



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญา

วิศวกรรมเคมี

วิศวกรรมเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วย *Clostridium acetobutylicum* โดยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken

Reducing Sugar Production from Water Hyacinth by *Clostridium acetobutylicum*  
Using Box-Behnken Experimental Design

นามผู้วิจัย นางสาวชมพูนุช ล้ออิสระตระกูล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุสิทธิ์ ชนะพิมพ์เมธา, D.Eng. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์อภิญา ดวงจันทร์, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ \_\_\_\_\_ เดือน \_\_\_\_\_ พ.ศ. \_\_\_\_\_

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์จากผักตบชวาด้วย *Clostridium acetobutylicum* โดยการออกแบบการทดลอง  
ตามวิธี Box-Behnken

Reducing Sugar Production from Water Hyacinth by *Clostridium acetobutylicum* using  
Box-Behnken Experimental Design

โดย

นางสาวชมพูนุช ล้ออิสระตระกูล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2555

ชมพูนุช ล้ออิสระตระกูล 2555: การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วย *Clostridium acetobutylicum* โดยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์

อนุสิทธิ์ ฐนะพิมพ์เมธา, D.Eng. 122 หน้า

งานวิจัยนี้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยการหมักกับแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเยื่อใยของผักตบชวาจะประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 35.84 27.11 และ 8.33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเมื่อนำผักตบชวามาปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และสารละลายค่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าองค์ประกอบของเยื่อใยมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 85.31 0.85 และ 1.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จากนั้นนำผักตบชวาล้างผ่านการปรับสภาพแล้วมาทำการศึกษาหาสภาวะในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยหมักกับแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ปริมาณของผักตบชวา 10-50 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการหมัก 24-48 ชั่วโมง จากการออกแบบพบว่าสภาวะของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ คือ ปริมาณของผักตบชวา 10.16 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 38.8 องศาเซลเซียส และเวลาในการหมัก 37.59 ชั่วโมง นั้นจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากสมการที่ได้จากการออกแบบเท่ากับ 9.47 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมัก และเมื่อนำสภาวะดังกล่าวนี้ไปทำการทดลองจริง พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าสมการจากการออกแบบเท่ากับ 4.01 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาทำการปรับความเข้มข้น โดยการระเหยน้ำออกจนมีค่าความหวานเป็น 15 องศาบริกซ์ แล้วไปทำการหมักเพื่อผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จะได้ปริมาณเอทานอล 2.54 กรัมต่อลิตร

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Chompoonuch Loisasatrakul 2012: Reducing Sugar Production from Water Hyacinth by *Clostridium acetobutylicum* using Box-Behnken Experimental Design. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Anusith Thanapimmetha, D.Eng. 122 pages.

The reducing sugar production from the submerged fermentation of water hyacinth with *Clostridium acetobutylicum* was studied for the optimal conditions. The components of water hyacinth by dry weight are cellulose 35.84%, hemicellulose 27.11% and lignin 8.33%. Water hyacinth was pretreated with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5% (w/w) and NaOH 10% (w/v). The results showed that, after the pretreatment, the compositions of water hyacinth were induced to cellulose 85.31%, hemicellulose 0.85% and lignin 1.01%. After that, the optimal condition for the reducing sugar production from water hyacinth using *Clostridium acetobutylicum*. This study employed the response surface Box-Behnken designs to find the conditions for reducing sugar production. The condition was the content of pretreated water hyacinth (10-50 g/l of the medium), temperature (30-50 °C) and incubation time (24-48 hours). The condition for reducing sugar production suggested by minitab program was the content of water hyacinth 10.16 g/l of the medium at 38.8 °C for 37.59 hours. The reducing sugar yield predicted from the statistical equation was 9.47% (g/g dry weight). The deviation value between the predicted model and the experimental results was 4.01%. Finally, the reducing sugar obtained from water hyacinth was concentrated to 15 °Brix prior to fermented by *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339. The result showed that the ethanol from fermentation of water hyacinth was 2.54 g/l.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุสิทธิ์ ชนะพิมพ์เมธา อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์ที่คอยดูแล ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตลอดการ  
ศึกษาวิจัย ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ ที่กรุณาให้คำปรึกษา  
คำแนะนำ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร. เมธี สายศรี  
หยุด และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีนสุภา ขุ้ยจุลเจิม ที่กรุณาสละเวลาเพื่อเป็นคณะกรรมการในการ  
สอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำแนะนำและแนวคิดที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้จัดทำ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวกระบวนการ และภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่เอื้อเพื่อ  
สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ และ ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชา  
วิศวกรรมเคมี รวมถึง เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่ให้การสนับสนุนในการทำ  
วิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) ศูนย์ความ  
เป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง และบัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนในด้านทุนวิจัยและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ญาติพี่น้องที่เป็นกำลังใจเสมอมา จนสำเร็จ  
การศึกษา

ชมพูนุช ล้ออิสระตระกูล

เมษายน 2555

## สารบัญ

## หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	47
อุปกรณ์	47
วิธีการ	50
ผลและวิจารณ์	58
สรุปและข้อเสนอแนะ	76
สรุป	76
ข้อเสนอแนะ	78
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	79
ภาคผนวก	86
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	87
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา	89
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส	93
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี HPLC	97
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วย GC	106
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลผลการทดลอง	109
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	122

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบองค์ประกอบของเส้นใยของผักตบชวาจากงานวิจัยต่างๆ	9
2	ข้อดีและข้อเสียในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เปรียบเทียบกับการไฮโดรไลซิสด้วยสารเคมี	26
3	การออกแบบ Box-Behnken สำหรับ k=3	32
4	ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา โดยการหมักกับแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i>	54
5	องค์ประกอบของผักตบชวาที่ได้จากการวิเคราะห์เอื้อใย	59
6	องค์ประกอบของผักตบชวาหลังจากผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกก่อนที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วนำไปปรับสภาพต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์	60
7	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> ตามการออกแบบการทดลอง Box-Behnken	65
8	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i>	66
9	วิเคราะห์ความแปรปรวน และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i>	67
10	เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> จากการทำนายตามสมการแบบจำลองกับการทดลองจริงที่สภาวะเดียวกัน โดยมีปริมาณของผักตบชวา 10.16 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 38.8 องศาเซลเซียส และเวลาในการหมัก 37.59 ชั่วโมง	72
11	ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่ได้จากการหมักผักตบชวา	73

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	95
ก2	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร	95
ง1	ตำแหน่งเวลา และพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรมของสารละลายเซลโลบิโอส กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แมนโนส และฟรุคโตสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร	99
จ1	พื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีก๊าซ (GC)	107
ฉ1	องค์ประกอบของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมี	110
ฉ2	องค์ประกอบของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	111
ฉ3	องค์ประกอบของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	112
ฉ4	องค์ประกอบของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 1 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟิวริก และตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	114
ฉ5	องค์ประกอบของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 3 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟิวริก และตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	115
ฉ6	ปริมาณน้ำตาลรีดิซซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียก ตามการออกแบบการทดลองของ Box-Behnken	116
ฉ7	ปริมาณน้ำตาลรีดิซซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> ที่สภาวะที่ศึกษา	117

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า	
น8	พื้นที่ได้กราฟของโครมาโตแกรมและปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์แต่ละชนิดที่ได้จากการหมักหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> ที่สภาวะที่ศึกษา	117
น9	ความเข้มข้นเซลล์แห้งที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงการเจริญของแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TYA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที	118
น10	ความเข้มข้นกลูโคสที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงการใช้กลูโคสในการเจริญของแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TYA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที	118
น11	ความเข้มข้นเซลล์แห้งที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงการเจริญของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5339 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที	119
น12	ความเข้มข้นกลูโคสที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงการใช้กลูโคสในการเจริญของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5339 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที	120
น13	พื้นที่ได้กราฟโครมาโตแกรม และความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักเพื่อผลิตเอทานอลด้วย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5339 โดยใช้กลูโคส และน้ำหมักที่ค่าความหวาน 15 องศาบริกซ์ เป็นแหล่งคาร์บอน	121

## สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของผักตบชวา	6
2	ปัญหาของผักตบชวาในแหล่งน้ำ	8
3	โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส	10
4	โครงสร้างของเซลลูโลส	11
5	โครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส	12
6	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	12
7	โครงสร้างของลิกนิน	14
8	การเกิดตัวยับยั้งจากส่วนต่างๆของวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส	17
9	การเกิดปฏิกิริยา enolization	18
10	การเกิดสารมัธยันต์ของปฏิกิริยาได้ 3-deoxyhexosulose (3-deoxy-D-glucosone)	19
11	การเกิดสาร 3-deoxy-D-glucosone 3-4ene	19
12	การเกิดเฟอฟูรัล และ hydroxymethylfurfural	20
13	สูตรโครงสร้างของ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล (HMF)	21
14	สูตรโครงสร้างของเฟอฟูรอล	21
15	โครงสร้างของกรดแทนนิก	22
16	การไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส	24
17	การไฮโดรไลซิสไซลเลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซลเลน	26
18	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Clostridium acetobutylicum</i>	27
19	โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลมอลโตส และซูโครส	28
20	แบบจำลองทั่วไปของกระบวนการหรือระบบ	29
21	การออกแบบ Box-Behnken สำหรับ 3 ตัวแปร	33
22	พื้นผิวตอบสนอง	34
23	กราฟคอนทัวร์	34
24	ลักษณะของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
25	ขั้นตอนการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบของพืช	52

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	ลักษณะทางกายภาพของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ก) ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (ข) ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ค)	62
27	โครงสร้างของผักตบชวาก่อนและหลังจากปรับสภาพด้วยสารเคมี โดยกล้องอิเล็กตรอนกำลังขยายสูง (SEM) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ผักตบชวาที่ไม่ปรับสภาพ (ก) ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (ข) ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ค)	63
28	แสดงการเจริญของแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที	64
29	แสดงอิทธิพลบนพื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์ของอุณหภูมิกับระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวา	70
30	พื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์ แสดงอิทธิพลของปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวา	70
31	พื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์ แสดงอิทธิพลของปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อกับอุณหภูมิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวา	71
32	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i>	71
33	โครมาโตแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> ที่สภาวะที่จากการออกแบบการทดลอง	73
34	การเจริญของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5339 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที	74

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น กลูโคสในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส	96
ง1 โครมาโตแกรมของสารละลายเซลโลบิโอสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	100
ง2 โครมาโตแกรมของสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	100
ง3 โครมาโตแกรมของสารละลายไซโลสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	101
ง4 โครมาโตแกรมของสารละลายอะราบิโนสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	101
ง5 โครมาโตแกรมของสารละลายแมนโนสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	102
ง6 โครมาโตแกรมของสารละลายฟรุคโตสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	102
ง7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของเซลโลบิโอส	103
ง8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของกลูโคส	103
ง9 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของไซโลส	104
ง10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของอะราบิโนส	104
ง11 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของแมนโนส	105
ง12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของฟรุคโตส	105

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

- จ1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย  
เครื่องโครมาโทกราฟีก๊าซ (GC) กับความเข้มข้นของเอทานอลมาตรฐาน 108



## การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วย *Clostridium acetobutylicum* โดยการออกแบบ การทดลองตามวิธี Box-Behnken

### Reducing Sugar Production from Water Hyacinth by *Clostridium acetobutylicum* Using Box-Behnken Experimental Design

#### คำนำ

ปัจจุบันราคาน้ำมันสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เกิดจากความต้องการในการใช้พลังงานในรูปแบบของเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นในปริมาณที่สูงมากทั่วโลก ขณะเดียวกันการผลิตเชื้อเพลิงดังกล่าวถูกจำกัดด้วยพื้นที่ที่มีทรัพยากร จึงหันมาให้ความสนใจกับการแสวงหาพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เช่น พลังงานน้ำ แสงอาทิตย์ ลม นิวเคลียร์ และพลังงานชีวภาพ เป็นต้น พลังงานชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของพลังงานทดแทน โดยเฉพาะเอทานอล การผลิตเอทานอลนั้นสามารถผลิตได้ทั้งจากวัสดุทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เนื่องจากผนังเซลล์ของพืชมีของเซลลูโลสองค์ประกอบหลัก เมื่อย่อยเซลลูโลสจะได้น้ำตาล ซึ่งสามารถนำไปหมักเป็นแอลกอฮอล์ได้ ดังนั้นกลูโคสจำนวนมากในเซลลูโลสจึงเปรียบเสมือนขุมทรัพย์จากธรรมชาติ สามารถนำไปสู่การผลิตแอลกอฮอล์ และน่าจะเป็นเชื้อเพลิงที่สำคัญในปัจจุบันและอนาคต

ผักตบชวา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Eichhomia Crassipes* ชื่อสามัญคือ water hyacinth ซึ่งปัจจุบันนี้จะเห็นได้ว่า ผักตบชวาเป็นวัชพืชน้ำเจริญบนผิวน้ำที่มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วและขยายพันธุ์ได้ง่าย โดยผักตบชวาเพียง 2 ต้น สามารถขยายได้เป็นจำนวนถึง 300 ต้นภายในเวลาเพียง 20 วัน ถ้าอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ผักตบชวาเพียง 10 ต้น นั้นจะขยายพันธุ์ได้ถึง 600,000 ต้น ครอบคลุมพื้นที่น้ำ 2.5 ไร่ ภายในเวลา 8 เดือน และถึงแม้ว่าผักตบชวาจะตกอยู่ในถิ่นแห้งแล้ง แต่เมล็ดก็สามารถจะดำรงชีวิตได้นานเป็นปี เมื่อเมล็ดได้รับน้ำ ก็จะแตกใบได้อีก จากการที่ผักตบชวาสามารถเจริญได้ดีในทุกสภาพอากาศและทุกสภาพพื้นที่ ทั้งในน้ำ สกปรกและน้ำสะอาด เจริญเติบโตได้ดีที่พีเอช 4-10 และอุณหภูมิของน้ำไม่สูงกว่า 34 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะแหล่งน้ำจืด จึงเกิดการแพร่กระจายไปทุกหนทุกแห่งและพบเห็นได้ตามแม่น้ำ ลำคลองทั่วทุกภาคของประเทศไทย ผักตบชวาจึงสร้างปัญหาในหลายๆด้าน เช่น การชลประทาน การสัญจรทางน้ำ การประมง การเกษตรและการสาธารณสุข ก่อปัญหาทำให้แหล่งน้ำตื้นเขิน น้ำเน่าเสีย ลดปริมาณออกซิเจนและแสงสว่างในแหล่งน้ำที่เป็นปัจจัยที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ

เกิดการอุดตันทางระบายน้ำ และกีดขวางการจราจรทางน้ำเป็นอย่างมาก การกำจัดผักตบชวามีอยู่ 3 วิธี คือ ทางเคมี ทางกายภาพ และชีววิทยา แต่การกำจัดผักตบชวาอาจมีผลเสียหายนอกเหนือจากสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้สารเคมีอาจทำให้น้ำเสียและเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ การกำจัดด้วยชีววิธี เช่น ใช้แมลงชนิดหนึ่งเป็นตัวทำลายผักตบชวาซึ่งอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจบางชนิดได้ ส่วนการกำจัดทางกายภาพ โดยการชักลากขึ้นมานบนบกทิ้งให้แห้งและเผา แต่พอฝนตก ต้นผักตบชวาที่ถูกไฟเผาไหม้จะแตกยอดอ่อน และมีขนาดใหญ่กว่าต้นเดิมถึงสองเท่า ปัจจุบันหลายประเทศต้องเสียงบประมาณเป็นจำนวนมากในการกำจัดวัชพืชน้ำชนิดนี้ ทั้งโดยการใช้เครื่องจักรกลและแรงงาน โดยการใช้ยาปราบวัชพืช และการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารเลี้ยงสัตว์ ใช้ในการบริโภค และทำเครื่องจักสาน ถึงกระนั้นก็ยังไม่สามารถกำจัดวัชพืชน้ำอย่างได้ผล ปัจจุบันยังมีการค้นคว้าแนวทางในการนำผักตบชวามาใช้เกิดประโยชน์ เช่น การหาแนวทางผลิตแอลกอฮอล์จากผักตบชวา การหมักเพื่อผลิตปุ๋ยอินทรีย์และการหมักเพื่อผลิตก๊าซธรรมชาติ และการใช้ผักตบชวาเป็นแหล่งเซลล์ulos เพื่อนำไปแปรสภาพด้วยปฏิกิริยาเคมีให้เป็นสารที่มีคุณค่าในทางเศรษฐกิจยิ่งขึ้น

ผักตบชวาเป็นพืชที่มีเซลลูลอสและเฮมิเซลลูลอสที่สูงประกอบด้วยจัดเป็นพืชโตเร็วและก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมจึงทำให้ผักตบชวาจัดเป็นพืชที่เหมาะสมเป็นอย่างยิ่งต่อการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบหลักสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

โครงการวิจัยนี้ศึกษาถึงการนำผักตบชวาซึ่งเป็นพืชน้ำที่สร้างปัญหาเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถผลิตเอโนไซม์สำหรับย่อยเซลลูลอสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียก โดยอาศัยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken เพื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและส่งเสริมการนำวัชพืชน้ำที่เป็นปัญหากับสิ่งแวดล้อมมาใช้ให้เกิดประโยชน์โดยใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพผักตบชวา โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของผักตบชวาก่อนและหลังจากการปรับสภาพ
2. ศึกษาหาสภาวะการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียกด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยอาศัยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken
3. ศึกษาหาชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* เช่น น้ำตาลเซลโลบิโอส กลูโคส และไซโลส เป็นต้น
4. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ผลิตได้จากผักตบชวา โดยทำการหมักกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339

## ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วน ในส่วนแรกเป็นการศึกษาถึงองค์ประกอบของผักตบชวา ส่วนที่สองจะทำการศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพผักตบชวาที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ส่วนที่สามเป็นการศึกษาหาสภาวะในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวากับแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียกที่ไม่มีการเติมอากาศ โดยอาศัยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken ซึ่งมีปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (10-50 กรัมต่อลิตร) อุณหภูมิ (30-50 องศาเซลเซียส) และ ระยะเวลาในการหมัก (24-48 ชั่วโมง) จากนั้นนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสภาวะที่ศึกษา ไปทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่ผลิตได้ และในที่สุดท้ายจะศึกษาถึงการผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ได้จากการหมักผักตบชวา โดยทำการหมักกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปราศจากการเขย่า เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

## การตรวจเอกสาร

### ผักตบชวา

#### 1. ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจายของผักตบชวา

ผักตบชวา (water hyacinth) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. พบครั้งแรกในทวีปอเมริกาใต้แถบประเทศบราซิล ผักตบชวาไม่ได้ก่อให้เกิดปัญหาใดๆ ให้แก่พื้นที่นั้นเลย ทั้งนี้ก็เพราะว่าในถิ่นกำเนิดของมัน มีศัตรูธรรมชาติ เช่น แมลง โรค และศัตรูอื่นๆ คอยควบคุมการระบาดอยู่แล้ว แต่เมื่อถูกนำไปจากถิ่นกำเนิดซึ่งปราศจากศัตรูธรรมชาติ ผักตบชวาจึงเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและถึงขั้นทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ต่อมาชาวคัทซ์ที่ปกครองประเทศอินโดนีเซียได้นำผักตบชวา ซึ่งขณะนั้นมีปลุกกันเฉพาะในสวนพฤกษชาติในหลายประเทศในทวีปยุโรป เข้ามายังประเทศอินโดนีเซียเพราะผักตบชวามีดอกสีฟ้าเป็นช่อตั้งสวยงามคล้ายคลึงกับดอก hyacinth ซึ่งเป็นไม้ประดับของประเทศในเขตอบอุ่น ในปี พ.ศ. 2444 ได้มีการนำผักตบชวาจากประเทศอินโดนีเซียเข้ามาปลูกในวังสระประทุมเพราะเห็นว่าดอกผักตบชวาสวยงามสามารถใช้ประดับสระน้ำได้ดี แต่ภายหลังเกิดน้ำท่วมวังสระประทุม ทำให้ผักตบชวาลุดกระจายไปตามแม่น้ำลำคลอง และแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว จนถึงปี พ.ศ. 2456 จึงได้มีพระราชบัญญัติสำหรับกำจัดผักตบชวาออกมา

#### 2. ลักษณะทั่วไปของผักตบชวา

ลักษณะต้น ประกอบด้วยกลุ่มของใบเรียงกันเป็นกระจุก ในต้นหนึ่งๆ จะมีใบตั้งแต่สองใบขึ้นไป ที่โคนก้านใบจะมีกาบใบ (sheath) ลักษณะเป็นเยื่อบางๆ สีขาวแกมเขียวอ่อนๆ แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นก็จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล บริเวณของกาบใบ เป็นสีน้ำตาลแกมม่วง จะเชื่อมติดต่อกันโดยมีไหล (stolon) ซึ่งเป็นลำต้นที่ทอดไปตามผิวน้ำช่วยในการขยายตัวของผักตบชวาให้เพิ่มขึ้น ต้นหนึ่งๆ ของผักตบชวาจะมีไหลแตกออกไปได้หลายอัน เมื่อไหลแตกออกไปแล้ว ก็จะเจริญขึ้นเป็นต้นใหม่ แต่ยังคงติดกับต้นเดิมอยู่และเกิดเป็นกอขึ้น พร้อมทั้งมีรากเกิดขึ้น

ลักษณะรากจะไม่ยึดติดกับพื้นดิน จึงถูกกระแสลมหรือน้ำพัดพาไปได้ไกลๆ แต่ถ้าน้ำตื้นแล้วรากจะหยั่งยึดติดกับพื้นดินได้ รากของผักตบชวาเป็นแบบรากฝอย (fibrous root) คือ มีรากย่อยๆ เป็นกระจุก รากที่แทงออก จะมีลักษณะอวบ สีขาว เมื่อมีอายุมากขึ้นจึงจะมีรากขนอ่อน (root

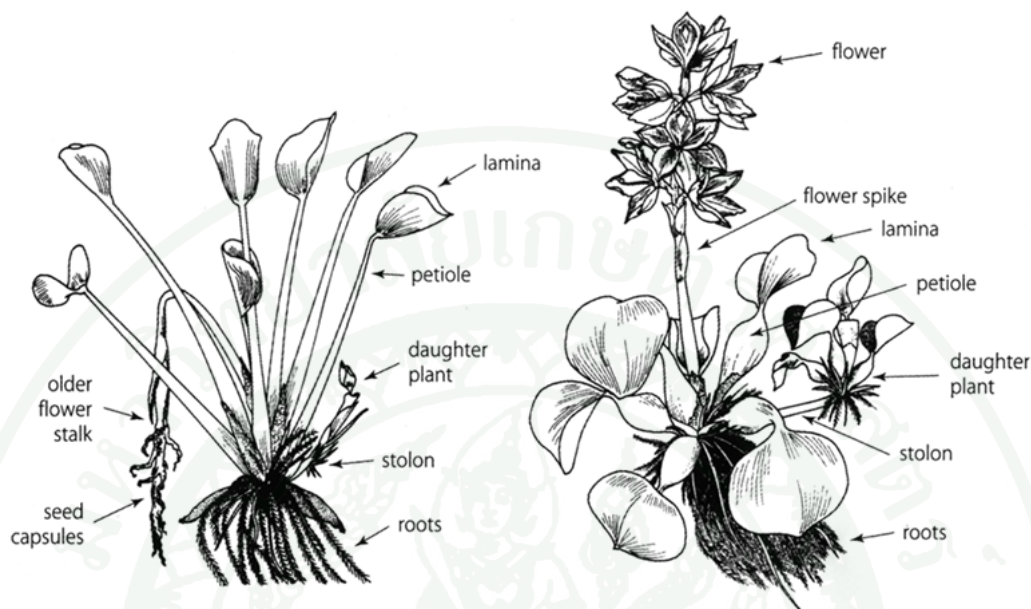
hair) ที่มีสีน้ำตาลอ่อน และเมื่อแก่ รากขนอ่อนนี้จะเปลี่ยนสีน้ำตาลแก่จนถึงสีดำ ความยาวของรากจะแตกต่างกันไป บางเส้นก็ยาวเกือบถึงหนึ่งเมตร (60-90 เซนติเมตร)

ลักษณะใบ เป็นแบบใบเดี่ยว (simple leaf) ประกอบด้วย แผ่นใบ (blade) และก้านใบ (petiole) แผ่นใบมีลักษณะคล้ายรูปไต (reniform) หรือคล้ายรูปหัวใจ (cordate) มักมีความกว้างมากกว่ายาว หรือเกือบจะเท่าๆ กัน เมื่อยังอ่อน ปลายใบมักจะมน แต่เมื่อมีอายุมากขึ้น ปลายใบจะแหลม มีสีเขียวเข้ม ขอบใบเรียบ ระบบเส้นใบ (venation) ซึ่งทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและอาหาร เป็นแบบเส้นใบขนาน

ก้านใบมีลักษณะกลม เรียบ อวบน้ำ ถ้าต้นผักตบชวาเจริญอยู่ห่างๆ กัน ลำต้นจะเล็กและก้านใบมักจะพองออกเป็นท่อนลอยน้ำ แต่ถ้าผักตบชวาเจริญอยู่ในที่เบียดชิดกันมาก โดยเฉพาะในน้ำนิ่ง ก้านใบจะไม่พอง นอกจากนั้น ก้านใบยังยาวมาก บางแห่งพบว่ายาวถึงหนึ่งเมตรก็มีการเกิดใบอ่อน จะเกิดตรงกลางกอ โดยแผ่นใบของใบอ่อนจะม้วนหุ้มรอบโคนก้านใบใกล้เคียง และมีกาบใบบาง ปลายกาบใบนี้ จะมีลักษณะคอดแล้วบาน ขอบหยักเล็กน้อย เป็นเยื่อบางๆ เมื่อใบอ่อนโตขึ้น ก้านใบก็จะขยายขึ้น ต้นกาบใบที่ห่อหุ้มนั้นออก แผ่นใบก็จะค่อยคลี่เป็นอิสระจากโคนก้านใบเดิมในระยะแรกใบจะมีสีเขียวอ่อน ต่อไปจะมีสีเขียวเข้มขึ้น กาบใบนั้นก็ยังคงติดอยู่ตรงโคนก้านใบ

ลักษณะดอกมีสีฟ้าสวยงามมาก ดอกออกเป็นช่อ มีก้านดอก (spike) ในช่อหนึ่งๆ จะมีจำนวนดอกแตกต่างกันไป ถ้าช่อดอกเล็ก ก็จะมีดอกประมาณ 4-5 ดอก ถ้าช่อดอกใหญ่ อาจจะมีจำนวนดอกเพิ่มขึ้นจนถึง 60 ดอก ช่อดอกจะเกิดบริเวณกลางๆ ต้นการเกิดของช่อดอก มีลักษณะคล้ายกับการเกิดใบ คือที่โคนก้านจะมีกาบใบบางๆ หุ้มไว้และที่ปลายก้านมีแผ่นใบเล็กๆ เกิดขึ้นด้วย ช่อดอกจะเจริญมาจากโคน ก้านใบเล็กๆ นี้ โดยที่ใบครั้งแรกจะมีกาบใบบางๆ หุ้มช่อดอกไว้ที่หนึ่ง และมีกาบใบอีกอันหุ้มโคนก้านใบไว้ เมื่อช่อดอกเจริญขึ้น ก้านช่อดอกจะค่อยๆ ยาว พองใหญ่ขึ้น ทำให้ภายในที่หุ้มก้านช่อดอกกับก้านใบขาดออก และเมื่อก้านช่อดอกเจริญมากขึ้น ก็จะดันกาบใบด้านในขาด ก้านช่อดอก (peduncle) ก็แทงชูช่อดอกเจริญ โผล่ขึ้นมาก โดยมีใบเล็กๆ ที่ปลายก้านใบ และภายในทำหน้าที่เป็นใบประดับ (bract) รองรับช่อดอกอีกทีหนึ่ง เมื่อเจริญเต็มที่แล้วดอกมักจะบานพร้อมกันหมดทั้งช่อ โดยจะค่อยๆ บานตั้งแต่แสงอาทิตย์เริ่มส่องแสง แล้วก็บานเต็มที่เมื่อแสงแดดส่องจ้า ดอกจะบานเพียง 1 วัน หลังจากนั้น กลีบดอกก็จะหุบเหี่ยวขดเป็นเกลียว แล้วก้านช่อดอกก็จะโค้งงอลงสู่พื้นน้ำ ผักตบชวาต้นหนึ่งๆ จะมีดอกได้หลายช่อ โดยจะทยอยกันออกดอก ดอกแต่ละดอก ประกอบด้วยกลีบดอก 6 กลีบ ปลายกลีบแยกเป็นแฉก มีขนาดแตกต่างกัน ส่วนโคนกลีบจะติดกันเป็นหลอด (tube) มีสีเขียว หลอดนี้จะติดไปถึงก้านช่อดอก ส่วนกลีบรวมนั้น

จะเป็นสีม่วงอ่อน มีกลีบอันหนึ่งซึ่งอยู่ตรงกลาง มีขนาดใหญ่กว่ากลีบอื่น มีแต้มสีเหลืองทับอยู่บนสีม่วง ทำให้ดอกมีสีสันสวยงามมาก ลักษณะของผักตบชวาแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะของผักตบชวา

ที่มา: Julien *et al.* (1999)

นอกจากนี้ ยังมีเกสรตัวผู้ (stamen) 6 อัน สั้น 3 ยาว 3 ติดอยู่ที่ตอนล่างของกลีบดอก อับเกสรตัวผู้ (anther) มีสีเหลือง ส่วนเกสรตัวเมีย (pistil) มีส่วนตรงปลายเรียกว่า stigma มีสีม่วงอ่อน อยู่บนก้าน (style) ต่อมาจากรังไข่ (ovary) ซึ่งอยู่เหนือกลีบดอก (superior ovary) รังไข่นี้เมื่อได้รับการผสมแล้ว จะเจริญขึ้นเป็นผล แต่ตามปกติแล้วในสภาพแวดล้อมในประเทศไทยมักจะไม่ค่อยพบว่า มีการผสมของดอกผักตบชวา จึงไม่ค่อยพบเมล็ด (seed) ผักตบชวา ในกรณีที่มีการผสม เมล็ดมีขนาดเล็กมาก สีน้ำตาลเข้ม

หลังจากที่ดอกบานได้ 48 ชั่วโมง และไม่มีแมลงมาช่วยผสมเกสร จะเกิดการผสมตัวเอง หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ เมล็ดเล็กๆ สีดำจะแก่ และก้านช่อดอกจะโค้งงอลงเบื้องล่าง เมื่อกระเปาะผลแตก เมล็ดก็จะหลุดลงสู่พื้นท้องน้ำ ในเนื้อที่ 1 ไร่ จะมีเมล็ดตกในโคลนตมได้พื้นน้ำถึง 18 ล้าน เมล็ด และสามารถรักษาความงอกอยู่ได้นานถึง 15 ปี เพราะฉะนั้น ภายใต้อุณหภูมิของดินแดนต่างๆ ที่เคยมีผักตบชวาขึ้นอยู่อาจจะยังมีเมล็ดผักตบชวาสะสมอยู่นับเป็นพันล้านเมล็ด รอคอยที่จะงอกจาก

เมล็ดเป็นต้นอ่อนเมื่อถึงคราวจำเป็น โดยทั่วๆ ฝักตบชาจะไม่สืบพันธุ์โดยเมล็ด นอกจากในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเช่น ในตอนที่น้ำแห้งในฤดูแล้ง ซึ่งต้นฝักตบชาแห้งตายหมด ครึ่งพอดถึงฤดูฝนเมล็ดที่พักตัวอยู่ในดินจะเริ่มงอกขึ้นมาเป็นต้นอ่อน และในไม่ช้าก็จะเจริญเติบโต

การสืบพันธุ์ของฝักตบชาที่พบเห็นอยู่ทั่วไปและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดก็คือ การแตกไหลแล้วกลายเป็นลำต้นติดอยู่กับต้นแม่เป็นจำนวนมากจนเกิดเป็นกอใหญ่ หลังจากที่ดินอ่อนเกิดตากและใบของตนเองได้ภายในเวลาเพียงไม่กี่วัน ต้นอ่อนเหล่านี้ก็จะเริ่มสร้างต้นอ่อนต่อไปเป็นช่วงที่สาม ได้มีผู้รายงานว่า ต้นฝักตบชาเพียง 2 ต้น สามารถสร้างลูกหลานได้เป็นจำนวนถึง 300 ต้นภายในเวลาเพียง 20 วัน และเพิ่มเป็น 1200 ต้น ภายใน 4 เดือน แต่ในสภาพตามธรรมชาติ มีผู้สังเกตว่าฝักตบชาจะเพิ่มปริมาณเป็นสองเท่าภายใน 10 วัน ถ้าหากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ต้นฝักตบชา 10 ต้น จะสร้างลูกหลานได้ถึง 600,000 ต้น ครอบคลุมพื้นที่น้ำ 2.5 ไร่ ภายในเวลา 8 เดือน

### 3. ปัญหาที่เกิดจากฝักตบชาและการใช้ประโยชน์จากฝักตบชา

ฝักตบชาเป็นวัชพืชที่เจริญอยู่บนผิวน้ำ ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วและพบเห็นได้ตามแม่น้ำลำคลองทั่วทุกภาคของประเทศไทย จากการที่ฝักตบชาสามารถเจริญได้ดีในทุกสภาพอากาศและทุกสภาพพื้นที่ โดยเฉพาะแหล่งน้ำจืด จึงเกิดการแพร่กระจายไปทุกหนทุกแห่ง ฝักตบชาจะสร้างปัญหาหลายด้าน เช่น การชลประทาน การสัญจรทางน้ำ การประมง การเกษตร และการสาธารณสุข ก่อปัญหาทำให้แหล่งน้ำตื้นเขิน น้ำเน่าเสีย ลดปริมาณออกซิเจนและแสงสว่างในแหล่งน้ำที่เป็นปัจจัยที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ ก่อให้เกิดสัตว์พาหะนำโรค เกิดการอุดตันทางระบายน้ำ และกีดขวางการจราจรทางน้ำเป็นอย่างมาก ฝักตบชาจึงเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปัญหาของผักตบชวาในแหล่งน้ำ

ที่มา: กองสาธารณสุขและสิ่งแวดล้อม เทศบาลเมืองราชบุรี (2554)

เนื่องจากผักตบชวาเป็นพืชที่เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ง่าย ทำให้หลายประเทศต้องเสียงบประมาณเป็นจำนวนมากในการกำจัดวัชพืชน้ำชนิดนี้ ทั้งโดยการใช้เครื่องจักรกลและแรงงาน โดยการใช้ยาปราบวัชพืช และการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารเลี้ยงสัตว์ ใช้ในการบริโภค และทำเครื่องจักสาน ถึงกระนั้นก็ยังไม่สามารถกำจัดวัชพืชนี้อย่างได้ผล ปัจจุบันยังมีการค้นคว้าแนวทางในการนำผักตบชวามาใช้เกิดประโยชน์ เช่น การหาแนวทางผลิตแอลกอฮอล์จากผักตบชวา การหมักเพื่อผลิตปุ๋ยอินทรีย์ การหมักเพื่อผลิตก๊าซธรรมชาติ และการใช้ผักตบชวาเป็นแหล่งเซลล์โลสเพื่อนำไปแปรสภาพด้วยปฏิกิริยาเคมีให้เป็นสารที่มีคุณค่าในทางเศรษฐกิจยิ่งขึ้น

#### 4. ส่วนประกอบทางเคมีของผักตบชวา

ผักตบชวาสามารถอยู่ได้ทุกสภาพน้ำ ทั้งในน้ำสกปรกและน้ำสะอาด เจริญเติบโตได้ดีที่พีเอช 4-10 และอุณหภูมิของน้ำไม่สูงกว่า 34 องศาเซลเซียส ในดินจะมีน้ำเฉลี่ยประมาณร้อยละ 95 ในใบร้อยละ 89 และในก้านใบร้อยละ 96.7 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบผักตบชวา พบว่าผักตบชวาประกอบด้วยเซลล์โลส เฮมิเซลล์โลส ลิกนิน เถ้า และโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบองค์ประกอบของเส้นใยของผักตบชวาจากงานวิจัยต่างๆ

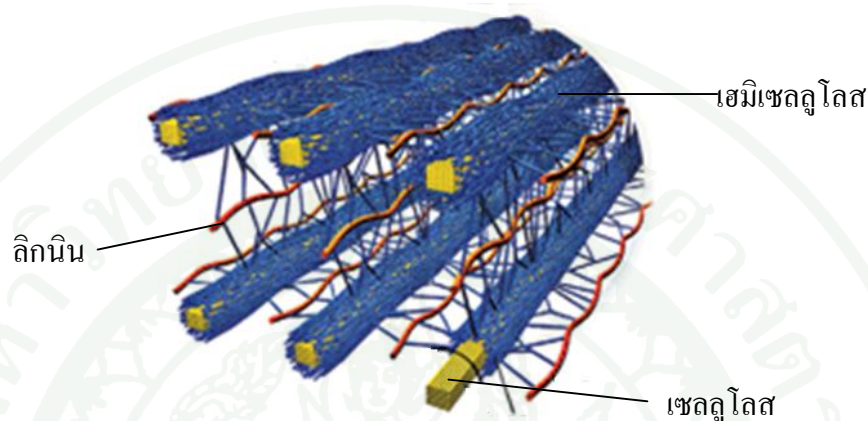
งานวิจัย	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง)				
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	โปรตีน
Bolenz <i>et al.</i> (1990)	31	22	7	15	-
Abdelhamid และ Gabr (1991)	19.5	19.02	9.27	25.7	20
Poddar <i>et al.</i> (1991)	25.61	18.42	9.93	16.39	16.25
Chanakya <i>et al.</i> (1993)	18	33.97	26.36	-	-
Patel <i>et al.</i> (1993)	17.8	43.4	7.8	20.2	11.9
Katima (2001)	19.1	18.4	25.6	23.5	-
Nigam (2002)	18.20	48.70	3.50	-	-
Mukherjee และ Nandi (2004)	36.5	22.0	15.2	2.6	-
Mishima <i>et al.</i> (2008)	19.7	27.1	-	-	-
Kumar (2009)	18.4	49.2	3.55	-	12.6
Sornvoraweat และ Kongkiattikajorn (2010)	19.02	32.69	4.37	-	10.20
รัชพล (2554)	44.71	14.85	3.06	-	-

รัชพล (2554) ได้รายงานว่าการที่ปริมาณองค์ประกอบของเส้นใยของผักตบชวาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมและสถานที่เก็บตัวอย่างผักตบชวา พืชจะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้นจึงทำให้ผักตบชวาในแต่ละสถานที่ที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน

#### วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นสารอินทรีย์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในพืช เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว และเศษไม้ ซึ่งลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ดังภาพที่ 3 อัตราส่วนของทั้ง 3 อย่างมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช การนำเอามาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีคือการเปลี่ยนเป็นสารเคมีที่มีราคาสูงขึ้น ปัญหาในการนำมาใช้ประโยชน์เกิดขึ้นเนื่องจากลิกนิน ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรง เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จะเข้าไปย่อยสลาย การใช้ประโยชน์จากลิก

โนเซลลูโลสต้องมีการแยกส่วนประกอบต่างๆออกจากกัน เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่มีมากและเป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตเมื่อนำมาผ่านการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ก็จะได้น้ำตาลกลูโคส เฮมิเซลลูโลสเมื่อนำมาย่อยสลายก็จะได้น้ำตาลไซโลส ซึ่งน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด มีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง



ภาพที่ 3 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส

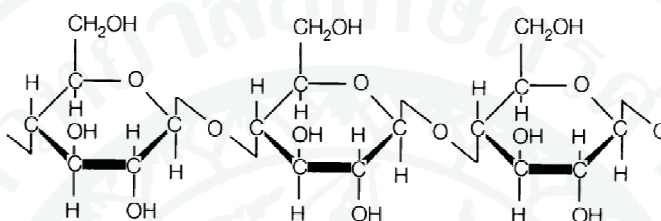
ที่มา: DeAngelis *et al.* (2010)

### 1. เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) สายยาว มีมวลโมเลกุลสูง ไม่มีกิ่งก้านสาขา และเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glucosidic linkage (ภาพที่ 4) มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ  $(C_6H_{10}O_5)_n$  โดยมีค่า degree of polymerization อยู่ในช่วงประมาณ 100-10,000 หน่วย เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในผนังเซลล์พืช โดยพบรวมตัวอยู่กับลิกนิน เพนโตแซนกัน แทนนิน ไขมัน และสารที่ทำให้เกิดสี เซลลูโลสที่ได้จากแต่ละส่วนของพืช จะมีความแข็งแรงและความเหนียว (toughness) แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอายุ และชนิดของพืช

เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 3 หมู่ สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของผลึกจึงมีมาก และโครงสร้างของเซลลูโลสยังจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ จึงทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกสูงมาก ส่วนที่เกิดผลึกจะมีความหนาแน่นมาก จึงทนทานต่อการถูก

ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์และสารเคมีมากกว่าส่วนที่ไม่เป็นผลึก (noncrystalline หรือ amorphous) นอกจากนี้ส่วนที่เป็นผลึกยังดูดน้ำได้น้อยกว่าด้วย ทำให้ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่ละลายในกรดเข้มข้น เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟิวริก เป็นต้น จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสรวดเร็วมากในสารละลายกรดที่อุณหภูมิห้อง แต่จะหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ เซลลูโลสขวมตัว ในสารละลายของเกลือเข้มข้นบางชนิด เช่น สารละลายอัลคาไลไฮดรอกไซด์ (alkali hydroxide) บางครั้งทำให้เซลลูโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถละลายได้

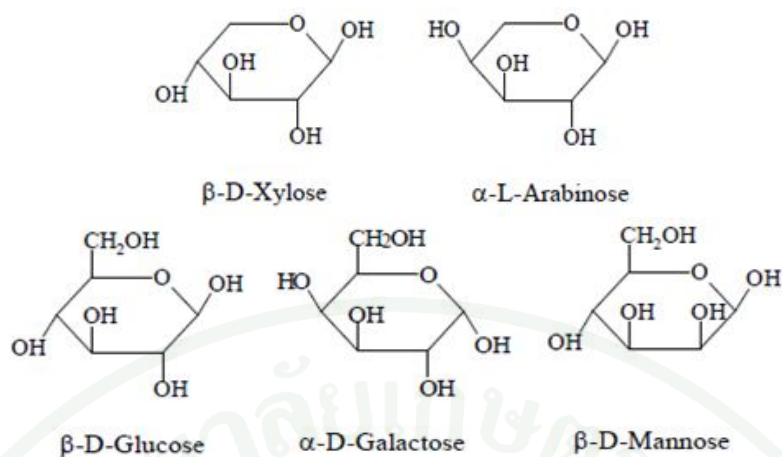


ภาพที่ 4 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา: Colebrook (2011)

## 2. เฮมิเซลลูโลส

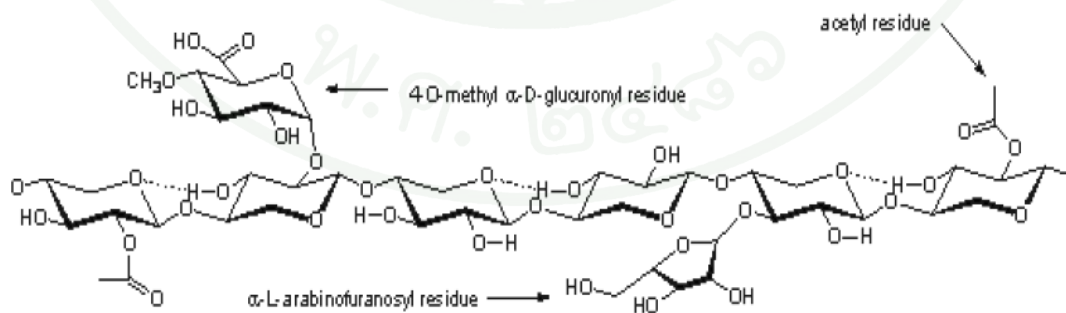
เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำและมีปริมาณการเกิดเป็นพอลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) ประมาณ 200 โดยทั่วไปพืชจะประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสประมาณ 1 ใน 3 ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ร่วมกับเซลลูโลสและลิกนิน ทำให้เกิดเป็นผนังเซลล์พืชที่แข็งแรง เฮมิเซลลูโลสมีทั้งโครงสร้างที่เป็นสายโซ่ตรงและโซ่กิ่งของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ ไซโลส และอะราบิโนส และน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ กลูโคส แมนโนส และกาแลกโตส (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Zomora (2011)

องค์ประกอบส่วนใหญ่ในเฮมิเซลลูโลสเป็นไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตา (1,4) และพบในไม้เนื้อแข็งมากกว่าไม้เนื้ออ่อน ทั้งนี้ไม่ค่อยพบเฮมิเซลลูโลสที่มีไซโลสเพียงชนิดเดียวในธรรมชาติ จึงมักพบอยู่ร่วมกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ และมีส่วนของลิกนินจับตัวกันอยู่อย่างหนาแน่นด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยทั่วไปเฮมิเซลลูโลสจะมีความเป็นกรด เนื่องจากมีหมู่ 4-เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคส (4-methyl- $\alpha$ -D-glucose) จับอยู่กับออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 ซึ่งการมีหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 2 และ 3 ดังภาพที่ 6 ส่งผลให้สามารถสกัดเฮมิเซลลูโลสออกได้ง่ายด้วยสารละลายเบส แต่ขั้นตอนของการสกัดเฮมิเซลลูโลสออกนั้นอาจต้องมีการกำจัดลิกนิน (delignification) ร่วมด้วย



ภาพที่ 6 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Harmsen *et al.* (2010)

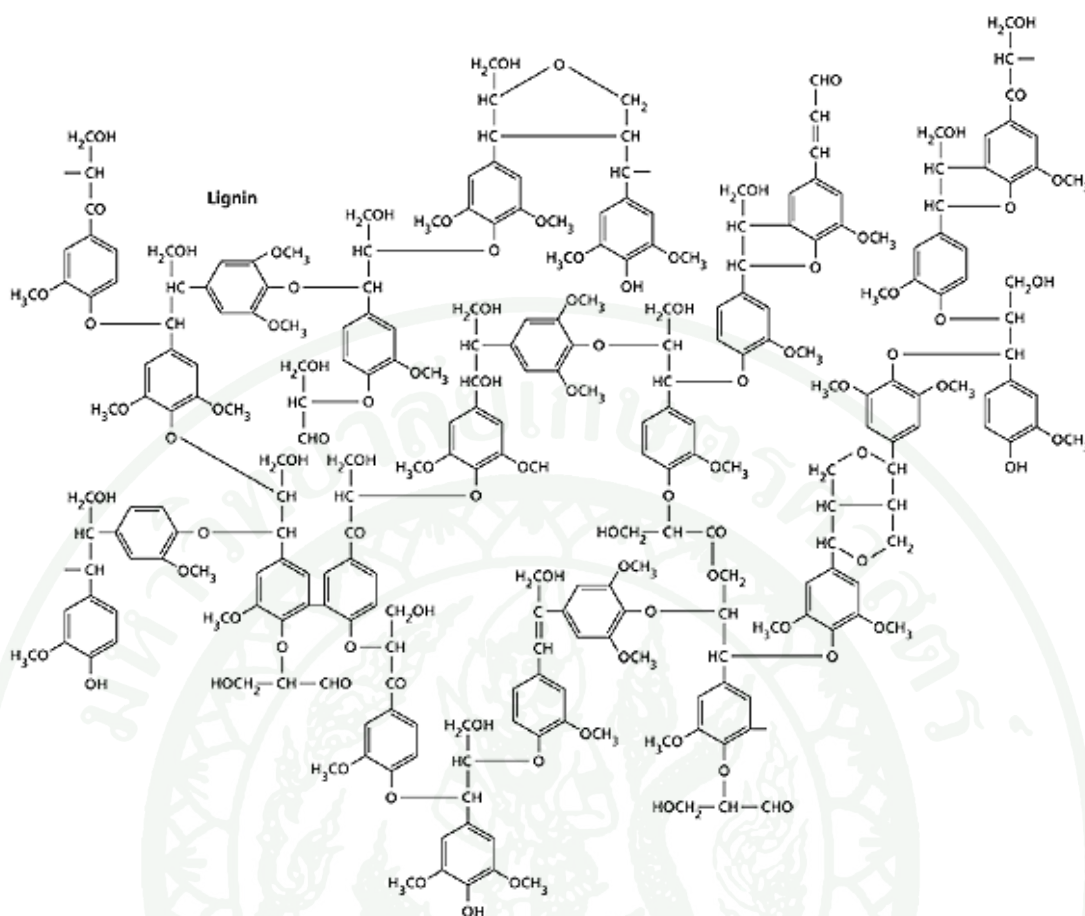
เฮมิเซลลูโลสจะถูกละลายได้ง่ายด้วยกรดหรือเบสเจือจางหรือเอนไซม์ เพราะเฮมิเซลลูโลสไม่มีรูปร่างแน่นอน ไม่เป็นเส้นตรง และมีลำดับของหน่วยย่อยน้ำตาลที่เรียงตัวแบบสุ่ม จึงทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่างไซโลสถูกทำลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ได้ง่าย

### 3. ลิกนิน

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่พบในผนังเซลล์พืชที่มีความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างร่วมกับเซลลูโลส และพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ ลิกนินประกอบด้วยโมเลกุลที่เป็นวงแหวนที่ต่อกันแบบสุ่มเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยภายในโครงสร้างจะเชื่อมกันด้วยพันธะอีเธอร์หรือคาร์บอนระหว่าง 2 โมเลกุล ทำให้ลิกนินทนทานต่อการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์มากกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงต้องอาศัยสารเคมีในการแยกลิกนินออกจากพอลิแซ็กคาไรด์

ลิกนินมีโครงสร้างที่เกิดจากหน่วยที่เหมือนกันซ้ำๆ ประกอบเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ มีการเชื่อมต่อกันของหน่วยย่อยคือ ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenyl propanoid) ที่มีหมู่เมธิลอยู่บนโมเลกุล (ภาพที่ 7) ลิกนินจากไม้เนื้ออ่อน หญ้า และไม้เนื้อแข็งมีองค์ประกอบของหมู่แทนที่พวกเมทอกซี (methoxy) และการเกิดพันธะระหว่างหมู่ฟีนิลที่แตกต่างกัน

ลิกนินมีสมบัติที่สำคัญคือ การละลายในตัวทำละลาย โดยปกติลิกนินจะไม่ละลายน้ำและตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นจึงสามารถสกัดลิกนินได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง ขณะที่บางส่วนในกลุ่มของอัลคาไลน์ลิกนิน (alkaline lignin) สามารถละลายได้ในตัวทำละลาย พวกไดออกเซน (dioxane) ไพริดีน (pyridine) และสารละลายเบสเจือจางได้ นอกจากนี้ เมื่อมีการเติมหมู่เมธิล (methylation) และหมู่อะซีติล (acetylation) แทนที่ตำแหน่งต่างๆ บนวงแหวนเบนซีนในโครงสร้างของลิกนิน ทำให้ลิกนินสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 280 นาโนเมตร ทั้งนี้ การเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ก็เป็นการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซีให้แก่โครงสร้างของลิกนิน ทำให้ลิกนินสามารถดูดกลืนแสงได้ด้วย



ภาพที่ 7 โครงสร้างของลิกนิน

ที่มา: Taiz and Zeiger (2011)

การที่ลิกนินอยู่ร่วมกับเซลลูโลสในเนื้อไม้ ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรงได้ตามธรรมชาติ รวมทั้งยังทำให้จุลินทรีย์และเอนไซม์ไม่สามารถทำลายโครงสร้างพืชได้ง่าย โดยโครงสร้างที่ลิกนินอยู่ร่วมกับเซลลูโลสจะมีพันธะโควาเลนต์เชื่อมระหว่างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นเพื่อให้การใช้ประโยชน์จากวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสมิมากขึ้น จึงต้องทำการปรับสภาพวัสดุเหล่านี้ก่อน และป้องกันผลเสียที่เกิดจากลิกนิน รวมทั้งให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

## การปรับสภาพวัตถุดิบ

เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในรูปผลึกของสารประกอบเชิงซ้อนกับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนที่นำมาใช้ คือเซลลูโลสเท่านั้น ขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบเสียก่อน เพราะทั้งเฮมิเซลลูโลสและลิกนินทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง ซึ่งลิกนินจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ต่ำ และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักด้วย ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนเข้ากระบวนการไฮโดรไลซิส คือ แยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีขึ้น ในการปรับสภาพนั้น จะต้องส่งผลต่อปริมาณเซลลูโลสน้อยที่สุด ซึ่งวิธีการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ

### 1. วิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

เป็นการปรับลดขนาดของวัตถุดิบและลดโครงสร้างที่เป็นผลึก (crystallinity) โดยทำลายโครงสร้างวัตถุดิบเพื่อให้ปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวภาพในขั้นไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง การตัดหรือการบดให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลง จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบทำให้สารเคมีหรือเอนไซม์เข้าทำการไฮโดรไลซิสได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องใช้พลังงานสูง

### 2. วิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

2.1 การใช้กรด (acid pretreatment) เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายกรดเจือจาง ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟิวริก เป็นต้น กรดจะทำการไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสได้เป็นน้ำตาลไซโลส และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ละลายน้ำออกมา โดยประสิทธิภาพของการปรับสภาพด้วยกรดยังขึ้นอุณหภูมิด้วย ซึ่งที่อุณหภูมิสูงจะช่วยทำให้ประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซิสดีขึ้น

2.2 การใช้ด่าง (alkaline pretreatment) เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายด่างเจือจาง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น โดยสารละลายด่างจะทำให้เฮมิเซลลูโลส และลิกนินละลายน้ำออกมา นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการพองตัว เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิว และลดการเป็นผลึกของวัตถุดิบอีกด้วย

### 3. วิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment)

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ ที่สามารถไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ได้ ซึ่งการใช้เอนไซม์ในการปรับสภาพวัตถุดิบจะมีต้นทุนที่สูง แต่ข้อดีของการใช้เอนไซม์ คือ ใช้พลังงานต่ำ และปฏิกิริยาไม่รุนแรง เป็นเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรง และช่วยลดความเป็นผลึกได้ดี

#### การไฮโดรไลซิส

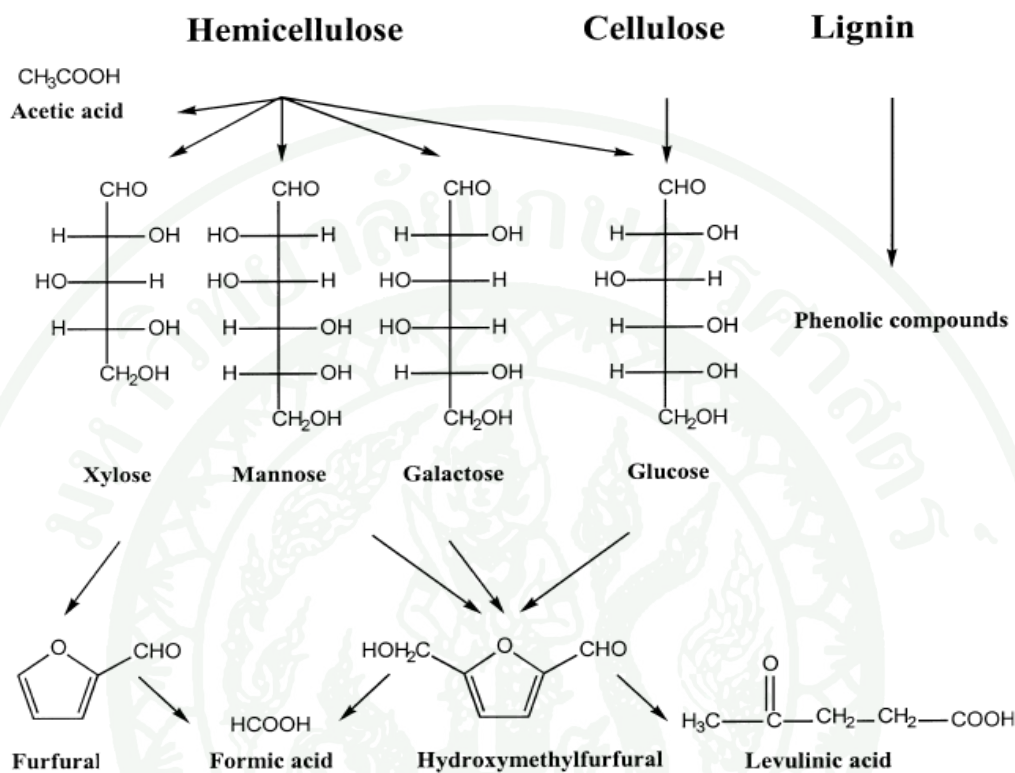
การไฮโดรไลซิสวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เป็นการย่อยสลายเซลลูโลส หรือ เฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลก่อนด้วยกรด หรือ ด่าง หรือเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

#### 1. การไฮโดรไลซิสด้วยกรด (acid hydrolysis)

เป็นการทำลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน สารละลายที่นิยมใช้ คือ กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟิวริก เป็นต้น โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นกลูโคสที่เกิดขึ้นบางส่วนจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไป ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เช่น เฟอฟูรัล (furfural) นอกจากนี้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบรุนแรง ภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อน ซึ่งมีราคาแพง และกรดที่ผ่านการใช้แล้วยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย แต่วิธีนี้ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ประมาณ 15-20 นาที

การไฮโดรไลซิสวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด นอกจากได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลแล้วยังพบสารพิษที่เกิดขึ้นระหว่างการไฮโดรไลซิส ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้มักเกิดจากการไฮโดรไลซิสของเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส และเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น ไซโลส แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส เป็นต้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง กลูโคสและไซโลสจะถูกย่อยสลายเป็นอนุพันธ์ฟิวราน เช่น เฟอฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรัล (hydroxymethylfurfural, HMF) ที่สามารถย่อยสลายต่อไปเป็นกรดฟอร์มิก (formic acid) และในกรณีของ HMF เมื่อย่อยสลายแล้วจะได้กรดเลวูลินิก (levulinic acid) ส่วนลิกนินเมื่อเกิดการย่อยสลายแล้วจะเกิดสารประกอบฟีนอลิกขึ้น ได้แสดงในภาพที่ 8 ซึ่งสารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการลดสารพิษก่อนการหมัก เพื่อช่วยให้จุลินทรีย์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 8 การเกิดตัวขี้ยังจากส่วนต่างๆของวัตถุดิบพวกกลีโคซิลโนเซลลูโลส

ที่มา: Palqvist และ Hahn-Hägerdal (1990)

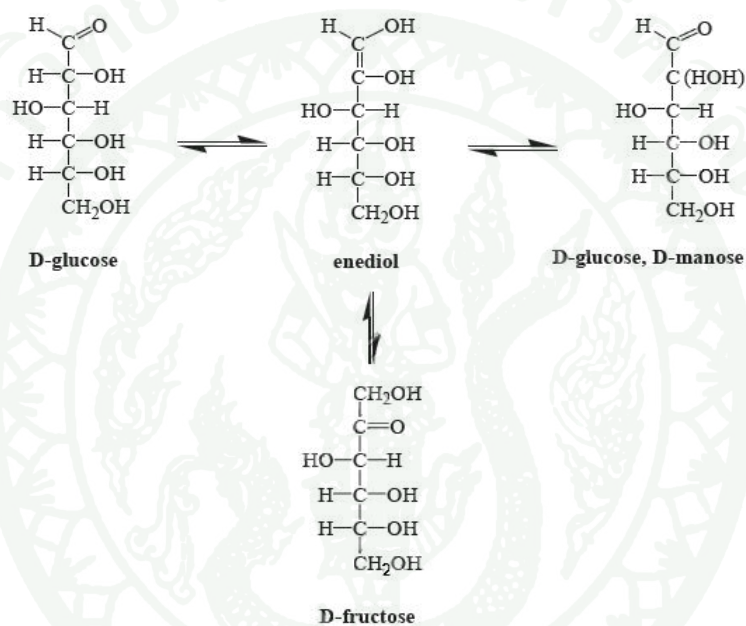
### 1.1 สารพิษและผลที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซิสด้วยกรด มีดังนี้

#### 1.1.1 การเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของน้ำตาล

สารพิษที่ได้จากการสลายตัวของน้ำตาล ได้แก่ ฟิวรัล และ HMF โดยฟิวรัลได้จากการสลายตัวของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เช่น ไซโลส และอะราบิโนส ส่วนน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม เช่น กลูโคส แมนโนส และกาแลคโตส นั้นย่อยสลายเป็น HMF

การเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของน้ำตาลแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

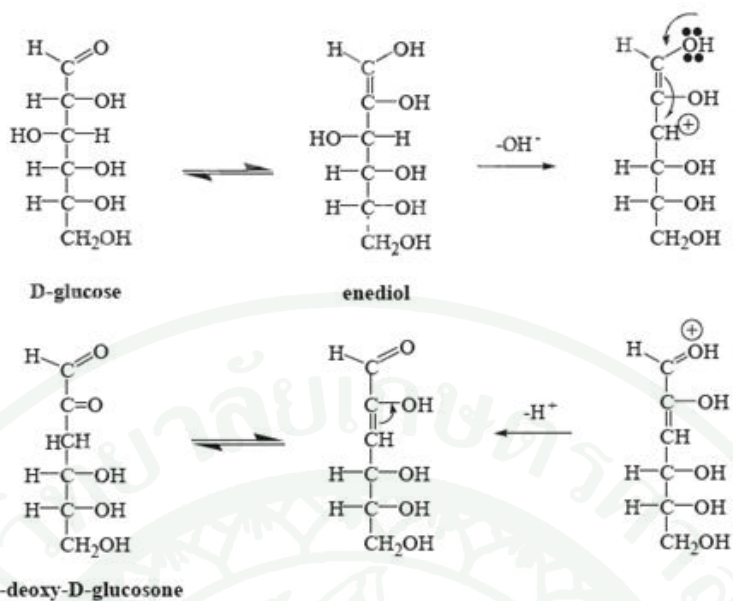
ขั้นที่ 1 การเกิดปฏิกิริยา enolization เป็นปฏิกิริยาขั้นเริ่มต้น (starting reaction) ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสกลายเป็นแมนโนส และฟรุกโตส ดังภาพที่ 9 ขั้นตอนนี้มีความสำคัญเนื่องจากเกิดสารตั้งต้นของปฏิกิริยา โดยทำให้โมเลกุลของน้ำตาลที่เรียงตัวไม่เป็นวงแหวน (acyclic) เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสลับไปมาของอัลโดส และคีโตสที่เป็นอีพิเมอร์กัน (epimer) และอยู่ในรูปของอินไดโอด (enediol)



ภาพที่ 9 การเกิดปฏิกิริยา enolization

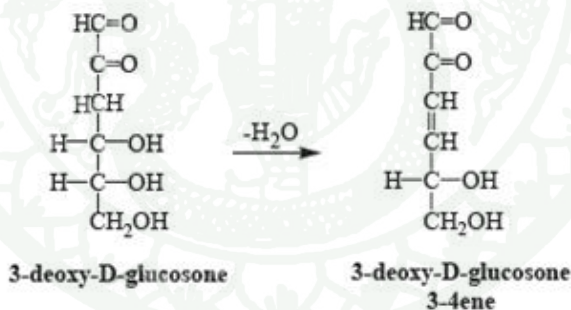
ที่มา: พิศมัย (2547)

ขั้นที่ 2 ปฏิกิริยาการแตกสลาย (degradative reaction) ปฏิกิริยานี้เกิดการสลายตัวเนื่องจากความร้อน และเกิดการสูญเสียน้ำ เมื่อ enediol เกิดการสูญเสียน้ำ (dehydration) มีการจัดเรียงตัวใหม่ได้ 3-deoxyhexosulose (3-deoxy-D-glucosone) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ (intermediate) แสดงในภาพที่ 10 จากนั้น 3-deoxy-D-glucosone เกิดการเสียน้ำได้เป็น 3-deoxy-D-glucosone 3-4ene ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 10 การเกิดสารมัธยันต์ของปฏิกิริยาได้ 3-deoxyhexosulose (3-deoxy-D-glucosone)

ที่มา: พิศมัย (2547)

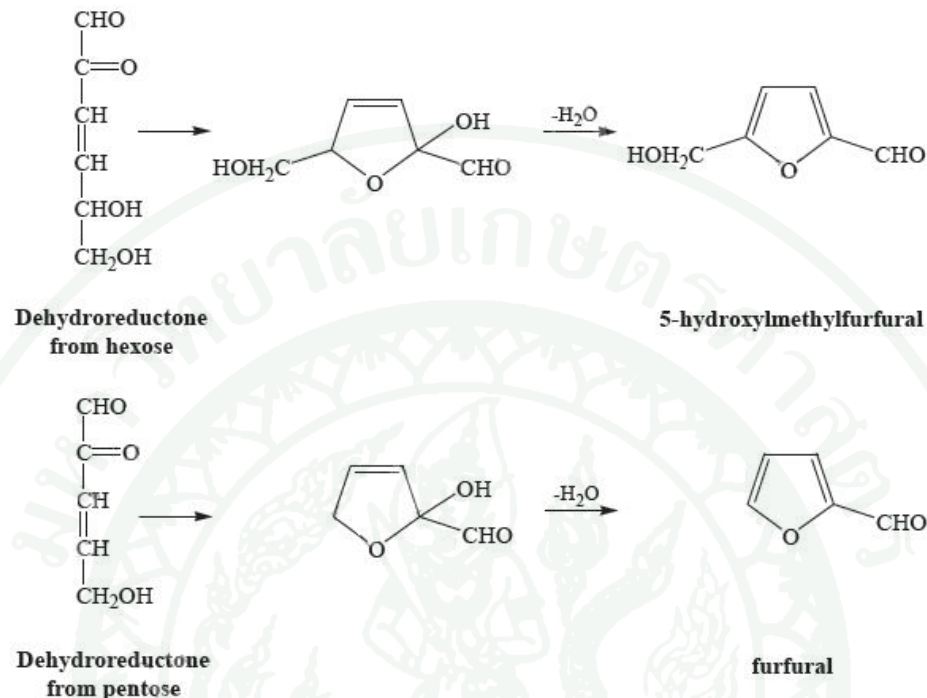


ภาพที่ 11 การเกิดสาร 3-deoxy-D-glucosone 3-4ene

ที่มา: พิศมัย (2547)

ขั้นที่ 3 ปฏิกิริยาการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอูฟิวรัล และ/หรือเฟอูฟิวรัล (hydroxymethylfurfural furfural formation) โดยเฟอูฟิวรัล และ HMF เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของคาร์โบไฮเดรต dehydroreductone (1,2-dicarbonyl) ที่ได้จากน้ำตาลเฮกโซสสามารถเกิดโครงสร้างวงแหวนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และตำแหน่งที่ 5 และสูญเสียน้ำได้เป็น HMF ซึ่งสารประกอบนี้จะให้กลิ่นคาราเมลอ่อนๆ แต่ไม่ใช่องค์ประกอบทางด้านกลิ่นรสที่สำคัญ ส่วน

dehydroreductone ที่ได้จากน้ำตาลเพนโทสสามารถเกิด โครงสร้างที่เป็นวงแหวนและสูญเสียน้ำได้ เป็นเฟอพิวรัล ซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญในการให้กลิ่นคาราเมล ดังแสดงในภาพที่ 12

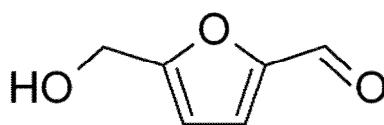


ภาพที่ 12 การเกิดเฟอพิวรัล และ hydroxymethylfurfural

ที่มา: พิสมัย (2547)

### 1.1.2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของน้ำตาล

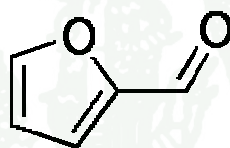
1) 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรัล (5-Hydroxymethylfurfural, 5-HMF) หรือมีชื่อเรียกทั่วไปว่า 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-ฟูรัลดีไฮด์ (5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde) หรือ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-ฟูแรนคาร์บออลดีไฮด์ (5-Hydroxymethyl-2-furancarbaldehyde) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 13 โดยจะมีลักษณะเป็นผลึก มีจุดเดือดอยู่ที่ 115 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวที่ 35 องศาเซลเซียส จุดวาบไฟ 79 องศาเซลเซียส และมีความหนาแน่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.29 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยมีสูตรทางเคมีคือ  $C_6H_6O_3$  มีน้ำหนักโมเลกุล 126.11 สามารถละลายได้ในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เช่น เมทานอล เอทานอล ไดทิวอีเทอร์ เบนซีน อะซิโตนและอีทิวอะซิเตด



ภาพที่ 13 สูตรโครงสร้างของ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล (HMF)

ที่มา: Anonymous (2011)

2) เฟอฟูรอลหรือมีชื่อเรียกอื่นๆ คือ ฟูแรน-2-คาร์บอกซอลดีไฮด์ (furan-2-carboxaldehyde), ฟูรอล (fural), เฟอฟูรอลดีไฮด์ (furfuraldehyde), 2-ฟูรอลดีไฮด์ (2-furaldehyde), ไพโรมุซิก แอลดีไฮด์ (pyromucic aldehyde) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 14 มีคุณสมบัติทางกายภาพ คือ จุดเดือด 161.7 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวที่ -36.5 องศาเซลเซียส จุดวาบไฟ 62 องศาเซลเซียส และมีความหนาแน่น 1.16 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสูตรทางเคมีคือ  $C_5H_4O_2$  มีน้ำหนักโมเลกุล 96.08 สามารถละลายได้ในเมทานอล



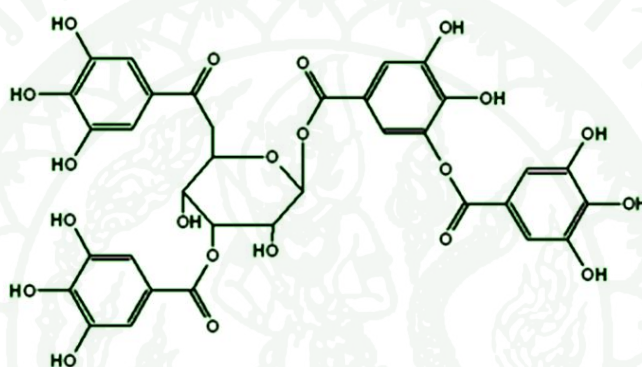
ภาพที่ 14 สูตรโครงสร้างของเฟอฟูรอล

ที่มา: Anonymous (2012)

### 1.1.3 ผลกระทบที่ได้จากการสลายตัวของลิกนิน

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารพิษที่ได้จากการสลายตัวของลิกนิน มีผลต่อการทำงานของหัวใจมากที่สุด เนื่องจากมีมวลโมเลกุลขนาดเล็กและเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งมีผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดความแข็งแรงและประสิทธิภาพในการเลือกสารผ่านเข้าออกได้ลดลง ส่งผลให้การเคลื่อนที่เข้าออกของเอนไซม์หรือสารจำเป็นอื่นๆ เข้าสู่เซลล์ได้น้อยลงจนทำให้มีความผิดปกติในการใช้น้ำตาลของเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งผลกระทบที่ได้จากการย่อยสลายลิกนินยังมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์รุนแรงกว่าอนุพันธ์ฟิวราน ถึงแม้ว่ามีความเข้มข้นต่ำกว่าก็ตาม

สารประกอบฟีนอลิกเป็นอนุพันธ์ของเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลติดต่อกันอยู่เป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ต่างๆ ในตำแหน่งออร์โท (orto) เมตา (meta) หรือพารา (para) ได้ อีกสารประกอบฟีนอลิกพื้นฐาน คือ ฟีนอลซึ่งประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ มีมวลโมเลกุล 94.11 เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี เมื่อโดนอากาศจะมีสีชมพูอ่อนๆ จุดหลอมเหลว 40.85 องศาเซลเซียส จุดเดือด 182 องศาเซลเซียส และจุดวาบไฟ 79 องศาเซลเซียส สารละลายของฟีนอลเป็นกรดอ่อน โดยมีค่า pKa เท่ากับ 10.0 สารละลายฟีนอลละลายได้ในกลีเซอรอล คาร์บอนไดซัลไฟด์ แอลกอฮอล์ อีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม สามารถวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปของกรดแทนนิก (tannic acid) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีนดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 โครงสร้างของกรดแทนนิก

ที่มา: Anonymous (2012)

#### 1.1.4 อนุพันธ์ที่ได้จากองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

กรดอะซีติกได้จากหมู่อะซีลิลที่พบในเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมักเกิดขึ้นเมื่อย่อยสลายด้วยกรด โดยสารที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เมื่อค่าพีเอชของการหมักลดลง กรดอะซีติกสามารถละลายได้ในไขมัน ทำให้เกิดการเลือกผ่านสารเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เมื่อภายในเซลล์ที่มีค่าพีเอชประมาณ 7.4 กรดอะซีติกจะแตกตัวและสะสมอยู่ในไซโทพลาซึม ในรูปของโปรตอน ทำให้ ค่า pH ภายในเซลล์ต่ำลงและเกิดภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์ ตลอดจนเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายในที่สุด

## 1.2 ผลจากสารพิษ

HMF มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าเฟอพิวรัลและมักพบ HMF ในสารละลายจากการย่อยสลายด้วยกรดในปริมาณที่ต่ำกว่าด้วย สารพิษมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตมวลเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตในระยะปรับตัว (lag phase) เป็นเวลานาน

ความสามารถของจุลินทรีย์ที่ทนทานต่อสารพิษ ไม่สามารถกำหนดเป็นความเข้มข้นที่แน่นอนได้ เนื่องจากผลของการยับยั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ สภาพของการเลี้ยงในอาหารหมัก ชนิดของการหมัก และชนิดของสารพิษที่มีอยู่ในสารละลายนั้น เป็นต้น

โดยรวมแล้วการเกิดความเป็นพิษจากผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของน้ำตาล ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของกลีซิน รวมถึงอนุพันธ์ที่ได้จากวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายของเฟอพิวรัล และ HMF ทำให้เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโต การผลิตมวลเซลล์ และปริมาณการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ลดลงได้

## 2. การไฮโดรไลซิสด้วยด่าง (alkaline hydrolysis)

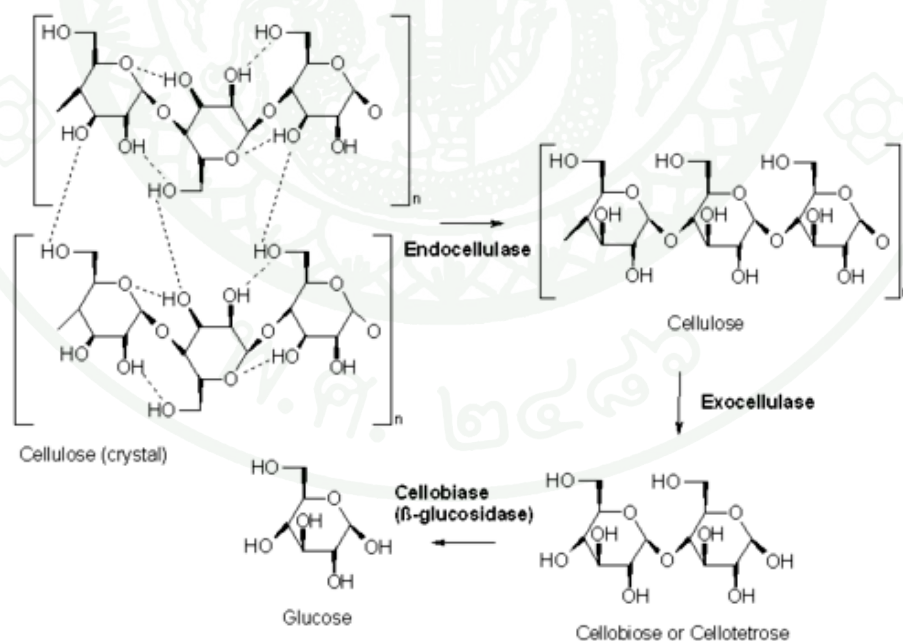
เป็นการทำลายพันธะของไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน เช่นเดียวกับการไฮโดรไลซิสด้วยกรด โดยสารละลายที่นิยมใช้ คือ เอทิลีน ไดอะมิน แอมโมเนีย และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เป็นต้น การใช้สารละลายด่างในการย่อยสลายนั้น เป็นการทำให้สายโพลีแซคาไรด์สั้นลง โดยปฏิกิริยานี้เกิดได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 160-180 องศาเซลเซียส และต้องใช้ออกซิเจนเข้าร่วมในการทำปฏิกิริยาด้วย

## 3. การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

ปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบเฉพาะเจาะจงระหว่างเซลลูเลส (cellulase) และเฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) กับสารประกอบของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ตามลำดับ ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวิซ์ ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่รุนแรงโดยเซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส ส่วนใหญ่จะได้อาหารและแบคทีเรีย

การไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส เป็นการลดจำนวนกลูโคสที่เรียงต่อกันในสายโมเลกุลให้สั้นลง เมื่อการย่อยสมบูรณ์จะมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเพียงอย่างเดียว คือ กลูโคส โดยเป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ (ภาพที่ 16) ดังนี้

- เอกโซกลูโคเนส (exoglucanase หรือ cellobiohydrolase หรือ 1,4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase ; EC.3.2.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยการตัดพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกจากปลายด้าน nonreducing ได้เป็นเซลโลบิโอส และกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย
- เอนโดกลูโคเนส (endoglucanase หรือ 1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase; EC.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยการตัดพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่มได้เซลโลบิโอส และกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย
- เบต้ากลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase หรือ  $\beta$ -D-glucoside-4-glucohydrolase หรือ cellobiase; EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลบิโอส และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย



ภาพที่ 16 การไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส

ที่มา: Absoluteastronomy (2009)

การไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรท (substrate) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสายหลักของไซแลน เพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลส นั้น จะเป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ (ดังภาพที่ 17)

- เอนโดไซแลนเนส (endoxylanase หรือ 1,4- $\beta$ -D-xylan-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะทำการย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4-ไซโลซิดิแบบสุม ผลผลิตสุดท้ายที่ได้เป็นไซโลส และโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ

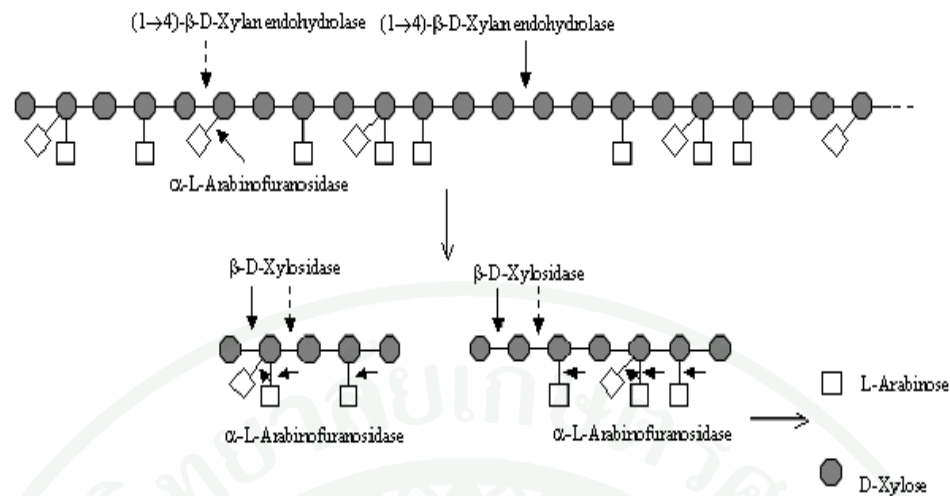
- เบต้าไซโลซิเดส ( $\beta$ -xylosidase หรือ 1,4- $\beta$ -D-xylan-xylohydrolase; EC 3.2.1.37) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4-บีตา-ไซโลไพราโนไซด์ที่ละ 1 หน่วย จากปลายสายด้านนอนรีดิวิซ (non-reducing end) ผลผลิตสุดท้ายที่ได้เป็นไซโลส

เนื่องจากโครงสร้างของไซแลนประกอบด้วยมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นมาเชื่อมต่อดังนั้นในการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น

- เอนไซม์แอลฟา-แอล-อะราบินอซิเดส ( $\alpha$ -L-arabinosidase; EC 3.2.1.55) จะย่อยสลายหมู่นอนรีดิวิซ-แอลฟา-แอล-อะราบินอพิราโนส ของ แอลฟา-แอล-อะราบินอพิราโนไซด์ อะราบินแนน และอะราบินกาแลคแตน ได้น้ำตาลที่เป็นพันธะกิ่งเป็นผลผลิตสุดท้าย

- เอนไซม์แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนซิเดส ( $\alpha$ -D-glucuronosidase; EC 3.2.1.1) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิก แอซิก

- เอนไซม์อะเซทิล (ไซแลน) เอสเทอเรส (acetyl (xylan) esterase); EC 3.1.1.6) จะย่อยสลายพันธะ-1,2 และเบต้า-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะเซทิลกับสายหลัก ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรดอะซิดิก



ภาพที่ 17 การไฮโดรไลซิสไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน

ที่มา: Australian Barley Technical Symposium (2001)

โดยเมื่อเปรียบเทียบข้อดี และข้อเสียของการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์กับด้วยสารเคมีจะแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อดีและข้อเสียในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เปรียบเทียบกับการไฮโดรไลซิสด้วยสารเคมี

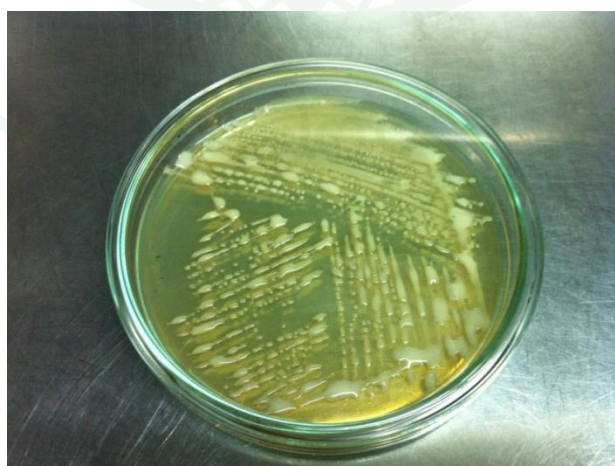
ข้อดี	ข้อเสีย
ก. สภาพที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและค่าพีเอชไม่รุนแรง	ก. วัตถุดิบต้องได้รับการปรับสภาพก่อน
ข. ปฏิกริยามีความจำเพาะเจาะจง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง	ข. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ สามารถเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ (product inhibition)
ค. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น	ค. สูญเสียเอนไซม์ไป เนื่องจากถูกดูดซับ (adsorbed) บนวัสดุที่ไม่ย่อย
ง. สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยได้	ง. เสี่ยงต่อการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์
จ. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน	จ. ถ้าระบบมีสารที่เป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยา เช่น เฮมิเซลลูโลส หรือลิกนิน อัตราปฏิกิริยาจะช้าลง

## การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

### 1. ลักษณะของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.6-0.9 x 2.4-4.7 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ (oval) ไม่มีเอกซสปอร์เรียม (exosporium) ไม่มีรยางค์ (appendage) ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม (circular) ขอบไม่เรียบ (irregular) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร สีของโคโลนีเป็นสีครีมผิวเป็นมันและโปร่งแสง เจริญได้ดีในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ด้วย ความสัมพันธ์กับออกซิเจนเป็นแบบ obligate anaerobe ไม่สร้างเอนไซม์อะเลส ผลผลิตจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตจะได้กรดอะซิติก กรดบิวทาลิก บิวทานอล และอะซิโตน สามารถตรึงไนโตรเจนได้บ้าง

แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* เจริญได้ 20-47 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบได้ในดิน สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ โดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* ที่มีความสามารถในการสร้างสปอร์ชนิดเอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียสามารถทนทานอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น การขาดสารอาหาร เป็นต้น สปอร์มีความทนทานต่อความร้อน ความแห้ง และสารเคมีได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell) เมื่อแบคทีเรียสร้างสปอร์ เมแทบอลิซึมของแบคทีเรียจะหยุดชะงัก จนกระทั่งสภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงงอกใหม่เป็นเซลล์ปกติ

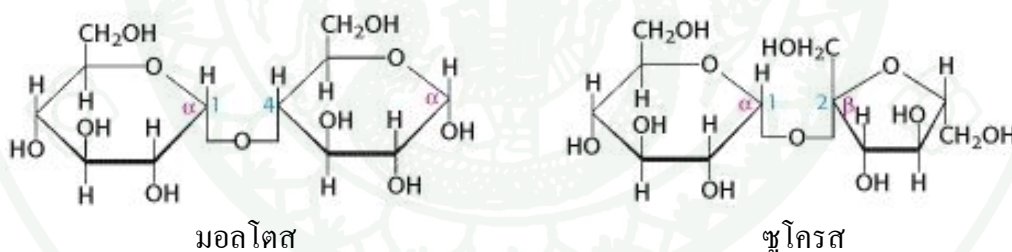


ภาพที่ 18 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

## น้ำตาลรีดิวซ์

น้ำตาลรีดิวซ์ คือ น้ำตาลที่มีหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนที่ตำแหน่งแอนเอเมอร์ที่ถูกออกซิไดซ์ได้ โดยโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์มี 2 แบบ คือ น้ำตาลที่ประกอบด้วยหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde) หรือที่เรียกว่า แอลโดส (aldose) และน้ำตาลที่ประกอบด้วยหมู่คีโตน (ketone) ที่เรียกว่า คีโตส (ketose) โดยมีทั้งแบบที่เป็นสายยาว และ โครงสร้างแบบวง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างรูปสายยาว และรูปวงแหวนอยู่ตลอดเวลา โดยเมื่อถูกออกซิไดซ์จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรด เช่น ออกซิไดซ์กลูโคสจะได้กรดแอลโดนิคมีชื่อว่า กรดกลูโคนิก ดังนั้นน้ำตาลที่คาร์บอนแอนเอเมอร์ไม่ได้อยู่ในรูปไกลโคไซด์ จึงเรียกว่า น้ำตาลรีดิวซ์

การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หาได้โดยอาศัยคุณสมบัติของมันที่สามารถรีดิวซ์โลหะไอออน เช่น  $\text{Cu}^{2+}$  หรือ  $\text{Ag}^+$  ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ ตัวอย่างของน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น เซลโลบิโอส กลูโคส อะราบิโนส มอลโตส และแลคโตส ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถถูกออกซิไดซ์ได้เนื่องจาก อะโนเมอร์คาร์บอนที่ถูกจับยึดไว้โดยพันธะไกลโคซิดิก เช่น น้ำตาลซูโครส จัดว่าเป็น non reducing sugars ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลมอลโตส และซูโครส

ที่มา: Freeman (2002)

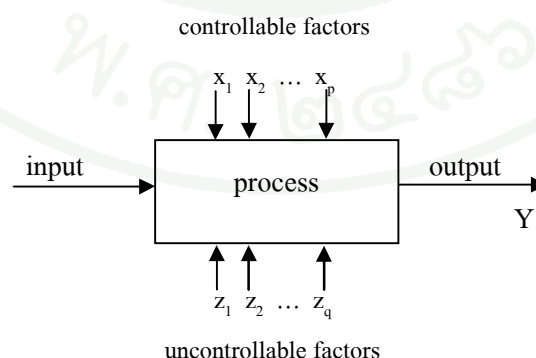
คุณสมบัติในการรีดิวซ์โลหะไอออนนั้น นอกจากจะใช้เพื่อตรวจสอบปริมาณแล้วยังสามารถใช้ในการบอกตำแหน่ง ทิศทางของหน่วยย่อยในคาร์โบไฮเดรตที่เป็นโพลิเมอร์ได้ในพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นสายตรง (linear chain) ในหนึ่งโมเลกุลจะมีปลาย reducing end 1 หน่วย (เป็นโมโนแซ็กคาไรด์ที่มีอะโนเมอร์คาร์บอนที่อิสระ) และปลายที่เป็น non reducing end 1 หน่วย

ส่วนโพลีแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างเป็นกิ่งก้าน (branched) ในหนึ่งโมเลกุลจะมีปลายที่เป็น non reducing end มากมายตามจำนวนกิ่งก้านที่มี แต่จะมีปลาย reducing end เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น

### การออกแบบการทดลอง

การออกแบบการทดลอง (design and analysis of experiment: DOE) เป็นเทคนิคทางสถิติขั้นสูงที่ใช้ในการปรับค่าสถานะของกระบวนการให้เป็นไปตามสภาพที่เราต้องการ ซึ่งข้อแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดระหว่างวิธีการ โดยทั่วไปกับเทคนิคของการออกแบบการทดลอง คือ วิธีการโดยทั่วไปมักเป็นการทดลองแบบลองผิดลองถูก หรือใช้การทดลองปรับตั้งค่ากระบวนการทีละค่า (one-factor-at-a-time) เพื่อที่จะหาจุดที่ดีที่สุดของกระบวนการซึ่งลักษณะนี้เรียกว่าการทดลองแบบปรับตั้งค่ากระบวนการทีละค่านั่นเอง โดยทั่วไปแล้วการออกแบบการทดลองแบบปรับตั้งค่ากระบวนการทีละค่า จะให้ผลตอบแทนเข้าสู่จุดมุ่งหมายที่เราต้องการได้ช้ามาก และสิ้นเปลืองทรัพยากรในการวิเคราะห์รวมถึงต้องเก็บข้อมูลมากและยังไม่เหมาะสมอย่างยิ่งกับกระบวนการที่มีผลของความสัมพัทธ์ร่วม (interaction effect) ระหว่างตัวแปรของกระบวนการด้วยตัวเอง ตามปกติแล้วการทดลองถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำงานของกระบวนการและระบบซึ่งทั้งกระบวนการและระบบสามารถที่จะแทนด้วยแบบจำลอง

การออกแบบการทดลอง หมายถึง การทดสอบเพียงครั้งเดียว หรือต่อเนื่อง โดยทำการเปลี่ยนแปลงค่าตัวแปรนำเข้า (inputs variables) ในระบบหรือกระบวนการที่สนใจศึกษาเพื่อสามารถสังเกตและทราบถึงสาเหตุหรือปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผลลัพธ์ที่ได้ (output) จากกระบวนการหรือระบบนั้น แสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 แบบจำลองทั่วไปของกระบวนการหรือระบบ

ที่มา: ปารเมศ (2545)

ปัจจัยในกระบวนการผลิตสามารถแบ่งปัจจัยออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. ปัจจัยที่ควบคุมได้ (controllable factors) หมายถึง ปัจจัยที่สามารถกำหนดค่าของปัจจัยนั้นได้ในกระบวนการ ซึ่งเป็นผลดีต่อการทดลอง เพราะโดยส่วนใหญ่ผู้ทำการทดลองต้องการกำหนดค่าต่างๆ ที่คิดว่ามีผลต่อค่าตอบสนองที่สนใจ

2. ปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ (uncontrollable factors) หมายถึง ปัจจัยที่ไม่สามารถกำหนดค่าของปัจจัยนั้นได้ในกระบวนการ อันเนื่องมาจากเทคโนโลยีไม่ทันสมัย ต้นทุนในการควบคุมสูงมาก มีความรู้ไม่เพียงพอ ฯลฯ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการอย่างมาก ผู้ทำการทดลองควรพยายามจัดปัจจัยลักษณะนี้เพื่อให้เปลี่ยนเป็นปัจจัยที่ควบคุมได้ จึงเป็นประโยชน์ต่อการทดลอง

ดังนั้น ในการออกแบบการทดลองจึงมีวัตถุประสงค์ดังนี้

- ระบุตัวแปรปัจจัยที่ควบคุมได้ (X) ที่มีผลต่อผลลัพธ์หรือค่าตอบสนอง (Y) มากที่สุด
- กำหนดค่า X ที่มีผลต่อ Y ที่ทำให้ได้ค่า Y ตามต้องการ
- กำหนดค่า X ที่มีผลต่อ Y ที่ทำให้ได้ค่า Y มีความแปรปรวนน้อยที่สุด
- กำหนดค่า X ที่มีผลต่อ Y ที่ทำให้ผลของตัวแปรปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ คือ  $z_1, z_2, \dots, z_q$  มีค่าน้อยที่สุด

ประโยชน์ของการออกแบบการทดลองในการพัฒนากระบวนการผลิตนั้น สามารถช่วยเพิ่มผลผลิต (yield) และลดต้นทุน ลดความแปรปรวนทำให้ผลลัพธ์ที่ได้ตามค่าที่ต้องการลดเวลาในการพัฒนากระบวนการผลิต และเพิ่มคุณภาพผลิตภัณฑ์ ส่วนประโยชน์ของการออกแบบการทดลองในการออกแบบเชิงวิศวกรรมนั้น ช่วยในการวิเคราะห์เลือกรูปแบบของผลิตภัณฑ์ เลือกวัตถุดิบที่เหมาะสม เลือกพารามิเตอร์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ทำงานได้ดีที่สุด และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ

### วัตถุประสงค์ของการออกแบบการทดลอง

1. เพื่อยืนยันข้อเท็จจริง (confirmation) คือการพิสูจน์ถึงข้อเท็จจริงหรือความเชื่อจากประสบการณ์หรือทฤษฎีบางอย่างที่อธิบายเกี่ยวกับกระบวนการผลิต
2. เพื่อค้นหาข้อเท็จจริง (exploration) คือการศึกษาถึงอิทธิพลของเงื่อนไขใหม่ที่มีผลต่อกระบวนการ

### หลักการพื้นฐานสำหรับการออกแบบการทดลอง (principle of experiments)

แผนการทดลองที่เมื่อนำไปใช้ทดลองแล้วจะทำให้ได้ข้อมูลที่มีคุณภาพ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ให้ได้ผลสรุปที่ถูกต้อง จำเป็นต้องมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน ดังนี้

1. การทดลองซ้ำ (replication) เพื่อให้สามารถประมาณค่าความคลาดเคลื่อนของการทดลองได้
2. การสุ่ม (randomization) เป็นพื้นฐานหลักสำหรับการใช้วิธีการเชิงสถิติในการออกแบบการทดลอง เพื่อขจัดปัญหาเกี่ยวกับผลของปัจจัยภายนอกที่อาจปรากฏในการทดลอง
3. การควบคุมความคลาดเคลื่อน (error control) เพื่อให้มีความคลาดเคลื่อนของการทดลองต่ำ ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจสอบพบความแตกต่างของปัจจัยได้อย่างแท้จริง

ข้อดีของการออกแบบการทดลองคือ ให้ผลของความแม่นยำและความถูกต้องในการวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างสูง โดยสามารถระบุออกมาเป็นค่าตัวเลขทางสถิติที่แสดงถึงค่าระดับความสำคัญของตัวแปรที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการ นอกจากนี้ยังมีความรวดเร็วในการดำเนินการตรวจสอบสาเหตุของปัญหา

### การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken

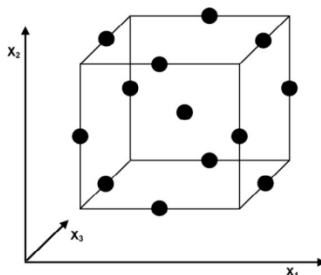
การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken เป็นวิธีที่ใช้ในการออกแบบการทดลองที่มีประสิทธิภาพ และนิยมใช้มากสำหรับกรณีการศึกษาปัจจัยการทดลองที่ประกอบไปด้วยระดับการ

ทดลอง 3 ระดับ (3-level design) โดยเฉพาะกรณีที่ต้องการสร้างสมการตัวแบบ โดยที่ปัจจัยแต่ละปัจจัยต้องเป็นปัจจัยเชิงปริมาณ (quantitative factor) เช่น เวลา อุณหภูมิ ความดัน ความเข้มข้น เป็นต้น โดยลักษณะของการออกแบบตามวิธี Box-Behnken จะใช้หลักการของ  $2^2$  การทดลอง แฟกทอเรียลเต็มรูปแบบวนวกกับจุดกึ่งกลาง (central point) รวมเข้าไป ในการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken นั้น ได้มีตารางสำหรับแผนการทดลองเพื่อใช้กับปัจจัยสูงสุดไม่เกิน 16 ปัจจัย (ไม่รวมกรณี  $k=8$ ) ดังตัวอย่างแผนการทดลองโดยวิธี Box-Behnken กรณีการศึกษา 3 ปัจจัยดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การออกแบบ Box-Behnken สำหรับ  $k=3$

Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

ที่มา : ประไพศรี และ พงศ์ชนัน (2551)



ภาพที่ 21 การออกแบบ Box-Behnken สำหรับ 3 ตัวแปร

ที่มา: Ferreira *et al.* (2007)

จากภาพที่ 21 แผนภาพการทดลอง Box-Behnken ไม่ได้พิจารณาจุดมุม (corner points) ซึ่งอาจจะต้องนำมาพิจารณาในบางกรณี อย่างไรก็ตามผู้ทำการทดลองบางส่วนอาจมองว่าการที่แผนการทดลองนี้ไม่ได้พิจารณาจุดมุมเป็นข้อที่น่าสนใจ แต่บางกลุ่มอาจมองว่าเป็นข้อด้อย

การออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken สามารถทำให้ศึกษาผลกระทบเชิงเส้น (linear effects) ผลกระทบในเชิงเส้นกำลังสอง (quadratic effects) และอันตรกิริยาหรือผลกระทบร่วม 2 ปัจจัย (2-factor inter-actions) แต่มีข้อเสีย คือ จำนวนครั้งที่ทดลอง (number of runs) มีค่ามาก และไม่สามารถที่จะลดได้ ไม่ว่าผู้ศึกษาจะสนใจผลกระทบที่เกินกว่าผลกระทบเชิงเส้นหรือไม่ (Box-Behnken Design สามารถประมวลผลกระทบในรูปโพลีโนเมียลกำลังสอง และผลกระทบร่วมสองปัจจัยได้เสมอ) นอกจากนี้แผนการทดลองนี้จะมีประสิทธิภาพด้อยกว่าการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เมื่อจำนวนปัจจัยมีจำนวนมากกว่า 4 ปัจจัยขึ้นไป

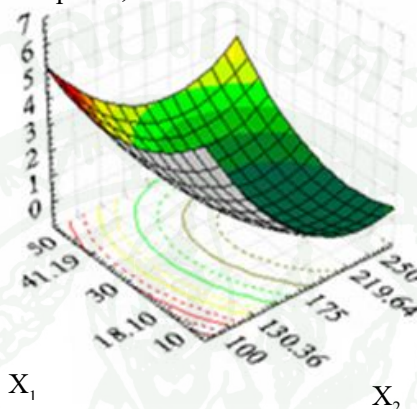
นอกจากนี้การออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken จะอาศัยวิธีการวิเคราะห์ตัวแปรผิวสะท้อนในการสร้างแบบจำลอง และการวิเคราะห์ปัญหาที่ผลตอบสนองเป็นฟังก์ชันของหลายปัจจัย โดยมีเป้าหมายเพื่อหาระดับของปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้ผลตอบสนองมีค่าเหมาะสมที่สุด เช่น ผลตอบสนอง  $Y$  เป็นฟังก์ชันของปัจจัย  $X_1$  และ  $X_2$  ดังนั้นจะสามารถเขียนในรูปสมการได้ดังนี้

$$Y = f(X_1, X_2) + \varepsilon \quad (1)$$

เมื่อ  $\varepsilon$  คือ สิ่งรบกวน (noise หรือ error) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ มีผลกระทบต่อผลตอบสนอง  $Y$   
 $E(Y) = f(X_1, X_2)$  คือ ค่าคาดหวังของ  $Y$  (expected response)

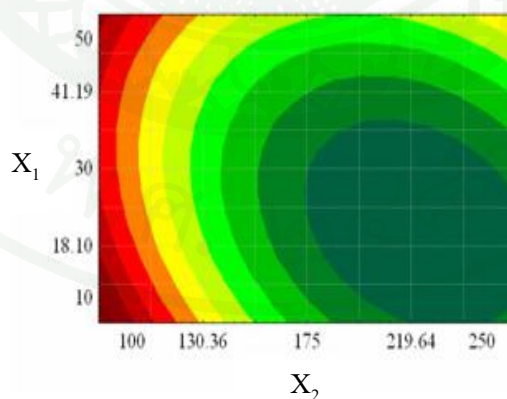
ดังนั้นพื้นผิวตอบสนอง (response surface) สำหรับระบบที่มีจำนวน 2 ปัจจัยสามารถแทนด้วยค่า  $Y = f(X_1, X_2)$  และพื้นผิวตอบสนองสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 22 ส่วนกราฟคอนทัวร์ (contour) แสดงดังภาพที่ 23 โดยมีเส้นระดับที่มีค่าของผลการตอบสนองที่จะถูกพล็อตลงในระนาบ  $X_1$  กับ  $X_2$  โดยแต่ละเส้นระดับจะสอดคล้องกับความสูงของพื้นผิวตอบสนอง

Y (expected response)



ภาพที่ 22 พื้นผิวตอบสนอง

ที่มา: ประไพศรี และ พงศ์ชนัน (2551)



ภาพที่ 23 กราฟคอนทัวร์

ที่มา: ประไพศรี และ พงศ์ชนัน (2551)

ในปัญหาเกี่ยวข้องกับพื้นผิวตอบสนอง มักจะไม่ทราบรูปแบบของความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองกับปัจจัยต่างๆ ดังนั้นขั้นตอนแรกในการหาพื้นผิวตอบสนอง คือ การประมาณความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนอง และปัจจัยต่างๆ โดยทั่วไปจะใช้รูปแบบของสมการลำดับที่ 1 (first order model) ในการประมาณความสัมพันธ์โดยมีรูปแบบคือ

$$Y = \beta + \sum \beta X_i + \varepsilon \quad (2)$$

แต่ในกรณีที่พื้นผิวมีความโค้ง (curvature) จะทำการประมาณโดยใช้รูปแบบของสมการลำดับที่ 2 โดยมีรูปแบบคือ

$$Y = \beta + \sum \beta X_i + \sum \beta X_i^2 + \sum \sum \beta X_i X_j + \varepsilon \quad (3)$$

วิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง เป็นวิธีการที่เป็นลำดับขั้นตอน (sequential procedure) กล่าวคือ จากสถานะการทำงานในปัจจุบันซึ่งเป็นจุดที่อยู่ไกลจากจุดที่เหมาะสมที่สุดในพื้นที่ผิวตอบสนอง ดังนั้นเพื่อความรวดเร็วในการเคลื่อนที่เพื่อเข้าไปยังบริเวณที่เหมาะสมที่สุดของพื้นผิวตอบสนองจะสามารถใช้รูปแบบของสมการลำดับที่ 1 ในการประมาณได้ ซึ่งเป้าหมายต่อไปก็คือการเข้าไปใกล้บริเวณที่เหมาะสมที่สุดแล้วสามารถใช้รูปแบบของสมการที่มีลำดับที่สูงกว่า (higher order) เข้ามาช่วยในการประมาณ และพบว่าส่วนใหญ่นิยมใช้รูปแบบของสมการลำดับที่ 2 (second order model) เนื่องจากมีความยุ่งยากไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบอื่นๆ ดังนั้นจะใช้รูปแบบของสมการลำดับที่ 2 ในการประมาณและการวิเคราะห์เพื่อหาจุดที่เหมาะสมที่สุด

### การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA)

เป็นวิธีการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง ตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งจะเป็นการวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม (between group variance) และความแปรปรวนภายในกลุ่ม (within group variance) ความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม เป็นค่าที่เกิดจากความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มต่างๆ ถ้าค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มแตกต่างกันมาก ค่าความแปรปรวนระหว่างกลุ่มก็จะมากตามไปด้วย สำหรับความแปรปรวนภายในกลุ่มเป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่า คะแนนแต่ละตัวที่รวบรวมมานั้นภายในแต่ละกลุ่มมีการกระจายมากหรือน้อย ค่าที่คำนวณได้เรียกว่าความคลาดเคลื่อน

### แบบจำลองการถดถอย (regressive model)

แบบจำลองการถดถอย เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้สำหรับการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย เพื่อนำไปสร้างสมการทำนายค่าของผลตอบ ซึ่งจะทำให้สามารถหาผลตอบที่จุดใดๆ ในแต่ละช่วงของปัจจัยได้ โดยวิธีการที่ใช้ในการประมาณค่าตัวแปรต่างๆ ในแบบจำลองนี้ส่วนใหญ่คือ วิธีกำลังสองน้อยสุด (least square method) ซึ่งเป็นการประมาณค่าตัวแปรที่ไม่ทราบค่า ( $\beta$ ) เพื่อให้ผลรวมของกำลังสองของความผิดพลาด ( $\epsilon^2$ ) มีค่าน้อยที่สุด ซึ่งบางครั้งเราเรียก  $\beta$  เหล่านี้ว่า ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย โดยมีขั้นตอนในการประมาณค่าดังนี้

- 1) สร้างผลรวมของกำลังสองของค่าความผิดพลาด โดยการพีดผลตอบ
- 2) ประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยในเทอมต่างๆ ที่ทำให้ผลรวมของกำลังสองของค่าความผิดพลาดมีค่าน้อยที่สุด
- 3) นำค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่ได้ไปเขียนสมการทำนายค่าของผลตอบ

### กระบวนการหมัก

การหมัก (fermentation) เป็นกระบวนการแปรสภาพทางชีวเคมี อันเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน น้ำส้มสายชู เอทานอล และก๊าซชีวภาพ (ก๊าซมีเทน) ล้วนแต่อาศัยการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบการหมักในสภาพอาหารเหลวเป็นสำคัญ

กระบวนการหมักโดยทั่วไปจะมีด้วยกัน 3 แบบ ซึ่งแบ่งตามลักษณะปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือของเหลวที่เติม คือ การหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation; SSF) การหมักในสภาพกึ่งเหลว (semi-solid fermentation) และการหมักในสภาพอาหารเหลว (submerged fermentation; SmF)

การหมักโดยใช้อาหารแห้งหรือการหมักแบบแห้ง เป็นกระบวนการหมักบนวัสดุที่เป็นของแข็ง ซึ่งไม่มีน้ำอิสระที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะฉะนั้นน้ำที่อยู่ในกระบวนการหมักนี้จึงอยู่ในสภาพของความชื้นที่อยู่ในวัสดุหมัก การหมักแบบแห้งนี้ไม่รวมกระบวนการหมักใน

ของเหลวที่มีของแข็งที่ไม่ละลายน้ำปนอยู่ หรือการหมักของแข็งในอาหารเหลว การหมักแบบแห้งนี้ วัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ ได้แก่ เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และถั่วเหลือง หรือวัตถุประสงค์พวกกลีโคโนเซลลูโลส เช่น ไม้ ฟางข้าว ชางข้าวฟ่างหวาน วัตถุประสงค์จำพวกนี้ส่วนใหญ่โมเลกุลจะใหญ่จึงไม่ละลายน้ำ หรือละลายน้ำได้น้อย และมีปริมาณมาก หาง่าย ราคาถูก และมีสารอาหารในปริมาณมาก แต่ก็มีข้อจำกัดคือ เกิดปัญหาการสะสมความร้อนหากใช้ในอุตสาหกรรม การหมักขนาดใหญ่ การติดตามผลและการควบคุมระหว่างกระบวนการหมักทำได้ยาก เช่น พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณความชื้น ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำหนักเซลล์ และปริมาณผลิตภัณฑ์นั้น และข้อมูลในการปรับปรุงกระบวนการหมักบนอาหารแข็งมีค่อนข้างน้อย

การหมักในสภาพกึ่งเหลว (semi-solid fermentation) เป็นการหมักที่มีอาหารหมักเป็นของเหลวแต่มีของแข็งแขวนลอยอยู่บางส่วน เช่น การหมักเนย โยเกิร์ต ไส้กรอก แหนม เป็นต้น

การหมักโดยใช้อาหารเหลว เป็นกระบวนการหมักที่วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมักละลายอยู่ในอาหารเหลว ดังนั้นส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นของเหลวที่มีสารอาหารต่างๆ และวัตถุประสงค์ (ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน) ละลายอยู่ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และทำการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการต่อไป โดยสารอาหารเป็นได้ทั้ง synthetic medium ที่ทราบองค์ประกอบของสารอาหารแน่นอนแต่ค่อนข้างมีราคาสูง จึงนิยมใช้ complex medium แทน โดยอาหารชนิดนี้ เป็นอาหารที่ไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่ชัด แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารประเภทนี้ ได้แก่ กากน้ำตาล แป้ง เซลลูโลส ธัญพืชและแลคโตส เป็นต้น สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ ได้แก่ กากถั่วเหลือง เจลาติน เคซีน เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นวัสดุเหลือใช้ หรือ by product จากโรงงานอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ เช่น น้ำตาล แป้ง เป็นต้น

การที่กระบวนการหมักในอาหารเหลวนิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมเนื่องจากใช้เวลาและเนื้อที่ในการผลิตน้อยทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็ว สามารถควบคุมและติดตามปัจจัยในกระบวนการหมัก เช่น พีเอช อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำหนักเซลล์ และปริมาณผลิตภัณฑ์ได้ง่าย

### กระบวนการหมักเอทานอล

เอทานอล (ethanol) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) สูตรโครงสร้างเป็น  $C_2H_5OH$  น้ำหนักโมเลกุล 46.07 มีจุดเดือด 78.5 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง -115

องศาเซลเซียส ที่ 760 มิลลิเมตรปรอท มีความหนาแน่น 0.7851 ที่ 20 องศาเซลเซียส ลักษณะทั่วไป เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย ติดไฟง่าย สามารถละลายน้ำและสารอินทรีย์อื่นๆ ได้ มีกลิ่นเฉพาะตัวของเอทานอล ประโยชน์ของเอทานอลนั้นใช้เป็นสารเคมีที่เกี่ยวข้องในชีวิตประจำวัน เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงให้พลังงานและความร้อน ในทางอุตสาหกรรมใช้เป็นตัวทำละลาย ในทางการแพทย์ใช้เป็นตัวทำละลายยาและเป็นสารเสริมช่วยออกฤทธิ์ในยา ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อเพื่อทำความสะอาด ในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อผลิตสารบางชนิด เช่น น้ำหอม สบู่ นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบในเครื่องดื่ม เช่น สุรา เบียร์ และไวน์ เป็นต้น

โดยทั่วไปเอทานอลจะทำมาจากวัตถุดิบจำพวกน้ำตาลและแป้งมันสำปะหลัง แต่ว่าต้นทุนวัตถุดิบยังอยู่ในเกณฑ์สูงและวัตถุดิบข้างต้นยังสามารถผลิตสินค้าชนิดอื่น เช่น เป็นอาหารซึ่งถือว่ามีความสำคัญมากกว่า ปัจจุบันมีผู้สนใจที่จะศึกษาการผลิตเอทานอลจากชีวมวล โดยชีวมวลหมายถึง สิ่งที่ได้จากสิ่งมีชีวิต หรือองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตหรืออินทรีย์สารต่างๆ เช่น ไม้ยืนต้น พืชที่มีส่วนประกอบเป็นแป้ง น้ำตาล เซลลูโลส วัชพืช และน้ำของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร หลักเกณฑ์ในการเลือกวัตถุดิบที่นำมาผลิตเอทานอล คือ วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนเข้าสู่โรงงานได้ตลอดทั้งปี หาได้ง่าย ราคาถูก สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบและต่อหน่วยพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทดังนี้

1. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย และกากน้ำตาล ซึ่งจะนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลได้โดยตรง
2. วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง และมันเทศ เป็นต้น
3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย ผักตบชวา รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

ในกระบวนการหมักเอทานอลนั้น จุลินทรีย์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอล ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ยีสต์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้สูง และสามารถทนสภาพแวดล้อมที่มีเอทานอลได้ดี

### 1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

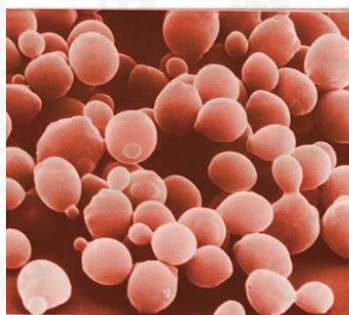
กระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยยีสต์นั้นในระดับอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิตแตกต่างกันไป รวมถึงยีสต์ที่ได้รับความสนใจและถูกเลือกใช้ในการหมัก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvaum* และ *Kluyveromyces species* (Roehr, 2001) สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Zymomonas mobilis* (สาวิตรี, 2540) ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดก็ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้สำหรับ *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae* ต่างมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพื้นฐานของการจัดการ กรณีเลือกใช้ *Z. mobilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูง แต่มีชีวมวลต่ำ ฉะนั้นจำเป็นต้องมีความระมัดระวังในเรื่องของการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงแง่เศรษฐศาสตร์ โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจึงให้ความสนใจ *S. cerevisiae* มากกว่า (Qureshi and Manderson, 1995) อีกทั้ง *Z. mobilis* มีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์ (สาวิตรี, 2540) การผลิตเอทานอลในระดับโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจุลินทรีย์ที่เลือกมาใช้ต้องมีลักษณะเหมาะสมกับกระบวนการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตและการออกแบบลักษณะของกระบวนการการผลิตนั้นก็ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ถูกเลือกมาใช้ในกระบวนการหมักด้วยเช่นกัน (Roehr, 2001) ตามทัศนคติของนักวิจัย จุลินทรีย์ที่ดีและมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลควรมีลักษณะดังนี้

1. ให้ผลผลิตสูง
2. ทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
3. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)
4. มีความคงตัวภายใต้สภาวะต่างๆ ของการหมัก
5. ทนต่อพีเอชต่ำ (acid tolerance)

6. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
7. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
8. เพิ่มจำนวน (propagation) ได้ง่าย
9. ให้ความร้อนในระหว่างการหมักต่ำ
10. มีความทนทานต่อสารพิษต่างๆ

## 2. ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม หรือรี ดังภาพที่ 24 ซึ่งเป็นลักษณะของยีสต์ *S. cerevisiae* สารอาหารที่ยีสต์ใช้ได้ดี ได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะกลูโคสและฟรักโทส *S. cerevisiae* มีอุณหภูมิของที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ในช่วงค่าพีเอชกว้าง โดยค่าพีเอชต่ำสุดที่เจริญได้ คือ 1.5 ส่วนค่าพีเอชสูงสุด คือ 8.0-8.5 สำหรับค่าพีเอชที่เหมาะสม คือ 4.0-4.5 แต่จะเจริญไม่ดีในสภาพที่เป็นด่าง

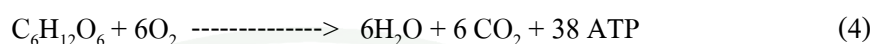


ภาพที่ 24 ลักษณะของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา: Fiddler (2006)

### 3. การหมักเอทานอลโดยยีสต์

ในสถานะที่มีออกาศยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสในการหายใจ (respiration) เพื่อการเจริญ และเพิ่มจำนวนเซลล์ ตามสมการที่ 4



ส่วนการผลิตเอทานอลนั้น เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ยีสต์ โดยจะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลในสถานะที่ไร้อากาศ ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) และปลดปล่อยเอทานอลออกมาภายนอกเซลล์ ตามทฤษฎีกลูโคสจะเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 51.1 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่เหลือ 48.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตามสมการที่ 5



แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลเพียง 95 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ที่จะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ได้นอกจากนั้นยีสต์จะใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญเติบโตของตัวเอง และเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ ได้แก่ อะซีตัลดีไฮด์ กรดอะซีติก กลีเซอริน กรดแลคติก กรดซัคซินิก น้ำ ฟิวเฟอรอล เป็นต้นจำนวนเล็กน้อย โดยการหมักแอลกอฮอล์นั้น สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

- 1) การหมักแบบกะ (batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการเติมวัตถุดิบ สารอาหาร และต้นเชื้อ ลงไปถึงหมักเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก
- 2) การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบ และสารอาหารลงไปถึงหมักมากกว่า 1 ครั้ง ขึ้นไป เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบ และสารอาหารได้ในปริมาณสูงขึ้น
- 3) การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบ และสารอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลาเช่นกัน ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดในระยะเวลาเท่ากัน เมื่อเทียบกับการหมักทั้งสองชนิดที่กล่าวมา

## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัชร และ สุภัตรา (2546) เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระหว่างชานอ้อยและผักตบชวา โดยย่อยวัสดุหมักด้วยกรดซัลฟิวริก 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองแล้วเก็บส่วนสารละลายไว้ จากนั้นนำส่วนที่เป็นของแข็งไปย่อยอีกทีด้วยกรดซัลฟิวริก 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่กรองได้ในครั้งรวมกับสารละลายส่วนที่ 2 และปรับปริมาตรให้ได้ 150 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 4-4.5 จากนั้นนำไปหมักกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากการทดลองพบว่า เอทานอลที่ได้สูงสุดจากการหมักผักตบชวาเท่ากับ 2.71 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการหมัก 3 วัน หลังจากวันที่ 2 ของการหมัก ความเข้มข้นของเอทานอลลดลงเนื่องจากเอทานอลที่ผลิตได้จะกลับมายับยั้งการเจริญของยีสต์ ดังนั้นเมื่อเอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นสูง อัตราการเจริญของยีสต์จะลดลง ทั้งนี้เพราะว่าเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์ โดยมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและเฮกโซไคเนส มีผลต่อเมมเบรนและเซลล์ยีสต์ด้วย เมื่อเปรียบเทียบเอทานอลที่ได้จากการหมักชานอ้อยได้ 5.67 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการหมัก 4 วัน โดยชานอ้อยจะให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าผักตบชวา

ประเวทย์ และคณะ (2551) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากตบชวา โดยปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์โดยใช้ความร้อนจากการอบด้วยไอน้ำอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที ปรับพีเอช 5.5 เติมเอนไซม์เพคตินเนส อะไมโลกลูโคซิเดส แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และไซแลนเนส แล้ววัดปริมาณกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เท่ากับ 5.81 และ 8.52 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับ 0.387 และ 0.568 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นนำไปหมักเอทานอลแบบกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (SSF) จากผักตบชวาโดยยีสต์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5048 กับ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอัตราส่วน 1:1 ให้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.19 กรัมต่อกรัม หรือ 2.81 กรัมต่อลิตร

รัชพล พะวงศรีรัตน์ (2554) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับทางเคมีที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ 1) แช่น้ำเปล่า 2) แช่สารละลายกรด 3) แช่สารละลายด่าง โดยพบว่า การปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ร่วมกับหมอนึ่งความดันไอน้ำความดันสูงจะได้ไฮโดรไลสที่มีโครงสร้างและองค์ประกอบสั้น โยสูงที่สุด โดยมีเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน คิดเป็น 23.16 47.38 และ 3.71 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณน้ำตาลและ

สารประกอบอนุพันธ์ที่เป็นพิษจากกระบวนการปรับสภาพ เช่น เพอร์ฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซิลเมทิลเพอร์ฟูรอลมีปริมาณน้อยมาก

Abraham *et al.* (1996) ศึกษาปัจจัยในการผลิตแอลกอฮอล์จากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเปอร์อะซิติก (peracetic acid) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากรา 4 สายพันธุ์ ได้แก่รา *Myrothecium verrucaria*, *Coprinus comatus*, *Pleurotus florida* และ *Cellomonas* sp. กับการย่อยด้วยกรด จากนั้นหมักกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ พบว่าผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพแล้วย่อยด้วยเอนไซม์จากรา *M. verrucaria* สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์ได้สูงสุดเท่ากับ 0.43 กรัมต่อกรัมผักตบชวา และเมื่อนำไปหมักกับยีสต์ *S. cerevisiae* ในสภาวะที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส พีเอช 4 และใช้ระยะเวลาในการหมัก 3 วัน สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 0.16 กรัมต่อกรัมผักตบชวา ส่วนผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพแล้วย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 2.5 5.0 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปให้ความร้อนภายใต้ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที พบว่าผักตบชวาที่ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์ได้สูงสุดเท่ากับ 0.38 กรัมต่อกรัมผักตบชวา และเมื่อนำไปหมักกับยีสต์ *S. cerevisiae* ผลิตแอลกอฮอล์ได้ 0.12 กรัมต่อกรัมผักตบชวา

Allcock and Woods (1981) ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอนซีเมทิลเซลลูเลสและเซลโลบิเอสจากแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าผลิตเอนไซม์คาร์บอนซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดที่พีเอช 4.6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยที่ปริมาณเอนไซม์คาร์บอนซีเมทิลเซลลูเลสและเซลโลบิเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียจะต่ำกว่าปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตจากรา

Aswathy *et al.* (2010) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาโดยกระบวนการหมักแบบแห้ง โดยย่อยผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus niger* และรา *Trichoderma reesei* โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการย่อยผักตบชวา ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (8-16 ยูนิตต่อกรัม) ปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (BGL) (1600-3200 ยูนิตต่อกรัม) และความเข้มข้นของ tween 80 (0.05-0.15 เปอร์เซ็นต์ต่อโดยปริมาตร) จากนั้นหมักเป็นเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์จากผักตบชวา คือ ใช้ปริมาณเซลลูเลส 8 ยูนิตต่อกรัม ปริมาณ BGL 3130 ยูนิตต่อกรัม และความเข้มข้น 0.14 เปอร์เซ็นต์ต่อโดยปริมาตร ได้ค่าน้ำตาลรีดิวิซ์จาก

สมการเท่ากับ 825 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวา และเมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมไปทำการทดลองจริง นั้นได้น้ำตาลรีดิวซ์ 790-850 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวา จากนั้นนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ทำให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปหมักกับยีสต์ *S. cerevisiae* ผลิตเอทานอลได้ 4.25 กรัมต่อลิตร (0.54 เปอร์เซ็นต์ต่อโดยปริมาตร)

Isarankura-Na-Ayudhya *et al.* (2007) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาโดยใช้กรดซัลฟิวริกในการย่อยเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลไซโลส พบว่าเมื่อใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นั้นได้น้ำตาลไซโลส 134 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวา ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากย่อยผักตบชวากับกรดแล้วทำการให้ความร้อนกับสารละลายที่ 60 องศาเซลเซียสและเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์จนมีพีเอชเป็น 10 จากนั้นนำไปหมักด้วยยีสต์ *Candida shehatae* ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 1.01 กรัมต่อลิตร

Kumar *et al.* (2009) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาโดยยีสต์ *Pichia stipitis* โดยย่อยผักตบชวากับใช้กรดซัลฟิวริก 2 เปอร์เซ็นต์ต่อโดยปริมาตร ทำการย่อยภายใต้สภาวะรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที กรองนำส่วนที่ไม่ละลายมาล้างด้วยน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่กรองได้รวมกับสารละลายที่ล้างด้วยน้ำ พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.19 กรัมต่อกรัมแห้งโดยเป็นส่วนของน้ำตาลเพนโตส 0.13 กรัมต่อกรัมแห้ง จากนั้นนำสารละลายมาให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม  $\text{Ca(OH)}_2$  จนพีเอชเป็น 10 จากนั้นนำไปหมักต่อกับยีสต์ *P. stipitis* ได้เอทานอล 0.425 กรัมต่อกรัมแห้ง

Kurup *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากผักตบชวาจากแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alcaligenes faecalis* และ *Aquaspirillum* sp. พบว่าในสภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอช 7 หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความชื้น 1:0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่า *A. faecalis* ผลิตเซลลูเลสในช่วง 16.8 - 94.8 ยูนิตต่อกรัม และ *Aquaspirillum* sp. ผลิตเซลลูเลสได้ในช่วง 25.2 - 110.4 ยูนิตต่อกรัม และเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน *Aquaspirillum* sp. ผลิตเซลลูเลสได้ 216 ยูนิตต่อกรัม ส่วน *A. faecalis* ผลิตเซลลูเลสได้ 210 ยูนิตต่อกรัม

Lee *et al.* (1985) ศึกษาการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* NRRL B527 และ ATCC 824 โดยมีเซลโลบิโอสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (70-90%) และเซลโลบิโอส (60-90%) ในช่วงการเจริญของกระบวนการ

หมักแบบต่อเนื่องและแบบกะในอาหารที่มีพีเอช 5.2 ซึ่ง *C. acetobutylicum* B527 ในการหมักแบบกะสามารถผลิตเอนไซม์เอนโคกลูคานเนสและเซลโลบีเอสในอาหารที่มีพีเอช 5.2 และ 4.8 ตามลำดับ ส่วน *C. acetobutylicum* ATCC 824 สามารถไฮโดรไลซ์คาร์บอนซีเมทิลเซลลูโลสและอะไวเซล (เซลลูโลส)

Masami *et al.* (2008) ย่อยผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก 0.5-4 เปอร์เซ็นต์ต่อโดยปริมาตร แล้วทำการย่อยที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 0.5-1.5 ชั่วโมง กรองแล้วทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล แล้วกรอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยผักตบชวาคือใช้กรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซ็นต์ต่อโดยปริมาตร ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมักต่อกับยีสต์ 624 สายพันธุ์จากแหล่งน้ำ 28 แหล่ง พบว่าสายพันธุ์ 484 นั่นคือยีสต์ *Candida shehatae* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 1.77 กรัมต่อลิตร

Mesa *et al.* (2009) ศึกษาการปรับสภาพขานอ้อยแบบ 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรกปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อละลายเฮมิเซลลูโลส และทำให้เกิดการสูญเสียกลูโคสในระดับที่ต่ำอีกด้วย ส่วนขั้นตอนที่ 2 ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ในการปรับสภาพเพื่อกำจัดลิกนินโดยตรง และมีเฮมิเซลลูโลสบางส่วนละลายออกมา อีกทั้งยังทำให้โครงสร้างเซลลูโลสเกิดการพองตัว ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ทำให้ง่ายต่อการไฮโดรไลซิส

Mishima *et al.* (2008) เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากผักตบชวากับจอก โดยนำวัสดุหมักผ่านการปรับสภาพก่อนด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 12 ชั่วโมง แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 31 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเลส แล้วนำไปหมักกับจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2346 และแบคทีเรีย *Escherichia coli* KO11 ซึ่ง *E. coli* นั้นได้รับการตัดต่อพันธุกรรม พบว่าในกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (SSF) เมื่อหมักผักตบชวากับยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 14.4 กรัมต่อลิตร ส่วนผักตบชวาที่หมักด้วยแบคทีเรีย *E. coli* ผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 16.9 กรัมต่อลิตร และจอกที่หมักกับยีสต์ *S. cerevisiae* ผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 14.9 กรัมต่อลิตร ส่วนจอกที่หมักด้วยแบคทีเรีย *E. coli* ผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 16.2 กรัมต่อลิตร และในกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับการหมัก (SHF) พบว่าเมื่อหมักผักตบชวากับยีสต์ *S. cerevisiae* ผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 9 เท่ากับ 10.1 กรัมต่อลิตร ส่วนผักตบชวาไปหมักด้วย

แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 30 เท่ากับ 10.3 กรัมต่อลิตร และเมื่อหมักจอกกับยีสต์ *S. cerevisiae* ผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 9 เท่ากับ 11.3 กรัมต่อลิตร ส่วนจอกที่หมักด้วยแบคทีเรีย *E. coli* ผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 30 เท่ากับ 12.7 กรัมต่อลิตร

Monot *et al.* (1982) ศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 พบว่า การเจริญของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับแมกนีเซียม เหล็ก และโพแทสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแมกนีเซียมและแมงกานีสที่มากเกินไป จะเกิดผลเสียกับแบคทีเรีย สูตรอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรีย คือ แมกนีเซียมซัลเฟต 50-200 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ไอออนซัลเฟต 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไบโอดีน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียมอะซิเตต 1.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.015-8 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 20-60 กรัมต่อลิตร

Nigam (2002) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาโดยยีสต์ *Pichia stipitis* โดยย่อยผักตบชวากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นเวลา 7 ชั่วโมง แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที แล้วกรองเก็บส่วนที่เป็นสารละลายที่กรองได้ไว้ ส่วนที่เป็นของแข็งนำไปล้างด้วยน้ำอุ่น (60 องศาเซลเซียส) นำน้ำที่ล้างร่วมกับสารละลายที่กรองได้ จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์จนมีพีเอชเป็น 10 จากนั้นหมักสารละลายกับยีสต์ *P. stipitis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และมีการให้อากาศ พบว่าได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.35 กรัมต่อกรัมผักตบชวา และความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.18 กรัมต่อลิตร

Sornvaraweat and Kongkiattikajorn (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ SHF จากใบผักตบชวาโดยเปรียบเทียบยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 *S. cerevisiae* KM 1195 และ *S. cerevisiae* KM 7253 ซึ่งผักตบชวาผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผักตบชวามาไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ไชแลนเนส และเพคตินเนส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากกระบวนการผลิตเอทานอลในกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับการหมัก (SHF) จากผักตบชวา เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากยีสต์ 3 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* KM 7253 ผลิตเอทานอลได้ต่ำสุด 0.19 กรัมต่อกรัมผักตบชวา ส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* KM 1195 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 0.24 กรัมต่อกรัมผักตบชวา

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA agar โดยมีสูตรอาหารดังภาคผนวก ก ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จังหวัดปทุมธานี ทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar โดยมีสูตรอาหารแสดงดังภาคผนวก ก ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 2. วัสดุหมัก

ผักตบชวาที่นำมาศึกษาเก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตัดส่วนที่เป็นรากทิ้ง จะนำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ จากนั้นหั่นผักตบชวาให้มีขนาดเล็ก ตากแดดจนแห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมาลดขนาดด้วยเครื่องบดให้มีขนาด 20-50 เมช และทำการศึกษองค์ประกอบของผักตบชวา ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ด้วยเครื่องวัดปริมาณเชื้อ

#### 3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและวิเคราะห์

- 3.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Anthekie Advanced, Secomam, France
- 3.2 เครื่องเขย่า (Shaking Incubator): SI2, China
- 3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): PLC-012, Gemmy, Taiwan
- 3.4 เครื่องชั่งแบบละเอียด (ทศนิยม 5 ตำแหน่ง): XP205, Mettler Toledo, Switzerland
- 3.5 เครื่องชั่งแบบหยาบ (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง): PM6100, Mettler Toledo, Switzerland
- 3.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ: HL-340, Huxley, China

- 3.7 ตู้บดมร่อน: PH510, EUTECH, U.S.A.
- 3.8 เครื่องวัดพีเอช: 420A, Orion, U.S.A.
- 3.9 ตู้บ่มเชื้อ: Memmert, Germany
- 3.10 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Thermo, U.S.A.
- 3.11 คอลัมน์ HPLC: Rezex RPM monosaccharide 00H-0135-K0
- 3.12 เครื่อง Gas Chromatography (GC): GC-8A, Shimadzu, Japan
- 3.13 คอลัมน์ GC: OV-1 80/100
- 3.14 เครื่องวัดความหวาน (Hand Refractometer): 507-I, N.O.W., Japan
- 3.15 เครื่องให้ความร้อนและกวนสารละลาย (Hot Plate & Stirrer): Cimarec 2, England
- 3.16 เครื่องทำน้ำกลั่น: 2012, GFL, Germany
- 3.17 เตาเผาอุณหภูมิสูง: Carbolite, Scientific, Thailand
- 3.18 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)
- 3.19 เครื่องผสม (Vortex Mixer): KMC-1300V, VISION, Korea
- 3.20 ชุดกรอง Mobile Phase: Supelco, U.S.A.
- 3.21 ตู้ควบคุมความชื้น: BQ 97, Bossmen, Taiwan
- 3.22 ออโต้ปิเปตขนาด 1, 5, 10 ml. : Boeco, Germany
- 3.23 เตาไฟฟ้า: H51, TL
- 3.24 เครื่องควบคุมน้ำหล่อเย็น: CBAI, Scientific, Thailand
- 3.25 นาฬิกาจับเวลา: HS20, Casio, Japan
- 3.26 ฟลasks ขนาด 125, 250, 500, 1000 ml
- 3.27 บีกเกอร์ขนาด 50, 150, 250, 500, 1000 ml
- 3.28 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ: SI2, CT laboratory,
- 3.29 เครื่องวิเคราะห์เชื้อยีส: FIWE 6, VELP Scientifica, Italia
- 3.30 อ่างควบคุมอุณหภูมิ: SBD50-COLD, Scientific, Thailand
- 3.31 syringe filter ขนาดรูพรุน 0.45  $\mu\text{m}$
- 3.32 ปิเปตแก้ว
- 3.33 กระจกบดวง
- 3.34 ตู้เขี่ยเชื้อ
- 3.35 บีกเกอร์สุญญากาศ
- 3.36 ซ้อนตักสาร
- 3.37 หลอดทดลอง

- 3.38 ขวดปรับปริมาตร
- 3.39 แท่งแก้ว
- 3.40 ลวดเขี่ยเชื้อ
- 3.41 จานเพาะเชื้อ
- 3.42 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.43 สำลี
- 3.44 ขวด Vial

#### 4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 4.1 กรดซัลฟิวริก (เกรด AR, Merck, Germany)
- 4.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.3 เอทานอล (เกรด AR, Merck, Germany)
- 4.4 เมทานอล (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.5 โซเดียมซิเตรต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.6 กรดซिटริก (เกรด AR, Merck, Germany)
- 4.7 แอมโมเนียมซัลเฟต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.8 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.9 แคลเซียมคลอไรด์ (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.10 แมกนีเซียมซัลเฟต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.11 เปปโตน (Biomark Laboratory, India)
- 4.12 สารสกัดยีสต์ (Biomark Laboratory, India)
- 4.13 มอลต์สกัด (Biomark Laboratory, India)
- 4.14 แอมโมเนียมอะซิเตต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.15 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.16 แมกนีเซียมซัลเฟต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.17 เฟอร์รัสซัลเฟต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.18 ทริปโตน (Biomark Laboratory, India)
- 4.19 เด็กซ์โตรส (เกรดการค้า)
- 4.20 โซเดียมโบเรต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.21 ไดโซเดียม เอทิลีนไดเอมีนเทอร์อะซิเตรต (EDTA)

- 4.22 โซเดียมลาร์วีรัซัลเฟต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.23 2-อีทรอกซีเอทานอล (เกรด AR, Merck, Germany)
- 4.24 ไดโซเดียมฟอสเฟต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.25 อะซิโตน (เกรดการค้า)
- 4.26 ออกทานอล (เกรด AR, Merck, Germany)
- 4.27 ซิลิโคนไตรเมทิลเอมโมเนียมโบมายด์ (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.28 3,5-ไดไนโตรซาลิไซเลต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.29 น้ำตาลกลูโคส (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.30 น้ำตาลไซโลส (เกรด AR, Fluka, Switzerland)
- 4.31 น้ำตาลอะราบีโนส (เกรด AR, Fluka, Switzerland)
- 4.32 น้ำตาลแมนโนส (เกรด AR, Fluka, Switzerland)
- 4.33 น้ำตาลเซลโลบิโอส (เกรด AR, Fluka, Switzerland)
- 4.34 โปแทสเซียมโซเดียมทาเทรต (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.35 โซเดียมซัลไฟต์ (เกรด AR, Ajax finechem, Australia)
- 4.36 ผงวุ้น

## วิธีการ

### 1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของผักตบชวา

วิเคราะห์องค์ประกอบของผักตบชวาจัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และ เถ้า แสดงในภาพที่ 25 โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Goering และ Van (1970) ด้วยเครื่องวัดเยื่อใย ประกอบไปด้วยขั้นตอน 4 ขั้นตอน ดังนี้

#### 1.1 หาค่า Neutral Detergent Fiber (NDF)

นำผักตบชวา 1 กรัม มาทำการสกัดโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตชนิดที่ละลายน้ำได้ และสิ่งเจือปนด้วย Neutral Detergent Solution (NDS) 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เติม 0.5 กรัม ของโซเดียมซัลไฟต์ และ 3-4 หยดของออกทานอล ต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำเดือด ตามด้วยอะซิโตน นำไปอบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้

ให้เขียนในตู้ควบคุมความชื้น ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ Neutral Detergent Fiber (%NDF) (ภาคผนวก ข)

### 1.2 หาค่า Acid Detergent Fiber (ADF)

นำผักตบชวา 1 กรัม มาทำการสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วย Acid Detergent Solution (ADS) 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) หยดออกทานอล 3-4 หยด ต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำเดือด ตามด้วยอะซิโตน นำไปอบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ควบคุมความชื้น ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ Acid Detergent Fiber (%ADF) (ภาคผนวก ข)

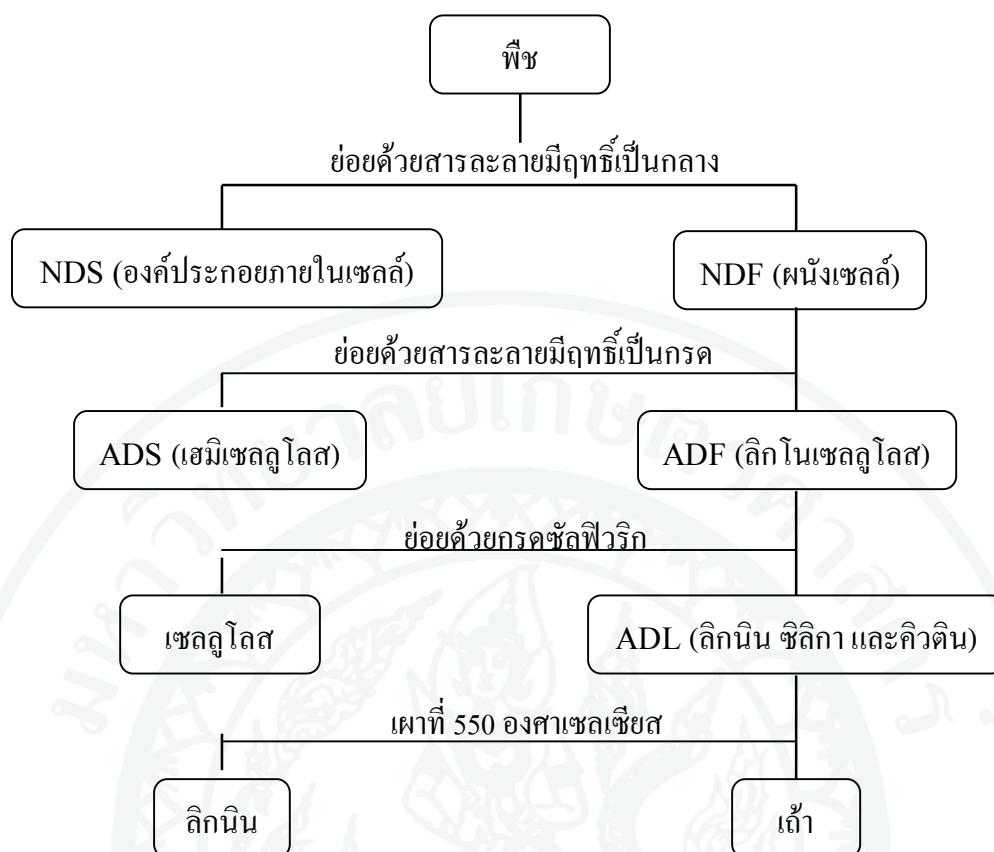
### 1.3 หาค่า Acid Detergent Lignin (ADL)

นำส่วนตะกอนที่เหลือจากขั้นตอนการหาค่า Acid Detergent Fiber มาทำการสกัดเซลลูโลสด้วย 72 เปอร์เซ็นต์ของกรดซัลฟิวริก 25 มิลลิลิตร ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีการคนทุกๆ ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างด้วยน้ำเดือด เสร็จแล้วนำไปอบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ควบคุมความชื้น ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ Acid Detergent lignin (%ADL) (ภาคผนวก ข)

### 1.4 หาค่าเถ้า (Ash)

นำส่วนตะกอนที่เหลือจากขั้นตอนการหาค่า Acid Detergent Lignin ไปทำการเผาด้วยเตาเผาอุณหภูมิสูง ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ควบคุมความชื้น ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของเถ้า (%Ash)

โดยค่า Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF), Acid Detergent Lignin (ADL) และ Ash ที่ได้จากการวิเคราะห์ สามารถนำไปใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้าได้ ดังแสดงภาคผนวก ข



ภาพที่ 25 ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบของฟีด

ที่มา: นีรนาม (2554)

## 2. ศึกษาหาความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพ

ผักตบชวาที่จะใช้เป็นวัสดุหมักในการศึกษาหาสภาวะเหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยนำผักตบชวามาปรับสภาพก่อนด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกก่อน เพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลสออก แล้วทำการกำจัดลิกนินออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยองค์ประกอบหลักที่เหลือในผักตบชวา คือ เซลลูโลส

ในขั้นตอนแรกของการปรับสภาพวัสดุหมัก นำผักตบชวามาเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก (0.5 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อกรดซัลฟิวริกเท่ากับ 1:20 ทำการให้ความร้อนโดยหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกจากสารละลายด้วยผ้าขาวบาง แล้วล้างเอากรด

ออกด้วยน้ำ จนมีค่าพีเอชเป็นกลาง อบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบตามวิธีของ Goering และ Van (1970) ด้วยเครื่องวัดเชื้อใย

ส่วนขั้นตอนที่ 2 นั้นนำผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพจากขั้นตอนแรกมาปรับสภาพต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 3 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1:20 ทำการให้ความร้อนโดยหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกจากสารละลายด้วยผ้าขาวบาง แล้วล้างเอาต่างออกด้วยน้ำ จนมีค่าพีเอชเป็นกลาง อบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบตามวิธีของ Goering และ Van (1970) ด้วยเครื่องวัดเชื้อใย เลือกระดับความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมในการปรับสภาพผักตบชวา

### 3. ศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA agar จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA broth ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ก ที่พีเอช 6.0 อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใช้เป็นตัวตั้งเชื้อในการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

ในการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ทำโดยการถ่ายตั้งเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA broth พีเอช 6.0 ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 1000 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด เพื่อวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวตั้งเชื้อในการหมักผักตบชวา โดยช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวตั้งเชื่อนั้น จะต้องเจริญอยู่ในช่วงก่อนเข้าสู่ระยะคงที่

#### 4. ศึกษาหาสภาวะในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

ทำการศึกษาหาสภาวะในช่วงที่กำหนดของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียกนั้น จะอาศัยการออกแบบการทดลองตามวิธีของ Box-Behnken โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ปริมาณของผักตบชวาต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการหมัก และเวลาที่ใช้ในการหมัก ซึ่งระดับการทดลองของแต่ละปัจจัยจะแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ขอบล่าง (-1), ค่ากลาง (0) และขอบบน (+1) ดังตารางที่ 4 สำหรับการทดลอง 3 ปัจจัย ในการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ MINITAB จะได้การทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง ทำการวิเคราะห์ตามสภาวะที่กำหนด แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS แสดงในภาคผนวก ก

ตารางที่ 4 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาโดยการหมักกับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum*

ปัจจัยการทดลอง	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย		
		-1	0	1
ปริมาณของผักตบชวาต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)	S	10	30	50
อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (องศาเซลเซียส)	T	30	40	50
ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	t	24	36	48

ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองทั้ง 15 การทดลอง จะนำไปวิเคราะห์หาผลทางสถิติ พื้นผิวตอบสนอง 3 มิติ (response surface-3D) กราฟคอนทัวร์ (contour-2D) สมการทำนายปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และสภาวะในช่วงที่กำหนดของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในโปรแกรม MINITAB จากนั้นทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่สภาวะที่เหมาะสม แล้วนำค่าที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับค่าที่ได้การคำนวณตามสมการทำนายปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ในการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ MINITAB version 14.0 สำหรับการทดลอง 3 ปัจจัย จะได้การทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง ซึ่งจะกำหนดปริมาณของผักตบชวาต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการหมัก และเวลาที่ใช้ในการหมักที่

ระดับการทดลองต่างๆ โดยในการในการทดลองนั้น จะนำผักตบชวาลงในพลาสติก 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA (ไม่เติมกลูโคส) พีเอช 6.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นถ่ายต้นเชื้อแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที แล้วทำการหมักกับผักตบชวาที่อุณหภูมิและเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนดไว้ในการทดลอง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

นอกจากนี้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ดังภาคผนวก ง

## 5. ศึกษาผลผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ได้จากการหมักผักตบชวา

ในการศึกษาการผลิตเอทานอลนั้นจะนำน้ำหมักที่ได้จากสภาวะที่กำหนดจากกระบวนการหมักผักตบชวา โดยทำการหมักน้ำตาลรีดิวซ์กับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ตอน

### 5.1 ศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339

ทำการเขี่ยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ก ที่พีเอช 4.5 อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใช้เป็นต้นเชื้อในการศึกษาการเจริญของยีสต์

ในการศึกษาการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ทำโดยการถ่ายต้นเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth พีเอช 4.0 ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 1,000 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด เพื่อวัดน้ำหนักเซลล์แห้งและวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาล

รีดิวิซ์ เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมของยีสต์ที่ใช้เป็นต้นเชื้อในการหมักเอทานอล โดยช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นเชื่อนั้น จะต่อเป็นยีสต์ที่เจริญอยู่ในช่วงก่อนเข้าสู่ระยะคงที่

## 5.2 ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ผลิตได้จากการหมักผักตบชวา

ในการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ได้จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียก ทำได้โดยการนำน้ำหมักที่ได้จากการหมัก (มีค่าความหวานประมาณ 1 องศาบริกซ์) ทำการระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ภายใต้ความดัน 72 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้ค่าความหวาน 15 องศาบริกซ์ จากนั้นทำการถ่ายต้นเชื้อของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่มีการเจริญอยู่ในช่วงก่อนเข้าสู่ระยะคงที่ คิดเป็นความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในน้ำหมักที่มีค่าความหวาน 15 องศาบริกซ์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พีเอช 4.0 ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล (ภาคผนวก จ)

## 6. การวิเคราะห์ตัวแปรต่าง ๆ

### 6.1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวิซ์

นำตัวอย่างที่ได้จากการทดลองมาทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ด้วยสารละลาย 3,5-ไดโนโตรซาลิไซลิก (DNS) ตามวิธีของ Miller (1959) โดยดูดสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ได้จำนวน 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย DNS 1.0 มิลลิลิตร ผสมรวมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที ทำการเจือจางน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับทำการพามาตรฐานสารละลายกลูโคส เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ค

วิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลรีดิวิซ์ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) โดยนำสารละลายน้ำตาลที่ได้ไปทำการกรองผ่าน syringe filter ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ไปฉีดผ่านคอลัมน์ Rezex RPM monosaccharide

00H-0135-K0 (300 × 7.8 มิลลิเมตร) เคนระบบโดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำการตรวจวัดปริมาณสารที่ผ่านออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบอาร์ไอ (RI detector) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นำพื้นที่ใต้กราฟจาก โครมาโตแกรมที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาล โดยน้ำตาลที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน ได้แก่ เซลโลบิโอส (cellobiose), กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และแมนโนส ตามลำดับ เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ง

## 6.2 การวิเคราะห์เอทานอล

วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบก๊าซ (Gas Chromatography, GC) โดยนำสารละลายเอทานอลที่ได้ไปกรองผ่าน syringe filter ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ไปฉีดผ่านคอลัมน์ OV-1 80/100 เคนระบบโดยใช้อิเลียม (helium) เป็นก๊าซตัวพา (carrier gas) ทำการตรวจวัดปริมาณสารที่ผ่านออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบเอฟไอดี (FID detector) นำพื้นที่ใต้กราฟจากโครมาโตแกรมที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอล เพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอลตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก จ

## 6.3 การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำหลอดเหวี่ยงพลาสติกไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่ง และจดบันทึกน้ำหนักของหลอดเหวี่ยงพลาสติกเปล่า คูดตัวอย่างสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งปริมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดเหวี่ยงพลาสติก นำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำส่วนใสออกจากนั้นนำหลอดเหวี่ยงพลาสติกที่มีกากตะกอนของเซลล์อยู่ไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนัก นำน้ำหนักที่ชั่งได้ครั้งหลังไปลบด้วยน้ำหนักของหลอดเหวี่ยงพลาสติกเปล่า ค่าที่ได้ คือ น้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร

## ผลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษานำผักตบชวาซึ่งเป็นวัชพืชน้ำ ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วและพบเห็นได้ตามแม่น้ำลำคลองทั่วทุกภาคของประเทศไทย จากการที่ผักตบชวาสามารถเจริญได้ดีในทุกสภาพอากาศและทุกสภาพพื้นที่ โดยเฉพาะแหล่งน้ำจืด จึงเกิดการแพร่กระจายไปทุกหนทุกแห่งและสร้างปัญหากับสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต จากการศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับผักตบชวาจะเห็นว่าม้งานวิจัยนำผักตบชวามาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น ใช้อาหารเสริมสำหรับเลี้ยงสัตว์ ใช้บำบัดน้ำเสีย การผลิตเอทานอล และก๊าซชีวภาพ เป็นต้น ซึ่งในหลายงานวิจัยนั้นเน้นที่จะนำเซลล์โกลสที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในผักตบชวามาใช้ โดยเซลล์โกลสจัดเป็นโฮโมพอลิเมอร์ของกลูโคส เมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสมันจะได้กลูโคสออกมา ดังนั้นผักตบชวาจัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสชนิดหนึ่ง ที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ และนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและส่งเสริมการนำวัชพืชที่เป็นปัญหากับสิ่งแวดล้อมมาใช้ให้เกิดประโยชน์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการนำผักตบชวามาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียก โดยแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตเอโนไซม์ ได้แก่ เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในผักตบชวา โดยในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์นั้น จะอาศัยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด โดยมีการปรับสภาพผักตบชวากับสารเคมีก่อน สารเคมีที่ใช้ในการปรับสภาพ ได้แก่ กรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมโดยทั่วไป และมีราคาไม่สูงมากนัก นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพวัตถุดิบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยเอโนไซม์ โดยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะนำไปหาชนิดและปริมาณของน้ำตาล แล้วนำไปใช้ในการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ต่อการผลิตเอทานอล

## 1. ศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของผักตบชวา

เก็บผักตบชวาจากแหล่งน้ำ คัดรากทิ้ง แล้วนำส่วนใบและก้านใบมาล้างเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดมา อบแห้ง และลดขนาดผักตบชวาคด้วยเครื่องบด จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ในผักตบชวา แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของผักตบชวาที่ได้จากการวิเคราะห์เยื่อใย

องค์ประกอบของผักตบชวา	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง
เซลลูโลส	35.84
เฮมิเซลลูโลส	27.11
ลิกนิน	8.33
เถ้า	0.61

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของผักตบชวาดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าผักตบชวาที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดคือ 35.84 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือปริมาณเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า คือ 27.11 8.33 และ 0.61 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ผักตบชวาเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในปริมาณสูง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้

## 2. ศึกษาหาความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพ

ผักตบชวาจัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยลิกนินเป็นตัวยึดเกาะระหว่างเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งจะขัดขวางการทำงานของกรดหรือเอนไซม์ในการไฮโดรไลซิสเซลลูโลส ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม และกำจัดลิกนิน จะทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเซลลูโลสและเอนไซม์เพิ่มขึ้น ก็จะทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย (Fan *et al.*, 1987) เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากขึ้น ส่งผลให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้นด้วย แต่เนื่องจากยีสต์ *S. cerevisiae* ใช้น้ำตาลเฮกโซสเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้เท่านั้น ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ จะได้

ปริมาณเอทานอลที่ต่ำกว่า เพราะเมื่อวัตถุดิบถูกไฮโดรไลซ์แล้วส่วนมากจะได้น้ำตาลไซโลส (Tellez-Luis *et al.*, 2002) หลุดออกมาเป็นหลัก เนื่องจากพันธะของเฮมิเซลลูโลสนั้นง่ายต่อการถูกไฮโดรไลซ์มากกว่าเซลลูโลส (Karimi *et al.*, 2006) จึงทำให้ซึ่งยีสต์สายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนี้ได้

โดยทั่วไปในการปรับสภาพวัตถุดิบจะใช้การทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่อุณหภูมิสูง สารเคมีที่นิยมใช้ในการทำลายพันธะไฮโดรเจนและแวนเดอร์วาลส์ ซึ่งเป็นพันธะที่ทำให้โครงสร้างผลึกของลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ กรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Carmen, 2009)

เมื่อนำผักตบชวาที่ผ่านการอบแห้งแล้วจะนำไปผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์องค์ประกอบตามภาคผนวก ข พบว่าองค์ประกอบของผักตบชวาเมื่อผ่านการปรับสภาพแล้วจะวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า แสดงในตารางที่ 6 จากนั้นนำผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วย กรดซัลฟิวริกมีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปปรับสภาพต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 3 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า แสดงในตารางที่ 6

**ตารางที่ 6** องค์ประกอบของผักตบชวาลังจากผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกก่อนที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วนำไปปรับสภาพต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ความเข้มข้นของ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%v/v)	ความเข้มข้นของ NaOH (%w/v)	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง)			
		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
0.5	-	50.81	6.83	7.92	0.18
	1	77.69	3.67	3.14	0.12
	3	79.96	3.10	1.08	0.11
	5	80.07	1.75	1.14	0.09
	10	85.31	0.85	1.01	0.05
	15	85.65	0.51	0.87	0.03
	20	85.73	0.35	0.64	0.00

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%v/v)	ความเข้มข้นของ NaOH (%w/v)	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง)			
		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
1	-	60.87	2.50	9.95	0.39
	1	77.19	0.93	6.35	0.23
	3	79.50	0.40	5.68	0.21
	5	81.12	0.15	3.18	0.14
	3	-	63.14	1.08	12.45
3	1	79.60	0.00	9.32	0.48
	3	80.13	0.00	6.76	0.35
	5	81.90	0.00	3.87	0.14

จากการทดลองพบว่า การปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก จะมีผลทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายออกมา โดยปริมาณของเฮมิเซลลูโลสจะลดลงจาก 27.11 เป็น 6.83 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลทำให้เปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลสและลิกนินเพิ่มขึ้นจาก 35.81 เป็น 50.81 และ 8.11 เป็น 7.92 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ การที่ปริมาณเฮมิเซลลูโลสลดลง ทำให้ความบริสุทธิ์ของเซลลูโลสในองค์ประกอบมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเพิ่มจาก 0.5 เป็น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปปรับสภาพต่อด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณของเซลลูโลสไม่ต่างกันมากนัก จึงเลือกใช้กรดซัลฟิวริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ในการปรับสภาพก่อน จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดลิกนินออก ซึ่งลิกนินจะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันเซลลูโลสจากการไฮโดรไลซิส (Palmqvist *et al.*, 1999) เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้นเป็น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร จะทำให้ปริมาณของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นถึง 85.31 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยเพิ่มขึ้นคิดเป็นประมาณ 2 เท่าของปริมาณเซลลูโลสเริ่มต้น ในขณะที่ปริมาณเฮมิเซลลูโลส และลิกนินลดลง คิดเป็นประมาณ 4 และ 30 เท่า ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร องค์ประกอบของผักตบชวามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย กล่าวคือ ปริมาณของเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้นเพียง 0.27 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเท่านั้น ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวจึงแสดงว่าการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกก่อนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์แล้วนำไปปรับสภาพต่อด้วย

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการนำไปปรับสภาพผักตบชวาเพื่อนำไปใช้ในเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป



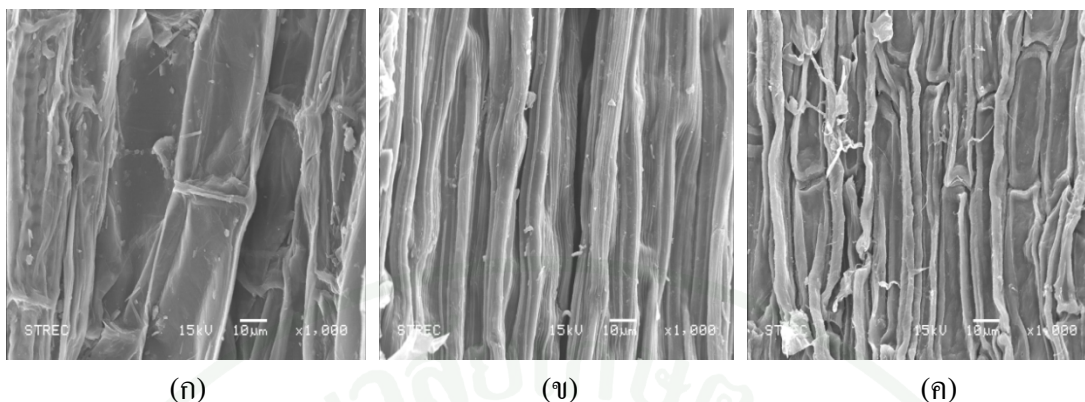
(ก)

(ข)

(ค)

**ภาพที่ 26** ลักษณะทางกายภาพของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ก) ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (ข) ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ค)

จากภาพที่ 26 แสดงลักษณะทางกายภาพของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก และผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกก่อนแล้วตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าโครงสร้างของผักตบชวาหลังจากปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกมีลักษณะแข็งมากขึ้นเมื่อเทียบกับผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ เนื่องจากสารละลายกรดจะเข้าไปทำลายโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส ทำให้เฮมิเซลลูโลสมีปริมาณลดลง ซึ่งกรดจะส่งผลต่อปริมาณลิกนินน้อยมาก (Silverstein *et al.*, 2007) จึงทำให้ลิกนินยังคงมีอยู่ โดยลิกนินจะทำหน้าที่เปรียบเสมือนเกราะป้องกันการไฮโดรไลซิสด้วยกรดหรือเอนไซม์ และเมื่อนำผักตบชวามาปรับสภาพต่อด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยสารละลายต่างจะทำให้ลิกนินละลายออกมา นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการพองตัว เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิว และลดการเป็นผลึกของเซลลูโลสอีกด้วย (Galbe and Zacchi, 2007)



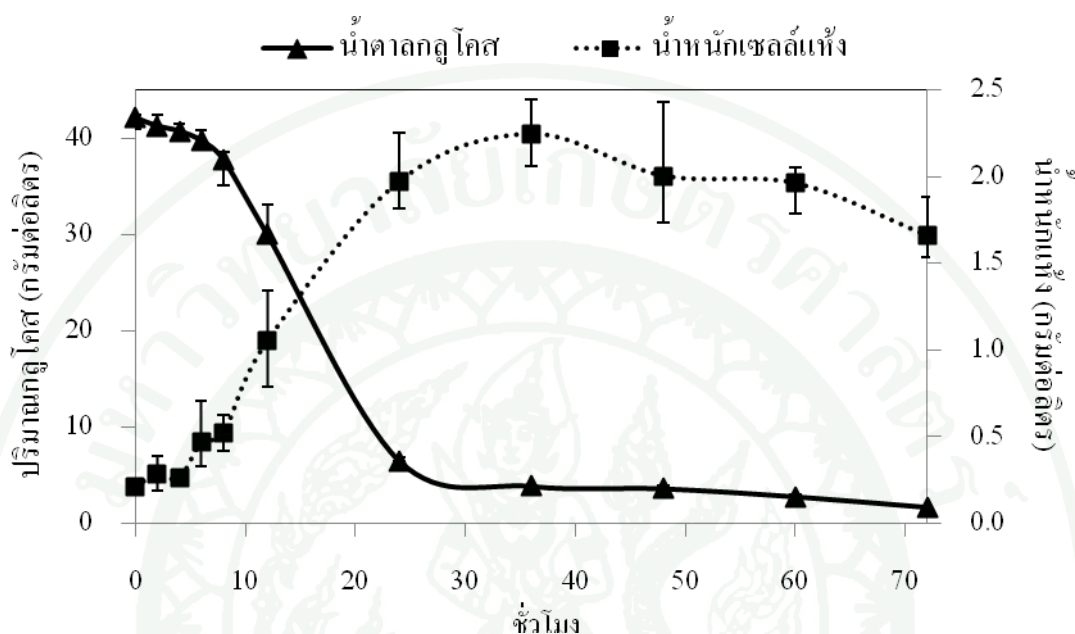
**ภาพที่ 27** โครงสร้างของฝักตบชวาก่อนและหลังจากปรับสภาพด้วยสารเคมี โดยกล้องอิเล็กตรอนกำลังขยายสูง (SEM) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ฝักตบชวาที่ไม่ปรับสภาพ (ก) ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (ข) ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ค)

จากผลการทดลองเมื่อทำการปรับสภาพฝักตบชวาด้วยสารเคมี พบว่าโครงสร้างของเส้นใยมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ภาพที่ 27ก) หลังจากปรับสภาพฝักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก ดังภาพที่ 27ข พบว่าโครงสร้างของเส้นใยจะชัดเจนขึ้น เรียงเป็นระเบียบมากขึ้น เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสหลุดออกไป เส้นใยยังไม่ถูกทำลาย แต่เมื่อปรับสภาพด้วยกรดและด่างทำให้เส้นใยถูกทำลายอย่างเห็นได้ชัด เพราะลิกนินถูกกำจัดออกไป แสดงในภาพที่ 27ค ซึ่งทำให้กรดหรือเอ็นไซม์สามารถเข้าไฮโดรไลซิสเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น

### 3. ศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

จากการศึกษาเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TYA ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที แล้ววัดปริมาณกลูโคสที่เหลือ และน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง แสดงในภาพที่ 28 พบว่าแบคทีเรียอยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) เป็นระยะที่แบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้น (วรารุณี, 2529) จนถึงชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้นแบคทีเรียจะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยสังเกตจากความชันของน้ำหนักรวมเซลล์แห้งจนถึงชั่วโมงที่ 36 แล้วหลังจากชั่วโมงที่ 36 อัตราการเจริญของแบคทีเรียเริ่มลดลง สาเหตุเนื่องจากอาหารเหลือน้อยมาก และเกิดการสะสมของเสียที่แบคทีเรียสร้างขึ้นซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอีกด้วย (วรารุณี, 2529) จากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าชั่วโมง

ที่ 12-24 เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับนำไปเป็นต้นเชื้อในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากช่วงเวลานี้เป็นช่วงที่แบคทีเรียอยู่ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) ซึ่งแบคทีเรียมีความแข็งแรงและเจริญเกือบเต็มที่แล้ว



ภาพที่ 28 การเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TYA ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

#### 4. การศึกษาหาสภาวะของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

ในการหาสภาวะในช่วงที่กำหนดของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพกับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* นั้น ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียก โดยกำหนดให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พีเอช 6.0 และเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที โดยใช้การออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken ซึ่งมีปัจจัยการทดลองที่ทำการศึกษาคือ 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณของผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และเวลาในการหมัก จะได้รับการทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง ทำ 3 ชั่วโมง หลังจากทำการหมักตามที่ได้ออกแบบการทดลองแล้ว จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาที่แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ตามการออกแบบการทดลอง Box-Behnken

การทดลองที่	ปัจจัยการทดลอง			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมัก)
	S (g/l)	T (°C)	t (hour)	
1	10	30	36	6.97±0.18
2	50	30	36	1.57±0.10
3	10	50	36	2.86±0.25
4	50	50	36	0.48±0.02
5	10	40	24	6.75±0.14
6	50	40	24	3.55±0.05
7	10	40	48	7.20±0.24
8	50	40	48	1.98±0.03
9	30	30	24	2.85±0.05
10	30	50	24	0.90±0.14
11	30	30	48	3.44±0.09
12	30	50	48	1.62±1.97
13	30	40	36	8.18±0.21
14	30	40	36	8.06±0.17
15	30	40	36	8.16±0.11

หมายเหตุ S คือ ปริมาณของผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)

T คือ อุณหภูมิในการหมัก (องศาเซลเซียส)

t คือ ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)

นำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองทั้ง 15 การทดลองแสดงในตารางที่ 7 มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม MINITAB version 14.0 เพื่อวิเคราะห์หาสมการแบบจำลองทำนายปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

#### 4.1 ผลการวิเคราะห์สมการแบบจำลองทำนายปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สมการแบบจำลองที่ได้จากการทดลอง จะสามารถเขียนในรูปแบบจำลองกำลังสอง (full quadratic model) ซึ่งจะประกอบไปด้วย 4 พจน์ คือ พจน์ของค่าคงที่ พจน์ของเชิงเส้นตรงพจน์ของกำลังสอง และพจน์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ซึ่งเมื่อทำการกระจายพจน์ต่างๆ จะได้ดังสมการที่ 6

$$Y = \beta_0 + \beta_1 S + \beta_2 T + \beta_3 t - \beta_{11} S^2 - \beta_{22} T^2 - \beta_{33} t^2 + \beta_{12} ST - \beta_{13} St + \beta_{23} Tt \quad (6)$$

โดยที่ Y คือ ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสมการ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมัก)

$\beta$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละปัจจัยในสมการแบบจำลองกำลังสอง

**ตารางที่ 8** ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย *C. acetobutylicum*

ปัจจัยการทดลอง	ค่าสัมประสิทธิ์	p-value
ค่าคงที่	-65.3611	0.000**
S	0.0107	0.881
T	2.8972	0.000**
t	1.0620	0.001**
S <sup>2</sup>	-0.0031	0.003**
T <sup>2</sup>	-0.0392	0.000**
t <sup>2</sup>	-0.0140	0.000**
S*T	0.0038	0.022**
S*t	-0.0021	0.079
T*t	0.0003	0.893

หมายเหตุ \*\*  $p \leq 0.05$

จากสมการที่ 6 เมื่อแทนค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละปัจจัย ( $\beta_j$ ) ที่ได้จากการทดลองตามตารางที่ 8 จะได้สมการแบบจำลองอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณของผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และเวลาในการหมัก ดังสมการที่ 7

$$Y = -65.3611 + 0.0107S + 2.8972T + 1.0620t - 0.0031S^2 - 0.0392T^2 - 0.014t^2 + 0.0038ST - 0.0021St + 0.0003Tt \quad (7)$$

ในส่วนต่อมาจะทำการพิจารณาค่าวิกฤตการแจกแจง (F) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ของสมการแบบจำลอง ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยที่ค่า F จะเป็นตัวพิจารณาว่าสมการที่ได้นั้นมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้หรือเชื่อถือได้หรือไม่ โดยจะทำการพิจารณาเทียบกับค่า F จากตารางค่าวิกฤตการแจกแจง (F-test) ถ้าหากค่า  $F_{\text{model}}$  มีค่ามากกว่าค่า  $F_{\text{Table}}$  นั้นแสดงว่าสมการที่ได้จากการทำนายมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ (Box and Draper, 2007) ส่วน  $R^2$  จะเป็นค่าที่ใช้อธิบายความสามารถของสมการ หรือปัจจัยในสมการว่าสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าตอบสนอง หรือตัวแปรตามได้มากน้อยเพียงเท่าใด ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ยิ่งมากสมการก็ยิ่งมีความเหมาะสมมาก

**ตารางที่ 9** วิเคราะห์ความแปรปรวน และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum*

Source	DF	SS	MS	F	P value
Regression (Model)	9	116.2278	12.9142	61.31	0.000
Residual Error	5	1.053	0.2106		
Total	14	117.281			
$R^2 = 99.1\%$		$R^2(\text{adj}) = 97.5\%$			

โดยจากการเปิดตารางค่าวิกฤตการแจกแจงที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ค่า  $F_{\alpha(\text{Model, Residual Error})}$  เป็น  $F_{0.05(9,5)}$  มีค่าเท่ากับ 4.77 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $F_{\text{model}}$  มีค่าเป็นไปตามทฤษฎี และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวากับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* มีค่าเท่ากับ 99.1 เปอร์เซ็นต์ จึงถือได้ว่าสมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากการทำนายมีความเหมาะสมและเชื่อถือได้

#### 4.2 การวิเคราะห์หัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ( $\beta_j$ ) ของแต่ละปัจจัย

การวิเคราะห์หัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ( $\beta_j$ ) ของปัจจัย โดยรูปแบบจำลอง full quadratic สามารถแสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยได้ดังตารางที่ 8

การวิเคราะห์หัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ( $\beta_j$ ) ของแต่ละปัจจัยเป็นการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่างๆ ที่ได้จากตารางที่ 9 เพื่อเป็นการทดสอบว่าปัจจัยแต่ละตัวในสมการที่ 7 นั้นมีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หรือมีนัยสำคัญทางสถิติ (significance) หรือไม่

ทำการกำหนดสมมติฐานโดย

$H_0 : \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_9 = 0$  ตัวแปรอิสระทุกตัวไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

$H_1 : \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_9 \neq 0$  มีตัวแปรอิสระอย่างน้อยหนึ่งตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

โดยตัวสถิติที่ใช้ในการทดสอบคือ  $p$ -value

ในการพิจารณาว่าค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละปัจจัยส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (significance) หรือไม่นั้น จะพิจารณาได้จากค่า  $p$ -value ดังที่แสดงในตารางที่ 8 ซึ่งค่า  $p$ -value เป็นค่าที่สามารถบ่งบอกได้ถึงการมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยถ้าค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยนั้น มีค่า  $p \leq 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าปัจจัยดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อย่างมีนัยสำคัญ

ผลจากการวิเคราะห์จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ คือ พจน์ T, t, S<sup>2</sup>, T<sup>2</sup>, t<sup>2</sup> และ ST ที่มีค่า  $p$ -value ที่ต่ำกว่า 0.05 แต่ผลของปัจจัยรวม ST มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นปัจจัยหลัก S มีผลตามด้วย ไม่สามารถตัดพจน์ S ทิ้งได้ (ชิตินา, 2551) ส่วนพจน์ St และ Tt ค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าพจน์นั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อย จึงสามารถที่จะตัดทิ้งได้

เมื่อพิจารณาในส่วนของพจน์เชิงเส้นตรง ได้แก่ พจน์ S, T และ t พบว่าค่า  $p$ -value ของพจน์ T มีค่าเป็นศูนย์ ส่วนพจน์ t นั้นมีค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.0001 แสดงว่าพจน์ T และ t มี

ความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ อย่างมีนัยสำคัญ โดยอุณหภูมิในการหมักเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลมากที่สุด รองลงมาคือ เวลาในการหมัก ส่วนพจน์ S แทนจะไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาล

จากการพิจารณาความสำคัญของปัจจัยในแต่ละพจน์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถสรุปสมการที่ 7 ได้ดังสมการที่ 8

$$Y = -65.3611 + 0.0107S + 2.8972T + 1.0620t - 0.0031S^2 - 0.0392T^2 - 0.014t^2 + 0.0038ST \quad (8)$$

#### 4.3 การวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

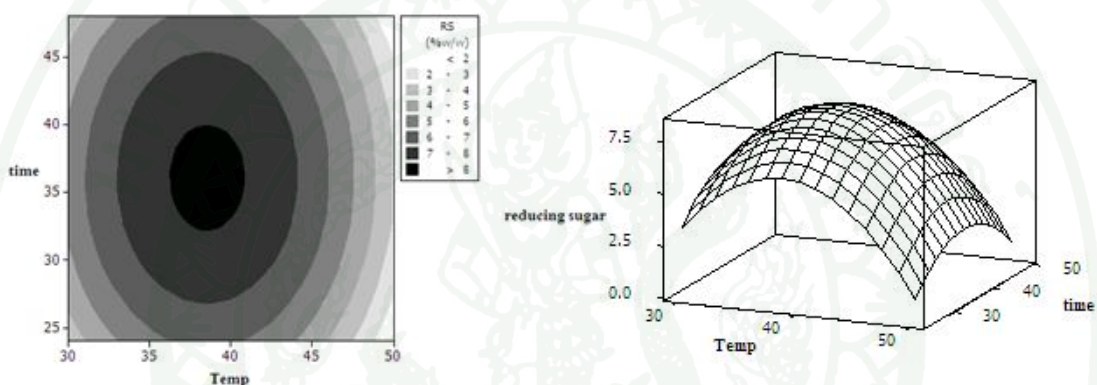
ในการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัย ได้แก่ ปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และเวลาในการหมัก ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียก จะสามารถอธิบายได้โดยอาศัยพื้นผิวตอบสนอง 3 มิติ และกราฟคอนทัวร์ 2 มิติ ดังภาพที่ 29 ถึง 31 ซึ่งในการใช้พื้นผิวตอบสนอง 3 มิติ และกราฟคอนทัวร์ 2 มิติ สำหรับการทดลอง 3 ปัจจัยการทดลองนั้น จะแสดงอิทธิพลของแต่ละปัจจัย โดยการพิจารณาปัจจัยพิจารณาทีละ 2 ปัจจัย และกำหนดให้อีกปัจจัยมีค่าคงที่ เท่ากับค่ากลาง (0) ของปัจจัยนั้น

จากภาพที่ 29 แสดงอิทธิพลของภาพพื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์ของ อุณหภูมิกับระยะเวลาในการหมักที่มีต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวา โดยกำหนดปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับกลางของการทดลองเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิของการหมักเพิ่มขึ้นจาก 30 จนถึง 38 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาของการหมักที่ 32-40 ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 6 เป็น 8 กรัมต่อลิตร แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส มีผลทำให้แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ลดลง อาจเกิดจากอุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้การทำงานของแบคทีเรียลดลง

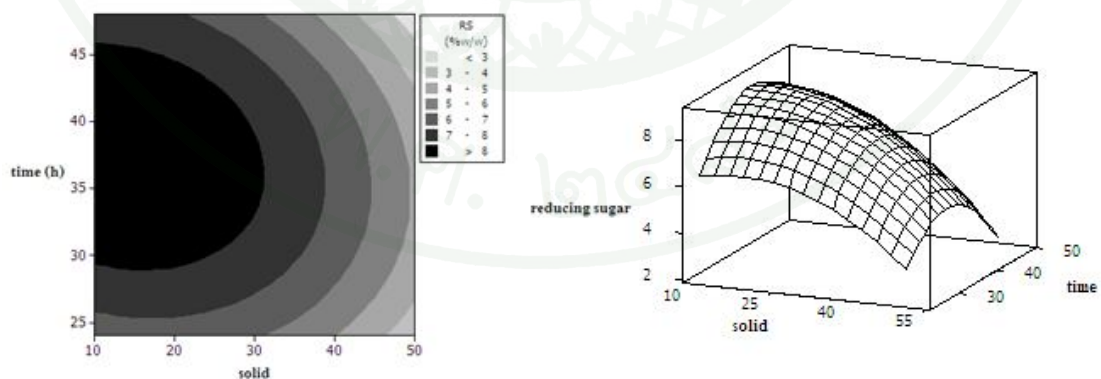
ในภาพที่ 30 แสดงอิทธิพลของภาพพื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์ของปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยกำหนดอุณหภูมิที่ระดับกลางของการทดลองเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วง 10-30 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างคงที่ และเมื่อเพิ่มปริมาณ

ผักตบชวามีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง การเพิ่มเวลาช่วยเพิ่มการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ แต่เมื่อเพิ่มเวลาสูงกว่า 46 ชั่วโมงจะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง

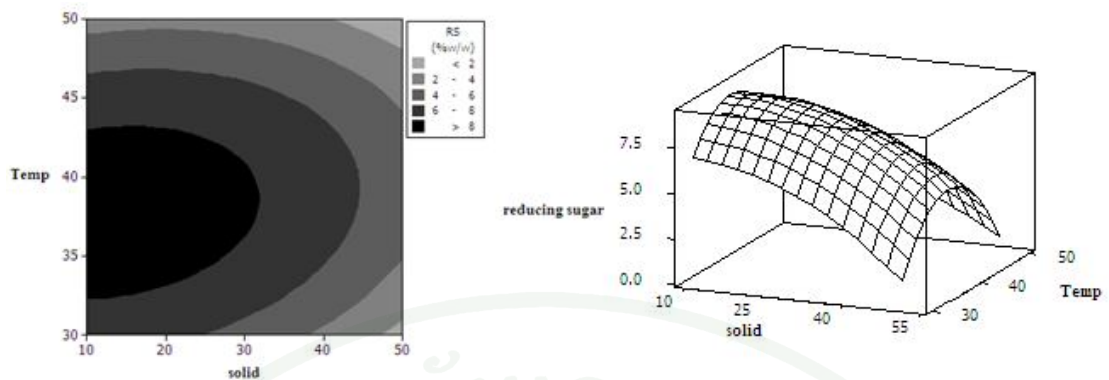
สำหรับพื้นผิวตอบสนองกราฟคอนทัวร์ของปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อกับอุณหภูมิต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยกำหนดระยะเวลาในการหมักที่ระดับกลางของการทดลองเท่ากับ 36 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 31 พบว่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อปริมาณผักตบชวาเพิ่มจาก 10 ถึง 30 กรัมต่อลิตร ส่วนเวลาในการหมักส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มในชั่วโมง 32-42 ของการหมัก



ภาพที่ 29 แสดงอิทธิพลบนพื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์ของอุณหภูมิกับระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวา



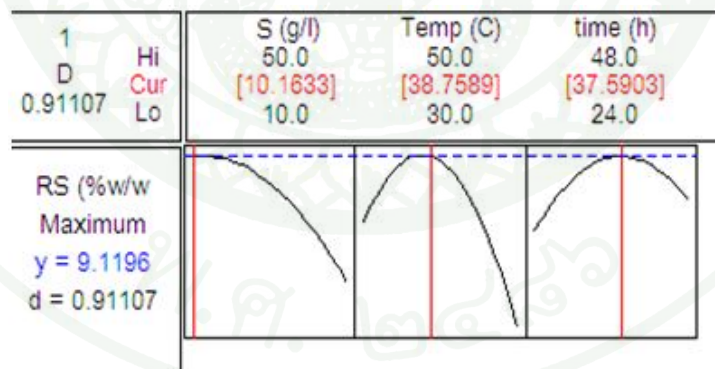
ภาพที่ 30 แสดงอิทธิพลบนพื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์ของปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อกับเวลาในการหมักต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวา



ภาพที่ 31 พื้นผิวตอบสนอง และกราฟคอนทัวร์ แสดงอิทธิพลของปริมาณผักตบชวาในอาหารเลี้ยงเชื้อกับอุณหภูมิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวา

#### 4.4 การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

ในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม MINITAB version 14.0 เป็นการนำเอาเทคนิคที่เรียกว่า Simultaneous Optimization Technique มาใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งจะได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum*

เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 32 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ได้แก่ ใช้ปริมาณผักตบชวา 10.16 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ หมักที่อุณหภูมิ 38.8 และใช้เวลาในการหมัก 37.59 ชั่วโมง จากการใช้สมการที่ 8

ในการทำนายแบบจำลองเมื่อใช้สภาวะดังกล่าวแล้วจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 9.47 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเมื่อทำการทดลองที่สภาวะเดียวกันเพื่อยืนยันผลการทำนาย พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $9.09 \pm 0.63$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมัก โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 4.01 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากค่าสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากโปรแกรมมีความละเอียดมาก แต่ในการทดลองจริงไม่สามารถควบคุมสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวได้ตามค่าที่ทำนาย ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ไม่ควรเกิน 5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับปัจจัยต่างๆ ที่ได้จากการออกแบบการทดลองโดยวิธี Box-Behnken สามารถนำมาใช้เป็นสมการตัวแทนในการพยากรณ์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้

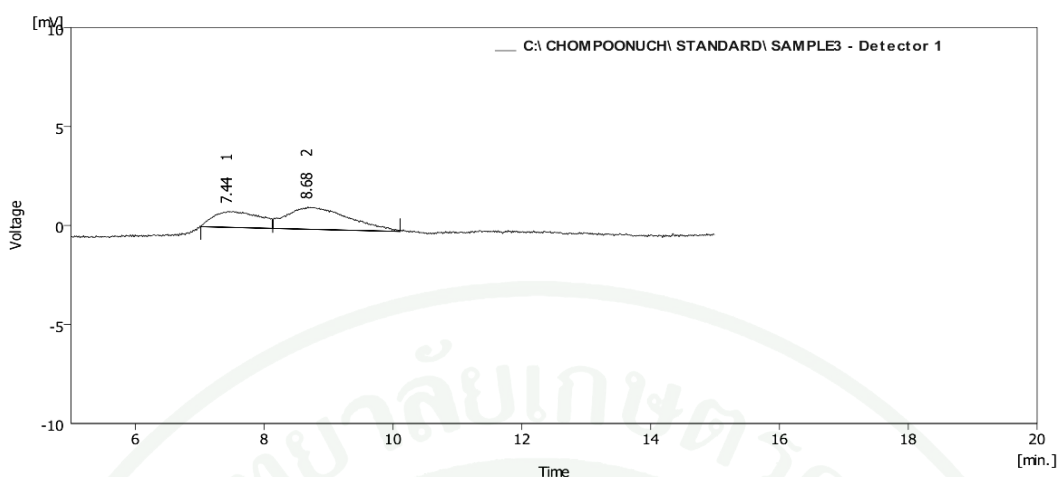
**ตารางที่ 10** เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* จากการทำนายตามสมการแบบจำลองกับการทดลองจริงที่สภาวะเดียวกัน โดยมีปริมาณของผักตบชวา 10.16 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 38.8 องศาเซลเซียส และเวลาในการหมัก 37.59 ชั่วโมง

สภาวะที่ใช้			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมัก)		
S (g/l)	T (°C)	t (h)	ค่าจากสมการ	ค่าจากการทดลอง	ค่าความคลาดเคลื่อน* (%)
10.16	38.8	37.59	9.47	$9.09 \pm 0.63$	4.01

หมายเหตุ: \*ค่าความคลาดเคลื่อนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างค่าจากสมการลดรูป (8) กับค่าจากการทดลอง

#### 4.5 วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของน้ำตาล

เมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาที่สภาวะที่เหมาะสมและน้ำตาลกลูโคสมาทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบว่าจะได้ลักษณะโครมาโตแกรม ดังภาพที่ 33



ภาพที่ 33 โครมาโตแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ที่สภาวะที่เหมาะสม

เมื่อนำตำแหน่งและพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากโครมาโตแกรมดังภาพที่ 33 ทำการเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาล (ภาคผนวก ง) จะทำให้สามารถระบุได้ถึงชนิดและปริมาณน้ำตาลของน้ำตาลเหล่านั้นได้ ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยน้ำตาลที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน ได้แก่ เซลโลบิโอส กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แมนโนส และฟรุคโตส

ตารางที่ 11 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่ได้จากการหมักผักตบชวา

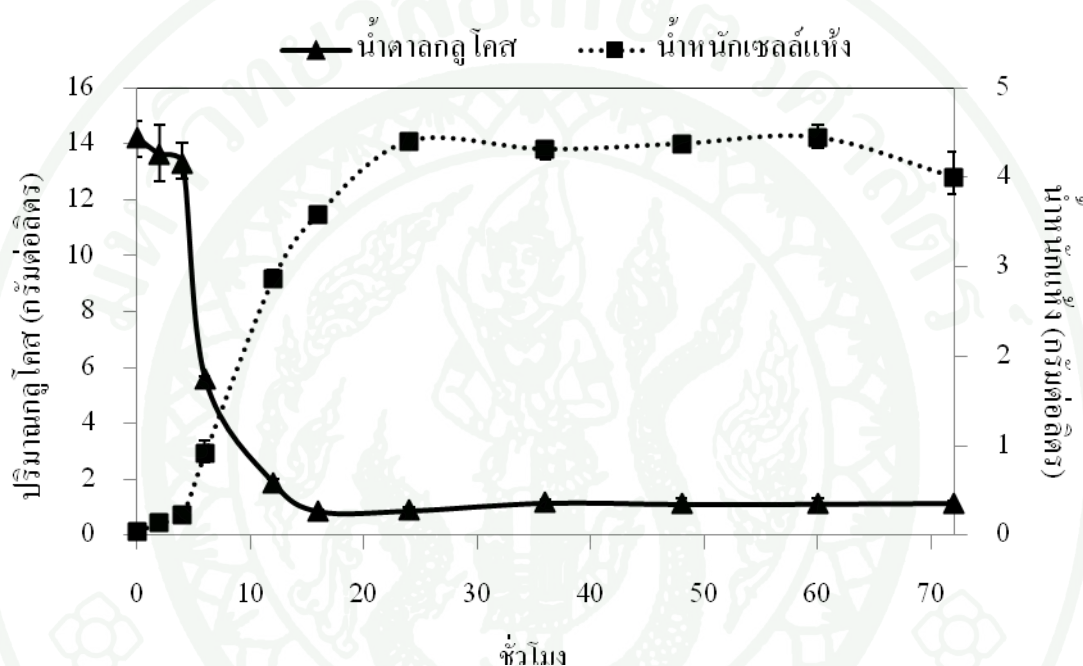
ชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณน้ำตาล (กรัม/ลิตร)
โอลิโกแซ็กคาไรด์	-
เซลโลบิโอส	0.29
กลูโคส	0.42
ไซโลส	-
อะราบิโนส	-
แมนโนส	-
ฟรุคโตส	-

ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่ได้จากการหมักผักตบชวาที่สภาวะที่เหมาะสมแสดงในตารางที่ 11 จากการศึกษาพบว่าชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสนั้นจะประกอบไปด้วย

น้ำตาลในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ น้ำตาลเซลโลบิโอส และน้ำตาลกลูโคส แต่ปริมาณน้ำตาลในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ เนื่องจากไม่สามารถระบุชนิดของน้ำตาลในกลุ่มนี้ได้

## 5. การผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ได้จากการหมักผักตบชวา

### 5.1 การศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*



ภาพที่ 34 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 34 ซึ่งแสดงถึงการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่ายีสต์มีการใช้เวลาในการปรับตัวน้อย อาจเป็นเนื่องมาจากสูตรอาหารที่ใช้และสถานะในขั้นตอนการเตรียมต้นเชื้อเป็นที่เดียวกับที่ใช้ในการศึกษาการเจริญยีสต์จะใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นอัตราการเจริญของยีสต์จะลดลง และเริ่มคงที่ สังกัดได้จากความเข้มข้นน้ำหมักเซลล์แห้ง ที่มีความชันลดลง และเริ่มคงที่ เนื่องจากความเข้มข้นของกลูโคสลดลงจนเกือบหมด (ที่ชั่วโมงที่ 16 มีความเข้มข้นกลูโคส

เหลือเพียง 0.87 กรัมต่อลิตร) ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าชั่วโมงที่ 12-16 เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมของการนำไปใช้เป็นตัวตั้งเชื้อในการผลิต เอทานอลต่อไป เนื่องจากช่วงเวลานั้น ยีสต์ที่เจริญอยู่ในช่วงก่อนเข้าสู่ระยะคงที่ เป็นช่วงที่ยีสต์มีความแข็งแรงและเจริญเกือบเต็มที่ ปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ดี ทำให้ลดระยะเวลาในการปรับตัวของจุลินทรีย์ได้ โดยที่ชั่วโมงที่ 16 มีความเข้มข้นน้ำหมักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.59 กรัมต่อลิตร

## 5.2 ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ผลิตได้จากการหมักผักตบชวา

นำน้ำหมักที่ได้จากการหมักผักตบชวาตามสภาวะดังตารางที่ 10 มาทำการปรับความเข้มข้นโดยการระเหยน้ำออกภายใต้ความดัน 72 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากค่าความหวานเริ่มต้นประมาณ 1 องศาบริกซ์ จนน้ำตาลมีค่าความหวานเพิ่มขึ้นเป็น 15 องศาบริกซ์ ไปทำการหมักกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 โดยใช้ปริมาณตั้งเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ผลิตได้จากผักตบชวากับสารละลายกลูโคสที่ค่าความหวานเดียวกัน พบว่าน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ค่าความหวาน 15 องศาบริกซ์ ซึ่งมีปริมาณกลูโคส 6.3 กรัมต่อลิตร นั้นจะได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 2.54 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับ 0.40 กรัมเอทานอลต่อน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ในส่วนสารละลายกลูโคสนั้น ที่มีค่าความหวานเท่ากับ 15 องศาบริกซ์เช่นกัน จะได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 14.42 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับ 0.23 กรัมเอทานอลต่อน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ในส่วนของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลที่ได้จากการหมักผักตบชวามีปริมาณที่น้อยกว่ากลูโคสนั้น เนื่องจากน้ำตาลที่ได้จากการหมักผักตบชวามีปริมาณกลูโคสที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ค่าความหวานเดียวกัน

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

โครงการวิจัยนี้มีความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา โดยทราบสถานะของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการหมักกับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* แล้วนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป โดยงานวิจัยนี้เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผักตบชวา ลดปัญหาที่เกิดจากผักตบชวาและเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจที่จะช่วยลดปัญหาการขาดแคลนพลังงานที่จะเกิดขึ้นในอนาคต อีกทั้งเป็นวัตถุดิบเสริมในระบบการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเสริมประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของโรงงานต่างๆ ได้อย่างเหมาะสม

**1. ศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพผักตบชวา โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของผักตบชวาก่อนและหลังจากการปรับสภาพ**

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของผักตบชวา พบว่าผักตบชวาประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 35.84 27.11 และ 8.33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จากนั้นทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบของผักตบชวา ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีที่มีความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วนำไปปรับสภาพต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะได้ปริมาณปริมาณของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของปริมาณเซลลูโลสเริ่มต้น และในส่วนของปริมาณเฮมิเซลลูโลสจะลดลงประมาณ 4 เท่าของปริมาณเฮมิเซลลูโลสเริ่มต้น และลิกนินลดลง 30 เท่าของปริมาณลิกนินเริ่มต้น ทำให้สรุปได้ว่าการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริกก่อนทำให้เฮมิเซลลูโลสที่เป็นโพลีเมอร์ขนาดเล็ก มีโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบ เฮมิเซลลูโลสจึงถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายกว่าเซลลูโลส ดังนั้นต้องไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสก่อนโดยใช้ความเข้มข้นของกรดต่ำ จากนั้นใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพต่อเพื่อทำลายโครงสร้างของลิกนิน ทำให้โครงสร้างที่เป็นผลึกของเซลลูโลสลดลง มีผลให้พื้นที่ผิวของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น

## 2. ศึกษาหาสภาวะของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมี ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียกด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยอาศัยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken

จากการนำผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยการหมักกับแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ซึ่งอาศัยการออกแบบการทดลองตามวิธี Box-Behnken พบว่าสภาวะของการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ คือ ปริมาณของผักตบชวา 10.16 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 38.8 องศาเซลเซียส และเวลาในการหมัก 37.59 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ตามสภาวะดังกล่าวสามารถสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับปัจจัยในการทดลองต่างๆ ได้ดังสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์} = -65.3611 + 0.0107S + 2.8972T + 1.0620I - 0.0031S^2 - 0.0392T^2 + 0.014I^2 + 0.0038ST$$

จากสมการข้างต้นเมื่อกำหนดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 9.47 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมัก และเมื่อทำการทดลองที่สภาวะเดียวกันเพื่อยืนยันผลพบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์  $9.09 \pm 0.63$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมัก โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนที่ได้จากการคำนวณและผลการทดลองจริงเท่ากับ 4.01 เปอร์เซ็นต์

## 3. ศึกษาหาชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการหมักผักตบชวากับแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

เมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาตามสภาวะข้างต้นมาทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบว่ามีเซลโลบิโอส 0.29 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 0.42 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจจะมีน้ำตาลชนิดอื่นด้วย แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยยีสต์สายพันธุ์นี้ใช้เพียงแต่น้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอลเท่านั้น

#### 4. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหมักที่ได้จากการหมักผักตบชวา

จากการนำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักผักตบชวา ที่มีค่าความหวานของน้ำตาลรีดิวซ์ 15 องศาบริกซ์ ทำการผลิตเอทานอลโดยหมักกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะได้เอทานอล 2.54 กรัมต่อลิตร

##### ข้อเสนอแนะ

1. ในกระบวนการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยหมักแบคทีเรียกับผักตบชวา ควรเลี้ยงแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ในอาหารที่ใช้ผักตบชวาเป็นแหล่งก่อนที่จะทำการหมักกับผักตบชวาตามวิธี Box-Behnken เพื่อให้แบคทีเรียได้ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่
2. เนื่องจากแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีปริมาณน้อย
3. ในกรณีที่ตัวแปรที่ต้องการศึกษามีจำนวนมากนั้น การออกแบบการทดลองควรมีการคัดกรองปัจจัย (screen) เพื่อจะได้ทราบถึงอิทธิพลของแต่ละปัจจัยว่าอย่างน้อยเพียงใด จะได้เป็นการลดตัวแปรที่ไม่มีอิทธิพลต่อค่าการตอบสนอง (response) ออก

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กองสาธารณสุขและสิ่งแวดล้อม เทศบาลเมืองราชบุรี. 2554. ปัญหาของผักตบชวาในแหล่งน้ำ. แหล่งที่มา: [http://sridonpai.com/news/news\\_detail.php?news\\_id=00312](http://sridonpai.com/news/news_detail.php?news_id=00312), 30 มิถุนายน 2554.

นิรนาม. 2554. องค์ประกอบทางโภชนาการของพืช. แหล่งที่มา: [http://www.natres.psu.ac.th/Department/Plant Science](http://www.natres.psu.ac.th/Department/Plant%20Science), 20 ธันวาคม 2554

ปารเมศ ชูติมา. 2545. การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ประเวทย์ ต้อยเต็มวงศ์, จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร, ปิยรัตน์ บุญแสวง และ ชีรภัทร ศรีนรคุตร. รายงานการวิจัย เรื่อง การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2551.

ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และ พงศ์ชนัน เหลืองไพบุลย์. 2551. การออกแบบและวิเคราะห์การทดลอง. บริษัท สำนักพิมพ์ท็อป จำกัด, กรุงเทพฯ.

พิศมัย ศรีชาเขษ. 2547. ผลของสภาวะการผลิตและกระบวนการให้ความร้อนต่อคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของคาราเมล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2554. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลสเททผักตบชวาโดยหม้อนึ่งความดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล. โครงการปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รวารุณี ครุสง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

วัชรนา หงส์เวียง และ สุภัตรา สิงห์ชนะ. 2546. การผลิตเอทานอลจากขานอ้อยและผักตบชวา. โครงการปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

สาวิตรี ลิ้มทอง. 2540. **ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี**. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abraham, M. and G.A. Kurup. 1996. Bioconversion of tapioca (*Manihot esculenta*) waste and water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)-influence of various physico-chemical factors. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 82 (3): 259-263.

Absoluteastronomy. 2009. **การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส**. Available Source: [www.absoluteastronomy.com/topics/Cellulase](http://www.absoluteastronomy.com/topics/Cellulase), June 25, 2009.

Allcock, E.R. and D.R. Woods. 1981. Carboxymethyl cellulase and cellobiase production by *Clostridium acetobutylicum* in an industrial fermentation medium. **Applied and Environmental Microbiology** 41 (2): 539-541.

Anonymous. 2011. **สูตรโครงสร้างของ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล**. Available Source: <http://hydroxymethylfurfural.info/5-hydroxymethylfurfural>, October 30, 2011.

Anonymous. 2012. **โครงสร้างของกรดแทนนิก**. Available Source: <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/tannic-acid.php>, April 19, 2012.

Anonymous. 2012. **สูตรโครงสร้างของเฟอฟูรอล**. Available Source: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---F/Furfural.htm>, April 19, 2012.

Aswathy, U.S., R.K. Sukumaran, G.L. Devi, K.P. Rajasree, R.R. Singhanian and A. Pandey. 2010. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: An evaluation of enzymatic saccharification strategy. **Bioresource Technology** 101: 925-930.

- Australian Barley Technical Symposium. 2001. การย่อยสลายไชแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อย  
สลายไชแลน. Available Source: <http://www.regional.org.au/au/abts/1999/lee.htm>,  
June 25, 2009.
- Bolenz, S., H. Omran and K. Gierschner. 1990. Treatments of water hyacinth tissue to obtain  
useful products. **Biological Wastes** 33 (4): 263–274.
- Box, G.E.P. and N.R. Draper. 2007. **Response Surface, Mixture and Ridge Analyses**. 2<sup>nd</sup> John  
Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Burton, J., E.V. Oosterhout and R. Ensbey. 2011. ลักษณะของผักตบชวา. Available Source:  
<http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/pests-weeds/weeds/profiles/water-hyacinth>,  
September 16, 2011.
- Chanakya, H.N., S. Borgaonkar, G. Meena and K.S. Jagadish. 1993. Solid-phase biogas  
production with garbage or water hyacinth. **Bioresource Technology** 46: 227–231.
- Carmen, S. 2009. Lignocellulosic residue: biodegradation and bioconversion by fungi. *Advanced  
Biotech* 27: 185-194.
- Colebrook, M. 2011. โครงสร้างของเซลลูโลส. แหล่งที่มา: [http://www.greenspirit.org.uk/resources/  
LifeChemistry.shtml](http://www.greenspirit.org.uk/resources/LifeChemistry.shtml), September 16, 2011.
- DeAngelis, K., M. Allgaier, P. D'haeseleer, J. Fortney, P. Hugenholtz, B. Simmons and T. Hazen.  
2010. โครงสร้างของลิโนเซลลูโลส. Available Source: [http://www.secondgenome.com/  
2010/08/lignocellulose-decomposition](http://www.secondgenome.com/2010/08/lignocellulose-decomposition), August 22, 2010.
- Fan, L.T., M.M. Gharpuray and Y.H. Lee. 1987. **In: Cellulose hydrolysis Biotechnology  
Monograph**. Springer, Berlin: 57.

Ferreira, S.L.C., R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandão, E.G.P. Silva, L.A. Portugal, P.S. Reis, A.S. Souza and W.N.L. Santos. 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta** 597: 179–186.

Fiddler. 2006. **ลักษณะของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae***. Available Source: [http://butabreath.blogspot.com/2006\\_02\\_01\\_archive.html](http://butabreath.blogspot.com/2006_02_01_archive.html), August 30, 2010.

Freeman, W.H. 2002. **โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลมอลโตสและซูโครส**. Available Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer>, August 30, 2010.

Galbe, M. and G. Zacchi. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** 108: 41-65.

Goering, H.K. and P.J. Van. 1970. **Forage Fiber Analysis Agriculture Handbook**. Agricultural Research Services, United States Department of Agriculture.

Harmsen, P., W. Huijgen, L. Bermudez and R. Bakker. 2010. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. Biosynergy. 54 pages.

Isarankura-Na-Ayudhya, C., T. Tantimongcolwat, T. Kongpanpee, P. Prabhate and V. Prachayasittikul. 2007. Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol: Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. **EXCLI Journal** 6: 167-176.

Julien, M.H., M.W. Griffiths and A.D. Wright. 1999. Biological control of water hyacinth: the weevils *Neochetina bruchi* and *N. eichhorniae*: biologies, host ranges, and rearing, releasing and monitoring techniques for biological control of *Eichhornia crassipes*. The Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra

- Karimi, K., S. Kheradmandinia and M.J. Taherzadeh. 2006. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy** 30: 247-253.
- Katima, J.H.Y. 2001. Production of biogas from water hyacinth: effect of substrate concentration, particle size and incubation period. **Tanzania Journal of Science** 27: 107-119.
- Kumar, A., L.K. Singh and S . Ghosh. 2009. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicelluloses acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology** 100: 3293–3297.
- Kurup, S.C., R. Snishamol and P.G. Nagendra. 2005. Cellulase production by native bacteria using water hyacinth as substrate under solid state fermentation. **Journal of Microbiology** 2: 25-29.
- Lee, S.F., C.W. Forsberg and L.N. Gibbins. 1985. Cellulolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology** 50 (2): 220-228.
- Masami, G.O., I.Y. Usui and N. Urano. 2008. Ethanol production from the water hyacinth *Eihhornia crassipes* by yeast isolated from various hydrospheres. **Journal of Microbiology Research** 2: 110-113.
- Mesa, L., E. González, I. Romero, E. Ruiz, C. Cara and E. Castro. 2011. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal** 175: 185-191.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry** 31: 426-429.

- Mishima, D., M. Kuniki, K. Sei, S. Soda, M. Ike and M. Fujita. 2008. Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia Stratiotes* L.). **Bioresource Technology** 99: 2495–2500.
- Monot, F., J.R. Martin, H. Petitdemange and R. Gay. 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. **Applied and Environmental Microbiology** 44 (6): 1318-1324.
- Mukherjee, R. and B. Nandi. 2004. Improvement of in vitro digestibility through biological treatment of water hyacinth biomass by two *Pleurotus* species. **International Biodeterioration and Biodegradation** 53: 7–12.
- Nigam, J.N. 2002. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. **Journal of Biotechnology** 97: 107-116.
- Palqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal. 1990. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology** 74: 25-33.
- Patel, V., M. Desai and D. Madamwar. 1993. Thermochemical pretreatment of water hyacinth for improved biomethanation. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 42 (1): 67-74.
- Poddar, K., L. Mandal and G.C. Banerjee. 1991. Studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) chemical composition of the plant and water from different habitats. **Indian Veterinary Journal** 68 (9): 833-837.

- Qureshi, N. and G.J. Manderson. 1995. Bioconversion of renewable resources into ethanol: An economic evaluation of selected hydrolysis, fermentation, and membrane technologies. *Energy Sources* 17 (2): 241-265.
- Roehr, M. 2001. **The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications**. WILEY-VCH: Weinheim - New York – Chichester – Brisbane – Singapore – Toronto.
- Silverstein, R.A., Y. Chen., R.R. Sharma-Shivappa, M.D. Boyette and J. Osborne. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology* 98: 3000–3011.
- Sornvaraweat, B. and J. Kongkiattikajorn. 2010. Separated hydrolysis and fermentation of water hyacinth leaves for ethanol production. *KKU Research Journal* 15 (9):794-802.
- Taherzadeh, M.J. and K. Karimi. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 9: 1621-1651.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2011. โครงสร้างของลิกนิน. Available Source: <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=24>, 16 September 2011.
- Tellez-Luis, S.J., J.A. Ramirez and M. Vazquez. 2002. Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. *Journal of Food Engineering* 52: 285-291.
- Zamora, A. 2011. โครงสร้างของน้ำตาลโมลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส และโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสและไซแทน. Available Source: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html>, September 16, 2011.





ภาคผนวก ก  
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

## 1. สูตรอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (TYA)

กลูโคส	40.0	กรัมต่อลิตร
ทริปโตน	6.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์	2.0	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมอะซิเตต	3.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.3	กรัมต่อลิตร
ไอออน (II) ซัลเฟต	10.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
วุ้น (ในกรณีที่เป็นอาหารแข็ง)	30.0	กรัมต่อลิตร

## 2. สูตรอาหารเลี้ยงยีสต์ (YM)

กลูโคส	10.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์	3.0	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด	3.0	กรัมต่อลิตร
วุ้น (ในกรณีที่เป็นอาหารแข็ง)	20.0	กรัมต่อลิตร



## ภาคผนวก ข

### การวิเคราะห์หาค่าประกอบทางเคมีของผักตบชวา

ในการวิเคราะห์หาค่าประกอบทางเคมีของผักตบชวานั้น จะมีด้วยกัน 4 ขั้นตอนตามวิธีของ Goering และ Van (1970) ดังต่อไปนี้

#### ขั้นตอนที่ 1 การหาค่า Neutral Detergent Fiber (NDF)

##### 1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 สารละลาย Neutral Detergent Solution (NDS) สามารถเตรียมได้จากการละลาย โซเดียมโบเรต 6.81 กรัม และไดโซเดียมเอทิลลีนไดเอมีนเทอร์เทอร์อะซิเตรต (EDTA) 18.61 กรัม กับน้ำกลั่นพอประมาณในบีกเกอร์ ให้ความร้อนกับส่วนผสม จากนั้นเติมสาร โซเดียมลาวัวร์ซัลเฟต 30 กรัม และ 2-อีทรอกซีเอทานอล 10 มิลลิลิตร ลงไป แล้วทำการละลายให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำการละลายไดโซเดียมฟอสเฟต 4.56 กรัม ในบีกเกอร์อีกใบหนึ่งกับน้ำกลั่นพอประมาณ ให้ความร้อนกับส่วนผสม ละลายจนหมด เอาส่วนผสมของสารละลายจากบีกเกอร์ทั้ง 2 ผสมเข้าด้วยกัน แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าพีเอช ให้อยู่ระหว่าง 6.9-7.1

##### 1.2 ออกทานอล

##### 1.3 โซเดียมซัลไฟต์

##### 1.4 อะซิโตน

##### 2. วิธีการหาค่า Neutral Detergent Fiber (NDF)

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แห้งมาบดแล้วกรองผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 1 มิลลิเมตร ทำการชั่งตัวอย่างในถ้วยแก้วให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม เติมสารละลายของ NDS 100 มิลลิลิตร ลงในถ้วยแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมโซเดียมซัลไฟต์ 0.5 กรัม และออกทานอล 3-4 หยดลงในถ้วยแก้ว ต้มจนเดือดเป็นเวลา 60 นาที กรองตัวอย่างที่ได้ แล้วล้างด้วยน้ำเดือด 3 ครั้ง และล้างด้วยอะซิโตน

โตนอีก 2 ครั้ง นำมาอบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ควบคุมความชื้น ทำการชั่งน้ำหนักกากของตัวอย่างที่ได้พร้อมด้วยแก้ว นำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ NDF ดังสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\% \text{ NDF} = \frac{\text{น้ำหนักของถ้วยแก้ว} + \text{น้ำหนักของกาก} - \text{น้ำหนักของถ้วยแก้ว}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

## ขั้นตอนที่ 2 การหาค่า Acid Detergent Fiber (ADF)

### 1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 สารละลาย Acid Detergent Solution (ADS) สามารถเตรียมได้จากการละลายซิติล ไตรเมทิลแอมโมเนียมโบมาด์ 20 กรัม ลงในกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 1 N คิดเป็น 49.40 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน

### 1.2 ออกทานอล

### 1.3 อะซิโตน

### 2. วิธีการหาค่า Acid Detergent Fiber (ADF)

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แห้งมาบดแล้วกรองผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 1 มิลลิเมตร ทำการชั่งตัวอย่างในถ้วยแก้วให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม เติมสารละลายของ ADS 100 มิลลิลิตรและออกทานอล 3-4 หยดลงในถ้วยแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นต้มจนเดือดเป็นเวลา 60 นาที กรองตัวอย่างที่ได้ แล้วล้างด้วยน้ำเดือด 3 ครั้ง และล้างด้วยอะซิโตนอีก 2 ครั้ง นำมาอบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ควบคุมความชื้น ชั่งน้ำหนักกากของตัวอย่างที่ได้พร้อมด้วยแก้ว นำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ ADF ดังสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\% \text{ ADF} = \frac{\text{น้ำหนักของถ้วยแก้ว} + \text{น้ำหนักของกาก} - \text{น้ำหนักของถ้วยแก้ว}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

### ขั้นตอนที่ 3 การหาค่า Acid Detergent Lignin (ADL)

#### 1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

##### 1.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์

#### 2. วิธีวิเคราะห์ Acid Detergent Lignin (ADL)

นำกากตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอน ADF มาทำการเติมด้วย 25 มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริกเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีการคนทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองแล้วล้างด้วยน้ำร้อน 3 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ควบคุมความชื้น ชั่งน้ำหนักกากที่เหลือพร้อมถ้วยแก้ว นำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ ADL ดังสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\% \text{ ADL} = \frac{(\text{น้ำหนักของถ้วยแก้ว} + \text{น้ำหนักของกาก}) - \text{น้ำหนักของถ้วยแก้ว} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

### ขั้นตอนที่ 4 การหาปริมาณเถ้า (Ash)

นำกากตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอน ADL มาทำการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ควบคุมความชื้น ทำการชั่งน้ำหนักกากที่เหลือพร้อมถ้วยแก้ว นำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์เถ้าดังสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\% \text{ Ash} = \frac{(\text{น้ำหนักของถ้วยแก้ว} + \text{น้ำหนักของกาก}) - \text{น้ำหนักของถ้วยแก้ว} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$



ภาคผนวก ค  
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส

## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) นั้นเป็นการวิเคราะห์ตามวิธีของ Miller (1959)

#### 1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 สารละลาย 3,5-ไดไนโตรซาลิไซเลต (DNS) 1.0 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายต่างที่ละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาทาลิตลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 กรัมต่อลิตร ดังตารางผนวกที่ ค1

#### 2. ขั้นตอนหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส

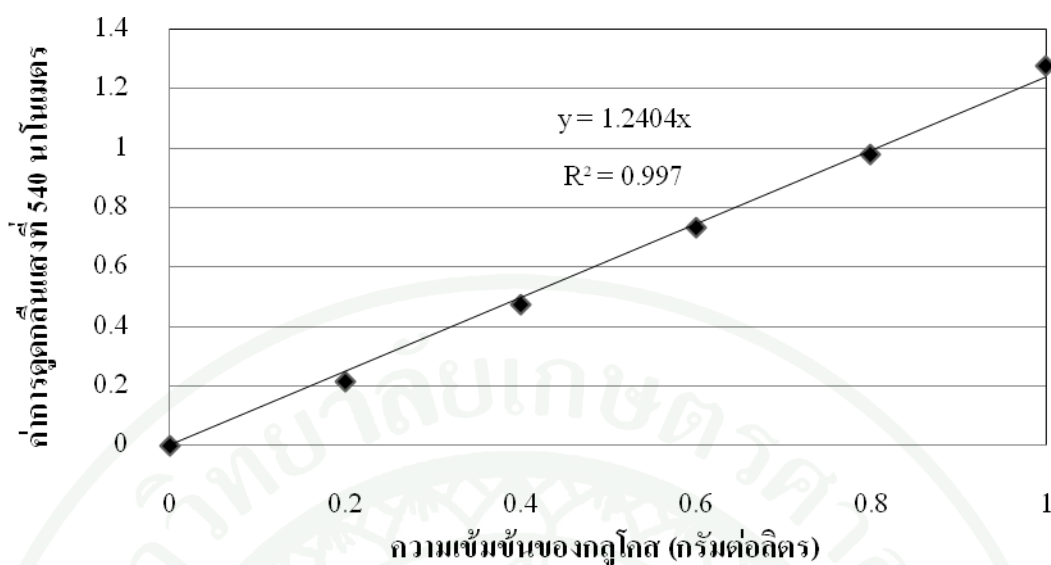
นำสารละลายตัวอย่างที่จะหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ทำการเติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นโดยทันทีที่อ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางผนวกที่ ค2 และนำไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น ดังภาพผนวกที่ ค1

**ตารางผนวกที่ ค1** การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิลิตร)	
	น้ำกลั่น	สารละลายกลูโคส (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.0	1.0	0.0
0.2	0.8	0.2
0.4	0.6	0.4
0.6	0.4	0.6
0.8	0.2	0.8
1.0	0.0	1.0

**ตารางผนวกที่ ค2** ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
0.0	0
0.2	0.213
0.4	0.473
0.6	0.732
0.8	0.978
1.0	1.275



ภาพผนวกที่ ๑1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นกลูโคสในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส

### 3. วิธีการคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

คำนวณหาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร} \times (\text{อัตราการใช้จาง})}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)} \times 100}{\text{น้ำหนักวัสดุหมัก (กรัม)}}$$



**ภาคผนวก**  
**การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี HPLC**

## ภาคผนวก ง

### การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี HPLC

#### 1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 สารละลายน้ำตาลมาตรฐานของเซลโลบิโอส กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และ แมนโนส ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

#### 2. ขั้นตอนหาชนิด และปริมาณน้ำตาลรีดิซซ์โดย HPLC

นำสารละลายตัวอย่างที่จะหาชนิดและปริมาณน้ำตาล และสารละลายน้ำตาลมาตรฐานของเซลโลบิโอส กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และ แมนโนส ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะ (HPLC) โดยนำสารละลายน้ำตาลที่ได้ไปกรองผ่าน syring filter (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร) จากนั้นนำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ไปฉีดผ่านคอลัมน์ Rezex RPM monosaccharide 00H-0135-K0 (300×7.8 มิลลิเมตร) เตินระบบโดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำการตรวจวัดปริมาณสารที่ผ่านออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบอาร์ไอ (RI detector) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จดบันทึกตำแหน่งของเวลาและพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม (ตารางผนวกที่ ง1 และภาพผนวกที่ ง1-5) นำไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้น ดังภาพผนวกที่ ง6-10

ตารางผนวกที่ ๑1 ตำแหน่งเวลา และพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรมของสารละลายเซลโลบิโอส กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แมนโนส และฟรุคโตสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ชนิดของน้ำตาล					
	เซลโลบิโอส	กลูโคส	ไซโลส	อะราบิโนส	แมนโนส	ฟรุคโตส
	ตำแหน่งเวลา (นาที)					
	6.73	7.96	8.59	9.77	10.11	10.52
พื้นที่ใต้กราฟ (mV)						
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.5	78.76	81.285	69.879	46.656	135.607	49.376
1.0	174.55	178.051	156.162	143.734	320.194	144.366

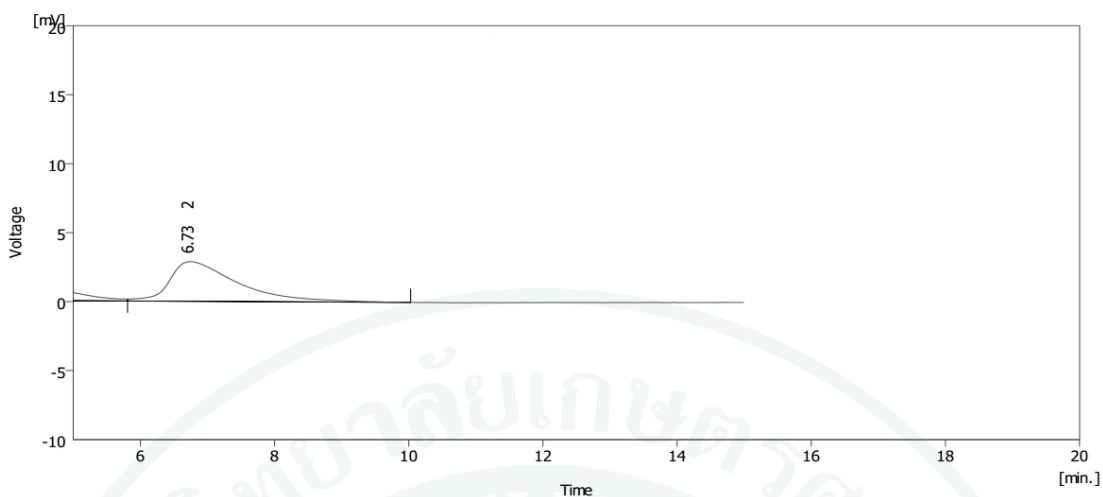
### 3. วิธีการคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

คำนวณหาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสูตร

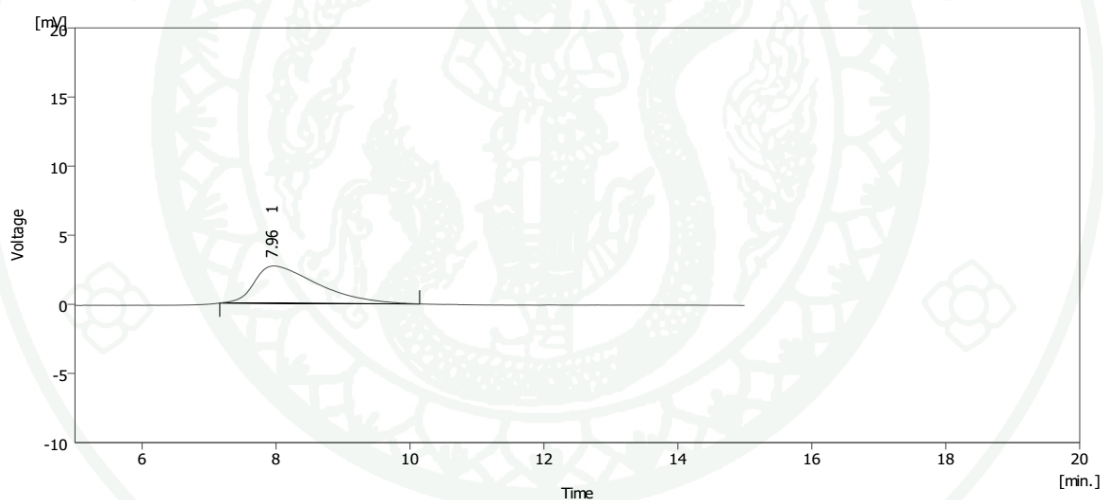
$$\text{ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรม}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากสูตร

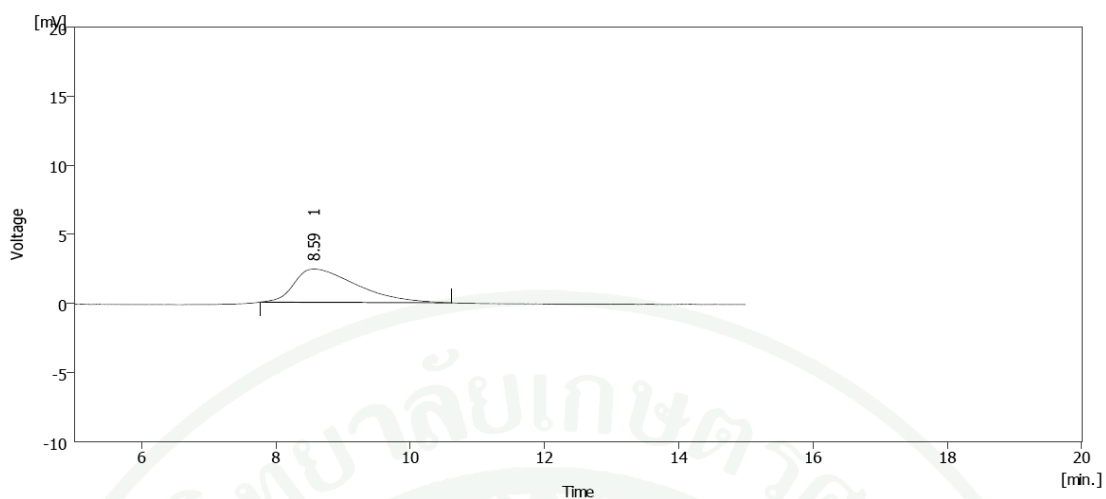
$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)} \times 100}{\text{น้ำหนักวัสดุหมัก (กรัม)}}$$



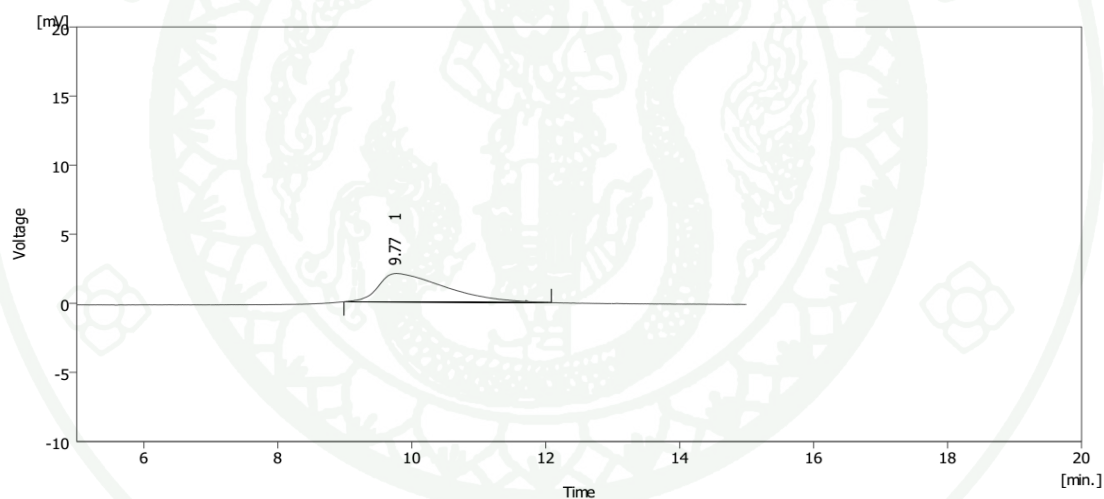
ภาพผนวกที่ ๑1 โครมาโตแกรมของสารละลายเซลโลบิโอสมมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง



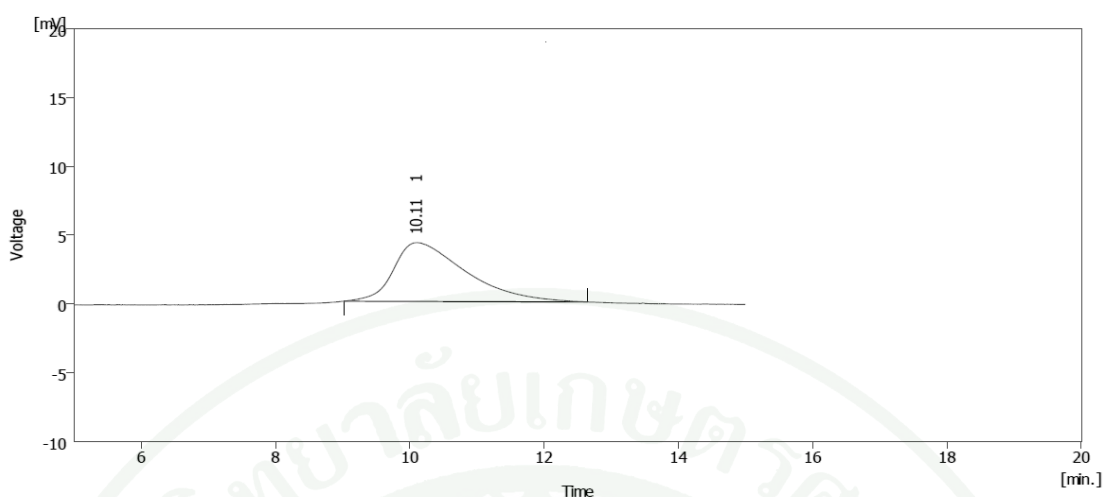
ภาพผนวกที่ ๑2 โครมาโตแกรมของสารละลายกลูโคสมมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง



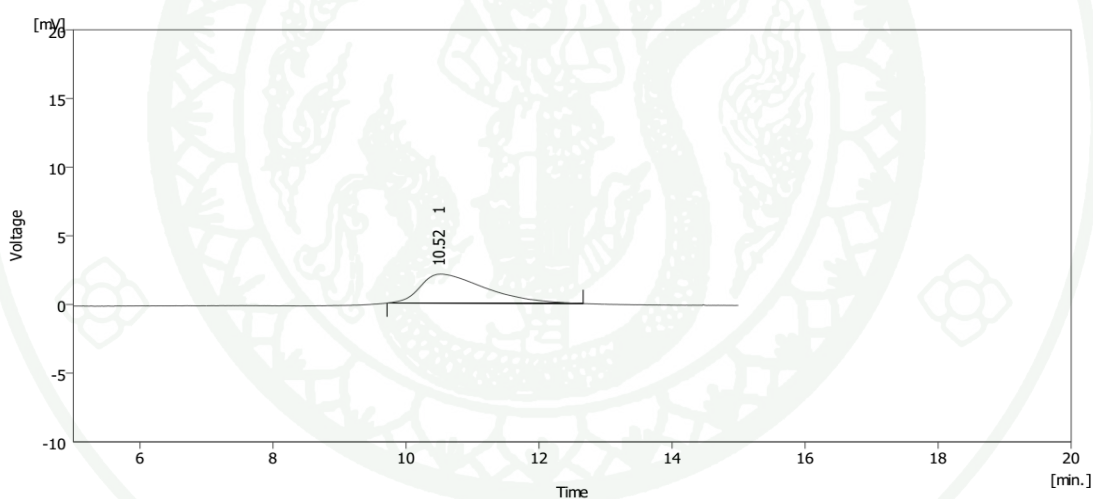
**ภาพผนวกที่ 3** โครมาโตแกรมของสารละลายไซโลสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร  
ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง



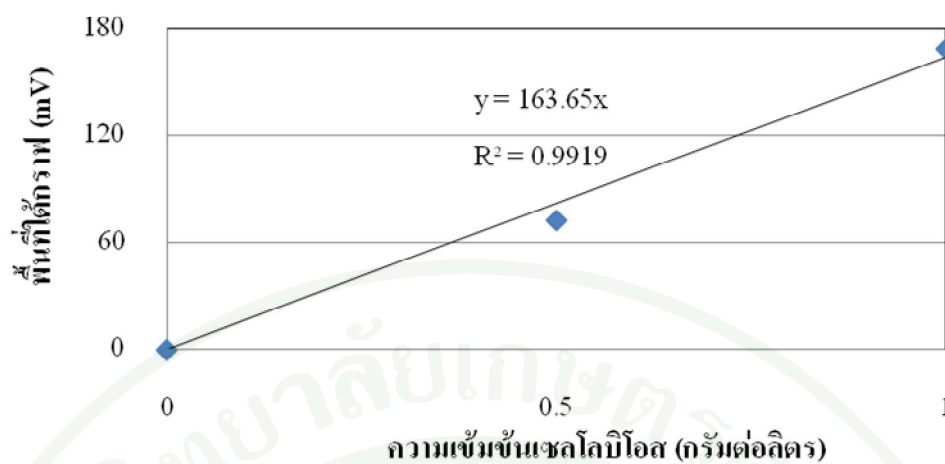
**ภาพผนวกที่ 4** โครมาโตแกรมของสารละลายอะราบิโนสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร  
ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง



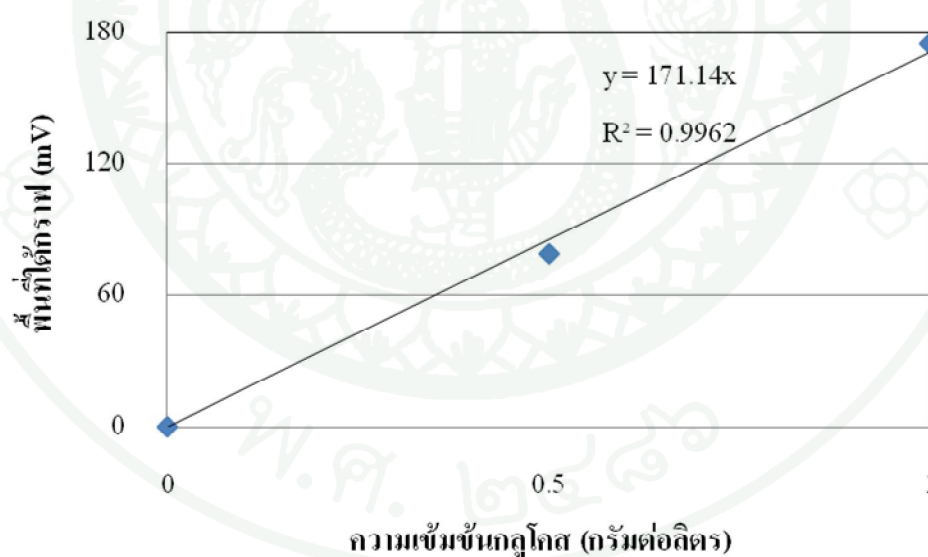
ภาพผนวกที่ 5 โครมาโตแกรมของสารละลายแมนโนสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร  
ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง



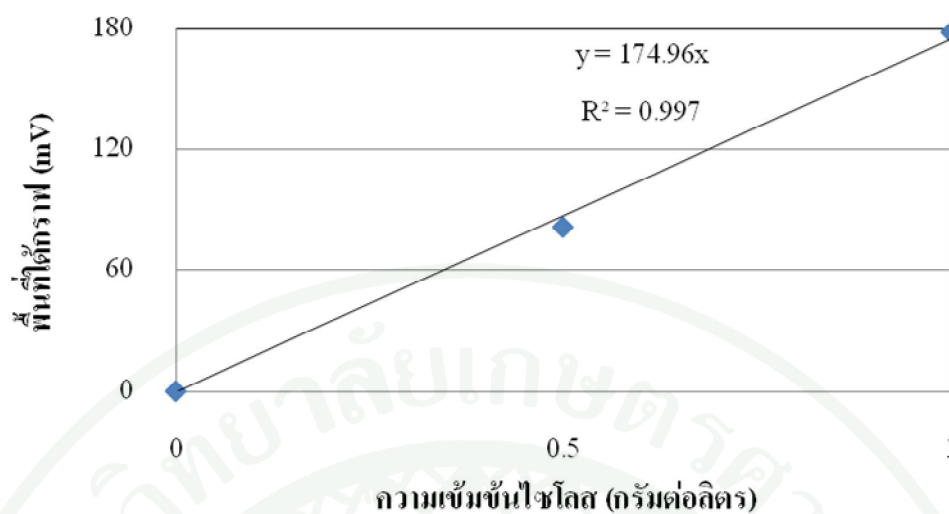
ภาพผนวกที่ 6 โครมาโตแกรมของสารละลายฟรุกโตสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร  
ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง



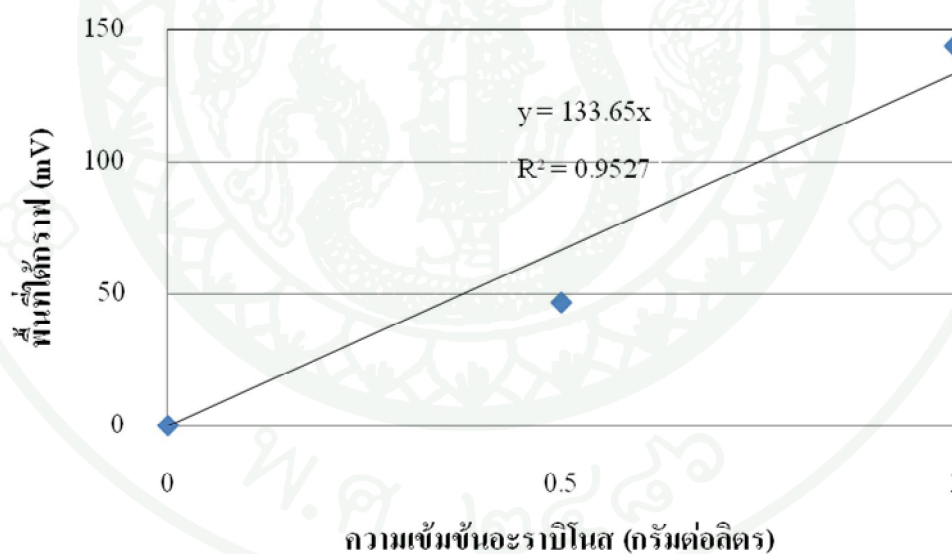
ภาพผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ไดกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของเซลโลบิโอส



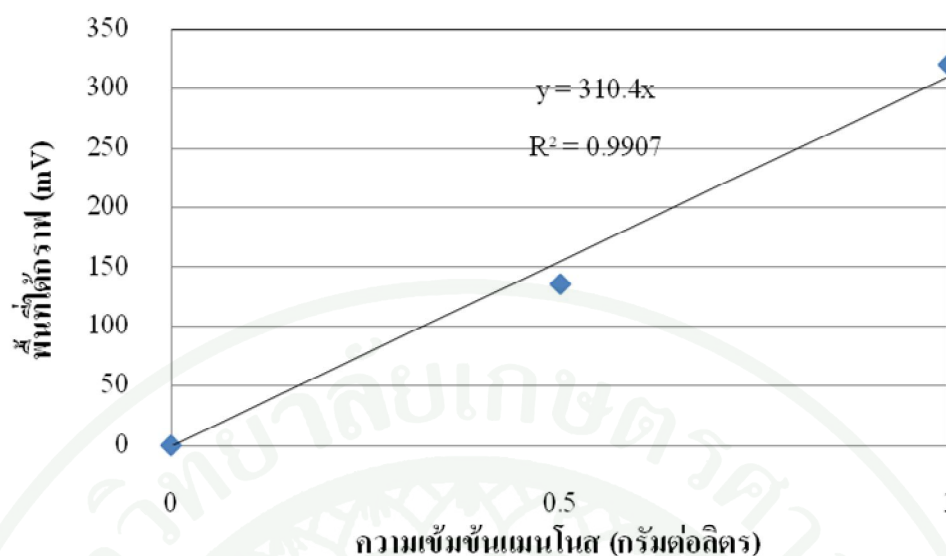
ภาพผนวกที่ 8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ไดกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของกลูโคส



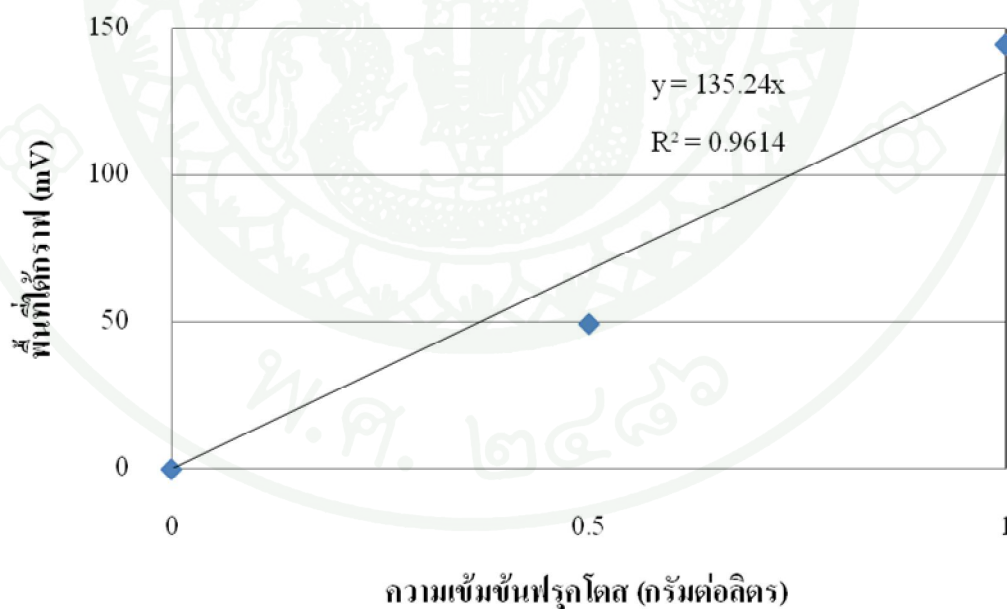
ภาพผนวกที่ 9 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ไดกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของไซโลส



ภาพผนวกที่ 10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ไดกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของอะราบินอส



ภาพผนวกที่ 11 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของแมนโนส



ภาพผนวกที่ 12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงกับความเข้มข้นของฟรุคโตส



## ภาคผนวก จ

## การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยวิธี GC

## 1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

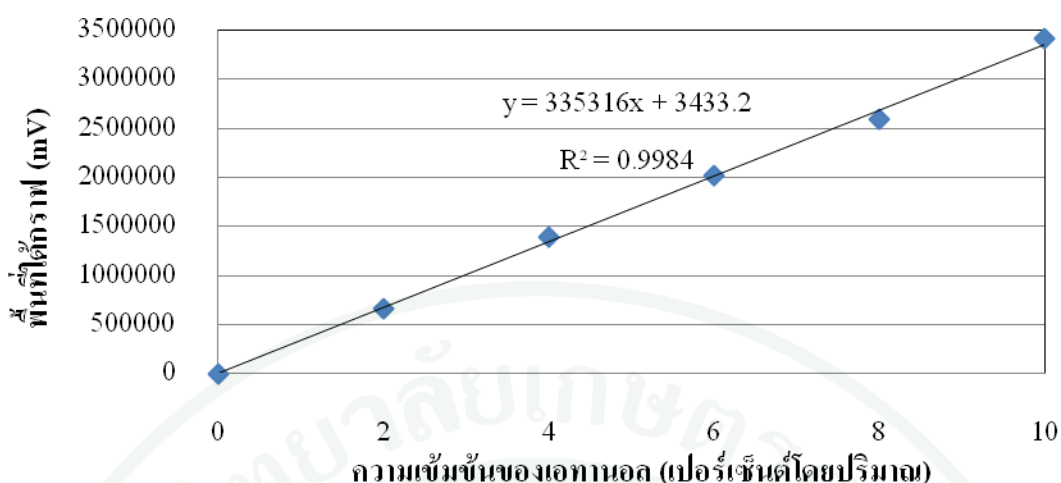
1.1 สารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

## 2. ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยวิธี GC

วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบก๊าซ (GC) โดยนำสารละลายเอทานอลที่ได้ และสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไปกรองผ่าน syring filter (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร) จากนั้นนำตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ไปฉีดผ่านคอลัมน์ OV-1 80/100 เคนระบบโดยใช้ฮีเลียม (helium) เป็นก๊าซตัวพา (carrier gas) ทำการตรวจวัดปริมาณสารที่ผ่านออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบแฟลไมด์ (FID detector) นำพื้นที่ใต้กราฟจาก โครมาโตแกรมที่ได้ (ตารางผนวกที่ จ1) ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอล (ภาพผนวกที่ จ1) เพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

ตารางผนวกที่ จ1 พื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีก๊าซ (GC)

ความเข้มข้นเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	พื้นที่ใต้กราฟ (mV)
0.0	0
2.0	663891
4.0	1392550
6.0	2016014
8.0	2598904
10.0	3408726



ภาพผนวกที่ จ1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีก๊าซ (GC) กับความเข้มข้นของเอทานอลมาตรฐาน

### 3. วิธีการคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

คำนวณหาความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรม} \times (\text{อัตราการใช้จาง})}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

คำนวณปริมาณเอทานอลจากเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (% v/v) เป็นน้ำหนักต่อปริมาตร (g/l)

สมมติปริมาณเอทานอลที่วัดได้เท่ากับ X% (โดยปริมาตร) นั่นคือ

สารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณเอทานอล X มิลลิลิตร

ถ้าสารตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณเอทานอลเท่ากับ  $\frac{X \times 1000}{100}$

$$= X \times 10 \text{ มิลลิลิตร/ลิตร}$$

จากความถ่วงจำเพาะของเอทานอลเท่ากับ 0.793 กรัม/มิลลิลิตร

เพราะฉะนั้น ปริมาณเอทานอล =  $X \times 10 \text{ มิลลิลิตร/ลิตร} \times 0.793 \text{ กรัม/มิลลิลิตร}$



## ภาคผนวก จ

## ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ จ1 องค์ประกอบของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมี

ผักตบชวาที่ ไม่ผ่านการ ปรับสภาพ	ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เชื้อใย (เปอร์เซ็นต์)				องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
	NDF	ADF	ADL	Ash	เซลลูโลส	เฮมิ เซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
ครั้งที่ 1	71.62	45.31	8.34	0.78	36.97	26.31	7.56	0.78
ครั้งที่ 2	72.16	43.65	8.84	0.61	34.81	28.51	8.23	0.61
ครั้งที่ 3	71.9	45.39	9.65	0.45	35.74	26.51	9.20	0.45
ค่าเฉลี่ย	71.89	44.78	8.94	1.10	35.84	27.11	8.33	0.61
SD	0.27	0.98	0.66	0.17	1.08	1.21	0.82	0.17

วิธีการคำนวณหาค่าเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน

1. การหาค่าเฮมิเซลลูโลส

$$\text{เฮมิเซลลูโลส} = \% \text{NDF} - \% \text{ADF} = 71.62 - 45.31 = 26.31 \text{ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง}$$

2. การหาค่าเซลลูโลส

$$\text{เซลลูโลส} = \% \text{ADF} - \% \text{ADL} = 45.31 - 8.34 = 36.97 \text{ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง}$$

3. การหาค่าลิกนิน

$$\text{ลิกนิน} = \% \text{ADL} - \% \text{Ash} = 8.34 - 0.78 = 7.56 \text{ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง}$$

ตารางผนวกที่ ๑๒ องค์ประกอบของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ความเข้มข้น H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)		ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เยื่อใย (เปอร์เซ็นต์)				องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
		NDF	ADF	ADL	Ash	เซลลูโลส	เฮมิ เซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
0.5	ครั้งที่ 1	64.35	59.35	8.72	0.22	50.63	5.00	8.50	0.22
	ครั้งที่ 2	66.96	60.00	6.96	0.13	53.04	6.96	6.83	0.13
	ครั้งที่ 3	65.95	57.39	8.62	0.18	48.77	8.56	8.44	0.18
	ค่าเฉลี่ย	65.74	58.91	8.10	0.05	50.81	6.84	7.92	0.05
	SD	1.30	1.36	0.99	0.08	2.14	1.78	0.95	0.08
1.0	ครั้งที่ 1	74.24	71.99	10.08	0.42	61.91	2.25	9.66	0.42
	ครั้งที่ 2	73.83	70.42	9.11	0.41	61.31	3.41	8.70	0.41
	ครั้งที่ 3	73.05	71.21	11.83	0.38	59.38	1.84	11.45	0.38
	ค่าเฉลี่ย	73.71	71.21	10.34	0.39	60.87	2.50	9.94	0.39
	SD	0.60	0.78	1.38	0.04	1.32	0.81	1.40	0.04
3.0	ครั้งที่ 1	78.50	78.14	14.33	0.71	63.81	0.36	13.62	0.71
	ครั้งที่ 2	76.75	74.84	12.85	0.63	61.99	1.91	12.22	0.63
	ครั้งที่ 3	76.58	75.61	12.00	0.48	63.61	0.97	11.52	0.48
	ค่าเฉลี่ย	77.27	76.20	13.06	0.61	63.14	1.08	12.45	0.61
	SD	1.06	1.73	1.17	0.12	1.00	0.78	1.07	0.12

**ตารางผนวกที่ ๓3** องค์ประกอบของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร แล้วตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

NaOH (%)		ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เยื่อใย (เปอร์เซ็นต์)				องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
		NDF	ADF	ADL	Ash	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
1	ครั้งที่ 1	84.07	81.41	2.96	0.15	78.45	2.66	2.81	0.15
	ครั้งที่ 2	85.35	79.99	3.56	0.09	76.43	5.36	3.47	0.09
	ครั้งที่ 3	84.45	81.47	3.26	0.12	78.21	2.98	3.14	0.12
	ค่าเฉลี่ย	84.63	80.95	3.26	0.12	77.69	3.68	3.14	0.12
	SD	0.66	0.83	0.30	0.03	1.10	1.48	0.33	0.03
3	ครั้งที่ 1	85.14	82.30	1.06	0.11	81.24	2.84	0.95	0.11
	ครั้งที่ 2	84.02	79.71	1.52	0.19	78.19	4.31	1.33	0.19
	ครั้งที่ 3	83.61	81.45	0.99	0.02	80.46	2.16	0.97	0.02
	ค่าเฉลี่ย	84.25	81.15	1.19	0.11	79.96	3.1	1.08	0.11
	SD	0.79	1.32	0.29	0.09	1.58	1.10	0.21	0.09
5	ครั้งที่ 1	83.04	81.09	0.86	0.08	80.23	1.95	0.78	0.08
	ครั้งที่ 2	82.93	81.12	1.22	0.10	79.90	1.81	1.12	0.10
	ครั้งที่ 3	83.18	81.70	1.60	0.08	80.10	1.48	1.52	0.08
	ค่าเฉลี่ย	83.05	81.30	1.23	0.09	80.07	1.75	1.14	0.09
	SD	0.13	0.34	0.37	0.01	0.17	0.24	0.37	0.01
10	ครั้งที่ 1	86.31	87.93	0.84	0.09	80.23	1.95	0.78	0.09
	ครั้งที่ 2	86.70	86.55	1.35	0.03	79.90	1.81	1.12	0.03
	ครั้งที่ 3	88.65	85.97	1.00	0.04	80.10	1.48	1.52	0.04
	ค่าเฉลี่ย	87.22	86.37	1.06	0.05	80.07	1.75	1.14	0.05
	SD	1.25	1.01	0.26	0.03	0.17	0.24	0.37	0.03

## ตารางผนวกที่ ๓ (ต่อ)

NaOH (%)	ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เยื่อใย (เปอร์เซ็นต์)				องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)				
	NDF	ADF	ADL	Ash	เซลลูโลส	เฮมิ เซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	
15	ครั้งที่ 1	86.11	86.94	1.16	0.01	85.78	0.00	1.15	0.01
	ครั้งที่ 2	87.99	86.15	0.92	0.04	85.23	1.84	0.88	0.04
	ครั้งที่ 3	87.05	86.55	0.61	0.03	85.94	0.50	0.58	0.03
	ค่าเฉลี่ย	87.05	86.54	0.90	0.03	85.65	0.78	0.87	0.03
	SD	0.94	0.39	0.27	0.01	0.37	0.95	0.29	0.01
20	ครั้งที่ 1	86.35	86.55	0.63	0.00	85.92	0.00	0.63	0.00
	ครั้งที่ 2	85.48	86.10	1.09	0.00	85.01	0.00	1.09	0.00
	ครั้งที่ 3	88.37	86.48	0.22	0.01	86.26	1.89	0.21	0.01
	ค่าเฉลี่ย	86.73	86.38	0.64	0.00	85.73	0.63	0.64	0.00
	SD	1.48	0.24	0.44	0.01	0.65	1.09	0.44	0.01

**ตารางผนวกที่ ๓4** องค์ประกอบของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 1 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟิวริก และตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ความเข้มข้น NaOH (%)		ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เยื่อใย (เปอร์เซ็นต์)				องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
		NDF	ADF	ADL	Ash	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
1	ครั้งที่ 1	83.42	84.08	7.16	0.16	76.92	0.00	7.00	0.16
	ครั้งที่ 2	85.64	82.73	6.65	0.26	76.08	2.91	6.39	0.26
	ครั้งที่ 3	85.05	84.50	5.92	0.20	78.58	0.55	5.72	0.20
	ค่าเฉลี่ย	84.70	83.77	6.58	0.23	77.19	0.93	6.35	0.23
	SD	1.15	0.93	0.62	0.07	1.27	1.82	0.64	0.07
3	ครั้งที่ 1	84.45	85.25	6.62	0.27	78.63	0.0	6.35	0.27
	ครั้งที่ 2	86.98	85.97	5.30	0.19	80.67	1.01	5.11	0.19
	ครั้งที่ 3	85.94	84.94	5.76	0.17	79.18	1.00	5.59	0.17
	ค่าเฉลี่ย	85.79	85.39	5.89	0.21	79.5	0.40	5.68	0.21
	SD	1.27	0.53	0.67	0.05	1.06	0.58	0.63	0.05
5	ครั้งที่ 1	85.77	84.92	3.55	0.19	81.37	0.85	3.36	0.19
	ครั้งที่ 2	84.80	84.78	3.68	0.11	81.1	0.02	3.57	0.11
	ครั้งที่ 3	83.23	83.63	2.74	0.12	80.89	0	2.62	0.12
	ค่าเฉลี่ย	84.60	84.44	3.32	0.14	81.12	0.16	3.18	0.14
	SD	1.28	0.71	0.51	0.05	0.24	0.49	0.50	0.05

ตารางผนวกที่ ๓5 องค์ประกอบของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 3 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟิวริก และตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ความเข้มข้น NaOH (%)		ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เยื่อใย (เปอร์เซ็นต์)				องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
		NDF	ADF	ADL	Ash	เซลลูโลส	เฮมิ เซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
1	ครั้งที่ 1	87.12	88.94	8.60	0.51	80.34	0.00	8.09	0.51
	ครั้งที่ 2	89.83	88.15	11.41	0.55	76.74	1.68	10.86	0.55
	ครั้งที่ 3	87.36	91.11	9.40	0.38	81.71	0.00	9.02	0.38
	ค่าเฉลี่ย	88.10	89.40	6.84	0.48	79.60	0.00	9.32	0.48
	SD	1.50	0.89	1.53	0.09	2.57	0.97	1.41	0.09
3	ครั้งที่ 1	84.57	87.72	7.24	0.42	80.48	0.00	6.82	0.42
	ครั้งที่ 2	83.87	85.42	8.24	0.22	77.18	0.00	8.02	0.22
	ครั้งที่ 3	84.02	88.60	5.87	0.42	82.73	0.00	5.45	0.42
	ค่าเฉลี่ย	84.15	87.25	7.12	0.35	80.13	0.00	6.76	0.35
	SD	0.37	1.64	1.19	0.12	2.79	0.00	1.29	0.12
5	ครั้งที่ 1	84.98	84.66	4.40	0.17	80.26	0.32	4.23	0.17
	ครั้งที่ 2	82.56	84.32	3.63	0.06	80.69	0.00	3.57	0.06
	ครั้งที่ 3	84.13	88.77	4.01	0.19	84.76	0.00	3.82	0.19
	ค่าเฉลี่ย	83.89	85.92	4.10	0.14	81.90	0.00	3.87	0.14
	SD	1.23	2.48	0.27	0.07	2.48	0.18	0.33	0.07

ตารางผนวกที่ ๑๖ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ภายใต้กระบวนการหมักแบบเปียก ตามการออกแบบการทดลองของ Box-Behnken

การทดลองที่	ปัจจัยการทดลอง			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (% w/w)			ค่าเฉลี่ย	SD
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1	-1	-1	0	7.14	6.77	7.01	6.97	0.18
2	1	-1	0	1.64	1.60	1.46	1.57	0.10
3	-1	1	0	2.66	3.14	2.78	2.86	0.25
4	1	1	0	0.48	0.46	0.51	0.48	0.02
5	-1	0	-1	6.89	6.61	6.73	6.75	0.14
6	1	0	-1	3.60	3.51	3.53	3.55	0.05
7	-1	0	1	7.46	7.18	6.97	7.20	0.24
8	1	0	1	1.96	2.01	1.97	1.98	0.03
9	0	-1	-1	2.89	2.80	2.86	2.85	0.05
10	0	1	-1	0.77	0.87	1.05	0.90	0.14
11	0	-1	1	3.39	3.39	3.55	3.44	0.09
12	0	1	1	0.47	0.50	3.90	1.62	1.97
13	0	0	0	8.41	8.02	8.10	8.18	0.21
14	0	0	0	8.22	8.06	7.89	8.06	0.17
15	0	0	0	8.16	8.05	8.26	8.16	0.11

ตารางผนวกที่ ๗ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ที่สภาวะที่ศึกษา

วัสดุหมัก		ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 นาโนเมตร	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
ผักตบชวา	ครั้งที่ 1	0.245	0.99	9.72
	ครั้งที่ 2	0.213	0.86	8.45
	ครั้งที่ 3	0.229	0.92	9.09
	ค่าเฉลี่ย	-	0.92	9.09
	SD	-	0.64	0.63

ตารางผนวกที่ ๘ พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมและปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์แต่ละชนิดที่ได้จากการหมักหมักผักตบชวาด้วยแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ที่สภาวะที่ศึกษา

	ชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
พื้นที่ใต้กราฟ (mV)	เซลโลบิโอส	56.40	40.26	51.523
	กลูโคส	74.98	75.02	78.20
ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	เซลโลบิโอส	0.33	0.24	0.30
	กลูโคส	0.43	0.43	0.45

**ตารางผนวกที่ ๙** ความเข้มข้นเซลล์แห้งที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงการเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TYA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.2380	0.2300	0.1750	0.2143	0.03
2	0.1860	0.3920	0.2840	0.2873	0.10
4	0.2570	0.2870	0.2500	0.2647	0.02
6	0.7100	0.3720	0.3270	0.4697	0.21
12	0.4190	0.6240	0.5220	0.5217	0.10
16	0.7910	1.0260	1.3440	1.0537	0.28
24	1.8180	2.2520	1.8510	1.9737	0.24
36	2.0610	2.4500	2.2300	2.2470	0.20
48	1.8460	1.7380	2.4330	2.0057	0.37
60	2.0540	2.0500	1.7870	1.9637	0.15
72	1.8810	1.5660	1.5380	1.6617	0.19

**ตารางผนวกที่ ๑๐** ความเข้มข้นกลูโคสที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงการใช้กลูโคสในการเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TYA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	42.16	42.40	41.85	42.14	0.28
2	40.05	41.38	42.40	41.27	1.18
4	41.61	39.97	40.67	40.75	0.83
6	38.64	40.36	40.28	39.76	0.97
8	37.07	37.85	38.56	37.83	0.74

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
12	26.96	31.74	31.35	30.02	2.65
16	6.11	6.46	6.96	6.51	0.43
20	3.97	3.82	3.81	3.87	0.09
24	3.31	3.57	3.98	3.62	0.34
30	2.55	2.73	3.10	2.80	0.28
36	1.68	1.68	1.72	1.69	0.03

ตารางผนวกที่ 11 ความเข้มข้นเซลล์แห้งที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.0300	0.0500	0.0400	0.0400	0.01
2	0.1300	0.1300	0.1600	0.1400	0.02
4	0.2300	0.2100	0.2500	0.2300	0.02
6	0.8100	0.8700	1.0600	0.9133	0.13
12	2.9700	2.8300	2.7800	2.8600	0.10
16	3.6100	3.6600	3.5000	3.5900	0.08
24	4.3900	4.4200	4.4000	4.4033	0.02
36	4.3700	4.3600	4.2000	4.3100	0.10
48	4.4100	4.3700	4.3400	4.3733	0.04
60	4.5900	4.3300	4.4100	4.4433	0.13
72	4.2900	3.9000	3.8100	4.0000	0.26

**ตารางผนวกที่ ๑๒** ความเข้มข้นกลูโคสที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงการใช้กลูโคสในการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	14.84	14.27	13.53	14.21	0.66
2	14.66	12.64	13.56	13.62	1.01
4	13.16	12.74	14.03	13.31	0.66
6	5.52	5.61	5.67	5.60	0.08
8	1.80	2.00	1.89	1.90	0.10
12	0.93	0.88	0.81	0.87	0.06
16	0.89	0.98	0.81	0.89	0.09
20	1.12	1.27	1.12	1.17	0.09
24	1.33	1.10	0.95	1.12	0.19
30	1.33	1.08	0.99	1.13	0.18
36	1.24	1.19	1.06	1.16	0.10

ตารางผนวกที่ ๑๓ พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรม และความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมัก เพื่อผลิตเอทานอลด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5339 โดยใช้กลูโคส และน้ำหมักที่ ค่าความหวาน 15 องศาบริกซ์ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	พื้นที่ใต้กราฟ (mV)			ปริมาณเอทานอล			เฉลี่ย	SD
				(เปอร์เซ็นต์โดย ปริมาตร)				
	1	2	3	1	2	3		
กลูโคส (15 °Bx)	3139501	3083017	2931269	9.35	9.18	8.73	18.18	0.64
น้ำตาลรีดิวซ์ (15 °Bx)	96335	112513	121847	0.28	0.33	0.35	0.32	0.04

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	ชมพูนุช ล้ออิสระตระกูล
เกิดวันที่	20 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-