



การผลิตเอทานอลจากทางใบต้นจากโดยใช้เซลล์ตรึงรูป *Clostridium*  
*xylanolyticum*

Ethanol Production from Nipa Palm Frond Using Immobilized  
*Clostridium xylanolyticum*

ธราวี ทวีกาญจน์

Tarawee Taweekarn

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Environmental Management

Prince of Songkla University

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การผลิตเอทานอลจากทางใบต้นจากโดยใช้เซลล์ตรึงรูป *Clostridium*  
*xylanolyticum*

Ethanol Production from Nipa Palm Frond Using Immobilized  
*Clostridium xylanolyticum*

ธราวี ทวีกาญจน์

Tarawee Taweekarn

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Environmental Management  
Prince of Songkla University

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลจากทางใบต้นจากโดยใช้เซลล์ตรึงรูป <i>Clostridium xylanolyticum</i>
ผู้เขียน	นางสาวธราวี ทวีกาญจน์
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรมาศ สุทธินน)	.....ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.พนาลี ชีวภิกขิต)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ เขียวศิลป์)
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสง)	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.น้อมจิตต์ แก้วไทย อันเดร)
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรารณ อินทศิริ)	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรมาศ สุทธินน)
	.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการ  
สิ่งแวดล้อม

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอแสดงความ  
ขอบคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ลงชื่อ.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรมาศ สุทธิบูรณ์)  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....  
(นางสาวธราวี ทวีกาญจน์)  
นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวธราวี ทวีกาญจน์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลจากทางใบต้นจากโดยใช้เซลล์ตรึงรูป <i>Clostridium xylanolyticum</i>
ผู้เขียน	นางสาวธราวี ทวีกาญจน์
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2559

### บทคัดย่อ

ต้นจาก (*Nypa fruticans*) เป็นพืชตระกูลปาล์มที่สำคัญบริเวณเขตร้อนและเจริญได้ดีบริเวณชายฝั่งที่มีน้ำกร่อยหรือดินเค็ม วัสดุเศษเหลือจากต้นจากมีปริมาณมากและมีองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับผลิตเอทานอล งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ส่วนต่าง ๆ ของทางใบต้นจาก ได้แก่ ก้านทางใบและใบเป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอลโดย *Clostridium xylanolyticum* ที่ถูกตรึงไว้ในโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และเมโซพอร์สซิลิกา หลังจากการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง พบว่าไฮโดรไลเซสของก้านทางใบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ปริมาณน้ำตาลรวมสูงที่สุดเท่ากับ 11.43 กรัมต่อลิตร รวมทั้งการผลิตเอทานอลปริมาณความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 0.07 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการทดลองซึ่งมีความแตกต่างกับชุดตัวอย่างอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) น้ำตาลที่พบสูงสุด ได้แก่ โซโลส รองลงมา คือ กลูโคส อะราบิโนส กาแลกโตส และ แรมโนส ในขณะที่เดียวกันพบสารยับยั้งในไฮโดรไลเซส ได้แก่ กรดแอสติค (1.10-2.87 กรัมต่อลิตร) สารเพอร์ฟูรัล (0.13-0.22 กรัมต่อลิตร) 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล (0.02-0.04 กรัมต่อลิตร) และกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (0.02-0.12 กรัมต่อลิตร) การตรึงแบคทีเรียแบบกักขังใน PVA ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับกรดบอริก 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และนำเม็ดบีด PVA แขนในสารละลายโซเดียมซัลเฟตบัพเฟอร์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้เม็ดบีดที่ฟอร์มตัวเป็นเม็ดกลม แยกออกจากกันได้ดี ไม่บวมน้ำ และมีความแข็งแรงสูง อย่างไรก็ตามกระบวนการตรึงดังกล่าวส่งผลให้ปริมาณแบคทีเรียลดลงจากหัวเชื้อเริ่มต้นเล็กน้อย ในขณะที่การตรึงแบคทีเรียในซิลิกาอาศัยเทคนิคการเกาะติดบนพื้นผิวของวัสดุที่มีพื้นที่ผิวและรูพรุนสูง ทำให้มีปริมาณแบคทีเรียเจริญเพิ่มขึ้นในวัสดุได้ดีกว่าการตรึงใน PVA จึงส่งผลต่อการผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้น 0.76 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอล 0.07 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลสูงกว่าแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA (0.51 กรัมต่อลิตร หรือ 0.04 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตเอทานอลได้ดีกว่าแบคทีเรียเซลล์อิสระที่พบปริมาณความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 0.45 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.03 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล หลังจากการหมักด้วยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา ตรวจไม่พบน้ำตาลและสารยับยั้ง ยกเว้น สารประกอบฟีนอลิก โดยกลไกหลักในการลดลงของสารยับยั้ง ได้แก่ การดูดซับไว้ในวัสดุตรึงซิลิกา นอกจากนี้แบคทีเรียตรึงในซิลิกาสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องได้อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของการใช้งานครั้งแรก

<b>Thesis Title</b>	Ethanol production from nipa palm frond using immobilized <i>Clostridium xylanolyticum</i>
<b>Author</b>	Miss Tarawee Taweekarn
<b>Major Program</b>	Environmental Management
<b>Academic Year</b>	2016

### ABSTRACT

Nipa palm (*Nypa fruticans*) is one of the major tropical coastal palm species which grow well in brackish water environments. It is expansively distributed in Asia. Nipa palm residues especially fronds and leaves are abundant and have superior chemical composition that could be exploited as alternative lignocellulosic materials for bioethanol production. This research aimed to study the possibility to use nipa palm fronds (without leaves) and leaves as substrate for ethanol production by *Clostridium xylanolyticum* immobilized either in polyvinyl alcohol (PVA) or on mesoporous silica. After diluted sulfuric acid hydrolysis hydrolyzates derived from untreated fronds contained the highest sugars of 11.43 g/L and gave the highest ethanol production of 0.07 g/L after 7 days of fermentation which was significantly different from all other hydrolyzates ( $p \leq 0.05$ ). Various sugars were found in fronds and leaves hydrolyzates with xylose as dominant sugar, followed by glucose, arabinose, galactose and rhamnose. Besides, the inhibitors generated during acid hydrolysis including acetic acid (1.10-2.87 g/L), furfural (0.13-0.22 g/L), 5-hydroxymethylfurfural (0.02-0.04 g/L) and phenolics (0.02-0.12 g/L) were detected. The optimum bacterial entrapment process was to use 10% PVA together with 7% boric acid (w/v) followed by soaking PVA beads in  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  buffer for 2 hrs, producing round shaped PVA beads without agglomeration. This method could prevent the swelling of beads and increase their mechanical strength. However, the bacterial viability was found to be reduced during the cell entrapment process. Meanwhile, the cell immobilization on mesoporous silica by attachment process led to a higher number of immobilized bacterial cells than that of the PVA. The silica-immobilized bacteria produced higher ethanol concentration (0.76 g/L) and yield (0.07 g ethanol/g sugar) than that of the PVA (0.51 g/L or 0.04 g ethanol/g sugar). These two immobilized bacteria could produce more ethanol than that of the free cells (0.45 g/L or 0.03 g ethanol/g sugar). No sugar and inhibitors except for phenolics were detected after fermentation. The loss of inhibitors was suggested to be mainly due to sorption by silica. Moreover, the silica-immobilized bacteria could maintain their ethanol production activity more than 50% of the initial use throughout repeated application over ten cycles.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดีจากอาจารย์หลาย ๆ ท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรมาศ สุทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรารวรรณ อินทศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาถ่ายทอดความรู้คำแนะนำให้มุมมองแง่คิดรวมถึงช่วยแก้ปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ ในการทำวิจัย ตรวจสอบแก้ไขความถูกต้องเรียบร้อยตลอดจนให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมาจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยระดับอุดมศึกษา จากสำนักงานนโยบายและแผนพลังงานแห่งชาติ กระทรวงพลังงาน

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตลอดจนบุคลากร ที่ช่วยเหลือ และแก้ไขปัญหาในการใช้เครื่องมือตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำงานวิจัย และช่วยเหลือในหลาย ๆ ขั้นตอนของการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวของผู้วิจัยที่สนับสนุนดูแลในทุก ๆ ด้านและเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมาจนทำให้การศึกษาระดับปริญญาโทสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธราวี ทวีกาญจน์



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(12)
รายการภาพ	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 กระบวนการผลิตเอทานอล	5
2.2 การผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส	6
2.3 การผลิตเอทานอลและการใช้ประโยชน์จากต้นจาก	7
2.3.1 ต้นจากและการใช้ประโยชน์	7
2.3.2 พื้นที่ที่มีศักยภาพในการปลูกต้นจาก	9
2.3.3 การผลิตเอทานอลจากต้นจาก	11
2.4 การปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส	15
2.5 สารยับยั้งที่มีผลต่อการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์	18
2.6 การย่อยสลาย (hydrolysis) วัสดุลิกโนเซลลูโลส	21
2.6.1 การย่อยทางเคมี	21
2.6.2 การย่อยด้วยเอนไซม์	21
2.7 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	26
2.7.1 แบคทีเรียจีโนส <i>Clostridium</i>	29
2.7.2 วิธีแม่แทบอลิซิม	30
2.8 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)	33

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	40
3.1 ภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัย	40
3.2 การเตรียมวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล	41
3.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยต่างเจือจาง	42
3.4 การย่อยสลายด้วยกรดเจือจาง	43
3.5 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย	43
3.6 การผลิตเอทานอลโดย <i>C. xyloolyticum</i> จากน้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม	44
3.7 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลเช่นเดียวกับที่พบในไฮโดรไลเสทกากทางไบตันจากโดยแบคทีเรียตรึงซิลิกา	44
3.8 การผลิตเอทานอลโดย <i>C. xyloolyticum</i> จากไฮโดรไลเสททางไบตันจาก	45
3.9 การตรึงแบคทีเรีย	46
3.9.1 การตรึงแบคทีเรียใน PVA	46
3.9.1.1 วิธีการตรึงแบคทีเรียแบบกักขังใน PVA	46
3.9.1.2 ผลของบัพเฟอร์ต่อการบวมตัว (Swelling) ของเม็ดπίท	46
3.9.1.3 ผลของบัพเฟอร์ต่อความแข็งแรง (Strenght) ของเม็ดπίท	47
3.9.2 การตรึงแบคทีเรียในซิลิกา	47
3.9.2.1 การสังเคราะห์ซิลิกา	47
3.9.2.2 วิธีการตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา	48
3.10 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระ	48
3.11 การนำแบคทีเรียตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	50
3.12 การดูดซับของซิลิกาและ EPS ของแบคทีเรีย	50
3.13 วิธีการวิเคราะห์	50
3.13.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของทางไบตันจาก	50
3.13.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารยับยั้ง (Inhibitors)	52
3.13.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาล	52
3.13.4 การวิเคราะห์ปริมาณอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล	52
3.13.5 ศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุตรึงและแบคทีเรียตรึงโดย SEM	53
3.13.6 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียและน้ำหนักเซลล์แห้ง	53

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	55
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของทางไบตันก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง	55
4.2 องค์ประกอบของไฮโดรไลเสทจากทางไบตันจาก	58
4.2.1 ชนิดและปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสท	58
4.2.2 ชนิดและปริมาณสารยับยั้ง (Inhibitors) ในไฮโดรไลเสท	61
4.3 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>C. xylanolyticum</i> จากน้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม	65
4.4 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>C. xylanolyticum</i> จากไฮโดรไลเสททางไบตันจาก	66
4.5 การตรึงแบคทีเรีย <i>C. xylanolyticum</i> ในโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol)	68
4.5.1 การเตรียมเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA	68
4.5.2 ผลของบัพเฟอร์ต่อการบวมตัว (Swelling) ของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA	72
4.5.3 ผลของบัพเฟอร์ต่อความแข็งแรง (Strenght) ของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA	74
4.5.4 ลักษณะพื้นผิวของเม็ดบีด PVA ที่มีและไม่มีแบคทีเรียตรึงรูป	76
4.5.5 ผลของปริมาณแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ต่อการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสท	77
4.6 การตรึงแบคทีเรีย	80
4.6.1 คุณสมบัติของวัสดุตรึงซิลิกา	80
4.6.2 การตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา	81
4.6.3 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา	83
4.6.3.1 ผลของปริมาณแบคทีเรียตรึงในซิลิกาต่อการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของทางไบตันจาก	83
4.6.3.2 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่พบในไฮโดรไลเสทของก้านทางไบตันจากโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา	84
4.7 การผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทก้านทางไบตันจากโดยแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระ	86

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.8 การเปลี่ยนแปลงของสารยับยั้งหลังจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย ตรึงในซิลิกา	89
4.9 การศึกษาประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของแบคทีเรียตรึงในซิลิกา	90
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	93
5.1 สรุปผลการทดลอง	93
5.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจาก	93
5.1.2 องค์ประกอบของไฮโดรไลเสทจากทางใบต้นจาก	93
5.1.3 ประสิทธิภาพของ <i>C. xalanolyticum</i> ในการผลิตเอทานอล	94
5.1.4 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA	94
5.1.5 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา	95
5.1.6 การใช้ซ้ำของแบคทีเรียตรึงในซิลิกา	95
5.2 ข้อเสนอแนะและแนวทางการประยุกต์ใช้	95
บรรณานุกรม	97
ภาคผนวก	108
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	109
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์	114
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี	121
ภาคผนวก ง สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	122
ภาคผนวก จ ข้อมูลดิบจากการทดลอง	124
ประวัติผู้เขียน	140

### รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 2.1	เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของทางใบปาล์มน้ำมัน ลำต้นปาล์มน้ำมัน ทะลายปาล์มเปล่า ไม้เนื้ออ่อน ฟางข้าว หญ้าเนเปีย ก้านทางใบต้นจาก และใบต้นจาก	7
ตารางที่ 2.2	แสดงผลผลิตของแอลกอฮอล์โดยใช้แหล่งวัตถุดิบต่างๆ	11
ตารางที่ 2.3	แสดงปริมาณสารยับยั้งจากการย่อยสลายเอมิเซลลูโลสจากต้นป๊อบลาร์ ด้วยวิธี hydrothermal degradation	20
ตารางที่ 2.4	สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ผลิตเอทานอล	27
ตารางที่ 2.5	ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	28
ตารางที่ 3.1	ชุดตัวอย่างและชุดควบคุมในการศึกษา	49
ตารางที่ 4.1	องค์ประกอบทางเคมีของก้านทางใบและใบต้นจากก่อนและหลัง การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	57
ตารางที่ 4.2	ชนิดและปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างไฮโดรไลสเสทของทางใบต้นจาก ที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์	60
ตารางที่ 4.3	ชนิดและปริมาณสารยับยั้งในไฮโดรไลสเสทก้านทางใบและใบต้นจาก ที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไข	63
ตารางที่ 4.4	แสดงมวลของทางใบและใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพ	64
ตารางที่ 4.5	การฟอร์มตัวของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปที่ใช้ความเข้มข้นของ PVA แตกต่างกันและแช่ในกรดบอริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร	70
ตารางที่ 4.6	การฟอร์มตัวของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปที่ใช้ความเข้มข้นของ PVA แตกต่างกันและแช่ในกรดบอริกความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร	71
ตารางที่ 4.7	ขนาดของเม็ดบีดในน้ำภายหลังจากการแช่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่บัฟเฟอร์	74
ตารางที่ 4.8	ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว CMS และที่ถูกตรึงอยู่ใน PVA และซิลิกาเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน	79
ตารางที่ 4.9	เปรียบเทียบคุณสมบัติของเมโซพอร์ซิลิกา กับคุณสมบัติของ PVA ที่ใช้ เป็นวัสดุตรึง	81

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 4.10	น้ำหนักแห้งเริ่มต้นและจำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่มีการผลิตเอทานอลสูงสุดโดยแบคทีเรียอิสระและแบคทีเรียตรึง 2 ชนิด	88
ตารางที่ 4.11	เปรียบเทียบความเข้มข้นและผลผลิตเอทานอลในไฮโดรไลเสทกับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา	88
ตารางที่ 4.12	ปริมาณสารยับยั้งและน้ำตาลที่เหลืออยู่หลังจากผ่านกระบวนการหมักเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกาและชุดควบคุม	90
ตารางที่ ข.1	เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid	114
ตารางที่ จ.1	ข้อมูลดิบปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง	124
ตารางที่ จ.2	ข้อมูลดิบปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสทใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง	125
ตารางที่ จ.3	ข้อมูลดิบปริมาณสารยับยั้งในไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง	126
ตารางที่ จ.4	ข้อมูลดิบปริมาณสารยับยั้งในไฮโดรไลเสทใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง	127
ตารางที่ จ.5	ข้อมูลดิบความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตโดย <i>C. xylanolyticum</i> จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ซึ่งโดยมีไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	128
ตารางที่ จ.6	ข้อมูลดิบความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตโดย <i>C. xylanolyticum</i> จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ซึ่งมีน้ำตาลผสม 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน	129
ตารางที่ จ.7	ข้อมูลดิบปริมาณน้ำตาลที่ลดลงโดยการใช้ของ <i>C. xylanolyticum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ซึ่งมีน้ำตาลผสม 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน	134
ตารางที่ จ.8	ข้อมูลดิบความเข้มข้นเอทานอลไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง	135
ตารางที่ จ.9	ข้อมูลดิบความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลเสทใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง	136
ตารางที่ จ.10	ข้อมูลดิบความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา	137
ตารางที่ จ.11	ข้อมูลดิบความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA	138

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ จ.12	ข้อมูลดิบความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลสเสททางไบตันจากที่ไม่ผ่าน การปรับสภาพด้วยแบคทีเรียอิสระ และแบคทีเรียตรึง 2 ชนิด	139
ตารางที่ จ.13	ความเข้มข้นเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการใช้ซ้ำ 10 ครั้ง ในไฮโดรไลสเสทก้านทางไบตันจาก	140

### รายการรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 2.1	ไดอะแกรมแสดงกระบวนการผลิตเอทานอล	5
ภาพที่ 2.2	การเปลี่ยนแปลงของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทานอล	6
ภาพที่ 2.3	ป่าจากหรือตงจาก (ก) และไบตันจาก (ข)	8
ภาพที่ 2.4	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของต้นจาก	9
ภาพที่ 2.5	ต้นจากที่ปลูกในนาทุ่งหิ้งร้าง	10
ภาพที่ 2.6	ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานและทางไบตันจาก	13
ภาพที่ 2.7	การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส	15
ภาพที่ 2.8	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) เซลล์ปกติ (a) และสปอร์ (b)	29
ภาพที่ 2.9	วิธีแม่แบบอลิซิมของน้ำตาลกลูโคสโดย <i>C. acetobutylicum</i>	31
ภาพที่ 2.10	Cross-linking process of PVA with tetrahydroxyborate ion	37
ภาพที่ 2.11	Reaction involving PVA, boric acid and sodium sulfate	38
ภาพที่ 2.12	The overall reaction of PVA bead formation with sulfate	38
ภาพที่ 3.1	กอดต้นจากที่มีการแตกแขนงประกอบด้วยทางไบจำนวนมาก (ก) ไบ (ข) และก้านทางไบตันจาก (ค)	41
ภาพที่ 3.2	ก้านทางไบตันจากที่ผ่านการตัด (ก) ก้านทางไบตันจากบดหยาบ (ข) และก้านทางไบตันจากบดละเอียด (ค)	42
ภาพที่ 3.3	ไบตันจากที่ผ่านการตัด (ก) ไบตันจากบดหยาบ (ข) และไบตันจากบดละเอียด (ค)	42
ภาพที่ 4.1	สีและลักษณะของก้านทางไบและไบตันจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ก,ค) และผ่านการปรับสภาพ (ข,ง)	57
ภาพที่ 4.2	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากแบคทีเรีย <i>C. xylanolyticum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ที่มีน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	66
ภาพที่ 4.3	การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย <i>C. xylanolyticum</i> จากไฮโดรไลเสทส่วนต่าง ๆ ของทางไบตันจากโดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลเสทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการ	68



**รายการภาพ (ต่อ)**

<b>รายการภาพ</b>		<b>หน้า</b>
ภาพที่ 4.4	ขนาดเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ที่ผ่านการแช่บัพเฟอร์ 2 ชนิด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาแช่น้ำต่อ 2 ชั่วโมง (ก) และผ่านการแช่ในโซเดียมซัลเฟตบัพเฟอร์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และแช่น้ำต่ออีก 168 ชั่วโมง (ข) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่บัพเฟอร์	73
ภาพที่ 4.5	เม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ที่แช่ในน้ำเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากผ่านการแช่บัพเฟอร์ชนิดต่าง ๆ มาแล้วเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่บัพเฟอร์	73
ภาพที่ 4.6	เปอร์เซ็นต์การแตกหักของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่บัพเฟอร์	76
ภาพที่ 4.7	ลักษณะพื้นผิวของเม็ดบีด PVA ที่ไม่มี (ก) และมี (ข) แบคทีเรียกักขัง อยู่ภายในวัสดุที่กำลังขยาย 5,000 เท่า	77
ภาพที่ 4.8	ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจาก โดยการใช้ <i>C. xylanolyticum</i> ตรึงรูปใน PVA โดยตัวอักษรพิมพ์เล็ก ที่ต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นเอทานอลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ ณ เวลา 12 วัน	78
ภาพที่ 4.9	ลักษณะแบคทีเรียตรึงรูปที่กักขังอยู่ใน PVA ก่อน (ก) และหลัง (ข) การใช้งาน 1 ครั้ง ที่กำลังขยาย 1,000 และ 500 เท่า ตามลำดับ	80
ภาพที่ 4.10	ลักษณะทางกายภาพและขนาดของแบคทีเรียตรึงในซิลิกา (ก) และแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA (ข)	81
ภาพที่ 4.11	ลักษณะพื้นผิวของซิลิกาก่อนตรึงแบคทีเรีย ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (ก) แบคทีเรียที่เกาะอยู่บนพื้นผิวและรูพรุนของเมโซพอร์สซิลิกา ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า (ข) และโครงสร้างของ EPS ที่ผลิตโดยแบคทีเรียเพื่อยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุและกลุ่มเซลล์ ที่กำลังขยาย 30,000 เท่า (ค)	83
ภาพที่ 4.12	ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากโดยแบคทีเรีย <i>C. xylanolyticum</i> ที่ถูกตรึงในซิลิกา โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลเสทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ ณ วันที่ 10 ของการทดลอง	84

**รายการภาพ (ต่อ)**

<b>ภาพที่</b>		<b>หน้า</b>
ภาพที่ 4.13	อัตราการใช้น้ำตาลผสมชนิดต่าง ๆ ในอาหารเหลว CMS และการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงไนซูลิกา	85
ภาพที่ 4.14	ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสระหว่างแบคทีเรียตรึงรูปและแบคทีเรียอิสระ โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลสที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการทดลองต่างๆ	89
ภาพที่ 4.15	ความเข้มข้นเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงรูปบนซิลิกาที่ผ่านการใช้ซ้ำ 10 ครั้งในไฮโดรไลสที่ต่างกันทางไบโต้นจาก โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลสที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการทดลองต่างๆ	92
ภาพที่ 4.16	ลักษณะแบคทีเรียตรึงไนซูลิกาก่อน (ก) และหลังผ่านการใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลจำนวน 10 ครั้ง (ข) ที่กำลังขยาย 2,500 และ 5,000 เท่า ตามลำดับ	92
ภาพที่ ข.1	กราฟมาตรฐานแกลลิก	115
ภาพที่ ข.2	กราฟมาตรฐานน้ำตาลแรมโนส	115
ภาพที่ ข.3	กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส	116
ภาพที่ ข.4	กราฟมาตรฐานน้ำตาลอะราบิโนส	116
ภาพที่ ข.5	กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส	116
ภาพที่ ข.6	กราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตส	117
ภาพที่ ข.7	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	117
ภาพที่ ข.8	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกาแลกโตส	117
ภาพที่ ข.9	กราฟมาตรฐานเอทานอล	118
ภาพที่ ข.10	กราฟมาตรฐานกรดแอสติก	118
ภาพที่ ข.11	กราฟมาตรฐานกรดบิวทริก	119
ภาพที่ ข.12	กราฟมาตรฐานกรดแลกติก	119
ภาพที่ ข.13	กราฟมาตรฐาน 5-HMF	120
ภาพที่ ข.14	กราฟมาตรฐานเฟอร์ฟูรัล	120

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เนื่องจากในปัจจุบันมีความต้องการในการใช้พลังงานเพิ่มสูงขึ้นเพื่อใช้ในการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ จากแผนแม่บทพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี (พ.ศ. 2551-2565) ได้เพิ่มสัดส่วนการใช้พลังงานทดแทนให้ได้ถึง 20.30 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งกำหนดเป้าหมายการส่งเสริมการผลิตเอทานอล 9 ล้านลิตรต่อวัน ในปี พ.ศ. 2565 ซึ่งสามารถลดการพึ่งพาการนำเข้าพลังงานได้มากกว่า 460,000 ล้านบาทต่อปี และสามารถลดก๊าซเรือนกระจกได้อีกประมาณ 42 ล้านตันต่อปี (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2553) วัตถุประสงค์ทางการเกษตรประเภทแป้งและน้ำตาลที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลมีหลายชนิด ได้แก่ อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด และกากน้ำตาล ทำให้เกษตรกรหันมาปลูกพืชเพื่อผลิตพลังงานเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อปริมาณและราคาพืชอาหารที่อาจปรับตัวสูงขึ้นในอนาคต อีกทั้งยังมีผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อมที่ตามมาอันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดิน จากปัญหาเหล่านี้จึงมีการแสวงหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ในการนำไปผลิตเอทานอลแทนการใช้พืชอาหารแบบเดิม การใช้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางเนื่องจากราคาถูกและหาได้ง่าย (Balat, 2011) โดยเฉพาะวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด (Lei *et al.*, 2014) ชานอ้อย (Asgher *et al.*, 2013) ฟางข้าว (Qureshi *et al.*, 2008) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวัสดุเหลือใช้จากพืชเศรษฐกิจพลังงานหลักทางภาคใต้ ได้แก่ ทางใบปาล์มน้ำมัน (Prawitwong *et al.*, 2012; Kristiani *et al.*, 2013; Ofori-Boateng and Lee, 2014) และเส้นใยปาล์มน้ำมัน (Boonsawang *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวัสดุเศษเหลือจากพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีศักยภาพในการนำไปผลิตเอทานอลนอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการพัฒนาพืชพลังงานที่ยั่งยืนในอนาคตได้

ต้นจาก (*Nypa fruticans*) เป็นพืชชนิดหนึ่งในตระกูลปาล์ม ที่มีอายุยืนยาวนานนับร้อยปีหลังการปลูก มีศักยภาพสูงในการผลิตน้ำหวาน จัดเป็นพืชท้องถิ่นที่พบได้ทั่วไปบริเวณเขตร้อนเจริญได้ดีบริเวณชายฝั่งที่มีน้ำกร่อย บริเวณดินกร่อย หรือดินเค็มที่ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ มีรายงานว่าน้ำหวานต้นจากสามารถให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชพลังงานอื่น ๆ โดยสามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 1,037 – 2,496 ลิตรต่อไร่ต่อปี (Hamilton and Murphy, 1988) อย่างไรก็ตามน้ำหวานจากมีการนำไปใช้แปรรูปเป็นน้ำตาลจาก ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำหวานอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการในระยะยาว ดังนั้นการใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลสจากส่วนต่าง ๆ ของต้นจากสำหรับการผลิต

เอทานอลจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ จากการศึกษาของค้ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากพบว่า ปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสมีค่าใกล้เคียงกับชานอ้อย ชังข้าวโพด และทางใบปาล์มน้ำมัน จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพหรือสารเคมีได้เป็นอย่างดี (Tamunaidu and Saka, 2011; Kristiani *et al.*, 2013) การนำวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจากต้นจากมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอลถือเป็นทางเลือกที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาพลังงานและสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน เนื่องจากการปลูกต้นจากเป็นพืชพลังงานใหม่ยังเป็นแนวทางในการบำบัดฟื้นฟูพื้นที่ดินเสื่อมโทรม ที่ไม่สามารถปลูกพืชอาหารได้ เช่น พื้นที่นาทุ่งและนาข้าวทิ้งร้าง หรือที่ราบลุ่มดินเค็มจัดจากป่าชายเลน เนื่องจากต้นจากมีศักยภาพในการดูดซึมเกลือได้สูง โดยปัจจุบันมีการรณรงค์ให้ประชาชนในพื้นที่ชายฝั่งปลูกต้นจากเพิ่มมากขึ้นเพื่อปรับปรุงพื้นที่เกษตรกรรมที่มีดินเสื่อมโทรมไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ ต้นจากจึงกลายเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของลุ่มน้ำปากพนังที่สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรในชุมชนได้เป็นอย่างดี (นพรัตน์ บำรุงรัตน์, 2554)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีทั้งยีสต์และแบคทีเรีย มีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถให้ผลผลิตเอทานอลสูงและรวดเร็วกว่าการหมักด้วยยีสต์ประมาณ 5 เท่า เมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลเท่ากัน (Lin and Tanaka, 2006) แบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium xyloxyticum* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ทั้งน้ำตาลคาร์บอน 6 และน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ กลูโคส และไซโลส (ประภัสสร เหลืองศิริวุฒิ และภิมวีจัน วัจนาคมกุลม, 2556) และให้ผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงค่าทฤษฎี อย่างไรก็ตามในระหว่างกระบวนการปรับสภาพและการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสก่อให้เกิดสารยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ ได้แก่ สารประกอบจำพวกฟีนอลิก (Phenolics) ฟูแรน (Furan) และกรดอ่อน (Weak acids) รวมทั้งความเข้มข้นของเอทานอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการกระบวนการหมักอาจส่งผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียบางชนิดจะทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นได้สูงกว่ายีสต์ (Lin and Tanaka, 2006) งานวิจัยนี้จึงสนใจปรับปรุงกระบวนการหมักโดยการใช้เทคนิคการตรึงแบคทีเรีย *C. xyloxyticum* โดยการใช้การตรึงแบบกักขัง (Entrapment) และแบบเกาะติด (Attachment/adsorption) ในวัสดุสังเคราะห์ 2 ชนิด เปรียบเทียบกัน ได้แก่ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นวัสดุที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงจุลินทรีย์สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีความคงทนและไม่เป็นพิษกับจุลินทรีย์ (Takei *et al.*, 2011) และวัสดุอีกชนิดหนึ่ง คือ ซิลิกา ซึ่งเป็นวัสดุที่มีพื้นที่ผิวและรูพรุนสูง มีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี สามารถใช้งานได้ในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้าง มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกไม่บวมน้ำ จึงสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดี และที่สำคัญค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ไม่แพง อีกทั้งช่วยเก็บรักษาเซลล์และเอนไซม์ในซิลิกาได้เป็นระยะเวลานาน และปราศจากการปนเปื้อน ป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ (Khongkhaem *et al.*, 2011) ซึ่งช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัว

เชื้อใหม่ ทั้งนี้การตรึงเซลล์จะช่วยเพิ่มความทนทานของเซลล์แบคทีเรียต่อสภาวะยับยั้งที่กล่าวมาแล้ว และเพื่อประโยชน์ในการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ รวมถึงเซลล์ตรึงยังช่วยลดการปนเปื้อน สามารถแยกผลผลิตออกมาได้ง่าย ช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียร และทำงานได้ดีขึ้นตลอดจนช่วยลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการแยกเซลล์อีกด้วย (Chandel *et al.*, 2007; Wirawan *et al.*, 2012)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาศักยภาพของไฮโดรไลสของส่วนต่าง ๆ ของทางใบต้นจาก ได้แก่ ก้านทางใบ และใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *C. xylanolyticum*

1.2.2 เพื่อศึกษากระบวนการตรึงแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ในวัสดุสังเคราะห์ 2 ชนิด ได้แก่ การตรึงแบบกักขังในโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และการตรึงแบบเกาะติดในซิลิกา

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสของก้านทางใบต้นจากโดยแบคทีเรียตรึง *C. xylanolyticum* ในวัสดุทั้ง 2 ชนิด และความเป็นไปได้ในการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้สนใจการผลิตเอทานอลจากทางใบต้นจาก โดยการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีในส่วนต่าง ๆ ของทางใบต้นจาก 2 ส่วน ได้แก่ ทางใบต้นจากที่เอาใบออกทั้งหมดและส่วนเฉพาะใบต้นจาก โดยทำการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไข ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของทางใบต้นจาก ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จากนั้นทำการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางวิเคราะห์ชนิด ปริมาณน้ำตาล และสภาวะยับยั้งที่เกิดขึ้นในไฮโดรไลส และทำการหมักด้วยแบคทีเรียอิสระของ *C. xylanolyticum* เพื่อเลือกวัตถุดิบที่มีศักยภาพสูงสุดในการผลิตเอทานอลต่อไป โดยใช้แบคทีเรียตรึงรูปในวัสดุตรึง 2 ชนิด ได้แก่ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ และเมโซพอร์รัสซิลิกา โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลและผลผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงรูปเปรียบเทียบกับหมักด้วยแบคทีเรียอิสระ รวมทั้งศึกษาการใช้ซ้ำของแบคทีเรียตรึง

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีของส่วนต่าง ๆ ของทางใบต้นจาก ได้แก่ ทางใบต้นจากที่เอาใบออกทั้งหมด และใบต้นจาก

1.4.2 ทำให้ทราบถึงวัสดุและกระบวนการตรึงแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ที่เหมาะสมในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลปริมาณมากที่สุด

1.4.3 ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของแบคทีเรียตรึง *C. xylanolyticum* ที่ใช้ในการหมักเอทานอลซึ่งช่วยลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่

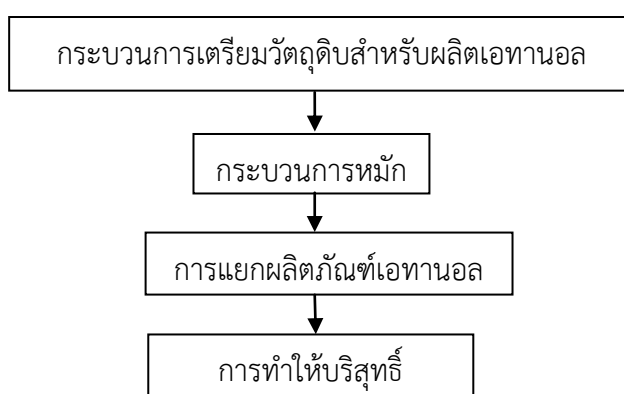
1.4.4 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เพื่อผลิตพลังงานทดแทนที่ช่วยลดการพึ่งพาและนำเข้าเชื้อเพลิงฟอสซิล

## บทที่ 2

### ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลประกอบด้วยกระบวนการเตรียมวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล กระบวนการหมัก กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอล และกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 2.1) ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบนั้น ถ้าเป็นประเภทแป้งหรือเซลลูโลส เช่น มันสำปะหลังและธัญพืช จะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยแป้งหรือเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลก่อน ด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์ ส่วนวัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น กากน้ำตาลหรือน้ำอ้อย เมื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมแล้ว สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมัก และจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่จะนิยมใช้ยีสต์ การเลือกใช้ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบที่นำมาหมัก จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักโดยเอทานอลที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 8-12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักจะนำมาแยกเอทานอลออกโดยใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้นจึงเข้าสู่กรรมวิธีในการแยกน้ำโดยใช้โมเลกุลาร์ซีฟ (molecular sieve separation) ทำให้เอทานอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ 99.50 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อใช้ในรถยนต์เครื่องยนต์เบนซินได้



ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิตเอทานอล

ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2552)

## 2.2 การผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตเอทานอล แบ่งเป็น 3 ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด และอื่น ๆ และวัตถุดิบประเภทสุดท้าย คือ วัตถุดิบประเภทวัสดุลิกโนเซลลูโลส แต่เนื่องด้วยมีข้อจำกัดของวัตถุดิบ 2 ประเภทแรกนั้น เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์ ซึ่งหากมีความต้องการในการนำมาใช้ในด้านพลังงานเพิ่มมากขึ้น อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณและราคาของอาหารที่อาจปรับตัวเพิ่มสูงขึ้นในอนาคต อีกทั้งอาจส่งผลกระทบในด้านสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดิน ดังนั้นวัตถุดิบประเภทวัสดุลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีปริมาณมากและไม่ได้เป็นพืชอาหารของมนุษย์ จึงมีความเหมาะสมมากในการนำมาผลิตเอทานอล ซึ่งวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีความซับซ้อน สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบโดยการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ (Balat, 2011) จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลต่อไป โดยการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยขั้นตอนหลัก ๆ คือ การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment) เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพื่อให้เอนไซม์กรด และจุลินทรีย์ เข้าไปย่อยได้ง่ายขึ้น การย่อยสลาย (Hydrolysis) เป็นการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสให้น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ ไซโลส อะราบินอส และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ กลูโคส เป็นต้น ขณะที่การเปลี่ยนเซลลูโลสจะให้น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ส่วนขั้นตอนในการหมักเป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (ภาพที่ 2.2) (เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ และคณะ, 2548)



ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทานอล

ที่มา : (เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ และคณะ, 2548)



วัสดุลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นวัตถุดิบเชื้อเพลิงรุ่นที่สอง (Second generation) ที่สำคัญซึ่งเข้ามามีบทบาทอย่างมากในปัจจุบัน และเนื่องจากพืชแต่ละชนิดก็จะมีสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน แตกต่างกันซึ่งแสดงตารางเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของพืชแต่ละชนิด (ตารางที่ 2.1)

**ตารางที่ 2.1** เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของทางใบปาล์มน้ำมัน ลำต้นปาล์มน้ำมัน ทะลายปาล์มเปล่า ไม้เนื้ออ่อน ฟางข้าว หญ้าเนเปีย ก้านทางใบต้นจาก และใบต้นจาก

วัสดุลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)	อ้างอิง
ลำต้นปาล์ม	41.02	29.12	24.51	Ang <i>et al.</i> (2013)
ทะลายปาล์มเปล่า	41.30-46.50	25.30-33.80	27.60-32.50	Kim and Kim. (2013)
ไม้เนื้ออ่อน	18.00-38.00	15.00-33.00	30.00-60.00	Balat (2011)
ไม้เนื้อแข็ง	22.00-40.00	20.00-38.00	30.00-55.00	Balat (2011)
ฟางข้าว	39.00-47.00	26.00-31.00	3.00-5.00	Balat (2011)
หญ้าเนเปีย	31.52	24.50	4.18	Lin <i>et al.</i> (2011)
ก้านทางใบต้นจาก	35.10	26.4	17.8	Tamunaidu and Saka (2011)
ใบต้นจาก	28.90	23.60	32.0	Tamunaidu and Saka (2011)

## 2.3 การผลิตเอทานอลและการใช้ประโยชน์จากต้นจาก

### 2.3.1 ต้นจากและการใช้ประโยชน์

ต้นจาก (*Nypa fruticans*) เป็นพืชจำพวกปาล์มที่จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Nypoideae ซึ่งเป็นปาล์มเพียงชนิดเดียวที่เป็นพืชในป่าชายเลน และมีลำต้นอยู่ใต้ดินนับเป็นพืชเก่าแก่มาช้านาน ต้นจากพบได้ทั่วไปในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งในบริเวณน้ำจืดและน้ำกร่อยที่มีน้ำเค็มขึ้นถึง มักจะขึ้นเป็นดงขนาดใหญ่ เรียกว่า ป่าจากหรือดงจาก (ภาพที่ 2.3ก) ต้นจากสามารถเติบโตได้ดีในดินโคลนตามป่าชายเลนหรือบริเวณริมคลองที่มีไม้ให้ร่มเงาปะปนอยู่ด้วย มักอยู่ในช่วงที่มีน้ำจืดและน้ำกร่อยปนกันแต่บนบกที่น้ำท่วมถึงก็พบต้นจากได้บ้างเช่นกัน หากดินไม่แห้งแล้งนานจนเกินไป โดยพบในธรรมชาติแถบอินโดนีเซีย ปาปัวนิวกินี ฟิลิปปินส์ และมาเลเซีย โดยประมาณ 48,000-420,000 ไร่

(Jabatan *et al.*, 2009) และพบในธรรมชาติส่วนใหญ่ใน 4 จังหวัด ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัด นครศรีธรรมราชซึ่งพบมากที่สุด ประมาณ 10,652.10 ไร่ รองลงมา จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัด ชุมพร และจังหวัดสงขลา โดยมีพื้นที่ในแต่ละจังหวัดประมาณ 3,081.90 ไร่ 1,365 ไร่ และ 340.63 ไร่ ตามลำดับ (นพรัตน์ บำรุงรัตน์, 2556)

ต้นจากซึ่งเป็นพืชที่คนไทยรู้จักมานานและใช้ประโยชน์จากต้นจากได้เป็นอย่างดีตั้งแต่โบราณถึง ผล สามารถแบ่งเป็น 2 รูปแบบใหญ่ ๆ คือ การใช้ประโยชน์จากส่วนใบและการใช้ประโยชน์จากช่อดอกและทะลาย ใบจากมีลักษณะคล้ายใบมะพร้าว (ภาพที่ 2.3ข) แต่มีความเหนียวและกว้างกว่าทำให้สามารถใช้นำมาเย็บเป็นตับ เรียกว่า ตับจาก แล้วนำไปมุงหลังคาและทำฝาบ้านกันแดดกันฝนได้เป็นอย่างดี แม้ว่าจะใช้งานไปนานใบจากกรอบเปลี่ยนจากสีเขียวเข้ม เป็นสีเหลืองสีน้ำตาลกระทั่งเกือบเป็นสีดำแต่ก็ยังคงกันฝนและแดดได้จนกว่าจะแห้งกรอบและผุไป ใบอ่อนใช้ทำหมวก เรียกว่า เปี้ยว และใบจากอ่อนตากแห้งใช้มวนยาสูบ ห่อขนมต้ม ทำที่ตักน้ำ เรียกว่า หมาจาก ตอกบิดเสวียน หม้อ ใช้ห่อขนมจากซึ่งเป็นขนมที่ทำจากแป้งน้ำตาลและมะพร้าวผสมกันจนเหลวได้ที่แล้วนำห่อด้วยใบจากปิ้งบนไฟจนมีกลิ่นหอมอาจมีการใช้ใบมะพร้าวมาห่อแต่ก็ไม่อร่อยเท่าใช้ใบจาก ใบจากใช้ต้มน้ำดื่มแก้อาการท้องร่วงได้ ในหมู่เกาะโรตีและชาวูไซใบจากเป็นอาหารหมูเพื่อให้เนื้อหมูมีรสหวาน ส่วนทางใบนำมาใช้ประโยชน์เป็นส่วนประกอบในไฟเบอร์บอร์ด และเป็นส่วนประกอบในการผลิตกระดาษ ส่วนช่อดอกและทะลายนำน้ำหวานจากก้านช่อดอกหรือทะลายต้นจากมาทำน้ำตาล น้ำส้มสายชู เครื่องดื่ม (น้ำตาลใส) และแอลกอฮอล์ ผลจากแห้งนำมาเป็นเชื้อเพลิง (ภาพที่ 2.4) จึงเรียกได้ว่าต้นจากเป็นพืชคู่ชีวิตของคนที่ย้ายบริเวณชายฝั่ง (นพรัตน์ บำรุงรัตน์, 2544)



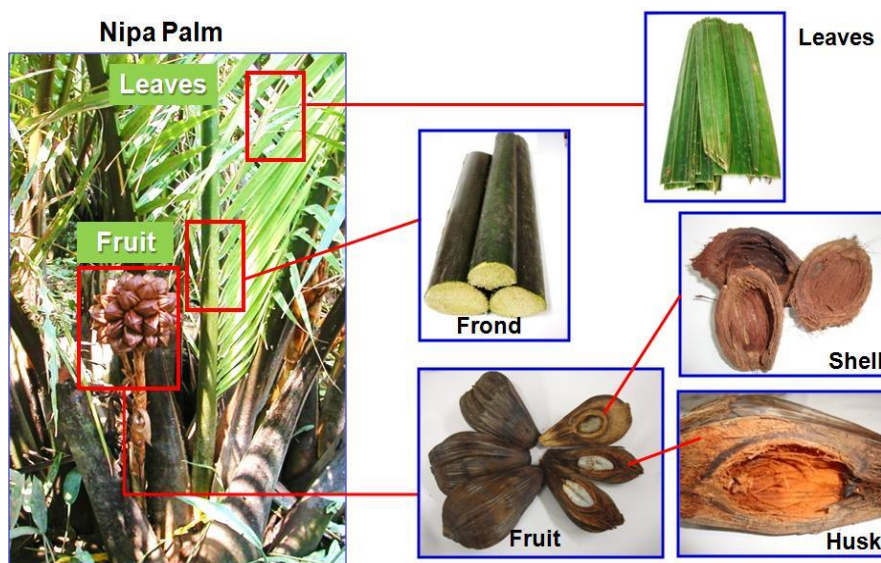
ก



ข

ภาพที่ 2.3 ป่าจากหรือดงจาก (ก) และใบต้นจาก (ข)

ที่มา : กรีนเนอรัลด์ (2556)



ภาพที่ 2.4 ส่วนประกอบต่างๆ ของต้นจาก

ที่มา : Tamunaidu and Saka (2011)

### 2.3.2 พื้นที่ที่มีศักยภาพในการปลูกต้นจาก

ในระยะเวลาเกือบ 20 ปีที่ผ่านมา พื้นที่ที่เคยมีต้นจากเจริญเติบโตประมาณ 20,000 ไร่ ที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ถูกเปลี่ยนไปเป็นนาทุ่งซึ่งทำรายได้ให้คนในท้องถิ่นมากกว่าในขณะนั้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันนาทุ่งนับล้านไร่ที่จังหวัดนครศรีธรรมราชและสงขลากำลังเป็นพื้นที่ที่ถูกทิ้งร้างไม่สามารถใช้ประโยชน์ในทางเกษตรกรรมได้เนื่องจากดินมีความเค็มและต้องใช้เวลาอีกหลายสิบปีจึงจะสามารถเพาะปลูกพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจได้อีกครั้งหนึ่ง จากการศึกษาของ นพรัตน์ บำรุงรัตน์ (2556) โดยการประเมินพื้นที่ที่มีศักยภาพในการปลูกต้นจาก นอกเหนือจากการเจริญเองตามธรรมชาติซึ่งมีพื้นที่ใน 4 จังหวัด ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสงขลา จังหวัดชุมพร และจังหวัดสุราษฎร์ธานี จากการทดลองปลูกต้นจากในนาทุ่งทิ้งร้างที่ตำบลขนานนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่าหลังปลูกกล้าได้ 6 เดือน (ภาพที่ 2.5ก) กล้าจะมีอัตราการรอดตายเกิน 75 เปอร์เซ็นต์ (นพรัตน์ บำรุงรัตน์, 2540) ต้นจากที่ปลูกเมื่ออายุ 4-7 ปี สามารถให้น้ำตาลได้วันละประมาณ 25 กิโลกรัม ต่อพื้นที่ปลูก 2 ไร่ ทำให้เกษตรกรผู้ปลูกมีรายได้วันละประมาณ 1,000 บาท ซึ่งสร้างรายได้ได้เป็นอย่างดี และต้นจากสามารถแตกกอ มีอายุยืนยาวนานนับร้อยปี ดังนั้นการที่นำต้นจากไปปลูกทดแทนในพื้นที่นาทุ่งทิ้งร้าง (ภาพที่ 2.5ข) ที่มีอยู่ทั่วไปในแถบจังหวัดสงขลา สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราชในขณะนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะประสบผลสำเร็จ ซึ่งการใช้ประโยชน์พื้นที่นาทุ่งทิ้งร้างเพื่อปลูกต้นจากทดแทนในตำบลขนานนาก เป็นแบบอย่างในการบำบัด

พื้นที่ชุ่มน้ำที่เสื่อมโทรมจากนาุ้งทิ้งร้าง เนื่องจากเป็นพื้นที่ซึ่งไม่สามารถเพาะปลูกพืชทางเศรษฐกิจชนิดอื่นได้ในระยะเวลาหลายสิบปี โดยต้นจากเป็นพืชที่มีความสามารถดูดเกลือได้ดี ดังนั้นแนวคิดในการใช้ประโยชน์จากพื้นที่นาุ้งทิ้งร้างโดยการปลูกต้นจากทดแทนซึ่งเป็นพืชดั้งเดิมที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่น อีกทั้งเป็นพืชที่มีคุณค่าต่อสิ่งแวดล้อมและเศรษฐกิจ จึงเป็นแนวทางสู่การพัฒนาพลังงานและสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน (นพรัตน์ บำรุงรัตน์, 2544) โดยประเทศจะสามารถผลิตพลังงานจากต้นจากบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยได้อย่างเพียงพอโดยไม่ต้องไปแย่งพืชอาหารชนิดอื่น หากมีการจัดการที่ดีก็จะมีเอทานอลเพียงพอสำหรับสนับสนุนแผนพลังงานแห่งชาติในปี พ.ศ.2565 โดยพบพื้นที่ที่มีศักยภาพในการปลูกต้นจากทั้งหมด 1,743,751.02 ไร่ เป็นพื้นที่ที่มีศักยภาพสูงในการปลูกต้นจาก 1,052,287.09 ไร่ ทั้งนี้ความสามารถในการผลิตเอทานอลของต้นจากโดยเฉลี่ยต่ำสุดประมาณ 1,037 ลิตรต่อไร่ต่อปี ซึ่งพื้นที่ที่มีศักยภาพของจังหวัดนครศรีธรรมราชเพียงจังหวัดเดียว อาจจะมีผลิตเอทานอลได้ 11,046,227 ลิตรต่อปี แต่หากคำนวณจากพื้นที่ที่มีศักยภาพปลูกต้นจากทั้งหมดจะมีความสามารถผลิตเอทานอลได้ 804,379,123 ลิตรต่อปี ทั้งนี้พื้นที่ดังกล่าวต้องปลูกต้นจากเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งแอลกอฮอล์ที่เป็นผลผลิตหนึ่งของต้นจากสามารถเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกได้อย่างดีในยามขาดแคลนพลังงาน



ก



ข

ภาพที่ 2.5 ต้นจากที่ปลูกในนาุ้งทิ้งร้าง  
ที่มา : นพรัตน์ บำรุงรัตน์ (2540)

### 2.3.3 การผลิตเอทานอลจากต้นจาก

น้ำหวานจากต้นจากเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ทำให้แอลกอฮอล์ต่อไร่สูง เมื่อเทียบกับพืชอื่น (ตารางที่ 2.2) จะเห็นได้ว่าต้นจากสามารถเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ที่ดีกว่ามะพร้าว มันสำปะหลัง และอ้อย ดังนั้นหากได้รับการพัฒนาที่เหมาะสมอาจใช้เป็นเชื้อเพลิงในยามขาดแคลนได้เป็นอย่างดี (นพรัตน์ บำรุงรัตน์, 2544) มีรายงานของ Tamunaidu *et al.* (2011) ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบ ศักยภาพในการผลิตเอทานอลระหว่างน้ำหวานจากต้นจากกับน้ำหวานจากอ้อย โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในกระบวนการหมักเอทานอล พบว่าน้ำหวานจากต้นจากให้ผลผลิตของเอทานอลเท่ากับ 0.42 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งมีศักยภาพใกล้เคียงน้ำหวานจากอ้อยโดยให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

ตารางที่ 2.2 แสดงผลผลิตของแอลกอฮอล์โดยใช้แหล่งวัตถุดิบต่างๆ

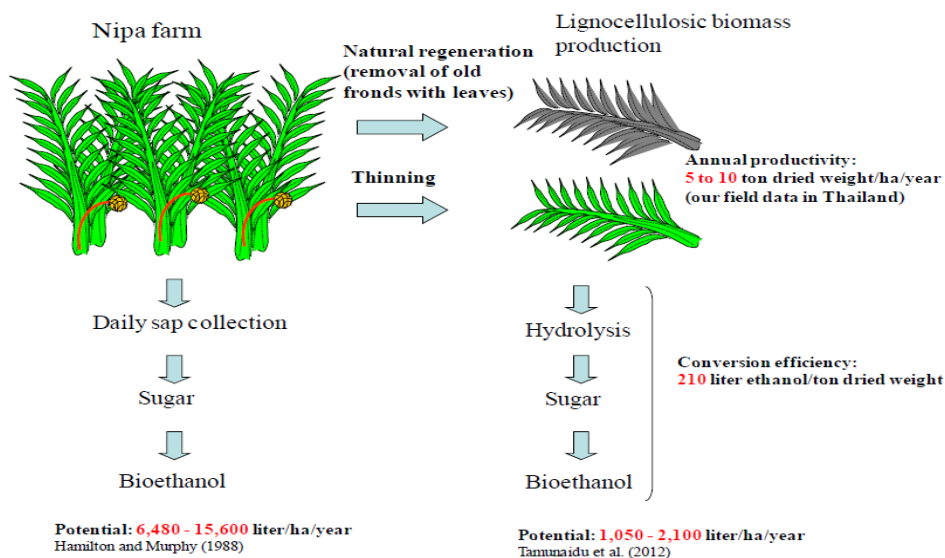
แหล่งวัตถุดิบ	ผลผลิต (ลิตรต่อไร่ต่อปี)
มันเทศ	1080 – 2880
น้ำหวานจาก	1037 – 2496
มะพร้าว	800
มันสำปะหลัง	518 – 1382
อ้อย	536 – 1072

ที่มา : Hamilton and Murphy (1988)

การผลิตเอทานอลจากต้นจากมีการผลิตจากส่วนประกอบหลัก 2 ส่วน คือ ส่วนน้ำหวานของต้นจากและส่วนทางใบของต้นจาก ซึ่งส่วนน้ำหวานของต้นจากสามารถผลิตได้ง่ายกว่าส่วนของทางใบของต้นจาก ซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสเนื่องจากมีขั้นตอนไม่ซับซ้อน น้ำหวานจากต้นจากสามารถนำมาผลิตเอทานอลโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการที่ซับซ้อนง่ายในการผลิตและสามารถผลิตได้ถึง 1,037-2,496 ลิตรต่อไร่ต่อปี (Hamilton and Murphy, 1988) แต่มีข้อจำกัด เนื่องจากน้ำหวานจากต้นจากเป็นอาหารของมนุษย์ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น บริโภคในครัวเรือน นำมาทำน้ำส้มสายชู น้ำตาลจาก รวมถึงสุราขาว จึงอาจไม่เพียงพอในการผลิตเอทานอลในระยะยาว จึงสนใจส่วนอื่นจากต้นจากที่เป็นวัสดุเศษเหลือซึ่งมีปริมาณมากและสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ในระยะยาว

ทางใบต้นจากจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาผลิตเอทานอล โดยทางใบของต้นจากถือเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่มีปริมาณมากยังไม่มีนำมาใช้ประโยชน์มากนัก และมีประสิทธิภาพในการนำมาผลิตเอทานอล จากรายงานที่ผ่านมาพบว่ามีทางใบต้นจากในบริเวณสวนจากตำบลขนานนาก อำเภอบางบาล จังหวัดนครศรีธรรมราช ถูกตัดแต่งทางใบทิ้งปีละประมาณ 0.8-1.6 ตันน้ำหนักแห้งต่อไร่ต่อปี และสามารถผลิตเอทานอลได้ 168-336 ลิตรต่อไร่ต่อปี (Tamunaidu *et al.*, 2012) ซึ่งการผลิตเอทานอลจากทางใบต้นจากมีขั้นตอนซับซ้อนกว่าการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานต้นจากซึ่งต้องผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้นก่อนผ่านกระบวนการย่อยสลายหรือไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสในทางใบต้นจากเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนนำไปหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ เอทานอล ซึ่งมีขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานต้นจากและทางใบต้นจาก (Tamunaidu *et al.*, 2012) (ภาพที่ 2.6) และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากที่พบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่ามีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 35.10, 26.40 และ 17.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Tamunaidu and Saka, 2011) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับทางใบปาล์มน้ำมันซึ่งพบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ประมาณ 40.01, 30.78 และ 29.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Kristiani *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณโฮโลเซลลูโลส (holocellulose) ในชานอ้อยโดยพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 65.00 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยมวล และซังข้าวโพดปริมาณ 66.70 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยมวล (Raveendran *et al.*, 1995; Rabemanolontsoa *et al.*, 2011) ดังนั้นวัสดุลิกโนเซลลูโลสจากต้นจากจึงมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับทำเชื้อเพลิงชีวภาพและสารเคมี ทั้งนี้นอกจากเป็นวิธีการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรแล้ว ยังเป็นแนวทางในการจัดการด้านสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน เนื่องจากต้นจากสามารถใช้เป็นพืชในการบำบัดฟื้นฟูพื้นที่ดินเสื่อมโทรมจากนาุ้งทิ้งร้างได้เป็นอย่างดี





ภาพที่ 2.6 ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานและทางใบต้นจาก

ที่มา : Tamunaidu *et al.* (2012)

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลจากต้นจากและองค์ประกอบทางเคมีจากต้นจาก มีดังนี้

Matsui *et al.* (2014) ศึกษาความสัมพันธ์ปัจจัยการผลิตน้ำหวานของต้นจากในฟาร์มต้นจากอำเภอปากพอง จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 5 ฟาร์ม โดยศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินในฟาร์มต้นจาก ซึ่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินจำนวน 80 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างดินอธิบายถึงปัจจัยที่กำหนดคุณภาพของต้นจาก ดังนั้น สารอินทรีย์ เกลือ และน้ำกร่อย ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถกำหนดคุณสมบัติของดิน โดยการผลิตน้ำหวานรายวัน Daily sap production (DSP) คิดเป็นมิลลิลิตรต่อวัน ก็สามารถอธิบายได้เป็นอย่างดีจากชีวมวลทางใบต้นจาก (biomass) ซึ่งคำนวณจากสมการ  $DSP = 17.6 \times \text{frond biomass (kg)} + 256.1$  ( $r^2 = 0.48$ ) and  $DSP = 11.4 \times \text{above-ground biomass (t/ha)} + 263.4$  ( $r^2 = 0.57$ ) ตามลำดับ ซึ่งคุณสมบัติดินที่ดีส่งผลต่อผลผลิตน้ำหวานจากที่ดี สามารถอธิบายโดยการวิเคราะห์ตัวแปรตามด้วย PCA กับสมการ  $DSP = 609.7 - 92.9 \times PC1 - 58.5 \times PC2$  ( $R^2 = 0.93$ ) ที่เป็น PC1 และ PC2 สอดคล้องกับปัจจัยอินทรีย์วัตถุและปัจจัยปริมาณเกลือ ซึ่งต้นจากจะสามารถผลิตน้ำหวานได้นั้นจะถูกควบคุมจากการเจริญเติบโตของต้นจากและปริมาณโซเดียมในดิน

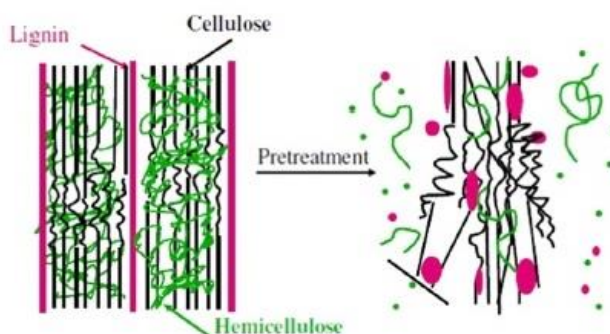
Tamunaidu and Saka (2011) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่าง ๆ ของต้นจาก เพื่อการใช้ประโยชน์ชีวมวลจากต้นจากเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและสารเคมี ต้นจากประกอบด้วยทางใบ (frond) เปลือก (shell) แกลบ (husk) และใบ (leaf) มีลักษณะเฉพาะทางเคมี เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน แป้ง โปรตีน และองค์ประกอบอนินทรีย์ ในแต่ละส่วนขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่ในช่วง 28.90-45.60 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยมวล และ 21.80-26.40 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยมวล ตามลำดับ เฮมิเซลลูโลสอุดมด้วย glucuronoxylan และลิกนินอยู่ในช่วง 19.40-33.80 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยมวล ซึ่งพบลิกนินสูงสุดในใบต้นจาก ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชันด้วยต่าง nitrobenzene แสดงให้เห็นชนิดของลิกนินในทางใบต้นจาก ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย guaiacyl และ syringyl propane ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ *p*-hydroxyphenylpropane นอกจากองค์ประกอบหลักทางเคมี แป้ง และโปรตีน ปริมาณ 2-8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ปริมาณเถ้าสูง 5.10-11.70 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยมวล ประกอบด้วยองค์ประกอบที่สำคัญเป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม และคลอไรด์ และพบสารอนินทรีย์ที่มีปริมาณน้อย ได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม ซิลิกา ฟอสฟอรัส กำมะถัน และอะลูมิเนียม โดยรวมแต่ละส่วนของต้นจากมีลักษณะที่โดดเด่น และมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและสารเคมีได้เป็นอย่างดี

Tamunaidu *et al.* (2011) ศึกษาจุดเริ่มต้นในการประเมินศักยภาพการผลิตน้ำหวานจากต้นจาก โดยน้ำหวานจากถือเป็นวัตถุดิบที่ยั่งยืนสำหรับการผลิตเอทานอล และสามารถจัดการเป็นพื้นที่เพาะปลูกใน 4 พื้นที่ ซึ่งเป็นทางเลือกสำหรับการศึกษารุ่นนี้ เนื่องจากต้นจากมีอายุ 8-100 ปี จากการศึกษาพบว่ามีความสามารถในการผลิตน้ำหวาน 0.4-1.2 ลิตรต่อวัน ต้นจากมีลักษณะทางเคมีที่เฉพาะ โดยสามารถให้น้ำหวานได้ ซึ่งพบชนิดน้ำตาลหลัก ๆ ในน้ำหวานจาก ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส นอกจากนี้พบแร่ธาตุต่าง ๆ ในสัดส่วน 5 กรัมต่อกิโลกรัมของสารอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม และคลอไรด์ เป็นองค์ประกอบหลักของสารอนินทรีย์ และจากการศึกษาพบว่าการหมักโดยการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลภายใน 30-48 ชั่วโมง ในสภาพที่มีและไม่มีคาร์บอนเสริมอาหาร นอกจากนี้แนวโน้มการหมักน้ำหวานจากมีความใกล้เคียงกับน้ำหวานจากอ้อย ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงถึง 95.50 และ 96.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าในองค์ประกอบสารอนินทรีย์ก่อนและหลังการหมักมีปริมาณแร่ธาตุซึ่งเป็นสารอาหารเสริม ได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส และซิลิกา ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากลักษณะทางเคมีและระบบการหมักเอทานอลที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ความหนาแน่นในการปลูกโดยมีความหนาแน่น 1,000 ต้นต่อเฮกตาร์ จะให้น้ำหวานอยู่ในช่วง 4,550-9,100 ลิตรต่อเฮกตาร์ต่อปี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำหวานจากเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้เป็นอย่างดี



## 2.4 การปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส

กระบวนการการปรับสภาพวัตถุดิบ คือ การเปลี่ยนหรือกำจัดโครงสร้างและองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เป็นสิ่งกีดขวางต่อกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส (ภาพที่ 2.7) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยให้ดีขึ้นและผลที่ได้คือผลผลิตน้ำตาลเพิ่มขึ้น ดังนั้นการปรับสภาพจึงถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งวัตถุประสงค์ของกระบวนการปรับสภาพ คือ กำจัดลิกนินและลดโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส เพิ่มพื้นที่ผิวเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนให้กับวัตถุดิบ เพื่อให้กรดหรือเอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ง่ายขึ้น โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอลโดยผ่านกระบวนการหมักต่อไป



ภาพที่ 2.7 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : Khoo *et al.* (2015)

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีการทางกายภาพ วิธีการทางกายภาพเคมี วิธีการทางเคมี และวิธีการทางชีวภาพ ซึ่งการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิด ในแต่ละวิธีมีหลักการที่แตกต่างกันดังนี้ (Balat, 2011)

### (1) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment)

เป็นวิธีการปรับสภาพเบื้องต้นของวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการต่าง ๆ ที่ไม่ใช่สารเคมี เช่น การสับ การบด การขัดสี การฉายรังสี และการอัดรีด ทั้งนี้เพื่อลดขนาดของวัตถุดิบและทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพโดยรวมของการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 5–25 เปอร์เซ็นต์ วิธีการนี้ถือเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากไม่มีสารตกค้างอันตรายที่เกิดขึ้นในกระบวนการ อย่างไรก็ตามเครื่องจักรกลก็ยังคงต้องใช้พลังงานในการเดินระบบ ซึ่งความต้องการใช้พลังงานของเครื่องจักรนั้นขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคชีวมวล

สุดท้ายที่ต้องการ ความซับซ้อนของลักษณะโครงสร้างชีวมวล ชนิดของเครื่องมือที่ใช้ และระยะเวลาของการปรับสภาพด้วย

#### (2) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพเคมี (Physicochemical pretreatment)

การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการนี้เป็นการผสมผสานระหว่างวิธีการทางกายภาพและทางเคมีเข้าด้วยกัน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการละลายเอมิเซลลูโลสของเอนไซม์เพิ่มขึ้น วิธีการที่สำคัญของกระบวนการนี้ได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion) การระเบิดด้วยไอน้ำกับการใช้สารละลายต่าง (Ammonia fiber explosion)

#### (3) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical pretreatment)

การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีทางเคมีเป็นการย่อยสลายโครงสร้างของเอมิเซลลูโลสและลิกนิน ทำให้เซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญสามารถละลายออกมาจากวัตถุดิบได้มากขึ้น ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการนี้มีความหลากหลายตั้งแต่ กรด ต่าง และสารออกซิไดซ์ เช่น กรดฟอสฟอริก กรดซัลฟูริก กรดอินทรีย์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนีย เป็นต้น

#### (4) การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

การปรับสภาพของวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการทางชีวภาพ สามารถใช้ได้ทั้งวิธีการใช้เซลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ทั้งราและแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายเอมิเซลลูโลสและลิกนิน รวมถึงวิธีการที่ใช้เฉพาะเอนไซม์ในการปรับสภาพวัสดุ ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อราทั้งชนิดราขาว (white rot fungi) ราผุไม้ตาล (brown rot fungi) โดยราขาวมีบทบาทในการย่อยสลายเซลลูโลส ลิกนินได้ดี ข้อได้เปรียบของวิธีการปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเนื่องจากใช้สภาวะที่เป็นกลาง ไม่ใช้สารเคมีที่รุนแรง จึงไม่เกิดการกักกร่อนของถังปฏิกรณ์และยังต้องการพลังงานในกระบวนการน้อย แต่พบข้อเสียเนื่องจากใช้เวลานานและประสิทธิภาพอาจไม่ดีนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมี

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีการต่าง ๆ มีดังนี้

Asgher *et al.* (2013) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากชานอ้อย โดยการเปรียบเทียบการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์จากราขาวสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* IBL-02 ที่พีเอช 4.5 พบว่าต่างและเอนไซม์จากราขาวสามารถกำจัดลิกนินในชานอ้อยได้ 48.70 และ 33.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นพบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสจากการปรับสภาพด้วยต่างและการปรับสภาพด้วยเอนไซม์จากราขาวมีประสิทธิภาพประมาณ 72.90 และ 69.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5 พบว่าการปรับสภาพด้วยต่างสามารถผลิตเอทานอลที่

ความเข้มข้น 18.20 กรัมต่อลิตร และการปรับสภาพด้วยเอนไซม์จากราฆูขาวสามารถผลิตเอทานอลที่ความเข้มข้น 16.30 กรัมต่อลิตร

Cuevas *et al.* (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกิ้งโกลีฟว้แห่ง โดยการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 150 - 210 องศาเซลเซียส ด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation; SSF) โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* IR2-9a ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถให้ผลผลิตเอทานอล 9.6 กิโลกรัมต่อ 100 กิโลกรัมของกิ้งโกลีฟว้แห่ง และให้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 0.27 กรัมต่อลิตร

Harun and Danquah (2011) ศึกษาผลของการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากสาหร่าย พบว่าสาหร่ายที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 7.2 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร

Kim and Kim (2013) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากทะเลสาบปาล์มเปลา่โดยใช้การปรับสภาพแบบ sequential acid/alkali โดยปรับสภาพครั้งแรกด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (autoclave) และปรับสภาพครั้งที่ 2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง และทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทำการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรในการหมัก 1.5 ลิตร ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ทะเลสาบปาล์มเปลา่ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางต่อเนื่องด้วยต่างความเข้มข้นสูงสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้เพิ่มมากขึ้นกว่าการปรับสภาพโดยใช้กรดเจือจางเพียงอย่างเดียว อีกทั้งยังสามารถลดขนาดเส้นใยและเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าสามารถให้ความเข้มข้นเอทานอล 37.80 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตเอทานอลได้ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส และให้ผลผลิตเอทานอล 0.378 กรัมเอทานอลต่อกรัมตัวอย่าง

ประภัสสร เหลืองหิรัญวุฒิ และภีมวิจันน์ วัฒนาคมกุลม (2556) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากและการปรับสภาพที่เหมาะสมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อผลิตเอทานอล โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 50, 100 และ 200 มิลลิโมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และทำการปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากก่อนทำการปรับสภาพด้วยต่างเจือจางและพบองค์ประกอบของเซลลูโลสปริมาณ 40.64±0.02 เปอร์เซ็นต์

เฮมิเซลลูโลส  $14.03 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน  $34.26 \pm 0.02$  เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้มีผลต่อประสิทธิภาพในการปรับสภาพโดยมีปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่ได้หลังจากการปรับสภาพมีปริมาณเปลี่ยนแปลงไป โดยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรให้สัดส่วนเซลลูโลสมากที่สุดเท่ากับ  $44.61 \pm 0.02$  รองลงมา คือ การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 100 และ 50 มิลลิโมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ  $43.97 \pm 0.12$  และ  $41.30 \pm 0.03$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสมีปริมาณ  $15.02 \pm 0.05$ ,  $14.20 \pm 0.02$  และ  $14.86 \pm 0.09$  ตามลำดับ และลิกนินมีปริมาณ  $32.50 \pm 0.13$ ,  $31.40 \pm 0.03$  และ  $30.15 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำไปหมักโดยใช้ *Clostridium xylanolyticum* ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดเท่ากับ  $477.46 \pm 0.24$  มิลลิกรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอล 0.2621 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการทดลอง ในขณะที่การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 200 และ 50 มิลลิโมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความสามารถในการผลิตเอทานอลและให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ  $415.52 \pm 0.45$  มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.2382 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ และ  $413.44 \pm 0.56$  มิลลิกรัมต่อลิตร 0.2543 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ

## 2.5 สารยับยั้งที่มีผลต่อการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์

ในระหว่างการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Hot-compressed water และการใช้กรดหรือด่างเจือจางมักมีผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่มีผลยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการกระบวนการผลิตเอทานอล ได้แก่ สารประกอบจำพวกเกลือของกรดอินทรีย์ เช่น อะซิเตท อนุพันธ์ฟูแรน เช่น สารเฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-hydroxymethylfurfural; 5-HMF) และสารประกอบอื่น ๆ ที่ได้มาจากส่วนของลิกนิน เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) (Klinke *et al.*, 2004) จากรายงานที่ผ่านมาพบสารเฟอร์ฟูรัล 5-HMF และสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณความเข้มข้นเท่ากับ 108.7, 38.13 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4.704 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ (Ofori-Boateng *et al.*, 2014) และจากการศึกษาของ Tamunaidu and Saka (2011) โดยศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของทางไบตันจากพบเฟอร์ฟูรัล และ 5-HMF เนื่องจากทางไบตันจากมีองค์ประกอบของน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม จากเฮมิเซลลูโลสปริมาณมากจึงทำให้ง่ายในการผลิตสารยับยั้งข้างต้น และพบสารประกอบฟีนอลิกจากลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในทางไบจาก ได้แก่ guaiacyl propane syringyl propane และ *p*-hydroxyphenylpropane โดยพบความเข้มข้นของ

guaiacyl propane, syringyl propane และ *p*-hydroxyphenylpropane ในก้านทางใบต้นจาก 1.0, 1.2 และ 0.1 โดยมวล ตามลำดับ และพบในใบต้นจากความเข้มข้น 1.0, 2.8 และ 0.2 โดยมวล ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีค่าพีเอช ในชั้นตอนสุดท้ายในน้ำหมัก โดยพีเอชจะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาลซึ่งมีรายงานหลายฉบับที่รายงานว่าถ้ารักษาค่าพีเอชของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูง ๆ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นกรดอินทรีย์ ในทางตรงกันข้ามถ้ารักษาค่าพีเอชไว้ที่ค่าต่ำ ๆ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามช่วงพีเอชที่จะทำให้มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะอยู่ในช่วงกว้างมากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะของการหมัก เนื่องจากการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์จะอยู่ในช่วงพีเอช 3.8-5.5 (Lee *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมอย่าง *Clostridium acetobutylicum* P262 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีในช่วงพีเอช 6.5 (Jones and Woods, 1986) กรดอ่อน (Weak acid) เช่น กรดแอสติคและกรดบิวทริกถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End-product) ของปฏิกิริยาโดยธรรมชาติซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์เนื่องจากสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ในรูปที่ไม่แตกตัวที่ความเข้มข้นของกรดสูง ๆ ค่าพีเอชที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์จะลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุในการยับยั้งปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมทั้งหมดของเซลล์ภายในตัวเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าจะมีการสะสมของกรดและการลดลงของค่าพีเอช จึงทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ลดลงจนกระทั่งหยุดชะงักในที่สุดถึงแม้ว่าการใช้วัตถุดิบและเมแทบอลิซึมของเซลล์ยังดำเนินต่อไป (Zhu and Yang, 2004) ดังนั้นการเปลี่ยนเป็นกลไก Solventogenesis จึงเป็นกลไกการลดพิษ (Detoxification) ของเซลล์เพื่อกำจัดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นเนื่องจากการยับยั้งของกรดในระดับช่วงที่มีพิษ (Hartamis *et al.*, 1984; Long *et al.*, 1984) โดยทั่ว ๆ ไปการเริ่มต้นของ Solventogenesis จะเกิดขึ้นขณะที่ค่าพีเอชของสารอาหารมีค่าต่ำและมีกรดในรูปที่ไม่แตกตัวอยู่ในช่วงวิกฤต (Lee *et al.*, 2008b) ดังนั้นความเข้มข้นบิวทริกจะต่ำเมื่อค่าพีเอชต่ำ (Jones and Woods, 1986) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่าผลของพีเอชเป็นผลจากความเข้มข้นของกรดบิวทริกที่ไม่แตกตัวและสิ่งนี้เป็นปัจจัยควบคุมการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์งานวิจัยนี้จึงสนใจวิธีการตรึงเซลล์เพื่อเพิ่มความทนทานให้แก่แบคทีเรียต่อสารประกอบเหล่านี้ รวมทั้งเซลล์ตรึงยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้

จากการศึกษาที่ผ่านมามีตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสารยับยั้งที่พบในไฮโดรไลสของวัสดุลิกโนเซลลูโลส ดังนี้

Gao *et al.* (2016) ศึกษาการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากต้นป๊อบลาร์โดยใช้การย่อยสลาย ด้วยวิธี hydrothermal ที่อุณหภูมิในช่วง 180-340 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดโดยจะพบน้ำตาลไซโลสสูงสุด 3.20 กรัมต่อลิตร ตามด้วยน้ำตาลกลูโคส และกาแลกโตสปริมาณ 0.95 และ 0.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นที่ 260 และ 300 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสลดลงอย่างรวดเร็วจาก 0.04 เหลือ 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นที่ 340 องศาเซลเซียสจะตรวจไม่พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าการใช้อุณหภูมิสูงจะเร่งการย่อยสลายของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว นอกจากนั้นยังไม่พบน้ำตาลอะราบิโนสจากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส โดยการแปรผันอุณหภูมิ ตั้งแต่ 180, 220, 260, 300 และ 340 องศาเซลเซียส พบว่าชนิดและปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นจะมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.3)

**ตารางที่ 2.3** แสดงความเข้มข้นสารยับยั้ง (กรัมต่อลิตร) จากการย่อยสลายด้วยวิธี (hydrothermal degradation)

Inhibitor	180 °C	220°C	260°C	300°C	340 °C
Furfural (g/L)	0.23	0.60	0.68	1.35	0.58
Formic acid (g/L)	0.78	1.75	0.80	0.65	0.30
Lactic acid (g/L)	0.45	1.95	1.8	0.60	0.40
Acetic acid (g/L)	0.18	0.30	0.33	2.73	1.40
Levulinic acid (g/L)	0.05	0.13	0.15	0.18	0
5-HMF (g/L)	0	0.10	0.08	0	0

## 2.6 การย่อยสลาย (Hydrolysis) วัสดุลิกโนเซลลูโลส

เนื่องจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งต้องทำการย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หากเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว แต่หากย่อยสลายไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมหลายชนิด ได้แก่ ไซโลส อะราบินอส โดยการย่อยมี 2 วิธี ได้แก่

### 2.6.1 การย่อยทางเคมี

เป็นการย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์โดยตรง สามารถใช้กรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง ได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก วิธีการนี้ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เนื่องจากน้ำตาลที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อจนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้อื่น ๆ เช่น สารเฟอร์ฟูรัล และ 5-HMF เนื่องจากกรดอาจทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ต้องการและต้องย่อยที่อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรงและไม่เฉพาะเจาะจง แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่นาน และค่าใช้จ่ายไม่แพงเมื่อเทียบกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

### 2.6.2 การย่อยด้วยเอนไซม์

การย่อยเซลลูโลสโดยเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับเซลลูโลส ได้ผลผลิตน้ำตาล ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส เป็นการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงและไม่รุนแรง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งราและแบคทีเรีย ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แต่ใช้ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายสูงวิธีการทางเคมี

ตัวอย่างงานวิจัยที่ข้องในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส

วรลักษณ์ คงจินตามณี (2556) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแกนข้าวโพด โดยแปรผันสภาวะในการปรับสภาพ และเปรียบเทียบการย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมีกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และกระบวนการหมักซึ่งเปรียบเทียบระหว่างการใช้ยีสต์ขนมปัง และยีสต์ *S. cerevisiae* โดยทำการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1-2.5 โมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 50-80 องศาเซลเซียส เวลาเป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง และย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.5-2.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวล ที่อุณหภูมิ 90-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวล

อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 12.42 กรัมต่อลิตร และสำหรับการปรับสภาพและการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05-0.20 เปอร์เซ็นต์โดยมวล ที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60-240 นาที และทำการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.05-0.20 เปอร์เซ็นต์โดยมวล อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240-480 นาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ การปรับสภาพด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.20 เปอร์เซ็นต์โดยมวล อุณหภูมิ 87.60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.13 เปอร์เซ็นต์โดยมวล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360 นาที ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 13.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลของการใช้เอนไซม์ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการใช้วิธีทางเคมี จากนั้นนำผลผลิตที่ผ่านการปรับสภาพและการย่อยภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทำการหมักด้วยยีสต์ต่างชนิดกัน ได้แก่ ยีสต์ขนมปัง และยีสต์ *S. cerevisiae* โดยมีปัจจัยที่ศึกษา คือ ปริมาณยีสต์ 2-8 เปอร์เซ็นต์โดยมวล และพีเอชอยู่ในช่วง 4.0-6.0 เป็นเวลา 48-148 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและการย่อยด้วยสารเคมี โดยใช้ยีสต์ขนมปัง 8 เปอร์เซ็นต์โดยมวล พีเอช 5.12 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถให้ผลผลิตเอทานอล 7.46 เปอร์เซ็นต์โดยมวล และการหมักสภาวะที่เหมาะสมด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ปริมาณ 5.77 เปอร์เซ็นต์โดยมวล ที่พีเอช 5.65 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเอทานอล 6.47 เปอร์เซ็นต์โดยมวลซึ่งน้อยกว่าผลผลิตจากยีสต์ขนมปัง สำหรับการหมักผลผลิตที่ผ่านการปรับสภาพและการย่อยด้วยเอนไซม์ ที่สภาวะเหมาะสมโดยใช้ยีสต์ขนมปัง 8 เปอร์เซ็นต์โดยมวล พีเอช 5.33 เป็นเวลา 135 ชั่วโมง ให้ผลผลิตของเอทานอล 8.16 เปอร์เซ็นต์โดยมวล และนำไปหมักในสภาวะที่เหมาะสมด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวล ค่าพีเอชเท่ากับ 5.64 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเอทานอล 9.31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลผลิตมากกว่าการใช้ยีสต์ขนมปัง และเป็นวิธีที่ให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์มากที่สุด

สุรียพร กำเนิดกลาง และคณะ (2555) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากลำต้นปาล์มน้ำมันที่เตรียมด้วยวิธีการทางเคมี ซึ่งใช้ลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการบดและอบแห้งปริมาณ 5, 10 และ 15 กรัม แخذในสารละลายกรดซัลฟูริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์ของลำต้นปาล์มน้ำมันอบแห้ง 5, 10 และ 15 กรัม ที่แช่ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 67.69, 78.41 และ 88.47 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 59.15, 79.55 และ 86.55 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท และแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เท่ากับ 59.70, 75.96 และ 82.68 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ และผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบหลังจากแช่ด้วยกรดซัลฟูริก 2 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 13.88, 8.00 และ 6.10 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบหลังจากแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์



ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 14.90, 9.60 และ 7.32 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท และให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบหลังจากแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 17.67, 12.57 และ 9.90 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ จากนั้นย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลส และเบต้า-กาลาโตซิเดส ในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเลือกตัวอย่างที่ดีที่สุด มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ที่ผ่านการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 9.80 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ เซลลูโลสที่ผ่านการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 9.20 กรัมต่อลิตร และทำการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผ่านการแช่ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 8.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ศิริลักษณ์ ธีระดากร (2555) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากขานข้าวฟ่างหวาน โดยแปรผันสภาวะในการย่อยสลายทางเคมีและการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยผสมวัตถุดิบกับสารละลายกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0-3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำไปปรับสภาพที่อุณหภูมิสูง 120 - 190 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาปรับสภาพนาน 10-30 นาที พบว่าการปรับสภาพขานข้าวฟ่างหวานที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นระยะเวลา 10 นาที จะให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 0.23 กรัมกลูโคสต่อกรัมสับสเตรท และผลผลิตน้ำตาลไซโลส 0.208 กรัมไซโลสต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ จากนั้นนำขานข้าวฟ่างหวานที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด มาแปรผันสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยแปรผันความเข้มข้นเซลลูเลส 15-35 ยูนิตต่อกรัมสารตั้งต้น และปริมาณความเข้มข้นของสารตั้งต้น 1-7 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส พิเอชอยู่ในช่วง 3-7 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสทำงานได้ดีที่สุดเมื่อใช้ขานข้าวฟ่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตั้งต้น และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณ 15 ยูนิตต่อกรัมสารตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 5 โดยให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ 0.344 กรัมน้ำตาลต่อกรัมสารตั้งต้น สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพทางเคมีและชีวภาพ จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเท่ากับ 5.5 และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อทำการหมักสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยขานข้าวฟ่างหวานที่ผ่านการย่อยด้วยกรดให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 15.40 กรัมต่อ 100 กรัมสารตั้งต้น ที่เวลา 12 ชั่วโมง

ขวัญสุดา อนุอัน (2549) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากขานอ้อยโดยการย่อยด้วยวิธีทางเคมี โดยทำการปรับสภาพด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถกำจัดลิกนินได้ดีที่สุดโดยสามารถกำจัดได้

38.41 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และตรวจไม่พบน้ำตาลในชั้นตอนนี้ จากนั้นนำขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการศึกษาสภาพการย่อยเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส โดยพบสภาพที่เหมาะสมในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์และน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ปริมาณเท่ากับ 22.07 และ 32.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หรือคิดเป็น 0.31 และ 0.45 กรัมน้ำตาลต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยขานอ้อยในชั้นตอนการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดไฮโดรคลอริกมากที่สุด คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย รองลงมาคือความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการย่อย จากนั้นนำขานอ้อยที่ผ่านการย่อยเฮมิเซลลูโลสในครั้งแรกย่อยเซลลูโลสต่อด้วยกรดซัลฟูริก พบว่าสภาพที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที ซึ่งให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ความเข้มข้น 11.43 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 0.22 กรัมน้ำตาลต่อกรัมสับสเตรท แล้วนำมาหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.31 กรัมเอทานอลต่อน้ำตาลรีดิวิซ์

เสรี มหาวิชาติ (2555) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากลำต้นมันสำปะหลังด้วยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง แล้วทำการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลกระทบของการปรับสภาพตัวอย่างโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การปรับสภาพ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การปรับสภาพโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส โดยใช้ตุ๋นไอร้อน เป็นเวลา 60 นาที และการปรับสภาพโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ด้วยอัตราส่วนของตัวอย่างต่อปริมาตรกรดซัลฟูริก 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ลงในตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮไลเซลลูโลสปริมาณ 10, 20 และ 50 กรัม จากนั้นนำไปย่อยสลายด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที นำสารละลายที่ได้วิเคราะห์ปริมาณและชนิดน้ำตาลที่เกิดขึ้น พบว่าตัวอย่างเริ่มต้นที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและตัวอย่างไฮไลเซลลูโลสที่ไม่ได้ปรับสภาพให้ผลผลิตน้ำตาลสูงสุด รองลงมาเป็นการปรับสภาพด้วยโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส โดยใช้ตุ๋นไอร้อน เป็นเวลา 60 นาที การปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และการปรับสภาพโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตามลำดับ พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากทั้งสองตัวอย่างเท่ากับ  $0.24 \pm 0.03$  และ  $0.26 \pm 0.02$  กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น พบว่ามีกลูโคสและไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ  $0.19 \pm 0.01$  และ  $0.20 \pm 0.01$  กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และให้ผลผลิตของน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ  $0.02 \pm 0.01$  และ

0.04±0.01 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง จากนั้นนำไปหมักในระบบกะด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR ให้ผลผลิตเอทานอล 0.063 และ 0.070 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎีเท่ากับ 68.00 และ 74.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

El-Zawawy *et al.* (2011) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว ชังข้าวโพด และของเหลือใช้จากกล้วย โดยทำการปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ 4 วิธี คือ ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยมวล โซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับไมโครเวฟ และการแยกสลายด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และการใช้น้ำร้อนแรงดันสูง พบองค์ประกอบหลักหลังการปรับสภาพด้วยการใช้น้ำร้อน ฟางข้าว ของเหลือใช้จากกล้วย และชังข้าวโพด โดยพบลิกนินปริมาณ 22.71, 27.11 และ 20.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบไฮโลเซลลูโลส 55.31, 42.01 และ 61.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบแอลฟาเซลลูโลส 44.95, 30.13 และ 50.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบลิกนินปริมาณ 1.56, 10.74 และ 1.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบไฮโลเซลลูโลส 86.83, 69.78 และ 83.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบแอลฟาเซลลูโลสปริมาณ 58.37, 51.52 และ 47.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับไมโครเวฟ พบลิกนิน 6.04, 15.22 และ 6.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบไฮโลเซลลูโลสปริมาณ 82.16, 55.62 และ 89.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบแอลฟาเซลลูโลส 53.90, 48.16 และ 59.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นทำการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-180 นาที และทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นทำการหมักด้วย *S. cerevisiae* ที่พีเอชเท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เขยาที่ 75 รอบต่อนาที โดยพบผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงสุด 7.61 กรัมต่อลิตร

Chemin *et al.* (2015) ศึกษาวิธีการที่ดีในการใช้ประโยชน์โอลิโกแซคคาไรด์จากไม้ปืช โดยมุ่งเน้นในการวิเคราะห์และจำแนกโครงสร้างโดยการใช้เทคนิค 1D และ 2D nuclear magnetic resonance spectrometry และเทคนิค matrix-assisted laser desorption/ionization-time ในการหา mass spectrometry ของตัวอย่างไฮโดรไลสที่ไม้ปืชจากการย่อยไม้ปืชด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.2-2.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-420 นาที โดยใช้สัดส่วนในการย่อยของวัตถุดิบ 1 ต่อ 10 พบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ให้น้ำตาลไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ได้แก่ น้ำตาลไซโลส และเฟอร์ฟูรัลปริมาณ 0.11 กรัมต่อลิตร

Rahman and Choudhury (2007) ศึกษาผลของความเข้มข้นกรดซัลฟูริก อุณหภูมิ และเวลา ในปฏิกิริยาการย่อยสลาย (hydrolysis) สำหรับการผลิตน้ำตาลไซโลสจากทะเลสาบปาล์มเปล่า โดยการหมักแบบกะ โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยสลายให้ได้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุด

จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม คือ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 119 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตามลำดับ ซึ่งภายใต้สภาวะเหล่านี้จะให้ผลผลิตน้ำตาลไซโลส 17.97 กรัมต่อกรัม คิดเป็น 91.27 เปอร์เซ็นต์

Phaiboonsilpa *et al.* (2011) ศึกษาการย่อยสลาย (Hydrolysis) ทางไบทันจากด้วยเทคนิค (hot compressed water) จากการศึกษาใช้อุณหภูมิ 2 อุณหภูมิ ในการทำการย่อยสลาย โดยในการย่อยสลายครั้งที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 MPa เป็นเวลา 30 นาที จะส่งผลให้ O-acetyl-4-O-methylglucuronoarabinoxylan, pectin และ para-crystalline cellulose ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลสถูกย่อยสลายออกมาพร้อมกับลิกนินบางส่วน และในส่วนของขั้นตอนการย่อยสลายครั้งที่ 2 จะส่งผลให้ผลึกของเซลลูโลส และลิกนินบางส่วนถูกย่อยสลายเพิ่มขึ้น นอกจากนี้องค์ประกอบอินทรีย์ และน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส จะถูก recovered ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 MPa เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะย่อยสลายด้วย 2 ขั้นตอนข้างต้น โดยรวมแล้ว ทางไบทันจากอบแห้งอาจจะละลายลงในน้ำเย็นและน้ำร้อนที่ถูกบีบอัด ซึ่งผลิตภัณฑ์จะสามารถย่อยสลายในส่วนของละลายน้ำได้ 97.30 เปอร์เซ็นต์ และส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสามารถแยกส่วนของ isomerized ที่ตกค้าง 2.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วยลิกนินเป็นส่วนใหญ่ และมีซิลิกาปริมาณ 0.40 เปอร์เซ็นต์ และจากการสลายตัวของ O-acetyl-4-O-methylglucuronoarabinoxylan ในเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักในตัวอย่างไฮโดรไลเสท จะเห็นได้ว่าเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักในทางไบทันจาก ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม และเฟอร์ฟูรัล และจากการย่อยสลายในขั้นตอนที่ 1 สามารถให้น้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก และในขั้นตอนย่อยสลายครั้งที่ 2 ส่งผลให้ปริมาณเฟอร์ฟูรัล และ 5-HMF เพิ่มขึ้นเนื่องจากในการย่อยสลายที่ 2 จะใช้สภาวะที่รุนแรงโดยใช้อุณหภูมิสูงขึ้น และสามารถพบกลูโคสได้ในขั้นตอนย่อยสลายครั้งที่ 2

## 2.7 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิดแต่นิยมใช้ยีสต์ (Yeast) โดยเฉพาะยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ก็ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก แต่ในปัจจุบัน พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ อีกทั้งแบคทีเรียยังให้ผลผลิตสูงและรวดเร็วกว่าการหมักด้วยยีสต์ถึง 5 เท่าเมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน เนื่องจากการหมักด้วยยีสต์ต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Hydrolysis enzymes) ซึ่งไม่ใช่วิธีโดยตรงในการหมัก แต่แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ อะไวซิเลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลู เบต้า-กลูโคซิเดส และไกลโคซิลไฮโดรเลส ซึ่งสามารถเปลี่ยน

เซลล์ulos ให้เป็นน้ำตาลได้ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายของเอนไซม์ ประหยัดเวลาและให้ผลเอทานอลใกล้เคียงค่าทฤษฎี ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลในกระบวนการหมักที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขณะที่ยีสต์ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลในกระบวนการหมักได้เพียง 4–12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Kiransree *et al.*, 2000) ซึ่งชนิดยีสต์และแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอทานอลมีหลายชนิด (ตารางที่ 2.4) และ (ตารางที่ 2.5)

**ตารางที่ 2.4** สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ผลิตเอทานอล

สายพันธุ์	ปริมาณเอทานอลที่ผลิต (%ปริมาตรต่อปริมาตร)
<i>Kluyveromyces fragilis</i> YKL1	4.0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC587	5.03
<i>Candida lusitaniae</i> Y-5394	4.57
<i>Candida pseudotropicalis</i> YCA9	6.87
<i>Candida tropicalis</i> NCYC405	3.43
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC4132	4.39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YSA86	6.38
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NP3	7.58
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y24	10.27
<i>Saccharomyces</i> sp. 1400	7.00
<i>Saccharomyces uvarum inulyticus</i>	7.82
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> YSC3	2.15
<i>Hansenula polymorpha</i> ATCC4516	1.80

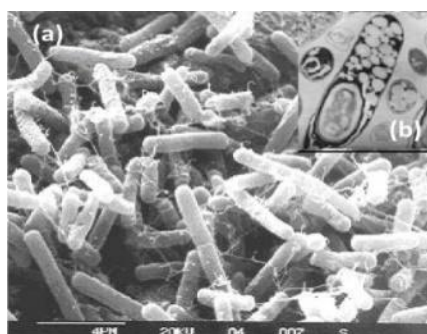
ที่มา : Panchai and Tavares (1990)

ตารางที่ 2.5 ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ชนิดจุลินทรีย์	มิลลิโมลเอทานอลต่อมิลลิโมลกลูโคส	อ้างอิง
<i>Clostridium sporogenes</i>	up to 4.15	Miyamoto 1997
<i>Clostridium indol</i> (pathogenic)	1.96	Miyamoto 1997
<i>Clostridium sphenoides</i>	1.8	Miyamoto 1997
<i>Clostridium Sordelli</i> (pathogenic)	1.7	Miyamoto 1997
<i>Zymomonas Mobilis</i> (syn. Anaerobica)	1.9	Miyamoto 1997
<i>Zymomonas mobilis sub</i> sp. pomaceas	1.7	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta aurantia</i>	1.5	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	0.84	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta litoralis</i>	1.1	Miyamoto 1997
<i>Erwinia amylovora</i>	1.2	Miyamoto 1997
<i>Escherichia coli</i> KO11	0.7–0.1	Dien <i>et al.</i> , 2003;
<i>Escherichia coli</i> LY01	40 –50 g ethanol produced/l	Matthew <i>et al.</i> , 2005
<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	1.1	Dien <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptococcus lactis</i>	1.0	Miyamoto 1997
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.94 – 0.98	Matthew <i>et al.</i> , 2005
<i>Klebsiella aerogenes</i>	24 g ethanol produced/l	Ingram <i>et al.</i> , 1998
<i>Mucor</i> sp. M105	-	Ingram <i>et al.</i> , 1998
<i>Fusarium</i> sp. F5	-	Ingram <i>et al.</i> , 1998
<i>Clostridium xylanolyticum</i>	0.45 (g/l)	ประภัสสร เหลืองศิริบุญชัย และ ภีมวัจน์ วัจนาคมกุล, 2556

### 2.7.1 แบคทีเรียจี้นัส *Clostridium*

แบคทีเรียจี้นัส *Clostridium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้และเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ ในช่วงศตวรรษที่ 20 แบคทีเรียจี้นัส *Clostridium* ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium beijerinckii* ซึ่งแบคทีเรียข้างต้นสามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE) ในสภาวะที่เหมาะสม แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอลและอะซิโตน แต่ถ้าสภาวะที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตอะซิโตนและเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ต่อมาแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้ถูกนำไปพัฒนาเพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตตัวทำละลายบิวทานอล อะซิโตน และเอทานอลจากแป้ง และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose) หรือน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม (Pentose) ในอัตราส่วน 3:6:1 ตามลำดับ (Lehmann *et al.*, 2011) *C. acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Obligate anaerobic bacteria) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) มีรูปร่างแท่ง (Rods shape) (ภาพที่ 2.8) ขนาด  $0.6 - 0.9 \times 2.4-4.7$  ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบ ๆ เซลล์ (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ (Oval) มีตำแหน่งของเอนโดสปอร์ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง ไม่มีเอกโซสปอเรียม (Exosporium) ไม่มีรยางค์ (appendage) ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะโคโลนี่เป็นแบบกลม (Circular) ขอบไม่เรียบ (Irregular) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 ไมโครเมตร สีของโคโลนี่เป็นสีครีมผิวเป็นมันและโปร่งแสง



ภาพที่ 2.8 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) a) เซลล์ปกติ (Vegetative cells) และ b) สปอร์ (Spore formed cells)

ที่มา : Jones *et al.* (1986)

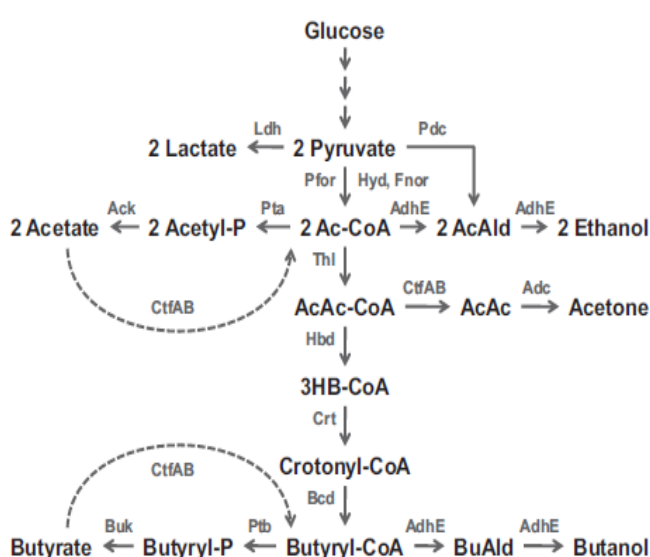
## 2.7.2 วิธีเมแทบอลิซึม

กระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ในระยะแรกจะมีการผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดบิวทิริก และกรดแอซิติกในช่วง 7-18 ชั่วโมงแรกซึ่งเป็นเหตุให้ค่าพีเอชในน้ำหมักลดลงช่วงนี้นิยม เรียกว่า ช่วงของการผลิตกรดอินทรีย์ หรือ Acidogenesis หลังจากนั้นระยะที่สองซึ่งเป็นช่วงของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ภาพที่ 2.9) ซึ่งปกติจะเกิดขึ้นภายหลังจากเริ่มการหมักไปแล้ว 18 ชั่วโมง จนถึง 36 หรือ 60 ชั่วโมง ในช่วงนี้ค่าพีเอชของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและจะมีการนำกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในช่วงแรกมาใช้เป็นบางส่วน ระยะที่สองนี้นิยม เรียกว่า ระยะของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ Solventogenesis นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักยังมีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาตลอดกระบวนการด้วย (Badr *et al.*, 2001; Lehmann *et al.*, 2011)

รูปแบบของการหมักแบบกะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ดังได้กล่าวไปแล้วนั้น แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนด้วย ทั้งนี้ น้ำตาลในกลุ่มคาร์บอน 6 อะตอม จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกโดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุลพร้อมกับการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ  $\text{NADH} + \text{H}^+$  จำนวน 2 โมเลกุล ด้วย น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม จะถูก Metabolized ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป และกรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์ และ Reduce ferredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvateferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมักโดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริกโดยจะทำให้ค่าพีเอชของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้างอะซิเตรทด้วย ซึ่งต่อมาอะซิเตรทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่กลับไม่ได้ (Jones and Woods, 1986) ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้นเพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษและช่วยกำจัด



2 ปฏิกิริยาที่สร้าง  $\text{NAD}^+$  ด้วยซึ่งถ้าต้องการสร้าง  $\text{NAD}^+$  แบบที่เรียจะจะมีกลไกในการเปลี่ยนบิวทิเรตกลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไปนอกจากนี้ยังพบว่า การผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก โดยเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยาโดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง  $\text{NAD}^+$  ด้วย



ภาพที่ 2.9 วิถีเมแทบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคสโดย *Clostridium acetobutylicum*  
ที่มา : Lehmann et al. (2011)

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการใช้ยีสต์ในการหมักเอทานอลเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก แต่ในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียบางชนิดมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องมีดังนี้

ประภัสสร เหลืองหิรัญวุฒิ และภิมวัจฉ์ วัจนาคมกุลม (2556) จากการศึกษาสายพันธุ์เชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้ทางไบโตนจากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 0.4098 กรัมต่อกรัมสับสเตรท จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรีย *Clostridium* ในการผลิตเอทานอล 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum* และ *Clostridium xylanolyticum* โดยทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 7 วัน และจะเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก ๆ 24 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมจะใช้ *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* และ *C. xylanolyticum* หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะใช้อาหารที่ใส่ กลูโคสแทนทางใบต้นจากหมักเป็นเวลา 7 วัน และทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* หมักที่อุณหภูมิห้องจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดในวันที่ 7 เท่ากับ  $456.59 \pm 0.07$  มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเอทานอล  $0.2507$  กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวิซ์ ตามด้วย *C. acetobutylicum* หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดในวันที่ 5 เท่ากับ  $383.22 \pm 1.13$  มิลลิกรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ  $0.2104$  กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวิซ์ ส่วนแบคทีเรียและอุณหภูมิที่ให้ค่าการผลิตเอทานอลได้ต่ำที่สุดคือ *C. butyricum* หมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลในวันที่ 6 เท่ากับ  $58.14 \pm 0.03$  มิลลิกรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอลเท่ากับ  $0.0319$  กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวิซ์ และทำการหมักชุดควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วย *C. xylanolyticum* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดในวันที่ 6 เท่ากับ  $768.75 \pm 0.74$  มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ  $0.0384$  กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวิซ์ ตามด้วย *C. butyricum* หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ในวันที่ 7 เท่ากับ  $107.21 \pm 0.59$  มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเอทานอล  $0.0054$  กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวิซ์ และ *C. acetobutylicum* หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะผลิตเอทานอลในวันที่ 7 เท่ากับ  $80.64 \pm 0.07$  มิลลิกรัมต่อลิตร และได้ค่าผลผลิตเอทานอล  $0.0040$  กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวิซ์ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของ *Clostridium* และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหมายความว่าชนิดของแบคทีเรีย และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ทำให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลแตกต่างกันด้วย และการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันโดยใช้ทางใบต้นจากและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้การผลิตเอทานอลแตกต่างกันด้วย โดยพบว่า *C. xylanolyticum* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าแบคทีเรียอีก 2 ชนิด คือ *C. acetobutylicum* และ *C. butyricum* เนื่องจาก *C. xylanolyticum* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยของเฮมิเซลลูโลสได้ด้วย ขณะที่ *C. acetobutylicum* และ *C. butyricum* เป็นเชื้อที่มี path way ที่สามารถผลิตบิวทานอลและอะซิโตนได้มากกว่าเอทานอล

Gupta et al. (2014) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากใบป๊อปปลาร์ ทำการปรับสภาพด้วยแอมโมเนีย ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นทำการปรับสภาพต่อด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 27 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ hemicellulase และหมักด้วยแบคทีเรีย *Clostridium thermocellum* ที่สภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 66 ชั่วโมง พบปริมาณเอทานอลความเข้มข้น 6.75 กรัมต่อลิตร

Jain *et al.* (2013) ศึกษาเปรียบเทียบการหมัก 2 แบบ ได้แก่ แบบใช้ของแข็ง (Solid-state) และ แบบใช้ของเหลว (Submerged-state) จากหญ้าสวิตช์กราส (switch grass) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแอมโมเนียต่อการผลิตเอทานอล และอะซิเตรท โดยเชื้อ *Clostridium phytofermentans* พบว่าการหมักแบบ Submerged-state ให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล อะซิเตรท และ ไฮโดรเจน ได้สูงกว่าแบบ Solid-state เนื่องจากการหมักแบบ Submerged-state สามารถผลิตไบโอฟิล์ม (Biofilm) ซึ่งพบว่าไบโอฟิล์มมีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

## 2.8 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

การตรึงเซลล์เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เพื่อเพิ่มความทนทานของเซลล์ และการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ รวมถึงยังช่วยลดการปนเปื้อนและสามารถแยกผลผลิตออกได้ง่าย ช่วยให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มขึ้น ตลอดจนช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนกระบวนการแยกเซลล์ (Nigam, 2000; Chandel *et al.*, 2007)

การตรึงเซลล์ คือ การยึดหรือการเกาะติดเซลล์จุลินทรีย์ไว้กับวัสดุตรึง วิธีการตรึงเซลล์สามารถแบ่งได้หลายวิธีการ (Hasirci *et al.*, 2006) ได้แก่

(1) การดูดติดผิวทางกายภาพและการยึดติดด้วยประจุ (Physical adsorption) เป็นวิธีการดูดหรือยึดเซลล์จุลินทรีย์ที่ผิวของวัสดุตรึง วัสดุตรึงที่นิยมใช้ในวิธีนี้ได้แก่ แผ่นพลาสติกที่มีรูพรุน วัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติ เป็นต้น วิธีการนี้มีโอกาสเกิดผลกระทบในแง่ลบต่อเซลล์น้อยเนื่องจากเป็นกระบวนการทางกายภาพ แต่ความเสถียรและความคงทนของเซลล์ตรึงก็น้อยเช่นกัน เทคนิคนี้มีการใช้อย่างแพร่หลายในงานทางสิ่งแวดล้อม เช่น การบำบัดน้ำเสียด้วยระบบการกรองแบบชีวมวล (Trickling filter)

(2) การยึดติดด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent Binding) วิธีการนี้เป็นกระบวนการสร้างพันธะระหว่างเซลล์จุลินทรีย์ วิธีการนี้มีพันธะที่แข็งแรงส่งผลให้เซลล์มีความเสถียรสูง แต่มีข้อเสียคือวัสดุตรึงในกลุ่มนี้จำเป็นต้องเร่งสภาพ (Activate) ก่อนใช้งาน (Hasirci *et al.*, 2006)

(3) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking) วิธีการนี้เป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างวัสดุตรึงและจุลินทรีย์โดยตรง วิธีการนี้ไม่เป็นที่นิยมมากนักเนื่องจากกระบวนการตรึงสามารถส่งผลเสียต่อจุลินทรีย์ได้มาก

(4) การกักขัง (Entrapment) เป็นการตรึงจุลินทรีย์ด้วยวัสดุตรึงประเภทสารพอลิเมอร์หรือแผ่นเมมเบรน วิธีการนี้แตกต่างจากวิธีข้างต้น นั่นคือจุลินทรีย์ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาโดยตรงกับวัสดุตรึง แต่จุลินทรีย์จะถูกกักขังอยู่ในวัสดุ ดังนั้นวิธีการนี้จึงสามารถประยุกต์ใช้งานได้ทั้งกับจุลินทรีย์ทุกชนิด และสารโปรตีนอื่น ๆ วัสดุที่นิยมใช้ในการตรึงประกอบด้วยพอลิเมอร์จากธรรมชาติและสังเคราะห์

เช่นสารประกอบอัลจิเนต (Alginate) สารโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (Nikolskaya *et al.*, 2012) เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรมอาหาร และพลังงาน

คุณสมบัติของวัสดุจริง ต้องเป็นวัสดุที่มีความเป็นรูพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้ในการยึดจับ ไม่ละลายน้ำ มีความแข็งแรง และทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ-เคมี เช่น แรงกระทบกระเทือน การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ พีเอช และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในสภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องทนต่อความร้อน ความดันได้สูง นอกจากนั้นวัสดุที่ใช้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ (Kourkoutas *et al.*, 2004) วัสดุจริงที่นิยมใช้ในการผลิตเอทานอล ได้แก่ กลุ่มพอลิเมอร์จากธรรมชาติ เช่น Agar, Alginate และ Chitosan กลุ่มของพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น Polyvinylalcohol (PVA) (Efremenko *et al.*, 2012) และ Calcium alginate (Wirawan *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามซิลิกาที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นวัสดุจริงในการผลิตเอทานอล เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี สามารถใช้งานได้ในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้าง มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกไม่บวมน้ำ และยังไม่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านพลังงาน แต่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Khongkhaem *et al.*, 2011) ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

อมรรัตน์ ศิริพันธ์ (2547) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้ยีสต์ตรึงสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์เพื่อผลิตเอทานอลโดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 โมลาร์ จากการศึกษาพบว่าโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรึงยีสต์ โดยยีสต์ที่ถูกตรึงในสภาวะนี้มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ 73.32 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตเอทานอลได้ 0.31 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ จากนั้นทำการศึกษาค่าใช้ซ้ำของยีสต์ตรึงจากสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น โดยแปรผันระยะเวลาหมักที่ 48, 56 และ 64 ชั่วโมง สามารถใช้ซ้ำได้ 8 ครั้ง โดยที่ความเข้มข้นและอัตราการผลผลิตเอทานอลมีค่าใกล้เคียงกัน โดยปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลเฉลี่ยของการหมัก 8 ครั้ง คือ  $74.12 \pm 7.19$ ,  $75.45 \pm 4.29$  และ  $81.47 \pm 6.50$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลเฉลี่ยได้  $0.34 \pm 0.05$ ,  $0.33 \pm 0.04$  และ  $0.33 \pm 0.02$  กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ใช้ ที่ระยะเวลาหมัก 48, 56 และ 64 ชั่วโมง ตามลำดับ

Khongkhaem *et al.* (2011) ศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาให้มีประสิทธิภาพสูง และพัฒนาระบบการกรองชีวภาพที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาเพื่อบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนฟีนอลและสารประกอบฟีนอล รวมทั้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซมีเทนโดยใช้

น้ำเสียที่ผ่านการกำจัดฟีนอล ทั้งนี้ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่ง พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้นสูง การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่เหมาะสม ทำโดยใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า OD<sub>578</sub> เท่ากับ 3.0 และเตรียมแบคทีเรียตรึงลักษณะสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แบคทีเรียตรึงที่ผลิตขึ้นมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 108 CFU ต่อกรัมซิลิกา มีความสามารถในการย่อยสลายฟีนอลและสารประกอบฟีนอลอื่น ๆ เช่น *m*-cresol, *o*-cresol, caffeic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, catechol และ 3-methylcatechol รวมทั้งสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 30 วัน จากนั้นได้พัฒนาระบบกรองชีวภาพขนาดเล็กแบบ Internal loop Airlift Bioreactor (ILALR) โดยใช้แบคทีเรียตรึงบนซิลิกาปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำที่ 2.5 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียตรึงในระบบการกรองชีวภาพสามารถย่อยสลายฟีนอลและสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีประสิทธิภาพในการย่อยฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีและสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาซ้ำได้เป็นเวลาอย่างน้อย 2 เดือน ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาในการเตรียมแบคทีเรียตรึง

Efremenko *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากสาหร่ายโดยทำการหมักด้วยแบคทีเรียตรึงสายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum* ในโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) โดยใช้ PVA ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ *C. acetobutylicum* 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากการศึกษาพบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพสูงสุด ได้แก่ บิวทานอลและเอทานอลความเข้มข้น 430 และ 290 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสามารถนำมาใช้หมักซ้ำได้ 5 ครั้ง

Singh *et al.* (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วยเซลล์ตรึงยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces thermotolerans* บนวัสดุตรึง 4 ชนิด ได้แก่ ก้านต้นปอ ชานอ้อย เส้นใยมะพร้าว และแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งใช้อัตรายีสต์ต่อวัสดุตรึง 9 ต่อ 10 กรัมเซลล์ต่อกรัมวัสดุตรึง จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากการหมักด้วยยีสต์ตรึงเปรียบเทียบกับยีสต์อิสระ โดยการตรึงเซลล์ 3 แบบแรกเป็นการตรึงเซลล์แบบเกาะติดหรือการดูดติดผิวทางกายภาพ (Physical Adsorption) บนวัสดุตรึงจากธรรมชาติ และการตรึงอีกแบบหนึ่งเป็นการตรึงแบบกักขัง (Entrapment) พบว่าการหมักโดยการตรึงบนก้านปอ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอทานอลที่ความเข้มข้น 69 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย ชานอ้อย เส้นใยมะพร้าว และแคลเซียมอัลจิเนต ที่ความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 53, 42 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

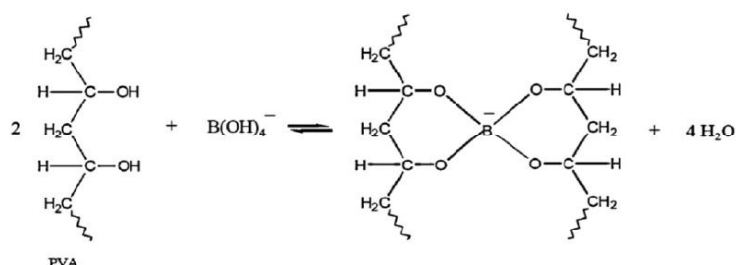
Wirawan *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากชานอ้อย โดยทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองนำส่วนของของเหลววิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาล และเปรียบเทียบการหมักโดยการใช้แบคทีเรียตรึงสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* ในวัสดุตรึง 2 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ แคลเซียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) ความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการหมัก ด้วยแบคทีเรียตรึงทั้ง 2 ชนิด โดยการหมัก 2 รูปแบบ คือ หมักแบบการย่อยน้ำตาลก่อนแล้วจึงนำไป ทำการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation; SHF) โดยย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และรูปแบบที่ 2 คือ การหมักแบบการย่อยน้ำตาลและทำการหมักไป พร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation; SSF) โดยการย่อยสลายด้วยการ เติมเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียตรึงใน PVA ด้วยการหมักแบบ SHF ให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด 6.24 กรัมต่อลิตร และอัตราในการผลิตเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 3.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แบคทีเรียตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตด้วยการหมักแบบ SHF ให้ อัตราในการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 2.37 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียตรึงใน PVA ทำการหมักแบบ SSF ให้อัตราในการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 1.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามแบคทีเรียตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตด้วยการหมักแบบ SSF ให้อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และสามารถนำแบคทีเรียตรึงใน PVA มาใช้หมักซ้ำได้ 5 ครั้ง โดยพบว่าแบคทีเรียตรึงมีความเสถียรสูงถึงจะผ่านการหมักซ้ำ 5 ครั้ง

Bach and Dinh (2014) ศึกษาการตรึงแบคทีเรียโดยเทคนิคใหม่ด้วยโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) โดยใช้ปฏิกิริยาเชื่อมโยงข้าม (Crosslink) ด้วยกรดบอริก ร่วมกับการใช้โซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ซึ่งการตรึงแบคทีเรียได้รับการพัฒนา จนสามารถลดการรวมตัวกันของเม็ดบีด PVA และ ความเป็นพิษของกรดที่เกิดจากขั้นตอนการฟอร์มตัวของเม็ดบีด PVA-บอริก นอกจากนี้ยังพบว่า วิธีการนี้ยังลดการบวมตัวของเม็ดบีดเมื่อแช่ในน้ำ วิธี PVA-บอริก โดย PVA จะอาศัยกรดบอริก ที่ เกิดการแตกตัวเป็น Tetrahydroxyborate ion ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมโยง ข้าม (Crosslink) ตรงตำแหน่งหมู่ ไฮดรอกซิล (OH) ของสายโซ่ PVA มากกว่า 1 สาย (ภาพที่ 2.10) ทำให้เกิดพอลิเมอร์แบบร่างแห โดยทำการตรึงโดยใช้ 4 สภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่ การแช่ PVA ที่ ฟอร์มตัวแล้วด้วยบัฟเฟอร์ 3 ชนิด และไม่แช่ในบัฟเฟอร์ โดยกลุ่ม B คือกลุ่มที่ผ่านการฟอร์มตัว ด้วยกรดบอริกและไม่ผ่านการแช่บัฟเฟอร์ กลุ่ม N คือกลุ่มที่ผ่านการแช่โซเดียมไนเตรตบัฟเฟอร์ ( $\text{NaNO}_3$ ) กลุ่ม P คือ กลุ่มที่ผ่านการแช่ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) และกลุ่ม S คือกลุ่มที่ ผ่านการแช่โซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบความเสถียร บวมตัว และความ แข็งแรงของเม็ดบีด PVA ซึ่งจากการศึกษา พบว่ากลุ่ม S เป็นบัฟเฟอร์ที่ดีที่สุด เนื่องจาก  $\text{SO}_4^{2-}$  ion

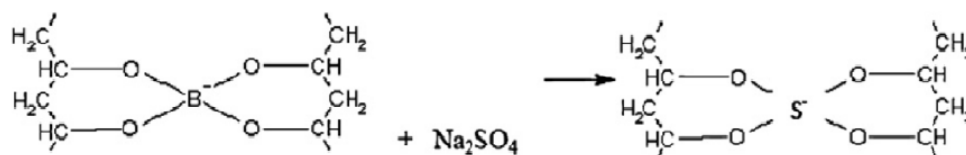
เข้าแทนที่ borate ion (ภาพที่ 2.11) ส่งผลให้เม็ดบีด PVA มีความเสถียร และแข็งแรงเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังส่งผลทำให้มีคุณสมบัติยืดหยุ่นคล้ายยาง และทำการทดลองตรวจสอบความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียหลังจากขั้นตอนการตรึงและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์คาร์บอนรวม (Total Organic Carbon; TOC) ในถังปฏิกรณ์แบบไร้อากาศ โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัด TOC ได้ถึง 80-87 เปอร์เซ็นต์

Zain *et al.* (2011) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียตรึงใน PVA-อัลจิเนต โดยปรับปรุงวิธีการในการตรึงโดยใช้โซเดียมซัลเฟต ซึ่งแปรผันความเข้มข้นในช่วง 0.1-0.9 พบว่าความเข้มข้น 0.5 เพียงพอต่อการลดการบวมตัวของเม็ดบีด ส่งผลให้เม็ดบีด PVA มีความเสถียร และแข็งแรงเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังส่งผลทำให้มีคุณสมบัติยืดหยุ่นคล้ายยาง เนื่องจากไอออน  $\text{SO}_4^{2-}$  เป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) (ชอบคาร์บอน) ตามธรรมชาติจึงดึงดูดกับอะตอมคาร์บอนในเม็ดบีด PVA-อัลจิเนต ได้ดีผ่านกลไกปฏิกิริยาแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก (nucleophilic) โดยซัลเฟตเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ใหญ่กว่า borate ซัลเฟตจึงเข้าแทนที่จากด้านตรงข้ามกับหมู่หลุดออก (leaving group) คือ borate เท่านั้น โดยจะเข้าจากทางด้านหลัง มากกว่าด้านหน้าซึ่งถูกบดบังโดยหมู่ที่หลุดออกมาแล้วนั้น และทำการทดสอบด้วยเครื่อง Energy Dispersive X-ray Spectrometer (EDX) พบว่า  $\text{SO}_4^{2-}$  ion (ภาพที่ 2.12) ยังคงอยู่ภายในโครงสร้างของ PVA-alginate แต่ไม่พบ borate ion ในโครงสร้างของ PVA-alginate



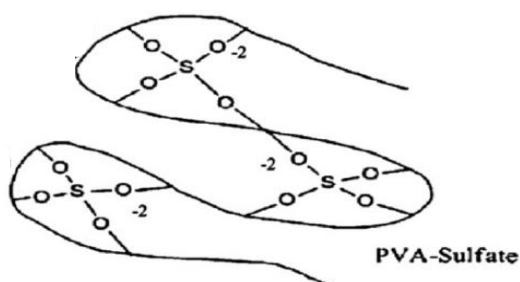
ภาพที่ 2.10 Cross-linking process of PVA with tetrahydroxyborate ion

ที่มา : Dinh and Bach (2014)



ภาพที่ 2.11 Reaction involving PVA, boric acid and sodium sulfate

ที่มา : Dinh and Bach (2014)



ภาพที่ 2.12 The overall reaction of PVA bead formation with sulfate

ที่มา : Zain et al. (2011)

Zhao and Xia (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลของเฮมิเซลลูโลสไฮโดรไลสจากชังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแอมโมเนียความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นและปรับสภาพวัสดุด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้สัดส่วนเริ่มต้น 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการแยกของแข็งออกจากของเหลวด้วยการกรองและการลดพิษ (Detoxification) จากเฮมิเซลลูโลสไฮโดรไลสโดยวิธีการกลั่นระเหยสารแบบหมุนและการทำให้เป็นกลางด้วยด่าง เพื่อกำจัดสารยับยั้งในไฮโดรไลสโดยพบเฟอร์ฟูรัลก่อนการลดพิษความเข้มข้น  $0.08 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร ภายหลังลดพิษ พบว่าสามารถกำจัดเฟอร์ฟูรัลได้ทั้งหมด และสามารถกำจัดกรดแอกซิดิกได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เดียวกันสามารถเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสได้ถึง 71.8 กรัมต่อลิตร รวมถึงการใช้เซลล์ตรึงรูปรวมในกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มความทนทานให้กับยีสต์ *S. cerevisiae* ZU-10 ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมและตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตพบว่าสามารถให้เอทานอลความเข้มข้น 31.10 กรัมต่อลิตร และสามารถให้ผลผลิตของเอทานอลเท่ากับ 0.406 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในการหมักแบบกะ และสามารถนำเซลล์ตรึงรูปแคลเซียมอัลจิเนต กลับมาใช้ซ้ำได้ 5 ครั้ง โดยการหมักแต่ละครั้งจะได้ปริมาณเอทานอลต่ำกว่า 30.10 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.393 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล โดยพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ZU-10 มีความอ่อนไหวต่อสารยับยั้ง ได้แก่ กรดแอกซิดิกและเฟอร์ฟูรัล เมื่อหมักโดยมีเฟอร์ฟูรัลอยู่ในไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร และ 0.12 กรัมต่อลิตร ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลลดลงจาก 27.9 กรัมต่อลิตร เหลือ 22.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าความเข้มข้นกรดแอกซิดิกและเฟอร์ฟูรัลที่เพิ่มขึ้นในกระบวนการหมักส่งผลกระทบต่อเซลล์อิสระซึ่งไม่ทนทานต่อสารยับยั้งทั้ง 2 ชนิดข้างต้น ในขณะที่เซลล์ตรึงรูปจะมีความทนทานต่อ กรดแอกซิดิกได้



ถึง 1.20 กรัมต่อลิตร และค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการหมักโดยการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ZU-10 เท่ากับ 5.5

Mishra *et al.* (2016) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพทางเคมีด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร และย่อยสลาย (hydrolysis) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้การหมักร่วมด้วยยีสต์ตรึงรูป *S. cerevisiae* GSE1618 ในระบบ packed bed reactor พบว่าขนาดของเม็ดบีทแคลเซียมอัลจิเนต มีผลต่อพื้นที่ผิว การแพร่ผ่านของสาร และการหลุดของเชื้อ โดยทำการแปรผันขนาดของเม็ดบีท 3 ขนาด ได้แก่ 3, 4 และ 5 มิลลิเมตรซึ่งขนาดกลางเป็นขนาดที่ดีที่สุด โดยพบว่าขนาดกลาง 4 มิลลิเมตร และใหญ่ 5 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการใช้ซ้ำมากกว่า 25 ครั้ง ในขณะที่ขนาดเล็ก 3 มิลลิเมตร มีขนาดเล็กสามารถกระจายตัวในไฮโดรไลเซสได้ทั่วถึงกว่าขนาดกลางและใหญ่ เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสูงและง่ายต่อการแพร่ผ่านของสารแต่อย่างไรก็ตามเม็ดบีทขนาดเล็กไม่เหมาะสมต่อการใช้ในระยะยาว ในขณะที่เม็ดบีทขนาดใหญ่มีพื้นที่ผิวต่ำกว่าและการแพร่ผ่านของสารต่ำกว่าทำให้มีความสามารถที่จะอยู่ในระบบหมักได้นานกว่า แต่อยู่ในระบบนานกว่าส่งผลให้ได้รับความดันจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการหมักสูงขึ้น จึงเป็นสาเหตุต่อการการเจริญเติบโตของเซลล์หยุดชะงัก ทำให้การผลิตเอทานอลในระบบกะ ลดลงกว่าเม็ดบีทขนาดกลางหลังการใช้งาน 25 ครั้ง ในขณะที่การหมักแบบต่อเนื่อง (packed bed reactor) พบว่าสามารถผลิตเอทานอลความเข้มข้น 40.33 กรัมต่อลิตร และใช้ซ้ำได้ 10 ครั้ง

## บทที่ 3

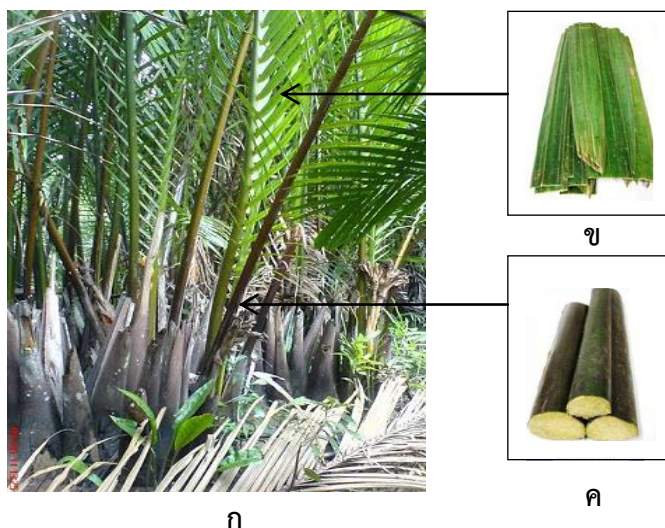
## วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 ภาพรวมขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัย



### 3.2 การเตรียมวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

งานวิจัยนี้ใช้ทางใบต้นจากเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยเก็บตัวอย่างทางใบต้นจากจากบริเวณสวนจากในตำบลขนานบนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีเกษตรกรประกอบอาชีพทำสวนจากจำนวนมาก และยังเป็นพื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์จากนาุ้งทิ้งร้างโดยการปลูกต้นจากทดแทน (Matsui *et al.*, 2014) (ภาพที่ 3.1ก) เลือกเก็บเฉพาะทางใบต้นจากที่ไม่อ่อนจนเกินไป โดยเลือกจากสีใบต้นจากที่เป็นสีเขียวเข้ม และแยกทางใบต้นจากเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่มีเฉพาะใบและส่วนของทางใบซึ่งตัดเอาใบออกทั้งหมดเหลือเฉพาะก้านทางใบ (ภาพที่ 3.1ข) และ (ค) นำตัวอย่างทางใบต้นจากทั้งหมดล้างทำความสะอาด และนำตัวอย่างแต่ละส่วนไปปรับสภาพเบื้องต้นด้วยการตัดก้านทางใบและใบต้นจากให้มีขนาดเล็กลง และบดหยาบให้มีขนาดประมาณ 1.00-1.50 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องสับผสม (FnB Machine & Solution Co., Ltd., ประเทศไทย) (ภาพที่ 3.2ข) และ (ภาพที่ 3.3ข) จากนั้นนำไปอบด้วยเครื่องอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และบดละเอียดด้วยเครื่อง Hammer mill (FnB Machine & Solution Co., Ltd., ประเทศไทย) ให้มีขนาดเล็กลงประมาณ 0.10-0.50 มิลลิเมตร (Tamunaidu and Saka, 2011) (ภาพที่ 3.2ค) และ (ภาพที่ 3.3ค) แล้วเก็บตัวอย่างในโถดูดความชื้น (desiccators) จนกว่าจะนำไปใช้งาน



ภาพที่ 3.1 กอต้นจากที่มีการแตกแขนงประกอบด้วยทางใบจำนวนมาก (ก) และใบ (ข) และก้านทางใบของต้นจาก (ค)

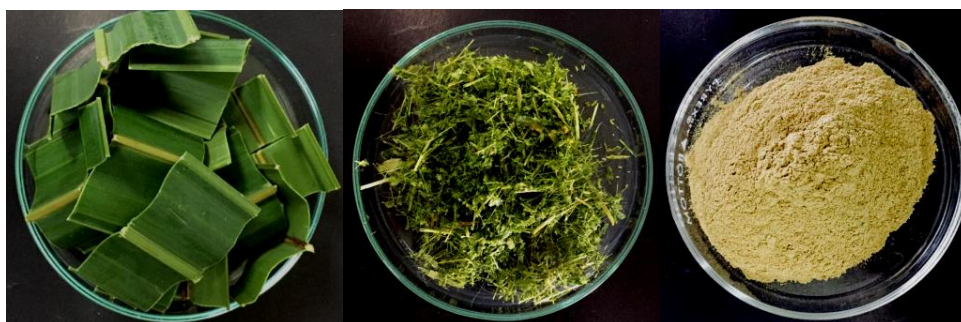


ก

ข

ค

ภาพที่ 3.2 ก้านทางไต้ต้นจากที่ผ่านการตัดให้มีขนาดเล็ก (ก) ก้านทางไต้ต้นจากที่ผ่านการบดหยาบ (ข) และก้านทางไต้ต้นจากที่ผ่านการบดละเอียด (ค)



ก

ข

ค

ภาพที่ 3.3 ไต้ต้นจากที่ผ่านการตัดให้มีขนาดเล็ก (ก) ไต้ต้นจากที่ผ่านการบดหยาบ (ข) และไต้ต้นจากบดละเอียด (ค)

### 3.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยต่างเจือจาง

การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยต่างเจือจาง ดัดแปลงจากวิธีการของประภัสสร เหลืองศิริบุญดี และกิมวัจฉ์ วัจนาคมกุลม (2556); Asgher *et al.* (2013) โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 ลิตร ลงในขวด Duran ขนาด 2 ลิตร ที่มีส่วนต่าง ๆ ของทางไต้ต้นจากที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2 ตัวอย่างละ 100 กรัม นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (autoclave) จากนั้นนำตัวอย่างกรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกจากส่วนของเหลว นำส่วนของแข็งล้างด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง แล้วนำตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของทางไต้ต้นจากไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำ

ส่วนของแข็งก่อนและหลังการปรับสภาพไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจาก ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีการในข้อ 3.13.1

### 3.4 การย่อยสลาย (Hydrolysis) ด้วยกรดเจือจาง

นำตัวอย่างส่วนที่เป็นของแข็งของทางใบต้นจาก ได้แก่ ก้านทางใบและใบต้นจาก หลังจากการปรับสภาพจากข้อ 3.3 แล้ว รวมทั้งวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ทำการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง (dilute acid hydrolysis) ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Chemin *et al.* (2015) โดยการผสมวัตถุดิบปริมาณ 100 กรัม ลงในสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจางที่มีความเข้มข้น 0.7 โมลาร์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที โดยใช้เครื่องกวนสารละลายแบบให้ความร้อน (Hot plate stirrer) ที่มีการกวนผสมตลอดระยะเวลาการทดลอง จากนั้นนำไฮโดรไลเสทที่ได้มาปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ และนำไฮโดรไลเสทที่ปรับพีเอชแล้วไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ตะกอนเกลือจากการปรับสภาพตกตะกอน แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และสารผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายลิกนินและน้ำตาล (lignin and sugar decomposition products) ตามวิธีการในข้อ 3.13.2 และ 3.13.3 ตามลำดับ

### 3.5 การเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรีย *Clostridium xylanolyticum* JCM 15735 (RIKEN BioResource Center, ประเทศญี่ปุ่น) นำหัวเชื้อที่เก็บไว้ในหลอด Eppendorf ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการกระตุ้นหัวเชื้อ โดยนำไปแช่ในน้ำอุ่น นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Cellulose mineral salt (CMS medium) ดัดแปลงมาจาก Reddy *et al.* (2010) ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีส่วนประกอบของสารอาหารดังต่อไปนี้ (ต่อ 1 ลิตรอาหารเหลว): กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) 20 กรัม โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) 1.5 กรัม โปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) 2 กรัม ยูเรีย (Urea) 2 กรัม ยีสต์สกัด (Yeast extract) 0.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4$ ) 0.8 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2$ ) 0.15 กรัม และโซเดียมซิเตรท ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) 3.5 กรัม โดยค่าพีเอชของอาหารเหลวมีค่าประมาณ 6.8-7.0 ตามด้วยการใส่ L-cystein 0.15 กรัม และ Resasurin 200 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ในการตรวจสอบก๊าซออกซิเจน จากนั้นเติมอาหารเหลวปริมาตร 80 มิลลิลิตร

ลงในขวดเซรั่มขนาด 100 มิลลิลิตร ฟันแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 1 นาที เพื่อไล่แก๊สออกซิเจนออก ปิดขวดด้วยจุกยางและ Aluminium crimp cap จากนั้นนำอาหารเหลวไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง เป็นเวลา 15 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากขวดเซรั่ม ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และนำไปผสมกับหัวเชื้อ จากนั้นทำการเติมสารละลายหัวเชื้อกลับไปในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ Pre-inoculum ที่เตรียมได้ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในขวดเซรั่มที่มีอาหารเหลวเตรียมใหม่ จากนั้นบ่มเชื้อตามสภาวะข้างต้น โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าความขุ่นของแบคทีเรียเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 1.0 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเอทานอลด้วยเซลล์อิสระ หรือใช้สำหรับการตรึงเซลล์ต่อไป

### 3.6 การผลิตเอทานอลโดย *C. xylanolyticum* จากน้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม

ศึกษาความสามารถของแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ในการใช้น้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอมเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอล โดยเตรียมอาหารเหลว CMS ปริมาณ 72 มิลลิลิตรในขวดเซรั่มขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติมตัวแทนน้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม ได้แก่ โซโลส และ กลูโคส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแบบแยกกัน จากนั้นเติมหัวเชื้อที่เพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 3.5 ให้มีค่าความขุ่นของเชื้อเริ่มต้น  $OD_{600}$  เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 8 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว CMS แล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นของอะซิโตน เอทานอล และบิวทานอล ตามวิธีการในข้อ 3.13.4 โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน

### 3.7 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลเช่นเดียวกับที่พบในไฮโดรไลเสทของก้านทางใบต้นจากโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา

ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีสารยับยั้ง โดยใช้ชนิดและปริมาณน้ำตาลเช่นเดียวกับที่พบในตัวอย่างไฮโดรไลเสทของก้านทางใบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง ซึ่งมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลโซโลส 6.22 กรัมต่อลิตร น้ำตาลอะราบิโนส 1.49 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 2.76 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกาแลกโตส 0.75 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลแรมโนส 0.21 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอล โดยเตรียมอาหารเหลว CMS ปริมาณ 72 มิลลิลิตร ในขวดเซรั่มขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติมตัวแทนน้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอมข้างต้น และความเข้มข้นรวมเท่ากับ 11.43 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมแบคทีเรียตรึงซิลิกาเตรียมตามวิธีการในข้อ 3.9.2.2 ให้มี

ค่าความขุ่นของเชื้อเริ่มต้น OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1.5 ปริมาณ 1 กรัม ลงในอาหารเหลว CMS ที่มีน้ำตาลผสมเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของอะซิโตน เอทานอล และบิวทานอล ตามวิธีการในข้อ 3.13.4 โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 14 วัน

### 3.8 การผลิตเอทานอลโดย *C. xyloolyticum* จากไฮโดรไลเสทของทางใบต้นจาก

นำไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้จากส่วนก้านทางใบหรือใบต้นจาก ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างเจือจางตามวิธีการในข้อ 3.4 ตัวอย่างละ 1 ลิตร เติมลงในบีกเกอร์ที่บรรจุองค์ประกอบของสูตรอาหาร CMS ในรูปของแข็ง ยกเว้นกลูโคส กวนผสมจนกระทั่งอาหาร CMS ในรูปของแข็งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไฮโดรไลเสทแต่ละชุดการทดลอง ปริมาณ 72 มิลลิลิตร เติมลงในขวดเซรัมขนาด 100 มิลลิลิตร ฟันแก๊สไนโตรเจนลงไปเป็นเวลา 1 นาที ต่อ 1 ขวดเพื่อไล่แก๊สออกซิเจนออก ปิดขวดด้วยจุกยางและ Aluminum crimp cap แล้วนำไฮโดรไลเสทไปผ่านการนิ่งมาเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมหัวเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 3.4 โดยวัดค่า OD<sub>600</sub> ของเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 1.0 ปริมาณ 8 มิลลิลิตร ทำการหมักในระบบกะที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มข้นของอะซิโตน เอทานอล และบิวทานอล ตามวิธีการในข้อ 3.13.4 เพื่อเลือกไฮโดรไลเสทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงสุดมาใช้ในการทดลองต่อไป การคำนวณผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) ดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} \text{ผลผลิตเอทานอลเทียบกับค่าในทางทฤษฎี (\%)} &= \frac{\text{ผลผลิตจริง}}{\text{ผลผลิตตามทฤษฎี}} \times 100\% \\ \text{ผลผลิตกรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล} &= \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)}} \\ \text{ผลผลิตกรัมเอทานอลต่อกรัม} &= \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำหนักร่องก่อนไฮโดรไลซิส}} \\ &\text{ปริมาณตัวอย่างก่อนไฮโดรไลซิส (กรัม)} \end{aligned}$$

### 3.9 การตรึงแบคทีเรีย

ศึกษาวิธีการตรึงแบคทีเรีย 2 รูปแบบ ได้แก่ การตรึงแบบกักขัง (Entrapment) ซึ่งวิธีการนี้เป็น การกักขังจุลินทรีย์ไว้ภายในรูพรุนของวัสดุตรึง และวิธีการตรึงแบบดูดติดหรือเกาะติดผิววัสดุตรึง (Physical adsorption/attachment) โดยการใช้วัสดุตรึงสังเคราะห์ที่มีความแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol ; PVA) และซิลิกา ดังวิธีการต่อไปนี้

#### 3.9.1 การตรึงแบคทีเรียใน PVA

##### 3.9.1.1 วิธีการตรึงแบคทีเรียแบบกักขังใน PVA

การตรึงแบคทีเรียโดยวิธีกักขังใน PVA ดัดแปลงตามวิธีการของ Bach and Dinh (2014) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4 มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำหัวเชื้อเริ่มต้นที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1 ในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร มาผสมกับสารละลาย PVA ที่แปรผันความเข้มข้น 7, 9, 10, 12 หรือ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และทำการหยดสารละลาย PVA ผสมกับหัวเชื้อแล้วด้วยเข็มฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ลงในกรดบอริกที่แปรผันความเข้มข้น 5 หรือ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำให้เกิดการฟอร์มตัวของเม็ดบีด PVA จากนั้นเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA โดยศึกษาจากลักษณะเม็ดบีดกลมและแยกเป็นเม็ดไม่ติดกันเพื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้นับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นและแบคทีเรียที่ถูกกักขังใน PVA หลังจากผ่านกระบวนการตรึงเซลล์ตามวิธีการข้อ 3.13.6

##### 3.9.1.2 ผลของบัพเฟอร์ต่อการบวมตัว (Swelling) ของเม็ดบีด PVA

นำเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ที่เตรียมได้จากวิธีการในข้อ 3.9.1.1 มาทดสอบผลของบัพเฟอร์ต่อการบวมตัวของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปขณะแช่ในน้ำดัดแปลงตามวิธีการของ Bach and Dinh (2014) โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 นำเม็ดบีดแช่ในสารละลายโซเดียมซัลเฟต (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ 2 แช่เม็ดบีดในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และชุดการทดลองที่ 3 เม็ดบีดที่ไม่ผ่านการแช่บัพเฟอร์ จากนั้นนำเม็ดบีดที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่



บัพเฟอร์จาก 3 ชุดการทดลองข้างต้น แขนงน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 2, 4, 6, 24, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง เพื่อวัดขนาดของเม็ดบีดแบคทีเรียที่เรียตรึงรูปที่เกิดการบวมตัวด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper) จากนั้นเลือกเม็ดบีดในชุดการทดลองที่มีการบวมตัวน้อยที่สุด ไปใช้ในการทดลอง ถัดไป

### 3.9.1.3 ผลของบัพเฟอร์ต่อความแข็งแรง (Strength) ของเม็ดบีด

นำเม็ดบีดแบคทีเรียที่เรียตรึงรูปใน PVA ที่เตรียมได้จากวิธีการในข้อ 3.9.1.1 มาทดสอบผลของบัพเฟอร์ต่อความแข็งแรงของเม็ดบีด ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการของ Bach and Dinh (2014) โดยนำเม็ดบีดที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่ในบัพเฟอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) และโซเดียมฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.9.1.2 ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบต่าง ๆ ได้แก่ 0, 1,200, 1,500, 1,725, 2,000, 2,220 และ 2,500 รอบต่อนาที เพื่อทดสอบความแข็งแรง (Strength) ของเม็ดบีด PVA ทำการทดสอบโดยใช้เม็ดบีดจำนวน 10 เม็ด จากนั้นนับการแตกหักของเม็ดบีดที่เกิดขึ้นจากการหมุนเหวี่ยงโดยโดยคำนวณเป็นค่าร้อยละความเสียหายของเม็ดบีด

นอกจากนี้ นำเม็ดบีดแบคทีเรียที่เรียตรึงรูปใน PVA ที่ผ่านการแช่โซเดียมซัลเฟตบัพเฟอร์มาศึกษาลักษณะพื้นผิวของ PVA และลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่เรียตรึงรูปที่ถูกกักขังอยู่ใน PVA ด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) ทั้งก่อนและหลังการใช้ในกระบวนการหมัก ตามวิธีการในข้อ 3.13.5

## 3.9.2 การตรึงแบคทีเรียในซิลิกา

### 3.9.2.1 การสังเคราะห์ซิลิกา

การสังเคราะห์ซิลิกาที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Boos *et al.* (2002) ทำการการสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกา (Mesoporous silica) โดยใช้สารตั้งต้น ได้แก่ Tetraethoxysilane (TEOS) และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่เป็นสายสั้น โข่งกึ่ง ซึ่งทำให้มีโอกาสนเกิดซิลิกาแบบผง (Mesoporous silica) ได้มากกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นเติม cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ปริมาณ 1.64 กรัม ลงในขวดสังเคราะห์เพื่อเป็นสารกำหนดโครงร่าง (Template) แล้วคนผสม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนกระทั่งสารละลายขุ่นขาว เมื่อครบ

กำหนดพักที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมเมทานอล และ TEOS ปริมาตร 13.20 และ 5.60 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยคนผสมตลอดเวลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำซิลิกามากรองและล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งพีเอชเป็นกลางและอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำซิลิกาไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เพื่อไล่ CTAB ออกจากซิลิกาทำให้เกิดรูพรุนภายในซิลิกา และทำให้ซิลิกามีความบริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำซิลิกาที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ย (Average pore diameter), ปริมาตรรูพรุนทั้งหมด (Total pore volume) และพื้นที่ผิวจำเพาะ (Specific surface area) โดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเก็บซิลิกาใน desiccators ก่อนการนำไปใช้งาน

### 3.9.2.2 วิธีการตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา

การผลิตแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา ทำโดยนำซิลิกาบริสุทธิ์ปริมาณ 2 กรัมใส่ลงในขวดเซรัมขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีการแปรผันค่าความขุ่น ( $OD_{600}$ ) เท่ากับ 1, 1.5 หรือ 2.5 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปิดขวดด้วยจุกยางและ aluminum crimp cap เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียจะฝังอยู่ในรูพรุนและบนซิลิกา จากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นและแบคทีเรียที่เกาะติดบนซิลิกาหลังจากกระบวนการตรึงเซลล์ตามวิธีการข้อ 3.13.6 นอกจากนี้ศึกษาลักษณะการเกาะติดของแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* บนวัสดุก่อนและหลังการนำไปใช้ในกระบวนการหมักด้วยเครื่อง SEM ตามวิธีการในข้อ 3.13.5

## 3.10 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระ

ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด ที่เตรียมได้จากการศึกษาข้างต้น โดยศึกษาผลของปริมาณแบคทีเรียที่ถูกตรึงในวัสดุต่อการผลิตเอทานอล ซึ่งมีการแปรผันปริมาณของเชื้อเริ่มต้นให้มี  $OD_{600}$  เท่ากับ 1, 1.5 และ 2.5 นำตัวอย่างแบคทีเรียตรึงตัวอย่างละ 1 กรัม เติมลงขวดเซรัมขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบของสารอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.5 (ยกเว้นกลูโคส) รวมกับไฮโดรไลสเสทก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ปริมาตร 72 มิลลิลิตร หมักตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก ๆ 48 ชั่วโมง จนกว่าอัตราการผลิตเอทานอลคงที่ พร้อมทั้งตรวจวัดพีเอชในตัวอย่าง โดยตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในน้ำหมักตามวิธีการข้อ 3.13.3 จากนั้นคำนวณผลผลิตของเอทานอลที่ได้

(กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำหนักแห้งก่อนไฮโดรไลซิส) หรือ (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอิสระ ทำการเตรียมชุดควบคุม (Positive control) 1 ชุด โดยใช้ปริมาณน้ำตาลรวม ได้แก่ น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลกาแลกโตส และน้ำตาลแรมโนส ความเข้มข้น 6.22, 2.76, 1.49, 0.75 และ 0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมเท่ากับปริมาณน้ำตาลในชุดตัวอย่าง (กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนไฮโดรไลเสทจากก้านทางต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ เตรียมชุดควบคุม (Negative control) โดยใช้สารอาหาร (ยกเว้นกลูโคส) ร่วมกับไฮโดรไลเสทที่กล่าวมาข้างต้นและไม่มีการเติมหัวเชื้อดัง ตารางที่ 3.1 ในการทดลองนี้จะคัดเลือกวัสดุเลี้ยงเซลล์ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดไปใช้ในการทดลองถัดไป

**ตารางที่ 3.1** ชุดตัวอย่างและชุดควบคุมในการศึกษา

ชุดตัวอย่าง/ชุดควบคุม	แหล่งคาร์บอน	เซลล์แบคทีเรียที่ใช้
ชุดตัวอย่างที่ 1	ไฮโดรไลเสทจากก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ	เซลล์อิสระ
ชุดตัวอย่างที่ 2	ไฮโดรไลเสทจากก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ	เซลล์ตรึงใน 10% PVA
ชุดตัวอย่างที่ 3	ไฮโดรไลเสทจากก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ	เซลล์ตรึงในซิลิกา
ชุดควบคุมที่ 1 (+)	น้ำตาลรวม	เซลล์ตรึงในซิลิกา
ชุดควบคุมที่ 2 (-)	ไฮโดรไลเสทจากก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ	ไม่เติมหัวเชื้อ
ชุดควบคุมที่ 3 (-)	ไฮโดรไลเสทจากก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ	เซลล์ตรึงที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclave (Killed cell)

### 3.11 การนำแบคทีเรียตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

นำแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอทานอลซึ่งเตรียมตามวิธีการในข้อ 3.9.2.2 ที่ผ่านการหมักเอทานอลแล้ว มาทำการกรองโดยกระดาษกรองแยกเอาเซลล์ตรึงในซิลิกาออกจากไฮโดรไลเซส โดยล้างแบคทีเรียตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำแบคทีเรียตรึงในซิลิกาที่กรองได้เติมลงในไฮโดรไลเซสที่เตรียมใหม่และทำการหมักซ้ำภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.7 และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน เพื่อนำไปตรวจวัดความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) โดยนำแบคทีเรียตรึงข้างต้นไปใช้ในการหมักเอทานอลซ้ำเรื่อย ๆ จนกระทั่งปริมาณความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นมีความเข้มข้นลดลงต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับหมักครั้งแรก

### 3.12 การวัดการดูดซับของซิลิกาและ EPS ของแบคทีเรีย

นำซิลิกาปริมาณ 1 กรัม ที่เตรียมจากวิธีการข้อ 3.9.2.1 เติมลงในขวดเซรัมขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีไฮโดรไลเซส ปริมาณ 72 มิลลิลิตร และชุดควบคุมที่เป็น killed cell ซึ่งใช้แบคทีเรียตรึงซิลิกาที่เตรียมจากวิธีการข้อ 3.9.2.2 และผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่ 14 ของการทดลอง เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้ง ได้แก่ เพอร์ฟูรัล 5-HMF กรดแอสติค และกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ตามวิธีการข้อ 3.13.2

### 3.13 วิธีการวิเคราะห์

#### 3.13.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจาก

นำตัวอย่างทางใบต้นจากทั้ง 2 ส่วนที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นจากข้อ 3.2 และ 3.3 มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินด้วยเครื่อง ANKOM<sup>200</sup> โดยใช้ Neutral Detergent Fiber (NDF) และ Acid Detergent Fiber (ADF) in Feeds Filter Bag Technique ดังนี้

ชั่งน้ำหนักของถุงกรอง ( $W_1$ ) ใส่ตัวอย่าง 0.45-0.55 กรัม ลงในถุงกรอง ( $W_2$ ) และเว้นระยะห่างจากขอบบนของถุงกรอง 4 มิลลิเมตร เพื่อปิดผนึกถุงกรองชั่งน้ำหนักถุงกรองเปล่า เพื่อทำเป็นชุดควบคุม ( $C_1$ ) วางถุงกรองชั้นละ 3 ถุง ซึ่งในการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากที่สุด 24 ถุง

โดยต้องใช้ทั้งหมด 9 ชั้น เติม ND Solution 1,900-2,000 มิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง 24 ถัง ลงในท่อของเครื่องวิเคราะห์เยื่อใยแต่หากวิเคราะห์ตัวอย่างน้อยกว่า 20 ถัง เติม ND Solution 100 มิลลิลิตรต่อถัง (โดยปริมาตรขั้นต่ำเท่ากับ 1,500 มิลลิลิตร) เติม Sodium sulfite 20 กรัม ต่อ 50 มิลลิลิตรของ ND Solution กดปุ่มเปิด Agitate และ Heat ตั้งเวลา 75 นาที แล้วปิดฝาเครื่อง กดปุ่มปิด Agitate และ Heat จากนั้นเปิดวาล์วเพื่อปล่อยสารละลายออกจากเครื่อง และปิดวาล์ว แล้วเปิดฝาเครื่อง จากนั้นเติมน้ำร้อน 1,900-2,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส เพื่อชะล้างสารละลายออกจากตัวอย่าง โดยกดปุ่มเปิด Agitate และ Heat เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้งหรือจนกระทั่งพีเอชเป็นกลาง นำถังกองออกจากเครื่องและเอาน้ำออกจากตัวอย่างโดยแช่ในสารละลายอะซิโตน 3-5 นาที จากนั้นนำถังกองออกมาอบแห้งที่อุณหภูมิ  $102 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ แล้วเก็บในโถดูดความชื้นจนอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก ( $W_3$ ) ทำการวิเคราะห์ต่อโดยวิธีการ Acid Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique (ANKOM Technology Method 6)

#### ทำการวิเคราะห์โดย

ชั่งน้ำหนักของถังกอง ( $W_1$ ) ใส่ตัวอย่าง 0.45-0.55 กรัม ลงในถังกอง ( $W_2$ ) และเว้นระยะห่างจากขอบบนของถังกอง 4 มิลลิเมตร เพื่อปิดผนึกถังกองชั่งน้ำหนักถังกองเปล่า เพื่อทำเป็นชุดควบคุม ( $C_1$ ) วางถังกองชั้นละ 3 ถัง ซึ่งในการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากที่สุด 24 ถัง โดยต้องใช้ทั้งหมด 9 ชั้น เติม AD Solution 1,900-2,000 มิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง 24 ถัง ลงในท่อของเครื่องวิเคราะห์เยื่อใยแต่หากวิเคราะห์ตัวอย่างน้อยกว่า 20 ถัง เติม AD Solution 100 มิลลิลิตรต่อถัง โดยปริมาตรขั้นต่ำเท่ากับ 1,500 มิลลิลิตร เติม Sodium sulfite 20 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตรของ ND Solution กดปุ่มเปิด Agitate และ Heat ตั้งเวลา 60 นาที แล้วปิดฝาเครื่อง กดปุ่มปิด Agitate และ Heat จากนั้นเปิดวาล์วเพื่อปล่อยสารละลายออกจากเครื่อง ปิดวาล์ว แล้วเปิดฝาเครื่อง จากนั้นเติมน้ำร้อน 1900-2000 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส เพื่อชะล้างสารละลายออกจากตัวอย่าง โดยกดปุ่มเปิด Agitate และ Heat เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้งหรือจนกระทั่งพีเอชเป็นกลางนำถังกองออกจากเครื่อง เอาน้ำออกจากตัวอย่างโดยแช่ในสารละลายอะซิโตน 3-5 นาที จากนั้นนำถังกองออกมาอบแห้งที่อุณหภูมิ  $102 \pm 2.0$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ แล้วเก็บในโถดูดความชื้น จนอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก ( $W_3$ )

### 3.13.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารยับยั้ง (Inhibitors)

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารผลิตภัณฑ์พลอยได้ ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์หลังจากผ่านการย่อยสลาย (Hydrolysis) เช่น อนุพันธ์ฟูแรน ได้แก่ สารเฟอร์ฟูรัล และ 5-HMF สารประกอบฟีนอลิก และกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

(1) วิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์ฟูแรน ได้แก่ เฟอร์ฟูรัล 5-HMF และกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดัดแปลงตามวิธีการของ Gaspar and Lopes (2009) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX (30 m x 320  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m) นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาทำการกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.22  $\mu$ m Flow แก๊สขาเข้า 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ Oven เริ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เพิ่ม 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 26 นาที อุณหภูมิคอลัมน์ขาเข้าและตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด flame ionization detector (FID) เท่ากับ 250 และ 275 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้โดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับสารละลายมาตรฐาน

(2) วิเคราะห์สารประกอบที่มาจากลิกนิน เช่น สารประกอบฟีนอลิก ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใช้วิธี Modification of the Folin-Ciocalteu method ตามวิธีการของ Ergul *et al.* (2011) โดยนำตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรเติมลงใน Folin-Ciocalteu phenol reagents ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank

### 3.13.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาล

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ โซโลส อะราบิโนส กลูโคส กาแลกโตส แรมโนส ฟรุคโตส และแมนโนส โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ดัดแปลงตามวิธีการของ AOAC international (1993) ใช้คอลัมน์ Zorbax NH<sub>2</sub> ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร หนา 0.5 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ตัวตรวจวัด ชนิด refractive index detector (RID) และตัวทำละลาย (Mobile phase) อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) 75 เปอร์เซ็นต์

### 3.13.4 การวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

วิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ดัดแปลงจากวิธีการของ (ประภัสสร เหลืองหิรัญวุฒิ และภิมวัจน์ วัจนาคมกุลม, 2556) ซึ่งทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง (GC Agilent 7820A) ใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX (30 m x 320  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m) โดยนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.22  $\mu$ m โดย Flow แก๊สขาเข้า 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ Oven เริ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เพิ่ม 5 องศาเซลเซียส จนถึง 70 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 12 นาที อุณหภูมิของคอลัมน์ขาเข้าและตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด flame ionization detector (FID) เท่ากับ 240 และ 250 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

### 3.13.5 การศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุตั้ง และแบคทีเรียตรึง โดย SEM

ศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุตั้ง และเซลล์แบคทีเรียที่ถูกกักขังในวัสดุตั้งทั้ง 2 ชนิด โดยนำตัวอย่างมาติดบนแท่นวางตัวอย่าง (Stub) แล้วนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง sputter coater และส่องดูด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) สำหรับการศึกษาลักษณะแบคทีเรียตรึง (ก่อนทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล) ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนฉาบทองเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างด้วย glutaraldehyde ที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หรือ formaldehyde ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง นำตัวอย่างมา Fix ครั้งที่ 2 ด้วย OsO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying

### 3.13.6 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียและน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง

(1) การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่ในซิลิกา ดัดแปลงจากวิธีการของ Khongkhaem *et al.* (2011); Tosu *et al.* (2015) โดยนำแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาจำนวน 1 กรัม เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วที่บรรจุเซลล์ตรึงรูปแบคทีเรีย ทำการเขย่าเพื่อให้แบคทีเรียหลุดออกจากตัวกลาง โดยใช้เครื่อง Sonicator เป็นเวลา 1 นาที และทำการเขย่าด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 2 นาทีโดยทำซ้ำ 3 ครั้ง ก่อนนำมาหาปริมาณ

แบคทีเรีย (CFU ต่อกรัมวัสดุตั้งรูป) จากนั้นนำสารละลายเซลล์มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี 10-fold dilution และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Total plate count

(2) วิธีการนับจำนวนแบคทีเรียใน PVA ดัดแปลงจากวิธีการของ *kumar et al.* (2012) นำแบคทีเรียตรึงใน PVA ปริมาณ 1 กรัม เติมในลงใน Sodium pyrophosphate ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และให้ความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที เพื่อให้เม็ดปีทละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการเขย่าด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำมาหาปริมาณแบคทีเรีย จากนั้นนำสารละลายเซลล์มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium โดยวิธี 10-fold dilution และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Total plate count

(3) การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ดัดแปลงจากวิธีการของ *Khongkhaem et al.* (2011); *Kumar et al.* (2012) วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำสารละลายเซลล์เติมลงใน Crucible นำไปชั่งน้ำหนัก และอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักและนำน้ำหนักเซลล์ที่ได้มาหาค่าส่วนต่างระหว่างน้ำหนักของสารละลายเซลล์ก่อนและหลังอบ ซึ่งจะได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด



## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของก้านทางใบและใบต้นจาก หลังจากนำตัวอย่างมาปรับสภาพเบื้องต้นโดยการบดและผ่านตะแกรงร่อนที่มีขนาดระหว่าง 0.10-0.25 มิลลิเมตร พบว่ามีปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 35.29 และ 30.23 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลสปริมาณ 26.17 และ 22.20 เปอร์เซ็นต์ และพบลิกนินปริมาณ 14.00 และ 13.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของก้านทางใบและใบต้นจากที่ได้มีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ Tamunaidu and Saka (2011) ที่พบปริมาณเซลลูโลสในทางใบและใบต้นจากปริมาณ 35.10 และ 28.90 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนเฮมิเซลลูโลสมีปริมาณ 23.60 และ 26.4 เปอร์เซ็นต์ และลิกนินมีปริมาณ 17.80 และ 32.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของ Phaiboonsilpa *et al.* (2011) รายงานองค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากที่มีการผสมทั้งก้านทางใบและใบต้นจากอยู่ในตัวอย่างเดียวกันมีค่าเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 25.60 และ 18.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่างานวิจัยนี้เล็กน้อย ในขณะที่พบปริมาณลิกนินมากกว่าที่ 23.70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากที่พบในงานวิจัยนี้มีความใกล้เคียงกับพืชในตระกูลปาล์มชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทน ได้แก่ ทางใบปาล์มน้ำมัน ลำต้นปาล์มน้ำมัน และทะลายปาล์มเปล่า ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินอยู่ในช่วง 40.01-46.50 เปอร์เซ็นต์ 25.30-33.80 เปอร์เซ็นต์ และ 24.51-32.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Kristiani *et al.*, 2013); (Ang *et al.*, 2013); (Kim and Kim 2013)

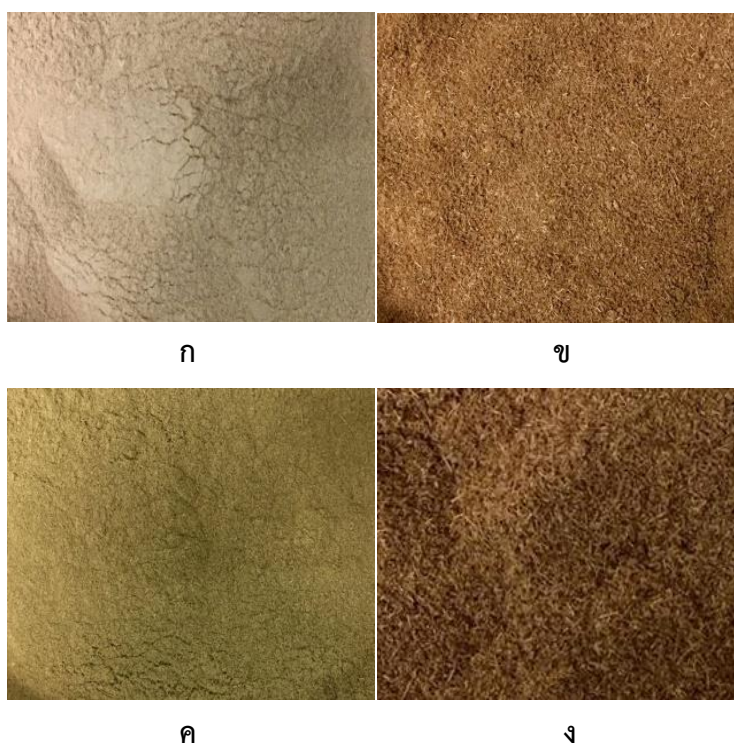
เนื่องจากต้นจากเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ไม่มีแก่นไม้ (non-woody) จึงมีความแตกต่างจากไม้เนื้อแข็ง (hard wood) ที่มีปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสอยู่ในช่วง 22.00-40.00 เปอร์เซ็นต์ และ 20.00-38.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าพืชชนิดที่ไม่มีแก่นไม้ แต่มีปริมาณลิกนินน้อยกว่าไม้เนื้ออ่อน (soft wood) โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 30.00-55.00 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีความเป็นเยื่อไยน้อยกว่าไม้เนื้ออ่อนจึงทำให้มีปริมาณลิกนินน้อยกว่า อย่างไรก็ตามองค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจากขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์ต้นจาก อายุ และสภาพแวดล้อมในการปลูก เป็นต้น ด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่กล่าวมาข้างต้น ประกอบกับลักษณะเนื้อไม้ที่อ่อนจึงง่ายต่อการตัดและบดให้มีขนาดเล็กลง ทำให้ลดต้นทุนและพลังงานในการลดขนาด ทางใบต้นจากจึงมีประสิทธิภาพใน

การนำไปใช้สำหรับการผลิตสารเคมี (biochemicals) และเชื้อเพลิงชีวภาพได้ (biofuels) (Phaiboonsilpa *et al.*, 2011)

เมื่อทำการปรับสภาพก้านทางใบและใบต้นจากด้วยต่างเงื่อนไข โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง เป็นเวลา 30 นาที พบว่าภายหลังการปรับสภาพทำให้ปริมาณเซลลูโลสในก้านทางใบและใบต้นจากเพิ่มขึ้นจาก 35.29 และ 30.23 เปอร์เซ็นต์ เป็น 48.52 และ 44.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไขช่วยเพิ่มการพองตัวและเกิดการบวมภายในโครงสร้างของวัสดุ ทำให้พื้นที่ผิวในการสัมผัสเพิ่มขึ้น และสามารถแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งมีโครงสร้างแบบผลึกกับเซลลูโลส โดยการสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างลิกนินกับไซแลน (Silverstein *et al.*, 2007) ส่วนเฮมิเซลลูโลสถูกสลายตัวทำให้ลิกนินหลุดออกมา ส่งผลให้สีของก้านทางใบและใบต้นจากภายหลังการปรับสภาพมีสีเข้มขึ้น (ภาพที่ 4.1) รวมทั้งส่งผลทำให้โครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลสลดลง (Balat, 2011; Asgher *et al.*, 2013) ในขณะที่ปริมาณของเฮมิเซลลูโลส ในตัวอย่างทางใบและใบลดลง เนื่องจากสูญเสียไปในระหว่างขั้นตอนการปรับสภาพ โดยพบว่าปริมาณวัตถุดิบก้านทางใบและใบต้นจากภายหลังการปรับสภาพลดลงจาก 100 กรัม เหลือเท่ากับ 60.71 และ 45.12 กรัม ตามลำดับ อีกทั้งพบปริมาณลิกนินในตัวอย่างก้านทางใบและใบต้นจากภายหลังการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไขมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 13.84 และ 13.96 เปอร์เซ็นต์ เป็น 14.00 และ 22.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิและระยะเวลาข้างต้น ไม่สามารถกำจัดลิกนินได้โดยตรงแต่ทำให้ลิกนินหลุดออกมาโดยผ่านการละลายของเฮมิเซลลูโลสเท่านั้น (ยุทธศักดิ์ สุขการี, 2551)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของก้านทางใบและใบต้นจากก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Parts of nipa palm	Chemical composition (%)		
	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Non-treated fronds	35.29±0.24	26.17±0.10	13.84±0.17
Pretreated fronds	48.52±0.28	19.30±0.12	14.00±0.20
Non-treated leaves	30.23±0.18	22.20±0.19	13.96±0.15
Pretreated leaves	44.01±0.20	12.46±0.13	22.04±0.10



ภาพที่ 4.1 สีและลักษณะเนื้อผิวของก้านทางใบและใบต้นจากต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ก, ค) และผ่านการปรับสภาพ (ข, ง)

## 4.2 องค์ประกอบของไฮโดรไลสเททจากทางใบต้นจาก

### 4.2.1 ชนิดและปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลสเทท

หลังจากการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง (dilute acid hydrolysis) ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที (Chemin *et al.*, 2015) เพื่อย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด และย่อยสลายเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส (Greetham *et al.*, 2016) พบว่าในไฮโดรไลสเททของก้านทางใบและใบต้นจากทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยดิวไฮดรอกไซด์พบชนิดน้ำตาลเหมือนกัน คือ น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอะราบิโนส ในส่วนน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลกโตส และน้ำตาลแรมโนส (ตารางที่ 4.2) โดยชนิดน้ำตาลที่พบสูงสุดในทุกตัวอย่าง ได้แก่ น้ำตาลไซโลส รองลงมา คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลกาแลกโตส และน้ำตาลแรมโนส แต่ไม่พบน้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลแมนโนส

เนื่องจากวัสดุหลักในเซลลูโลสจากทางใบต้นจากนั้นประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งเฮมิเซลลูโลสมีทั้งโครงสร้างที่เป็นสายโซ่ตรงและโซ่กิ่งของน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมจึงทำให้สามารถพบน้ำตาลได้ทั้ง 2 ประเภท อีกทั้งต้นจากเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ไม่มีแกนไม้ และมีโครงสร้างประเภท glucuronoarabinoxylan จึงทำให้พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส หรือน้ำตาลอะราบิโนสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีความแตกต่างจากไม้เนื้อแข็งประเภท glucuronoxylan ที่มีน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลักในวัตถุดิบ (Jong and Gosselink, 2014) นอกจากนี้ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส (Cao *et al.*, 2009) โดยเฮมิเซลลูโลสถูกย่อยสลายได้ในสถานะที่ไม่รุนแรง และที่อุณหภูมิต่ำกว่าเซลลูโลส (Tamunaidu and Saka, 2011) ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษานี้จึงทำให้เฮมิเซลลูโลสที่ถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส และทำให้พบปริมาณน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมสูงกว่าน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมที่เกิดจากเซลลูโลส ตลอดจนเฮมิเซลลูโลสมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ไม่เป็นเส้นตรง และมีลำดับของหน่วยย่อยน้ำตาลที่เรียงแบบสุ่ม จึงทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่างไซโลสถูกทำลายได้ง่ายด้วยกรด (Balat, 2011) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tamunaidu and Saka (2011) รายงานว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ในเฮมิเซลลูโลสของก้านทางใบและใบต้นจากประกอบด้วยน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม จำพวกน้ำตาลไซโลส

ทั้งนี้พบว่าไฮโดรไลสเททจากก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้น้ำตาลไซโลสสูงที่สุด ปริมาณ 6.22 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) และเป็นไฮโดรไลสเททที่มีปริมาณน้ำตาลรวมสูงที่สุดด้วย

เท่ากับ 11.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับปริมาณน้ำตาลในชุดตัวอย่างอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังจะเห็นได้ว่ามีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ (ตารางที่ 4.1) จึงทำให้พบน้ำตาลได้มากกว่าในตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ รองลงมา ได้แก่ ก้านทางใบต้นจากที่ผ่านการปรับสภาพมีปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 8.27 กรัมต่อลิตร ใบจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีปริมาณเท่ากับ 7.21 กรัมต่อลิตร และใบจากที่ผ่านการปรับสภาพมีปริมาณเท่ากับ 4.87 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าไฮโดรไลสจากวัสดุที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีองค์ประกอบของน้ำตาลสูงกว่าวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ เนื่องจากตัวอย่างไฮโดรไลสที่ไม่ผ่านการปรับสภาพไม่มีการสูญเสีย น้ำตาลบางส่วนจากขั้นตอนการปรับสภาพ (ตารางที่ 4.4) แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตน้ำตาลที่ได้ต่ำกว่าค่าทฤษฎีประมาณ 3-7 เท่า และคิดเป็น 14.53-30.07 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าทางทฤษฎี (ตารางที่ 4.4) ทั้ง 4 ชุดการทดลอง เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพและการย่อยสลายไม่เหมาะสมซึ่งไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการให้ผลผลิตน้ำตาลในปริมาณที่สูง ดังจะเห็นได้เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Phaiboonsilpa *et al.* (2011) ซึ่งศึกษาการย่อยสลาย (hydrolysis) ทางใบต้นจากด้วยเทคนิค (hot compressed water) โดยการใช้อุณหภูมิ 2 อุณหภูมิ ในการทำการย่อยสลาย โดยในการย่อยสลายครั้งที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 MPa เป็นเวลา 30 นาที ในการย่อยสลายครั้งแรกจะทำให้เฮมิเซลลูโลส สลายออกมาพร้อมกับลิกนินบางส่วน และในขั้นตอนการย่อยสลายครั้งที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 MPa เป็นเวลา 30 นาที พบชนิดและปริมาณ น้ำตาลในตัวอย่างทางใบต้นจากที่ไม่แยกใบออกจากทางใบ แตกต่างจากการศึกษานี้โดยพบไซโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ 114 กรัมต่อลิตร น้ำตาลอะราบิโนส 43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกาแลกโตส 13 กรัมต่อลิตร น้ำตาลแมนโนส 17 กรัมต่อลิตร น้ำตาลฟรุกโตส 5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลแรมโนส 4 กรัมต่อลิตร เนื่องจากใช้วิธีการในการย่อยสลายแตกต่างกัน โดยเฉพาะการใช้ อุณหภูมิสูง 230-260 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ได้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่สูงกว่าการศึกษานี้ และจากการศึกษาของ Tamunaidu and Saka (2011) ได้รายงานว่าชนิดและปริมาณน้ำตาลใน ตัวอย่างทางใบที่ไม่ได้มีการเอาใบออกและตัวอย่างใบต้นจากมีชนิดน้ำตาลเหมือนกับการศึกษานี้ แต่มี ปริมาณน้ำตาลแตกต่างกัน โดยพบน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 164 และ 173 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 30 และ 29 กรัมต่อลิตร น้ำตาลอะราบิโนสเท่ากับ 27 และ 18 กรัมต่อลิตร น้ำตาล แมนโนสปริมาณ 10 และ 4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกาแลกโตสปริมาณ 19 และ 24 กรัมต่อลิตร และ น้ำตาลแรมโนสปริมาณ 2 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบปริมาณน้ำตาลในทางใบมากกว่าใบ ต้นจาก เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ปริมาณสูงกว่า จะเห็นได้ว่า วิธีการและสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพและการย่อยสลาย รวมถึงชนิดในแต่ละส่วนของวัตถุดิบเป็น ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่ได้แตกต่างกันในแต่ละการศึกษา และจากรายงานของ Chemin *et al.* (2015) ซึ่งวิเคราะห์และจำแนกโครงสร้างขององค์ประกอบที่เกิดขึ้นในไฮโดรไลส

ไม้ปืท โดยการแปรผันความเข้มข้นของกรดอยู่ในช่วง 0.2-2.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-90 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในช่วง 10-420 นาที ในการย่อยสลายไม้ปืทโดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที พบน้ำตาลไซโลสเพียงชนิดเดียว เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษาเป็นไม้เนื้อแข็งซึ่งมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในรูปของไซแลนในสัดส่วนที่สูงกว่าทางไบตันจากที่เป็นไม้เนื้ออ่อน

**ตารางที่ 4.2** ชนิดและปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างไฮโดรไลสของทางไบตันจากที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

Hydrolyzates	Sugar composition (g/L)					
	Xylose	Glucose	Arabinose	Galactose	Rhamnose	Total
Non-treated frond hydrolyzates	6.22±0.42	2.76±0.10	1.49±0.10	0.75±0.01	0.21±0.01	11.43 <sup>a</sup>
Pretreated frond hydrolyzates	5.17±0.17	2.13±0.10	0.66±0.01	0.21±0.01	0.10±0.01	8.27 <sup>b</sup>
Non-treated leaf hydrolyzates	5.10±0.10	0.83±0.01	0.30±0.01	0.70±0.01	0.28±0.01	7.21 <sup>c</sup>
Pretreated leaf hydrolyzates	1.68±0.07	1.39±0.06	0.48±0.01	1.02±0.09	0.30±0.04	4.87 <sup>d</sup>

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างแตกต่างกันแสดงถึงปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดตัวอย่างต่างๆ

#### 4.2.2 ชนิดและปริมาณของสารยับยั้ง (Inhibitors) ในไฮโดรไลเสท

เนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรด นอกจากจะให้ผลผลิตน้ำตาลแล้ว ยังพบสารประกอบอื่น ๆ ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการสลายตัวของน้ำตาลและการย่อยสลายของลิกโนเซลลูโลส (degradation by products) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล ได้แก่ กลุ่มอนุพันธ์ฟูแรน (furans) เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-Hydroxymethylfurfural; 5-HMF) กลุ่มกรดอ่อน (weak acids) เช่น กรดแอสติค และกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) (Gao *et al.*, 2016; Palmqvist and Hagerdal, 2002) จากการวิเคราะห์สารยับยั้งดังกล่าวพบปริมาณของสารประกอบแต่ละชนิดแตกต่างกันในไฮโดรไลเสทของทางใบต้นจาก โดยสารยับยั้งที่พบในปริมาณมากที่สุด ได้แก่ กรดแอสติค เนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลายเอมิเซลลูโลสสามารถเกิดกรดแอสติคซึ่งถูกย่อยสลายออกมาพร้อมน้ำตาล และพบปริมาณกรดแอสติคในไฮโดรไลเสทของตัวอย่างต่าง ๆ อยู่ในช่วง 1.10- 2.87 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.3) โดยพบมากที่สุดในไฮโดรไลเสทของก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีปริมาณเท่ากับ 2.87 กรัมต่อลิตร รองลงมา ได้แก่ ใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ มีปริมาณ 2.08 กรัมต่อลิตร เพราะตัวอย่างทั้ง 2 ส่วนมีปริมาณสัดส่วนของเอมิเซลลูโลสสูงกว่าในตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง (ตารางที่ 4.1) และเมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรดจึงส่งผลต่อเอมิเซลลูโลสที่เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของน้ำตาล และกรดแอสติค (Balat, 2011) จึงทำให้พบกรดแอสติคในปริมาณที่สูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ และจากรายงานที่ผ่านของ Palmqvist and Hagerdal (2000) พบว่าสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในไฮโดรไลเสท ได้แก่ กรดแอสติค ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เฟอร์ฟูรัลความเข้มข้น 1.2 กรัมต่อลิตร และ 5-HMF ความเข้มข้น 1.3 กรัมต่อลิตร มีผลในการยับยั้งการเจริญ การทำงานของเอนไซม์ และเพิ่มระยะ lag phase ของยีสต์ *S. cerevisiae* ให้นานขึ้น ซึ่งส่งผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเอทานอล และประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารยับยั้งที่พบในงานวิจัยนี้ต่ำกว่างานวิจัยข้างต้นจึงอาจไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในระบบการหมักเอทานอล

ส่วนสารประกอบในกลุ่มอนุพันธ์ฟูแรน ได้แก่ เฟอร์ฟูรัล พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง 0.13-0.22 กรัมต่อลิตร และ 5-HMF พบอยู่ในช่วง 0.02-0.04 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบปริมาณความเข้มข้นเฟอร์ฟูรัลสูงกว่า 5-HMF เนื่องจากอุณหภูมิและความเข้มข้นกรดที่ใช้เหมาะสำหรับการย่อยสลายเอมิเซลลูโลสเพื่อให้ได้มาซึ่งน้ำตาลไซโลสซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นเฟอร์ฟูรัล (chemin *et al.*, 2015) เนื่องจากกรดจะทำหน้าที่เป็นตัวดึงโมเลกุลของไฮโดรเจนและออกซิเจนออกจากโมเลกุลของน้ำตาล เมื่อเกิดปฏิกิริยานี้จะได้เป็นเฟอร์ฟูรัล จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง (คุชฎี อดุภาพ, 2550) จากการศึกษาของ Gao *et al.* (2016) ศึกษาการย่อยสลายเอมิเซลลูโลสจากต้นป๊อบบาร์ โดยใช้การย่อย

สลายด้วยวิธี hydrothermal ที่อุณหภูมิ 180-340 องศาเซลเซียส พบปริมาณสารยับยั้งจากการย่อยสลาย ได้แก่ เพอร์ฟูรัล ในช่วง 0.23-1.35 กรัมต่อลิตร และกรดแอสติคิกในช่วง 0.18-2.73 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าสารยับยั้งที่พบในงานวิจัยนี้ เนื่องจากชนิดวัตถุดิบ และสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพและการย่อยสลาย เช่น ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และความดันที่ใช้ ส่งผลต่อการทำลายโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้นเป็นสารประกอบชนิดอื่น ๆ เช่น กลุ่มฟูแรน และกรดแอสติคิกที่เกิดจากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม เช่น น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอะราบิโนส จากนั้นน้ำตาลดังกล่าวถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วได้เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ คือ เพอร์ฟูรัล ในขณะที่น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลกโตส และน้ำตาลแรมโนส เกิดการสลายตัวเปลี่ยนรูปเป็น 5-HMF (Phaiboonsilpa *et al.*, 2011) นอกจากนี้พบกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกในไฮโดรไลเสทซึ่งอยู่ในช่วง 0.02-0.12 กรัมต่อลิตร โดยเกิดจากการย่อยสลายลิกนินเพียงบางส่วน เพราะลิกนินมีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ และเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่ต่อกันแบบส้อมเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยภายในโครงสร้างจะเชื่อมต่อระหว่างคาร์บอน 2 โมเลกุล และฟีนิลโพรพานอยด์ (phenyl propanoid) ทำให้ลิกนินทนทานต่อการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์ (Tamunaidu and Saka, 2011) การศึกษานี้พบสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดในตัวอย่างไบตันจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวไม่ได้ถูกกำจัดลิกนินออกจากวัตถุดิบ จึงทำให้พบปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกย่อยสลายจากลิกนินสูงกว่าไบตันจากการปรับสภาพ อีกทั้งในไบตันจากมีปริมาณลิกนินที่สูงกว่าส่วนก้านทางไบตันจากอีกด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tamunaidu and Saka (2011) ที่พบปริมาณลิกนินในไบตันจากปริมาณ 33.80 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าทางไบตันจากซึ่งพบในปริมาณ 19.70 เปอร์เซ็นต์ มีสาเหตุมาจากภายในไบตันจากมีการแตกแขนงของเส้นกึ่งกลางใบสูงซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างของลิกนินจึงทำให้ส่วนนี้มีความแข็งแรง จากการศึกษาของ Phaiboonsilpa *et al.* (2011) พบว่าการปรับสภาพทางไบตันจากโดยวิธี Hot-compressed water ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูงประมาณ 230-270 องศาเซลเซียส ก่อให้เกิดสารยับยั้งในปริมาณสูง โดยพบสารยับยั้งในกลุ่มของอนุพันธ์ฟูแรน ได้แก่ เพอร์ฟูรัล ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร 5-HMF ปริมาณ 7 กรัมต่อลิตร และพบ Sinapyl alcohol ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกที่ถูกย่อยจากลิกนิน ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เนื่องจากวิธีการในการปรับสภาพและย่อยสลายวัตถุดิบมีความแตกต่างกันส่งผลต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นจึงพบว่ามีปริมาณสูงกว่า เมื่อใช้สภาวะอุณหภูมิที่รุนแรงกว่า



**ตารางที่ 4.3** ชนิดและปริมาณสารยับยั้งในตัวอย่างไฮโดรไลเสทของก้านทางใบและใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไข

Hydrolyzates	Lignocellulose-derived inhibitors (g/L)			
	Acetic acid	Furfural	5-HMF	Total phenolics
Non-treated frond hydrolyzates	2.87±0.04	0.17±0.001	0.03±0.0008	0.02±0.0001
Pretreated frond hydrolyzates	1.10±0.08	0.22±0.001	0.04±0.0004	0.02±0.0001
Non-treated leaf hydrolyzates	2.08±0.06	0.13±0.001	0.02±0.0004	0.12±0.0002
Pretreated leaf hydrolyzates	2.03±0.07	0.15±0.001	0.03±0.0004	0.02±0.0002

ตารางที่ 4.4 แสดงมวลของทางใบและใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพ

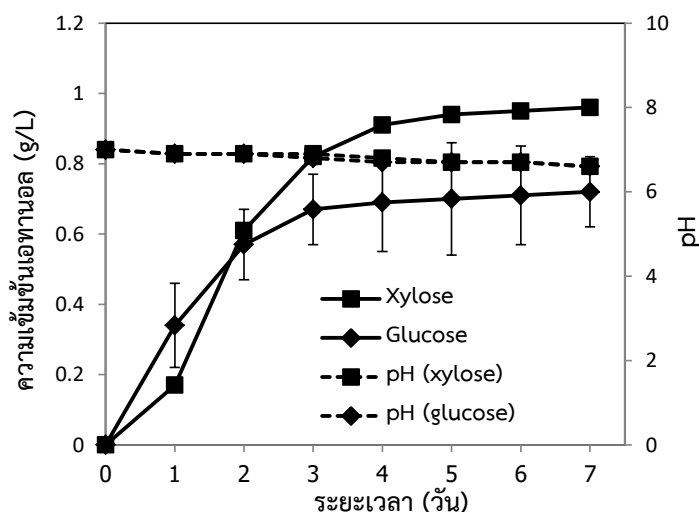
วัตถุดิบ	วัตถุดิบเริ่มต้น (g)	วัตถุดิบหลังจาก การปรับสภาพ ด้วยต่าง (g)	เซลลูโลส + เฮมิเซลลูโลส (g)	น้ำตาลทาง ทฤษฎี (g)	น้ำตาลที่สูญเสีย ระหว่างการ ปรับสภาพ (g)	น้ำตาลที่ ได้จริง (g)	น้ำตาลที่ ได้จริง (%)	น้ำตาลหลังจากการ หมัก (วันที่ 7) (g/L)
ทางใบไม่ผ่านการ ปรับสภาพ	100	-	37.77	38.01	-	11.43	30.07	ND
ใบไม่ผ่านการ ปรับสภาพ	100	-	27.49	27.68	-	8.27	29.88	ND
ทางใบที่ผ่านการ ปรับสภาพ	100	60.71	46.00	47.72	1.02	7.21	15.11	ND
ใบที่ผ่านการปรับ สภาพ	100	45.12	31.87	33.52	1.38	4.87	14.53	ND

-, ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ND = Not detected

#### 4.3 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* จากน้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม

การศึกษาผลผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากกระบวนการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ซึ่งเติมตัวแทนน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ น้ำตาลไซโลส หรือ น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ในปริมาณชุดการทดลองละ 20 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* JCM 15735 สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดได้ แต่ไม่พบอะซิโตน และบิวทานอล โดยการใช้น้ำตาลไซโลสจะได้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส (ภาพที่ 4.2) ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 0.96 กรัมต่อลิตร (0.05 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) และจากน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 0.72 กรัมต่อลิตร (0.04 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) และค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยหลังผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งอยู่ในช่วง 6.8-7.0 สอดคล้องกับงานวิจัยของ ประภัสสร เหลืองศิริวุฒิ และภีมวัจน์ วัจนาคมกุลม (2556) ที่รายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายของเฮมิเซลลูโลส โดยสามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลความเข้มข้น 0.48 กรัมต่อลิตร และผลิตเอทานอลได้สูงสุดความเข้มข้น 0.46 กรัมต่อลิตร และสูงกว่าแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* 0.08 กรัมต่อลิตร และ *C. butyricum* 0.06 กรัมต่อลิตร เนื่องจากแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้มีวิถีเมแทบอลิซึมที่มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ บิวทานอล และอะซิโตนได้สูงกว่าเอทานอล เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Qureshi *et al.* (2008) มีรายงานว่าแบคทีเรีย *C. beijerinckii* 1BA10 สามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม โดยใช้น้ำตาลเริ่มต้นปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร ในการผลิต อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE) โดยการหมักน้ำตาลไซโลสให้ปริมาณความเข้มข้นของ ABE เท่ากับ 9.60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคสที่ให้ปริมาณความเข้มข้นของ ABE เท่ากับ 9.90 กรัมต่อลิตร เนื่องจากแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* มีความสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของวัสดุ ลิกโนเซลลูโลสที่มีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเป็นองค์ประกอบอยู่ร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น นอกจากนี้จากรายงานที่ผ่านมายังพบว่าแบคทีเรียในจีนัส *Clostridium* เช่น *Clostridium cellulovorans* มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส (Xylanase) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม เฮมิเซลลูเลส (Hemicellulases) ทำหน้าที่ในการย่อยโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวก xylan ที่ได้จากเฮมิเซลลูโลสของไม้ ก่อนจะถูกย่อยต่อเป็นน้ำตาลไซโลสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย Kosugi *et al.* (2001)

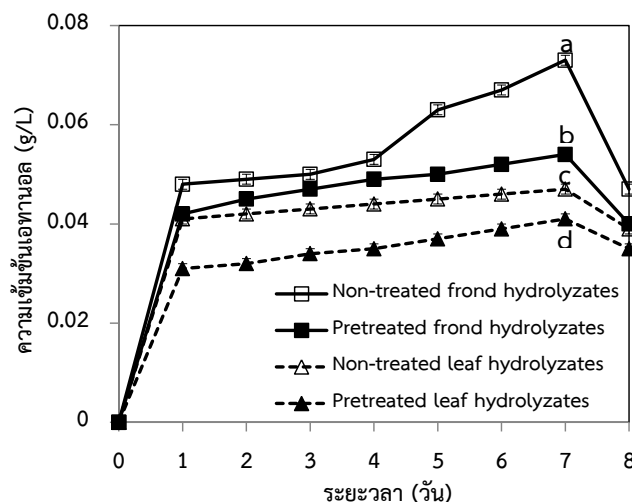


ภาพที่ 4.2 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ในอาหารเหลว CMS ที่มีน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

#### 4.4 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* จากไฮโดรไลเสทของทางใบต้นจาก

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกไฮโดรไลเสทของส่วนต่าง ๆ ของทางใบต้นจากที่ให้การผลิตเอทานอลสูงที่สุดโดยแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* JCM 15735 โดยความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $6.2 \times 10^6$  CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ร่วมกับไฮโดรไลเสท ปริมาตร 72 มิลลิลิตร ทำการหมักในระบบกะที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วัน พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสททุกตัวอย่างได้ แต่ไม่พบอะซิโตนและบิวทานอล โดยผลผลิตเอทานอลแปรผันตามปริมาณน้ำตาลที่พบในไฮโดรไลเสท (ตารางที่ 4.2) นั่นคือไฮโดรไลเสทที่มีปริมาณน้ำตาลสูงสุด อีกทั้ง *C. xylanolyticum* ยังมีความสามารถในการใช้กรดแอสติคซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการไฮโดรไลซิส โดยพบว่าในการหมักเอทานอลด้วยแบคทีเรียอิสระจาก้านทางใบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพซึ่งมีปริมาณกรดแอสติคสูงที่สุด และเมื่อผ่านการหมักผ่านไป 7 วัน พบว่าปริมาณกรดแอสติคลดลงจาก 2.87 เหลือเพียง 1.74 กรัมต่อลิตร เนื่องจากแบคทีเรียนำกรดแอสติคไปใช้ร่วมกับน้ำตาลได้ ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล ซึ่งพบความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด ได้แก่ ไฮโดรไลเสทของก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.073 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอลเท่ากับ (0.03 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำหนักแห้งก่อนไฮโดรไลซิส) หรือ (0.006 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) ในวันที่ 7 (ภาพที่ 4.3) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตัวอย่างอื่น ๆ รองลงมา ได้แก่ ไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ผ่านการปรับสภาพให้ปริมาณความเข้มข้น

ของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.053 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ (0.02 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำหนักแห้งก่อนไฮโดรไลซิส) หรือ (0.006 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) และไฮโดรไลเซสไบตันจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้เอทานอลความเข้มข้น 0.046 กรัมต่อลิตร (0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำหนักแห้งก่อนไฮโดรไลซิส) หรือ (0.006 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) ในขณะที่ไฮโดรไลเซสของไบตันจากที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 0.040 กรัมต่อลิตร (0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำหนักแห้งก่อนไฮโดรไลซิส) หรือ (0.003 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) เมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kim and Kim (2013) ซึ่งทำการผลิตเอทานอลจากทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้การปรับสภาพแบบ sequential acid/alkali ซึ่งปรับสภาพครั้งที่ 1 ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง และปรับสภาพครั้งที่ 2 โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 โมลาร์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง และทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทำการหมักในถังหมักโดยมีปริมาตร 1.5 ลิตร ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ทะลายปาล์มเปล่าปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 37.80 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเอทานอล 0.378 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จะเห็นได้ว่าผลผลิตเอทานอลที่พบในไฮโดรไลเซสที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำกว่าในระบบหมักโดยใช้อาหารเหลว CMS ที่เติมน้ำตาลไซโลสหรือน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนประมาณ 10-20 เท่า เนื่องจากปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเซสมีความเข้มข้นต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 2-4 เท่า นอกจากนี้ในไฮโดรไลเซสยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่แตกต่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น สารยับยั้งชนิดต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อการทำงานของแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Greetham *et al.*, 2016) (ตารางที่ 4.3) พบกลุ่มสารยับยั้ง ได้แก่ กลุ่มกรดอ่อน เช่น กรดแอสซิติค อาจมีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000) กลุ่มอนุพันธ์ฟูแรน ได้แก่ เฟอร์ฟูรัล และ 5-HMF ส่งผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก ซึ่งจะใช้ระยะเวลาในการปรับตัว (lag phase) เพื่อการเจริญเป็นเวลานาน (Mussatto and Roberto, 2004) และกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารยับยั้งที่มีความเป็นพิษต่อกระบวนการหมักมากที่สุด เนื่องจากมีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก ส่งผลต่อความแข็งแรงและประสิทธิภาพในการเลือกผ่านเข้าออกของสารในเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง ทำให้การเคลื่อนที่เข้าออกของเอนไซม์หรือสารอื่นที่จำเป็นเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลงจนส่งผลต่อการใช้น้ำตาลในการเจริญของเซลล์ผิดปกติ และมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักมากกว่าสารในกลุ่มอนุพันธ์ฟูแรน แม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำกว่าก็ตาม (Mussatto and Roberto, 2004) ผลจากการศึกษาในขั้นตอนนี้จึงเลือกไฮโดรไลเซสที่มีปริมาณน้ำตาลสูงที่สุด และมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงที่สุด คือไฮโดรไลเซสของก้านทางไบตันจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ เพื่อใช้ในการทดลองถัดไป



ภาพที่ 4.3 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *C. Xylanolyticum* จากไฮโดรไลสของส่วนต่าง ๆ ของทางใบต้นจาก โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลสที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ ณ เวลาเดียวกัน

#### 4.5 การตรึงแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ในโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)


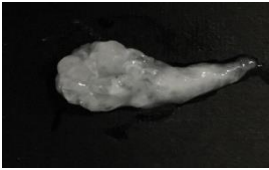



##### 4.5.1 การเตรียมเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA

การเตรียมเม็ดบีด PVA ให้มีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสม นั่นคือ มีรูปร่างกลม และไม่จับตัวเป็นก้อน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเม็ดบีด ได้แก่ ความเข้มข้นของ PVA และความเข้มข้นของกรดบอริก ซึ่งการฟอร์มตัวของเม็ดบีด PVA อาศัยกรดบอริกเป็นสารที่ช่วยในการเกิดปฏิกิริยา Crosslink โดยเกิดการแตกตัวเป็น Tetrahydroxyborate ion ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมโยงข้าม (Crosslink) ตรงตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของสายโซ่ PVA มากกว่า 1 สาย ทำให้เกิดพอลิเมอร์แบบร่างแห การทดลองนี้ทำโดยการนำหัวเชื้อแบคทีเรียมาผสมกับสารละลาย PVA เข้มข้น 7, 9, 10, 12 หรือ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และหยดสารละลายด้วยเข็มฉีดยาลงในกรดบอริกความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 5 หรือ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดบอริกที่ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเม็ดบีด PVA ที่ใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 7-15 เปอร์เซ็นต์ ไม่ฟอร์มเป็นทรงกลม มีลักษณะจับตัวติดกันเป็นก้อน มีความอ่อนนุ่มสีค่อนข้างขาวใส (ตารางที่ 4.5) ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดบอริกเป็น 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเม็ดบีด

เริ่มมีการฟอร์มตัวเป็นเม็ดทรงกลมมากขึ้น และมีความแข็งแรงขึ้นไม่อ่อนนุ่มมีสีขาวขุ่น อย่างไรก็ตาม ยังมีการจับตัวเป็นก้อนเมื่อใช้ความเข้มข้นของ PVA ที่ 7 หรือ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ตารางที่ 4.6) แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ PVA ขึ้นเป็น 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเกิดการฟอร์มตัวเป็นเม็ดบิทรทรงกลม และแยกเป็นเม็ดไม่ติดกันเป็นก้อน โดยความเข้มข้นของ PVA ที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้ความหนาแน่นเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การแพร่ผ่านของสารถูกจำกัด (Mass transfer limitation) (Sun *et al.*, 2011) ดังนั้นเมื่อเม็ดบิทร PVA ที่ได้จาก 2 ความเข้มข้นข้างต้นมีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกันจึงเลือกความเข้มข้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เกิดการแพร่ผ่านของสารได้ดีกว่า อีกทั้งยังสามารถลดค่าใช้จ่ายเนื่องจากสามารถลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น PVA เป็น 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้เม็ดบิทรฟอร์มตัวเป็นทรงกลม และไม่ติดกันเป็นก้อน แต่มีหางเรียวยาว (ตารางที่ 4.5) เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของ PVA เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งจะส่งผลต่อการฟอร์มตัวอย่างรวดเร็วเมื่อหยดสารละลายผ่านเข็มฉีดยา ทำให้รูปร่างที่ฟอร์มตัวในกรดบอริกขณะนั้นยังคงมีส่วนหางจากปลายของเข็มฉีดยา ทำให้เม็ดบิทรที่เกิดขึ้นมีหางเรียวยาว


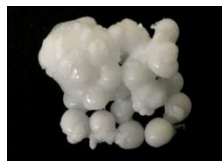



จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ PVA และกรดบอริกที่เหมาะสมที่สุด คือ 10 และ 7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ เพราะให้เม็ดบิทรที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมไม่มีหาง และแยกออกจากกันไม่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อน (ตารางที่ 4.5) ซึ่งมีแนวโน้มในการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Dinh and Bach (2014) รายงานว่าการผลิตแบคทีเรียตรึงใน PVA และแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) และแคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2$ ) ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของ PVA 6, 8, 10, 12 และ 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กรดบอริกความเข้มข้น 5-7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2-5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ PVA ความเข้มข้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัลจิเนตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กรดบอริกความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งให้เม็ดบิทรที่มีลักษณะกลม และแยกตัวออกจากกันได้ดี ในขณะที่ความเข้มข้นของ PVA ที่ต่ำหรือสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เม็ดบิทรไม่ฟอร์มตัวเป็นเม็ดหรือมีลักษณะเป็นรูปร่าง และหางเรียวยาว และจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Wirawan *et al.* (2012) ซึ่งเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอลจากชานอ้อยโดยใช้แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ตรึงรูปในแคลเซียมอัลจิเนต และ PVA โดยใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แคลเซียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ PVA 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งพบว่า PVA มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่ความเข้มข้นสูงกว่าแคลเซียมอัลจิเนตประมาณ 1 เท่า เนื่องจาก PVA มีความแข็งแรงและมีสมบัติเชิงกลที่ดีกว่าแคลเซียมอัลจิเนต

ตารางที่ 4.5 ลักษณะการฟอร์มตัวของเม็ดบีทแบคทีเรียตรึงรูปที่ใช้ความเข้มข้นของ PVA แตกต่าง  
กัน และแช่ในกรดบอริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

PVA (% w/v)	Agglomeration	Formation of beads	Appearance
7	มีลักษณะติดกันเป็น ก้อน	ไม่ฟอร์มตัวเป็นเม็ด (Weak)	
9	มีลักษณะติดกันเป็น ก้อน	ไม่ฟอร์มตัวเป็นเม็ด (Weak)	
10	ไม่แยกออกจากกัน มี ลักษณะติดกันเป็นก้อน	การฟอร์มตัวเป็นเม็ด ไม่ดี (Weak)	
12	ไม่แยกออกจากกัน ติดกันเป็นแพ	การฟอร์มตัวเป็นเม็ด บีทดี (Good)	
15	แยกตัวออกจากกัน	ฟอร์มตัวเป็นเม็ดบีทดี มาก (Very good) แต่ มีหาง	



**ตารางที่ 4.6** ลักษณะการฟอร์มตัวของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปที่ใช้ความเข้มข้นของ PVA แตกต่าง  
กัน และแช่ในกรดบอริกความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

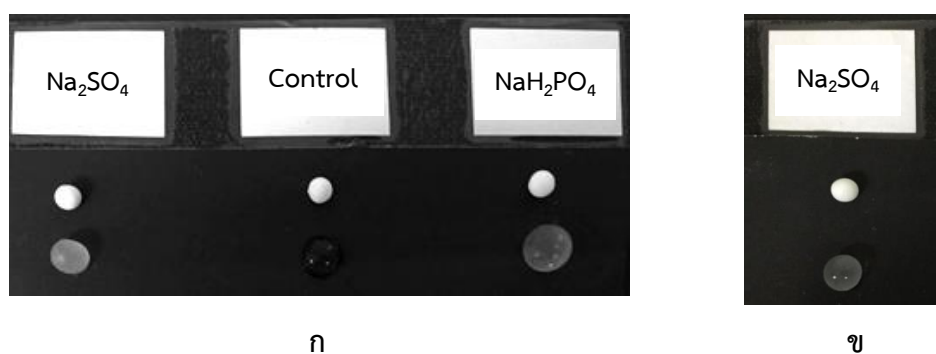
PVA (% w/v)	Agglomeration	Formation of beads	Appearance
7	มีลักษณะติดกันเป็น ก้อน	การฟอร์มตัวเป็นเม็ดไม่ ดี (Weak)	
9	มีลักษณะติดกันเป็น ก้อน	การฟอร์มตัวเป็นเม็ดไม่ ดี (Weak)	
10	แยกตัวเป็นเม็ด ไม่ ติดกันเป็นก้อน	การฟอร์มตัวเป็นเม็ดดี มาก (Very good)	
12	แยกตัวเป็นเม็ด ไม่ ติดกันเป็นก้อน	การฟอร์มตัวเป็นเม็ดดี มาก (Very good)	
15	แยกตัวออกจากกัน เป็น เม็ด แต่มีหาง	ฟอร์มตัวเป็นเม็ดบีดดี มาก (Very good) แต่ มีหาง	

#### 4.5.2 ผลของบัฟเฟอร์ต่อการบวมตัว (Swelling) ของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA

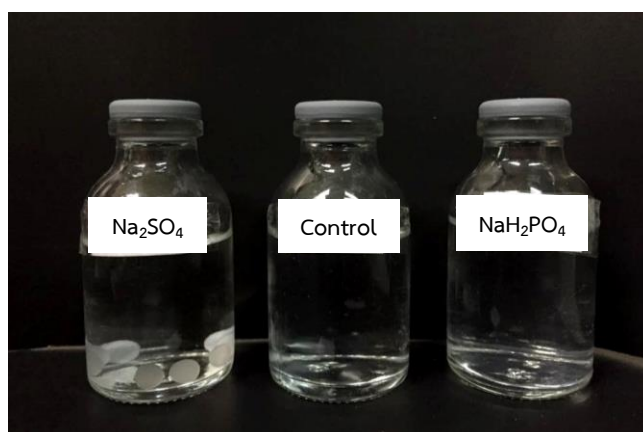
เนื่องจากการใช้งานเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปเพื่อผลิตเอทานอลนั้น เม็ดบีดจำเป็นต้องแช่อยู่ในไฮโดรไลสเสทที่เป็นของเหลว ซึ่งอาจก่อให้เกิดการบวมตัวของเม็ดบีดได้ การทดลองนี้จึงศึกษาวิธีการลดผลกระทบดังกล่าวเพื่อให้เม็ดบีดคงสภาพเดิมตลอดการใช้งาน โดยนำเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA มาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้แก่ โซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) บัฟเฟอร์ หรือโซเดียมฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยา cross-link ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น (Dinh and Bach, 2014) ซึ่งจะลดการบวมตัวและการแตกหักของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ก่อนนำไปทดสอบการบวมตัวในน้ำ โดยมีชุดควบคุมเป็นเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปที่ไม่ผ่านการแช่ในบัฟเฟอร์ ซึ่งพบว่าเมื่อนำไปแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium เม็ดบีดละลายตัวซึ่งเกิดจากในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีส่วนผสมของบัฟเฟอร์ที่ช่วยลดการบวมตัว โดยผลการศึกษาพบว่าเม็ดบีดที่แช่ในโซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์ มีการบวมตัวเพียงเล็กน้อย โดยเม็ดบีดมีขนาดเพิ่มขึ้นจาก 2.5 มิลลิเมตร เป็น 3.5 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.6) และไม่ละลายในน้ำ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.4 ข) เนื่องจาก  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  แตกตัวเป็นไอออน  $\text{SO}_4^{2-}$  ล้อมรอบโมเลกุลของ PVA และน้ำด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้การฟอร์มตัวแบบผลึกของ PVA คงสภาพเดิม (Takei *et al.*, 2011) ในขณะที่เม็ดบีดที่แช่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีการบวมตัวในน้ำเพิ่มขึ้นจาก 2.5 มิลลิเมตร เป็น 4.5 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.4 ก, ตารางที่ 4.7) และละลายในน้ำภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.5) ส่วนเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ที่ไม่ผ่านการแช่ในบัฟเฟอร์จะละลายในน้ำภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.5, ตารางที่ 4.7)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Zain *et al.* (2011) ที่พบว่าการใช้โซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์ร่วมกับกรดบอริกในกระบวนการผลิตเม็ดบีด PVA โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.9 โมลาร์ พบว่าที่ 0.5 โมลาร์ มีประสิทธิภาพเพียงพอที่สามารถป้องกันการบวมตัวและแก้ไขปัญหการละลายน้ำของเม็ดบีด PVA และเมื่อทำการทดสอบด้วยเครื่อง Energy dispersive X-ray spectrometer (EDX) พบว่าไอออน  $\text{SO}_4^{2-}$  ยังคงอยู่ภายในโครงสร้างของ PVA โดยไอออน  $\text{SO}_4^{2-}$  เข้าแทนที่ไอออนของ borate  $\text{B}(\text{OH})_4^-$  ส่งผลให้เม็ดบีดมีความเสถียร และแข็งแรงเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังทำให้เม็ดบีดมีคุณสมบัติยืดหยุ่นคล้ายยาง เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Dinh and Bach (2014) ที่พบว่า การแปรผันชนิดบัฟเฟอร์มีผลต่อความแข็งแรงและการบวมตัว (swelling) ของเม็ดบีด ซึ่งศึกษาการแช่เม็ดบีดในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) และโซเดียมฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) บัฟเฟอร์ก่อนนำไปใช้งานสามารถลดการบวมตัว และการละลายของเม็ดบีดในน้ำได้ดีกว่าการแช่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โซเดียมไนเตรทบัฟเฟอร์ และการไม่แช่ในบัฟเฟอร์ เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาของ

Wirawan *et al.* (2012) พบว่าการผลิตแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งหยดลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ และกรดบอริกความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร ผสมกัน มีความสามารถในการนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่าแคลเซียมอัลจิเนต และสามารถนำไปใช้ซ้ำได้ 5 ครั้ง



ภาพที่ 4.4 ขนาดของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ที่ผ่านการแช่ในบัฟเฟอร์ 2 ชนิด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาแช่น้ำต่ออีก 2 ชั่วโมง (ก) และผ่านการแช่ในโซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และแช่น้ำต่ออีก 168 ชั่วโมง (ข) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่บัฟเฟอร์



ภาพที่ 4.5 เม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ที่แช่น้ำเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากผ่านการแช่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ มาแล้ว เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่บัฟเฟอร์

**ตารางที่ 4.7** ขนาดของเม็ดบีดในน้ำภายหลังจากการแช่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่บัฟเฟอร์

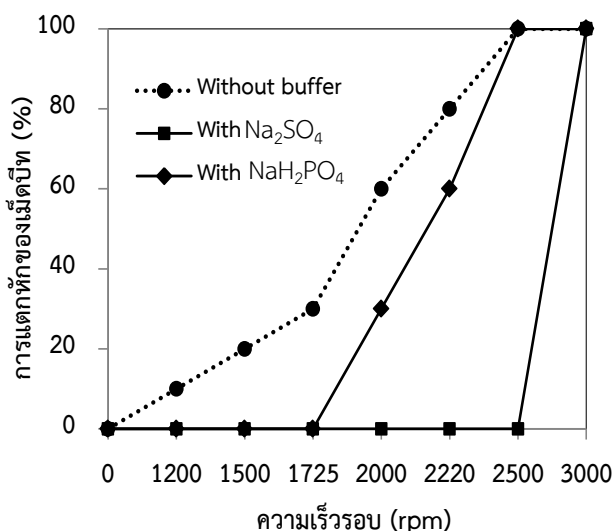
ระยะเวลา (hours)	Without buffer (mm)	Sodium sulfate buffer (mm)	Sodium phosphate buffer (mm)
0	2.5	2.5	2.5
2	dissolve	3.0	4.5
4	dissolve	3.0	dissolve
6	dissolve	3.0	dissolve
24	dissolve	3.5	dissolve
48	dissolve	3.5	dissolve
96	dissolve	3.5	dissolve
168	dissolve	3.5	dissolve

#### 4.5.3 ผลของบัฟเฟอร์ต่อความแข็งแรง (Strength) ของเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูป PVA

นำเม็ดบีดแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่บัฟเฟอร์เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้อามาทดสอบความแข็งแรงของเม็ดบีดเนื่องจากต้องการเม็ดบีดที่แข็งแรง เพราะในกระบวนการหมักเอทานอลในระบบกะได้ทำการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน ความแข็งแรงของเม็ดบีดจะป้องกันการแตกหักเสียหายของเม็ดบีด PVA ในระหว่างกระบวนการหมัก จึงนำไปทดสอบความแข็งแรงด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบตั้งแต่ 1,200 ถึง 3,000 รอบต่อนาที แล้วนับจำนวนเม็ดบีดที่แตกหัก เพื่อนำมาคำนวณร้อยละการแตกหักของเม็ดบีด พบว่าการแช่เม็ดบีดในโซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์ นอกจากจะลดการบวมตัวและการละลายในน้ำแล้ว ยังเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดบีดอีกด้วย โดยพบว่าที่ความเร็วรอบในช่วง 1,200 ถึง 2,500 รอบต่อนาที ไม่พบการแตกหักของเม็ดบีด แต่เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นเป็น 3,000 รอบต่อนาที พบว่าเม็ดบีดมีการแตกหัก 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.6) โดยเม็ดบีดที่แช่ในบัฟเฟอร์ดังกล่าว มีความแข็งแรงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น เป็นผลมาจากการแทนที่ของไอออน  $SO_4^{2-}$  ในตำแหน่งไอออน

borate/ $B(OH_4)^-$  ส่งผลให้เม็ดบีทึมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น เนื่องจากไอออน  $SO_4^{2-}$  เป็น นิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) (ชอบคาร์บอน) ตามธรรมชาติจึงดึงดูดกับอะตอมของคาร์บอนในเม็ดบีทึ PVA ได้ดี ผ่านกลไกปฏิกิริยาแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก (nucleophilic) โดยซัลเฟตเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ใหญ่กว่า borate ซัลเฟตจึงเข้าแทนที่จากด้านตรงข้ามกับหมู่ที่หลุดออก (leaving group) คือ borate เท่านั้น อีกทั้งไอออน  $SO_4^{2-}$  เป็นชนิด lone pairs ซึ่งไม่มีส่วนในการสร้างพันธะแต่ทำให้มีความเสถียรเพิ่มขึ้นซึ่งจะทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างไฮโดรเจนในพอลิเมอร์ของเม็ดบีทึทำให้เพิ่มความแข็งแรงให้เม็ดบีทึ ส่วนเม็ดบีทึที่ผ่านการแช่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ไม่พบการแตกหักของเม็ดบีทึ ในช่วงความเร็วรอบตั้งแต่ 1,200 ถึง 1,725 รอบต่อนาที แต่จะเกิดความเสียหายเมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นมากกว่า 1,725 รอบต่อนาที โดยพบการแตกหักของเม็ดบีทึเพิ่มขึ้นตามความเร็วรอบที่เพิ่มขึ้น จาก 25 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ณ ความเร็วรอบ 2,220 รอบต่อนาที ในขณะที่เม็ดบีทึที่ไม่ผ่านการแช่ในบัฟเฟอร์ มีความแข็งแรงน้อยที่สุด โดยพบว่าเม็ดบีทึเกิดการแตกหักตั้งแต่ใช้ความเร็วรอบ 1,200 รอบต่อนาที จนพบการแตกหักอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ความเร็วรอบเท่ากับ 2,220 รอบต่อนาที ซึ่งอาจเกิดจากการ cross-link ไม่สมบูรณ์ (Dinh and Bach, 2014)

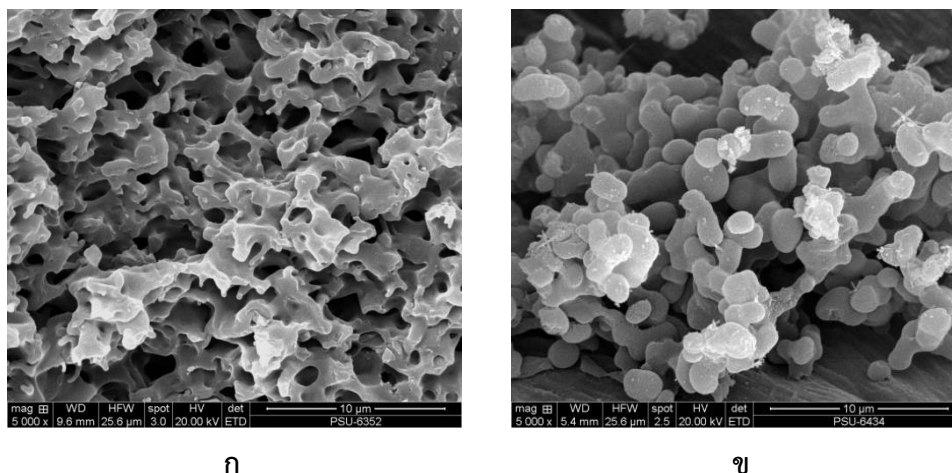
ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Dinh and Bach (2014) พบว่าเม็ดบีทึ PVA ที่ผ่านการแช่โซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์มีความแข็งแรงมากที่สุด โดยพบว่าเม็ดบีทึเกิดการแตกหักเมื่อใช้ความเร็วรอบมากกว่า 2,000 รอบต่อนาที จนพบการแตกหักอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ความเร็วรอบเท่ากับ 2,500 รอบต่อนาที รองลงมาคือเม็ดบีทึที่ผ่านการแช่โซเดียมฟอสเฟต พบว่าเม็ดบีทึเกิดการแตกหักตั้งแต่ใช้ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที โดยพบว่าเม็ดบีทึแตกหักมากขึ้นตามความเร็วรอบที่เพิ่มขึ้น จาก 10 เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าการผลิตเม็ดบีทึแบบที่เรียตรังรูปใน PVA เพียงชนิดเดียวโดยไม่ผสมแคลเซียมอัลจินเต มีความแข็งแรงมากกว่าโดยเกิดการแตกหักอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ความเร็วรอบตั้งแต่ 2,500 รอบต่อนาที ซึ่งสูงกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ อีกทั้งยังสามารถลดการใช้สารเคมี และค่าใช้จ่ายเนื่องจากอัลจินเตมีราคาสูงกว่าการใช้ PVA



ภาพที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การแตกหักของเมมเบรนที่เตรียมขึ้นใน PVA ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ในบัฟเฟอร์

#### 4.5.4 ลักษณะพื้นผิวของเมมเบรน PVA ที่มีและไม่มีแบคทีเรียตรึงรูป

จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning electron microscope (SEM) พบว่าลักษณะพื้นผิวของเมมเบรน PVA ที่ยังไม่ได้มีการตรึงแบคทีเรีย ประกอบด้วยโครงสร้างที่มีความซับซ้อน ลักษณะพื้นผิวก่อนข้างเรียบ มีความเป็นรูพรุนคล้ายรังผึ้ง (ภาพที่ 4.7ก) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ย (Average pore diameter) เท่ากับ 1.70 นาโนเมตร และพื้นที่ผิวจำเพาะ (Specific surface area) ประมาณ 273 ตารางเมตรต่อกรัม (Caroline *et al.*, 2006) ส่วนเมมเบรนที่มีแบคทีเรียตรึงรูปจะสังเกตเห็นแบคทีเรียเกาะกันเป็นกลุ่มอยู่ภายในเมมเบรน (ภาพที่ 4.8ข) เนื่องจากเมมเบรน PVA มีพื้นที่จำกัดจึงทำให้แบคทีเรียที่ถูกตรึงรูปไว้ในวัสดุเกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่นภายในเมมเบรน



ก

ข

ภาพที่ 4.7 ลักษณะพื้นผิวของเม็ดบิพ PVA ที่ไม่มี (ก) และมี (ข) แบคทีเรียที่เรียกักขังอยู่ภายในวัสดุ ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

#### 4.5.5 ผลของปริมาณแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA ต่อการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของทางใบต้นจาก

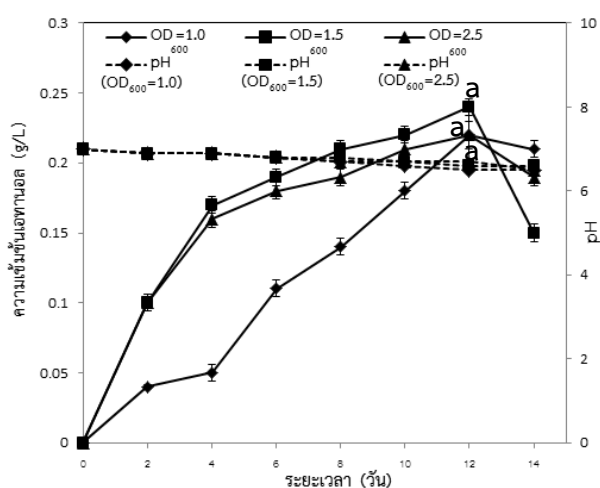
เมื่อทราบสภาวะเหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ตรึงรูปแบบกักขัง (Entrapment) ใน PVA จากการทดลองก่อนหน้านี้แล้ว จึงนำแบคทีเรียตรึงรูปมาใช้ทดสอบการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของทางใบต้นจาก โดยก่อนนำแบคทีเรียตรึงรูปไปใช้ในกระบวนการหมักได้แปรผันความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงแตกต่างกัน ได้แก่ ความขุ่นของเชื้อ ( $OD_{600}$ ) เท่ากับ 1.0 ( $62 \times 10^5$  CFU ต่อ มิลลิลิตร), 1.5 ( $93 \times 10^5$  CFU ต่อ มิลลิลิตร) และ 2.5 ( $233 \times 10^5$  CFU ต่อ มิลลิลิตร) พบว่าหลังผ่านกระบวนการตรึงแล้ว มีปริมาณแบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่ใน PVA ลดลงจากหัวเชื้อเริ่มต้น โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 29, 31 และ  $46.5 \times 10^5$  CFU ต่อกรัม PVA ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าการตรึงแบคทีเรียด้วยวิธีการ PVA-boric acid นั้นแบคทีเรียต้องมีการสัมผัสกับกรดบอริกจึงมีผลทำให้แบคทีเรียที่ถูกตรึงใน PVA ตายไปบางส่วน (Dinh and Bach, 2014) นอกจากนี้การนำสารละลายเซลล์แบคทีเรียมาผสมกับสารละลาย PVA ในระหว่างกระบวนการตรึงเซลล์ ยังส่งผลให้ความเข้มข้นของแบคทีเรียเริ่มต้นเจือจางลงด้วย ทั้งนี้พบว่าวิธีการในการละลายเม็ดบิพ PVA ก่อนนำไปนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย ดังรายงานที่ผ่านมาของ Kumar *et al.* (2012) ศึกษาการย่อยสลายประกอบ N,N-dimethylformamide โดยแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. DGVK1 ตรึงรูปใน PVA และแคลเซียมอัลจิเนต (Ca-Alginate) พบว่าวิธีการที่ใช้ในการละลายเม็ดบิพดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อ การรอดชีวิตของแบคทีเรียในเม็ดบิพ PVA-แคลเซียมอัลจิเนต

จากนั้นทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงรูปในการผลิตเอทานอลแบบกะ โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียที่กักขังอยู่ใน PVA ทั้ง 3 ความเข้มข้นตามผลการทดลองข้างต้น ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าแบคทีเรียตรึงทั้ง 3 ความเข้มข้น พบค่าพีเอชในกระบวนการหมักลดลงเพียงเล็กน้อยซึ่งอยู่ในช่วง 7.0-6.5 สามารถผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) คืออยู่ในช่วง 0.21-0.24 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.8) เนื่องมาจากปริมาณแบคทีเรียที่กักขังอยู่ใน PVA ทั้ง 3 ค่ามีความใกล้เคียงกัน จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีงานวิจัยที่นำจุลินทรีย์ตรึงรูปใน PVA มาใช้งานด้านสิ่งแวดล้อมและพลังงานอย่างแพร่หลาย เนื่องจากวัสดุดังกล่าวมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีความแข็งแรง และราคาถูก (Wirawan *et al.*, 2012) จากงานวิจัยของ Efremenko *et al.* (2012) พบว่าเซลล์ตรึงรูปของ *C. acetobutylicum* ใน PVA มีความสามารถในการผลิตเอทานอลโดยใช้ไฮโดรไลสจากสาหร่ายเป็นสับสเตรทให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดประมาณ 0.29 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ และจากงานวิจัยของ Wirawan *et al.* (2012) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากขานอ้อย โดยการใช้แบคทีเรียตรึงรูปสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* ในวัสดุตรึง 2 ชนิด ได้แก่ Polyvinylalcohol (PVA) ที่ความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการหมักด้วยเซลล์ตรึงทั้ง 2 ชนิด โดยวิธีการหมัก 2 แบบ คือ วิธีการย่อยน้ำตาลแยกออกจากการหมัก Separate hydrolysis and fermentation (SHF) โดยย่อยน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และกระบวนการหมักแบบการย่อยน้ำตาลและการหมักพร้อมกัน Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยการย่อยน้ำตาลด้วยการเติมเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียตรึงใน PVA หมักแบบ SHF ให้ความเข้มข้นเอทานอล 6.24 กรัมต่อลิตร และให้อัตราในการผลิตเอทานอล 3.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และแบคทีเรียตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต หมักแบบ SHF ให้อัตราในการผลิตเอทานอล 2.37 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียตรึงใน PVA หมักแบบ SSF ให้อัตราในการผลิตเอทานอล 1.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และแบคทีเรียตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต หมักแบบ SSF ให้อัตราในการผลิตเอทานอล 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และสามารถนำมาใช้หมักซ้ำได้ 5 ครั้ง โดยพบว่าแบคทีเรียตรึงมีความเสถียรสูงถึงจะผ่านการหมักซ้ำ 5 ครั้ง

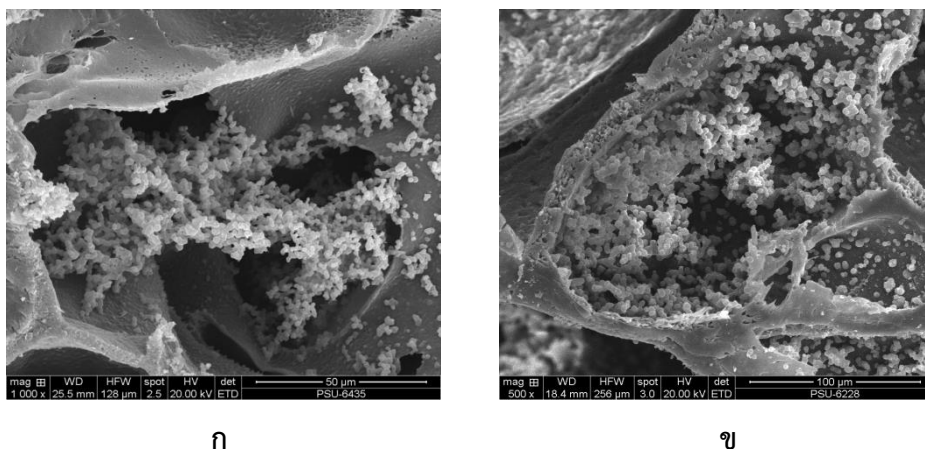


ตารางที่ 4.8 ปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว CMS และที่ถูกตรึงอยู่ใน PVA และซิลิกาเมื่อใช้ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน

ความขุ่นเชื้อ (OD <sub>600</sub> )	จำนวนแบคทีเรีย เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ( $\times 10^5$ CFU ต่อ มิลลิลิตร)	จำนวนแบคทีเรียตรึงในวัสดุ ( $\times 10^5$ CFU ต่อ กรัม PVA)	จำนวนแบคทีเรียตรึงในวัสดุ ( $\times 10^5$ CFU ต่อ กรัม ซิลิกา)
1.0	62 $\pm$ 0.05	29 $\pm$ 0.12	1550 $\pm$ 0.06
1.5	93 $\pm$ 0.03	31 $\pm$ 0.09	2250 $\pm$ 0.04
2.5	233 $\pm$ 0.02	46.5 $\pm$ 0.13	4200 $\pm$ 0.01



ภาพที่ 4.8 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของก้านทางใบต้นจากโดยการใช้แบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ตรึงรูปใน PVA โดยที่ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ ณ เวลา 12 วัน



ภาพที่ 4.9 ลักษณะแบคทีเรียรูปร่างที่กักขังอยู่ใน PVA ก่อน (ก) และหลัง (ข) การใช้งาน 1 ครั้ง ที่กำลังขยาย 1,000 และ 500 เท่า ตามลำดับ

#### 4.6 การตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา

##### 4.6.1 คุณสมบัติของวัสดุตรึงซิลิกา

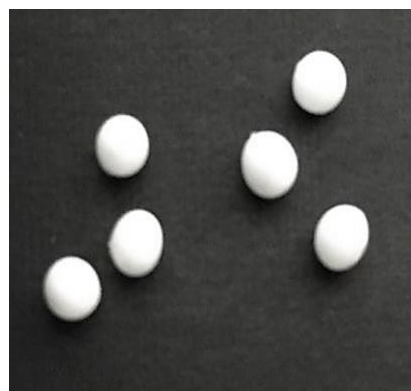
การศึกษานี้ใช้ซิลิกาชนิดเมโซพอร์ซิลิกา (Mesoporous silica) หรือซิลิกาแบบผงเป็นผลึก ที่มีความเป็นรูพรุน และพื้นที่ผิวสูง นอกจากนี้ซิลิกายังเป็นวัสดุที่มีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี สามารถใช้งานได้ในช่วงพีเอช และอุณหภูมิที่กว้าง มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกไม่บวมน้ำ (Khongkhaem *et al.*, 2011; Boos *et al.*, 2002) จากการศึกษาพื้นที่ผิวของซิลิกาเท่ากับ 1,021.50 ตารางเมตรต่อกรัม พบว่าสูงกว่าวัสดุตรึงชนิด PVA ประมาณ 4 เท่า และมีปริมาตรรูพรุนทั้งหมด (Total pore volume) ค่อนข้างสูงประมาณ 234.69 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม อีกทั้งขนาดรูพรุนที่ใหญ่กว่า PVA (ตารางที่ 4.9) คุณสมบัติข้างต้นส่งผลให้มีพื้นที่ในการเกาะติดและอยู่อาศัยของแบคทีเรียมาก อีกทั้งมีขนาดอนุภาคเล็กทำให้สามารถสัมผัสกับสับสเตรทได้ดี (ภาพที่ 4.10) จึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรียมากกว่า PVA เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของวัสดุตรึงชนิดซิลิกากับวัสดุตรึงเซลล์แบบเกาะติดชนิดอื่น ๆ ที่นิยมใช้ในงานวิจัยที่ผ่านมา เช่น ถ่านกัมมันต์ พบว่ามีพื้นที่ผิวเท่ากับ 907.80-1,100 ตารางเมตรต่อกรัม และปริมาตรรูพรุนทั้งหมด (Total pore volume) เท่ากับ 0.43 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม ซึ่งมีพื้นที่ผิวใกล้เคียงกับซิลิกา แต่ปริมาตรรูพรุนทั้งหมดน้อยกว่าวัสดุตรึงชนิดซิลิกา

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเมโซพอร์ซิลิกากับคุณสมบัติของ PVA ที่ใช้เป็นวัสดุตรึง

คุณสมบัติ	ชนิดวัสดุ	
	เมโซพอร์ซิลิกา (งานวิจัยนี้)	PVA Caroline <i>et al.</i> (2006)
Total pore volume (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	234.69	-
Specific surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	1,021.50	273.00
Average pore diameter (nm)	2.94	1.70
Size (mm)	0.10-0.25	3.50



ก



ข

ภาพที่ 4.10 ลักษณะทางกายภาพและขนาดของแบคทีเรียตรึงในซิลิกา (ก) และแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA (ข)

#### 4.6.2 การตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา

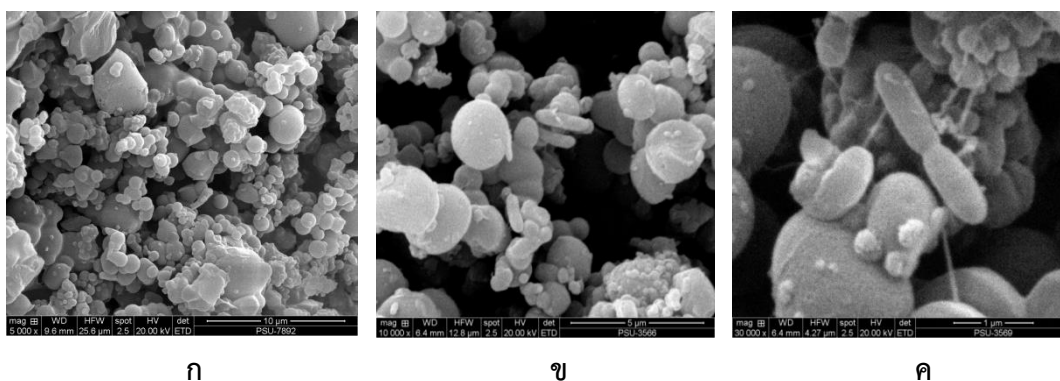
การผลิตแบคทีเรียตรึงในเมโซพอร์ซิลิกา ใช้วิธีการตรึงแบบเกาะติดผิววัสดุตรึง (Physical adsorption/attachment) โดยการแปรผันความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงแตกต่างกัน ได้แก่ ความขุ่นของเชื้อ (OD<sub>600</sub>) เท่ากับ 1.0, 1.5 และ 2.5 ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 62, 93 และ 233 × 10<sup>5</sup> CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียที่ผสมรวมกับซิลิกาป่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าหลังผ่านกระบวนการตรึงแล้วมีปริมาณ

แบคทีเรียถูกตรึงอยู่ในเมโซพอร์ซิลิกา เพิ่มขึ้นจากปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น โดยมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 155, 255 และ  $420 \times 10^6$  CFU ต่อกรัมซิลิกา ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) ซึ่งวิธีการสกัดแบคทีเรียให้หลุดออกจากวัสดุตรึงโดยการใช้ sonicate ไม่ส่งผลกระทบต่อทำให้แบคทีเรียตายในระหว่างการสกัดแบคทีเรีย เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการ sonicate นั้นใช้ระยะเวลาในช่วงสั้น ๆ เพียง 1 นาที และมีการพัก 2 นาที ก่อนนำไป sonicate ซ้ำ (Pattanasupong *et al.*, 2004; Khongkhaem *et al.*, 2011; Tosu *et al.*, 2015) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตรึงแบคทีเรียด้วยซิลิกาโดยวิธีแบบเกาะติดมีผลทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดี เนื่องจากช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงคือ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถเจริญเกาะติดกับวัสดุตรึงที่มีพื้นที่ผิวและรูพรุนสูง และไม่เกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเจริญของแบคทีเรีย ในขณะที่การตรึงแบคทีเรียแบบกักขังใน PVA จะใช้ระยะเวลาสั้นกว่าเพียงแค่ประมาณ 2 ชั่วโมง แต่ในระหว่างการตรึงด้วย PVA นั้นก่อให้เกิดความเป็นพิษสูงจากกรดบอริกที่ใช้เป็นสารช่วยในการเกิดปฏิกิริยา Crosslink ซึ่งทำให้เซลล์ตายได้ด้วยวิธีการตรึงและชนิดของวัสดุที่แตกต่างกัน จึงทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงแบคทีเรียทั้ง 2 รูปแบบมีความแตกต่างกัน

จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกาโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) พบว่าลักษณะพื้นผิวที่ยังไม่ได้มีการตรึงแบคทีเรีย ประกอบด้วยโครงสร้างที่มีความซับซ้อน ลักษณะพื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีความเป็นรูพรุนคล้ายรังผึ้ง (ภาพที่ 4.11ก) ส่วนลักษณะของซิลิกาที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียแล้ว จะสังเกตเห็นแบคทีเรียเกาะกันเป็นกลุ่มอยู่บนพื้นผิวและภายในรูพรุนของซิลิกา (ภาพที่ 4.11ข) อีกทั้งพบว่าแบคทีเรียที่ถูกดูดซับบนซิลิกามีการสังเคราะห์โครงสร้าง Extracellular polymeric substance (EPS) ขึ้นมาภายนอกเซลล์ (ภาพ 4.11ค) ซึ่งทำหน้าที่เสมือนกาวทำให้เซลล์แบคทีเรียยึดติดกับพื้นผิวของวัสดุ โดยปริมาณและองค์ประกอบของ EPS มีผลต่อความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรียบนพื้นผิววัสดุตรึง และ EPS เป็นโครงสร้างสำคัญที่ทำให้เกิดการปกคลุมเซลล์ในรูปแบบฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) (Rosche *et al.*, 2009) ซึ่งนอกจากจะช่วยให้แบคทีเรียเจริญและทำงานได้ในสภาวะที่มีความรุนแรง (Extreme environment) แล้วยังพบว่าฟิล์มชีวภาพช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นด้วย

ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Jain *et al.* (2013) ศึกษาเปรียบเทียบการหมักหญ้าสวิตช์ (switch grass) แบบ solid-state และ submerged-state ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแอมโมเนีย เพื่อใช้สำหรับการผลิตเอทานอล อะซิเตท และไฮโดรเจน โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium phytofermentans* พบว่าการหมักแบบ submerged-state ให้ผลิตภัณฑ์ทั้งหมดจากการหมักในรูปน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ต่อน้ำหนักของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ไป สูงกว่าการหมักแบบ Solid-state โดยแบคทีเรียมีการเจริญและสังเคราะห์ฟิล์มชีวภาพบนหญ้าซึ่งตรวจพบโดย SEM ในระหว่างการหมัก

แบบ Submerged-state ในขณะที่ตรวจพบการเกาะของแบคทีเรียบนหญ้าในระหว่างการหมักแบบ solid-state แต่ไม่พบการสร้างฟิล์มชีวภาพ ซึ่งรายงานของ Leschine (2009) อธิบายว่าไบโอฟิล์มที่ถูกสร้างขึ้นจากแบคทีเรียจะส่งผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลสได้รวดเร็วขึ้น อาจจะอธิบายได้ว่าผลผลิตจากการหมักของแข็ง (Solid-state) จึงต่ำกว่าเนื่องจากขาดการสร้างไบโอฟิล์ม เมื่อเปรียบเทียบกับ การหมักแบบ Submerged-state ซึ่งจะแสดงให้เห็นไบโอฟิล์มที่กระจายตัวแต่มีความหนา ดังนั้น ผลผลิตที่ต่ำกว่าจากการหมักของแข็งอาจจะส่งผลต่อการย่อยสลายหญ้าสวิตช์เป็นน้ำตาลรีดิวิซ์



ภาพที่ 4.11 ลักษณะพื้นผิวของชิลิกาก่อนการตรึงแบคทีเรียที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (ก) แบคทีเรียที่เกาะอยู่บนพื้นผิวและในรูพรุนของเมโซพอร์ซชิลิกาที่กำลังขยาย 10,000 เท่า (ข) และโครงสร้างของ EPS ที่ผลิตโดยแบคทีเรียเพื่อยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุและกลุ่มเซลล์ที่กำลังขยาย 30,000 เท่า (ค)

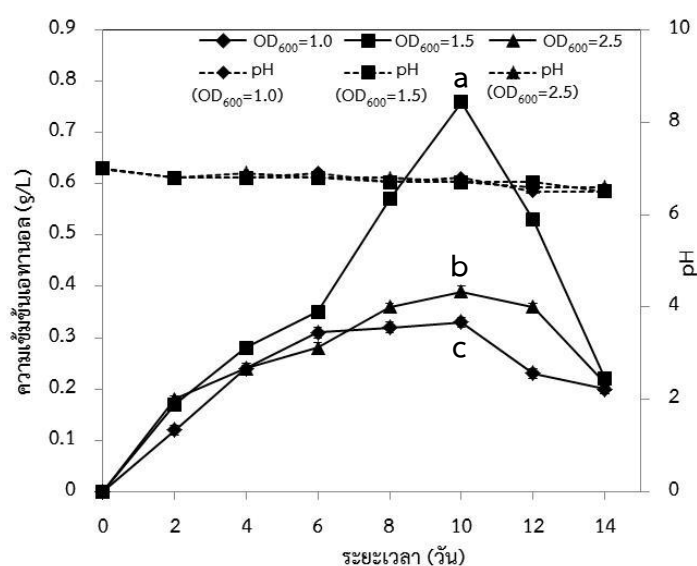
#### 4.6.3 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงในชิลิกา

##### 4.6.3.1 ผลของปริมาณแบคทีเรียตรึงในชิลิกาต่อการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของทางใบต้นจาก

นำเซลล์ตรึงในชิลิกาที่มีปริมาณแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุแตกต่างกัน 3 ค่า จากการทดลองก่อนหน้านี้ มาทดสอบการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของทางใบต้นจาก เพื่อศึกษาจำนวนแบคทีเรียตรึงที่เหมาะสมในชิลิกา โดยการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าแบคทีเรียตรึงที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น  $OD_{600}$  เท่ากับ 1.5 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียหลังจากตรึงเท่ากับ  $255 \times 10^6$  CFU ต่อกรัมชิลิกา สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด คือ 0.76 กรัมต่อลิตร และมีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ภาพที่ 4.12) ส่วนแบคทีเรียตรึงที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น  $OD_{600}$  เท่ากับ 1.0 และ 2.5 มีความสามารถในการผลิตเอทานอลอยู่ในช่วง 0.33-0.51 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียในชิลิกามีผลต่อการกระบวนการ

ผลิตเอทานอล โดยหัวเชื้อ เริ่มต้น OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1.0 มีปริมาณจำนวนเชื้อในปริมาณที่น้อยกว่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1.5 และ 2.5 แต่อย่างไรก็ตาม OD<sub>600</sub> เท่ากับ 2.5 มีปริมาณเชื้อมากกว่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1.5 แต่ให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลต่ำกว่าอาจเกิดจากเมื่อปริมาณจำนวนเชื้อเริ่มต้นมีความหนาแน่นมากเกินไปส่งผลต่อ ประสิทธิภาพในการทำงานของแบคทีเรียได้ และค่าพีเอชที่พบลดลงเพียงเล็กน้อยซึ่งอยู่ในช่วง 7.0-6.5 (ภาพที่ 4.12)

ทำการเตรียมแบคทีเรียตรึงในซิลิกาโดยใช้ความขุ่นของหัวเชื้อเริ่มต้นที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1.5 เพื่อให้ได้จำนวนแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อกรัมซิลิกาสำหรับการผลิตเอทานอลในการทดลองต่อ ๆ ไป



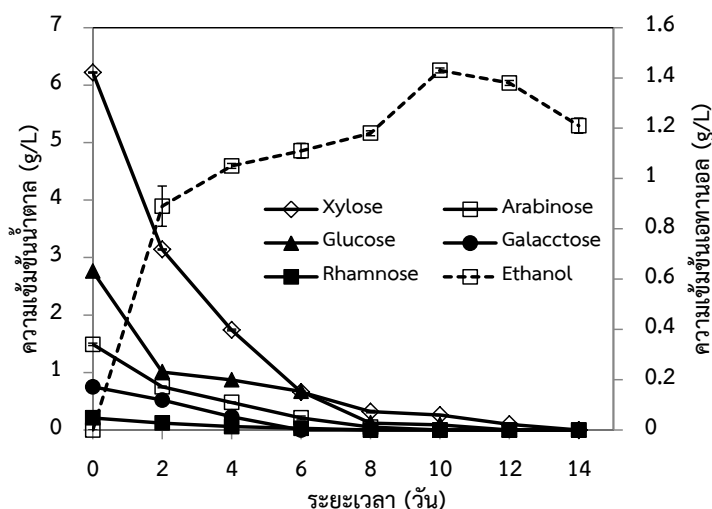
ภาพที่ 4.12 ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของก้านทางใบต้นจาก โดยแบคทีเรีย *C. xyloolyticum* ที่ถูกตรึงในซิลิกา โดยที่ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ ณ วันที่ 10 ของการทดลอง

#### 4.6.3.2 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่พบในไฮโดรไลเสทของก้านทางใบต้นจากโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา

เมื่อทราบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในไฮโดรไลเสทของก้านทางใบต้นจากที่มีสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ รวมอยู่ด้วยโดยใช้แบคทีเรียตรึงในซิลิกาในการทดลองก่อนหน้านี้ การทดลองนี้ต้องการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีสารยับยั้ง จึงใช้น้ำตาลผสมที่พบเช่นเดียวกับในไฮโดรไลเสทของก้านทางใบซึ่งมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาล

กลูโคส น้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลแรมโนส (ตารางที่ 4.2) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว CMS โดยผสมน้ำตาลดังกล่าวในปริมาณเท่ากับที่พบในไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจาก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาสามารถใช้น้ำตาลได้ทุกชนิด และให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าในวันที่ 2 ถึงวันที่ 10 ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณความเข้มข้นเอทานอลและผลผลิตเอทานอลสูงสุดในวันที่ 10 ที่ความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 1.43 กรัมต่อลิตร และ (0.12 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) ตามลำดับ (รูปที่ 4.13, ตารางที่ 4.11) หลังจากนั้นความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มลดลง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลซึ่งเป็นสับสเตรทของแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* หหมดลง และอาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้นยับยั้งอัตราการเจริญของแบคทีเรีย เป็นผลให้ประสิทธิภาพในการหมักลดลงตามไปด้วย (ดอเลาะห์ ดารี, 2556)

อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้สูงกว่าการผลิตจากไฮโดรไลเสท เนื่องจากไม่มีสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองให้มีชนิด และปริมาณน้ำตาลเท่ากับไฮโดรไลเสท จึงทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า



ภาพที่ 4.13 อัตราการใช้ น้ำตาลผสมชนิดต่าง ๆ ในอาหารเหลว CMS และการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา

#### 4.7 การผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสเสทก้านทางใบต้นจากโดยแบคทีเรียตรึงและแบคทีเรียอิสระ

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงในวัสดุที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ ซิลิกา และ PVA รวมทั้งเซลล์อิสระจึงควบคุมปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์ตรึงเริ่มต้นให้มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 0.40 กรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียตรึงบนซิลิกามีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอทานอลโดยให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.76 กรัมต่อลิตร และ (0.07 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) ในวันที่ 10 ของการทดลอง (ภาพที่ 4.14, ตารางที่ 4.9) รองลงมา คือ แบคทีเรียตรึง รูปใน PVA และแบคทีเรียอิสระ ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตร (0.04 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) และ 0.45 กรัมต่อลิตร (0.03 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) ตามลำดับ โดยค่าพีเอชที่พบลดลงเพียงเล็กน้อยซึ่งอยู่ในช่วง 7.0-6.5 (ภาพที่ 4.14) จากผลการศึกษาก็จะเห็นได้ว่าเซลล์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้สูงกว่าแบคทีเรียอิสระ เนื่องจากแบคทีเรียตรึงในซิลิกาสามารถผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสเสทได้สูงกว่าการใช้แบคทีเรียอิสระ ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าการใช้แบคทีเรียตรึงในซิลิกามีความสามารถในการลดพิษของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในไฮโดรไลสเสทในกระบวนการผลิตเอทานอลได้บางส่วน จึงส่งผลต่อปริมาณของความเข้มข้นเอทานอลที่พบได้สูงกว่าการใช้แบคทีเรียอิสระ อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์อิสระมีแนวโน้มในการผลิตเอทานอลได้สูงกว่าเซลล์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิดในช่วงแรก แต่ภายหลังจากวันที่ 6 พบว่าปริมาณความเข้มข้นเอทานอลลดลงอย่างต่อเนื่อง และให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลต่ำกว่าเซลล์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด (ภาพที่ 4.13) เนื่องจากเซลล์อิสระสามารถสัมผัสกับสับสเตรทได้ดี นั่นคือมีอัตราการแพร่ผ่านของสารดีกว่าระบบของเซลล์ตรึงรูปที่มีวัสดุตรึงเป็นตัวกลางกั้นระหว่างแบคทีเรียและสับสเตรท ทำให้เซลล์อิสระมีอัตราการใช้สับสเตรทได้เร็วกว่าในช่วงแรก ในขณะที่เดียวกันแบคทีเรียมีโอกาสสัมผัสกับสารยับยั้งในไฮโดรไลสเสทได้โดยตรง จึงส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียอิสระ (Mishra *et al.*, 2016) ทำให้การผลิตเอทานอลน้อยกว่าแบคทีเรียตรึง

ส่วนแบคทีเรียตรึงซึ่งอยู่ภายในวัสดุเป็นการจำกัดบริเวณให้แก่เซลล์และจำกัดการแพร่ผ่านของสาร แบคทีเรียจึงมีโอกาสสัมผัสกับสับสเตรทได้ช้ากว่าและต้องอาศัยการปรับตัวเพื่อให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมใหม่ ดังนั้นอัตราการผลิตเอทานอลในช่วงแรกจึงช้ากว่าแบคทีเรียอิสระ แต่อย่างไรก็ตามวัสดุตรึงหรือไบโอฟิล์มที่เปรียบเสมือนกันชนสำหรับห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เพื่อป้องกันการสัมผัสโดยตรงต่อความเข้มข้นของสารยับยั้ง (Tosu *et al.*, 2015) ประกอบกับวัสดุตรึงเป็นการสร้างสภาวะที่เหมาะสมให้กับจุลินทรีย์และยังสามารถเพิ่มความทนทานให้แก่จุลินทรีย์ต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในไฮโดรไลสเสท (Zhao and Xia, 2010) จึงทำให้การผลิตเอทานอลสูงตามไปด้วย นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังช่วยเพิ่มปริมาณแบคทีเรียได้ดีโดยจะเห็นว่าในระหว่างการหมักพบน้ำหนักรวมและจำนวนแบคทีเรียในแบคทีเรียตรึงทั้ง 2 ชนิดสูงกว่าแบคทีเรียอิสระ (ตารางที่ 4.9) เนื่องจากเซลล์ตรึงสามารถ



เพิ่มความเสถียรให้แก่เซลล์และการทำงานของเอนไซม์ จึงทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสรอดชีวิตและเจริญได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Wirawan *et al.*, 2012; Cheman *et al.*, 2016)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียตรึงรูปแบบกักขัง (Entrapment) ใน PVA และแบคทีเรียตรึงแบบเกาะติด (Attachment/adsorption) ในซิลิกา พบว่าแบคทีเรียตรึงในซิลิกามีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้สูงกว่าแบคทีเรียตรึงรูปแบบใน PVA เนื่องจากความสามารถในการแพร่ผ่านของสารเข้าสู่วัสดุตรึงแบบเกาะติดได้ดีกว่าวัสดุตรึงแบบกักขัง และในระหว่างกระบวนการหมักยังพบปริมาณการเจริญของแบคทีเรียในวัสดุดังกล่าวมากกว่า (ตารางที่ 4.10) เพราะซิลิกาเป็นวัสดุที่มีพื้นผิวและรูพรุนสูง (Bautista *et al.*, 2010; Boos *et al.*, 2002) ส่งผลให้แบคทีเรียตรึงที่ถูกตรึงยึดเกาะกับพื้นผิวและถูกดูดซับในรูพรุนได้ดี (Khongkhaem *et al.*, 2011) จึงส่งผลให้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลที่พบในแบคทีเรียตรึง 2 ชนิดแตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ รัชพล พะวงศรีรัตน์ และคณะ (2556) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทของใบตองโดยใช้อาหารเหลว YM ปรับปริมาตรด้วยส่วนของของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพใบตองโดยปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นให้มีปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรด้วยน้ำตาลไซโลส และทำการเปรียบเทียบเทคนิคการตรึงเซลล์ที่แตกต่างกัน ในถังหมักแบบแพคเบด โดยการตรึงยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 แบบกักขังในแคลเซียมอัลจิเนตและการตรึงแบบเกาะติดผิวทางกายภาพด้วยวัสดุธรรมชาติ เช่น ชังข้าวโพด และชานอ้อย พบว่าการตรึงแบบเกาะติดผิวทางกายภาพบนชานอ้อย มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงที่สุดคือ 30.93 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเอทานอล 0.67 กรัมต่อกรัม หลังจาก 12 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรึงแบบกักขังในแคลเซียมอัลจิเนตที่พบปริมาณความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 30.40 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ การใช้ยีสต์ตรึงในชังข้าวโพด และเซลล์อิสระ พบความเข้มข้นของเอทานอล 29.93 และ 25.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการศึกษาข้างต้นให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่างานวิจัยนี้เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่ใช้ในการหมักเริ่มต้นมีความเข้มข้นสูงกว่าประมาณ 5 เท่า จึงส่งผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล และจากการศึกษาของ Mishra *et al.* (2016) พบว่าการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก เจือจางความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร และย่อยสลาย (hydrolysis) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้การหมักร่วมด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูป *S. cerevisiae* GSE1618 ในแคลเซียมอัลจิเนตให้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่ายีสต์เซลล์อิสระ โดยยีสต์ตรึงรูปให้ปริมาณเอทานอลความเข้มข้นเท่ากับ 33.00 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียตรึงรูปแบบซิลิกามีประสิทธิภาพสูงสุดในกระบวนการหมัก จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

ตารางที่ 4.10 น้ำหนักแห้งเริ่มต้นและจำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่มีการผลิตเอทานอลสูงสุดโดยแบคทีเรียอิสระและแบคทีเรียตรึง 2 ชนิด

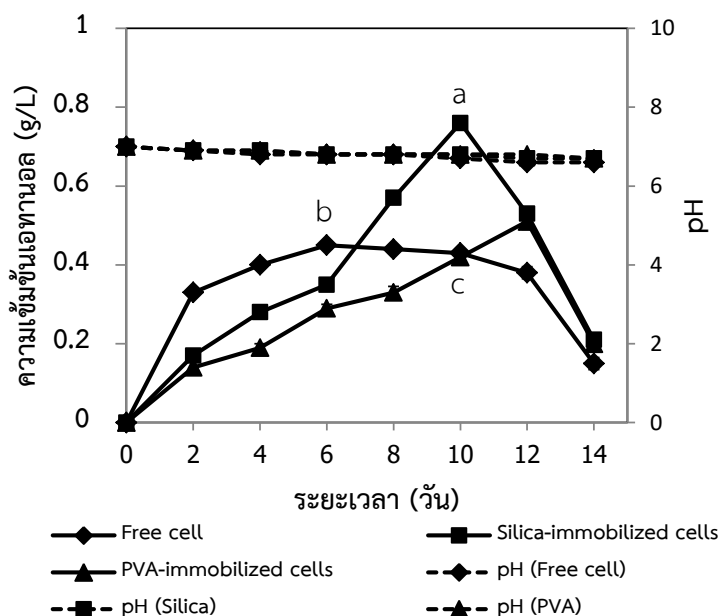
ชนิดแบคทีเรียที่ใช้	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น (g/ml)	ปริมาณเซลล์ ณ วันที่เอทานอลสูงสุด	
		น้ำหนักแห้ง (g/ml)	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/กรัมวัสดุ หรือ CFU/ml)
แบคทีเรียตรึงในซิลิกา	0.4095	0.5312 (T <sub>10</sub> )	22×10 <sup>9</sup> (T <sub>10</sub> )
แบคทีเรียตรึงรูปใน PVA	0.3991	0.4217 (T <sub>12</sub> )	26×10 <sup>6</sup> (T <sub>12</sub> )
แบคทีเรียเซลล์อิสระ	0.3940	0.4133 (T <sub>6</sub> )	ND

ND, Not determined

T<sub>n</sub>, ระยะเวลาในการหมัก (วัน)

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบความเข้มข้นและผลผลิตเอทานอลในไฮโดรไลสเสทกับอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium โดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา

วัตถุดิบ	ความเข้มข้นเอทานอล	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	ผลผลิตเอทานอล	ผลผลิตเอทานอลเปรียบเทียบกับค่าทฤษฎี %
	(g/L)	(g/L)	(g EtOH/ g Sugar)	
Hydrolyzate	0.76	11.43	0.07	13.01
CMS medium	1.43	11.43	0.12	24.61



ภาพที่ 4.14 ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสระหว่างเซลล์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ โดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นเอทานอลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ

#### 4.8 การเปลี่ยนแปลงของสารยับยั้งหลังจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา

จากการศึกษาปริมาณสารยับยั้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังจากผ่านกระบวนการหมักเอทานอล ณ วันที่ 14 ไม่พบน้ำตาลและสารยับยั้ง ยกเว้น สารประกอบฟีนอลิก ที่มีปริมาณลดลงจาก 0.02 กรัมต่อลิตร เหลืออยู่ 0.003 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.12) นอกจากนี้พบว่าชุดควบคุมซึ่งเป็นวัสดุตรึง (ซิลิกา) เพียงอย่างเดียวที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรีย มีความสามารถในการดูดซับสารตัวกลาง เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน มีการลดลงของสารยับยั้งในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกจาก 0.02 กรัมต่อลิตร เป็น 0.003 กรัมต่อลิตร และไม่พบสารยับยั้งชนิดอื่น ๆ ซึ่งเกิดจากการดูดซับโดยซิลิกาเนื่องด้วยความเป็นรูพรุนสูงของวัสดุ อีกทั้งในชุดควบคุมที่เป็น killed cell ซึ่งเป็นชุดที่ใช้แบคทีเรียตรึงซิลิกาที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งยังคงมีลักษณะของไบโอฟิล์มที่เป็นโครงสร้างที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นอยู่ เพื่อศึกษาความสามารถในการดูดซับสารยับยั้งของไบโอฟิล์ม พบว่ามีการลดลงของสารยับยั้งในกลุ่มฟีนอลิกใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่เป็นวัสดุตรึงซิลิกาเพียงอย่างเดียว และไม่พบสารยับยั้งชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 4.12) แสดงให้เห็นว่าการลดลงของสารยับยั้งมีกลไกหลักผ่านการดูดซับของซิลิกา

**ตารางที่ 4.12** ปริมาณสารยับยั้งและน้ำตาลที่เหลืออยู่หลังจากผ่านกระบวนการหมักเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา และชุดควบคุม

Hydrolyzates	Acetic acid (g/L)	Furfural (g/L)	5-HMF (g/L)	Total phenolics (g/L)	Total sugar (g/L)
Hydrolyzates (day0)	2.87±0.04	0.17±0.001	0.03±0.00	0.02±0.00	11.43
Hydrolyzates+silica- immobilized cells (day 14)	ND	ND	ND	0.003±0.00	ND
Hydrolyzates + silica only (day14)	ND	ND	ND	0.003±0.00	-
Hydrolyzates + heat- killed immobilized cells (day14)	ND	ND	ND	0.002±0.00	-

ND, Not detected.

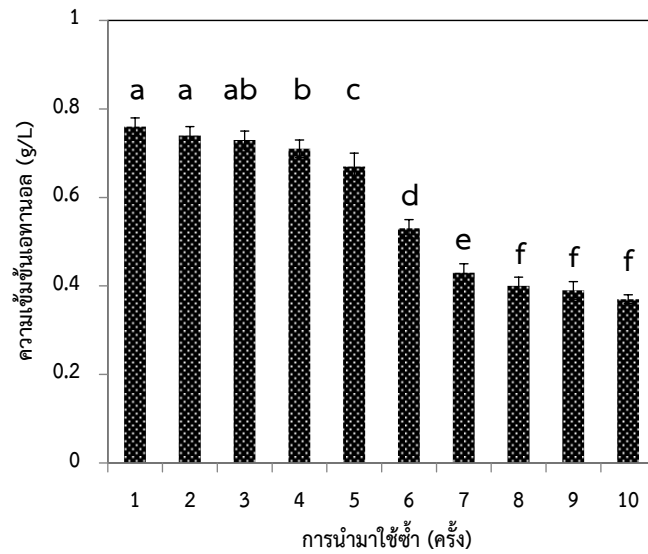
-, ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

#### 4.9 การศึกษาประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของแบคทีเรียตรึงในซิลิกา

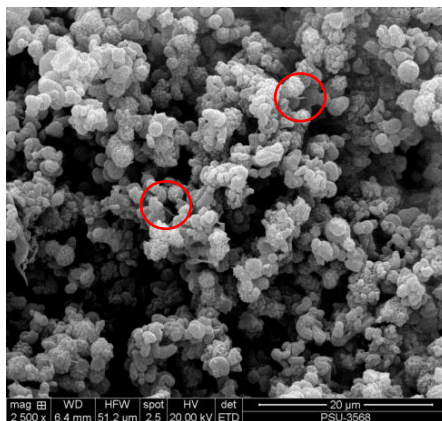
เมื่อนำเซลล์ตรึงในซิลิกาที่ผ่านการหมักเอทานอลแล้วทำการหมักซ้ำ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงว่ามีความสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง และยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้เหมือนกับการใช้ในครั้งแรกหรือไม่ ซึ่งจะช่วยในการลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ จากการศึกษาพบว่าสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของการใช้งานครั้งแรก ภายใต้การหมักรอบละ 14 วัน (ภาพที่4.15) ทั้งนี้การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในช่วง 4 ครั้งแรก พบว่ามีความแตกต่างในการผลิตเอทานอลอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หลังจากนั้นมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลต่ำลงตามลำดับจนกระทั่งผ่านการใช้ซ้ำ 8 ครั้ง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการผลิตใน

ครั้งที่ 9 และ 10 อาจเนื่องจากองค์ประกอบต่าง ๆ ในไฮโดรไลเซทก้านทางใบต้นจาก เช่น เกิดการสะสมของสารยับยั้งภายในไฮโดรไลเซทโดยถูกซิลิกาดูดซับไว้ในวัสดุตั้งซิลิกา ส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมในการใช้แหล่งอาหารของแบคทีเรีย ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพื้นผิววัสดุตั้ง (ภาพที่ 4.16) ซึ่งอาจส่งผลทำให้เซลล์ตั้งเกิดความเสียหาย และเชื้อโตจนความหนาแน่นของเชื้อเพิ่มมากขึ้นจนเชื้อหลุดออกจากวัสดุตั้งได้ เมื่อมีการนำไปใช้ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิววัสดุและแบคทีเรียตั้งหลังจากผ่านการหมักซ้ำในไฮโดรไลเซทก้านทางใบต้นจากโดยเทคนิค SEM แสดงให้เห็นว่าวัสดุมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย และยังคงมีปริมาณแบคทีเรียที่ถูกตั้งเหลืออยู่ในรูพรุนและบนพื้นผิววัสดุเมื่อผ่านการหมักเป็นจำนวน 10 ครั้ง อีกทั้งสังเกตเห็นแบคทีเรียอยู่ภายในซิลิกาตลอดการทดลอง (ภาพที่ 4.16 ก และ ข)

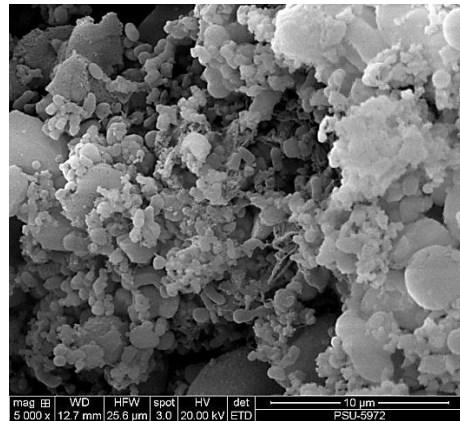
อย่างไรก็ตามซิลิกายังไม่มีการนำมาใช้เป็นวัสดุตั้งจุลินทรีย์สำหรับงานด้านพลังงาน แต่จากการศึกษาของ Khongkhaem *et al.* (2011) นำมาใช้ในการบำบัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่ามีประสิทธิภาพและมีความสามารถในการใช้งานได้อย่างต่อเนื่องได้มากกว่า 2 เดือน ในขณะที่งานวิจัยของรัชพล พวงศรีรัตน์ และคณะ (2556) ซึ่งใช้ยีสต์ตั้งบนขานอ้อยในการผลิตเอทานอลสามารถใช้ซ้ำได้ 3 ครั้ง โดยประสิทธิภาพลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และจากงานวิจัยของ Wirawan *et al.* (2012) พบว่าการใช้แบคทีเรียตั้งใน PVA ในการนำมาใช้ในการหมักเอทานอลสามารถนำไปใช้ซ้ำได้ 5 ครั้ง และประสิทธิภาพลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการใช้ซ้ำ 5 ครั้ง



ภาพที่ 4.15 ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการใช้ซ้ำ 10 ครั้ง ในไฮโดรไลสเสทก้านทางใบต้นจากโดยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงถึงความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลสเสทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) ในระหว่างการใช้ซ้ำแต่ละครั้ง



ก



ข

ภาพที่ 4.16 ลักษณะของแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาก่อน (ก) และหลังผ่านการใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลจำนวน 10 ครั้ง (ข) ที่กำลังขยาย 2,500 และ 5,000 เท่า

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

##### 5.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของทางใบต้นจาก

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของก้านทางใบและใบต้นจาก หลังจากนำตัวอย่างมาปรับสภาพเบื้องต้นโดยการบดและผ่านตะแกรงร่อนที่มีขนาดระหว่าง 0.10-0.25 มิลลิเมตร พบว่ามีปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 35.29 และ 30.23 เปอร์เซ็นต์ มีเฮมิเซลลูโลสปริมาณ 26.17 และ 22.20 เปอร์เซ็นต์ และลิกนินปริมาณ 13.84 และ 13.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการปรับสภาพก้านทางใบและใบต้นจากด้วยต่างเจือจางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง เป็นเวลา 30 นาที พบว่าปริมาณเซลลูโลสในก้านทางใบและใบต้นจากเพิ่มขึ้นเป็น 48.52 และ 44.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเฮมิเซลลูโลสลดลงเป็น 19.30 และ 12.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่พบปริมาณลิกนินเพิ่มขึ้นเป็น 14.00 และ 22.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

##### 5.1.2 องค์ประกอบของไฮโดรไลเสทจากทางใบต้นจาก

การย่อยสลายส่วนต่าง ๆ ของทางใบต้นจาก ได้แก่ ก้านทางใบและใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง (acid hydrolysis) ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที พบน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ ซาโลส และอะราบิโนส และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส และแรมโนส โดยไฮโดรไลเสทจากก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงที่สุดปริมาณ 6.22 กรัมต่อลิตร และเป็นไฮโดรไลเสทที่มีปริมาณน้ำตาลรวมสูงที่สุดเท่ากับ 11.43 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรด นอกจากจะให้ผลผลิตน้ำตาลแล้วยังพบสารประกอบอื่น ๆ ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (degradation by-products) จากการสลายตัวของน้ำตาลและการย่อยลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ สารกลุ่มอนุพันธ์ฟูแรน คือ สารเฟอร์ฟูรัล และ 5-HMF พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง 0.13-0.22 และ 0.02-0.04 กรัมต่อลิตร

สารกลุ่มกรดอ่อน ได้แก่ กรดแอสซิติค พบอยู่ในช่วง 1.10- 2.87 กรัมต่อลิตร และกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งพบปริมาณ 0.01-0.05 กรัมต่อลิตร

### 5.1.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ในการผลิตเอทานอล

จากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย *C. xylanolyticum* ในอาหารเหลว CMS ซึ่งเติมน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ ไซโลส และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตเอทานอล แต่ไม่พบอะซิโตน และบิวทานอล โดยการใช้น้ำตาลไซโลสจะได้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร และผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณ 0.70 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักไฮโดรไลสเสทของส่วนต่าง ๆ ของทางใบต้นจากในระบบกะ พบว่าไฮโดรไลสเสทของก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ มีปริมาณความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.073 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการทดลอง

### 5.1.4 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงรูปในโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)

ความเข้มข้น PVA และกรดบอริกที่เหมาะสมที่สุดในการตรึงแบคทีเรียแบบกักขัง (Entrapment) ใน PVA คือ 10 และ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ เพราะให้เม็ดปืที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมไม่มีหาง และแยกออกจากกันไม่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อน และจากการศึกษาผลของบัฟเฟอร์ต่อการบวมตัว (swelling) ของเม็ดปืแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA พบว่าเม็ดปืที่แช่ในโซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์ มีการบวมตัวเพียงเล็กน้อย โดยเม็ดปืมีขนาดเพิ่มขึ้นจาก 2.5 มิลลิเมตร เป็น 3.5 มิลลิเมตร และไม่ละลายในน้ำ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง และพบว่าการแช่เม็ดปืในบัฟเฟอร์ดังกล่าว นอกจากจะลดการบวมตัวและการละลายในน้ำแล้ว ยังสามารถเพิ่มความแข็งแรง (Strength) ให้กับเม็ดปือีกด้วย ซึ่งไม่พบการแตกหักของเม็ดปืเมื่อนำไปทดสอบโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบน้อยกว่า 2,500 รอบต่อนาที โดยเซลล์ตรึงรูปที่มีจำนวนแบคทีเรียกักขังอยู่ในวัสดุเท่ากับ  $62-233 \times 10^5$  CFU ต่อกรัม PVA สามารถผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสเสทของก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพได้เท่ากับ 0.21-0.24 กรัมต่อลิตร



### 5.1.5 การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงในซิลิกา

แบคทีเรียตรึงที่มีจำนวนแบคทีเรียถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของซิลิกาประมาณ  $1,550-4,200 \times 10^5$  CFU ต่อกรัมซิลิกา สามารถผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลสของก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพได้เท่ากับ 0.17-0.76 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA และแบคทีเรียอิสระ พบว่าแบคทีเรียตรึงในซิลิกาให้ความเข้มข้นและผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด 0.76 กรัมต่อลิตร และ 0.07 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ และแบคทีเรียตรึงทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพในการนำไปผลิตเอทานอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระ จากการศึกษาองค์ประกอบของไฮโดรไลสหลังจากผ่านกระบวนการหมักเอทานอลไม่พบน้ำตาลและสารยับยั้ง ยกเว้น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งการลดลงของสารยับยั้งดังกล่าวเกิดจากการดูดซับโดยวัสดุตรึงซิลิกาเป็นกลไกหลัก

### 5.1.6 การใช้ซ้ำของแบคทีเรียตรึงในซิลิกา

โดยจากการศึกษาพบว่าสามารถนำแบคทีเรียตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของการทำงานครั้งแรก ภายใต้การหมักรอบละ 14 วัน ทั้งนี้การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในช่วง 4 ครั้งแรกพบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ภายหลังจากนั้นมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลต่ำลงตามลำดับจนกระทั่งผ่านการใช้ซ้ำ 8 ครั้งซึ่งมีความใกล้เคียงกับการผลิตในครั้งที่ 9 และ 10 อาจเนื่องจากองค์ประกอบต่าง ๆ และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิววัสดุและแบคทีเรียตรึงหลังจากผ่านการหมักซ้ำในไฮโดรไลสก้านทางใบต้นจากโดยเทคนิค SEM แสดงให้เห็นว่าวัสดุมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย และยังคงมีปริมาณแบคทีเรียที่ถูกตรึงเหลืออยู่ในรูพรุนและบนพื้นผิววัสดุเมื่อผ่านการหมักเป็นจำนวน 10 ครั้ง อีกทั้งสังเกตเห็นแบคทีเรียอยู่ภายในซิลิกาตลอดการทดลอง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ และแนวทางการประยุกต์ใช้

5.2.1 ศึกษาสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพและไฮโดรไลซิส เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น

5.2.2 ศึกษาเพิ่มเติมเทคนิคการตรึงเซลล์ หรือระยะเวลาในการตรึงเซลล์แบคทีเรียให้แบคทีเรียเกาะติดได้ดี เพื่อป้องกันแบคทีเรียหลุดระหว่างการใช้ซ้ำในการหมักเอทานอล

5.2.3 ควรศึกษาเพิ่มเติมสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างแบคทีเรียตรึงรูปและสับสเตรท เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

5.2.4 ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงโดยการพัฒนาวัสดุตรึงให้มีศักยภาพมากขึ้น ได้แก่ การเพิ่มขนาดให้มีความสะดวกในการนำไปใช้งาน

5.2.5 แนวทางในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม อาจทำการทดลองในระบบขยายขนาด และใช้การหมักแบบต่อเนื่องเพื่อประเมินศักยภาพและความยั่งยืนในการผลิตเอทานอล ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร โดยเป็นแนวทางในการจัดการของเสียชีวภาพที่น่าสนใจและมีประสิทธิภาพ เพื่อการจัดการสิ่งแวดล้อมและพัฒนาพลังงานอย่างยั่งยืน

### บรรณานุกรม

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2552. กระบวนการผลิตเอทานอล. กระทรวงพลังงาน.(เอกสารออนไลน์). (15 ตุลาคม 2557). Available :<http://www.dede.go.th>
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2553.นโยบายด้านเอทานอลตามแผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15ปี(พ.ศ. 2551-2565). กระทรวงพลังงาน.(เอกสารออนไลน์). (15ตุลาคม 2557).Available[http://www.dede.go.th/dede/fileadmin/usr/bers/gasohol\\_documents/gasohol\\_2009/R\\_EDPChapter8\\_Ethanol.pdf](http://www.dede.go.th/dede/fileadmin/usr/bers/gasohol_documents/gasohol_2009/R_EDPChapter8_Ethanol.pdf)
- เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, สิทธิโชค วัลลภาทิพย์, บุญเรียง ล้ำชัยภูมิ และกล้าณรงค์ ศรีรอด. 2548. โอกาสของมันเป็นสำปะหลังกับอุตสาหกรรม. หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลัง และแป้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ขวัญสุดา อนุอัน. 2549. โครงการการย่อยชานอ้อยด้วยวิธีทางเคมีเพื่อการผลิตเอทานอล, โครงการนักศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิตภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ดุขฎี อุตภาพ. 2550. Carbohydrate technology. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ดอเลาะห์ ดารี. 2556. การเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (เอกสารออนไลน์). (28 มีนาคม2556). Available: [http://web.yru.ac.th/~dolah/text/4032601-2-47/MicrobGrNutrition-1%20\(1in1\).pdf](http://web.yru.ac.th/~dolah/text/4032601-2-47/MicrobGrNutrition-1%20(1in1).pdf)
- นพรัตน์ บำรุงรัตน์. 2540. รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาด้านนิเวศวิทยา ประโยชน์ใช้สอย และการขยายพันธุ์ต้นจากในพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร
- นพรัตน์ บำรุงรัตน์. 2544. ต้นจากพืชเศรษฐกิจของป้าชายเลน. โครงการศึกษาวิจัย เพื่ออนุรักษ์พัฒนาและติดตามการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติชายเลน กลุ่มงานทรัพยากรธรรมชาติ กองโครงการและประสานงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร
- นพรัตน์ บำรุงรัตน์. 2554. ม.อ. ส่งเสริมปลูกต้นจากในนาทุ้งร้างที่ปากพนัง ช่วยฟื้นสภาพดินเค็ม ให้คุณค่าทางนิเวศและทางเศรษฐกิจ. สถาบันทรัพยากรทะเลและชายฝั่ง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- นพรัตน์ บำรุงรัตน์.2556.รายงานฉบับสมบูรณ์สำรวจพื้นที่ที่มีต้นจากและพื้นที่ที่มีศักยภาพในการปลูกจากเพื่อผลิตเอทานอลในประเทศไทย.สถาบันวิจัยระบบพลังงาน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประภัสสร เหลืองศิริวุฒิ และ นายกิมวัจน์ วิจารณ์าคมกุล. 2556. การผลิตเอทานอลจากทางและใบต้นจากโดยใช้ *Clostridium* sp. โครงการนักศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ยุทธศักดิ์ สุขการี. 2551. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยวิธี Simultaneous saccharification and fermentation (SSF). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- รัชพล พะวงศรีรัตน์. มาลินี อ้นภักดี. สุทธิเดช ปรีชารัมย์. 2556. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน, วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่ 6 ฉบับที่ 2 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรลักษณ์ คงจินตามณี .2556. การผลิตเอทานอลจากแกนข้าวโพด, วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศิริลักษณ์ ธีระดากร .2555. กระบวนการการแปรสภาพและย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอล, ทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรีย์พร กำเนิดกลาง. นูรฮายาดี อามะ. กนกพร สังข์รักษ์ และสมพงษ์ โอทอง .2555. การผลิตเอทานอลจากลำต้นปาล์มที่ผ่านการเตรียมโดยวิธีการทางเคมีด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*, วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่15 ฉบับที่3 มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- เสรี มหาวิทยาลัย .2555. การผลิตลิกโนเซลลูโลสเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเคมีวิเคราะห์ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อมรรัตน์ ศิริพันธ์. 2547. การศึกษากระบวนการหมักแบบกะข้าโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปเพื่อผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

- AOAC international. 1993. Methods of analysis for nutrition labelling. Chapter 33. Sugars (Mono & Di), glucose, fructose, sucrose and maltose in presweetened cereals liquid chromatographic method (982.18): Sugars (Mono & Di), separation of sugars in honey liquid chromatographic method (977.20)
- Ang, S.K., Shaza, E.M., Adibah, Y., Suraini, A.A. and Madihah, M.S. 2013. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 48: 1293-1302.
- Asgher, M., Ahmad, Z. and Iqbal, A.H.M.N. 2013. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane Energy Conversion and Management bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 44: 488-495.
- Badr, H.R., Toledo, R. and Hamdy, M.K. 2001. Continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Biomass Bioenergy*. 20 : 119-132.
- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. 52:858-875.
- Bankar, B.S., Survase, A.S., Singhal, S.R. and Granstrom, T. 2012. Continuous two stage acetone - butanol-ethanol fermentation with integrated solvent removal using *Clostridium acetobutylicum* B 5313. *Bioresource Technology*. 106: 110–116
- Bautista, F. L., Morales, G. and Sanz, R. 2010. Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene. *Bioresource Technology*. 101: 8541–8548.
- Boonsawang, P., Subkaree, Y. and Srinorakutara, T. 2012. Ethanol production from palm pressed fiber by prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation (SSF). *Biomass and Bioenergy*. 40: 127-132.
- Boos, A., Intasiri, A., Brunette, J.P. and Leroy, M.J.F. 2002. Surfactant-templated silica doped with 1-phenyl-3-methyl-4-stearoylpyrazol-5-one (HPMSP) as a new sorbent. *Journal of materials chemistry*. 12: 886-889.

- Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D.J., Guo, W., Liu, B., Feng, Y. and Zhao, Q. 2009. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16. *International journal of hydrogen energy*. 34: 7182-7188
- Caroline, L., Masaru, W., Yuichi, A. and Hiroshi, I. 2006. Synthesis of nanophased metal oxides in supercritical water: catalysts for biomass conversion. *Research Center of Supercritical Fluid Technology*. 4: 217-230
- Chandel, A.K., Chan, E.S., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V. and Pogaku, R. 2007. Economics and environmental impact of bio-ethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology Microbiology Review*. 2: 14–32.
- Chemin, M., Wirotius, A.L., Ham-Pichavant, F., Chollet, G., Perez, D.D.S., Petit-Conil, M., Cramail, H. And Grelier, S. 2015. Well-defined oligosaccharides by mild acidic hydrolysis of hemicelluloses. *European Polymer Journal*. 66: 190–197.
- Cuevas, M., Sanchez, S., Bravo, V., García, J.F., Baeza, J., Parra, C. and Freer, J. 2010. Determination of optimal pre-treatment conditions for ethanol production from olive-pruning debris by simultaneous saccharification and fermentation. *Fuel*. 89: 2891–2896.
- Dien, B.S., Cotta, M.A. and Jeffries, T.W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production current status. *Applied Microbiology Biotechnology*. 63: 258–266.
- Dinh, V. P. and Bach, T. L. Immobilized bacteria by using PVA (Polyvinyl alcohol) crosslinked with Sodium sulfate. 2014. *International Journal of Science and Engineering*. 7(1): 41-47.
- Duan, X., Zhang, C., Ju, X., Li, Q., Chen, S., Wang, J. and Liu, Z. 2013. Effect of lignocellulosic composition and structure on the bioethanol production from different poplar lines. *Bioresource Technology*. 140: 363–367.
- Efremenko, E.N., Nikolskaya, A.B., Lyagin, I.V., Senko, O.V., Makhlis, T.A., Stepanov, N.A., Maslova, O.V., Mamedova, F. and Varfolomeev, S.D. 2012. Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells. *Bioresource Technology*. 114: 342-348.

- 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.
- Gao, Y., Wang, H., Guo, J., Peng, P., Zhai, M. and She, D. 2016. Hydrothermal degradation of hemicelluloses from triploid poplar in hot compressed water at 180-340 °C. *Polymer degradation and stability*. 126: 179-187.
- Greetham, D., Hart, A.J. and Tucker, G.A. 2016. Presence of low concentrations of acetic acid improves yeast tolerance to hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural. *Biomass and Bioenergy*. 85: 53-60.
- Gupta, A., Saprativ, P.D., Ghosh, A., Choudhary, R., Das, D. and Goyal, A. 2014. Bioethanol production from hemicellulose rich *Populus nigra* involving recombinant hemicellulases from *Clostridium thermocellum*. *Bioresource Technology*. 165: 205–213.
- Hamilton, L.S. and Murphy, D.H. 1988. Use and Management of Nipa Palm (*Nypa fruticans*, Arecaceae). *A Review – Economic Botany*. 42 (2): 206–213.
- Hartmanis, M.G.N., Klason, T. and Gatenbeck, S. 1984. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal Applied Microbiology Biotechnology*. 20 : 66- 77.
- Harun, R. and Danquah, M.K. 2011. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*. 46: 304–309.
- Hasirci, N., Aksoy, S. and Tümtürk, H. 2006. Activation of poly (dimethylol acrylate-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of  $\alpha$ -amylase. *React. Functional Polymers*. 66: 1546-1551.
- Ingram, L.O., Gomez, P.F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., Yomano, L.P. and York, S.W. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology Bioengineering*. 58: (23): 204-214.
- Jabatan, P.S.M. 2009. Prosiding seminar pengurusan dan pemuliharaan hutan nipah. February 25-26, Penang, Malaysia. 103.

- Jahan, A.s., Chowdhury, D.A.N. and Islam, M.K. 2006. Characterization and evaluation of golpara fronds as pulping raw materials. *Bioresource Technology*. 97: 401-406.
- Jain, A., Morlok, K.C. and Michael Henson, J. 2013. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. *Bioenergy and Biofuels*. 97: 905-917.
- Jones, D. T. and Woods, D. R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiology Review*. 50: 484-524.
- Jong, E.D. and Gosselink, R.J.A. 2014. Lignocellulose based chemical products. *Bioenergy Research*. 278-309.
- Khongkhaem, P., Intasiri, A. and Luepromchai, E. 2011. Silica-immobilized *Methylobacterium sp.* NP3 and *Acinetobacter sp.* PK1 degrade high concentrations of phenol. *Applied Microbiology*. 12: 156-160
- Khoo, H. H. 2015. Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 49: 100-119.
- Kim, S. and Kim, C.H. 2013. Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber. *Renewable Energy*. 54: 150-155.
- Kiransree, N., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M. and VenkateswarRao, L. 2000. High alcohol production by repeated batch fermentation using immobilized, osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Biotechnology*. 24: 222-226.
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B. and Ahring, B. K. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiolog Biotechnology*. 66:10-26.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, M.I., Marchant, R. and Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 21: 377-397.



- Kristiani, A., Abimanyu, H., Setiawan, A.H. and Sudiyarmanto-Aulia, F. 2013. Effect of pretreatment process by using diluted acid to characteristic of oil palm frond. *Energy Procedia*. 32: 183-189.
- Kumar, S.S., Kumar, S.M., Siddavattam, D. and Karegoudar, T.B. 2012. Generation of continuous packed bed reactor with PVA–alginate blend immobilized *Ochrobactrum* sp. DGVK1 cells for effective removal of N,N-dimethylformamide from industrial effluents. *Journal of Hazardous Materials*. 199– 200: 58– 63.
- Lee, S.Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J. and Jung, K. S. 2008. Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Journal of Biotechnology Bioenergy*. 101: 209-228.
- Lei, C., Jian, Z., Lin X. and Jie, B. 2014. An alternative feedstock of corn meal for industrial fuel ethanol production: Delignified corncob residue. *Bioresource Technology*. 167: 555-559.
- Leschine, S. 2009. Impacts of biofilm formation on cellulose fermentation. Grant No. DE-FG02-02ER15330. University of Massachusetts.
- Lin, Y. and Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology Biotechnology*. 69: 627-642.
- Long, S., Jones, D. T. and Woods, D. R. 1984. Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Journal Applied Microbiology Biotechnology*. 20: 256-261.
- Man, C. R., Ismail, F. A., Ghazali, F. N. and Illias, M. R. 2016. Effects of culture conditions of immobilized recombinant *Escherichia coli* on cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) excretion and cell stability. *Process Biochemistry*. 51: 474–483.
- Matsui, N., Okimori, Y., Takahashi, F., Matsumura, K. and Bamroongrugs, N. 2014. Nipa (*Nipa fruticans* Wurmb) sap collection in Southern Thailand I. sap production and farm management. *Environment and Natural Resources Research*. 4: 75-88.
- Matthew, H., Ashley, O., Brian, K., Alisa, E. and Benjamin, J.S. 2005. Wine making. 101. Available: <http://www.arches.uga.edu/matthaas/strains.htm>

- Mattiasson, B. and Hahn-Hagerdal, B. 1982. Micro-environmental effects on metabolic behavior of immobilized cells : a hypothesis. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*. 16: 52–5.
- Mishra, A., Sharma, A.K., Sharma, S., Bagai, R. and Mathur, A.S. 2016. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. *Renewable Energy*. 3: 1-7
- Miyamoto, K. 1997. Renewable biological systems for alternativesustainable energy production. Available: <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e00.htContent>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96 (6): 673-686.
- Mussatto, S.I. and Roberto, I.C. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. 93: 1-10.
- Nigam, J.N. 2000. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Journal Biotechnology*. 80: 189–93.
- Nikolskaya, A., Senko, O., Stepanov, N., Lyagin, I., Efremenko, E. and Varfolomeyev, S. 2012. Hydrogen-producing immobilized biocatalyst: composition and properties. *Modern problems in biochemical physics: New Horizons*. Nova Science Publishers, New York. 56: 163–170.
- Ofori-Boateng, C. and Lee, K.T. 2014. Sono-assisted organosolv/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment of oil palm (*Elaeisguineensis* Jacq.) fronds for recovery of fermentable sugars: Optimization and severity evaluation. *Fuel*. 115: 170-178.
- Ofori-Boateng, C., Lee, K.T. and Saad, B. 2014. A biorefinery concept for simultaneous recovery of cellulosic ethanol and phenolic compounds from oil palm fronds: Process optimization. *Energy Conversion and Management*. 81: 192-200.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification: review. *Bioresource Technology*. 74: 17–24.

- Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. 2000b. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74: 25-33.
- Panchal, C.J. and Tavares, F.C.A. 1990. Yeast strain selection for ethanol production. In C.J.Panchal (ed). Yeast strain selection. New York: Marcel Deker
- Pattanasupong, A., Nagase, H., Sugimoto, E., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M. and Miyamoto, K. 2004. Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98: 28-33
- Prawitwong, P., Kosugi, A., Arai, T., Deng, L., Lee, K.C., Ibrahim, D., Murata, Y., Sulaiman, O., Hashim, R., Sudesh, K., Ibrahim, W.A.B., Saito, M. and Mori, Y. 2012. Efficient ethanol production from separated parenchyma and vascular bundle of oil palm trunk. *Bioresource Technology*. 125: 37-42.
- Qureshi, N., Ezeji, T.C., 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.
- Qureshi, N., Saha, B.C., 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.
- Rabemanolontsoa, H., Ayada, S. and Saka, S. 2011. Quantitative method applicable for biomass species to determine their chemical composition. *Biomass and Bioenergy*. 35: 4630-4635
- Rattanathanalerk, M., Chiewchan, N. and Srichumpoung, W. 2005. Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. *Journal of Food Engineering*. 66: 259-265.
- Raveedran, K., Ganesh, A. and Khilar, K. C. 1995. Influence of mineral matter on biomass pyrolysis characteristics. *Fuel*. 74: 1812-1822.
- Reddy, Y.H.K., Srijana, M., Reddy, D.M and Reddy, D. 2010. Coculture fermentation of banana agro-waste to ethanol by cellulolytic thermophilic *Clostridium thermocellum* CT2. *African Journal of Biotechnology*. 9: 1926-1934.

- Rosche, B., Li, X.Z., Hauer, B., Schmid, A. and Buehler, K. 2009. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis. *Trends in Biotechnology*. 27: 636-643.
- Silverstein, K.A., Moskal, W.A., Wu, H.C., Underwood, B.A., Graham, M.A., Town, C.D. and VandenBosch, K.A. 2007. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant Journal*. 51: 262-280.
- Singh, L.N., Srivastava, P. and Mishra, P.K. 2009. Studies on ethanol production using immobilized cells of *Kluyveromyces thermotolerans* in packed bed reactor. *Scientific and Industrial Research*. 68: 617-623
- Takei, T., Ikeda, K., Ijima, H. and Kawakami, K. 2011. Fabrication of poly (vinyl alcohol) hydrogel beads crosslinked using sodium sulfate for microorganism immobilization. *Process Biochemistry*. 46: 566-571.
- Takei, T., Ikeda, K., Ijima, H. and Kawakami, K. Fabrication of poly(vinyl alcohol) hydrogel beads crosslinked using sodium sulfate for microorganism immobilization. 2011. *Process Biochemistry*. 46: 566-71.
- Tamunaidu P. and Saka S. 2011. Chemical characterization of various parts of nipa palm (*Nypa fruticans*). *Industrial Crops and Products*. 34: 1423-1428.
- Tamunaidu, P. 2011. Potential evaluation of nipa palm (*Nypa fruticans*) for bioethanol production. Doctoral Dissertation, Kyoto University, Kyoto, Japan.
- Tamunaidu, P., Pitiyont, B., Miyasaka, H. and Saka, S., 2012. Feasibility study on nipa frond as a raw material for bioethanol production. Abstracts of the 4th International Symposium of Kyoto University Global COE Program in collaboration with the Joint Graduate School of Energy and Environment, King Mongkut's University of 36 Technology Thonburi. Zero-Carbon Energy 2012, May 22-23, 2012, Bangkok, Thailand.
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G. and Sonomoto, K. 2005. High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell recycling and bleeding. *Journal of Biotechnology*. 120: 197-206.

- Tosu, P., Luepromchai, E. and Suttinun, O. 2015. Activation and immobilization of phenol-degrading bacteria on oil palm residues for enhancing phenols degradation in treated palm oil mill effluent. *Environmental Engineers*. 20 (2): 141-148.
- Wirawan, F., Cheng, C.L., Kao, W.C., Lee, D.J. and Chang, J.S. 2012. Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis*. *Applied Energy*. 100: 19–26.
- Yang, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C. and Cheng, J. Saccharification and fermentation of dilute-acid-pretreated freeze-dried switchgrass. *Energy Fuels*. 23: 5626-5635.
- Zain, N.A.M., M.S. Suhaimi, and Idris, A. (2011). Development and modification of PVA-alginate as a suitable immobilization matrix. *Process Biochemistry*. 46(11): 2122-2129.
- Zhao, J. and Xia, L. 2010. Ethanol production from corn stover hemicellulosichydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochemical Engineering Journal*. 49: 28–32.
- Zhu, Y. and Yang, S. T. 2004. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology*. 110: 143- 151.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## วิธีการวิเคราะห์

## 1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (A.O.A.C.,1999)

## สารเคมี

1. อะซิโตน หรือแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.00 นอร์มัล
4. Decahydronaphthalene
5. Acid detergent solution

วิธีการเตรียมเติม Cetyl trimethylammonium bromide 20 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1นอร์มัล

## วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่างที่บดละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.10-0.25 มิลลิเมตร ปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลาย Acid detergent ปริมาณ 100 มิลลิลิตร และDecahydronaphthalene ปริมาณ 2 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนจนเดือด เป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากนั้นลดอุณหภูมิให้พออุ่น เป็นเวลา 60 นาที
3. กรองผ่านครุชชีเบลที่ทราบน้ำหนักคงที่ ( $W_1$ ) โดยใช้แรงสุญญากาศ และล้างด้วยอะซิโตน ปริมาณเล็กน้อย 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ
4. นำครุชชีเบลไปทำการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ( $W_2$ )
5. นำครุชชีเบลวางบนภาตกันชื้น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ก่อนใช้แช่เย็นที่ 15 องศาเซลเซียส ลงในครุชชีเบลประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วคนด้วยแท่งแก้วคนเพื่อให้เยื่อใยเปียกทั่วถึง เติมกรดเพิ่มลงไปในทุก ๆ 1 ชั่วโมง พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง
6. นำครุชชีเบลไปกรองเอากรดออกโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ จากนั้นล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งฟิเอชเป็นกลาง
7. อบครุชชีเบลที่ได้จากข้อที่ 6 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดความชื้น ทำให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนัก ( $W_3$ )

8. นำครุชชีเบลไปทำการเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นเย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนัก ( $W_4$ ) (การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ดำเนินการทดสอบตัวอย่างโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

#### การคำนวณ

$$ADF = \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{S}$$

S

$$L = \frac{(W_3 - W_4) \times 100}{S}$$

S

$$C = ADF - L$$

โดยที่ ADF = Acid detergent fiber (ร้อยละ)

L = ปริมาณลิกนิน (ร้อยละ)

C = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละ)

$W_1$  = น้ำหนักครุชชีเบลเปล่า (กรัม)

$W_2$  = น้ำหนักครุชชีเบลและตัวอย่างหลังการย่อยด้วย Acid detergent (กรัม)

$W_3$  = น้ำหนักครุชชีเบลและตัวอย่างหลังผ่านการกรองด้วยกรดซัลฟูริก(กรัม)

$W_4$  = น้ำหนักครุชชีเบลและตัวอย่างหลังการเผา (กรัม)

S = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

วิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ดัดแปลงจากวิธีการของ (ประภัสสร เหลืองหิรัญวุฒิ และภีมวัจฉ์ วัจนาคมกุลม, 2556) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) ใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX (30 m x 320  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m) นำตัวอย่างที่จะทดสอบกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.22  $\mu$ m Flow แก๊สขาเข้า 1 มิลลิลิตร และอุณหภูมิของ Oven เริ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เพิ่ม 5 องศาเซลเซียส จนถึง 70 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์



นาที่ 12 อุณหภูมิของคอลัมน์ขาเข้าและตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด flame ionization detector (FID) เท่ากับ 240 และ 250 องศาเซลเซียส ตามลำดับจากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้โดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับสารมาตรฐานที่สนใจ โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานต้องทำการวัดในสภาวะเดียวกันโดยจะใช้เมทานอลเป็นตัวล้างเข็ม

### 2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม (เอทานอล อะซิโตน บิวทานอล)

จะทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม เอทานอล อะซิโตน และบิวทานอล ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร โดยจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

### 3. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟูแรน และกรดอินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟูแรน และกรดอินทรีย์ ได้แก่ สารเฟอร์ฟูรัล และ 5- HMF และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทริก กรดแลกติก และกรดไกลโคลิก ดัดแปลงตามวิธีการของ Gaspar and Lopes (2009) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX (30 m x 320  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m) นำตัวอย่างที่จะทดสอบมา กรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.22  $\mu$ m Flow แก๊สขาเข้า 1 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิ Oven เริ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เพิ่ม 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 26 นาที อุณหภูมิของคอลัมน์ขาเข้าและตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด flame ionization detector (FID) เท่ากับ 250 และ 275 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้โดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับสารละลายมาตรฐาน โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานต้องทำการวัดในสภาวะเดียวกันโดยจะใช้เมทานอลเป็นตัวล้างเข็ม

#### 3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม (สารประกอบฟูแรน และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ)

จะทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม เฟอร์ฟูรัล 5HMF กรดอะซิติก กรดบิวทริก และกรดแลกติก ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร โดยจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

#### 4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาล

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคาร์บอน 5 และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ ไซโลส อะราบิโนส กลูโคส กาแลกโตส และแรมโนส โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ตามวิธีของธรวารี ทวีกาญจน์ (2559) ใช้คอลัมน์ Zorbax NH<sub>2</sub> ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร หนา 0.5 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิด refractive index detector (RID) และใช้ตัวทำละลาย (Mobile phase) อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้โดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับสารละลายมาตรฐาน โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานต้องทำการวัดในสภาวะเดียวกันโดยจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวล้างเข็ม

##### 4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม (น้ำตาลคาร์บอน 5 และน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม)

จะทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม ไซโลส อะราบิโนส กลูโคส กาแลกโตส และแรมโนส ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร โดยจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

#### 5. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolics)

วิเคราะห์สารประกอบที่มาจากลิกนินเช่นสารประกอบฟีนอลิกทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใช้วิธี Modification of the Folin-Ciocalteu method ตามวิธีการของ Ergul *et al.* (2011) โดยนำตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรเติมลงใน Folin-Ciocalteu phenol reagents ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้น้ำกลั่นที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank

## 6. ศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุจริง และเซลล์จริงโดย SEM

การศึกษาลักษณะพื้นผิววัสดุที่ใช้จริง ได้แก่ ซิลิกา และโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) นำวัสดุมาติดบนแท่นวางตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างข้างต้นฉาบทองด้วยเครื่อง Sputter coater และส่องดูด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) สำหรับการศึกษาลักษณะเซลล์จริง (ก่อนทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล) ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนฉาบทองเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างด้วย glutaraldehyde ( $C_5H_8O_2$ ) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หรือ formaldehyde ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง นำตัวอย่างมา Fix ครั้งที่ 2 ด้วย  $OsO_4$  ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying (การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ดำเนินการทดสอบตัวอย่างโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

### 6.1 ศึกษาพื้นที่ผิวเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุน และพื้นที่ผิวของวัสดุโดยเครื่อง (Surface area analyzer)

การศึกษพื้นที่ผิว เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุน และพื้นที่ผิวของวัสดุ โดยการนำวัสดุ 0.25 กรัม จากนั้นทำการ Outgas ที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้นหรือสารปนเปื้อนที่อาจดูดซับอยู่บนผิววัสดุออก หลังจากนั้นนำตัวอย่างวางในหลอดตัวอย่างที่เชื่อมต่อกับเครื่องวิเคราะห์ ซึ่งตัวอย่างดูดซับไนโตรเจนแก๊ส ที่ 77 เคลวิน ด้วยเครื่อง Belsorp II mini (BEL Japan, Inc., Osaka, Japan) โดยพื้นที่ผิว Specific surface area คำนวณตามวิธี Brunauer-Emmett-Teller (BET) และLangmuir plot method และการกระจายตัวของรูพรุน (Pore size distribution) คำนวณตามวิธี Barrer-Joyner-Halenda (BJH) (การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ดำเนินการทดสอบตัวอย่างโดย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

## ภาคผนวก ข

## กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์

## ข.1 กราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

## การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก โมโนไฮเดรต (gallic acid monohydrate) ปริมาณ 0.55 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร โดยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามสัดส่วน (ตารางผนวกที่ ข.1)

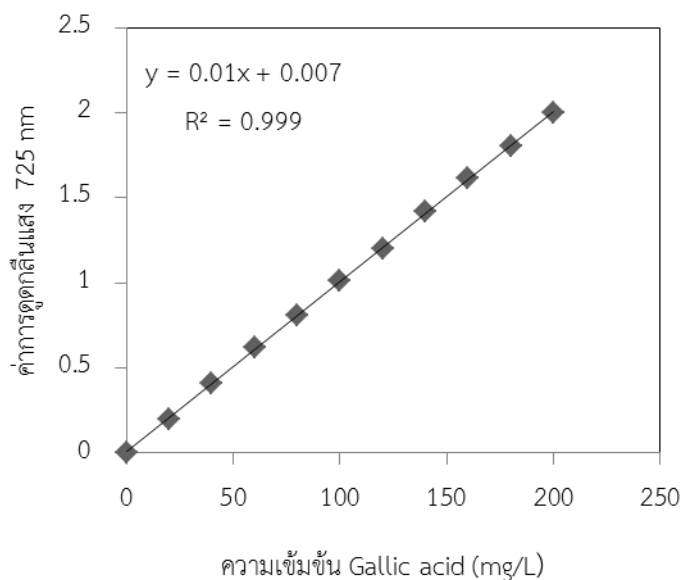
ตารางผนวกที่ ข.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
20	0.2	4.8
40	0.4	4.6
60	0.6	4.4
80	0.8	4.2
100	1.0	4.0

## การสร้างกราฟมาตรฐาน

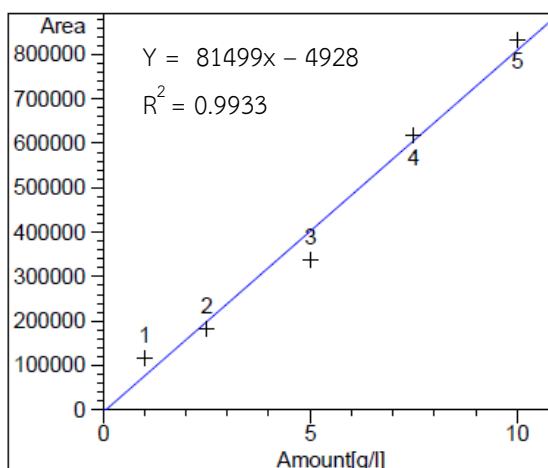
ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรความเข้มข้นละ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติม Folin-Coicalteau phenol reagents ที่เจือจาง 4 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Sodium carbonate Sodium carbonate ที่มีความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ใน

ที่มีด เวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ 725 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาพภาคผนวกที่ ข.1)

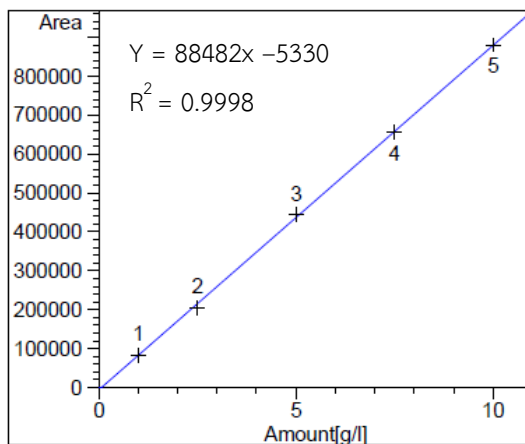


ภาพภาคผนวกที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid)

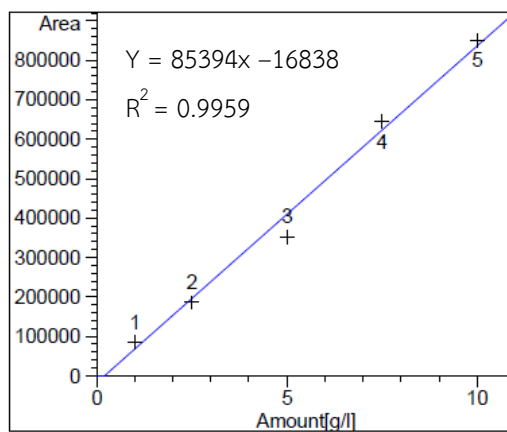
กราฟมาตรฐานน้ำตาลแรมโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลกาแลกโตสจากเครื่อง HPLC



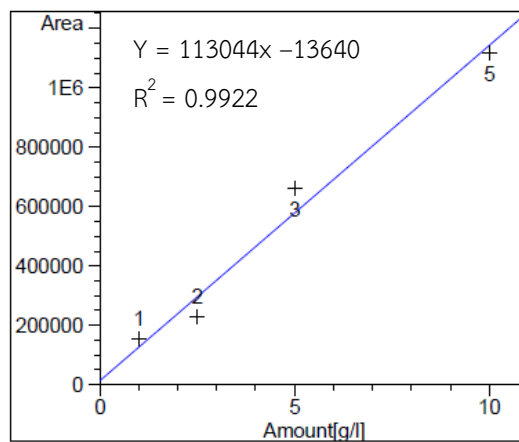
ภาพภาคผนวกที่ ข.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแรมโนส



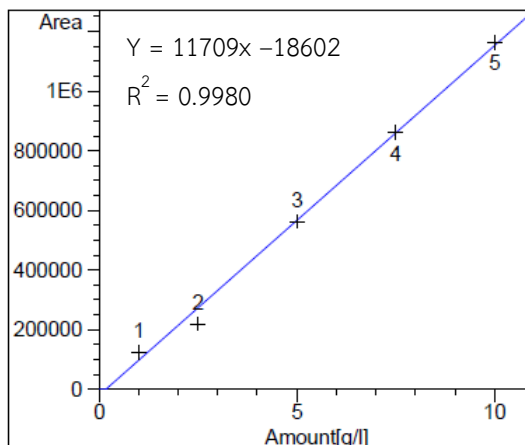
ภาพภาคผนวกที่ ข.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส



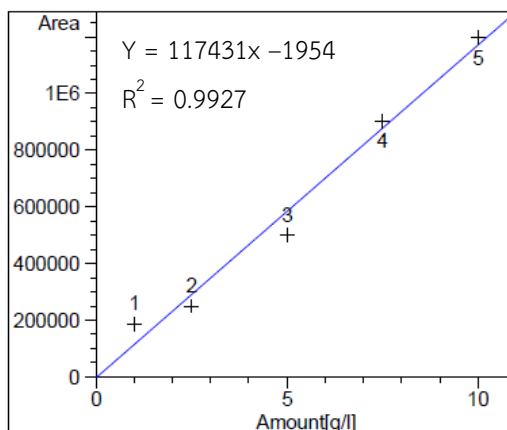
ภาพภาคผนวกที่ ข.4 กราฟมาตรฐานน้ำตาลอะราบิโนส



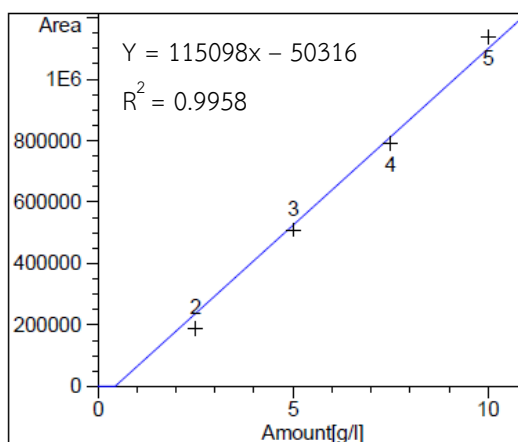
ภาพรูปภาคผนวกที่ ข.5 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส



ภาพภาคผนวกที่ ข.6 กราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส

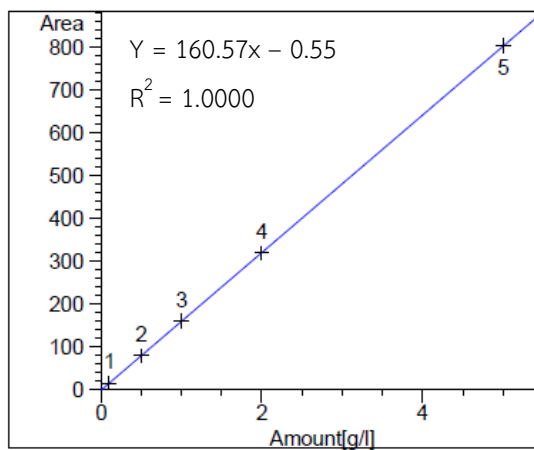


ภาพภาคผนวกที่ ข.7 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

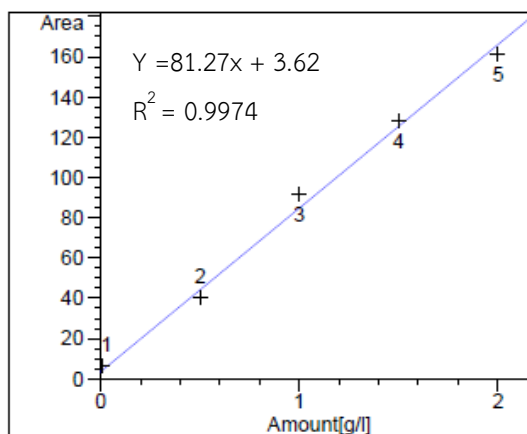


ภาพภาคผนวกที่ ข.8 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกาแลคโตส

กราฟมาตรฐานเอทานอล กรดแอสิติก กรดบิวทริก กรดแลกติก 5-HMF และเฟอร์ฟูรัล  
จากเครื่องGC

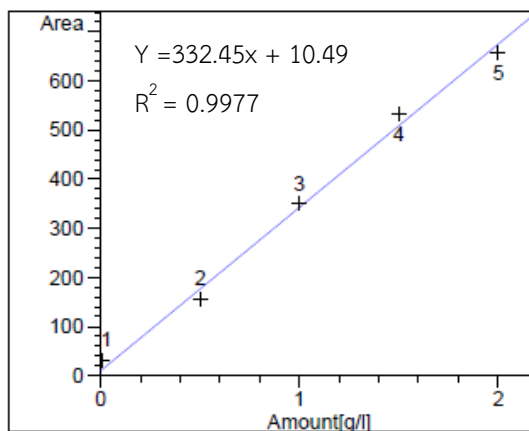


ภาพภาคผนวกที่ ข.9 กราฟมาตรฐานเอทานอล

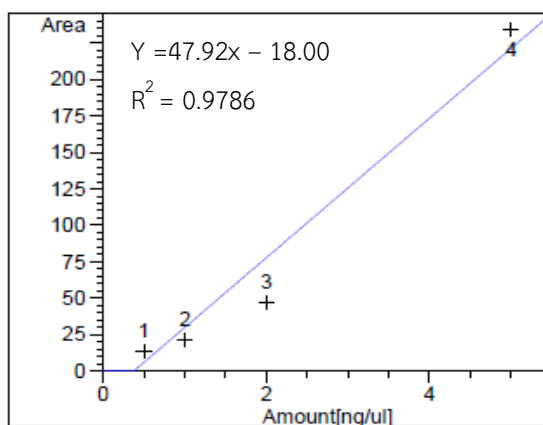


ภาพภาคผนวกที่ ข.10 กราฟมาตรฐานกรดแอสิติก

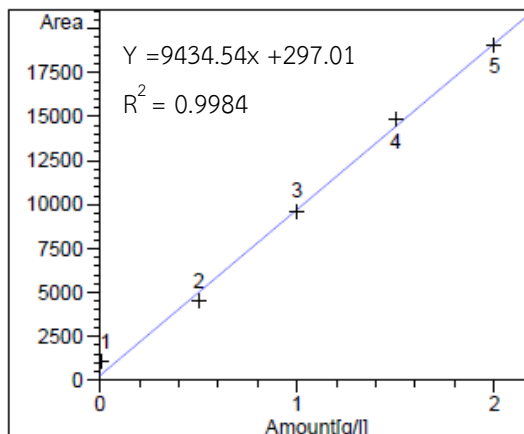




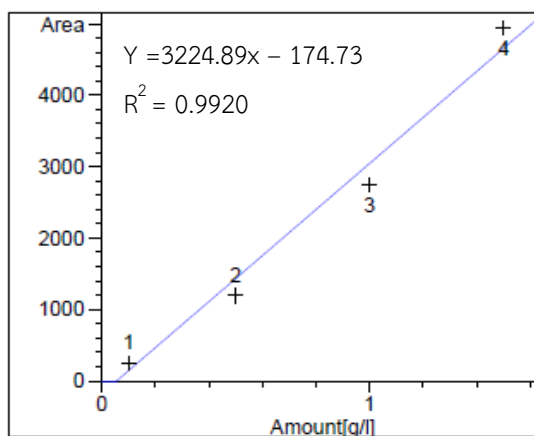
ภาพภาคผนวกที่ ข.11 กราฟมาตรฐานกรดบิวทีริก



ภาพภาคผนวกที่ ข.12 กราฟมาตรฐานกรดแลกติก



ภาพภาคผนวกที่ ข.13 กราฟมาตรฐาน 5-HMF



ภาพภาคผนวกที่ ข.14 กราฟมาตรฐานเฟอริฟูรัล

## ภาคผนวก ค

### การเตรียมสารเคมี

1. เตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์  
ซึ่งผลึกโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร
2. เตรียมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.7 โมลาร์  
ตวงสารละลายกรดซัลฟูริก 98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและปริมาตร ปริมาณ 39 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร
3. เตรียมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและปริมาตร  
ตวงสารละลายกรดซัลฟูริก 96 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร
4. เตรียม Neutral Detergent Solution  
ซึ่ง Sodium dodecyl sulfate, USP 30 กรัม Ethylenediaminetetraacetic disodium salt, dihydrate 18.61 กรัม Sodium borate 6.81 กรัม Sodium phosphate dibasic, anhydrous 4.56 กรัม และ Triethylene glycol ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตรปรับให้มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.9 – 7.1
5. เตรียม Acid Detergent Solution  
ซึ่ง Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 20 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วย สารละลายกรดซัลฟูริก 1 นอ้มัลเป็น 1,000 มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ง

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Cellulose Mineral Salt (CMS) medium

อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นอาหารสูตรพื้นฐาน CMS medium ซึ่งมีส่วนประกอบของสารอาหารในน้ำกลั่น 1 ลิตร ดังนี้ (Reddy *et al.*, 2010)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0	กรัม
Urea	2.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.8	กรัม
CaCl <sub>2</sub>	0.15	กรัม
Sodium citrate	3.5	กรัม
L-Cystein	0.15	กรัม
Resasurin	200	ไมโครลิตร

เตรียมได้โดยใส่ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Urea, Yeast extracted และ Mineral solution ปริมาณตามสูตรลงในปิอกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นจากนั้นคนให้เข้ากันและปรับค่าพีเอชของสารละลายให้เป็น 7.0 ด้วยการเติมสารละลาย NaOH หรือ HCL ตามด้วยการใส่ L-Cystein และ Resasurin จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ลงในขวดเซรัมขนาด 120 มิลลิลิตร ฟันแก๊สไนโตรเจนลงไปเป็นเวลา 1 นาที ต่อ 1 ขวดเพื่อไล่ออกซิเจนปิดขวดด้วยจุกยางและ Aluminium cap ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

## 2. การเตรียมสปอร์ของเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium มีการเติมกลูโคสลงไปโดยมีการไล่ออกซิเจนออกด้วยไนโตรเจนปิดขวดด้วยจุกยางและ Aluminium cap ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาจากขวดเซรัม 1 มิลลิลิตร และนำไปผสมกับเชื้อที่ส่งเชื้อซึ่งเป็นเซลล์แห้งและทำการควบกลับไปฉีดที่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อขวดเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำขวดที่เลี้ยงเชื้อมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่มีปริมาณอาหารอยู่ 72 มิลลิลิตร โดยดูดเชื้อที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 มิลลิลิตร ต่อ 1 ขวด ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออยู่ทั้ง 4 ขวด ไปทำการหมนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้เหลือแต่ตะกอนสปอร์เซลล์เชื้อ นำกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 32 มิลลิลิตร เทผสมกับสปอร์เชื้อและตุบปริมาณ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ใน ependrop ปิดด้วยพาราฟินเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

### 3. เตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บไว้ใน ependrop ที่ -20 องศาเซลเซียส มาทำการ activate โดยจะนำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นนาน 1 นาที และดูเชื้อใน ependrop ถ่ายลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ปริมาณ 80 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคสนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน เมื่อครบกำหนดทำการถ่ายเชื้อที่บ่มปริมาณ 8 มิลลิลิตร ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละขวดอีก 3 ขวด โดยแต่ละขวดมีอาหารอยู่แล้ว 72 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน และเมื่อครบกำหนดสามารถนำเชื้อที่บ่มไปใช้ในการทำการทดลองได้ โดยจะมีการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อเริ่มต้นในการหมักให้อยู่ในช่วง 1.0 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ภาคผนวก จ

ข้อมูลดิบจากการทดลอง

ตารางที่ จ.1 ปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเชื้อจาก

Sugar composition	Non-treated frond hydrolyzates			ค่าเฉลี่ย	SD	Sugar composition	Pretreated frond hydrolyzates			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3		
Xylose	6.61	5.77	6.29	6.22	0.42	Xylose	5.27	5.07	5.17	5.17	0.17
Glucose	2.65	2.85	2.76	2.76	0.10	Glucose	2.13	2.14	2.13	2.13	0.01
Arabinose	1.59	1.38	1.50	1.49	0.10	Arabinose	0.67	0.65	0.66	0.66	0.01
Galactose	0.74	0.76	0.75	0.75	0.01	Galactose	0.21	0.21	0.20	0.21	0.005
Rhamnose	0.22	0.20	0.21	0.21	0.01	Rhamnose	0.10	0.10	0.11	0.10	0.001

ตารางที่ จ.2 ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลในไฮโดรไลเสทไต้ต้นจากที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไข

Sugar composition	Non-treated leaf hydrolyzates			ค่าเฉลี่ย	SD	Sugar composition	Pretreated leaf hydrolyzates			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3		
Xylose	4.98	5.15	5.18	5.10	0.10	Xylose	1.69	1.74	1.60	1.68	0.07
Glucose	0.85	0.82	0.83	0.83	0.01	Glucose	1.36	1.35	1.45	1.39	0.06
Arabinose	0.31	0.30	0.29	0.30	0.01	Arabinose	0.47	0.49	0.47	0.48	0.01
Galactose	0.69	0.72	0.70	0.70	0.01	Galactose	1.02	0.95	1.10	1.02	0.09
Rhamnose	0.30	0.27	0.28	0.28	0.01	Rhamnose	0.33	0.28	0.29	0.30	0.04

ตารางที่ จ.3 ปริมาณสารยับยั้งในไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไข

Inhibitor composition	Non-treated frond hydrolyzates			ค่าเฉลี่ย	SD	Inhibitor composition	Pretreated frond hydrolyzates			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3		
Acetic acid	2.86	2.84	2.91	2.87	0.04	Acetic acid	1.06	1.20	1.05	1.10	0.08
Furfural	0.03	0.03	0.04	0.03	0.0008	Furfural	0.04	0.04	0.03	0.04	0.0004
5-HMF	0.17	0.17	0.19	0.17	0.001	5-HMF	0.22	0.22	0.23	0.22	0.001
Total phenolic	0.02	0.02	0.03	0.02	0.0001	Total phenolic	0.03	0.02	0.02	0.02	0.0001



ตารางที่ จ.4 ปริมาณสารยับยั้งในไฮโดรไลเสทใบต้นจากที่ไม่ผ่านและผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไข

Inhibitor compositio	Non-treated leaf hydrolyzates			ค่าเฉลี่ย	SD	Inhibitor composition	Pretreated leaf hydrolyzates			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3		
Acetic acid	2.03	2.07	2.14	2.08	0.06	Acetic acid	2.11	2.01	1.98	2.03	0.07
Furfural	0.02	0.02	0.03	0.02	0.0004	Furfural	0.04	0.04	0.03	0.03	0.0004
5-HMF	0.13	0.13	0.14	0.13	0.001	5-HMF	0.15	0.14	0.15	0.15	0.001
Total phenolic	0.11	0.12	0.10	0.12	0.0005	Total phenolic	0.01	0.02	0.02	0.02	0.0001

ตารางที่ จ.5 ความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตโดย *C. xylanolyticum* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ซึ่งโดยมีไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	น้ำตาลไซโลส (g/l)			ค่าเฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	น้ำตาลกลูโคส (g/l)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.18	0.17	0.16	0.17	0.01	2	0.21	0.44	0.37	0.34	0.12
3	0.62	0.62	0.60	0.61	0.01	3	0.56	0.59	0.57	0.57	0.02
4	0.83	0.80	0.83	0.82	0.02	4	0.78	0.63	0.58	0.67	0.10
5	0.92	0.90	0.90	0.91	0.01	5	0.85	0.64	0.59	0.69	0.14
6	0.94	0.94	0.95	0.94	0.01	6	0.89	0.65	0.59	0.71	0.15
7	0.94	0.96	0.94	0.95	0.01	7	0.86	0.64	0.61	0.70	0.14

ตารางที่ จ.6 ความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตโดย *C. xylanolyticum* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium ซึ่งมีน้ำตาลผสม 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	Mixe sugar			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.85	0.83	0.98	0.89	0.08
4	1.04	1.05	1.06	1.05	0.01
6	1.09	1.09	1.15	1.11	0.03
8	1.17	1.18	1.19	1.18	0.01
10	1.40	1.43	1.46	1.43	0.03
12	1.38	1.39	1.38	1.38	0.01
14	1.21	1.21	1.20	1.20	0.01

ตารางที่ จ.7 ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงโดยการใช้ของ *C. xylanolyticum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium โดยมีน้ำตาลผสม 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน

Sugar composition	วันที่ 0			ค่าเฉลี่ย	SD	Sugar composition	วันที่ 2			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่						ครั้งที่				
	1	2	3				1	2	3		
Xylose	6.61	5.77	6.29	6.22	0.42	Xylose	3.13	3.15	3.15	3.14	0.01
Glucose	2.65	2.85	2.76	2.76	0.10	Glucose	1.01	1.06	0.96	1.01	0.05
Arabinose	1.59	1.38	1.50	1.49	0.10	Arabinose	0.75	0.76	0.73	0.75	0.02
Galactose	0.74	0.76	0.75	0.75	0.01	Galactose	0.51	0.55	0.50	0.52	0.03
Rhamnose	0.22	0.20	0.21	0.21	0.01	Rhamnose	0.09	0.14	0.13	0.12	0.03

ตารางที่ จ.7 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงโดยการใช้ของ *C. xylanolyticum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium โดยมีน้ำตาลผสม 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน

Sugar composition	วันที่ 4			ค่าเฉลี่ย	SD	Sugar composition	วันที่ 6			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่						ครั้งที่				
	1	2	3				1	2	3		
Xylose	1.74	1.73	1.75	1.74	0.01	Xylose	0.64	0.67	0.66	0.66	0.02
Glucose	0.87	0.87	0.86	0.87	0.005	Glucose	0.69	0.66	0.65	0.67	0.02
Arabinose	0.48	0.48	0.49	0.48	0.005	Arabinose	0.17	0.21	0.24	0.21	0.04
Galactose	0.23	0.23	0.21	0.23	0.006	Galactose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rhamnose	0.06	0.05	0.06	0.06	0.006	Rhamnose	0.03	0.02	0.03	0.03	0.005

ตารางที่ จ.7 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงโดยการใช้ของ *C. xylanolyticum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium โดยมีน้ำตาลผสม 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน

Sugar composition	วันที่ 8			ค่าเฉลี่ย	SD	Sugar composition	วันที่ 10			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่						ครั้งที่				
	1	2	3				1	2	3		
Xylose	0.33	0.30	0.34	0.32	0.02	Xylose	0.26	0.28	0.24	0.26	0.02
Glucose	0.15	0.10	0.12	0.12	0.02	Glucose	0.10	0.08	0.09	0.09	0.005
Arabinose	0.17	0.21	0.24	0.21	0.04	Arabinose	0.05	0.07	0.04	0.05	0.005
Galactose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	Galactose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rhamnose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	Rhamnose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ จ.7 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงโดยการใช้ของ *C. xylanolyticum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMS medium โดยมีน้ำตาลผสม 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน

Sugar composition	วันที่ 12			ค่าเฉลี่ย	SD	Sugar composition	วันที่ 14			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่						ครั้งที่				
	1	2	3				1	2	3		
Xylose	0.09	0.11	0.1	0.10	0.01	Xylose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glucose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	Glucose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Arabinose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	Arabinose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Galactose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	Galactose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rhamnose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	Rhamnose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ จ.8 ความเข้มข้นเอทานอลไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไข

เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอลจาก Non-treated frond hydrolyzates (g/l)			ค่าเฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอลจาก Pretreated frond hydrolyzates (g/l)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.048	0.047	0.048	0.048	0.001	1	0.042	0.042	0.041	0.042	0.001
2	0.049	0.049	0.048	0.049	0.001	2	0.046	0.045	0.044	0.045	0.001
3	0.049	0.051	0.049	0.050	0.001	3	0.047	0.048	0.047	0.047	0.001
4	0.054	0.053	0.053	0.053	0.001	4	0.050	0.049	0.049	0.049	0.001
5	0.063	0.064	0.062	0.063	0.001	5	0.049	0.050	0.051	0.050	0.001
6	0.067	0.067	0.066	0.067	0.001	6	0.051	0.052	0.052	0.052	0.001
7	0.074	0.073	0.072	0.073	0.001	7	0.053	0.054	0.054	0.054	0.001
8	0.047	0.046	0.048	0.047	0.001	8	0.041	0.040	0.040	0.040	0.001



ตารางที่ จ.9 ความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลสที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างเงื่อนไข

เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอลจาก Non-treated leaf hydrolyzates (g/l)			ค่าเฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอลจาก Pretreated leaf hydrolyzates (g/l)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.041	0.042	0.040	0.041	0.001	1	0.031	0.032	0.031	0.031	0.001
2	0.042	0.043	0.042	0.042	0.001	2	0.032	0.033	0.032	0.032	0.001
3	0.044	0.043	0.043	0.043	0.001	3	0.034	0.034	0.033	0.034	0.001
4	0.045	0.044	0.044	0.044	0.001	4	0.035	0.035	0.034	0.035	0.001
5	0.045	0.046	0.044	0.045	0.001	5	0.038	0.037	0.037	0.037	0.001
6	0.046	0.046	0.045	0.046	0.001	6	0.039	0.039	0.038	0.039	0.001
7	0.047	0.047	0.046	0.047	0.001	7	0.040	0.042	0.041	0.041	0.001
8	0.040	0.038	0.039	0.039	0.001	8	0.035	0.034	0.036	0.035	0.001

ตารางที่ จ.10 ความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลเสทก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยแบคทีเรียตรึงไนซูลิกา

เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล Silica OD <sub>600</sub> =1 (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล Silica OD <sub>600</sub> =1.5 (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล Silica OD <sub>600</sub> =2.5 (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3				1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.130	0.130	0.120	0.130	0.01	2	0.170	0.160	0.170	0.170	0.01	2	0.190	0.180	0.190	0.190	0.01
4	0.240	0.240	0.230	0.240	0.01	4	0.280	0.280	0.270	0.280	0.01	4	0.240	0.230	0.240	0.240	0.01
6	0.310	0.310	0.300	0.310	0.01	6	0.350	0.350	0.340	0.350	0.01	6	0.280	0.270	0.290	0.280	0.01
8	0.320	0.320	0.330	0.320	0.01	8	0.570	0.570	0.560	0.570	0.01	8	0.360	0.360	0.350	0.360	0.01
10	0.330	0.330	0.320	0.330	0.01	10	0.760	0.760	0.750	0.760	0.01	10	0.390	0.400	0.380	0.390	0.01
12	0.230	0.230	0.220	0.230	0.01	12	0.530	0.530	0.520	0.530	0.01	12	0.350	0.360	0.360	0.360	0.01
14	0.210	0.190	0.200	0.200	0.01	14	0.220	0.220	0.200	0.210	0.01	14	0.210	0.220	0.190	0.210	0.02

ตารางที่ จ.11 ความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลสเสทก้านทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยแบคทีเรียตรึงรูปใน PVA

เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล PVA OD <sub>600</sub> =1 (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล PVA OD <sub>600</sub> =1.5 (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล PVA OD <sub>600</sub> =2.5 (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3				1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.034	0.036	0.035	0.035	0.001	2	0.096	0.096	0.095	0.096	0.006	2	0.170	0.170	0.160	0.170	0.006
4	0.045	0.046	0.046	0.046	0.006	4	0.100	0.100	0.110	0.100	0.006	4	0.190	0.190	0.180	0.190	0.006
6	0.150	0.150	0.160	0.150	0.006	6	0.160	0.170	0.160	0.160	0.006	6	0.200	0.200	0.190	0.200	0.006
8	0.180	0.180	0.170	0.180	0.006	8	0.190	0.190	0.180	0.180	0.006	8	0.210	0.210	0.200	0.210	0.006
10	0.210	0.210	0.200	0.210	0.006	10	0.220	0.220	0.210	0.220	0.006	10	0.220	0.220	0.210	0.220	0.006
12	0.220	0.230	0.210	0.220	0.010	12	0.240	0.240	0.230	0.240	0.006	12	0.230	0.250	0.220	0.230	0.020
14	0.150	0.140	0.140	0.140	0.006	14	0.140	0.150	0.150	0.150	0.006	14	0.160	0.160	0.170	0.160	0.006

ตารางที่ จ.12 ความเข้มข้นเอทานอลจากไฮโดรไลเซสทางใบต้นจากที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยแบคทีเรียอิสระและแบคทีเรียตรึง 2 ชนิด

เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล Free cell (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล Silica (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD	เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล PVA (g/l)			ค่า เฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่				
	1	2	3				1	2	3				1	2	3		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.33	0.33	0.32	0.33	0.01	2	0.170	0.160	0.170	0.170	0.01	2	0.12	0.15	0.14	0.14	0.02
4	0.39	0.38	0.37	0.38	0.01	4	0.280	0.280	0.270	0.280	0.01	4	0.20	0.19	0.18	0.19	0.01
6	0.43	0.44	0.42	0.43	0.01	6	0.350	0.350	0.340	0.350	0.01	6	0.28	0.29	0.30	0.29	0.01
8	0.46	0.44	0.45	0.45	0.01	8	0.570	0.570	0.560	0.570	0.01	8	0.32	0.33	0.35	0.33	0.02
10	0.43	0.44	0.45	0.44	0.01	10	0.760	0.760	0.750	0.760	0.01	10	0.49	0.43	0.42	0.42	0.02
12	0.40	0.41	0.38	0.40	0.02	12	0.530	0.530	0.520	0.530	0.01	12	0.49	0.51	0.53	0.51	0.02
14	0.15	0.16	0.13	0.15	0.02	14	0.220	0.220	0.200	0.210	0.01	14	0.21	0.20	0.19	0.20	0.01

ตารางที่ จ.13 ความเข้มข้นเอทานอลโดยแบคทีเรียตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการใช้ซ้ำ 10 ครั้งใน ไฮโดรไลสเสทก้านทางใบต้นจาก

ครั้งที่	ปริมาณเอทานอล ใช้ซ้ำ Silica OD <sub>600</sub> =1.5 (g/l)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ตัวอย่างที่				
	1	2	3		
1	0.76	0.75	0.74	0.75	0.01
2	0.74	0.75	0.73	0.74	0.01
3	0.72	0.73	0.71	0.72	0.01
4	0.71	0.69	0.70	0.70	0.01
5	0.70	0.67	0.64	0.67	0.03
6	0.51	0.54	0.55	0.53	0.02
7	0.43	0.44	0.41	0.43	0.02
8	0.42	0.38	0.39	0.40	0.02
9	0.39	0.37	0.38	0.38	0.02
10	0.37	0.39	0.35	0.37	0.02

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวธราวี ทวีกาญจน์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5610920005	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่นักศึกษาระดับอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2557 ของกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2558

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Taweekarn, T., Boonsawang, P., Intasiri, A., and Suttinun, O. (2015). “Ethanol production from nipa palm frond using immobilized *Clostridium xylanolyticum*”. The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference “Innovative Biotechnology” Bangkok, Thailand, November 17-20, 2015.

Taweekarn, T., Boonsawang, P., Intasiri, A., and Suttinun, O. (2016). “ Utilization of nipa palm biomass for ethanol production by *Clostridium xylanolyticum*” International conference on Agriculture & Environment : Food, Water, Soil, Air “New Zealand house of science”, Kuala Lumpur, Malaysia, May 25-26, 2016.