigate pretreatment method, enzyme hydrolysis and butanol fermentation by *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 of *Rhizoclonium* sp. In experiments, the effect of chemical (H_2SO_4 and NaOH), chemical concentration (1-9% by volume H_2SO_4), pretreatment temperature (95^{o}C and 121^{o}C), pretreatment time (30 and 60 min) of algae on further hydrolysis efficiency were study. The result shown that the highest sugar release in enzymatic hydrolyzed with commercial enzyme cocktail (CELLIC C TEC2) of 0.908 g sugar/g pretreated algae were achieved from algae pretreated with 3% H_2SO_4 at 121^{o}C for 1 hr. However, the highest sugar released yield in initial algae weight basis of 0.604 g sugar/ g algae was obtained from algae pretreated with 3% H_2SO_4 at 95^{o}C for 1 hr, because of its high solid recovery during the pretreatment. In Acetone Butanol Ethanol (ABE) fermentation, 94% of hydrolyzed sugar released from the algae which pretreated with 3% H_2SO_4 at 95^{o}C for 1 hr was consumed by bacteria and yielded 0.54 g butanol/g sugar which equal to 0.17 g butanol/g algae or 0.33 g ABE/g algae. This work demonstrated a feasible approach of converting residual biomass of *Rhizoclonium* sp. into a valuable biofuel.

Prince of Songkla University Pattani Campus

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความร่วมมือ การช่วยเหลือให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ และกำลังใจจากหลาย ๆ ฝ่ายด้วยกัน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. รัตนา จริยาบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร. ประวิทย์ คงจันทร์ และ ดร. สมรักษ์ พันธ์ผล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็นตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้ความรู้และเสนอแนวทางในการศึกษาค้นคว้าด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดมาทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ดีผู้วิจัยขอขอบคุณไว้เป็นอย่างสูง

ผลงานนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ SAT570129S

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการค้นคว้าวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2556 ที่ได้อุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่แผนกวิชาเคมี หน่วยวิจัยการแปรรูปชีวมวลเพื่อพลังงานและเคมีภัณฑ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมถึงบุคลากรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยในครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ ผู้ที่เป็นมากกว่าทุกสิ่งทุกอย่างของลูก และครอบครัวทุกคนที่ห่วงใยเป็นกำลังใจช่วยเหลือและสนับสนุนการศึกษาแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สูไฮลา สาและ

Prince of Songkla University Pattani Campus

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (5)

ABSTRACT (6)

สารบัญ (8)

สารบัญตาราง (11)

สารบัญรูป (12)

สารบัญรูป(ต่อ) (13)

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 3

1.3 ขอบเขตการศึกษา 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 5

2.1.1 บิวทานอล 5

2.1.2 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลว 6

2.1.3 ชีวเคมีของการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล 7

2.1.4 วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ผลิตไบโอบิวทานอล 10

2.1.5 สาหร่าย 11

2.1.6 การปรับสภาพเบื้องต้น (Pretreatment) 14

2.1.7 การไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) 18

2.1.8 กระบวนการหมัก Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation 20

2.1.9 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการหมัก 21

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22

Prince of Songkla University Pattani Campus

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 30

3.1. สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ 30

3.1.1 สารเคมี 30

3.1.2 วัสดุ 30

3.1.3 อุปกรณ์ 31

3.1.4 เครื่องมือ 31

3.2 วิธีการทดลอง 32

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย 32

3.2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางประการของสาหร่าย 32

3.2.3 การปรับสภาพเบื้องต้น 33

3.2.4 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ 33

3.2.5 การหมักอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE) 34

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 37

4.1 การศึกษาองค์ประกอบบางประการของสาหร่าย 37

4.2 การศึกษาการปรับสภาพเบื้องต้นและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ 40

4.2.1 ผลการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่ายต่างชนิดกัน 40

4.2.2 ผลของชนิดสารเคมีในการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. 42

4.2.3 ผลของความเข้มข้นสารเคมีในการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. 45

4.2.4 ผลการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน 46

4.2.5 ผลของการใช้ซ้ำของสารละลาย 3%H_2SO_4 ในการปรับสภาพเบื้องต้น 48

4.2.6 สัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ปรับและไม่ผ่านการปรับสภาพ 49

4.3 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในการหมักและการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในการผลิต ABE 51

4.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นในการหมัก 51

4.3.2 การหมัก ABE จากกลูโคส 51

Prince of Songkla University Pattani Campus

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.3 การหมัก ABE โดยใช้ไฮโดรไลเสทของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่ 95°C ที่เวลา 60 นาที 53
4.3.4 ผลได้ของ ABE เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น 55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 57
5.1 สรุปผลการวิจัย 57
5.2 ข้อเสนอแนะ 58
บรรณานุกรม 59
ภาคผนวก 66
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์ 67
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ 73
ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 77
ประวัติผู้เขียน 78

Prince of Songkla University Pattani Campus

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	สมบัติทางกายภาพของบิวทานอล	6
ตารางที่ 2.2	การศึกษาผลของการปรับสภาพเบื้องต้นต่อการหมักเพื่อผลิตไบโอบิวทานอล	29
ตารางที่ 3.1	วิธีการศึกษาสมบัติทางด้านเคมีของสาหร่าย	32
ตารางที่ 4.1	สมบัติทางเคมีบางประการของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. จากบริเวณสวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จ.ปัตตานี	39
ตารางที่ 4.2	ปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่สภาวะต่างๆ	44
ตารางที่ 4.3	ผลของการปรับสภาพเบื้องต้นต่อการหมักเพื่อผลิตไบโอบิวทานอล	56

Prince of Songkla University Pattani Campus

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1	กลไกการหมัก ABE	8
รูปที่ 2.2	การผลิตไบโอบิวทานอลจากข้าวโพดและวิถีเมตาบอลิซึมของการสลายกลูโคสของ *Clostridium*	9
รูปที่ 2.3	โครงสร้างของน้ำตาลที่พบได้ในสาหร่ายทะเล	12
รูปที่ 2.4	การปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของลิกโนเซลลูโลส	15
รูปที่ 2.5	วิธีต่าง ๆ ในการปรับสภาพเบื้องต้นของชีวมวล	16
รูปที่ 3.1	ขั้นตอนการดำเนินการทดลองการผลิตไบโอบิวทานอลจากการหมัก ABE ด้วยสาหร่าย	36
รูปที่ 4.1	สาหร่ายที่พบบริเวณสวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จ.ปัตตานี	38
รูปที่ 4.2	ลักษณะของสาหร่ายที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์	38
รูปที่ 4.3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 60 นาที	42
รูปที่ 4.4	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 60 นาที	43
รูปที่ 4.5	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพที่ความเข้มข้นของสารละลายกรด H_2SO_4 ที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 60 นาที	46
รูปที่ 4.6	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน	47
รูปที่ 4.7	โครมาโทกราฟีชนิดของน้ำตาลที่วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC	48
รูปที่ 4.8	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย 3%H_2SO_4 ที่นำกลับมาใช้ใหม่	49
รูปที่ 4.9	สัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. หลังปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%H_2SO_4	50

Prince of Songkla University Pattani Campus

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.10	สัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. หลังปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%NaOH	50
รูปที่ 4.11	การผลิตบิวทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นซับสเตรท	52
รูปที่ 4.12	กลไกการผลิต ABE	53
รูปที่ 4.13	การผลิตบิวทานอลจากไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพที่ 95°C เวลา 60 นาที	55
รูปที่ ข.1	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	72
รูปที่ ข.2	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	72
รูปที่ ข.3	กราฟมาตรฐานกรดบิวทิริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	73
รูปที่ ข.4	กราฟมาตรฐานกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	73
รูปที่ ข.5	กราฟมาตรฐานบิวทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	74
รูปที่ ข.6	กราฟมาตรฐานเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	74
รูปที่ ข.7	กราฟมาตรฐานอะซิโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	75

Prince of Songkla University Pattani Campus

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโลกเรามีปริมาณการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มสูงขึ้น โดยแหล่งที่มาหลักของพลังงานเชื้อเพลิงคือ ฟอสซิล ยิ่งนับวันปริมาณฟอสซิลที่มีอยู่ใต้ผิวโลกเริ่มหมดลง พลังงานที่ได้จากฟอสซิลยังเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพภูมิอากาศของโลก ดังนั้นพลังงานทางเลือกจึงเป็นทางออกเพื่อแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพลังงานที่จะมีขึ้นในอนาคตข้างหน้าและยังเป็นพลังงานที่สะอาดไม่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel) ที่หลากหลาย เช่น ไบโอเอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานชีวภาพชนิดหนึ่งที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรง หรือนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินเรียกว่า “แก๊สโซฮอล์ (Gasohol)” และนำไปผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่า “ดีโซฮอล์ (Desohol)” อย่างไรก็ตามมีเชื้อเพลิงชีวภาพเหลวอีกตัวหนึ่งที่ได้รับความสนใจมากขึ้นคือ ไบโอบิวทานอล ซึ่งมีประสิทธิภาพเหนือกว่าเอทานอลในด้านการนำมาใช้เป็นพลังงาน มีความร้อนจากการเผาไหม้เท่ากับ 29.2 MJ/dm^3 ในขณะที่เอทานอลมีค่าเท่ากับ 19.6 MJ/dm^3 (Kaminski *et al.*, 2011) บิวทานอลมีค่าออกเทนอยู่ที่ 96 ซึ่งเหมาะสมกับการใช้งานกับเครื่องยนต์ มีความดันไอและความสามารถในการกัดกร่อนน้อยกว่าเอทานอลจึงสามารถขนส่งทางท่อได้ ทำให้สามารถลดต้นทุนในเรื่องของการขนส่ง และที่สำคัญสามารถผลิตไบโอบิวทานอลจากชีวมวลประเภทเดียวกันกับการผลิตไบโอเอทานอล

จากพันธสัญญาที่หลายประเทศทำร่วมกันเพื่อลดการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์สู่บรรยากาศเป็นแรงผลักดันให้เกิดการพัฒนาพลังงานทางเลือกที่ไม่ได้มาจากแหล่งฟอสซิลแต่เป็นแหล่งที่ให้พลังงานหมุนเวียนได้ ซึ่งทั้งพืชและสาหร่ายเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกนี้ ทั้งนี้เพราะทั้งสองสิ่งรับพลังงานจากแสงอาทิตย์และใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์สำหรับสร้างชีวมวลผ่านการสังเคราะห์แสง ซึ่งทั้งพืชและสาหร่ายนั้นสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานได้โดยตรงหรือผ่านกระบวนการทางเคมีหรือชีวเคมีเพื่อผลิตเป็นพลังงาน จากนั้นคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ก็สามารถกำจัดได้โดยนำไปสร้างชีวมวลรุ่นต่อไปได้ (Rodrigues and Bon, 2011) โดยวัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้คือ กลุ่มจำพวกพืชที่มีแป้งและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ อ้อย บีทรูท (Beetroot) ข้าวฟ่างหวาน (Sweet sorghum) ข้าวโพด มันสำปะหลัง เป็นต้น และกลุ่มของเซลลูโลสหรือลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic material) เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์พืช ส่วนมากเป็นเส้นใย ได้แก่ เส้นใยปาล์ม ฟางข้าว ชานอ้อย

วัชพืช เป็นต้น อย่างไรก็ตามวัตถุดิบ 2 กลุ่มนั้นมาจากพืชที่เป็นอาหาร ซึ่งก่อให้เกิดการแข่งขันด้านราคาและปัญหาด้านความมั่นคงทางอาหารและต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกเป็นจำนวนมาก การนำเอาชีวมวลสาหร่ายมาใช้ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ในแหล่งน้ำรวมทั้งในทะเลจึงมีข้อได้เปรียบมากกว่า สาหร่ายเป็นพืชที่เจริญเติบโตง่ายและไม่ได้เป็นอาหารหลักของมนุษย์ มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตสูง ตัวอย่างเช่น *Laminaria japonica* (สาหร่ายสีน้ำตาล) *Sargassum fulvellum* (สาหร่ายสีน้ำตาล) *Gelidium amansii* (สาหร่ายสีแดง) และ *Ulva lactuca* (สาหร่ายสีเขียว) มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 51.9 39.6 77.2 และ 54.3% ต่อน้ำหนักสาหร่ายแห้งตามลำดับ (Kim *et al.*, 2011) สาหร่ายมีลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยและประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ถูกย่อยได้ง่ายกว่าวัสดุลิกโนเซลลูโลส ชนิดของน้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลได้แก่ แอลจิเนต (Alginate) แมนนิทอล (Manitol) และกลูแคน (Glucan) ซึ่งกลูแคนจะอยู่ในรูปของลามินาริน (Laminarin) หรือเซลลูโลส (Wargacki *et al.*, 2012)

ไบโอบิวทานอลสามารถผลิตจากกระบวนการหมักของวัตถุดิบโดยใช้แบคทีเรียตระกูล *Clostridium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน ในกระบวนการหมักจะได้เอทานอลและอะซิโตนเป็นผลผลิตร่วมด้วย จึงเรียกกระบวนการนี้ว่า การหมัก ABE (Acetone Butanol และ Ethanol) (Ezeji *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์พลอยได้เป็นแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย ลักษณะของกระบวนการหมัก ABE จากชีวมวลที่เป็นเซลลูโลสเริ่มต้นจากการปรับสภาพเบื้องต้น (Pretreatment) เพื่อให้โครงสร้างของเซลลูโลสหรือพอลิแซคคาร์ไรด์ลดความเป็นผลึกลง หรือตัดสายโซ่ของพอลิแซคคาร์ไรด์ให้สั้นลง จากนั้นเป็นการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอนการไฮโดรไลซิสพอลิแซคคาร์ไรด์ให้เป็นมอนอแซคคาร์ไรด์หรือน้ำตาลที่สามารถนำไปใช้ในการหมักได้ วิธีที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดองค์ประกอบของวัตถุดิบนั้น ซึ่งได้แก่ วิธีการทางกายภาพ การให้ความร้อน วิธีการทางเคมี (กรด เบส ตัวทำละลายอินทรีย์) วิธีทางชีววิทยาโดยการใช้จุลินทรีย์หรือใช้เอนไซม์ เป็นต้น ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสำคัญในการกำหนดว่าวัตถุดิบจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลเพื่อผลิตไปเป็น ABE ได้คุ้มค่าเพียงใด กระบวนการปรับสภาพและไฮโดรไลซ์ที่เหมาะสมจะต้องดึงปริมาณน้ำตาลออกจากวัตถุดิบให้มากที่สุด ในขณะเดียวกันต้องไม่เกิดสารที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการที่สามารถไฮโดรไลซ์พอลิแซคคาร์ไรด์ให้เป็นกลูโคสได้โดยไม่ก่อให้เกิดสารยับยั้ง (Qureshi *et al.*, 2008) แต่ผลิตภัณฑ์กลูโคสที่เกิดขึ้นกลับเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอง การใช้การหมักควบคู่ไปกับการไฮโดรไลซิสจะช่วยลดปัญหานี้ได้เพราะมีการใช้กลูโคสไปในการหมักทำให้ปริมาณกลูโคสลดลง (Ohgren *et al.*, 2007) ข้อเสียของการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์คือเอนไซม์มีราคาแพง แต่กระบวนการนี้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เกิดการกัดกร่อนต่ออุปกรณ์ ดำเนินการได้ในสภาวะอุณหภูมิที่ไม่สูงและความดันปกติ

และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme) ซึ่งเป็นข้อดีที่เหนือกว่าการใช้กรดหรือเบส (Alkhatib *et al.*, 2011; Afsahi *et al.,* 2007) อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการปรับสภาพเบื้องต้นของวัตถุอย่างเหมาะสมเพื่อให้เอนไซม์เข้าไฮโดรไลซ์วัตถุดิบได้ง่ายขึ้น ขั้นตอนต่อไปคือ การหมักซึ่งต้องควบคุมให้มีสภาวะต่าง ๆ ต่อไปนี้ให้เหมาะสม เช่น ปริมาณวัตถุดิบ อัตราการกวน ค่าพีเอช อุณหภูมิ เพื่อผลิตไบโอบิวทานอลได้ประสิทธิภาพสูงสุดและขั้นตอนสุดท้าย คือการแยกตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งสามารถใช้การกลั่นธรรมดาในการแยกได้ และถึงแม้จะเป็นข้อเสียของการผลิตไบโอบิวทานอลซึ่งยังสามารถผลิตได้ในระดับความเข้มข้นที่ไม่สูง จึงทำให้ไม่คุ้มค่าต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตามการใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องและแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ใช้เทคโนโลยีเมนเบรนซึ่งกำลังได้รับความสนใจในการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ได้จริงมากขึ้น (Hecke *et al.,* 2012; Huang and Meagher, 2001) ก็จะสามารถช่วยบรรเทาปัญหานี้ได้ ถึงแม้ว่าในปัจจุบันการผลิตไบโอบิวทานอลยังใช้ต้นทุนสูงกว่าบิวทานอลที่ได้จากกระบวนการปิโตรเคมี แต่ยังมีแนวทางเพื่อการพัฒนาเพื่อให้มีความคุ้มค่ามากขึ้น โดย DuPont (สหรัฐอเมริกา) และ BP (อังกฤษ) ได้วิจัยร่วมกันเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไบโอบิวทานอลตั้งแต่ปี 2009 มีสถาบันวิจัยที่ก่อตั้งในประเทศบราซิลเพื่อพัฒนาการผลิตไบโอบิวทานอลจากต้นอ้อย และ Biobutanol technology demonstration plant ถูกสร้างขึ้นเพื่อการพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายน้ำจืดที่มีลักษณะเป็นเส้น มีสีเขียว สามารถพบได้ในแหล่งน้ำทั่วไปและบ่อน้ำทิ้งสำหรับผลิตไบโอบิวทานอล โดยศึกษาการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยวิธีทางกายภาพ ความร้อนและสารเคมี การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ และกระบวนการหมัก ABE ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางด้านเคมีบางประการของสาหร่าย

1.2.2 ศึกษาการปรับสภาพเบื้องต้นและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสของสาหร่ายสำหรับการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461

Prince of Songkla University Pattani Campus

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1.3.1 เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดใหญ่ที่พบมากในบริเวณคูน้ำของสวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จังหวัดปัตตานี ได้แก่ *Rhizoclonium* sp. และ *Ceratophyllum demersum*

1.3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมีของสาหร่าย ได้แก่ ปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งระเหยได้ ลิกนิน แป้ง ไขมัน

1.3.3 ศึกษาปัจจัยที่มีต่อการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ความเข้มข้นของสารเคมี และอุณหภูมิ เพื่อให้ได้วิธีที่ดีที่สุดสำหรับการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป

1.3.4 ไฮโดรไลซิสสาหร่ายที่ปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์ CELLIC C TEC2 ที่อุณหภูมิ 40°C pH เท่ากับ 6.3 ตามด้วยการหมักโดยใช้ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ที่อุณหภูมิ 37°C

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้วิธีการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอบิวทานอลจากสาหร่าย *Rhizoclonium* sp.

1.4.2 ได้แนวทางในการผลิตไบโอบิวทานอลจากสาหร่าย *Rhizoclonium* sp.

Prince of Songkla University Pattani Campus

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการเผาไหม้ของพลังงานจากฟอสซิลเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม และการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลกซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตบนพื้นโลก อีกทั้งมีราคาแพงและกำลังใกล้จะหมดสิ้นลง ดังนั้นพลังงานที่เป็นพลังงานหมุนเวียน (Renewable energy) และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมหรือที่เรียกว่าพลังงานสะอาด เช่น พลังงานจากแสงอาทิตย์ ลม น้ำ หรือพลังงานจากชีวมวล จึงได้รับความสนใจในการพัฒนาวิจัย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงอย่างคุ้มค่าและมีประสิทธิภาพ บิวทานอลพลังงานที่สามารถผลิตได้จากชีวมวลด้วยกระบวนการทางชีวเคมี สามารถผสมกับน้ำมันดีเซลหรือน้ำมันเบนซินได้ด้วยทุกความเข้มข้น ซึ่งมีผลดีมากกว่าการใช้เอทานอลทั้งในแง่ของคุณภาพเชื้อเพลิงเนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำน้อยกว่า ประสิทธิภาพการเผาไหม้เพราะมีค่าพลังงานต่อหน่วยเชื้อเพลิงสูงกว่า รวมถึงความปลอดภัยในการใช้งานและการขนส่งเนื่องจากมีความดันไอต่ำกว่า การสันดาปภายในที่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์น้อยกว่าพลังงานฟอสซิล (Dürre, 2007) นอกจากนี้บิวทานอลยังนิยมใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมเคมีและการสังเคราะห์ยาง ปัจจุบันการผลิตบิวทานอลส่วนใหญ่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยการนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีต้นทุนสูง การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักจึงได้รับความสนใจมากขึ้น เพราะสามารถใช้ชีวมวลประเภทเดียวกันกับที่ใช้ผลิตเป็นไบโอเอทานอลได้

2.1.1 บิวทานอล

บิวทานอล (Butanol) หรือที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl alcohol) เป็นแอลกอฮอล์ที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน 4 อะตอม (Primary alcohol) มีสูตรโมเลกุล C_4H_9OH มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 74.12 g/mol บิวทานอลเป็นสารที่ไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่จะมีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายคลึงกับกลิ่นของกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่รุนแรง สามารถทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง โดยเฉพาะบริเวณดวงตาและผิวหนัง ไอระเหยของบิวทานอลก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุโพรงจมูกได้ ทั้งนี้ อาจก่อให้เกิดการเสพติดได้เมื่อสูดดมที่ความเข้มข้นสูงๆ บิวทานอลมีคุณสมบัติสามารถละลายเข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีแต่ละลายในน้ำได้ค่อนข้างต่ำ (Lee *et al*., 2008; Durre, 2007) และคุณสมบัติอื่น ๆ ดังแสดงใน

ตารางที่ 2.1 นอกจากนี้ ยังมีสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลแอลกอฮอล์เช่นเดียวกับบิวทานอลได้แก่ เมทานอล เอทานอล และโพรพานอล

บิวทานอลนั้นสามารถผลิตได้จากกระบวนการสามวิธีด้วยกันคือ 1. จากกระบวนการทางเคมีที่มาจากน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน 2. กระบวนการหมัก (Fermentation) จากสารชีวมวลบางชนิด 3. จากกระบวนการขั้นสูง โดยมีสารตั้งต้นจากหลากหลายชนิด แต่วิธีที่นิยมในปัจจุบันที่ทำกันมากคือการหมัก (Fermentation) โดยใช้แบคทีเรียและยีสต์ที่เหมาะสม และเชื้อแบคทีเรียที่มักจะเป็นเชื้อแบคทีเรียในตระกูลของ *Clostridium*

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพของบิวทานอล (Lee *et al*., 2008)

สมบัติ	บิวทานอล
จุดหลอมเหลว (Melting point, °C)	-89.3
จุดเดือด (Boiling point, °C)	117.2
อุณหภูมิขณะที่มีการลุกไหม้ (Ignition point, °C)	367
จุดวาบไฟ (Flash point, °C)	35
ความถ่วงจำเพาะ (Density, g/mL)	0.80
ความดันวิกฤต (Critical pressure, hPa)	48.4
อุณหภูมิวิกฤต (Critical temperature, °C)	287

2.1.2 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลว

ไบโอบิวทานอล เป็นบิวทานอลที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นและกระวนการผลิตทางชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์ได้ในอนาคตอันใกล้นี้ ถึงแม้ว่าในขณะนี้ด้วยเหตุผลหลายประการ เอทานอลยังคงเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่นิยมในปัจจุบันมากกว่าก็ตาม (Hansen *et al*., 2005; Niven, 2005) อย่างไรก็ตาม บิวทานอลจัดเป็นสารที่มีข้อดีกว่าเอทานอลหลายประการ เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี รวมถึงคุณสมบัติทางระดับพลังงานที่ดีกวาเอทานอล กล่าวคือไบโอบิวทานอลมีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนมากกว่าเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากันเครื่องยนต์จะใช้เอทานอลหมดเร็วกว่าบิวทานอล นอกจากนี้บิวทานอลมีความเป็นขั้วต่ำกว่าจึงสามารถผสมกับแก๊สโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ การใช้บิวทานอลไม่ต้องปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์มีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนแก๊สโซลีน พบว่าเครื่องยนต์เดินได้ตามปกติ โดยที่มีการใช้บิวทานอลสูงกว่าแก๊สโซลีน 9% ถึงแม้ว่ารถยนต์ใช้บิวทานอลในปริมาณที่สูงกว่าแก๊สโซลีน แต่พบว่าการใช้บิวทานอลมีการปลดปล่อย

Prince of Songkla University Pattani Campus

คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และการปล่อยสารพิษ NOx ลดลงมาก ซึ่งเป็นเรื่องสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมของโลก

นอกจากการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงใช้กับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีมากมาย ซึ่งบิวทานอลส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบ เช่น บิวทิลอะครีเลท (Butyl acrylate) ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมี เป็นสารเคลือบผิว และเป็นสารผสมในสี และบิวทานอลยังเป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเป็นตัวทำละลายสำหรับสารเคลือบไม้และวัสดุต่าง ๆ ในงานอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ การใช้ประโยชน์จากบิวทานอลและสารประกอบอื่น ๆ คือ เป็นทินเนอร์สำหรับผสมเป็นตัวทำละลายในสี เช่น หมึกพริ้นท์ และเป็นสารสกัดในกระบวนการผลิตยาและสารธรรมชาติ เช่น ยาปฏิชีวนะ ฮอร์โมน และวิตามิน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้บิวทานอลในประโยชน์ด้านอื่น ๆ เช่น กระจกนิรภัย สารทำความสะอาด อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น สารตกแต่งตา ยาทาเล็บ สารในผลิตภัณฑ์การโกนหนวด ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพอนามัย นอกจากนี้เป็นสารสำหรับการสกัด และอุตสาหกรรมอาหารและกลิ่น เป็นต้น (Lee *et al*., 2008; Duree, 2007)

- **ข้อได้เปรียบของการใช้บิวทานอลมากกว่าเอทานอล** (วรวุฒิ, 2558)

1) การระเหย (Volatility) ต่ำกว่า จึงเป็นพิษน้อยกว่า (มีค่า Reid Vapor Preessure (RVP) ต่ำกว่า 7.5 เมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล

2) บิวทานอลไม่ดูดซับความชื้น (จึงมีค่า Hygroscopicity ต่ำกว่า)

3) บิวทานอลมีค่าการกัดกร่อนต่ำกว่า

4) การใช้บิวทานอลปลอดภัยกว่าเอทานอล เนื่องจากมีค่าการติดไฟ (Flash point) สูงกว่า และมีค่าแรงดันเป็นไอต่ำกว่า

5) มีค่าออกเทนสูงกว่า

6) บิวทานอลมีค่าพลังงานสูงกว่าเอทานอล โดยบิวทานอลมีค่า 110,000 BTU ต่อแกลลอน ในขณะที่เอทานอลมีค่า 84,000 BTU ต่อแกลลอน

7) สามารถผสมรวมกับทั้งแก๊สโซลีนและดีเซลได้สมบูรณ์ ดังนั้น จึงทำให้การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงมีความปลอดภัย รวมทั้งอุปกรณ์ การเก็บและการเติมบิวทานอลยังสามารถใช้อุปกรณ์ที่ใช้ในสถานีเติมน้ำมันและรถยนต์ได้โดยไม่ต้องปรับเปลี่ยนใดๆเลย

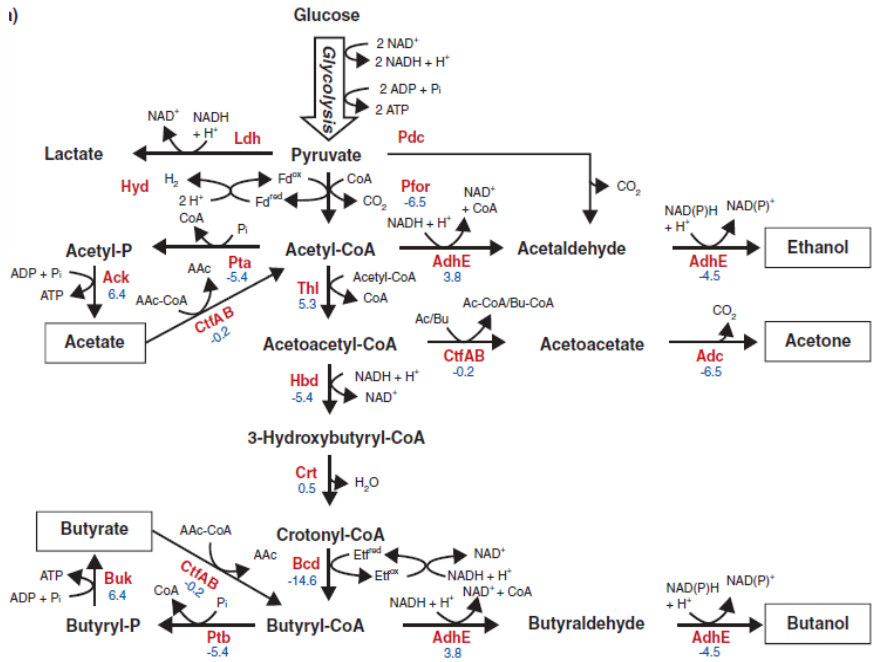
2.1.3 ชีวเคมีของการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล

ไบโอบิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone butanol ethanol fermentation) หรือเรียกว่า การหมัก ABE ซึ่งมีแบคทีเรียหลายสกุลที่สามารถใช้ในการหมัก ABE ได้ โดยแบคทีเรียสกุล *Clostridium* เป็นสกุลที่นิยมใช้มากที่สุด

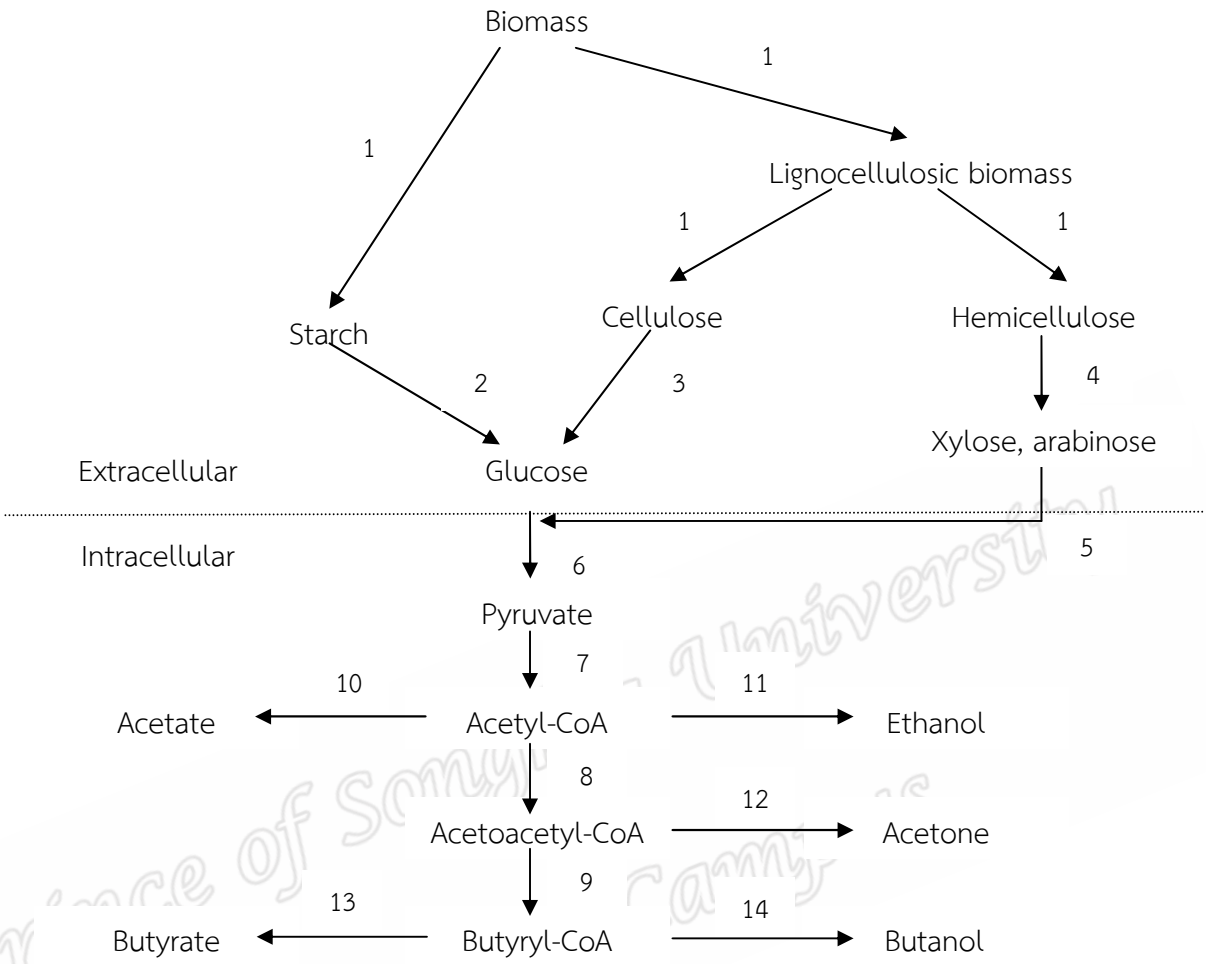
Prince of Songkla University Pattani Campus

แบคทีเรียสกุลนี้สร้างสปอร์และเจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน (Anaerobic bacteria) มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก ซึ่งสามารถคัดแยกได้จากหลากหลายแหล่ง ปัจจุบันแบคทีเรียในสกุลนี้ที่สามารถใช้ในการหมัก ABE ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum, C. beijerinckii, C. saccharobutylicum, C. saccharoperbutylacetonicum* และ *C. pasteurianum*. แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลายชนิดเช่น กลูโคส (Glucose) ซูโครส (Sucrose) แลคโทส (Lactose) ไซโลส (Xylose) ไซเลน (Xylan) แป้งและกลีเซอรอล (Andrade and Vasconcelos, 2003; Mitchell, 1998) โดยแหล่งคาร์บอนเหล่านี้มีอยู่หรือสามารถผลิตได้จากชีวมวลที่มีอยู่หลากหลายและมากมาย ซึ่งวัตถุดิบที่สามารถใช้ผลิตไบโอบิวทานอลได้นั้นอธิบายอยู่ในหัวข้อถัดไป

กลไกการหมัก ABE ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือการผลิตกรดบิวทิริกและกรดอะซิติก ในขั้นตอน Acidogenesis ตามด้วยการการผลิตตัวทำละลาย ABE ในขั้นตอน Solventogenesis โดยแบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลาย ABE ผ่านกระบวนการเมแทบอไลต์เป็นไพรูเวท จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อเนื่องเปลี่ยนเป็นอะซิติลโค เอ อะซิโตอะซิติลโค เอ และบิวทาริวโคเอ ตามลำดับ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ ตัวทำละลาย บิวทานอล อะซิโตน และเอทานอล ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ในสัดส่วน 6:3:1 โดยประมาณ ให้กรดบิวทิริก กรดอะซิติก แก๊สไฮโดรเจน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (อังคณาและคณะ, 2553) วิถีเมแทบอลิซึม (Metabolic pathways) ของการสลายกลูโคสของ *Clostridium* (Ezeji *et al*., 2007b) แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.1 กลไกการหมัก ABE



รูปที่ 2.2 การผลิตไบโอบิวทานอลจากข้าวโพดและวิถีเมแทบอลิซึมของการสลายกลูโคสของ *Clostridium*

1) การปรับสภาพเบื้องต้น;

2) การไฮโดรไลซิสแป้ง (α-amylase, β-amylase, Pullulanase, Glucoamylase, α-glucosidase);

3) การไฮโดรไลซิสเซลลูโลส (Cellulases, β-glucosidase); 4) การไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลส

5) Transketolase-transaldolase และ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway;

6) Phosphotransferase system (PTS) และ EMP pathway; 7) Pyruvate-ferrodoxin oxidoreductase;

8) Thiolase; 9) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, crotonase และ Butyryl-CoA dehydrogenase;

10) Phosphate acetyltransferase และ Acetate kinase;

11) Acetaldehyde dehydrogenase และ Ethanol dehydrogenase;

12) Acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase และ Acetoacetate decarboxylase;

13) Phosphate butyltransferase และ Butyrate kinase; 14) Butyraldehyde dehydrogenase และ Butanol dehydrogenase.

2.1.4 วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ผลิตไบโอบิวทานอล

ไบโอบิวทานอลเป็นพลังงานเชื้อเพลิงเหลวเช่นเดียวกันกับไบโอเอทานอลและไบโอดีเซล ซึ่งสามารถผลิตได้จากชีวมวลที่มีส่วนประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรต โดยปัจจุบันได้แบ่งวัตถุดิบเหล่านี้เป็น 3 รุ่น ดังนี้ (Nigam and Singh, 2011)

2.1.4.1. วัตถุดิบรุ่นที่ 1 เป็นวัตถุดิบจำพวกแป้งและน้ำตาล ได้แก่ ข้าวทุกชนิด ข้าวโพด เมล็ดธัญพืช มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ กากน้ำตาล น้ำตาลสด น้ำผลไม้ และอ้อย เป็นต้นวัตถุดิบประเภทน้ำตาลสามารถเข้าสู่กระบวนการหมักได้เลย โดยปรับปริมาณของน้ำตาลให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการหมักจะสั้นกว่าการหมักวัตถุดิบที่เป็นจำพวกแป้ง สารจำพวกแป้งจะต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นสารจำพวกน้ำตาลโดยใช้กรดหรือเอนไซม์ก่อน จากนั้นก็จะเข้าสู่ขั้นตอนการหมักเพื่อผลิตเป็นแอลกอฮอล์ต่อไป วัตถุเหล่านี้ส่วนใหญ่จะเป็นพืชอาหารที่มนุษย์นำมาใช้บริโภค ดังนั้นการนำพืชเหล่านี้ไปเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานต้องแน่ใจว่าไม่กระทบต่อความมั่นคงด้านอาหาร

2.1.4.2. วัตถุดิบรุ่นที่ 2 วัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมักจะเป็นชีวมวลจากวัสดุเหลือใช้จากทางการเกษตรหรือจากแหล่งอื่น ๆ (เศษไม้ เศษกระดาษ ซังข้าวโพด รำข้าว ฟางข้าว กากอ้อย เป็นต้น) หรือชีวมวลจากพืชหญ้า หรือวัชพืชทั้งหลาย ข้อดีของวัตถุดิบรุ่น 2 คือ ไม่ใช่วัตถุดิบที่เป็นอาหารจึงไปกระทบต่อความมั่นคงด้านอาหาร จึงทำให้วัตถุดิบเหล่านี้มีราคาไม่สูง หมุนเวียนได้ มีองค์ประกอบหลักคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งสองตัวแรกสามารถไฮโดรไลซ์ให้เป็นน้ำตาลได้ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพเบื้องต้นก่อน เพื่อกำจัดลิกนิน และการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลที่สามารถถูกใช้ในกระบวนการหมักต่อไป

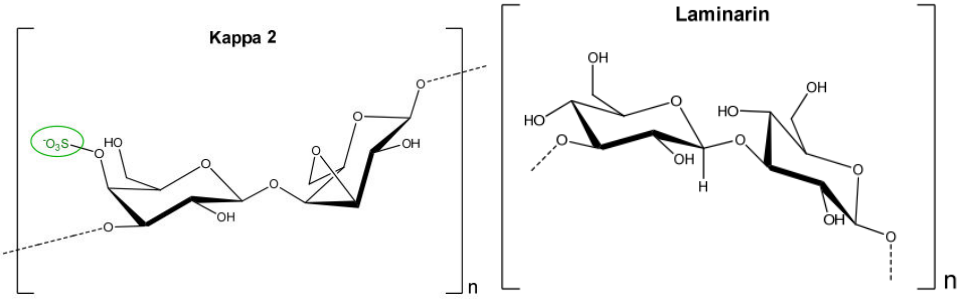
2.1.4.3. วัตถุดิบรุ่นที่ 3 เนื่องจากวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลสมีโครงสร้างที่ทำลายยาก ยุ่งยากในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสพวกลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล และเพื่อเป็นการแก้ปัญหาเรื่องความมั่นคงด้านอาหาร จึงมีการแสวงหาแหล่งวัตถุดิบอื่น ซึ่งพบว่ามีแหล่งของวัตถุดิบที่มีศักยภาพที่น่าสนใจ คือ ชีวมวลจากสาหร่ายและสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) สาหร่ายมีทั้งที่สามารถเจริญเติบโตในน้ำจืดและน้ำเค็ม จึงไม่เบียดเบียนพื้นที่เพาะปลูกที่เป็นดิน เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตสูง สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและตรงข้ามกับพืชชั้นสูง นอกจากนี้ยังพบว่าผนังเซลล์ของสาหร่ายนั้นไม่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นข้อดีต่อการนำชีวมวลสาหร่ายไปหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเหลว (Rodrigues and Bon, 2011)

2.1.5 สาหร่าย

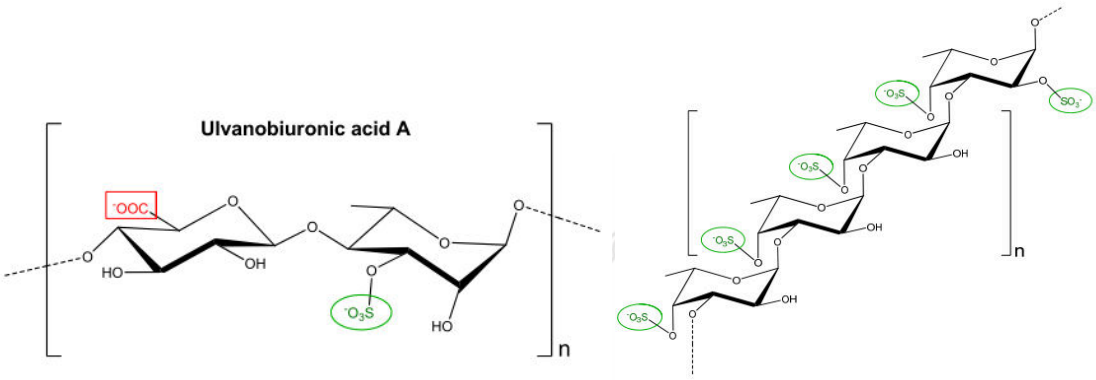
สาหร่าย หมายถึง สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ ตรงกับภาษาอังกฤษว่า algae และภาษากรีก phykos เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Microscopic algae :Microalgae) ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ จนถึงขนาดใหญ่ที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (Macroscopic algae :Macroalgae) ซึ่งดูเหมือนมีราก ล้าต้นและใบ รวมเรียกว่า ทัลลัส (Thallus) ส่วนใหญ่จะมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง (ยุวดี, 2549) สาหร่ายจัดเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก สาหร่ายพวกที่พบล่องลอยไปตามกระแสน้ำหรือแขวนลอยในน้ำชั้นบนใกล้ผิวน้ำในแหล่งต่างๆ เรียกว่า แพลงก์ตอน (Plankton) สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศในน้ำ เนื่องจากลักษณะทางกายภาพและขนาดทำให้แพลงก์ตอนไม่สามารถรักษาการเคลื่อนที่ในกระแสน้ำได้ แพลงก์ตอนพืชเป็นกลุ่มที่มีสารสีในเซลล์ทำให้สามารถดูดซับพลังงานและใช้พลังงานแสงร่วมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและสร้างสารอินทรีย์ แพลงก์ตอนพืชนับว่ามีความสำคัญมาก เพราะว่าเป็นอาหารเบื้องต้นในห่วงโซ่อาหารในแหล่งน้ำ (ลัดดา, 2542)

สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae) หมายถึง สาหร่ายกลุ่มที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งมีลักษณะการรวมตัวเป็นโคโลนีหรือทัลลัสที่แตกต่างกันไป (Sheath and Cole, 1992) ซึ่งสาหร่ายขนาดใหญ่ ส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่ายประเภทยึดเกาะกับพื้นท้องน้ำ ลักษณะของพื้นท้องน้ำมีความสำคัญ โดยจะมีผลต่อการกระจายของสาหร่ายขนาดใหญ่ และเนื่องจากสาหร่ายขนาดใหญ่สามารถเจริญได้ดีบนกรวดและก้อนหิน ดังนั้นพื้นท้องน้ำที่มีลักษณะเป็นกรวดและก้อนหินจะพบความหลากหลายของสาหร่ายขนาดใหญ่ค่อนข้างสูง (สมสุข, 2538) เช่น *Cladophora*, *Aegagropila* และ *Rhizoclonium* เป็นต้น

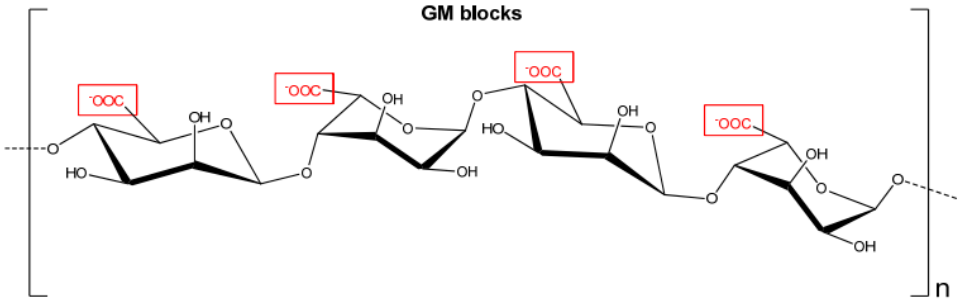
สาหร่ายมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันออกไป (Jang *et al*., 2012) รายงานองค์ประกอบของสาหร่ายทะเลที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลดังนี้ คาร์โบไฮเดรต (44.5–66.0%) โปรตีน (10.6–19.9%) ไขมัน (0.4–1.8) และเถ้า (21.8–35.1%) สาหร่ายมีลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่น้อย และประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ถูกย่อยได้ง่ายกว่าวัสดุลิกโนเซลลูโลสผนังเซลล์ซึ่งเป็นพอลิแซคคาร์ไรด์คือ Ulvans, Agarans และ Carrageenans, Alginates และ Fucans พบได้ในสาหร่ายสีเขียว สีแดง และสีเขียวตามลำดับ นอกจากนี้น้ำตาลที่พบในสาหร่ายได้แก่ Mannitol และ Glucan (ซึ่ง Glucan จะอยู่ในรูปของ Laminarin หรือ Cellulose) และ Carrageenans (Wargacki *et al*., 2012; Vera *et al*., 2011)



Kappa- carrageenans Laminarin



Ulvan Fucan



Alginate

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของน้ำตาลที่พบได้ในสาหร่ายทะเล (Vera *et al*., 2011)

เมื่อพิจารณาพอลิแซคคาร์ไรด์ซึ่งเป็นผนังเซลล์ของสาหร่ายแล้ว (รูปที่ 2.3) พบว่ายังคงต้องมีการปรับสภาพเบื้องต้นเพื่อให้เกิดการไฮโดรไลซ์ได้ง่ายขึ้น (Huesemann *et al*., 2012) โดยสรุปขั้นตอนการผลิต ABE จากสาหร่ายได้ดังนี้

สาหร่าย ->การลดขนาด ->การปรับสภาพเบื้องต้น ->ไฮโดรไลซิส ->การหมัก ABE

Rhizoclonium เป็นสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง เซลล์แต่ละเซลล์มีรูปทรงกระบอก ผนังเซลล์แต่ละเซลล์มักจะหนามีลักษณะเป็นตัว H ซ้อนกัน คลอโรพลาสต์อาจมีลักษณะเป็นร่างแห หรืออยู่ริมๆเซลล์ หรืออาจเป็นแผ่นเต็มเซลล์ ไม่มีไพรีนอยด์ สืบพันธุ์โดยการที่เส้นสายขาดออกเป็นท่อนหรือสร้างสปอร์ที่มีแฟลกเจลลัม 2 หรือ 4 เส้น และอาจพบสปอร์แบบอะพลาโนสปอร์ ถ้าสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมอาจสร้างอะคีนิท ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแกมมีท ซึ่งจะผสมกับไอโซแกมมี เมื่อยังอ่อนอยู่อาจมีโฮลฟาสต์ยึดติดกับพื้น แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นจะขาดลอยเป็นแพลงก์ตอนพืช (ปริญญา และ อมรรัตน์, 2556)

จากการรายงานในงานวิจัยของ Ehimen *et al.*, (2013) การประยุกต์ใช้ในการปรับสภาพเบื้องต้นเชิงกลและทางชีวภาพของสาหร่าย *Rhizoclonium* เพื่อย่อยสลายชีวมวลสาหร่ายในการผลิตแก๊สมีเทน พบว่าสามารถผลิตแก๊สมีเทน 62–97 mL CH_4 / g VS และจากการรายงานของ Chao *et al*., (1991) สาหร่าย *Rhizoclonium* มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 57.4 และมีหลากหลายชนิดของน้ำตาลที่สามารถเป็นซับสเตรทในกระบวนการหมักได้ ดังนั้น การนำสาหร่าย *Rhizoclonium* จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการผลิตพลังงานชีวภาพโดยกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศได้

สาหร่ายพุงชะโดหรือสาหร่ายห่างม้า เป็นพรรณไม้ใต้น้ำ ประเภทใบเลี้ยงคู่ (Submerged plant) มีอายุหลายปี ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Ceratophyllum demersum* L. ชื่อสามัญคือ Coontail, Hornwort ลักษณะลำต้นเป็นสายกลมเรียวยาว ไม่มีราก มีใบออกมาตามข้อโดยรอบเป็นชั้น แตกกิ่งก้านมากจนดูเป็นกลุ่มใหญ่ใต้ผิวน้ำ ลอยตัวอย่างอิสระ ใบมีลักษณะคล้ายเส้นด้าย ขอบใบจักหยาบ ปลายใบแตกเป็น 2 แฉก ดอกเป็นดอกเดี่ยวแยกเพศ เกิดที่ซอกโคนใบ ดอกตัวผู้เห็นได้ชัด คือ มีเกสรตัวผู้สีขาวอยู่เป็นกระจุก ไม่มีกลีบดอก ไม่มีก้านดอก ส่วนดอกตัวเมียจะเห็นชัดเจนเมื่อติดผลแล้ว ผลเป็นรูปไข่ สีดำมีหนามยื่นยาว 3 อัน สาหร่ายพุงชะโดเป็นวัชพืชที่ชอบขึ้นในที่ตื้นพบได้ตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ทั่วไป เช่น ทะเลสาบ บ่อน้ำ บ่อปลาหรือบ่อบำบัดน้ำเสีย จะกระจายอยู่ในเขตอุ่นและร้อน ในประเทศไทยจะพบมากบริเวณภาคใต้ ตลอดทั้งปี (ช่อทิพย์, 2531)

จากการสำรวจเบื้องต้นพบสาหร่ายพุงชะโดบริเวณคูน้ำรอบสวนสาธารณะ สวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จังหวัดปัตตานี ซึ่งคูน้ำดังกล่าวมีขนาดประมาณ กว้าง 3 เมตร ลึก 1 เมตร ยาว 2 กิโลเมตร พืชน้ำกำลังได้รับความสนใจในฐานะชีวมวลน้ำเพื่อการผลิตพลังงานรุ่นที่ 3 ที่ให้พลังงานมากกว่าชีวมวลบกถึง 6-12 เท่า เนื่องจากโครงสร้างของสาหร่ายที่ประกอบด้วยเซลลูโลสในปริมาณที่ไม่สูงเกินและลิกนินอยู่น้อย ทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่า Koyama *et al*., (2014) รายงานปริมาณลิกนินในสาหร่ายพุงชะโดที่พบในประเทศญี่ปุ่นเท่ากับ 15% ของสาหร่ายพุงชะโดแห้ง และมีศักยภาพในการหมักเพื่อเปลี่ยนเป็นมีเทนร้อยละ 60 ดังนั้น การนำสาหร่าย

พุงชะโดที่ไม่ได้เป็นพืชอาหารหลักและเจริญเติบโตได้รวดเร็วมาเป็นซับสเตรทสำหรับการผลิตพลังงานชีวภาพโดยกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ

2.1.6 การปรับสภาพเบื้องต้น (Pretreatment)

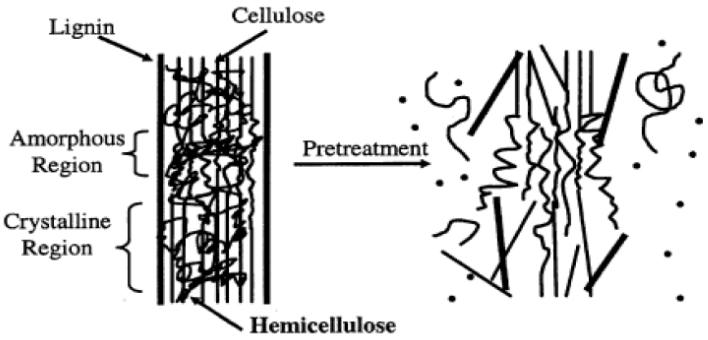
หลังจากเก็บเกี่ยวหรือเก็บรวบรวมสาหร่าย ทำความสะอาด ลดขนาดและความชื้น ขั้นตอนต่อไปคือการปรับสภาพเบื้องต้น ซึ่งมีวัตถุประสงค์หลักคือการทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่ต่างกัน ทำให้มีวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการปรับสภาพเบื้องต้นของวัตถุดิบแต่ละประเภทแตกต่างกันไป โดยกระบวนการที่ดีต้องการประกอบด้วยคุณสมบัติดังนี้คือ ได้ปริมาณและความเข้มข้นของน้ำตาลสูง การสลายตัวหรือการสูญหายของน้ำตาลต่ำ ไม่เกิดสารยับยั้ง เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงเมื่อมีความชื้นต่ำ ไม่จำเป็นต้องลดขนาดของวัตถุดิบลงมาก ใช้พลังงานทั้งเชิงกลและความร้อนต่ำ เกิดกากของเสียและน้ำเสียต่ำ และที่สำคัญคือมีต้นทุนต่ำ (Alvira *et al*., 2010)

การปรับสภาพเบื้องต้น สามารถใช้ได้ทั้งกระบวนการทางชีววิทยาโดยใช้เชื้อรา ทางกายภาพ เช่นการตัด การคั้น การรีด และทางเคมีร่วมกับความร้อนที่ได้รับความนิยมเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงสุด การใช้กรดซัลฟิวริกหรือไฮโดรคลอริก (0.1-1.0%) ที่อุณหภูมิ 121°C สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 13.5 g/L จากสาหร่าย *Saccharina japonica* (Jang *et al*., 2012) ในขณะที่การใช้สารละลายเบส $Ca(OH)_2$ ในการปรับสภาพสาหร่ายนั้นไม่เหมาะสมเนื่องจากเกิดเจล (Kim *et al.,* 2011) แต่อย่างไรก็ตามการใช้กรดร่วมกับความร้อนนั้นอาจเกิดการสลายตัวของกลูโคสและไซโลสเป็น 5-hydroxymethylfurfural (HMF) และ furfural ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟิวแรน ตามลำดับ มีผลการทดลองว่าสารสองตัวเป็นสารยับยั้งการทำงานของยีสต์ในการหมักเอทานอล แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารสองตัวนี้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 3 g/L จะไม่ยับยังการทำงานของ *Clostridium beijerinckii* BA101 (Ezeji *et al*., 2007a) เนื่องจากการปรับสภาพหรือการไฮโดรไลซ์สาหร่ายด้วยกรดร่วมกับความร้อนนั้นเกิดการสลายตัวของน้ำตาลและทำให้ผลได้ลดลง จึงควรปรับสภาพเพียงช่วงเวลาสั้น ใช้กรดเจือจาง และความร้อนต่ำ เพียงเพื่อให้ผนังเซลล์เปลี่ยนสภาพหรือสลายโครงสร้างเพื่อให้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ได้ง่ายขึ้นในขั้นตอนต่อไป การไฮโดรไลซ์โดยใช้เอนไซม์นั้นจะไม่ก่อให้เกิดสารยับยั้งและการสลายตัวของกลูโคสเนื่องจากการทำงานค่อนข้างมีความเฉพาะเจาะจงกลูแคนหรือเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่ายสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้โดยเอนไซม์เซลลูเลส เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส สามารถพบได้มากในแบคทีเรีย เห็ดรา โปรโตซัว เช่นผลิตจาก *Trichoderma reesei* และ *Cellulomonas fimi* เอนไซม์ผสมนี้จะประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดเป็นอย่างน้อย ได้แก่ (1) Endoglucanase ทำหน้าที่ย่อย β-1,4-glycosidic linkage ผลการย่อยทำให้สายโมเลกุลของเซลลูโลสสั้นลงและหมู่รีดิวซ์เพิ่มขึ้น ผลผลิตคือกลูโคส เซลโลไตรโอส

(Cellotriose), (2) Exoglucanase หรือ Cellobiohydrolase เอนไซม์นี้สามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึกหรือเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลเดกทรินและเซลโลไบโอสและ (3) β-glucosidase ซึ่งย่อยเซลโลไบโอสและ Cellooligosaccharide ได้เป็นกลูโคส (El-Zawawy *et al.*, 2011)

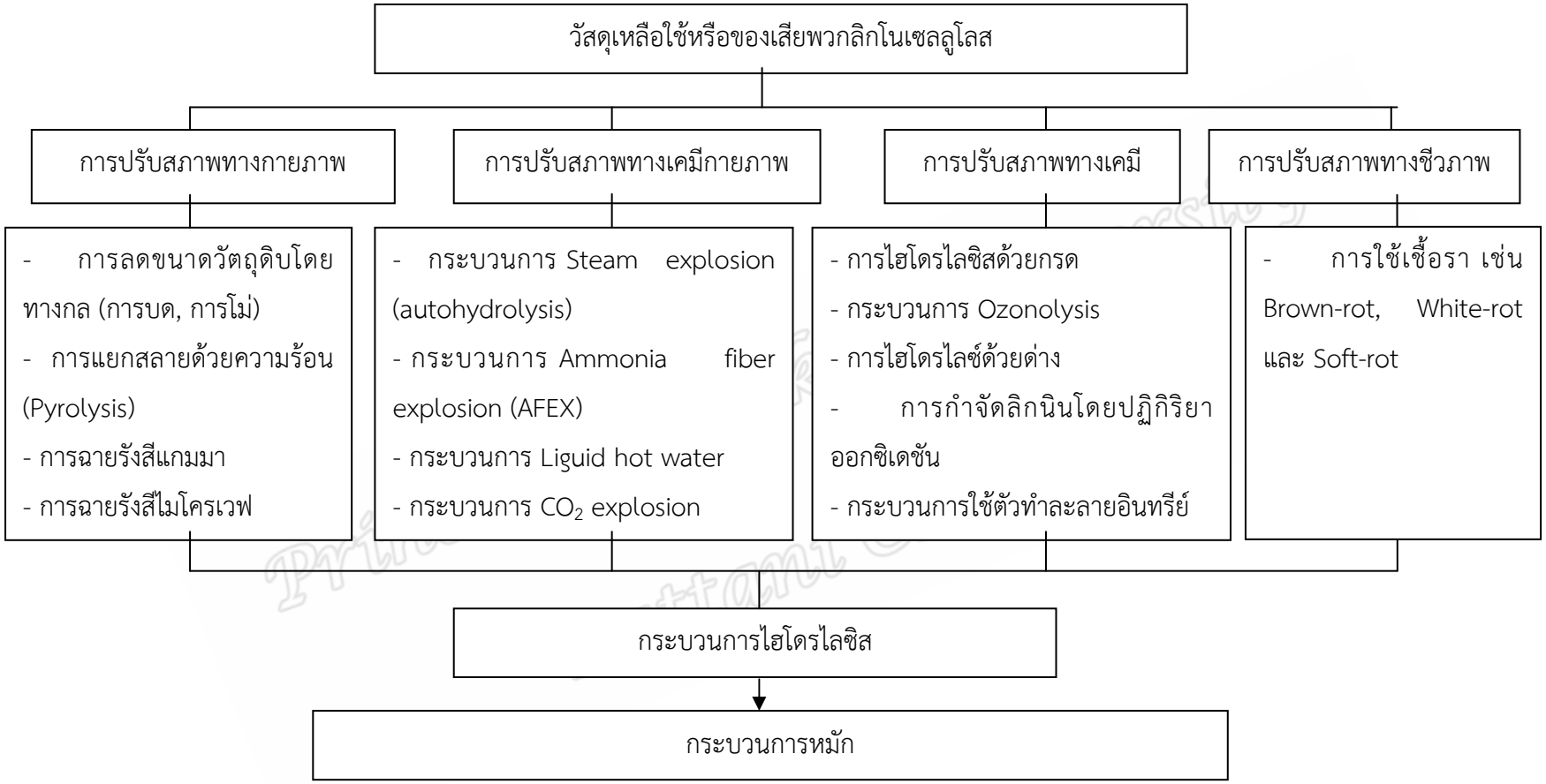
วัสดุลิกโนเซลลูโลสนั้นประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก ๆ คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนินซึ่งเซลลูโลสและลิกนินนี้จะอยู่รวมกันที่บริเวณผนังเซลล์ และเนื้อเยื่อชั้นในของเซลล์ โดยมีเฮมิเซลลูโลสเป็นตัวเชื่อมประสานระหว่างเซลลูโลสและลิกนินเข้าไว้ด้วยกัน ทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรงสูง การปรับสภาพวัตถุดิบนั้นทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสได้มากขึ้น เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลนำไปใช้ในการหมักต่อไป และมีจุดประสงค์เพื่อทำให้โครงสร้างที่เป็นผลึก หรือโครงสร้างระเบียบ (Crystalline) ของเซลลูโลส และลิกนินที่ติดอยู่แตกออกดังภาพที่ 2.4 (Mosier *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังกำจัดเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนของลิกโนเซลลูโลส โดยการปรับสภาพวัตถุดิบมีประโยชน์ดังนี้ 1) ปรับปรุงโครงสร้างของน้ำตาล หรือเพิ่มความสามารถในขั้นตอนการย่อยให้ได้น้ำตาล 2) ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต 3) ลดการเกิด by-products ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งในขั้นตอนการย่อย และการหมัก และ 4) ลดต้นทุนในการผลิต การปรับสภาพวัตถุดิบเป็นหนึ่งในขั้นตอนที่แพงที่สุดในการเปลี่ยนชีวมวลเป็นน้ำตาลที่ใช้ในการหมักและจะเป็นขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพและมีค่าใช้จ่ายลดลงหากมีการวิจัยและพัฒนาที่เหมาะสม (Mosier *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009)



รูปที่ 2.4 การปรับสภาพ (Pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของลิกโนเซลลูโลส

วิธีการปรับสภาพเบื้องต้นชีวมวลมีมากมาย ซึ่งสามารถแบ่งจำแนกออกได้ดัง รูปที่ 2.5 คือ กระบวนการทางกายภาพ ทางเคมีกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ



รูปที่ 2.5 วิธีต่าง ๆ ในการปรับสภาพเบื้องต้นของชีวมวล (ดัดแปลงจาก สุขใจ, 2554)

2.1.6.1. การปรับสภาพเบื้องต้นโดยกระบวนการทางกายภาพ

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบชีวมวล และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถเข้าไปไฮโดรไลซ์ทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น และเพื่อลดโครงสร้างของเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างแบบผลึก ถ้าใช้กระบวนการทางกล วัตถุดิบจะถูกบดให้ละเอียด โดยการตัด การบด หรือ การใช้ความร้อน ซึ่งขนาดของวัตถุดิบจะถูกทำให้อยู่ระหว่าง 10-30 mL

2.1.6.2. การปรับสภาพเบื้องต้นโดยกระบวนการทางเคมีกายภาพ

การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion) การระเบิดด้วยไอน้ำถูกนำมาใช้ในการแยกวัสดุจำพวกไม้ และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เมื่อประมาณ 60 ปีมาแล้ว และเทคโนโลยีนี้ได้มีการศึกษาปรับปรุงจนในปัจจุบันเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำสามารถทำงานได้ทั้งรูปของกระบวนการแบบเบ็ดเสร็จ (Batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) ในการทำงานจะใช้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิ และความดันสูงไปแยกเอาส่วนของเฮมิเซลลูโลสออกมาจากส่วนของเซลลูโลส และลิกนินที่ประกอบอยู่ในไม้หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยระยะเวลาของการระเบิดด้วยไอน้ำจะไม่เกิน 5 นาที ส่วนของเซลลูโลสและลิกนินที่เหลือจะแยกออกจากกันโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งจากเทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำนี้ก็จะสามารถแยกเอาส่วนต่าง ๆ คือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน ไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเคมีมูลค่าเพิ่มต่าง ๆ ได้ ตัวแปรที่สำคัญของเทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ อุณหภูมิของไอน้ำและระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด

2.1.6.3. การปรับสภาพเบื้องต้นโดยกระบวนการทางเคมี

1) การปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้กรด

กรดซัลฟิวริกเจือจางจะผสมเข้ากับชีวมวล เพื่อไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลไซโลส และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ และสลายน้ำตาลไซโลสให้กลายเป็นเฟอร์ฟูรอลต่อ เฟอร์ฟูรอลจะนำกลับคืนมาโดยการกลั่น กรดที่ผสมหรือสัมผัสกับชีวมวลจะคงอยู่ในอุณหภูมิ 160-220 °C ใช้ช่วงเวลาจากวินาทีเป็นนาที โดยกรดซัลฟิวริกถูกนำมาใช้ในการกำจัดเฮมิเซลลูโลส และการ ไฮโดรลิซิสเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

การไฮโดรลิซิสโดยกรด จะเกิดการปลดปล่อยสารโมเลกุลขนาดกลางหรือโอลิโกเมอร์และสารโมเลกุลเดี่ยวหรือโมโนเมอร์ นั่นคือกรดจะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสเป็นกลูโคส ตามด้วยการไฮโดรลิซิสกลูโคสเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ และผลิตภัณฑ์ตัวอื่นออกมา (Mosier *et al*., 2005)

ข้อดีของการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้กรดคือ ให้ผลได้ของน้ำตาลเฮมิเซลลูโลสมากรวมถึงการทำให้ความสามารถในการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสสูง โดยการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้มากกว่าเซลลูโลส ทำให้เหมาะสมต่อการไฮโดรลิซิสเอนไซม์ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถละลายโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบออกได้ ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือจำเป็นต้องมีขั้นตอนการสะเทินกรดให้เป็นกลาง ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการไฮโดรลิซิสน้ำตาลต่อ ทำให้ผลได้ของน้ำตาลลดลง และได้องค์ประกอบอื่น

Prince of Songkla University Pattani Campus

เกิดขึ้น ได้แก่ กรดอะซิติก และเฟอร์ฟูรอล เป็นต้น ที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ในขั้น ตอนการหมักได้ วิธีการนี้ยังต้องการอุปกรณ์ที่มีราคาแพง โดยถังปฏิกรณ์ที่ใช้ต้องมีความทนทานต่อการกัดกร่อน และแข็งแรงในอุณหภูมิและความดันสูงได้

2) การปรับสภาพเบื้องต้นโดยด่าง

การใช้สารละลายด่าง ในการปรับสภาพเบื้องต้นวัตถุดิบชีวมวล มีประสิทธิภาพคือขึ้นอยู่กับปริมาณลิกนิน โดยมีกลไกของปฏิกิริยา Saponification ของพันธะเชื่อมโยงของเอสเทอร์ภายในโมเลกุลที่ของไซแลนของเฮมิเซลลูโลส และองค์ประกอบอื่น เช่น ลิกนิน กับด่างแก่ มีรายงานว่ารูพรุนของวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพิ่มขึ้น โดยการกำจัดพันธะเชื่อมโยง (Silverstein, 2004) การปรับสภาพเบื้องต้นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางทำให้วัสดุเกิดการพองตัวส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น Degree of polymerization และความเป็นผลึกลดลง เกิดการแยกตัวของโครงสร้างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางนี้สามารถลดเปอร์เซ็นต์ของลิกนินลงได้ในไม้ใบกว้างและส่งผลดีต่อพืชจำพวกฟางที่มีปริมาณลิกนินต่ำ

2.1.6.4. การปรับสภาพเบื้องต้นโดยกระบวนการทางชีวภาพ

การปรับสภาพเบื้องต้นทางชีวภาพ จะใช้เชื้อรา เช่น Brown-rot, White-rot และ Soft-rot เป็นต้น ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสที่สามารถไฮโดรไลซ์ได้ โดยรากลุ่ม White-rot เป็นกลุ่มราในคลาส Basiomycetes ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ส่วนการไฮโดรลิซิสลิกนิน ของรากลุ่ม White-rot ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, และ *Trametes versicolor* เกิดด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ราประกอบด้วยเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (LiP) แมงกาเนสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และ แลกเคส (Laccases) (Silverstein, 2004)

ข้อดีของการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้เชื้อราคือ ไม่ต้องใช้สารเคมีที่มีความรุนแรง และอุณหภูมิที่ใช้ไม่สูง ใช้พลังงานต่ำ เป็นสภาวะที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมที่ใช้สารเคมีและอุณหภูมิสูง ส่วนข้อเสียคือ เนื่องจากสภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง จึงทำให้ใช้เวลาในการไฮโดรลิซิสลิกนินนานขึ้น เพราะเกิดอัตราการไฮโดรลิซิสชีวมวลต่ำ (Silverstein, 2004)

2.1.7 การไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

เนื่องจากสาหร่ายมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตและลิกนินอยู่น้อย ดังนั้นเมื่อทำการไฮโดรไลซิสจะได้น้ำตาลหลายชนิดปะปนกันออกมา รวมทั้งสารอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซิส สำหรับการไฮโดรไลซิสมี 2 วิธี ได้แก่ วิธีการไฮโดรไลซิสด้วยกรด และวิธีการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

2.1.7.1. การไฮโดรลิซิสด้วยกรด (Acid hydrolysis) (ประมุข, 2555)

สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้น้ำตาลกลูโคส แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เนื่องจากมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไป ทำให้ได้ผลพลอยได้อื่น ๆ ได้แก่ เฟอฟูรอล นอกจากนี้กรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลส ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 70% ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40% ขึ้นไป กรดซัลฟิวริกเจือจาง 1% เป็นต้น และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160°C ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรง และไม่เฉพาะเจาะจง โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อนจึงมีราคาแพงนอกจากนี้น้ำทิ้งจากการย่อยจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีกรดเจือปน

2.1.7.2. การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบสำคัญคือเซลลูโลสซึ่งเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-Glycosidic linkage ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เชิงซ้อน 3 ส่วน ดังนี้

1) Endoglucanase (endo- β-1,4-glucanase) (E.C.3.2.1.4) (พิจิตรา, 2548) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (Phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (Hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (Cello-oligomers) โดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่ง พันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (Random) ทำให้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Cellooligo-saccharides) เซลโลเพนธาโอส (Cellopentaose) เซลโลไตรโอส (Cellotriose) เซลโลไบโอส (Cellobiose) และกลูโคส โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักใดขึ้นอยู่กับสมบัติ ของแต่ละเอนไซม์

2) Exoglucosidase (Exo- β -1,4-glucanase) หรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91) พบว่า มักทำหน้าร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (Non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (Microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส

3) เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคไซเนส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง กลไกลการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งใน

Prince of Songkla University Pattani Campus

ส่วนที่เป็นระเบียบ (Crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน

เนื่องจากโครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยโครงสร้างผลึก หรือส่วนที่เป็นระเบียบ (Crystalline region) และส่วนที่ไม่มีระเบียบ (Amorphous region) เอนไซม์ Endoglucanase จะเข้าไปย่อยสลายส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ ทำให้เส้นใยเซลลูโลสขาดเป็นช่วง ๆ เอนไซม์ Exoglucanase เข้าไปย่อยส่วนปลายของเส้นใยที่ขาดออกมา จากนั้นโมเลกุลของเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลที่สั้นลงโดยเอนไซม์ Exoglucanase และโมเลกุลที่สั้นลงนั้นถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β-glucosidase ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส

2.1.8 กระบวนการหมัก Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation

กระบวนการหมักบิวทานอลมีทั้งการแบบแบบแบทช์ เฟด-แบทช์ และแบบต่อเนื่อง นอกจากนี้กระบวนการหมักโดยทั่วไปอาจแบ่งเป็น 2 แบบ (Shen and Agblevor , 2010)

2.1.8.1 แบบเอนไซม์ไฮโดรไลซิสสมบูรณ์แล้วตามด้วยการหมัก ABE (Separate hydrolysis and fermentation, SHF)

เป็นกระบวนการการที่แยกขั้นตอนระหว่างการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ให้ได้กลูโคสก่อน แล้วจึงนำไปหมักต่อเพื่อให้ได้บิวทานอล ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถแยกขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน 40-60°C และการหมักที่มีอุณหภูมิ 30°C เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเจริญของแบคทีเรีย แต่กระบวนการนี้มีข้อเสียที่สำคัญคือ กลูโคสที่เกิดขึ้นที่มีปริมาณมากถึงจุดหนึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ในระหว่างการย่อยสลาย จึงทำให้ต้องใช้วัสดุหมักปริมาณไม่มาก แต่ให้ใช้เอนไซม์ปริมาณมากแทนเพื่อที่จะให้ได้ผลผลิตเป็นบิวทานอลในปริมาณที่ยอมรับได้

2.1.8.2 เอนไซม์ไฮโดรไลซิสบางส่วนแล้วตามด้วยการหมัก ABE (Simultaneous saccharification (hydrolysis) and fermentation, SSF)

เป็นกระบวนการที่รวมเอาการย่อยสลายเซลลูโลสและการหมักไว้ในขั้นตอนเดียวกัน กลูโคสที่เกิดขึ้นในระบบจะถูกใช้ไปในการหมักแบคทีเรียอย่างต่อเนื่อง จึงพบว่ามีเซลโลไบโอสและกลูโคสอยู่ในระดับต่ำมาก ด้วยเหตุนี้จึงช่วยลดปัญหาของการยับยั้งการทำงานของเซลลูเลสโดยน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นได้ และช่วยลดปริมาณเอนไซม์ที่ต้องใช้ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมของกระบวนการนี้อยู่ที่ประมาณ 37–38°C และจะดีที่สุดในช่วงประมาณ 40–60°C เพราะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ประสิทธิภาพของกระบวนการหมักสามารถระบุได้เป็นอัตราการผลิต (Productivity) ซึ่งหมายถึงอัตราการผลิต ABE ต่อน้ำหนักวัตถุดิบต่อเวลา และผลได้ (Yield) ซึ่งหมายถึงปริมาณ ABE

Prince of Songkla University Pattani Campus

ต่อน้ำหนักวัตถุดิบ กระบวนการแบบ SSF จะมีอัตราการผลิตสูงกว่า SHF เพราะใช้เวลาในการดำเนินการสั้นกว่า แต่ในกรณีของผลได้นั้นไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดขึ้นอยู่กับแต่ละกรณี กระบวนการแบบ SSF มีข้อดีคือลดความเข้มข้นของกลูโคสซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เพราะกลูโคสจะถูกใช้ในการหมัก และระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสก็นานกว่าแบบ SHF ซึ่งซับสเทรตจะถูกแยกออกจากไฮโดรไลเสทก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก สำหรับข้อดีของ SHF คือสามารถดำเนินการได้ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการใช้เอนไซม์ ซึ่งมักจะอยู่ที่อุณหภูมิที่สูงกว่า (50°C) ดังนั้นถ้าหากใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซิสในสภาวะที่เหมาะสมเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นจึงนำส่วนผสมทั้งหมดทั้งไฮโดรไลเสทและกากไฮโดรไลเสทไปหมักตามสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย ซึ่งเราเรียกกระบวนการนี้ว่า เอนไซม์ไฮโดรไลซิสบางส่วนแล้วตามด้วยการหมัก ABE (Semi-Simultaneous saccharification and fermentation, SSSF) ก็จะสามารถทำให้ประสิทธิภาพของการหมักมีอัตราการผลิตและผลได้ที่สูงกว่า SHF และ SSF ได้ หากใช้ระยะเวลาของเอนไซม์ไฮโดรไลซิสก่อนหมักที่เหมาะสม

2.1.9 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการหมัก

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการหมักบิวทานอล ได้แก่

2.1.9.1. ซับสเตรท (Substrate) วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารเมแทโบไลต์ที่ต้องการ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้สาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลซ์กลายเป็นน้ำตาลแล้วโดย *Clostridium beijerinckii* ที่สามารถใช้น้ำตาลทั้งได้ Pentose และ Hexose

2.1.9.2. เชื้อจุลินทรีย์ (Microorganism) ในช่วงการหมัก สิ่งสำคัญประการหนึ่ง คือการเตรียมหัวเชื้อสำหรับการหมัก เป็นการเตรียมจุลินทรีย์ให้แข็งแรงและมีปริมาณมากพอต่อการหมัก รวมทั้งปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

2.1.9.3. ผลของธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่อการหมักซึ่งได้แก่ คาร์บอนซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญที่ได้จากซับสเตรทนอกจากนี้ยังมีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ วิตามิน ซึ่งสารอาหารเหล่านี้สามารถพบได้ในสาหร่ายทะเล ในกรณีที่มีน้อยเกินก็สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อร่วมได้

2.1.9.4. อุณหภูมิและค่า pH นับว่ามีความสำคัญมากต่อการหมัก สำหรับแบคทีเรีย *C. beijerinckii* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 24-38°C โดยที่อุณหภูมิต่ำจะสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงกว่าแต่อัตราการผลิตก็จะต่ำกว่า สำหรับ pH ที่เหมาะสมคือ 4.8-5.5 (Glassner *et al.,* 1991) ดังนั้นจำเป็นต้องควบคุม pH ระหว่างการหมักโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์

2.1.9.5. ตัวยับยั้ง (Ezeji *et al.*, 2007a) ศึกษาผลของสารประกอบที่เกิดขึ้นระหว่างการไฮโดรไลซิสของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (จากข้าวโพด และข้าว) ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ได้แก่ Furfural,

Prince of Songkla University Pattani Campus

Hydroxymethyl furfural (HMF), Acetic, Ferulic, Glucuronic, ρ-coumaric acids, Syringaldehyde, และ Phenolic compounds ต่อการทำงานของ *Clostridium beijerinckii* BA101 ในกระบวนการหมัก ABE ผลการทดลองพบว่า furfural และ HMF ที่ความเข้มข้น 3 g/L ไม่ยับยั้งการทำงานของ C. *beijerinckii* BA101 ในขณะที่สารตัวอื่นแสดงการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเกลือ Sodium acetate (8.9 g/L) และ Sodium sulfate (13.3 g/L) ก็ยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียเช่นเดียวกัน โดยตัวหลักในการยั้บยั้งแบคทีเรียในกระบวนการหมักคือบิวทานอลที่เกิดขึ้นนั่นเองโดยจะแสดงความเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูงกว่า 12 g/L (Andrade and Vasconcelos, 2003)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wang *et al.* (2004) ได้พัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Logistic model ที่มีความซับซ้อนน้อยและง่ายต่อการใช้งาน สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการอธิบายจลนพลศาสตร์ของการหมัก ABE ได้ แบบจำลองนี้มีองค์ประกอบหลักสามส่วนได้แก่ สมการการเจริญเติบโตของเซลล์ สมการการเกิดผลิตภัณฑ์ และสมการการใช้ซับสเตรทของเซลล์ ดังนี้

การหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ สมการ (1)

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \qquad (1)$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียที่เวลาใด ๆ (g/L)

X_m = ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียสูงสุด (g/L)

μ_m = อัตราจำเพาะสูงสุดของการเจริญเติบโต (h^{-1})

ในแบบจำลองนี้กำหนดให้การผลิต ABE มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของ ABE ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นลักษณะ Growth-linked product ดังแสดงด้วยสมการที่ (2) โดยสมการนี้จะอธิบายอัตราการผลิต ABE และช่วงเวลาที่ใช้ของการผลิต ABE เปรียบเทียบกับการเจริญของเซลล์

Prince of Songkla University Pattani Campus

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \frac{dX}{d(t-\Delta t)} \quad (2)$$

เมื่อ P = ความเข้มข้นของ ABE ที่เวลาใด ๆ (g/L)

Δt = ระยะการปรับตัวของการผลิต ABE (h)

$Y_{P/X}$ = ผลได้ของ ABE จากเซลล์แบคทีเรีย (g ABE/g เซลล์แบคทีเรีย)

การหาอัตราการใช้ซับสเตรทของแบคทีเรีย อธิบายได้จากสมการ (3)

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} + m \cdot X \quad (3)$$

จากสมการ (1), (3) และพารามิเตอร์ จะได้สมการ (4) และค่า $Y_{X/S}$ และ m

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{x/s}} \left[\frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - X_0 \right] - \frac{X_m m}{\mu_m} \ln \frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} \quad (4)$$

เมื่อ S = ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เวลาใด ๆ (g/L)

S_0 = ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เวลาเริ่มต้น (g/L)

m = ค่าคงที่บำรุงเซลล์ (h^{-1})

$Y_{X/S}$ = ผลได้ของจากเซลล์แบคทีเรียจากน้ำตาล (g เซลล์แบคทีเรีย/g น้ำตาล)

การศึกษาแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์การหมัก ABE โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Logistic model จากผลการกำหนดค่า X_0 และ S_0 ในการทดลอง และเก็บข้อมูลของ P, S และ X ที่เวลาใด ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลมากพอสำหรับใช้ในการคำนวณหาค่าตัวแปรต่าง ๆ

Mishima *et al.* (2006) ศึกษาผลของการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ ของพืชน้ำสองชนิด คือ จอกและผักตบชวา ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิการไฮโดรไลซ์ตัวอย่างของพืชทั้งสองชนิดด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ น้ำกลั่น 10%HCl 1%NaOH 1%H_2SO_4 35%H_2O_2 2%NaOH/H_2O_2 และ Peracetic acid อุณหภูมิที่ศึกษาได้แก่

อุณหภูมิห้อง 60 และ 100 °C แยกศึกษาระหว่างใบและรากเตรียมตัวอย่างโดยล้างด้วยน้ำประปา ทำแห้ง และลดขนาดเป็น 350 μm เวลาที่ใช้ในการปรับสภาพคือ 2 หรือ 24 ชั่วโมง หลังจากปรับสภาพเบื้องต้นด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ แล้วจึงเข้าสู่การไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40°C จากผลการทดลองพบว่าการปรับสภาพด้วย $NaOH/H_2O_2$ ส่งผลให้การไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนถัดมา มีประสิทธิภาพและเกิดน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากจอกได้สูงกว่าผักตบชวา 1.8 เท่า และใบของพืชทั้งสองชนิดสามารถใช้ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าส่วนที่เป็นราก

Ohgren *et al.* (2007) เปรียบเทียบกระบวนการผลิตเอทานอลแบบ Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) และ Simultaneous Saccharification (Hydrolysis) and Fermentation (SSF) จากซังข้าวโพดที่ซับสเตรทที่ใช้คือซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยไอน้ำ เอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์ทางการค้าประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดเช่น เซลลูเลส เบตากลูโคซิเดส ไซลาแนส ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้คือ 10 FPU/g ของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ ในกระบวนการหมักใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 35°C ควบคุม pH ให้คงที่ที่ pH = 5 จากผลการทดลองพบว่ากระบวนการ SSF สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า SHF คิดเป็น 13% อธิบายได้ว่า ความเข้มข้นของกลูโคสที่ลดลงเนื่องจากการหมักทำให้ลดการยับยั้งของกลูโคสที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์พอลิแซคคาไรด์เป็นน้ำตาลที่ใช้สำหรับการหมักได้ และการลดความเป็นพิษของตัวยับยั้งตัวอื่นเกิดขึ้นในช่วงการหมักอีกด้วย

Qureshi *et al.* (2008) พบว่าการหมักไฮโดรไลเสทของเส้นใยข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยกรด (SACFH) ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium beijerinckii* BA101 และการผลิต ABE การกำจัดตัวยับยั้งออกด้วย XAD-4 resin ทำให้ผลิต ABE ได้สูงขึ้นประมาณห้าเท่า สำหรับการหมัก ABE จากไฮโดรไลเสทของเส้นใยข้าวโพดที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไม่พบการยับยั้งใด ๆ ในระหว่างการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสามารถใช้ไซโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับกลูโคส

Qureshi *et al.* (2008) ศึกษาการหมัก ABE จากฟางข้าวสาลีด้วยแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* P260 ด้วยกระบวนการที่แตกต่างกัน 5 กระบวนการดังนี้ (1) ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยกรดเจือจาง (2) การไฮโดรไลซ์ (ด้วยเอนไซม์ Carboxymethyl Cellulase และ Xylanase) ตามด้วยการหมักโดยไม่กำจัดกากออก (3) การไฮโดรไลซ์ควบคู่กับการหมักโดยปราศจากการกวน (4) การไฮโดรไลซ์ควบคู่กับการหมักที่มีการเติมน้ำตาลเพิ่ม (5) การไฮโดรไลซ์ร่วมกับการหมักที่มีการกวนที่เกิดจากการไล่ด้วยแก๊ส (Gas stripping) จากผลการทดลองพบว่าสามารถผลิต ABE ได้เท่ากับ 9.36, 13.12, 11.93, 17.92 และ 21.42 g/L ตามลำดับ หรือหากคิดเป็นอัตราการผลิตได้เท่ากับ 0.19, 0.14, 0.27, 0.19, และ 0.31 g/L•h ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการหมักควบคุมที่ใช้กลูโคสได้ผลผลิตเท่ากับ 0.30 g/L•h ซึ่งชุดการทดลองที่ใช้กระบวนการไฮโดรไลซ์

Prince of Songkla University Pattani Campus

ควบคู่กับการหมักและไล่ด้วยแก๊สให้อัตราการผลิต ABE สูงสุด และมีผลได้เท่ากับ 0.4 การไล่ด้วยแก๊สนั้นเป็นการลดความเข้มข้นของ ABE ในกระบวนการหมักจึงทำให้ลดการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียจากความเข้มข้นของ ABE ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักได้นั่นเอง

Aguilar *et al.* (2011) ออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก ABE จากแป้งมันสำปะหลังด้วยแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* โดยแป้งมันสำปะหลังที่ใช้มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น เท่ากับ 86.7% 1.3% 0.2% 2.4% และ 9.4% ตามลำดับ ตัวแปรที่ใช้ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมัก (35 หรือ 40°C) ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลัง (60 หรือ 80 g/L) การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลสตามด้วยเบตากลูโคอะมัยเลส จากผลการทดลองพบว่าสามารถผลิต ABE ได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 31.38 g/L ด้วยอัตราการผลิตเท่ากับ 0.33 g/L•h เมื่อใช้สภาวะการหมักที่ 40°C ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 60 g/L และไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์

Ranjan and Moholkar (2011) ศึกษาผลของการปรับสภาพเบื้องต้นของฟางข้าวก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก ABE ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* MTCC 481 ด้วยวิธีการต่าง ๆ คือ ทางกายภาพ (ใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 30 นาที) ทางเคมี (1% กรดซัลฟิวริก ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) และเอนไซม์ (บ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) จากการใช้ฟางข้าวที่ 5 %w/w ไฮโดรไลซ์ด้วยวิธีต่าง ๆ แล้วเข้าสู่กระบวนการหมัก ABE พบว่าชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์ฟางข้าวให้ผลได้ของบิวทานอลสูงที่สุดคือ 1.042 g/g ในขณะที่การไฮโดรไลซ์ด้วยไอน้ำและกรดให้ผลได้เท่ากับ 0.861 และ 0.803 g/g ตามลำดับ โดยสัดส่วนองค์ประกอบของ ABE ที่ผลิตได้คือ 0.11 0.861 และ 0.05 ตามลำดับ

Wang and Blaschek (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก ABE จากต้นข้าวโพดด้วย *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 ในกระบวนการแบบแบทช์ ออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Central Composite Design ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ ค่า pH ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาล อัตราเร็วการกวนต่อการผลิต ABE จากการทดลองและการทำนายโดยใช้โปรแกรม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ ที่ pH = 6.7 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลเท่ากับ 42.2 g/L และอัตราเร็วการกวนเท่ากับ 48 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุดที่ผลได้เท่ากับ 0.27 g/g sugar หากเพิ่มอัตราการกวนจะส่งผลให้เกิดอะซิโตนมากขึ้นทำให้ปริมาณบิวทานอลลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 สามารถใช้กลูโคสและฟรุกโทสได้หลังกระบวนการหมักในขณะที่ซูโครสจะถูกใช้หลังชั่วโมงที่ 14 และเมื่อสิ้นสุดการหมัก 80 ชั่วโมง กลูโคสและฟรุกโทสถูกใช้ไป 70% ในขณะที่ซูโครสถูกใช้ไปเพียง 50%

Cheng *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตไบโอบิวทานอลจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสถือว่าเป็นที่ยอมรับและมีแนวโน้มความเป็นไปได้ในเชิงเศรษฐกิจ ซึ่งแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิต

บิวทานอล (ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *Clostridium*) ที่ได้จากกากตะกอนน้ำเสียในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ในงานวิจัยนี้ใช้ของเสียทางการเกษตร 2 ประเภท (คือฟางข้าวและชานอ้อย) โดยใช้ด่างในการปรับสภาพและไฮโดรไลซ์โดยใช้ค๊อกเทลเซลลูเลสที่เกิดจาก *Pseudomonas* sp. CL3 และ *Clostridium* sp. TCW1 และนำไปหมักโดยผ่านกระบวนการ Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) หรือการรวมกันของกระบวนการ SHF กับ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SHF–SSF) ซึ่งในกระบวนการ SHF ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงสุด ร้อยละผลผลิตที่ได้และอัตราส่วนของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE: Acetone, Butanol and Ethanol) จากชานอ้อยเป็น 2.29 g/L, 1.00 กรัม/ลิตร/วัน, 0.52 โมลบิวทานอล/โมลน้ำตาลรีดิวซ์ และอัตราส่วน 0.12:1:0.06 ตามลำดับ และสำหรับฟางข้าวเป็น 2.92 g/L, 1.41 กรัม/ลิตร/วัน, 0.51 โมล-บิวทานอล/ โมลน้ำตาลรีดิวซ์ และอัตราส่วน 0.19:1:0.1 ตามลำดับ และในกระบวนการ SHF-SSF ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงสุด ร้อยละผลผลิตที่ได้สำหรับชานอ้อยเป็น 1.95 g/L, 0.61 กรัม/ลิตร/วัน, 0.37 โมลบิวทานอล/ โมลน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ และสำหรับฟางข้าวเป็น 2.93 กรัม/ลิตร, 0.86 กรัม/ลิตร/วันและ 0.49 โมลบิวทานอล/โมลน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงแนวทางและเป็นไปได้ของของเสียทางการเกษตรที่สามารถเปลี่ยนเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีคุณค่า (เช่น บิวทานอล)

Huesemann *et al.*(2012) ศึกษาการหมัก ABE จากชีวมวลสาหร่ายสีน้ำตาล kelp ชนิด *Saccharina* sp. ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) สาหร่ายที่ใช้ศึกษานั้นมีองค์ประกอบหลักคือ แมนนิทอลและลามินารินนอกจากนี้ได้เพิ่มกลูโคสในกระบวนการหมักเพื่อศึกษาพฤติกรรมของการหมักด้วย จากการทดลองพบว่ากลูโคสจะถูกใช้ก่อนตามด้วยแมนนิทอลและลามินารินตามลำดับ แต่อัตราการใช้ของลามินารินในระหว่างการหมักนั้นน้อยและช้ามาก ซึ่งจำเป็นจะต้องเพิ่มขั้นตอนการย่อยลามินารินให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กที่สามารถหมักได้ก่อนเข้าสู่การหมัก ABE สำหรับการศึกษานี้ผลได้ของบิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมดต่อน้ำหนักสาหร่ายตั้งต้นเท่ากับ 0.12 และ 0.16 g/g ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามถ้าหากปรับกระบวนการหมักโดยไฮโดรไลซ์คาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นให้ได้น้ำตาลมากขึ้นก็มีความเป็นไปได้ในการนำชีวมวลสาหร่ายสำหรับผลิต ABE ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

Ehimen *et al.*(2013) ศึกษาอิทธิพลของวิธีการปรับสภาพเบื้องต้นที่แตกต่างกันในกระบวนการย่อยแบบไร้อากาศของเส้นใยสาหร่าย *Rhizoclonium* ซึ่งมีองค์ประกอบของของแข็งระเหยได้ 64-67% คาร์บอน 23-24% ไฮโดรเจน 2.46–2.70% ออกซิเจน 36–37% ไนโตรเจน 1% กำมะถัน 1% และปริมาณเถ้า 32–35 % ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของการประยุกต์ใช้ในการปรับสภาพเบื้องต้นเชิงกลและทางชีวภาพเพื่อย่อยสลายชีวมวลสาหร่ายในการผลิตแก๊สมีเทน จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การรวมกันของชีวมวลและใช้เอนไซม์ในการปรับสภาพเบื้องต้นเพื่อผลิตมีเทน

Prince of Songkla University Pattani Campus

ร้อยละผลได้ได้น้อยกว่า 20 เมื่อเปรียบเทียบกับการลดขนาดอนุภาคเพียงอย่างเดียว ซึ่งเท่ากับ 62–97 mL CH_4 / g VS

Jensen *et al.*(2013) ศึกษาวิธีการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย *Chaetomorpha linum* (*C.Linum*) เพื่อผลิตเอทานอลอย่างมีประสิทธิภาพสามารถใช้องค์ความรู้ของการปรับสภาพชีวมวลที่เพาะปลูกบนพื้นดินได้ ซึ่งสาหร่าย *C. linum* มีองค์ประกอบดังนี้ กลูแคน 34-38 กรัม ไซแลน 6 กรัม อะราบีแนน 9-10 กรัม สารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ไฮโดรไลซ์ 7 กรัม เถ้า 21-23 กรัม แพกติน 14 กรัมและแวกซ์ 6 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ในงานวิจัยนี้ศึกษาการปรับสภาพ *C. linum* ด้วย 5 วิธีการคือ Hydrothermal Pretreatment (HTT), Wet Oxidation (WO), Steam Explosion (STEX), Plasma-Assisted Pretreatment (PAP) และ Ball Milling (BM) เพื่อตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นเมื่อนำสาหร่าย *C.linum* ที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นไปหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) จากการทดลองพบว่า วิธีการปรับสภาพด้วย WO และ BM ให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงที่สุด 44 กรัมเอทานอล/100 กรัมกลูแคน ซึ่งใกล้เคียงกับเอทานอลตามทฤษฎี 57 กรัมเอทานอล/100กรัมกลูแคน การปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้วิธีการ WO และ BM ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดคือ 64% ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับสาหร่าย *C. linum* ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการปรับสภาพอย่างไรก็ตาม 50% ของชีวมวลที่หายไปในระหว่างการปรับสภาพด้วยวิธี WO จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นการเลือกวิธีปรับสภาพที่ถูกต้องมาใช้ร่วมกันในการปรับสภาพสาหร่ายทะเลที่มีปริมาณกลูแคนที่สูงและกำจัดเกลือออกก่อนสามารถเพิ่มผลผลิตเอทานอลได้อย่างมีนัยสำคัญ

Wang *et al.*(2013) ศึกษา Distiller's Dried Grains with Solubles (DDGS) เป็นผลิตภัณฑ์ร่วมในการผลิตเอทานอลจากข้าวโพดแห้ง เมื่อเร็ว ๆ นี้กระบวนการทางกายภาพได้พัฒนาการแยก DDGS เป็นสองส่วนที่มีมูลค่าเพิ่ม คือ DDGS ที่อุดมด้วยเส้นใยและส่วนที่อุดมไปด้วยน้ำมันและโปรตีน ในงานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบผลของกระบวนการปรับสภาพเบื้องต้นต่างๆ ของ DDGS ด้วย Electrolyzed Water ที่สี่อุณหภูมิคือ 130, 145, 160, และ 175°C และสามเวลาในการปรับสภาพคือ 10, 20, และ 30 นาที โดยการโหลดของแข็ง 20% w/w การปรับสภาพเบื้องต้นวิธีอื่น ๆ เช่น กรดซัลฟูริกเจือจาง สารละลายด่างและน้ำร้อนยังได้มีการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบด้วย ในกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50°C จะมีการเติมเซลลูเลส 15FPU/กรัมเซลลูโลส β-glucosidase 40 หน่วย/กรัมเซลลูโลส ไซลาเนส 50 หน่วย/กรัมชีวมวลแห้ง และโหลดของแข็ง 10% DDGS ที่ผ่านการไฮโดรไลซิสถูกนำไปหมักโดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* BA 101 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในถังหมัก Autocontrolled Sixfors อย่างต่อเนื่องซึ่งจากการทดลองพบว่าการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้วิธีการปรับสภาพด้วย Acidic electrolyzed ที่อุณหภูมิ 175°C เป็นเวลา 10 นาทีให้ผลการทดลองที่เหมาะสมที่สุดที่มีผลผลิตของน้ำตาลกลูโคส, ไซโลสและอะราบิโนส คือ 23.25

Prince of Songkla University Pattani Campus

กรัม จาก 100 กรัม DDGS และในกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *C. beijerinckii* สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE: Acetone, Butanol และ Ethanol) 5.35 กรัม จาก 100 กรัม DDGS การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การปรับสภาพเบื้องต้นของ DDGS ด้วย Electrolyzed Water และไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์สามารถนำมาใช้ในการผลิตไบโอบิวทานอลโดยปราศจากมลพิษได้

ซึ่งการศึกษาผลของการปรับสภาพเบื้องต้นต่อการหมักเพื่อผลิตไบโอบิวทานอล ดังแสดงในตารางที่ 2.2

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 2.2 การศึกษาผลของการปรับสภาพเบื้องต้นต่อการหมักเพื่อผลิตไบโอบิวทานอล

Pretreatment				Hydrolysis		Fermentation			Time (h)	Butanol (g/L)	ABE (g/g)	Reference
Substrate	Substrate conc.	Method	Temp. (°C)	Enzyme	Temp. (°C)	Inoculum	Medium	Temp. (°C)				
Corn fiber	5.6% w/w	3.6 % w/w H_2SO_4	50	Commercial enzyme	-	*C. beijerinckii*	YPS	37	90	-	0.35	Guo *et al.*, 2013
Rice Straw	0.125 RS/mL	H_3PO_4, NaOH	50	Cellulase, ß-glucosidase	45	*C. acetobutylicum*	Yeast Extract	37	72	1.4 2.0	0.12 0.15	Moradi *et al.*, 2013
Rice Straw	0.050 RS/mL	1%H_2SO_4	60	Commercial enzyme	60	*C. acetobutylicum*	RCM	37	288	13.5	-	Ranjan *et al.*, 2013
Corn fiber	5.6% w/v	2%H_2SO_4	50	Commercial enzyme	-	*C. beijerinckii*	YPS	35	90	0.260	0.260	Du *et al.*, 2013
Algae	10% w/w	1M H_2SO_4	90	Xylanase cellulase	-	*C. saccharoperbutyl-acetonicum*	RCM	35	120	0.244	0.201	Ellis *et al.*, 2012
Agricultural waste	20 g/L	NaOH/H_2O_2	120	Xylanase cellulase	40	*Mixed culture*	BM, BHM and TA	37	192	2.2-2.9	-	Cheng *et al.*, 2012

** หมายเหตุ Conc. = Concentration, *C.* = *Clostridium*, YPS= Yeast extract-Peptone-Starch,RCM= Reinforced Clostridia Medium, BA = Basal Medium, BHM = Bushnell Haas Medium, TAM = Thermophilic Anaerobe Medium

Prince of Songkla University Pattani Campus

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

3.1.1.1 Sodium potassium tartrate

3.1.1.2 Boric acid

3.1.1.3 Potassium sulfate

3.1.1.4 Sodium hydroxide

3.1.1.5 D-Glucose

3.1.1.6 Sodium thiosulfate pentahydrate

3.1.1.7 Ammonium acetate

3.1.1.8 Phenol

3.1.1.9 Potassium hydrogen phosphate

3.1.1.10 Magnesium sulfate

3.1.1.11 3,5-Dinitrosalicylic acid

3.1.1.12 Sulfuric acid

3.1.1.13 n-Butanol

3.1.1.14 Ethanol

3.1.1.15 Acetone

3.1.1.16 Tryptone

3.1.2 วัสดุ

3.1.2.1 สาหร่ายสายพันธุ์ *Rhizoclonium* sp. และสาหร่ายสายพันธุ์ *Ceratophyllum demersum* จากบริเวณสวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จังหวัดปัตตานี

3.1.2.2 เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.1.2.3 เอนไซม์เซลลูเลสที่มีชื่อทางการค้า CELLIC C TEC2 จากบริษัทเบรนน์แท็ก อินกรีเดียนส์

3.1.3 อุปกรณ์

3.1.3.1 Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 mL

3.1.3.2 Beaker ขนาด 50 และ 100 mL

3.1.3.3 Cylinder ขนาด 10 และ 100 mL

3.1.3.4 Volumetric flask ขนาด 10, 50 และ 100 mL

3.1.3.5 Volumetric pipette ขนาด 1 และ 2 mL

3.1.3.6 Micropipette ขนาด 100 และ 1000 µL

3.1.3.7 Crucible

3.1.3.8 Buchner filter

3.1.3.9 Test tube

3.1.3.10 Syringe filter

3.1.3.11 Cuvette

3.1.3.12 Serum bottle

3.1.3.13 Syringe

3.1.4 เครื่องมือ

3.1.4.1 UV-Vis Spectrophotometer

3.1.4.2 Gas Chromatography (GC)

3.1.4.3 pH meter

3.1.4.4 Microcentrifuge

3.1.4.5 Water bath

3.1.4.6 Incubator

3.1.4.7 เครื่องย่อย (Total Kjeldhl Nitrogen, TKN)

3.1.4.8 เครื่องกลั่น (Total Kjeldhl Nitrogen, TKN)

3.1.4.9 เครื่องบด

3.1.4.10 ตู้อบ

3.1.4.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.4.12 เตาเผา

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย

3.2.1.1. เก็บตัวอย่างสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. และ *Ceratophyllum demersum* จากบริเวณสวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จังหวัดปัตตานี

3.2.1.2. ระบุประเภทของตัวอย่างโดยการนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์และสอบถามจากผู้เชี่ยวชาญ

3.2.1.3. นำตัวอย่างสาหร่ายมาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งแดดให้แห้งเป็นเวลา 1-2 วัน อบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C จนมีน้ำหนักคงที่

3.2.1.4. นำไปบดด้วยเครื่องบด ร่อนผ่านตะแกรงร่อนมาตรฐาน เก็บตัวอย่างที่มีขนาด 20-25 เมช (0.71–0.85 มิลลิเมตร) เพื่อนำไปทำการทดลองต่อ

3.2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางประการของสาหร่าย

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางประการของสาหร่าย เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกใช้ตัวอย่างสาหร่ายที่เป็นซับสเตรททำให้สามารถทำนายการผลิตบิวทานอลจากการใช้ซับสเตรทข้างต้นได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ก่อนเข้าสู่กระบวนการเริ่มต้นกล้าเชื้อต่อไป

การศึกษาองค์ประกอบทางด้านเคมีบางประการของสาหร่าย ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วิธีการศึกษาสมบัติทางด้านเคมีของสาหร่าย

ปัจจัยทางด้านเคมี	วิธีวิเคราะห์
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solid: TS)	AOAC Official Method 985.29 (1995)
ปริมาณของแข็งระเหยได้ (Volatile Solid : VS)	AOAC Official Method 985.29 (1995)
ปริมาณเถ้า (Ash content)	AOAC Official Method 985.29 (1995)
ปริมาณไขมัน (Fat)	Soxhlet Extraction Method
ปริมาณแป้ง (Starch)	Nitrogen Free Extract (NFE)
ปริมาณไนโตรเจน (Total Kjeldhl Nitrogen, TKN)	AOAC Official Method 955.04 (2000)
ปริมาณคาร์บอน (Carbon content)	CHNS Analyzer
ปริมาณไฮโดรเจน (Hydrogen content)	CHNS Analyzer
ปริมาณซัลเฟอร์ (Sulfur content)	CHNS Analyzer
ค่าความร้อนจำเพาะ (Specific heating value)	Bomb Calorimeter
ชนิดของน้ำตาลมอนอเมอร์	HPLC

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2.3 การปรับสภาพเบื้องต้น

หลังจากการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายและศึกษาองค์ประกอบบางประการ ขั้นตอนต่อไปคือการปรับสภาพเบื้องต้น ซึ่งมีวัตถุประสงค์หลักคือการกำจัดลิกนิน และการทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่ต่างกัน ทำให้มีวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการปรับสภาพเบื้องต้นของวัตถุดิบแต่ละประเภทแตกต่างกันไป การปรับสภาพที่เลือกมาใช้ในการทดลองนั้นจะเริ่มต้นจากวิธีที่มีความยุ่งยากและต้นทุนน้อยไปหามาก ดังนี้ 1. ไม่มีการปรับสภาพ 2. การปรับสภาพโดยใช้ NaOH 3. การปรับสภาพโดยใช้ H_2SO_4 ทำการทดลองที่ละวิธีเรียงตามลำดับ โดยแต่ละขั้นตอนจะทำการทดลองเริ่มต้นจากการปรับสภาพ การไฮโดรไลซิส จนไปถึงการหมัก วิธีการปรับสภาพที่เหมาะสม จะตัดสินจากประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับการสารอ้างอิงคือ อะวิเซล (Avicel) หรือกระดาษกรอง whatman No.1 และประสิทธิภาพการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นสารอ้างอิง รายละเอียดของการปรับสภาพด้วย NaOH และ H_2SO_4 แสดงในหัวข้อที่ 3.2.3.1

3.2.3.1 การปรับสภาพเบื้องต้นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และซัลฟิวริก (H_2SO_4)

1) นำตัวอย่างสาหร่ายแห้งที่บดแล้วจากข้อ 3.2.1 จำนวน 60 g/L ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL

2) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1 3 5 7 และ 9 %w/v ปริมาตร 100 mL

3) ปิดฝาขวดแล้วนำไปให้ความร้อนตามอุณหภูมิที่กำหนด (95, 121°C) ที่เวลา 30 60 นาที

4) เก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด วิธี Phenol-Sulfuric Acid ตามวิธีการของ Dobois (1956) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS ตามวิธีการของ Miller (1959)

5) เมื่อสิ้นสุดการปรับสภาพนำสารผสมไปกรองเพื่อแยกกากสาหร่ายแล้วล้างตะกอนให้เป็นกลางและนำไปอบให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.4 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

ในกระบวนการไฮโดรไลซิสใช้เอนไซม์ เซลลูเลส ที่มีชื่อทางการค้าคือ CELLIC C TEC2 ใช้อะวิเซล (Avicel) ในการทดสอบหาปริมาณของซับสเตรทที่เปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาเฉพาะของเอนไซม์จำนวนหนึ่งภายในหนึ่งหน่วยเวลา (Enzyme Activity)

3.2.4.1. นำกากสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพ 3 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL ปริมาตรของเหลวรวมเท่ากับ 100 mL

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2.4.2. เติมเอนไซม์เซลลูเลส 2 mL

3.2.4.3. เติมสารละลาย Citrate buffer เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 6.3

3.2.4.4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C ที่อัตราการเขย่า 160 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.4.5. เก็บตัวอย่างของเหลวที่เวลา 0 2 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง โดยนำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์

3.2.4.6. ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง

3.2.4.7. นำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS ตามวิธีการของ Miller (1959) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด วิธี Phenol-Sulfuric Acid ตามวิธีการของ Dobois (1956) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และมีชุดการทดลองควบคุมโดยใช้ อะวิเซล (Avicel) หรือกระดาษกรองเป็นสารอ้างอิง

3.2.4.8. วิเคราะห์ชนิดน้ำตาลในไฮโดรไลเสทด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งสภาวะดังแสดงในภาคผนวก ก

3.2.5 การหมักอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE)

หลังจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์แล้วจะตามด้วยการหมัก ABE โดยจะมีขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อก่อน ดังนี้

3.2.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในการหมัก

1) นำหัวเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 จากหลอด stock ถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Tryptone - Yeast extract - Acetate (TYA) ปริมาตร 50 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) อุณหภูมิ 121°C เวลา 20 นาที ซึ่ง TYA จะประกอบด้วย Glucose 20 g/L, Yeast extract 2 g/L, Tryptone 6 g/L, CH_3COONH_4 3 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 g/L และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/L

2) นำไปเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเชื้อที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.5.2 ศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในการผลิตบิวทานอล

1) เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ TYA ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 g/L ปริมาตร 25 mL ในขวดซีรัมขนาด 120 mL

2) ปรับค่าพีเอชของสารตั้งต้นให้ได้เท่ากับ 6.3 โดยใช้สารละลาย Citric acid buffer ปิดฝาขวดซีรัม

3) เติมเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า OD เท่ากับ 0.5 ปริมาณ 10% โดยปริมาตรของสารตั้งต้น ผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

4) นำไปหมักเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C

5) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลเมื่อเวลาผ่านไป 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง โดยวัดค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด วิธี Phenol-Sulfuric Acid ตามวิธีการของ Dobois (1956) และปริมาณบิวทานอล เอทานอล อะซิโตน และกรด (กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก) โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี

3.2.5.3 การหมัก ABE จากไฮโดรไลเสทสาหร่าย

1) นำไฮโดรไลเสทจากขั้นตอนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 24 ชั่วโมง ทำให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 30 g/L ใส่ลงในขวดซีรัมขนาด 500 mL

2) ปรับค่า pH ของสารตั้งต้นให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.3 ผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที

3) เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียปริมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรทั้งหมด

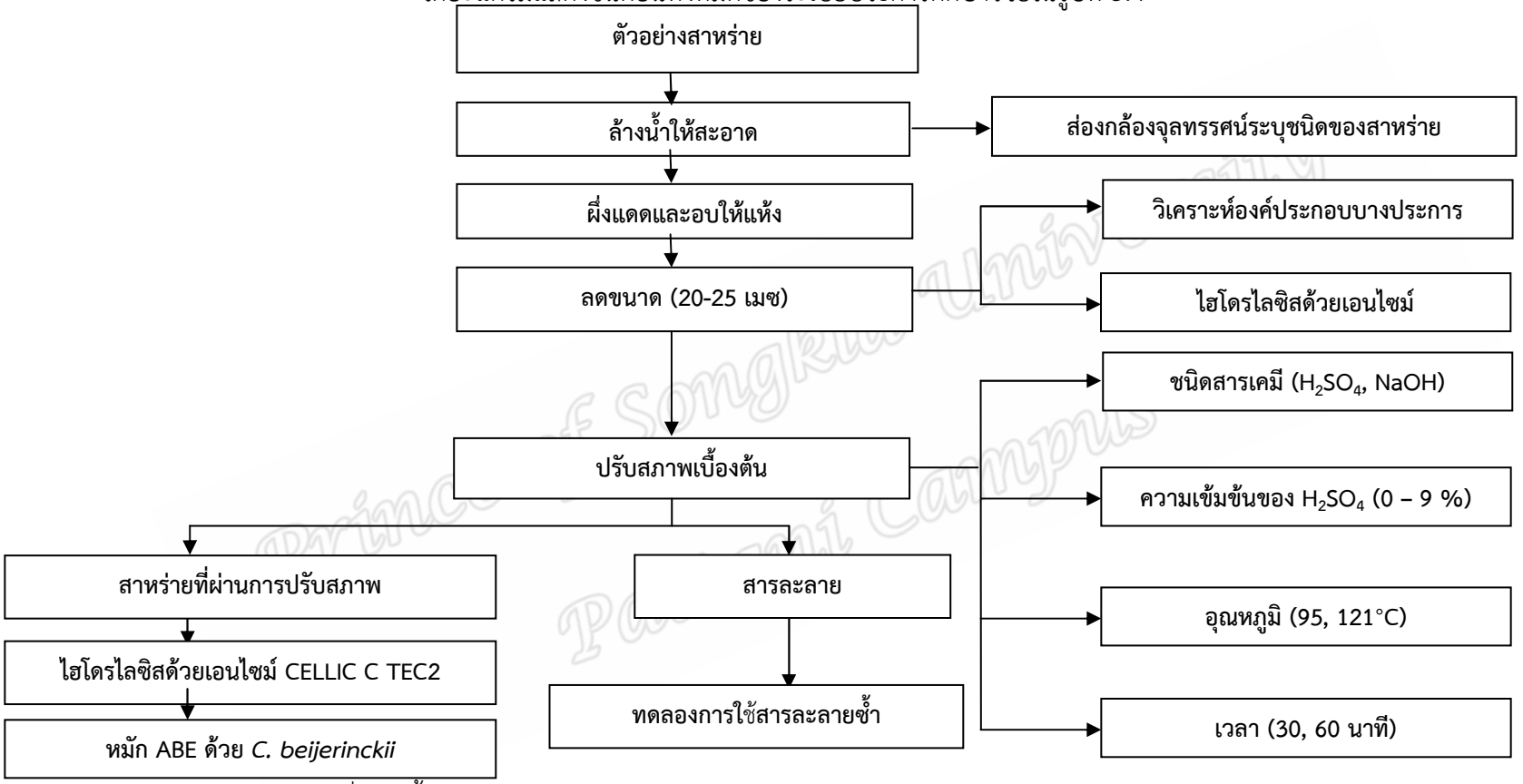
4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

5) เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ผลที่เวลา 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด วิธี Phenol-Sulfuric Acid ตามวิธีการของ Dobois (1956) ปริมาณ ABE และกรด (กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก) โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ มีการทำชุด Blank โดยใช้น้ำกลั่นและชุด Control โดยใช้กลูโคส

Prince of Songkla University Pattani Campus

ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนทั้งหมดของระเบียบวิธีการศึกษาวิจัยในรูปที่ 3.4



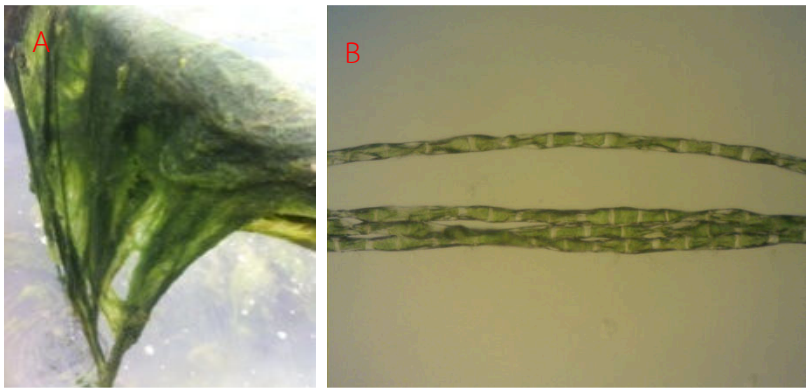
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการดำเนินการทดลองการผลิตไบโอบิวทานอลจากการหมัก ABE ด้วยสาหร่าย

บทที่ 4

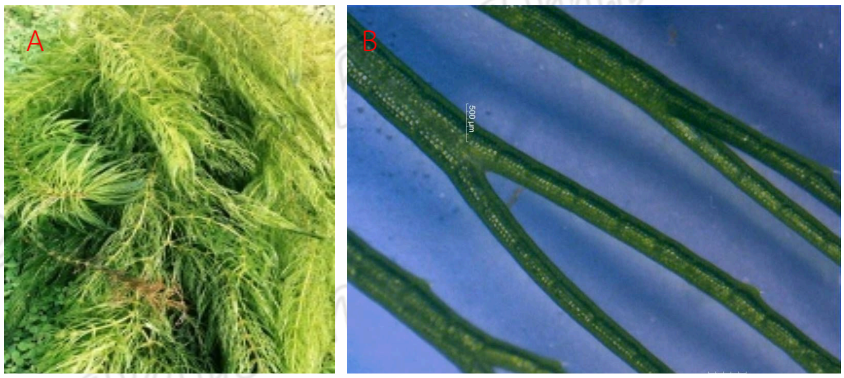
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาองค์ประกอบบางประการของสาหร่าย

จากการสำรวจในบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานีและบริเวณใกล้เคียง ได้พบสาหร่ายเป็นจำนวนมาก จึงมีแนวคิดที่จะนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลังงานทดแทน เนื่องจากสาหร่ายไม่เบียดเบียนพื้นที่ทางการเกษตร มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ช่วยในเรื่องการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งก่อนที่จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นได้มีการนำสาหร่ายมาตรวจสอบกลุ่มสายพันธุ์และวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ที่จะบ่งชี้ถึงความสามารถในการผลิตพลังงานซึ่งในที่นี้คือ ABE (Acetone Butanol Ethanol) ซึ่งจากการสำรวจในบริเวณแหล่งน้ำต่าง ๆ ทั้งแหล่งน้ำดีและน้ำเสีย ในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานีและพื้นที่ที่ใกล้เคียง พบว่าบริเวณคูน้ำรอบสวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ ที่มีความกว้างประมาณ 3 เมตร และความยาวประมาณ 3 กิโลเมตร มีสาหร่ายขนาดใหญ่หลัก ๆ อยู่ 2 ชนิด คือสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. และ สาหร่าย *Ceratophyllum demersum* (สาหร่ายพุงชะโด) นอกจากนี้ยังพบ *Rhizoclonium* sp. ในบ่อเพาะพันธุ์สัตว์น้ำของแผนกเทคโนโลยีประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี โดยสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. นั้นเป็นสายพันธ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Chaetomorpha* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ที่พบมากในบริเวณอ่าวปัตตานี (Ruangchuay *et al*., 2007) และเป็นสาหร่ายที่ไม่ได้นำมาบริโภค จึงเลือก *Rhizoclonium* sp. เป็นวัตถุดิบในงานวิจัยนี้ *Rhizoclonium* sp. จัดอยู่ใน Division Chlorophyta เป็นสาหร่ายสีเขียวที่เก็บเกี่ยวง่ายเพราะเป็นเส้นสายที่ยาว (รูปที่ 4.1A) และเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง แต่จะมีส่วนของเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นไรซอยด์แตกแขนงออกจากแกนกลางเพียง 1 หรือ 2-3 เส้น ผนังเซลล์หนา มีคลอโรพลาสเป็นร่างแหหรือตาข่าย (รูปที่ 4.2A) มีทั้งแบบที่สืบพันธุ์โดยการขาดออกเป็นท่อนและแบบอาศัยเพศพบทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำทะเล (ยุวดี, 2549) ในขณะที่กลุ่ม *Ceratophyllum demersum* มีความใกล้เคียงกับพืชชั้นสูงมาก บางครั้งถูกจัดเป็นวัชพืช มองดูเหมือนสาหร่ายหางกระรอก (รูปที่ 4.1B) มีส่วนที่เป็นข้อและปล้องชัดเจน (รูปที่4.2B) เป็นสาหร่ายที่พบในน้ำจืด และบางส่วนพบในน้ำกร่อยผนังเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้คล้ายพืชชั้นสูงคือ เป็นพวกเซลลูโลส คิวติเคิล มีเมือกปกคลุมอยู่ จึงมีความลื่นเล็กน้อย มีความเปราะและหักง่าย มีทั้งแบบที่สืบพันธุ์แบบอาศัยและไม่อาศัยเพศ



รูปที่ 4.1 ลักษณะของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp.
(A) ลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (B) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 4.2 ลักษณะของสาหร่าย *Ceratophyllum demersum*
(A) ลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (B) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สมบัติทางเคมีบางประการของสาหร่ายแสดงดังตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าหลังจากการนำสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด คือ *Rhizoclonium* sp. และ *Ceratophyllum demersum* ที่ผ่านการตากแห้งด้วยแสงอาทิตย์จนมีน้ำหนักคงที่ พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ระเหยง่าย 81.29 และ 95.26% ตามลำดับ ปริมาณของแข็งระเหยง่ายเป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณสารอินทรีย์ที่สลายได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 550°C และมีปริมาณเถ้า ซึ่งเป็นปริมาณโดยประมาณของส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์สำหรับสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. และ *Ceratophyllum demersum* 17.78 และ 16.29% ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่บ่งชี้ว่าวัตถุดิบที่เลือกมานี้อาจมีแร่ธาติที่จำเป็นและช่วยให้จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ปริมาณลิกนินที่พบใน *Ceratophyllum demersum* สูงกว่า *Rhizoclonium* sp. ซึ่งอาจทำให้การปรับสภาพเบื้องต้นของ *Ceratophyllum demersum* ทำได้

ยากกว่ากรณีของ *Rhizoclonium* sp. ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 65.88% ปริมาณคาร์บอน 23.40% ไฮโดรเจน 3.04% และปริมาณไขมันเท่ากับ 4.38% ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกันกับงานวิจัยของ Ehimen *et al.*, (2013) ซึ่งรายงานว่าสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. มีองค์ประกอบของของแข็งระเหยได้ 64-67% คาร์บอน 23-24% ไฮโดรเจน 2.46–2.70% กำมะถัน 1% ซึ่งองค์ประกอบของ *Rhizoclonium* sp. ที่วิเคราะห์ได้จากงานวิจัยนี้แตกต่างกับงานวิจัยที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายแปรปริมาณไปตามสภาพภูมิประเทศ สภาพแวดล้อม สภาพอากาศและคุณภาพแหล่งน้ำที่สาหร่ายเจริญเติบโตนั่นเอง ในส่วนของความร้อนจำเพาะของสาหร่าย *Ceratophyllum demersum* มีค่า 12245 J/g ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งระเหยง่ายของ *Ceratophyllum demersum* ที่สูงกว่านั่นเอง

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของสาหร่ายเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่า สาหร่ายน่าจะมีศักยภาพในการนำมาหมักเพื่อผลิต อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้ เนื่องจากมีคาร์โบไฮเดรตมากกว่า 50% และเป็นสาหร่ายที่สามารถพบได้ทั่วไป เก็บเกี่ยวง่าย ไม่ได้เป็นอาหารของมนุษย์ และมีรายงานว่าสามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้ได้ (Chao *et al*., 2005)

ตารางที่ 4.1 สมบัติทางเคมีบางประการของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. และ *Ceratophyllum demersum* จากบริเวณสวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จ.ปัตตานี

Components	**Composition** (%Total Solid)	
	Rhizoclonium sp.	*Ceratophyllum demersum*
Volatile Solid Content	81.29 ± 1.12	95.26 ± 0.20
Protein	10.19 ± 0.30	12.29 ± 0.20
Fat content	4.38 ± 0.25	3.71 ± 0.21
Lignin (Phenolic Compounds)	0.84 ± 0.03	9.27 ± 0.21
Carbohydrate	65.88 ± 0.00	58.44
Ash content	17.78 ± 2.01	16.29 ± 0.14
Carbon content	23.40 ± 0.46	32.32 ± 0.16
Hydrogen content	3.04 ± 0.05	4.48 ± 0.001
Sulfur content	1.16 ± 0.03	0.29 ± 0.01
C/N ratio (g/g)	11.82 ± 0.23	17.01 ± 0.08
Specific heating value (J/g)	10355	12245

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2 การศึกษาการปรับสภาพเบื้องต้นและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

ขั้นตอนการปรับสภาพเบื้องต้น (pretreatment) เพื่อให้โครงสร้างของเซลลูโลสหรือพอลิแซคคาร์ไรด์ลดความเป็นผลึกลง หรือตัดสายโซ่ของพอลิแซคคาร์ไรด์ให้สั้นลง ทำให้การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไปง่ายขึ้น เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่ต่างกัน ทำให้มีวิธีการและสภาวะการดำเนินที่เหมาะสมในการการปรับสภาพเบื้องต้นของวัตถุดิบแต่ละประเภทแตกต่างกันไป การปรับสภาพเบื้องต้นสามารถใช้ได้ทั้งกระบวนการทางชีววิทยาโดยใช้เชื้อรา ทางกายภาพ เช่นการตัด การคั้น การรีดและทางเคมีร่วมกับความร้อน ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาทั้งการใช้สาหร่ายสดและสาหร่ายแห้งที่ไม่มีการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยสารเคมีคือกรดซัลฟิวริก (0-9% v/v) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 3% v/v ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ (95 และ 121°C) โดยใช้สาหร่ายเริ่มต้น 60 g/L ให้ความร้อนเป็นเวลา 60 นาที

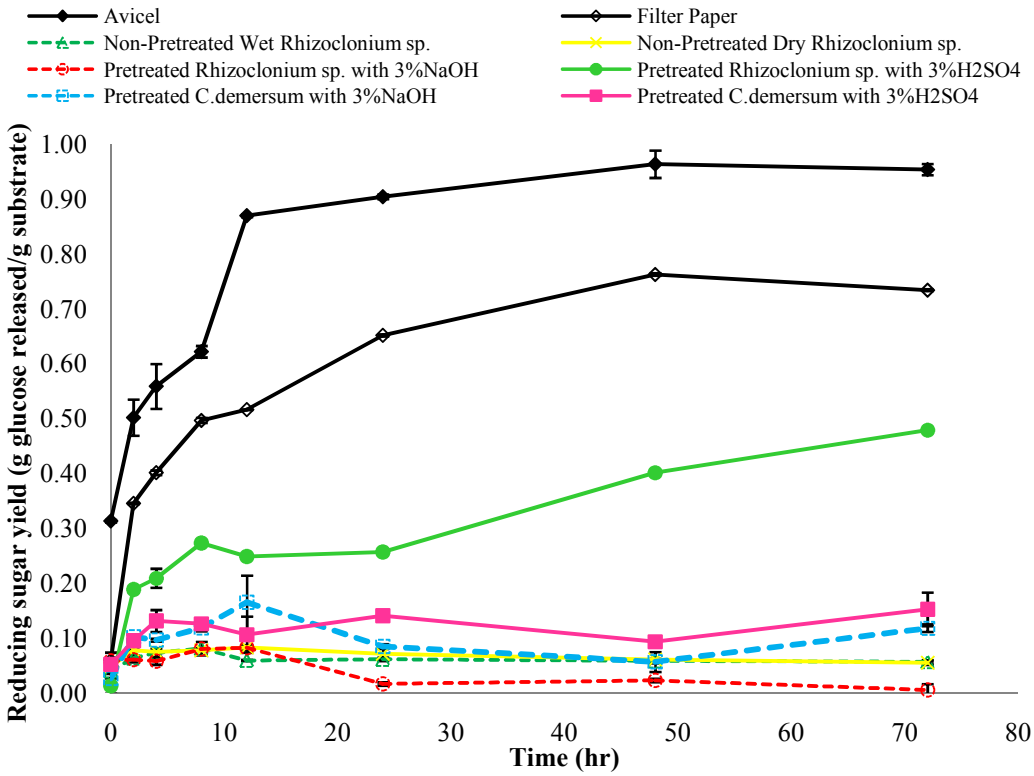
ประสิทธิภาพของการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย แสดงได้ 2 ค่า คือ ร้อยละของแข็งสาหร่ายที่ยังเหลือหลังการปรับสภาพ (%Solid recovery) และประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของสาหร่ายที่ปรับสภาพแล้ว วิธีการปรับสภาพสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพตามคาดหวังคือ วิธีที่ได้ solid recovery สูง และได้ไฮโดรไลเสทหลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดสูง

4.2.1 ผลการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่ายต่างชนิดกัน

รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 95°C จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้กระดาษกรองซึ่งเป็นผลึกเซลลูโลสเป็นซับสเตรทพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นคือ 0.763 g glucose released/g substrate ในขณะที่ใช้ Avicel เป็นสารมาตรฐานเซลลูโลส พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นคือ 0.964 g glucose released/g substrate ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ Avicel ได้ผลผลิตน้ำตาลที่สูงกว่าเนื่องจาก Avicel เป็นเซลลูโลสประเภทจุลผลึกเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเส้นใยและมีขนาดอนุภาคเล็กกว่ากระดาษกรอง จึงทำให้เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซิสได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับกระดาษกรอง อย่างไรก็ตามผลการทดลองจากการใช้ Avicel เป็นการยืนยันว่าเอนไซม์ที่ใช้มีประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสสูงถึง 96.4% ในสภาวะดำเนินการที่ใช้ ในเบื้องต้น งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของสาหร่ายที่ปรับสภาพโดยการลดขนาดด้วยเครื่องบดชนิดใบมีดและให้ความร้อนเพื่อกำจัดความชื้น ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสที่ได้มีค่าต่ำ (น้อยกว่า 8.3%) จึงสรุปได้ว่าจำเป็นต้องมีการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยความร้อนและสารเคมีเพิ่มเติม แต่อย่างไรก็ตาม การปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%NaOH ที่อุณหภูมิ 95°C ก็ไม่ได้ช่วยให้การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ดีขึ้น เพราะสาหร่ายมีองค์ประกอบของลิกนินต่ำ การปรับสภาพด้วย NaOH นั้นเหมาะกับวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส สำหรับ

Prince of Songkla University Pattani Campus

การปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้ 3%H_2SO_4 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ค่าสูงสุด เนื่องจากการใช้กรดซัลฟิวริกร่วมกับความร้อนเปลี่ยนสภาพหรือสลายโครงสร้างของผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น Ulvan ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท sulfated cell-wall polysaccharides (Robic *et al*., 2009) ได้ดีกว่าการใช้สารละลายด่าง เพื่อให้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ได้ง่ายขึ้นในขั้นตอนต่อไปและนอกจากนี้เนื่องจากสภาวะที่ความเป็นกรดเบสเหมาะสมในการหมักคือ 6.3 ดังนั้นการใช้กรดในขั้นตอนการปรับสภาพเบื้องต้นจะทำให้การล้างกรดส่วนเกินออกจากตะกอนสาหร่ายใช้ปริมาณน้ำในการล้างเพื่อปรับสภาพค่าความเป็นกรดเบสน้อยกว่ากรณีที่ใช้สารละลาย NaOH ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%H_2SO_4 และ 3%NaOH คือ 0.537 g glucose released/g substrate และ 0.082 g glucose released/g substrate ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 14.81 g/L และ 2.56 g/L ตามลำดับ และในขณะที่ของสาหร่าย *Ceratophyllum demersum* ที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%H_2SO_4 และ 3%NaOH ได้ 0.152 และ 0.165 g glucose released/g substrate หรือ 5.08 และ 4.04 g/L ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า การปรับสภาพด้วย 3%H_2SO_4 เหมาะสมกับการนำไปใช้กับสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. มากกว่า *Ceratophyllum dermersum* อธิบายได้ว่าผนังเซลล์ของ *Rhizoclonium* sp. ถูกการแทรกซึมด้วยกรดได้ง่ายกว่า เนื่องจากมีปริมาณลิกนินน้อยกว่า *Ceratophyllum dermersum* สอดคล้องกับผลการทดลองในการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย *Ceratophyllum demersum* ด้วย 3%NaOH ที่ได้ผลผลิตน้ำตาลสูงกว่าการปรับสภาพด้วย 3%H_2SO_4 *Ceratophyllum dermersum* มีค่าพลังงานความร้อนจำเพาะสูงกว่า *Rhizoclonium* sp. ซึ่งหมายถึงมีค่าความเป็นเชื้อเพลิงมากกว่า อย่างไรก็ตามในกรณีที่เปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีเป็นพลังงานบิวทานอลนั้นแซคคาไรด์เป็นซับสเตรทหลักสอดคล้องกับปริมาณของคาร์โบไฮเดรตของ *Rhizoclonium* sp. สูงกว่า *Ceratophyllum dermersum* ทำให้ผลได้น้ำตาลที่ได้สูงกว่าด้วย อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีหรือเพิ่มเวลาในการปรับสภาพของ *Ceratophyllum dermersum* มากขึ้นเพื่อเพิ่มการดึงน้ำตาลออกมา แต่ก็เป็นการเพิ่มค่าใช้จ่าย ดังนั้นจึงเลือก *Rhizoclonium* sp. สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สาหร่ายสดหรือสาหร่ายแห้งที่ผ่านการลดขนาดได้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในการประยุกต์ใช้งานจริงสามารถใช้สาหร่ายสดหรือสาหร่ายแห้งก็ได้ขึ้นอยู่กับความสะดวกในการนำมาใช้ ถ้าอยู่ใกล้แหล่งวัตถุดิบสามารถใช้สาหร่ายสดได้ลดขั้นตอนการอบแห้ง แต่ถ้าอยู่ห่างไกลกับแหล่งวัตถุดิบก็สามารถใช้แบบแห้งได้ เนื่องจากสะดวกต่อการขนส่งและการเก็บรักษาสภาพพสาหร่ายเพื่อไม่ให้เกิดการเน่าเสีย ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้สาหร่าย *Rhizoclonium* sp. แบบแห้งเพื่อควบคุมคุณภาพของซับสเตรทให้คงที่และสะดวกในการจัดเก็บตัวอย่างนั่นเอง



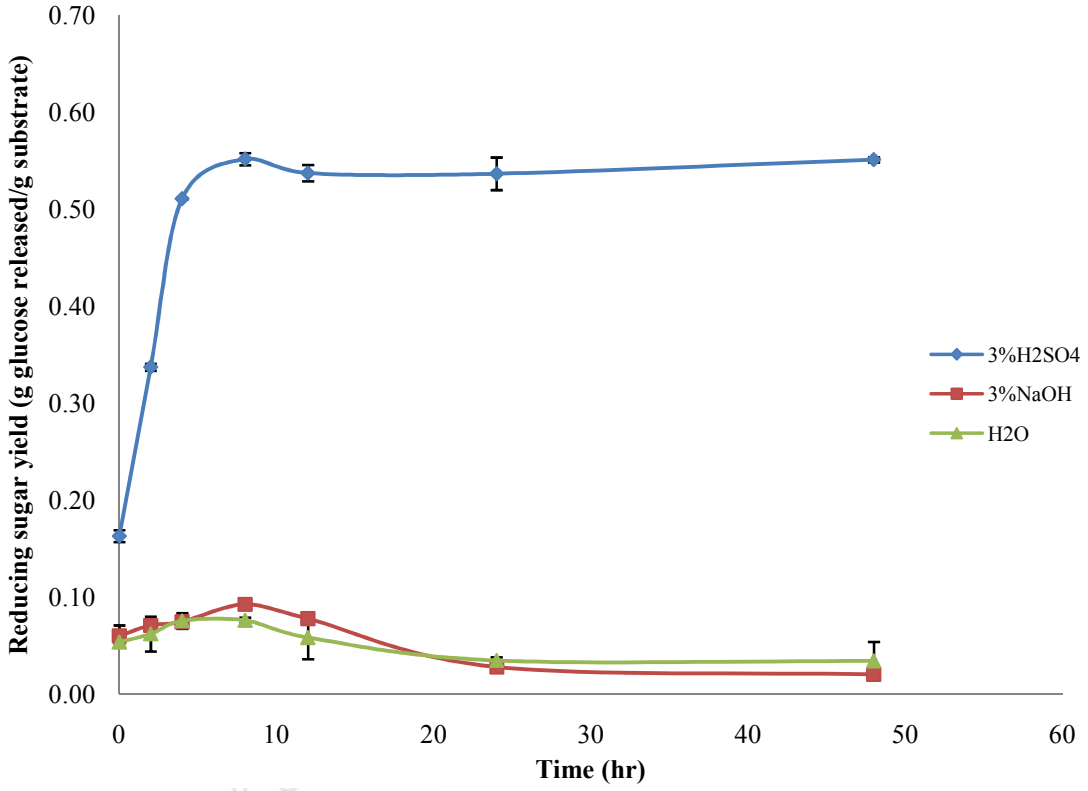
รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 60 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2.2 ผลของชนิดสารเคมีในการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp.

เนื่องจากผลได้ของน้ำตาลในไฮโดรไลเสทที่ได้ในหัวข้อ 4.2.1 ยังมีค่าไม่สูงมากนักในหัวข้อนี้จึงปรับสภาพเบื้องต้นด้วยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 121°C และเพิ่มขั้นตอนการแช่สาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ในสารละลาย 3%H_2SO_4 หรือ 3%NaOH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การให้ความร้อนต่อ 1 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าในการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้ 3%NaOH และน้ำกลั่น น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันคือ 0.093 และ 0.076 g glucose released/g substrate ตามลำดับ เนื่องจากในการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%NaOH เพียงเข้าไปสลายความเป็นผลึกให้ลดลงและผนังเซลล์ของสาหร่ายเกิดความเป็นรูพรุนเล็กน้อยจึงทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์ได้น้อยและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%H_2SO_4 คือ 0.551 g glucose released/g substrate นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความร้อนที่สูงขึ้น 121°C ผลของน้ำตาลที่เกิดขึ้นเป็น 86.93% เมื่อเทียบกับความร้อนที่ 95°C เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นก็จะเพิ่มอัตราการละลายหรือสลายพันธะขององค์ประกอบในผนังเซลล์ยังเพิ่มการกำจัดจำนวนชนิดของสารประกอบที่ทำหน้าที่ยึดหรือปกป้องความเป็นพอลิแซคคาร์ไรด์อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องผลของ %Solid recovery ในขั้นตอน

การปรับสภาพเบื้องต้นที่ซึ่งเมื่อใช้อุณหภูมิสูงขึ้น %Solid recovery จะลดลง ดังแสดงตารางที่ 4.2 จึงทำให้เมื่อคำนวณผลได้ของน้ำตาลต่อมวลสาหร่ายแห้งของการใช้การปรับสภาพที่อุณหภูมิ 95°C ได้สูงกว่า ดังนั้นการประยุกต์ใช้การปรับสภาพสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่อุณหภูมิ 95°C จึงเหมาะมากกว่าที่อุณหภูมิ 121°C



รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 60 นาที

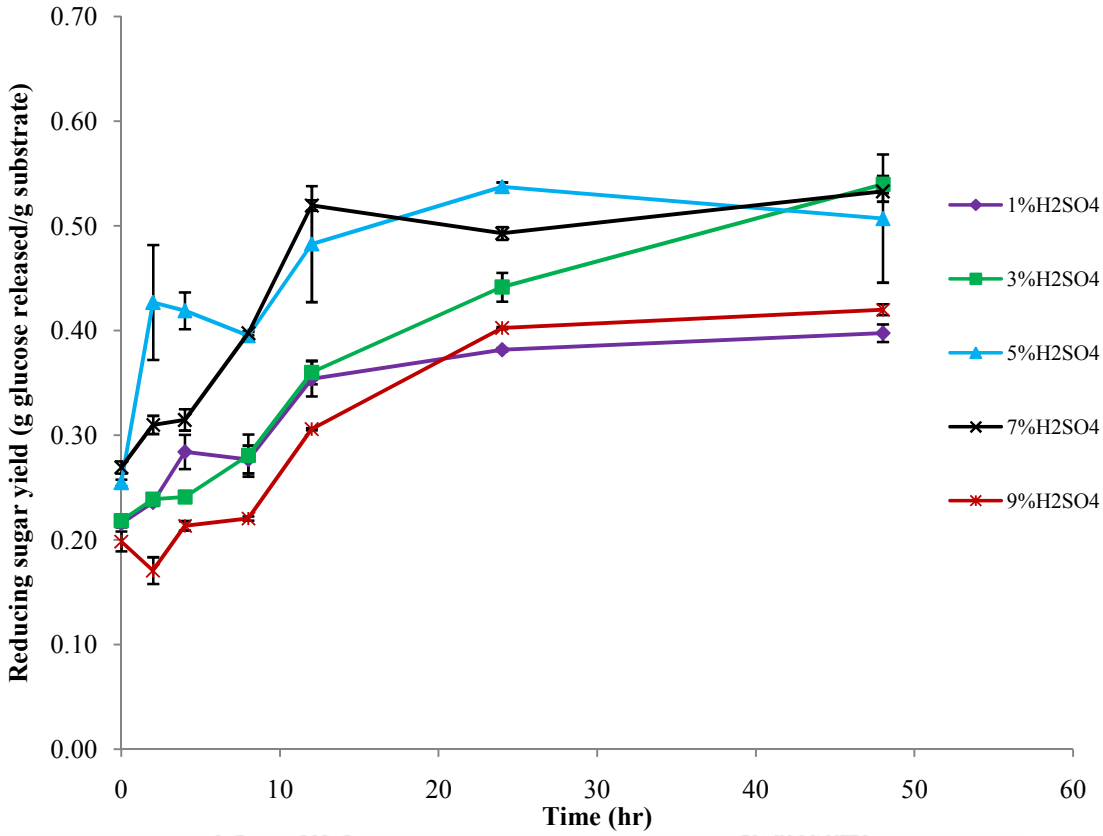
ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่สภาวะต่างๆ

	Pretreatment Conditions			Solid recovery in pretreatment (%)	Hydrolysis yield (g glucose/g pretreated algae)		Sugar yield (g glucose/g algae)	
	Chemical	Temp. (°C)	Time (min)		Reducing sugar	Total sugar	Reducing sugar	Total sugar
1	0.25% H_2SO_4	121	60	89.37	0.072	0.151	0.064	0.135
2	0.50% H_2SO_4	121	60	88.79	0.086	0.181	0.076	0.161
3	1% H_2SO_4	121	60	87.83	0.397	0.671	0.349	0.589
4	3% H_2SO_4	95	30	82.08	0.381	0.644	0.313	0.529
			60	73.53	0.486	0.821	0.357	0.604
		121	30	56.10	0.524	0.886	0.294	0.497
			60	56.07	0.537	0.908	0.301	0.509
5	5% H_2SO_4	121	60	27.54	0.507	0.857	0.140	0.236
6	7% H_2SO_4	121	60	20.78	0.520	0.832	0.108	0.173
7	9% H_2SO_4	121	60	20.23	0.420	0.710	0.085	0.144
8	3% NaOH	95	60	79.16	0.082	0.139	0.065	0.110
		121	60	72.40	0.095	0.199	0.069	0.144

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2.3 ผลของความเข้มข้นสารเคมีในการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp.

รูปที่ 4.5 แสดงผลของความเข้มข้นของ H_2SO_4 ตั้งแต่ 1-9% ที่ใช้ในการปรับสภาพสาหร่ายก่อนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์พบว่า ในการปรับสภาพเบื้องต้นที่ความเข้มข้นของ H_2SO_4 ที่เพิ่มขึ้น ผลของน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มดีขึ้น ร้อยละผลได้สูงขึ้นและอัตราการไฮโดรไลซิสก็สูงขึ้นอีกด้วย เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสหรือพอลิแซคคาร์ไรด์ลดความเป็นผลึกได้มากขึ้นทำให้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ได้ง่ายขึ้นแต่เมื่อปรับสภาพเบื้องต้นด้วยความเข้มข้นของ H_2SO_4 ที่สูงกว่า 7%v/v พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ได้ลดต่ำลง เนื่องจากหลงเหลือสารประกอบที่ไฮโดรไลซ์ได้ยากและการปรับสภาพหรือการไฮโดรไลซ์สาหร่ายด้วยกรดที่มีความเข้มข้นสูงร่วมกับความร้อนนั้นเกิดการสลายตัวของน้ำตาลและทำให้ผลได้ลดลง ซึ่งจากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1% H_2SO_4 เท่ากับ 0.397 g glucose released/g substrate และที่ความเข้มข้นของ H_2SO_4 ที่ 5% และ 7% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เท่ากัน แต่ที่ 3%H_2SO_4 ได้น้อยกว่า และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิส พบว่าที่ความเข้มข้น 3% 5% และ 7% ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เท่ากับ 0.540, 0.507 และ 0.520 g glucose released/g substrate ตามลำดับ อย่างไรก็ตามถึงแม้การเพิ่มความเข้มข้นของ H_2SO_4 จะทำให้สามารถปลดปล่อยน้ำตาลในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสได้ดีขึ้น แต่มวลของสาหร่ายในระหว่างการปรับสภาพลดลงและจากการคำนวณค่าผลได้ของน้ำตาลต่อสาหร่ายเริ่มต้น พบว่า การใช้ 1%H_2SO_4 ในการปรับสภาพเบื้องต้นสูงสุด ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงได้ข้อสรุปที่ว่าในการใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 3%H_2SO_4 ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถลดน้ำเสียในกระบวนการทำให้เป็นกลางและได้ปริมาณของแข็งในปริมาณที่สูง



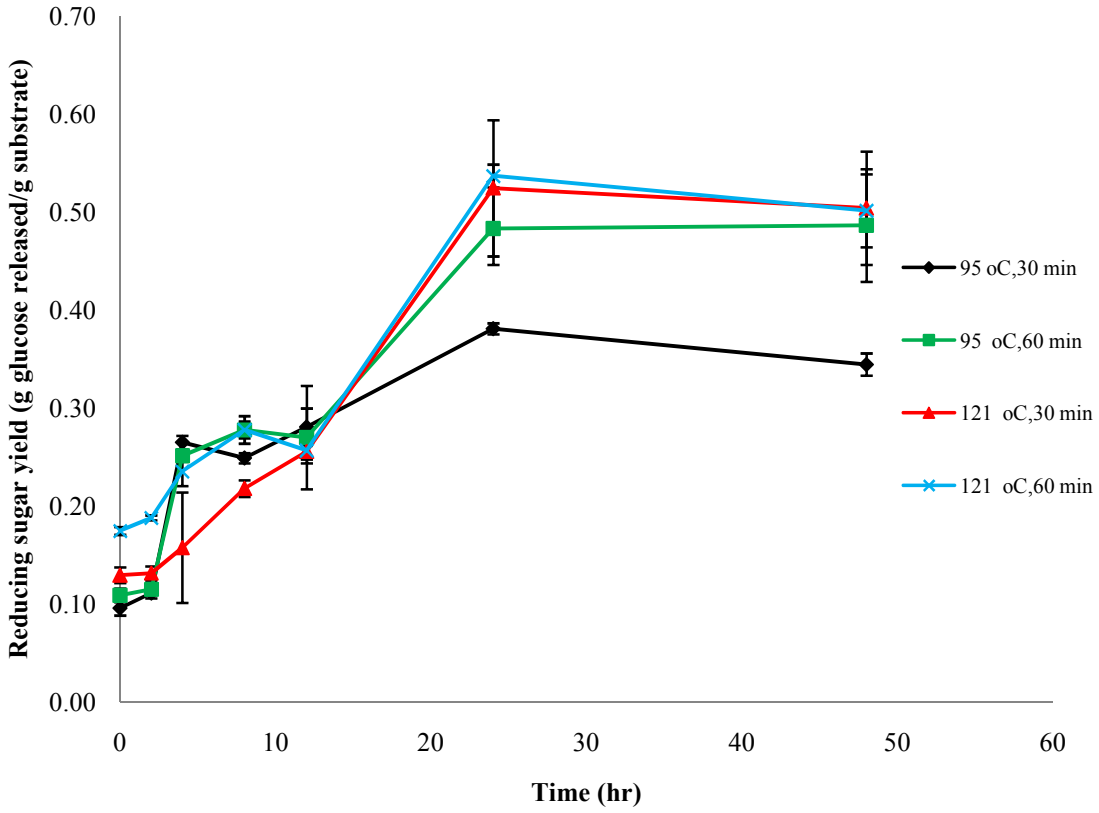
รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพที่ความเข้มข้นของสารละลายกรด H_2SO_4 ที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 60 นาที

4.2.4 ผลการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน

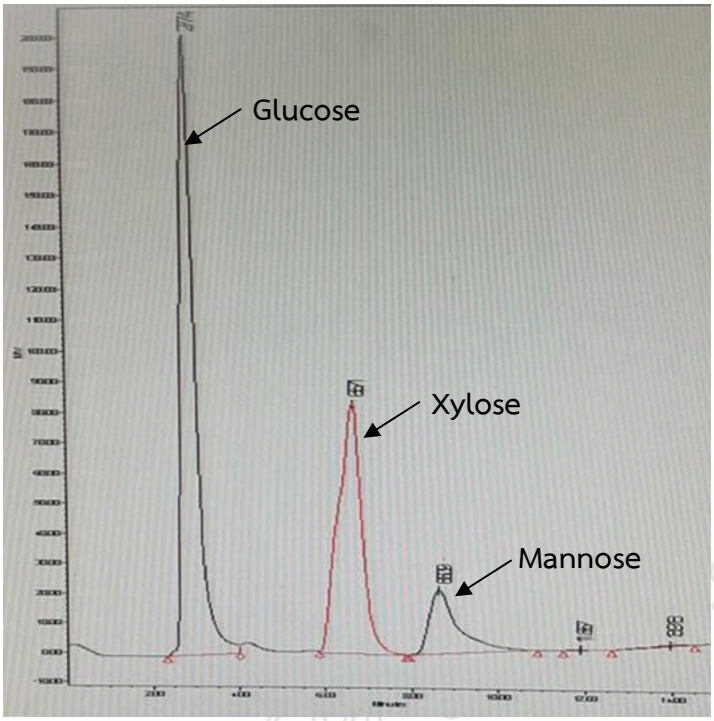
รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน ผลการไฮโดรไลซิสของสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพด้วยอุณหภูมิ 121°C สูงกว่า การปรับสภาพที่อุณหภูมิ 95°C ไม่ว่าจะใช้เวลาในการปรับสภาพ 30 หรือ 60 นาที และเช่นกันการเพิ่มเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพจะทำให้สามารถผลิตน้ำตาลได้มากขึ้น และการใช้การปรับสภาพที่ 95°C เป็นเวลา 60 นาที ได้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสใกล้เคียงกับการปรับสภาพที่ 121°C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาผล Solid recovery ร่วมด้วยทำให้ได้น้ำตาลต่อน้ำหนักสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. เริ่มต้น จากการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%H_2SO_4 ที่เวลา 60 นาที มีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.537 g glucose released/g substrate หรือคิดเป็น 80.12% น้ำตาลที่ถูกปล่อยออกมาจากคาร์โบไฮเดรตในสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้เป็นประมาณสองเท่าของน้ำตาลรีดิวซ์ ทั้งนี้น้ำตาลนอนรีดิวซ์อาจมาจาก

น้ำตาลชนิดที่มีโมเลกุลยากกว่ามอนอแซคคาร์ไรด์หรือน้ำตาลชนิดอื่น เช่น แมนนิทอล ไซลิทอล และอนุพันธ์ของน้ำตาลทั้งสอง (Chao *et al*., 1999) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chao *et al*., 1999 ที่มีการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. พบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และ แมนโนส ด้วยเช่นกันและอาจมีน้ำตาลอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบบ้างเล็กน้อย

จากการวิเคราะห์มอนอเมอร์ของแซคคาร์ไรด์ในไฮโดรไลเสทด้วย HPLC โดยใช้สารมาตรฐานน้ำตาลบางชนิด ได้แก่ กลูโคส ไซโลส และแมนโนส พบว่ามีกลูโคสในปริมาณที่มากที่สุดตามด้วยไซโลสและแมนโนส ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน

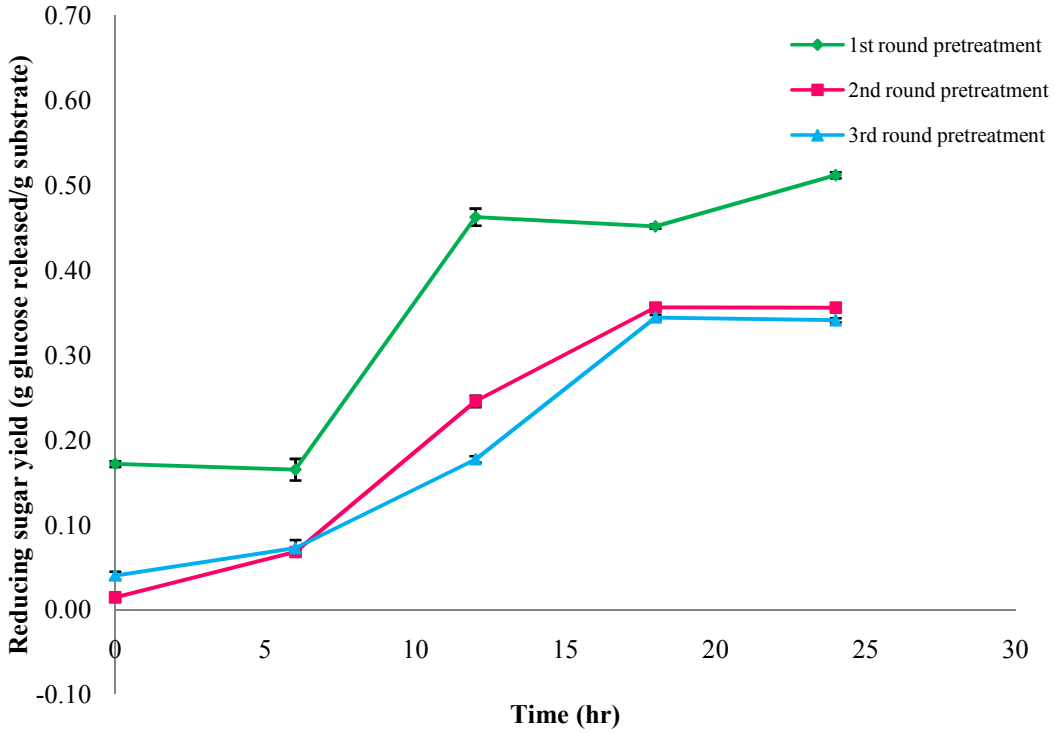


รูปที่ 4.7 โครมาโทกราฟีชนิดของน้ำตาลที่วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

4.2.5 ผลของการใช้ซ้ำของสารละลาย 3%H_2SO_4 ในการปรับสภาพเบื้องต้น

ในหัวข้อนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารละลาย 3%H_2SO_4 ที่ผ่านการปรับสภาพสาหร่ายที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 60 นาที และแยกกากของแข็งสาหร่ายออก ซึ่งในการทดลองนำสารละลาย 3%H_2SO_4 นี้ไปปรับสภาพสาหร่ายอีกครั้งที่สภาวะเดิม จากผลการทดลองในรูปที่ 4.8 ผลได้น้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการใช้สารละลาย 3%H_2SO_4 โดยที่รอบที่ 2 ลดลงจากการใช้รอบที่ 1 ประมาณ 30% เนื่องจากในการนำสารละลายมาใช้ในครั้งแรกประสิทธิภาพของการเข้าถึงผนังเซลล์และทำลายโครงสร้างของสาหร่ายได้ดีกว่าสารละลายที่นำมาซ้ำทำให้เกิดความเป็นรูพรุนมากจึงทำให้เอนไซม์สามารถเกิดการย่อยสลายได้ดีด้วย สำหรับการใช้สารละลายจากการปรับสภาพด้วยซ้ำเป็นที่รอบที่ 3 พบว่ามีประสิทธิภาพในขั้นตอนไฮโดรไลซิสไม่แตกต่างจากการใช้ซ้ำรอบที่ 2 อย่างไรก็ตามปริมาณของแข็งสาหร่ายที่เหลือหลังการปรับสภาพเบื้องต้นของการใช้ซ้ำในแต่ละรอบเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจากการปรับสภาพครั้งที่ 1 เกิดการละลายของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายและที่สำคัญมีการละลายของสารประกอบฟีโนลิกเกิดขึ้นอาจไปเคลือบผนังเซลล์ของสาหร่ายเกิดการขัดขวางการทำงานของโปรตอนของ H_2SO_4 ที่ไม่สามารถไปดึงไฮดรอกไซด์ได้ จึงไม่มีการนำมาซ้ำอีกครั้ง นอกจากนั้นพบว่าปริมาณของแข็งหลังปรับสภาพเบื้องต้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ

Prince of Songkla University Pattani Campus

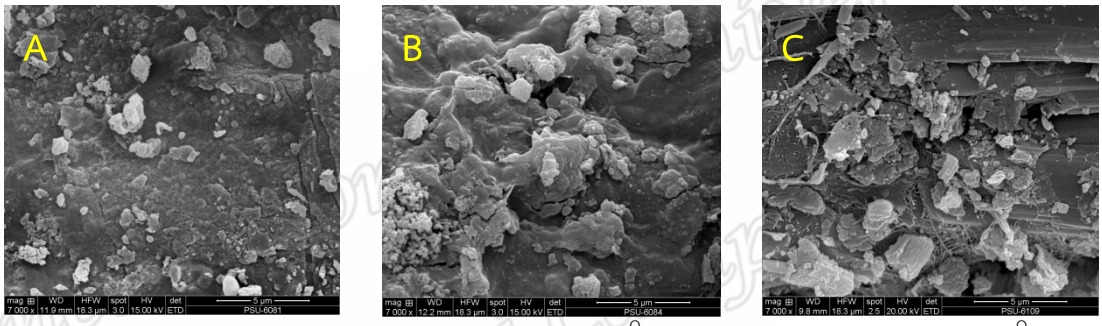


รูปที่ 4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดในไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย 3%H_2SO_4 ที่นำกลับมาใช้ใหม่

4.2.6 สัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ปรับและไม่ผ่านการปรับสภาพ

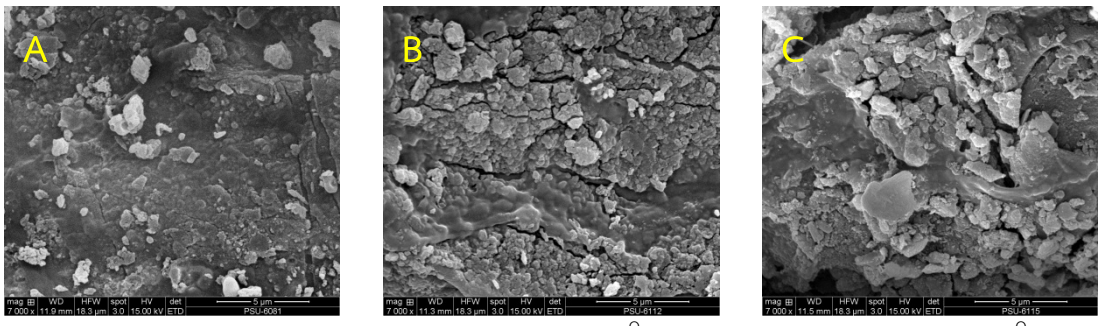
จากตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) ภาพสัณฐานวิทยาลักษณะพื้นผิวของสาหร่ายทั้งก่อนและหลังปรับสภาพด้วย 3%H_2SO_4 และ 3%NaOH แสดงดังรูป 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าลักษณะผิวของสาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่น่าสนใจเกิดขึ้น ซึ่งผลลักษณะทางกายภาพก่อนการปรับสภาพของผงสาหร่ายเมื่อมองด้วยตาเปล่าจะมีลักษณะผงสีเขียวละเอียด แต่เมื่อนำตัวอย่างไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายก่อนการปรับสภาพมีลักษณะเป็นแผ่นหรือเป็นเกล็ดและมีขนาดแตกต่างกัน มีพื้นผิวเรียบละเอียดและเรียงตัวกันแน่น แสดงดังภาพที่ 4.9 (A) และ 4.10 (A) ตามลำดับ เมื่อปรับสภาพเบื้องต้นแล้ว เส้นใยเกิดการผิดรูปและเกิดการแบ่งแยก นอกจากนั้นยังเปิดตัวออกจากโครงสร้าง จึงเป็นการ

เพิ่มพื้นที่ผิวภายนอกและความเป็นรูพรุนให้กับสาหร่าย ซึ่งคาดว่าการเปลี่ยนแปลงนี้เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่ใช้มากขึ้นในการปรับสภาพ เมื่อทำการปรับสภาพด้วย 3%H_2SO_4 และ 3%NaOH ดังแสดงรูป 4.9A และ 4.9B และ 4.10A และ 4.10B ที่อุณหภูมิสูงขึ้น พบว่าเส้นใยเกิดการแบ่งแยกและเปิดตัวออกจากโครงสร้างมากขึ้น เนื่องจากสารละลายกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้าไประเบิดโครงสร้างร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจึงเป็นการเพิ่มพื้นผิวภายนอกและความเป็นรูพรุนให้กับสาหร่ายมากขึ้นและเนื้อเยื่อเริ่มมีการพองตัวมากขึ้นและแตกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าในการปรับสภาพเบื้องต้นสาหร่ายด้วย 3%H_2SO_4 จะมีลักษณะของความเป็นรูพรุนและพื้นที่ผิวภายนอกมากกว่าสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%NaOH อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย ฐิติมา และคณะ, 2554 ที่ศึกษาการปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยไอน้ำและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง



Untreated 3%H_2SO_4 at 95°C 3%H_2SO_4 at 121°C

รูปที่ 4.9 สัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. หลังปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%H_2SO_4



Untreated 3%NaOH at 95°C 3%NaOH at 121°C

รูปที่ 4.10 สัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. หลังปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3%NaOH

4.3 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในการหมักและการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในการผลิต ABE

4.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นในการหมัก

ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักจะต้องมีการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น โดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 จากหลอด stock ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ TYA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลใส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การถ่ายเชื้อจาก stock ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปลงในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นเป็นโคโลนีของเชื้อเกิดขึ้น หลังจากนั้นนำเชื้อที่บ่มไปถ่ายลงในอาหารเหลว เพื่อใช้ในกระบวนการหมักต่อไป เมื่อถ่ายเชื้อจากอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะสีน้ำตาลใส เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะสีขุ่นขึ้น เนื่องจากเกิดการเจริญเติบโตของเชื้อ

4.3.2 การหมัก ABE จากกลูโคส

โดยทั่วไปกระบวนการผลิต ABEจากแบคทีเรียตระกูล *Clostridium* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการผลิตกรด (Acidogenesis) และขั้นตอนที่สองเป็นการผลิตตัวทำละลาย (Solventogenesis) ในช่วงแรกแบคทีเรียจะใช้น้ำตาลในการสร้างเซลล์แล้วผลิตเมทาบอไลต์ที่เป็นของเหลวออกมาคือกรดบิวทิริก กรดอะซิติก เอทานอลจึงทำให้น้ำหมักมีค่า pH ลดลง ซึ่งในขั้นตอนนี้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตในระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Log phase) จากนั้นในขั้นตอนที่สองเป็นการเปลี่ยนเปลี่ยนกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกเป็นบิวทานอลและอะซิโตนเพื่อลดความเป็นพิษของกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกต่อเซลล์ของแบคทีเรียเอง ช่วงนี้น้ำหมักจะมีค่า pH ลดลงเล็กน้อย ซึ่งในขั้นตอนนี้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตในระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) กลไกการเกิด ABE แสดงดังรูปที่ 4.11

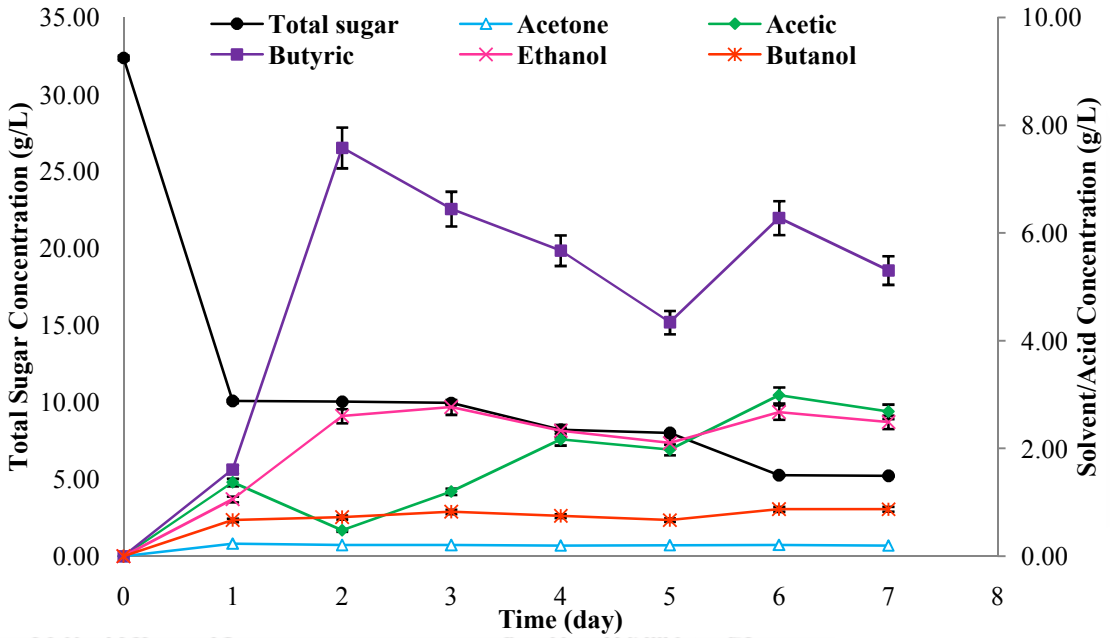
ผลการผลิต ABE โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 33 g/L แสดงดังรูปที่ 4.12 เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียนำไปใช้ได้ง่ายที่สุด จึงทำให้กลูโคสลดลง 70% ภายในวันแรกของการหมักและตรวจพบ กรดบิวทิริก กรดอะซิติกและเอทานอลที่ความเข้มข้น 1.2-1.8 g/L การผลิตสารประกอบทั้งสามตัวจากกลูโคสในขั้น Acedogenesis แสดงดังสมการ (1)-(3) (Batstone, *et al*., 2002)

Prince of Songkla University Pattani Campus

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_3H_7COOH + 2CO_2 + 2H_2$ $\Delta G^0 = -264.0$ kJ/mol (1)

$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$ $\Delta G^0 = -251.7$ kJ/mol (2)

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$ $\Delta G^0 = -235.1$ kJ/mol (3)

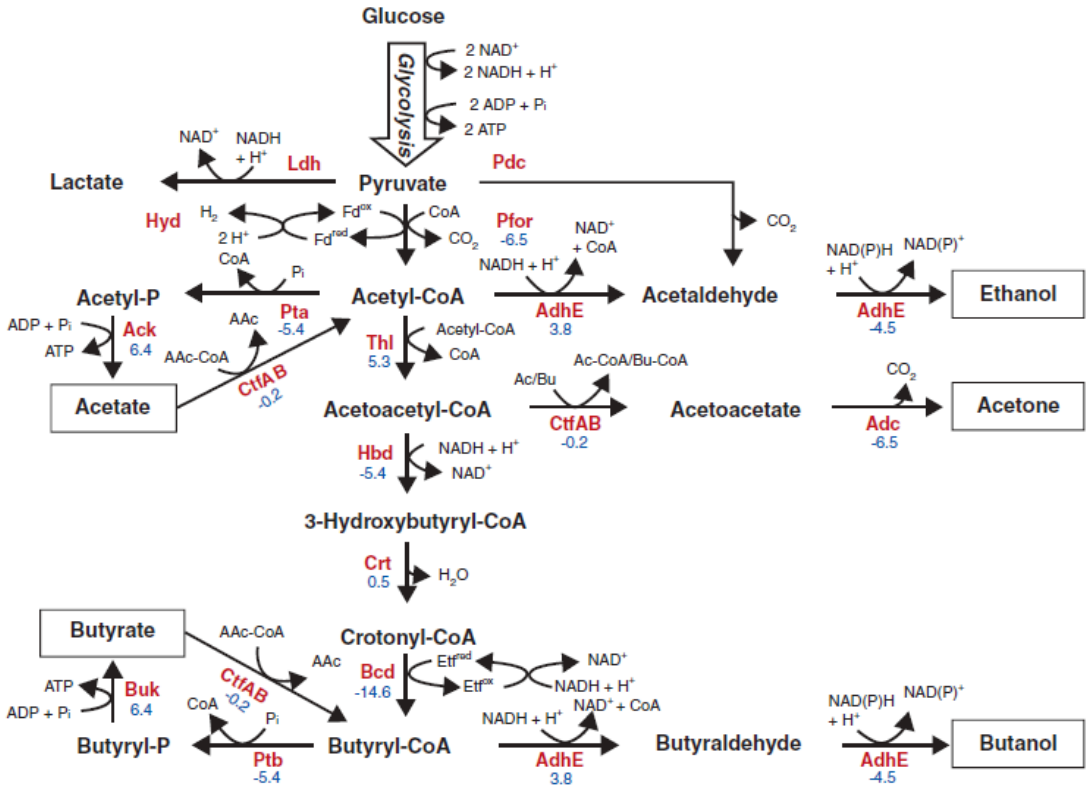


รูปที่ 4.11 การผลิตบิวทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นซับสเตรท

นอกจากนี้ในวันแรกของการหมักยังตรวจพบบิวทานอลและอะซิโตนในน้ำหมักปริมาณเล็กน้อย (0.2-0.4 g/L) หลังจากนั้นในวันที่ 2 ตรวจพบว่ามีกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นเป็น 8 g/L เอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 2.2 g/L ในขณะที่ความเข้มข้นของบิวทานอลและอะซิโตนยังคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำหมักมีกรดบิวทิริกความเข้มข้นสูง ซึ่งกรดบิวทิริกสามารถแพร่เข้าไซโทพลาสซึม ซึ่ง pH ในไซโทพลาสซึมจะมีค่าสูงกว่าสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ 1-2 หน่วย ทำให้เกิดการแตกตัวเป็นโปรตอนและบิวทิเรตและถูกกักไว้ในเซลล์ทำให้ pH ในเซลล์ลดลง เป็นผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของโปรตอนเข้าในไซโทพลาสซึมทำให้เกิดศักย์เยื่อหุ้มเซลล์ membrane potential ถูกกระตุ้น (Richter *et al.*, 2011) ดังนั้นกรดบิวทิริกจึงเป็นสารตัวหลักที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพราะกรดอะซิติกมีความเป็น Hydrophobic น้อยกว่า อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของกรดบิวทิริกในน้ำหมักก็เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดบิวทานอลมากว่าความเข้มข้นของบิวทิเรตหรือกรดอะซิติก

หลังจากวันที่2 พบว่ากรดบิวทิริกลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งในวันที่ 5 เหลือเป็น 4 g/L ของการหมัก การลดลงของกรดบิวทิริกเนื่องจากเซลล์พยามยามลดความเป็นพิษของบิวทิริกโดย

เปลี่ยนให้เป็นกรดอะซิติกซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า ทำให้หลังจากวันที่ 5 เซลล์สามารถปรับตัวและใช้น้ำตาลต่อความเข้มข้นของกรดบิวทิริกและกรดอะซิติก เอทานอล บิวทานอลและอะซิโตนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของบิวทานอลที่เพิ่มขึ้นนี้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยคือ 0.2 g/L ทั้งที่มีกรดบิวทิริกอยู่ประมาณ 6 g/L ทั้งนี้เนื่องจากกลูโคสถูกรีดิวซ์กลายเป็นกรดอินทรีย์และเอทานอลในช่วงเวลานี้มีเพียงเล็กน้อยจึงมีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกไปเป็นบิวทานอลและอะซิโตนเพียงเล็กน้อยเช่นกัน



รูปที่ 4.12 กลไกการผลิต ABE

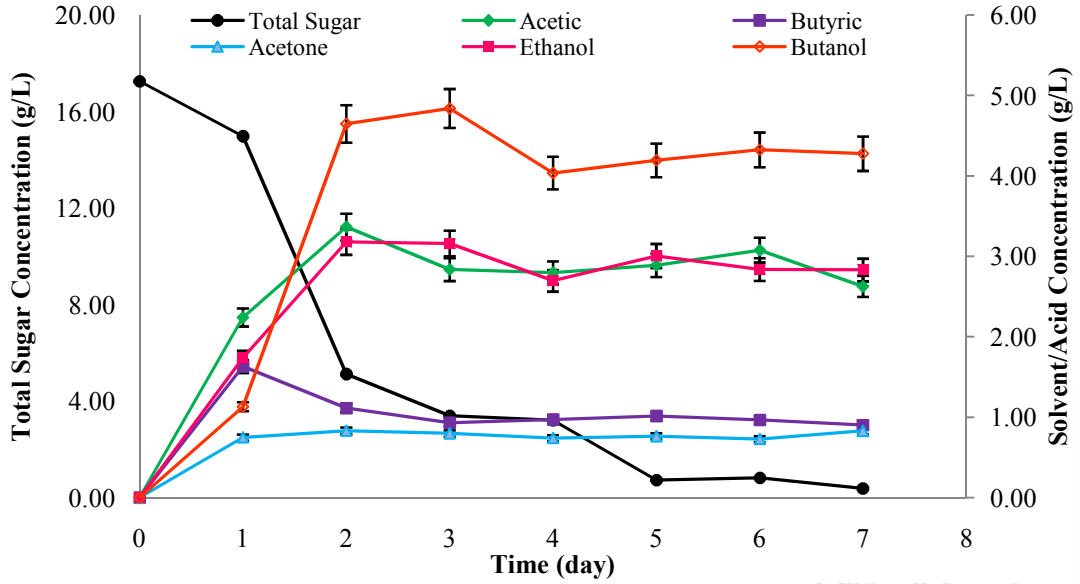
4.3.3 การหมักABE โดยใช้ไฮโดรไลเสทของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่ 95°C ที่เวลา 60 นาที

ในหัวข้อนี้ หมัก ABE โดยใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 17 g/L ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ใส่เพิ่ม 7 g/L ไฮโดรไลเสทสาหร่าย 10 g/L (ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5 g/L) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 ทั้งขั้นตอน Acedogenesis และ Solventogenesis เกิดขึ้นภายในวันที่แรกของการหมัก ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักลดลงจาก 17 g/L เป็น 5 g/L ในวันที่ 2 ของการ

หมัก ซึ่งน้ำตาลที่ลดลงใน 2 วันแรกเป็นน้ำตาลรีดิวซ์จากไฮโดรไลเสทของสาหร่ายและกลูโคสที่เติมเพิ่มในตอนต้นของการหมัก หลังจากวันที่ 2 ของการหมักเป็นการถูกใช้ของน้ำตาลนอนรีดิวซ์ที่ป้อนเข้าในตอนต้น เนื่องจาก *Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียที่สามารถหลั่งเอนไซม์เพื่อไฮโดรไลซิส และในน้ำหมักก็ยังมีเอนไซม์ CELLIC TEC 2 จากขั้นตอนไฮโดรไลซิสก่อนหน้า รวมถึง *Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลายชนิดเช่น กลูโคส (Glucose) ซูโครส (Sucrose) แลคโทส (Lactose) ไซโลส (Xylose) ไซเลน (Xylan) แป้งและกลีเซอรอล (Andrade and Vasconcelos, 2003; Mitchell, 1998) นอกจากนี้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลที่ใช้ไม่สูงและมีบางส่วนเป็นน้ำตาลนอนรีดิวซ์ อัตราการเกิดกรดบิวทิริกจึงไม่สูงเกินไปจนทำให้มีการสะสมของกรดบิวทิริกเป็นพิษต่อเซลล์อย่างรุนแรง ทำให้แบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทั้งหมดจากที่ป้อนเข้าและผลิตบิวทานอลได้ ส่งผลให้บิวทานอลมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆและสูงสุด เท่ากับ 4.84 g/L หรือ 0.28 g butanol/g sugar และได้ผล ABE รวมเท่ากับ 0.54 g butanol/g sugar ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณบิวทานอลที่ได้ 0.17 g butanol/g algae และเท่ากับ 0.33 g ABE / g algae

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าในการกระบวนการหมัก ABE จากไฮโดรไลเสทของสาหร่ายนั้นขั้นตอน Solventogenesis เกิดได้ดีกว่าการหมักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 33 g/L อย่างไรก็ตามยังมีปริมาณกรดที่เหลืออยู่ด้วยคือ กรดบิวทิริกและกรดอะซิติก คือ 1 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีผลิตภัณฑ์พลอยได้อีกด้วยคือ แก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Lu¨tke-Eversloh and Bahl, 2011) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก โดยน้ำตาล 1 โมเลกุล จะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP 2 โมเลกุล และ NADH+ H^+ จำนวน 2 โมเลกุลด้วย นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วย ซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้นเพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษและช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ ด้วย จากที่กล่าวมาข้างต้นใช้อธิบายเหตุผลที่เกิดการผลิตอะซิโตนในสัดส่วนต่อการเกิดบิวทานอลต่ำ จึงทำให้ยังเหลืออะซิติกอยู่ในน้ำหมักในสัดส่วนที่สูงเมื่อเทียบกับกรดบิวทิริก นอกจากนี้เนื่องจากในการหมักของการวิจัยนี้ดำเนินในขวดซีรัมที่ปิดฝา มีการปล่อยแก๊สออกมาวันละ 1 ครั้ง จึงทำให้มีการสะสมของแก๊สแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งทำให้การผลิตอะซิโตนลดลง (Lu¨tke-Eversloh and Bahl, 2011)

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 4.13 การผลิตบิวทานอลจากไฮโดรไลเสทสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ผ่านการปรับสภาพที่ 95°C เวลา 60 นาที

4.3.4 ผลได้ของ ABE เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย H_2SO_4 ต่อการหมักเพื่อผลิตไบโอบิวทานอล ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น พบว่าผลได้ของ ABE ต่อมวลวัตถุดิบเริ่มต้นของงานวิจัยนี้ใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่น แต่ผลได้การผลิตบิวทานอลยังต่ำกว่างานวิจัยอื่น เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาวิธีการปรับสภาพเบื้องต้นสาหร่ายที่เหมาะสมเป็นหลัก จึงยังไม่ได้ศึกษาวิธีการที่จะผลิตบิวทานอลได้สูงสุด อย่างไรก็ตามก็สามารถกล่าวไว้กระบวนการปรับสภาพเบื้องและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ที่ดำเนินการในงานวิจัยนี้ สามารถผลิตน้ำตาลที่สามารถถูกใช้โดยแบคทีเรียได้มากถึง 94% (รูปที่ 4.13)

ตารางที่ 4.3 ผลของการปรับสภาพเบื้องต้นต่อการหมักเพื่อผลิตไบโอบิวทานอล

Pretreatment			Fermentation		Time (h)	Butanol (g/g)	ABE (g/g)	Reference
Substrate	Conc. H_2SO_4	Temp. (°C)	Inoculum	Temp. (°C)				
Corn fiber	3.6%	50	*C. beijerinckii*	37	90	-	0.35	Guo *et al*., 2013
Corn fiber	2%	50	*C. beijerinckii*	35	90	0.260	0.260	Du *et al*., 2013
Algae	5.3%	90	*C.saccharoperbutyl-acetonicum*	35	120	0.244 g/L	0.201	Ellis *et al*., 2012
Algae	3%	95	*C. beijerinckii*	37	72	0.170	0.330	This study

**หมายเหตุ Conc. = Concentration, *C*. = *Clostridium*

Prince of Songkla University Pattani Campus

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการศักยภาพการผลิต ABE จากพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่ที่พบมากในบริเวณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี คือสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. และ *Ceratophyllum dermersum* (สาหร่ายพุงชะโด) พบว่า *Rhizoclonium* sp. ซึ่งความแข็งแรงของโครงสร้างผนังเซลล์หรือมีปริมาณลิกนินน้อยกว่าจะถูกปรับสภาพเบื้องต้นเพื่อให้ได้ไฮโดรไลเสทที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงได้ดีกว่า *Ceratophyllum dermersum*

จากการศึกษาผลของสารเคมีในการปรับสภาพเบื้องต้นของสาหร่ายด้วยสาร 3 ชนิด คือ สารละลายกรด H_2SO_4 สารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และน้ำกลั่น ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 60 นาที พบว่าเมื่อนำสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย 3% H_2SO_4 ไปไฮโดรไลซิสต่อด้วยเอนไซม์พบว่าสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 0.551 g glucose released/g pretreated algae และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรด H_2SO_4 ร้อยละ 1-9 โดยปริมาตร พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ H_2SO_4 ช่วยให้สามารถปลดปล่อยน้ำตาลในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสได้ดีขึ้น แต่การกู้คืนของของแข็งสาหร่ายระหว่างกระบวนการปรับสภาพเบื้องต้นลดลงเมื่อความเข้มข้นของ H_2SO_4 เพิ่มขึ้น ผลได้ของน้ำตาลสูงสุดได้จากการใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 3% H_2SO_4 คือ 0.908 g sugar/g pretreated algae นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการปรับสภาพเบื้องต้นที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน ผลการไฮโดรไลซิสของสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพที่ 95°C เป็นเวลา 60 นาที ได้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสใกล้เคียงกับการปรับสภาพที่ 121°C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที ซึ่งมีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.537 g sugar/g algae หรือคิดเป็น 80.12% ของปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. จากนั้นในขั้นตอนสุดท้ายคือการนำเอนไซม์ไฮโดรไลเสทที่ได้จากสาหร่ายที่ผ่านการปรับสภาพที่ 95°C เป็นเวลา 60 นาทีไปหมักโดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium beijerinkii* TISTR 1461 ด้วยการหมักแบบใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซิสแล้วตามด้วยการหมัก พบว่าน้ำตาลในไฮโดรไลเสทนี้สามารถถูกใช้โดยแบคทีเรียได้มากถึง 94% ได้ผลผลิตบิวทานอลเท่ากับ 0.17 g butanol /g algae และเท่ากับ 0.33 g ABE / g algae

Prince of Songkla University Pattani Campus

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. นอกจากสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. แล้วสาหร่ายหรือพืชน้ำอื่น ๆ เช่น *Chaetomorpha* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ที่พบมากในบริเวณอ่าวปัตตานีและเป็นสายพันธ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Rhizoclonium* sp. ผักตบชวา เป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจในการนำมาผลิตเป็นพลังงานทดแทน
2. การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการปรับสภาพเบื้องต้น การไฮโดรไลซิส และการหมักโดยทำการทดลองในปริมาตรใหญ่ระดับ 1 ลิตรขึ้นไป จะได้ข้อมูลสำหรับการขยายสเกลการผลิตรวมถึงออกแบบเครื่องปฏิกรณ์
3. การเพิ่มผลผลิตของการผลิต ABE สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การใช้กระบวนการหมัก 2 ขั้นตอนที่แยกขั้น Acidogenesis และ Solventogenesis

Prince of Songkla University Pattani Campus

บรรณานุกรม

ช่อทิพย์ อาธารมาศ. 2531. พรรณไม้น้ำของไทย. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฐิติมา คำไชยใหญ่, สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย และ ศุภรินทร์ ไชยกลางเมือง. 2554. การปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยไอน้ำ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางเพื่อผลิตเอทานอล. การประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21, 10 – 11 พฤศจิกายน 2554.

ประมุข ภระกลูสุขสถิตย์. 2555. การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ปริญญา มูลสิน และ อมรรัตน์ วงษ์กลม. 2556. การศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากสาหร่ายเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. สาขาวิชาชีววิทยาและสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

พิจิตรา ตั้งเขื่อนขันธ์, รสรินทร์ รุจนานนท์ และ อัญชลี อานาทสมบูรณ์. 2548. การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2558. เชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

สมสุข มัจฉาชีพ. 2538. นิเวศวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน, ชลบุรี.

สุขใจ ชูจันทร์. 2554. การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

อังคณา สุจริต, ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล, จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, วรกันต์ บุรพาธนะ และเหมือนเดือน พิศาลพงศ์. 2553. การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ. วิศวกรรมสาร มข. 4, 339-347.

Prince of Songkla University Pattani Campus

Afsahi, B., Kazemi, A., Kheirolomoom, A. and Nejati, S. 2007. Immobilization of cellulase on non-porous ultrafine silica particles. Scientia Iranica. 14(4), 379 - 383.

Aguilar, L.L., Rodrı´guez, C.E.R., Arias, M.L., Lutz, G. and Ulate, W. 2011. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 using cassava flour as fermentation substrate: enzymatic versus chemical pretreatments. World J Microbiol Biotechnol. 27, 1933 – 1939.

Alkhatib, M., Abd, R.M., Alam, M.Z. and Saleh, H.M. 2011. Enzymatic hydrolysis of oil palm empty fruit bunch using immobilized cellulase enzyme. African Journal of Biotechnology. 10(81), 18811 - 18815.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology. 101, 4851 – 4861.

Andrade, J.C. and Vasconcelos, I. 2003. Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum* : culture stability and low-grade glycerol utilization. Biotechnology Letters. 25, 121–125.

Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhny, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H. Vavilin, V. A. 2002. Anaerobic digestion model no. 1 (ADM1).IWA Publishing.

Cheng, C.L., Che, P.Y., Chen, B.Y., Lee, W.J., Lin, C.Y. and Chang, J.S. 2012. Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora. Applied Energy. 100, 3 - 9.

Chao, K.P., Chen, C.S., Wang, E.I.C. and Su, Y.C. 2005. Aquacultural characteristics of *Rhizoclonium riparium* and an evaluation of its biomass growth potential. Journal of Applied Phycology. 17, 67 – 73.

Chao, K.P., Su, Y.C. and Chen, C.S. 1999. Chemical composition and potential for utilization of the marine alga *Rhizoclonium* sp. Journal of Applied Phycology 11, 525–533.

Du, L.f., He, A.Y., Wu, H., Chen, J.N., Liu, J.L., Min, J and Ouyang, P.K. 2013. Butanol production from acid hydrolyzed corn fiber with *Clostridium beijerinckii* mutant. Bioresource Technology. 135, 254 - 261.

Prince of Songkla University Pattani Campus

Dürre, P. 2007. Biobutanol : An attractive biofuel. Journal Biotechnol. 1, 115 – 124.

Ehimen, E.A., Nielsen, J.B.H., Poulsen, M. and Boelsmand, J.E. 2013. Influence of different pre-treatment routes on the anaerobic digestion of a filamentous algae. Renewable Energy. 50, 476 – 480.

Ellis, J.T., Hengge, N.N., Sims, R.C. and Miller, C.D. 2012. Acetone butanol and ethanol production from wastewater algae. Bioresource Technology. 111, 491 - 495.

El-Zawawy, W.K., Ibrahim, M.M., Abdel-Fattah, Y.R., Soliman, N.A. and Mahmoud, M.M. 2011. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. Carbohydrate Polymers. 84, 865 – 871.

Ezeji, T.C., Qureshi, N. and Blaschek, H.P. 2007. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Current Opinion in Biotechnology. 18, 220 – 227.

Ezeji, T., Qureshi, N. and Blaschek, H.P. 2007a. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. Biotechnology and Bioengineering. 97 (6), 1460 - 1469.

Ezeji, T.C., Qureshi, N. and Blaschek, H.P. 2007b. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Current Opinion in Biotechnology. 18, 220 – 227.

Guo, T., He, A.Y., Wu, H., Du, T.F., Zhu, D.W., Liang, D.F., Jiang, M., Wei , P. and Ouyang, P.K. 2013. Butanol production from hemicellulosic hydrolysate of corn fiber by a *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor tolerance. Bioresource Technology. 135, 379 - 385.

Hansen, A.C., Zhang, Q. and Lyne, P.W.Y. 2005. Ethanol diesel fuel blends – a review. Bioresource Technology. 96, 277 - 285.

Hecke, W.V., Vandezande, P., Claes, S., Vangeel, S., Beckers, H., Diels, L. and Wever, H.D. 2012. Integrated bioprocess for long-term continuous cultivation of *Clostridium acetobutylicum* coupled to pervaporation with PDMS composite membranes. Bioresource Technology. 111, 368 – 377.

Prince of Songkla University Pattani Campus

Huang, J. and Meagher, M.M. 2001. Pervaporative recovery of n-butanol from aqueous solutions and ABE fermentation broth using thin-film silicalite-filled silicone composite membranes. Journal of Membrane Science. 192, 231 – 242.

Huesemann, M.H., Kuo, L.J. Urquhart, L., Gill, G.A. and Roesijadi, G. 2012. Acetone-butanol fermentation of marine macroalgae. Bioresource Technology. 108, 305 – 309.

Jang, J.S., Cho, Y., Jeong, G.T. and Kim, S.K. 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. Bioprocess Biosystems Engineering. 35, 11 – 18.

Jensen, N.S., Thygesen, A., Leipold, F., Thomsen, SJ., Roslander, C., Lilholt, H. and Bjerre, AB. 2013. Pretreatment of the macroalgae *Chaetomorpha linum* for the production of bioethanol – comparison of five pretreatment technologies. Bioresource Technology. 140, 36 - 42.

Kaminski, W., Tomczak, E. and Gorak, A. 2011. Biobutanol-Production and purification methods. Ecological Chemistry and Engineerings. 18, 31 - 37.

Kim, N.J., Li, H., Jung, K. Chang, H.N., and Lee, P.Y. 2011. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. Bioresource Technology. 102, 7466 – 7469.

Koyama, M., Yamamoto, S., Ishikawa, K., Ban, S. and Toda, T. 2014. Anaerobic digestion of submerged macrophytes: Chemical composition and anaerobic digestibility. Ecological Engineering. 69, 304 – 309.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Industrial and Engineering Chemistry Research. DOI: 10.1021.

Lee, S.Y., Park, H.S., Jank, H., Nielsen, K.J. and jung, K.S. 2008. Fermentative butanol production by *Clostridia*. Biotechnology and Bioengineer. 101, 209 – 228.

Loyarkata, S., Cheirsilp, B. and Umsakul, K. 2013. Decanter cake waste as a renewable substrate for biobutanol production by *Clostridium beijerinckii*. Process Biochemistry. 48, 1933 – 1941.

Prince of Songkla University Pattani Campus

Lu¨tke-Eversloh, Y. and Bahl, H. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. Current Opinion in Biotechnology. 22, 634 – 647.

Mishima, D., Tateda, M., Ike, M. and Fujita, M. 2006. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. Bioresource Technology. 97, 2166 – 2172.

Mitchell, W.J. 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by Clostridia. Advances in Microbial Physiology. 39, 31–130.

Moradi, F., Amiri, H., Soleimanian-Zad, S., Ehsani, M.R. and Karimi, K. 2013. Improvement of acetone butanol and ethanol production from rice straw by acid and alkaline pretreatments. Fuel. 112, 8 - 13.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladish, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. 96, 673 - 686.

Nigam, P.S. and Singh, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. Progress in Energy and Combustion Science. 37; 52 - 68.

Niven, R.K. 2005. Ethanol in gasoline : environmental impacts and sustainability review article. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 9, 535 - 555.

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

Prasertsan, P., O-Thong, S. and Birkeland, N.K. 2009. Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process. International Journal of Hydrogen Energy. 34, 7448 – 7459.

Qureshi, N., Ezeji, C.T., Ebener, J, Dien, B.S., Cotta, M.A. and Blaschek, H.P. 2008. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. Bioresource Technology. 99, 5915 – 5922.

Prince of Songkla University Pattani Campus

Qureshi, N., Saha, C.B., Hector, R.E., Hughes, S.R. and , Cotta, M.A. 2008. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-Batch fermentation. Biomass and Bioenergy. 32, 168 - 175.

Ranjan, A. and Moholkar, V.S. 2013. Comparative study of various pretreatment techniques for rice straw saccharification for the production of alcoholic biofuels. Fuel. 112, 567 – 571.

Ranjan, A., Khanna, S. and Moholkar, V.S. 2013. Feasibility of rice straw asvalternate substrate for biobutanol production. Applied Energy. 103, 32 - 38.

Richter, H., Qureshi, N., Heger, S., Dien, B., Cotta, M.A. and Angenent, L.T. 2011. Prolonged Conversion of n-Butyrate to n-Butanol with *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* in a Two-Stage Continuous Culture with in-situ Product Removal. Biotechnology and Bioengineering. 109, 913-921.

Rodrigues, M.A. and Bon, E.P.S. 2011. Evaluation of Chlorella (Chlorophyta) as source of fermentable sugar via cell wall enzymatic hydrolysis. Enzyme Research. Volume 2011, Article ID 405603.

Robic, A., Rondeau-Mouro, C., Sassi, J.F., Lerat, Y. and Lahaye, M. 2009. Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). Carbohydrate Polymers. 77, 206–216.

Ruangchuay, R., Lueangthuwapranit, C. and Pianthumdee, N. 2007. Apparent characteristics and taxonomic study of macroalgae in Pattani Bay. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 29(4), 893 - 905.

Sheath, R.G. and Cole, K.M. 1992. Biogeography of stream macroalgae in North America. Journal of Phycology. 28, 448–460.

Shen, J. and Agblevor, F.A. The operable modeling of simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. Applied Biochemistry and Biotechnology. 160, 665–681.

Silverstein, R.A. 2004. A Comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol. M.S. Thesis, North Carolina State University.

Prince of Songkla University Pattani Campus

Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A. and Moenne, A. 2011. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. Marine Drugs. 9, 2514 – 2525.

Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R. and Corleti. V. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. Bioresource Technology. 98, 296 – 301.

Wang, D., Xu1, Y., Hu, J. and Zhao, G. 2004. Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyce cerevisiae.* Journal of the Institute of Brewing. 110(4), 340 – 346.

Wang, X., Wang, Y., Wang, B., Blaschek, H., Feng, H. and Li, Z. 2013. Biobutanol production from fiber-enhanced DDGS pretreated with electrolyzed water. Renewable Energy. 52, 16 - 22.

Wang, Y. and , Blaschek, H.P. 2011. Optimization of butanol production from tropical maize stalk juice by fermentation with *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 . Bioresource Technology. 102, 9985 – 9990.

Wargacki, A.J. Leonard, E.,Win, M.N,. Regitsky, D.D., Santos,C.N.S., Kim, P.B., Cooper, S.R., Raisner, R.M., Herman, A. Sivitz, A. B., Lakshmanaswamy, A., Kashiyama, Y.,Baker, D. and Yoshikuni, Y. 2012. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. Science. 335, 303 - 313.

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก

Prince of Songkla University
Pattani Campus

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1.การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TSC) และปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ (VSC) ด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 920.193

1.1 วิธีการทดลอง

1.1.1. อบ Crucible ที่อุณหภูมิ 105 ℃ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.1.2. นำออกจากตู้อบ วางทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์

1.1.3. นำไปชั่งน้ำหนักของ Crucible หลังอบ บันทึกน้ำหนัก (A)

1.1.4. นำสาหร่ายแห้งบดประมาณ 1 กรัม ใส่ลงใน Crucible ชั่งน้ำหนัก แล้วบันทึกน้ำหนัก (B)

1.1.5. นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 ℃ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือจนมีน้ำหนักคงที่

1.1.6. นำออกจากตู้อบ นำไปวางทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์

1.1.7. นำไปชั่งน้ำหนักบันทึกน้ำหนัก (C)

1.1.8. นำไปเผาโดยใช้เตาเผาที่อุณหภูมิ 550 ± 50 ℃ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

1.1.9. นำออกจากเตาเผา นำไปวางทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์

1.1.10. นำไปชั่งน้ำหนักบันทึกน้ำหนัก (D)

1.2 การคำนวณ

TSC = (Y) (100) / (X)

VSC = [(Y-Z) (100)] / (X)

เมื่อ X คือ ตัวอย่างน้ำเริ่มต้น (B-A) (g)

Y คือ ตัวอย่างน้ำหลังอบ (B-C) (g)

Z คือ ตัวอย่างน้ำหลังเผา (C-D) (g)

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) และปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 973.48

2.1 การเตรียมสารละลาย

2.1.1. การเตรียม Digestion reagent

(1) ละลาย K_2SO_4 134 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 650 mL

(2) นำมาผสมกับ Conc. H_2SO_4 ปริมาตร 200 mL

(3) เติม $CuSO_4$ 2 กรัม

(4) ปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่น

2.1.2. การเตรียมสารละลาย NaOH

(1) ละลาย NaOH ประมาณ 500 กรัม และ $Na_2S_2O_35H_2O$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น

(2) ปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่น

2.1.3. การเตรียมสารละลาย H_3BO_3

(1) ละลาย H_3BO_3 20 กรัม ในน้ำกลั่น

(2) ปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่น

2.1.4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.01 M H_2SO_4

(1) ปิเปต Conc. H_2SO_4 0.54 mL

(2) ปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่น

2.1.5. การเตรียม Mix indicator

(1) ละลาย Methyl red indicator 200 mg ใน Ethyl alcohol 100 mL

(2) ละลาย Methylene blue indicator 200 mg ใน Ethyl alcohol 100 mL

(3) ผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1. การย่อย

(1) นำตัวอย่างสาหร่ายปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงไปในขวด Kjeldahl

(2) เติม boiling ships 2-3 ชิ้น

(3) เติม Digestion reagent 50.0 mL

(4) นำเข้าเครื่องย่อย

(5) ย่อยที่อุณหภูมิ 375 °C จนได้สารละลายใส จากนั้นย่อยต่อไปอีก 20-30 นาที

2.2.2. การกลั่น

(1) นำสารที่ย่อยเสร็จแล้วเข้าเครื่องกลั่นแอมโมเนียแล้วเติม Phenolphthalein 0.5 mL

Prince of Songkla University Pattani Campus

(2) จุ่มสายจาก Condenser ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL ที่มีสารละลายกรด H_3BO_3 50 mL

(3) กลั่นโดยใช้ความร้อนที่เหมาะสม เก็บส่วนที่กลั่นออกมาโดยให้มีปริมาตร 200 mL

(4) นำสารที่กลั่นออกมาได้ไปไทเทรต

2.2.3. การไทเทรต

(1) นำสารที่กลั่นออกมาได้ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.01 M H_2SO_4

(2) หยด Mix indicator 3 หยด

(3) ไทเทรตจนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

(4) ให้ทำสารละลาย Blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

2.2.4. การคำนวณ

ไนโตรเจนอินทรีย์ (ppm) = [(A-B) (C) (28000)] / ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

โปรตีน (ppm) = (ปริมาณไนโตรเจน) (6.25)

3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิธีดีเอ็นเอส (DNS method)(สาโรจน์,2544)

3.1 สารเคมี

3.1.1. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1% เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 g ในน้ำกลั่น 250 mL เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 16 g ละลายในน้ำกลั่น 200 mL) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 g ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 mL เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1000 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 mL จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 mg/mL

3.2 วิธีการ

3.2.1. ดูดสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ออกมา) หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-1.0 mg/mL) ที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.2.2. เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 2 mL

3.2.3. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

3.2.4. แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น 5 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2.5. เติมน้ำกลั่น 20 mL ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

3.2.6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด วิธี Phenol – Sulfuric acid

4.1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 mL

4.2. เติม 5% Phenol 1 mL และ conc. H_2SO_4 5 mL

4.3. วางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเขย่า

4.4. นำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 25-30°C เป็นเวลา 20-30 นาที

4.5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm

4.6. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 1-1000 µg/ml

5. การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

5.1 วิธีการ

5.1.1. นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ออก เก็บส่วนที่ใสกรองอีกครั้ง นำไปวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาล

5.1.2. นำส่วนใสของสารตัวอย่างที่ได้มา 2 mL บรรจุขวดปิดฝา

5.1.3. ฉีดสารตัวอย่างที่เตรียมได้ 1 µL เข้าไปในแก๊สโครมาโตกราฟี

5.1.4. หลังจากฉีดตัวอย่างไปแล้วประมาณ 0-20 นาที เครื่องอินทิเกรเตอร์ก็จะแสดงยอดออกมา เครื่องอินทิเกรเตอร์จะทำการคำนวณพื้นที่ใต้พีคออกมาให้โดยอัตโนมัติ และนำไปเทียบกับพีคของสารมาตรฐานเพื่อบ่งบอกชนิดน้ำตาล

5.2 สภาวะดังนี้

Column : LiChroCART® 250-4 Purospher® STAR NH2, 5 µm (Cat. No. 1.50245)

Mobile Phase : Acetonitrile / Water ; 75:25

Flow rate : 1.0 mL/min

Detection : Refractive Index detector (RI detector)

Temperature : 30°C

Inject. volume : 10 µL

Prince of Songkla University Pattani Campus

6. วิเคราะห์ปริมาณบิวทานอล เอทานอล อะซิโตน และกรด (กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก) ของผลิตภัณฑ์โดยใช้ Gas Chromatograph (GC) (สาโรจน์,2544)

6.1 วิธีการ

6.1.1. นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ออก เก็บส่วนที่ใสกรองอีกครั้ง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล เอทานอล อะซิโตน และกรด (กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก)

6.1.2. นำส่วนใสของสารตัวอย่างที่ได้มา 1.5 mL บรรจุขวดปิดฝา

6.1.3. ฉีดสารตัวอย่างที่เตรียมได้ 1 μL เข้าไปในแก๊สโครมาโตกราฟี

6.1.4. หลังจากฉีดตัวอย่างไปแล้วประมาณ 7-16 นาที เครื่องอินทิเกรเตอร์ก็จะแสดงยอดออกมา เครื่องอินทิเกรเตอร์จะทำการคำนวณพื้นที่ใต้พีคออกมาให้โดยอัตโนมัติ จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)

6.2 สภาวะดังนี้

Column : HP-FFAP

Detector : Flame Ionization Detector (FID)

Temperature of Column : 50 °C

Temperature of Injector : 150 °C

Temperature of Detector : 250 °C

7. วิธีการเตรียมสารละลาย Citrate buffer

7.1 การคำนวณ

7.1.1 การเตรียม Citric acid ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 200 mL

1000 mL มีเนื้อสาร 0.1 mol

250 mL มีเนื้อสาร $\frac{0.1 \times 250}{1000}$ เท่ากับ 0.025 mol

1 mol มีเนื้อสาร 192.124 g

0.025 mol มีเนื้อสาร $\frac{192.124 \times 0.02}{1}$ เท่ากับ 4.80 g

Prince of Songkla University Pattani Campus

7.1.2 การเตรียม Trisodium citrate ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 2000 mL

1000 mL มีเนื้อสาร 0.1 mol

2000 mL มีเนื้อสาร $\frac{0.1 \times 2000}{1000}$ เท่ากับ 0.2 mol

1 mol มีเนื้อสาร 294.10 g

0.2 mol มีเนื้อสาร $\frac{294.10 \times 0.2}{1}$ เท่ากับ 58.82 g

7.2 การเตรียมสารละลาย Citrate buffer

7.2.1 ชั่ง Citric acid 4.80 กรัม ในน้ำกลั่น 100 mL คนให้ละลายเข้ากันจนหมด ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 250 mL เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

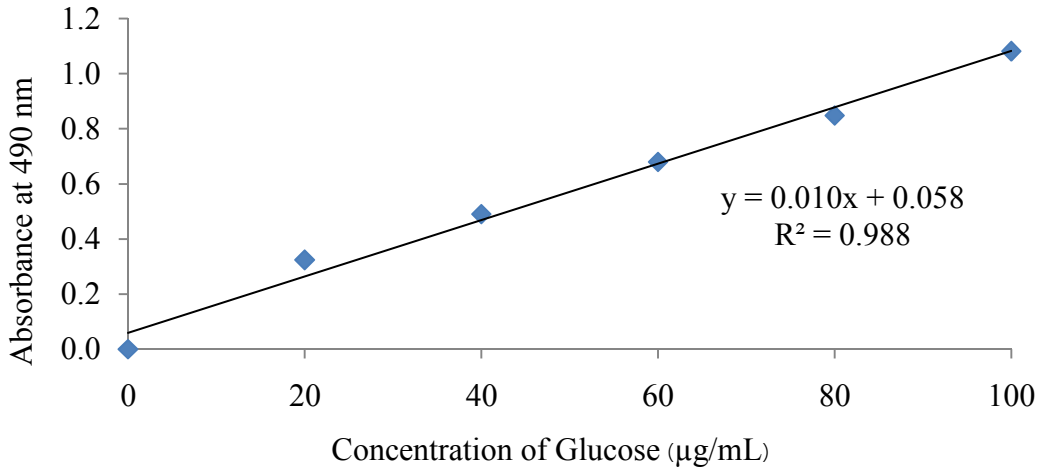
7.2.2 ชั่ง Trisodium citrate 58.82 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 mL คนให้ละลายเข้ากันจนหมด ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 2000 mL เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

7.2.3 ปรับอัตราส่วนของสารละลายตามที่ต้องการให้ pH เท่ากับกับ 6.3 ในอัตราส่วนของสาร Citric acid : Trisodium citrate คือ 7.2 : 42.8

Prince of Songkla University Pattani Campus

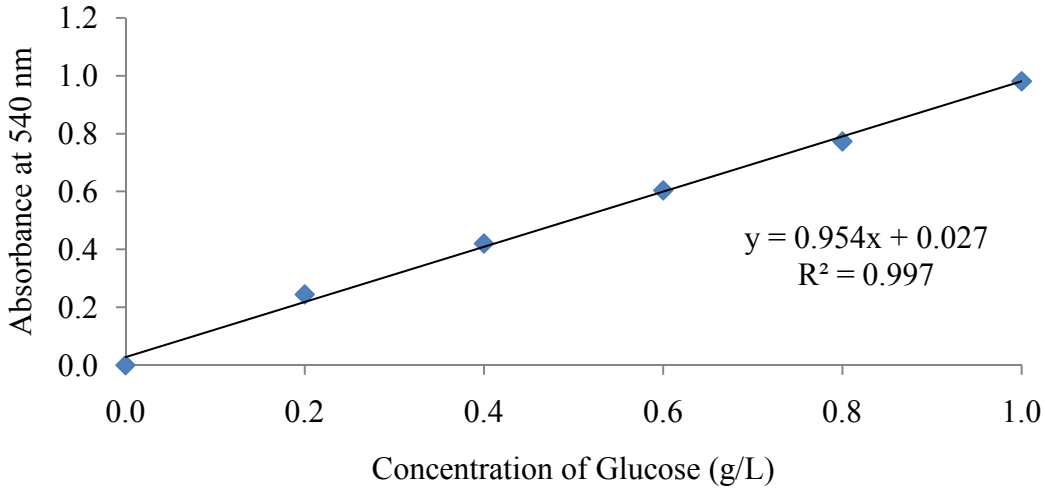
ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์

1. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

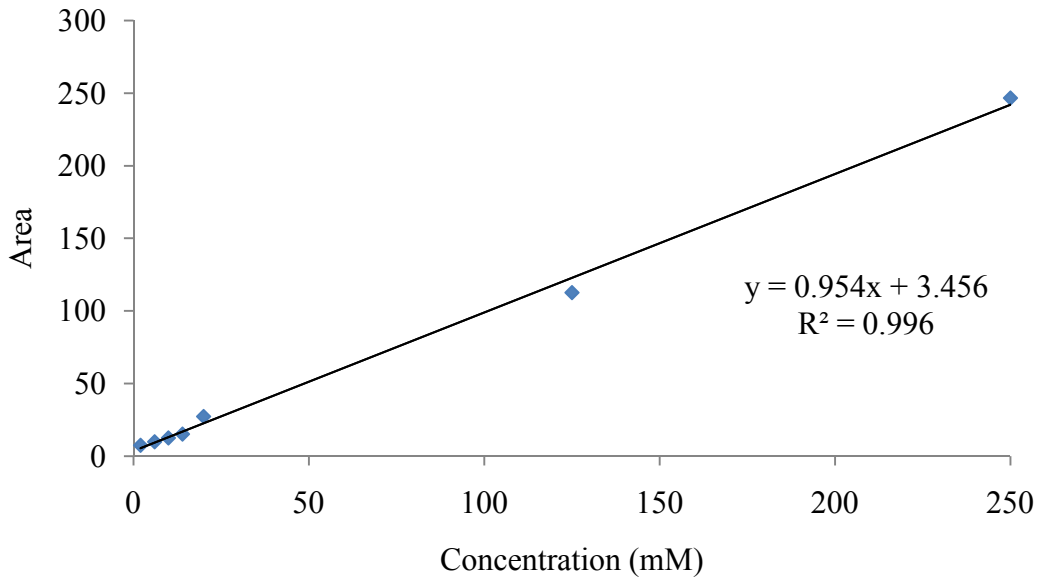
2. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

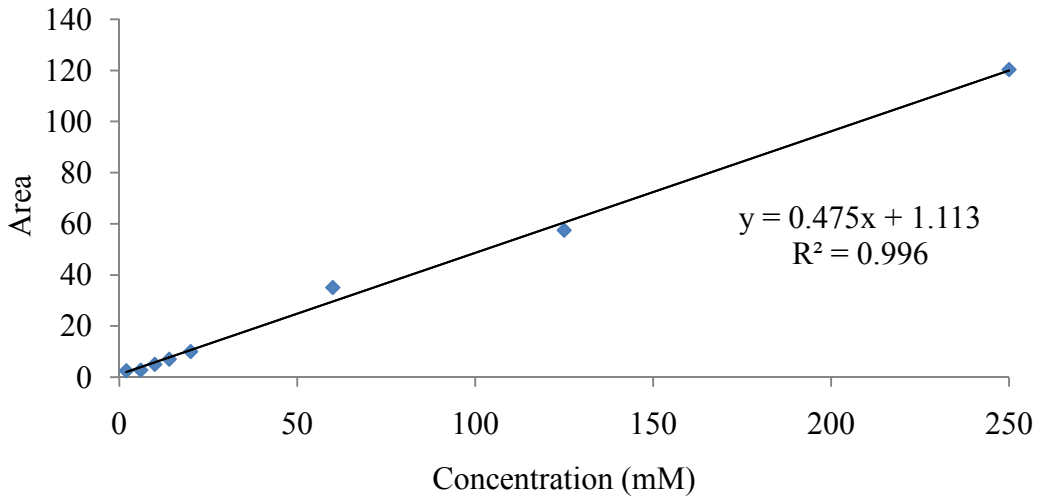
Prince of Songkla University Pattani Campus

3. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดบิวทิริก



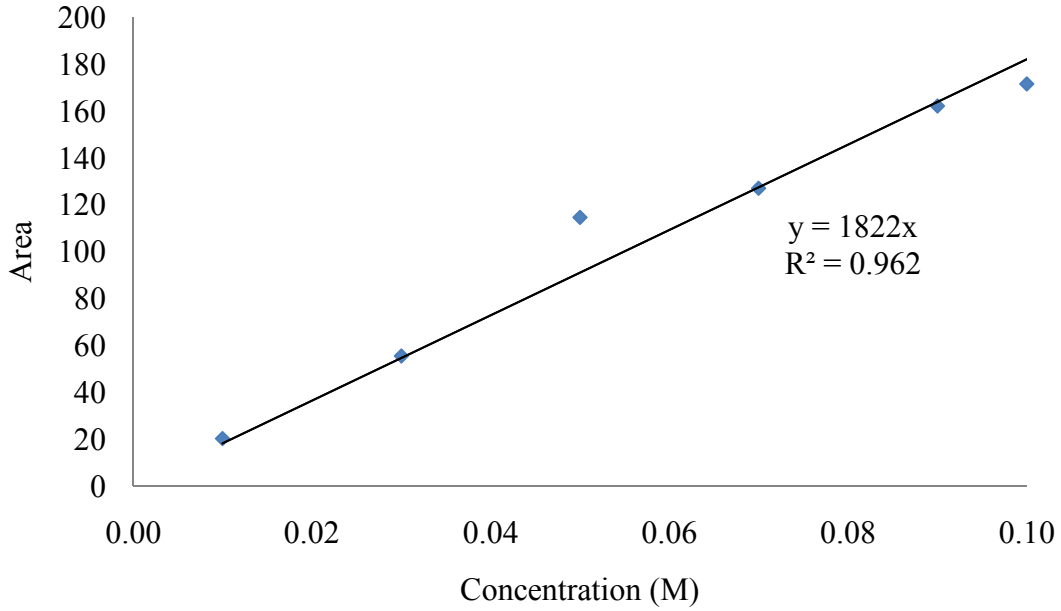
รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานกรดบิวทิริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดอะซิติก



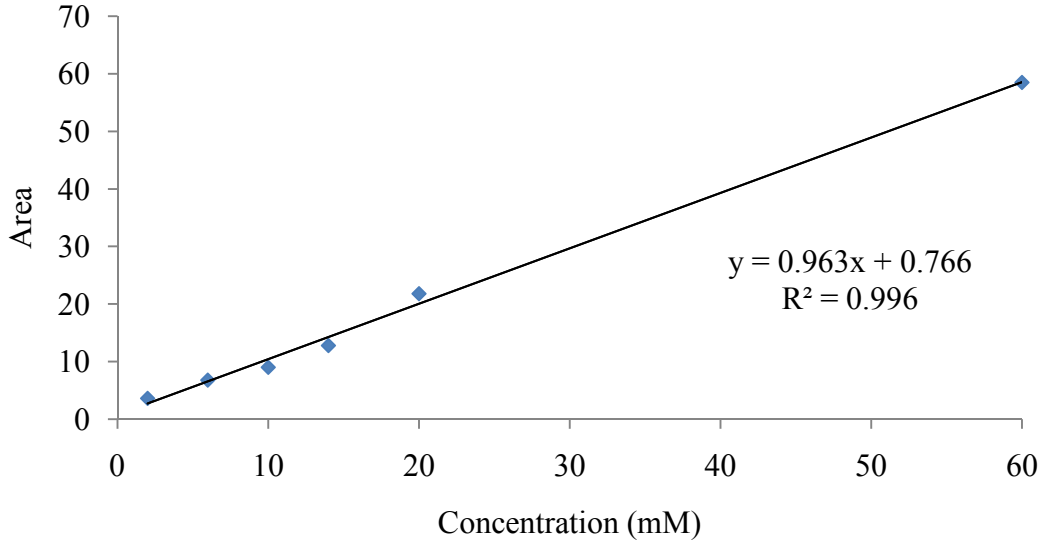
รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง

5. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นบิวทานอล



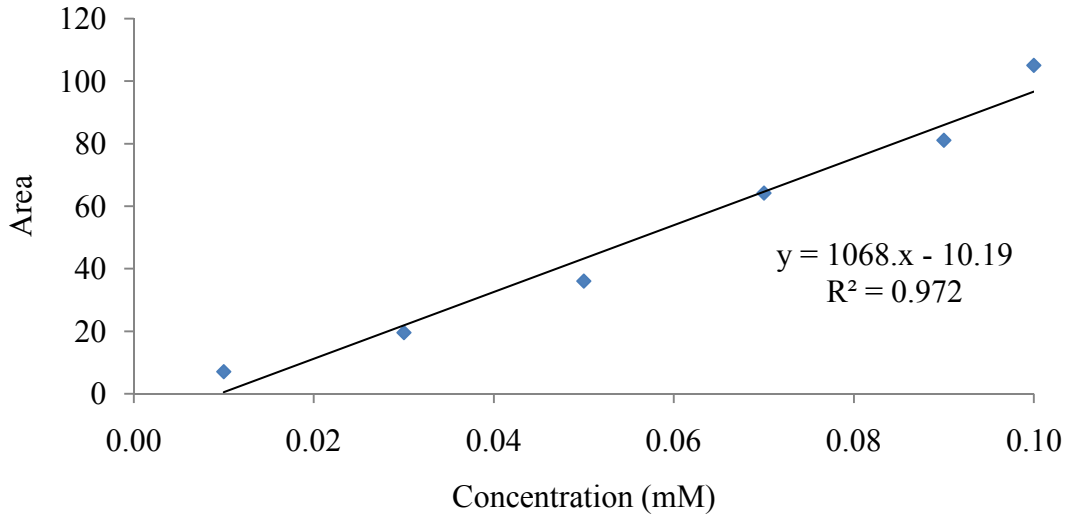
รูปที่ ข.5 กราฟมาตรฐานบิวทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

6. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอล



รูปที่ ข.6 กราฟมาตรฐานเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

7. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน



รูปที่ ข.7 กราฟมาตรฐานอะซิโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก ค
วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

1. การเตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Triptone-yeast extract-acetate (TYA) Medium

   ส่วนประกอบของอาหาร

   - Glucose 20 g/L
   - Yeast extract 2 g/L
   - Tryptone 6 g/L
   - CH_3COONH_4 3 g/L
   - $MgSO_4.7H2O$ 0.3 g/L
   - KH_2PO_4 0.5 g/L
   - $FeSO_4.7H2O$ 10 mg/L

   ชั่งส่วนประกอบของอาหาร TYA ตามปริมาตรข้างต้น ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 L ในขวดดูแรน 1 L จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำร้อนและแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}C$ ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 20 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล สูไฮลา สาและ
รหัสประจำตัวนักศึกษา 5620320302
วุฒิการศึกษา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์) สาขาเคมี	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา

ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษา จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2556
ทุนอุดหนุนการค้นคว้าวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2556
งบประมาณแผ่นดิน ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ SAT570129S

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Suhaila Salaeh, Prawit Kongjan, Somrak Panphon and Rattana Jariyaboon. 2014. Pretreatment of *Rhizoclonium* spp. for an efficient biobutanol production process based on enzymatic hydrolysis. Asia Biohydrogen and Biorefinery symposium, 16-18 December, 2014, Mahkota Hotel, Melaka, Malaysia.

Suhaila Salaeh, Prawit Kongjan, Somrak Panphon and Rattana Jariyaboon. 2015. Feasible pretreatment of *Rhizoclonium* spp. for butanol production by *Clostridium beijerinckii*. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. 17-20 November, 2015, Mandarin Hotel Bangkok by Centre Point, Bangkok, Thailand.

Prince of Songkla University Pattani Campus