ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม — **สาขา**

วิทยาศาสตร์ — **สายวิชา**

เรื่อง การผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำโดยใช้ยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ในถังหมักชีวภาพ

Ethanol Production from Aquatic Weed Plants by Using Yeast *Candida shehatae* TISTR 5843 Fermentation in Bioreactor

นามผู้วิจัย นางสาวสุจิตรา รอดหมวน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(อาจารย์ประภา โซ๊ะสลาม, ปร.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์รัชพล พะวงศ์รัตน์, ปร.ด.)

รักษาราชการแทน หัวหน้าสายวิชา .....

(รองศาสตราจารย์ศิริภัทรา เหมือนมาลัย, ปร.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำโดยใช้ยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ในถังหมักชีวภาพ

Ethanol Production from Aquatic Weed Plants by Using Yeast *Candida shehatae* TISTR 5843 Fermentation in Bioreactor

โดย

นางสาวสุจิตรา รอดหมวน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม)
พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุจิตรา รอดหมวน 2556: การผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำโดยใช้ยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ในถังหมักชีวภาพ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม สายวิชาวิทยาศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ประภา โซ๊ะสลาม, ปร.ด. 146 หน้า

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ โดยทำการเปรียบเทียบเทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกันในถังหมักชีวภาพด้วยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 โดยวิธีการห่อหุ้มโดยใช้แคลเซียมอัลจิเนต และวิธีการดูดซับบนวัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ชานอ้อย ซังข้าวโพด และลำต้นข้าวฟ่างหวาน ทำการทดลองหมักเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบกะ กึ่งกะ และกะซ้ำ ที่สภาวะการหมักค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักแบบกึ่งกะ วิธีการเพิ่มจำนวนครั้งของการเติมอาหารวัชพืชน้ำให้มากขึ้นจะช่วยลดระยะเวลาในการหมักได้ และเพิ่มผลผลิตเอทานอลได้มากกว่าการหมักแบบกะ ส่วนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้เซลล์ตรึงรูปในชานอ้อยเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยทำการหมักได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดติดกันได้ 4 รอบ ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดของการหมักในรอบที่ 3 จากผักตบชวา จอกน้ำ ธูปฤาษี เท่ากับ 13.82±0.83, 6.10±0.32 และ 7.29±0.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการใช้เซลล์ตรึงรูปในอัลจิเนต และชานอ้อย หมักแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด พบว่าที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 220 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลในถังหมักแบบแพคเบด ได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดจากผักตบชวา จอกน้ำ และ ธูปฤาษี เท่ากับ 94.79±0.46, 78.09±0.48 และ85.46±0.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้อัตราการเกิดเอทานอล (Qp) สูงสุด เท่ากับ 1.97, 1.63 และ 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และร้อยละประสิทธิภาพการหมัก เท่ากับ 84.48±0.02%, 69.60±0.13% และ76.17±0.24% ตามลำดับ การคำนวณต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ พบว่าต้นทุนการผลิตเอทานอลจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 9.89, 14.03 และ11.98 บาทต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งต้นทุนการผลิตต่ำกว่าอ้อย ข้าวโพด และกากน้ำตาล จากผลการทดลองสามารถใช้วัชพืชน้ำเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้ นอกจากนี้เป็นการใช้ประโยชน์และกำจัดวัชพืชน้ำเพื่อการพัฒนาการผลิตพลังงานทดแทน

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sujitra Rodmuan 2013: Ethanol Production from Aquatic Weed Plants by Using Yeast *Candida shehatae* TISTR 5843 Fermentation in Bioreactor. Master of Science (Environmental Science and Technology), Major Field: Environmental Science and Technology, Division of Science. Thesis Advisor: Miss Prapa Sohsalam, Ph.D. 146 pages.

Comparative study of ethanol production from aquatic plant using *Candida shehatae* TISTR 5843 in packed bed reactor by different immobilization technique using entrapment method with calcium alginate and adsorbtion method with natural suppoting materials such as bagasse, corncob and sweet sorghums stem were investigated. The experiment of batch, fed batch and repeated batch used fermentation condition carried at initial pH, of 5.0, shaking speed, 120 rpm, temperature, 30 °C . The result showed that fed batch technique with more frequenced additions of aquatic plant medium reduced fermentation time and increased ethanol production. The repeated batch of using immobilization with a bagasse showed the highest efficiency. Although, The highest of ethanol production was used at least 3 times in the repeated-batch fermentation. The maximum of ethanol concentration from water hyacinth , water lettuce and cattail were 13.82±0.83, 6.10±0.32 and 7.29±0.41 g/L, respectively. The continuous ethanol fermentation in a packed-bed reactor used immobilization in alginate and bagasse with the flow rate of 1.0 mL/ min and initial sugar concentration of 220 g/L. It was optimum condition for ethanol fermentation from aquatic plant. Ethanol concentrations from water hyacinth , water lettuce and cattail were 94.79±0.46, 78.09±0.48 and 85.46±0.62 g/L, respectively. The productivity of ethanol (Qp) were 1.97, 1.63 and 1.78 g/L.h, respectively. and percent efficient fermentation were 84.48±0.02%, 69.60±0.13% and 76.17±0.24%, respectively. The ethanol production costs, from water hyacinth, water lettuce and cattail were 9.89, 14.03 and 11.98 baht/L, respectively which less than the cost of production from sugarcane, corn and molasses. The experimental results could use aquatic plants was raw material for the production of ethanol. Moreover, its application and management for sustainable use as renewable energy in the future.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ประภา โซ๊ะสลาม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร. รัชพล พะวงศ์รัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำคำปรึกษา ความรู้ต่างๆ ทั้งทางด้านวิชาการและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติยา แซ่ปัง และอาจารย์ ดร. ทัศนี ต้นดี ที่ให้คำแนะนำและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ประจำห้องศูนย์ส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่าง ๆ

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องนิสิตปริญญาโทสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม และนิสิตปริญญาโทและเอก สาขาวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่าง ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจตลอดมา

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณมารดา และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใด เนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่บิดา มารดาและผู้มีพระคุณทุกท่าน รวมทั้งครูบาอาจารย์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

งานวิจัยนี้ได้การสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา ปีการศึกษา 2554

สุจิตรา รอดหมวน

ตุลาคม 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	44
อุปกรณ์	44
วิธีการ	48
ผลและวิจารณ์	55
ผล	55
วิจารณ์	55
สรุปและข้อเสนอแนะ	91
สรุป	91
ข้อเสนอแนะ	92
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	93
ภาคผนวก	106
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	107
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	110
ภาคผนวค ค ภาพผลการทดลอง และตารางแสดงผลการทดลอง	116
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	146

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัชพืชน้ำ	8
2	ส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัตถุดิบจากธรรมชาติ เศษวัสดุจากอุตสากรรมและการเกษตร	16
3	กระบวนการปรับสภาพของวัสดุลิกโนเซลลูโลส	23
4	การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการต่างๆ	37
5	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของวัชพืชน้ำวัดโดยใช้วิธี DNS และเครื่อง HPLC	56
6	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการปรับสภาพวัชพืชน้ำ ด้วยวิธีการปรับสภาพวิธีที่ 2 เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับสิ่งอ้างอิงต่างๆ	57
7	องค์ประกอบเส้นใย ก่อน-หลังการปรับสภาพโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิก	59
8	ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) ของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่สภาวะเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	66
9	ค่าตัวแปรทางจลนศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำในการหมักแบบกึ่งกะโดยมีการเติมอาหารปริมาณที่แตกต่างกันโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	70

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

10 ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) สูงสุด และประสิทธิภาพการหมักของการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ 76

11 ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) สูงสุด และประสิทธิภาพการหมักของการผลิตเอทานอลจากจอกน้ำที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ 77

12 ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) สูงสุด และประสิทธิภาพการหมักของการผลิตเอทานอลจากธูปฤาษีที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ 78

13 เปรียบเทียบต้นทุนและปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบชนิดต่างๆ 90

ตารางผนวกที่

ข1 การเตรียมเอทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 0.75 0.325 0.1725 และ0.08625 เปอร์เซ็นต์ 111

ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซโลสความเข้มข้นที่ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร 113

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ค1	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด และความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ของการผลิตเอทานอลจากผักตบชวา ด้วยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ ภายใต้สภาวะพีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในวัสดุตรึงรูปที่ต่างกัน	119
ค2	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด และความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ของการผลิตเอทานอลจากจอกน้ำ ด้วยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ ภายใต้สภาวะพีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในวัสดุตรึงรูปที่ต่างกัน	120
ค3	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด และความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ของการผลิตเอทานอลจากผักตบชวา ด้วยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ ภายใต้สภาวะพีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในวัสดุตรึงรูปที่ต่างกัน	121
ค4	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะ ที่เติมอาหารวัชพืชน้ำครั้งเดียว (100:100) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	122
ค5	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะ ที่เติมอาหารวัชพืชน้ำสองครั้ง (100:50:50) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	123
ค6	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะ ที่เติมอาหารวัชพืชน้ำสองครั้ง (100:60:40) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	124

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค7 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ 125

ค8 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ 126

ค9 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ 127

ค10 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยซังข้าวโพด ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ 128

ค11 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยลำต้นข้าวฟ่างหวาน ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ 129

ค12 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 130

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค13 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที 131

ค14 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที 131

ค15 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร 132

ค16 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร 133

ค17 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 240 กรัมต่อลิตร 134

ค18 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร 135

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค19 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร 136

ค20 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 240 กรัมต่อลิตร 137

ค21 อัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) และผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) สูงสุด และประสิทธิภาพการหมักของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 หมักในถังหมักแบบแพคเบด ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง 138

ค22 ค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าความขุ่นเซลล์(OD660 nm) เซลล์อิสระของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ 140

ค23 ค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าความขุ่นเซลล์(OD660 nm) เซลล์อิสระของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะ โดยให้ปริมาตรน้ำตาลเริ่มต้นที่100 มิลลิลิตร และเติมน้ำตาลครั้งเดียวชั่วโมงที่ 12 ปริมาตร100 มิลลิลิตร(100:100) 141

ค24 ค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าความขุ่นเซลล์(OD660 nm) เซลล์อิสระของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะโดยให้ปริมาตรน้ำตาลเริ่มต้นที่ 100 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลสองครั้งเติมอาหารสองครั้ง ที่ชั่วโมง 6 และ12 คือ (50:50) และ(60:40) 142

ค25 ค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าความขุ่นเซลล์(OD660 nm) เซลล์อิสระของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะซ้ำ 143

ค26 การคิดคำนวณต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ 144

ค27 กลุ่มพืชที่ใช้ชีวมวลเหนือดินทั้งหมด เป็นวัตถุดิบผลิตพลังงาน 145

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะลำต้นผักตบชวา	4
2	ลักษณะลำต้นธูปฤาษี	6
3	ลักษณะลำต้นจอกน้ำ	7
4	ตัวอย่างโครงสร้างวัสดุลิกโนเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อน	9
5	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิก	10
6	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	11
7	สูตรโครงสร้างของ *trans-p*-coumaryl *trans*-coniferyl alcohol และ *trans-p*-sinapyl alcohol	12
8	การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตรประเภทต่างๆ	18
9	เมแทบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์	31
10	วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์	36
11	ลักษณะของถังหมักชีวภาพชนิดต่างๆ ที่ใช้ในระบบการหมัก	41
12	ชุดอุปกรณ์การผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด	47
13	แสดงแผนการดำเนินงานวิจัย	54
14	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเซลล์ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่เวลาเปลี่ยนไปภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	60

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ผลของความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น สำหรับการหมักเอทานอลแบบกะจากวัชพืชน้ำโดยใช้ยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843: ผักตบชวา (■), จอกน้ำ (▲) และ ธูปฤาษี (●) ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 1×10^{6}(ก1), 1×10^{7} (ก2) และ 1×10^{8} (ก3) น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (——) และความเข้มข้นเอทานอล (----)	62
16	ผลความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการใช้น้ำตาลสำหรับการหมักเอทานอลแบบกะจากวัชพืชน้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843:ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 10 (ข1), 15 (ข2) และ20 (ข3) กรัมต่อลิตรของ ผักตบชวา (■), จอกน้ำ (▲) และ ธูปฤาษี (●) น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (——) และความเข้มข้นเอทานอล (----)	63
17	การผลิตเอทานอลสูงสุด และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงรูปในวัสดุตรึงต่างๆ โดยยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	65
18	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะที่เติมอาหารวัชพืชน้ำครั้งเดียว (100:100) และเติมอาหารวัชพืชน้ำสองครั้ง ได้แก่ (100:50:50) และ(100:60:40) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	68
19	การหมักเอทานอลและการใช้น้ำตาลจากผักตบชวาของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยวัสดุตรึงต่างๆ ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ	72

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	การหมักเอทานอลและการใช้น้ำตาลจากจอกน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยวัสดุตรึงต่างๆ ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ	73
21	การหมักเอทานอลและการใช้น้ำตาลจากธูปฤาษีของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยวัสดุตรึงต่างๆ ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ	74
22	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากผักตบชวา ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที	81
23	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากจอกน้ำ ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที	82
24	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากธูปฤาษี ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที	82
25	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากผักตบชวา ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร	83

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากจอกน้ำ ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร	84
27	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากธูปฤาษี ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร	85
28	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากผักตบชวา ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร	86
29	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากจอกน้ำ ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร	87
30	การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากธูปฤาษี ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร	88

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ข1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร 111

ข2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสโดยวิธี DNS 114

ข3 กราฟมาตรฐานเอทานอลวิเคราะห์ด้วยเครื่องHPLC 115

ค1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำ 3 ชนิด จากการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับทางเคมีที่แตกต่างกัน ทรีสเม้นต์ที่ 1) ใช้สารละลาย NaOH รวมกับ H_2O_2 ทรีสเม้นต์ที่ 2) ใช้สารละลายNaOH พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิก และทรีสเม้นต์ที่ 3) ใช้สารละลาย NaOH ร่วมกับหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง และทำการไฮโดรไลซีสโดยเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส (20 และ 10 หน่วย ต่อกรัมสารตั้งต้น ตามลำดับ) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (control ใช้น้ำกลั่นแช่วัชพืชน้ำแทนสารละลาย NaOH) 117

ค2 ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้จากวัชพืชน้ำ 3 ชนิด หมักในถังหมักแบบแพคเบด ที่อัตราไหลต่างกันในชั่วโมงที่ 24 117

ค3 องค์ประกอบเส้นใย ก่อน-หลังการปรับสภาพโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิก 118

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำโดยใช้ยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ในถังหมักชีวภาพ

Ethanol Production from Aquatic Weed Plants by using *Candida shehatae* TISTR 5843 Fermentation in Bioreactor

คำนำ

ในปัจจุบันนานาประเทศทั่วโลกมีอัตราการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีอัตราการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงที่ไม่เพียงพอกับอัตราการใช้งาน จึงเป็นสาเหตุให้เกิดวิกฤตการณ์ทางด้านราคาน้ำมันที่มีราคาสูงขึ้น ดังนั้นการที่จะลดปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องแสวงหาพลังงานทดแทนหรือพลังงานทางเลือกจากแหล่งอื่นๆ เช่น พลังงานทดแทนจากธรรมชาติ พลังงานไฟฟ้า พลังงานนิวเคลียร์ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันมีหลายประเทศให้ความสนใจเกี่ยวกับงานวิจัยในด้านการผลิตเอทานอลเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนภายในประเทศ

ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่ให้ความสำคัญกับพลังงานทดแทนจากเอทานอล เพราะพลังงานเอทานอลนับว่ามีบทบาทสำคัญกับสภาวะแวดล้อมโลกในปัจจุบัน พลังงานเอทานอลจัดว่าเป็นพลังงานสะอาดไม่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านมลพิษในสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงจากซากฟอสซิลอันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดสภาวะโลกร้อนได้ โดยประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งเป็นสารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลส อยู่มากมายเช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด หญ้าแฝก และพืชเส้นใยชนิดอื่นๆ เป็นการประยุกต์ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์มากขึ้น เพื่อเพิ่มมูลค่าจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแล้วยังลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและมีส่วนสนับสนุนการเกษตรกรรมให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้แล้วในประเทศไทยยังมีวัชพืชน้ำหลายชนิดที่มีแนวโน้ม สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ เช่น ผักตบชวา ธูปฤาษี จอกน้ำ แพงพวยน้ำ ตับเต่า เป็นต้น ข้อดีของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำคือ ช่วยลดต้นทุนการผลิตอย่างมาก ควบคุมสภาพแวดล้อมไม่ให้เกิดสิ่งกีดขวางการคมนาคมทางน้ำ และลดภาระการกำจัดของเสียนี้ด้วยลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัชพืชน้ำเป็นพืชเส้นใยที่ควรให้ความสนใจ เพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ซึ่งจากการศึกษาในขั้นต้นพบว่าองค์ประกอบเส้นใยของผักตบชวาประกอบไปด้วย ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน คือร้อยละ18.20, 48.70 และ 3.50 ของน้ำหนักเปียกตามลำดับ (Nigam, 2002) โดยลำต้นของวัชพืชน้ำจะมีเส้นใยที่อ่อนทำให้ง่ายต่อการทำปฏิกิริยาทางเคมีในกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง หรือด่างเจือจาง และย่อยด้วยเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ นอกจากนี้วัชพืชน้ำเป็นพืชที่ปลูกครั้งเดียวสามารถเก็บผลผลิตได้หลายปี เป็นพืชโตเร็ว ทนต่อสภาวะแห้งแล้ง มีการแพร่กระจายตามแหล่งน้ำทั่วไป สำหรับการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดนั้นจำเป็นต้องมีสายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากวัชพืชน้ำ เนื่องจากยีสต์ส่วนใหญ่ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในปัจจุบันเป็นยีสต์ที่ผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้ดี ขณะที่ยีสต์ที่ผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสให้ผลผลิต และอัตราการผลิตเอทานอลที่ต่ำ

งานวิจัยนี้จึงมีการประยุกต์ใช้วัชพืชน้ำเพื่อผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ที่สามารถหมักน้ำรีดิวซ์ของวัชพืชน้ำที่ผ่านขบวนการปรับสภาพ (pretreatment) และการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ หมักในถังหมักชีวภาพ เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลที่สูง และปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอลอย่างมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสวัชพืชน้ำ

2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยอัลจิเนต และวัสดุตรึงจากธรรมชาติ

3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ โดยใช้กระบวนการหมักแบบกะ(Batch) กึ่งกะ(fed-batch) และกะซ้ำ (repeated-batch)ในระดับห้องปฏิบัติการ

4. เพื่อปรับปรุงกระบวนการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยใช้กระบวนการหมักในถังหมักชีวภาพแบบแพคเบด (packed-bed bioreactor)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1.วัชพืชน้ำ (aqutic plants)

1.1 ผักตบชวา

ภาพที่ 1 ลักษณะลำต้นผักตบชวา
ที่มา: http://www.biogang.net/biodiversity_view.php?menu=biodiversity&uid=19285&id=126223
ชื่อพื้นบ้าน: สวะ ผักป่อง ผักบ่ง ผักตบ
ชื่อสามัญ: ผักตบชวา (Water Hyacinth)
ชื่อทางพฤกษศาสตร์: *Eichlornia crassipes* (Mart.) Soloms

ลักษณะทั่วไป

ผักตบชวา เป็นพืชน้ำซึ่งจัดเป็นพืชประเภทใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Pontederiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศบราซิลทวีปอเมริกาใต้ พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2367 โดย Karl Von Matius และมีการขยายพันธุ์ไปประเทศในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน โดยมีการนำเข้ามาจากประเทศอินโดนีเซีย ในปี พ.ศ. 2444 เป็นวัชพืชที่ร้ายแรงในแหล่งน้ำทั่วไป ก่อให้เกิดปัญหามากมายในด้านการคมนาคมทางน้ำ และการกำจัดรวมถึงประเทศไทยด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของผักตบชวา

ผักตบชวาเป็นพืชน้ำล้มลุก ประกอบด้วยลำต้นที่มีหัวราก (rhizomatous system)มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร และยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ลำต้นมีสีม่วงแดง มีขนาดแตกต่างกัน ประกอบด้วยกลุ่มใบเรียงกันเป็นกลีบชั้น (rosettes) ก้านใบมีลักษณะกลมพองออก ภายในมีเนื้อพรุนคล้ายฟองน้ำเป็นเครื่องพยุงให้ต้นลอยน้ำได้ ผักตบชวามีระบบรากเป็นรากฝอย โดยแตกออกจากข้อบนลำต้น มีความยาวตั้งแต่ 10-90 เซนติเมตร มีไหลซึ่งเกิดตามซอกใบแล้วเจริญเป็นต้นอ่อนที่ปลายไหล ถ้าน้ำตื้นก็จะหยั่งรากลงดิน และมีประสิทธิภาพสูงในการดูดซึมธาตุอาหารต่างๆ ที่ปะปนในน้ำ ส่วนดอกมีสีม่วงฟ้าลักษณะเป็นช่อดอกมีประมาณ 6-12 ดอก ผักตบชวาจัดเป็นพืชน้ำที่เจริญเติบโตได้เร็วที่สุด โดยสามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบไม่ใช้เพศ (vegetative propagation) และแบบใช้เพศ (sexual reproduction) แต่โดยทั่วไปมักจะขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ โดยสามารถเพิ่มการครอบคลุมพื้นที่ได้เป็น 2 เท่า ทุกระยะเวลา 62 วัน หรือเพิ่มจำนวนจาก 10 ต้นเป็น 6 แสนต้น ภายในเวลา 8 เดือน สำหรับการขยายพันธุ์โดยใช้เพศจะผสมเกสรภายในตัวเอง (self pollination) แต่บางครั้งสามารถผสมข้ามต้นได้ โดยจะเกิดเฉพาะในฤดูแล้งเท่านั้น

ขยายพันธุ์: แยกต้นอ่อนที่ปลายไหลไปปลูก

การบริโภค: ดอกอ่อนและก้านใบอ่อนกินเป็นผักลวกจิ้มน้ำพริกหรือทำแกงส้ม

สรรพคุณ: ช่วยระบายความร้อนในร่างกาย

แหล่งที่พบ: ผักตบชวาสามารถอยู่ได้ทุกสภาพน้ำ ทั้งในน้ำสกปรกและน้ำสะอาด เจริญเติบโตได้ดี ที่พีเอช 4-10 และอุณหภูมิของน้ำไม่สูงกว่า 34 องศาเซลเซียส และในต้นพืชจะมีน้ำเฉลี่ยประมาณร้อยละ 95ประกอบด้วยในใบร้อยละ 89 และในก้านใบร้อยละ 96 (เปล่งศักดิ์ และภู่ขจร, 2546) ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีการแพร่กระจายของผักตบชวาอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำต่างๆ ในหลายจังหวัดทั่วประเทศ

องค์ประกอบของผักตบชวา

ต้นผักตบชวา 100 กิโลกรัม หลังจากตากให้แห้งจะมีน้ำหนักเหลือประมาณ 5 กิโลกรัมคิดเป็นกากแห้งเฉลี่ยร้อยละ 5 ของน้ำหนักทั้งหมด จากการวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่าผักตบชวาประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และแร่ธาตุต่างๆ (แสดงดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ธูปฤาษี

ภาพที่ 2 ลักษณะลำต้นธูปฤาษี

ที่มา: http://th.wikipedia.org/wiki/Typha_angustifolia

ชื่อพื้นบ้าน : กกธูป กกช้าง เฟือ ปรือ หญ้าสลาบหลวง

ชื่อสามัญ : ธูปฤาษี (Elephant grass, Cat-tail, Lesser reedmace)

ชื่อทางพฤกษศาสตร์: *Typha angustifolia* L.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ธูปฤาษีเป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี ใบเลี้ยงเดี่ยว เป็นพืชที่เจริญเติบโตอยู่ในน้ำจัดว่าเป็นวัชพืชชนิดหนึ่ง มีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรปและอเมริกา ลำต้นตั้งตรง สูง 1.5-3 เมตร ใบเป็นรูปแถบแบน กว้าง 1-2 เซนติเมตร ยาว 2 เมตร ใบแตกสลับกันเป็นสองแถวด้านข้าง มีกาบใบ ช่อดอกเป็นสีน้ำตาล ช่อดอกรูปทรงกระบอก แยกเพศบนก้านเดียวกัน ก้านช่อดอกกลม แข็ง ช่วงดอกเพศผู้อยู่ที่ปลายช่อ ยาว 8-40 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร มีใบประดับ 1-3 ใบ แต่จะหลุดร่วงไป ช่วงดอกเพศเมียอยู่ด้านล่าง ยาว 5-30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร มักแยกออกจากส่วนดอกเพศผู้ด้วยส่วนก้านช่อดอกที่เป็นหมันที่ยาว 2.5-7 เซนติเมตร ดอกมีขนาดเล็ก ไม่มีกลีบดอกและกลีบเลี้ยง เกสรเพศผู้ส่วนมากมี 3 อัน มีขนล้อมรอบ ก้านเกสรเพศผู้สั้น อับเรณูยาว 1.5-2 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียมีใบประดับย่อยรูปเส้นด้าย รังไข่รูปกระสวย ก้านรังไข่เรียวยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร มีขนยาวสีขาว ก้านเกสรเพศเมียยาว 1-1.5 มิลลิเมตร มีขนแต่สั้นกว่าบนก้านรังไข่ ยอดเกสรรูปใบหอก ผลมีขนาดเล็ก รูปรี เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-3 เซนติเมตร

ขยายพันธุ์: โดยการที่เมล็ดปลิวไปตามลม เมล็ดมีขนอ่อนนุ่ม มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลกในเขตร้อนและเขตอบอุ่น สำหรับประเทศไทยพบในทุกภูมิภาค ขึ้นตามพื้นที่ชุ่มน้ำ พบได้ทั่วไปตามหนอง คลอง บึง และแม่น้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การบริโภค: มีการสกัดเป็นแป้ง เพื่อใช้ในการบริโภค

สรรพคุณ: เป็นวัชพืชลำต้นใต้ดินและรากใช้เป็นสมุนไพร ขับปัสสาวะ

แหล่งที่พบ: ธูปฤาษีจัดเป็นวัชพืชในกลุ่มวัชพืชชายตลิ่ง มีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรปและอเมริกาแพร่กระจายทั่วไปในเขตร้อน เช่น ประเทศไทย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และยังพบได้ในอเมริกาเหนือและชายฝั่งแปซิฟิก สำหรับประเทศไทยนั้นพบขึ้นทั่วทุกภาคของประเทศ เช่น ในบริเวณหนองน้ำบึง นาข้าว ร่องน้ำข้างถนน และอ่างเก็บน้ำ เป็นต้น ต้นธูปฤาษีที่อยู่ในเขตที่ลุ่มจะมีการเจริญเติบโตได้ตลอดทั้งปี ขยายพันธุ์โดยเหง้า และเมล็ด ออกดอกตั้งแต่เดือนสิงหาคมเป็นต้นไปช่อดอกมีลักษณะคล้ายก้านธูปขนาดใหญ่สีน้ำตาล (อำพล, 2544)

1.3 จอกน้ำ

ภาพที่ 3 ลักษณะลำต้นจอกน้ำ

ที่มา: http://www.thaikasetsart.com/%E0%B8%88%E0%B8%AD%E0%B8%81/

ชื่อพื้นบ้าน: ผักกอก กากอก

ชื่อสามัญ: จอกน้ำ (water lettuce)

ชื่อทางพฤกษศาสตร์: *Pistia stratiotes* L.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

จอกน้ำเป็นพืชลอยน้ำอายุหลายปี ลำต้นเป็นกอ มีไหลเพื่อช่วยในการขยายพันธุ์ มีรากแตกเป็นกระจุก ใบ เป็นใบเดี่ยว รูปไข่กลับ ยาว 2 – 15 เซนติเมตร ดอก ออกเป็นช่อตั้งขนาดเล็ก ยาว 1.2 – 1.5 เซนติเมตร มีใบประดับสีขาวรองรับ ดอกย่อยเป็นดอกแยกเพศ อยู่บนช่อเดียวกัน โดยดอกเพศผู้อยู่ด้านบน มีเกสรเพศผู้ 2 – 8 อัน เกสรเพศเมียมีเพียงรังไข่ 1 อัน ผล เป็นผลสด ขนาดเล็กสีเขียว มีหลายเมล็ด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขยายพันธุ์: จอกมีการกระจายพันธุ์ทั่วไปในเขตร้อนขยายพันธุ์โดยแตกหน่อใหม่จากไหล เพิ่มปริมาณและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมาก จึงสร้างปัญหาแก่แหล่งน้ำ จอกต้นเล็กๆ มีสีเขียวสดใส ถ้ามีจำนวนไม่มากนัก จะดูเหมือนดอกไม้สีเขียวๆ ลอยน้ำอยู่ดูสวยงาม

สรรพคุณ: นำไปใช้ประโยชน์โดยประดับในสวนน้ำ ต้นอ่อนๆ ใช้เป็นอาหารเลี้ยงหมู และสามารถนำมาทำปุ๋ยหมักได้

แหล่งที่พบ: พบได้ทั่วไปในเขตร้อน ลอยอยู่ตามน้ำนิ่งหรือไหลช้า ๆ ตามท้องทุ่งนา หรือบึงน้ำจืด

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัชพืชน้ำ

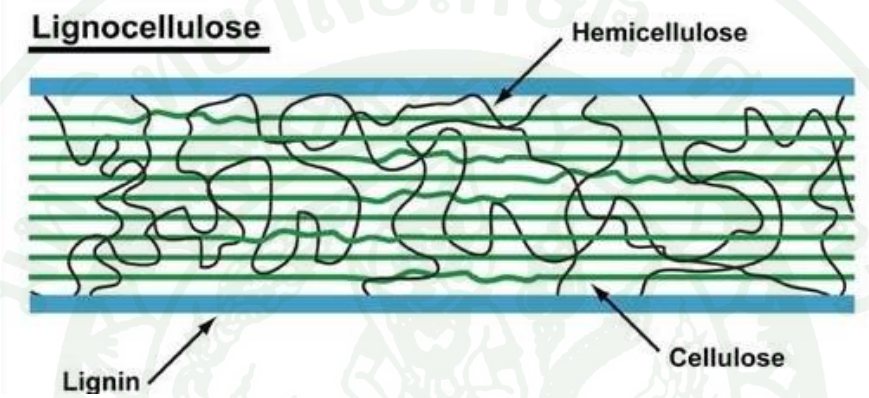
องค์ประกอบชีวมวล	ร้อยละขององค์ประกอบ		
	ผักตบชวา	**จอกน้ำ**	**ธูปฤาษี**
เซลลูโลส (Cellulose)	25.0	18.7	34.54
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)	35.0	17.9	14.45
ลิกนิน (Lignin)	10.0	6.20	7.21
โปรตีน (Protein)	-	17.1	12.99
แป้ง (Starch)	-	11.1	67.52
เถ้า (Ash)	20	23.2	4.5
ไนโตรเจน (Nitrogen)	3.0	-	-
โซเดียม (Sodium)	2.5	-	-
โปแตสเซียม (Potassium)	3.5	-	-
แคลเซียม (calcium)	1.0	-	-

ที่มา: ดัดแปลงจาก จิระศักดิ์ และคณะ(2000); เวสารัชและรัชพล (2556); B. Anjanabha *et al*. (2010) และ Mishima *et al*. (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปพบเซลลูโลสร้อยละ 40-60 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 20-30 และลิกนินร้อยละ 15-30 (Cowling and Kirk, 1976; Dekker, 1982; Kirk, 1983) ตัวอย่างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด เศษไม้ เป็นต้น



ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างวัสดุลิกโนเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อน Page (1976)

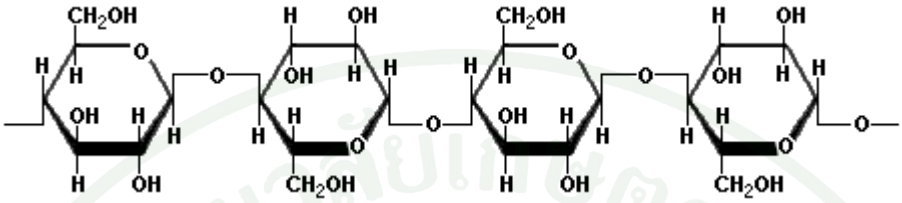
2.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccarides) เซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือเบตา-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1-4-glycosidic เป็นเชิงเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยซ้ำๆ มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ ($C_6H_{12}O_6$) โดยจะมีความสัมพันธ์และพบรวมกับเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เพนโตแซนกัม แทนนินไขมัน และสารที่ทำให้เกิดสี เป็นต้น

เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 3 หมู่ ซึ่งจะทำปฏิกิริยาโดยจะจับกับพวก O-,N- และ S- สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสจึงมีมากและโครงสร้างของเซลลูโลสยังจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ จึงทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกสูงมาก อุณหภูมิการหลอมตัวจึงสูงมาก การที่จะแยกองค์ประกอบเหล่านี้ออกจากกันได้จึงจำเป็นต้องใช้กระบวนการทางเคมีเข้ามาช่วย เซลลูโลสมักจะเกิดการสลายตัวก่อนถึงอุณหภูมิหลอมตัว และมีความสามารถในการละลายต่ำ เซลลูโลสธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน การกระจายน้ำหนักโมเลกุลของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เซลลูโลสมีความสำคัญต่อสมบัติทางกายภาพจึงจำเป็นที่จะต้องมีการนำวัตถุดิบไปผ่านกระบวนการต่างๆเพื่อเปลี่ยนสภาพวัตถุดิบให้เหมาะต่อการนำไปย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์(น้ำย่อย) แล้วเข้าสู่กระบวนการการหมักต่อไป



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,4 ไกลโคซิดิก

ที่มา: Eriksson *et al*. (1990)

2.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลส เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืช โดยจะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมประสานกลุ่มเส้นใยเซลลูโลสร่วมกับลิกนินและเพกตินประกอบเป็นผนังเซลล์ทำให้เซลล์มีความแข็งแรงและคงรูปอยู่ได้ (Browning, 1967) โดยทั่วไปแล้วเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดคือ ไซโลส (xylose) แมนโนส (mannose) กาแลกโตส (galactose) แรมโนสอะราบิโนส (arabinose) และกรดกลูคูโรนิก (glucuronic) เฮมิเซลลูโลสถูกจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มย่อยตามชนิดและสัดส่วนของน้ำตาลดังนี้

2.2.1 ไซแลน

เป็นกลุ่มของเฮมิเซลลูโลสที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นพอลิเมอร์หลักที่เชื่อมกันด้วยพันธะ $\beta(1\longrightarrow4)$ หรือเป็นสายกิ่งจำนวนมากที่ต่อกับสายหลักด้วยพันธะ$\beta(1\longrightarrow3)$ ในขณะที่อะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน เป็นเฮมิเซลลูโลสที่ประกอบด้วยไซแลนเป็นสายพอลิเมอร์หลักโดยมีสายอะราบิโนสไซโลสและ 4-O-methyl-D-glucuronic acid ซึ่งเชื่อมต่อด้วยพันธะ $\alpha(1\longrightarrow2)$, $\beta(1\longrightarrow3)$ และ $\alpha(1\longrightarrow3)$ ตามลำดับ

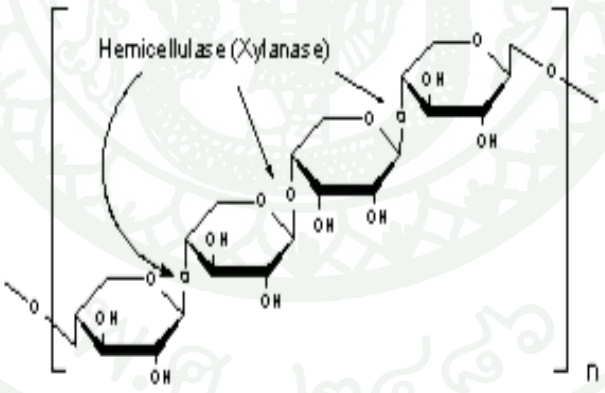
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.2 แมนแนน

เป็นโครงสร้างที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น กาแล็กโทกลูโคแมนแนนซึ่งมี แมนโนส กาแลกโทส กลูโคสเป็นองค์ประกอบของสายพอลิเมอร์หลักในอัตราส่วนของน้ำตาล 3:1:1 โดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\beta(1\longrightarrow4)$ และ$\alpha(1\longrightarrow6)$

2.2.3 กาแล็กแทน

เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยน้ำตาลกาแล็กโทสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนมากอยู่ในรูปของอะราบิโนกาแลกแทน ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\beta(1\longrightarrow3)$ และมีสายกิ่งที่ประกอบด้วยไดแซ็กคาไรด์ของกาแล็กโทสหรืออะราบิโนสซึ่งเชื่อมต่อสายหลักด้วยพันธะเฮมิเซลลูโลสที่พบในธรรมชาติจะแบ่งออกออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่พบในพวกไม้เนื้อแข็งจะประกอบไปด้วยเฮมิเซลลูโลสชนิดกลูคูโรโนไซแลน และกลูโคแมนแนนในปริมาณร้อยละ15-35 และ 2-5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ กลุ่มที่พบในไม้เนื้ออ่อนจะมีส่วนของเฮมิเซลลูโลสชนิดกาแลกโทกลูโคแมนแนน และอะราบิโนไซแลนในปริมาณร้อยละ12-20 และ 5-14 โดยน้ำหนักตามลำดับ



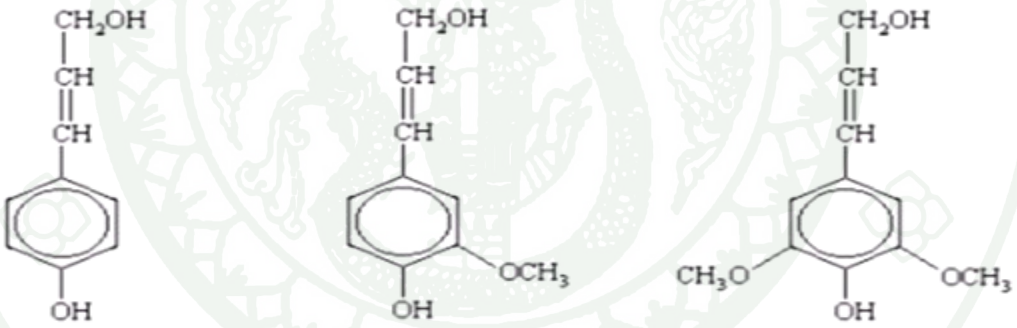
ภาพที่ 6 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Bastawde (1992)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนของผนังเซลล์พืช พบปริมาณที่แตกต่างกันไปตามชนิดพืช โดยพบร่วมกับเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ลิกนินมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและสารละลายอินทรีย์หลายชนิด แต่ละลายได้ดีใน dioxane โดยทั่วไปลิกนินไม่ละลายในกรด แต่ละลายในด่าง (Gottlieb and Pelezar, 1951; Janshekar and Fiechter, 1983) ลิกนินเป็นส่วนที่ป้องกันเซลลูโลสไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบ 3 มิติ ไม่ตกผลึก มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1,000-10,000 ดาลตัน (Gottlieb and Pelezar, 1951; Sarkanen and Ludwig, 1971) ประกอบด้วยสารประกอบอะโรมาติก 3 ชนิด คือ *trans-p*-coumaryl *trans*-coniferyl alcohol และ *trans-p*-sinapyl alcohol (Eriksson *et al*., 1990) โดยสูตรโครงสร้างดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 7 นอกจากนี้โมเลกุลของลิกนินยังเชื่อมต่อกับสารประกอบอะโรมาติกอื่นๆอีกมากมาย เช่น vanillin และsyringaldehyde (Yudkin and Offord, 1973)



trans-p-coumaryl *trans*-coniferyl alcohol *trans-p*-sinapyl alcohol

ภาพที่ 7 สูตรโครงสร้างของ *trans-p*-coumaryl *trans*-coniferyl alcohol และ *trans-p*-sinapyl alcohol

ที่มา: Eriksson *et al*. (1990)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การผลิตเอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือที่เรียกว่าเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) หรือเกรนแอลกอฮอล์ (Grain alcohol) หรือแอลกอฮอล์ เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี จุดติดไฟ และระเหยง่าย มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH สามารถละลายได้ในน้ำและสารละลาย อื่นๆ มีจุดเดือด 78.32 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง - 243.1 องศาเซลเซียส เอทานอลสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical Synthesis) และการหมักโดยจุลินทรีย์ (Yeast Fermentation) ปัจจุบันเอทานอลที่ผลิตส่วนใหญ่จะได้จากกระบวนการทางชีวภาพที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ เอทานอลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีมีปริมาณน้อยมาก โดยคิดเป็นประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลก

สำหรับการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก จะอาศัยกระบวนการทำงานของเชื้อยีสต์ โดยเชื้อยีสต์นั้นจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งตามทฤษฎีแล้วในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 51.11 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.89 กรัม นอกจากนั้นยังมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้นอีก 28.7 กิโลแคลอรี่ (Kcal) ดังแสดงได้ดังสมการที่ 1

$C_6H_{12}O_6$ + ยีสต์	⟶	$2C_2H_5OH$	+	$2CO_2$ + 28.7 Kcal	(1)
(กลูโคส)		(เอทานอล)		(คาร์บอนไดออกไซด์)	
180 กรัม		2x46 กรัม		2x44 กรัม	
คิดเป็นร้อยละ100 กรัม		51.11 กรัม		48.89 กรัม	

ดังนั้นวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบสามารถนำมาใช้ในการหมักเอทานอล โดยวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และอื่นๆ และประเภทสุดท้ายคือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic material) ที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เช่น ฟางข้าว กากอ้อย และซังข้าวโพด เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบประเภทน้ำตาลที่ใช้การผลิตเอทานอล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และบีทน้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสนั้นมีขั้นตอนดังนี้ คือ ขั้นแรกน้ำตาลซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสอย่างละโมเลกุล จากนั้นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสจะถูกยีสต์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 4 โมเลกุล การหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสเป็นดังสมการที่ 2

$$\underset{\text{(ซูโครส)}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{\text{(น้ำ)}}{H_2O} \longrightarrow \underset{\text{(กลูโคส)}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{(ฟรุกโทส)}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{ยีสต์}} \underset{\text{(เอทานอล)}}{4C_2H_5OH} + 4CO_2 \quad (2)$$

342 กรัม 18 กรัม 180 กรัม 180 กรัม 4x46 กรัม 4x44 กรัม

คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับน้ำตาลซูโคส 0.5380 กรัม 0.5146 กรัม

3.2 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้งที่ใช้ในการผลิต ได้แก่ มันสำปะหลัง (ทั้งหัวมันสด และมันเส้น) ข้าวโพด ข้าว และเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นต้น โดยแป้งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำแป้งมาผ่านกระบวนการย่อย (Hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลได้ โดยปัจจุบันจะนิยมย่อยแป้งด้วยเอนไซม์มากกว่ากรด เนื่องจากสามารถควบคุมการย่อยได้ง่ายกว่าและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากกว่า การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์จะประกอบด้วยการย่อย 2 ครั้ง คือ

- การย่อยแป้งครั้งแรก (Liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (α-amylase) ย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าเด็กทรินซ์ (Dextrin)

- การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายหรือการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (Saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคอะมิเลส (Glucoamylase) ย่อยเด็กทรินซ์ที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส ให้ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำตาลกลูโคส ซึ่งยีสต์สามารถใช้หมักเป็นเอทานอลได้ โดยกระบวนการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งสามารถแสดงได้ดังสมการที่ 3

$$\underset{\text{(แป้ง)}}{H(C_6H_{10}O_5)OH} \xrightarrow[\text{น้ำ}]{\text{เอนไซม์อะไมเลส}} \underset{\text{(กลูโคส)}}{nC_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{ยีสต์}} \underset{\text{(เอทานอล)}}{2\,nC_2H_5OH + 2nCO_2} \quad (3)$$

162 กรัม (มอนอเมอร์) 180 กรัม 2x46 กรัม 2x44 กรัม

คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง 0.5679 กรัมต่อกรัม

3.3 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด และเศษไม้ เป็นต้นวัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบที่เป็น เซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึกมีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และอะราบิโนส (Arabinose)เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก กระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทั้งน้ำตาล 5 คาร์บอนและ 6 คาร์บอนก่อนที่จะเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลมีกระบวนการหลายขั้นตอน จากการศึกษาพบว่าในการเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลนั้นจะเกี่ยวข้องกับกระบวนใหญ่ๆอยู่ 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรกกระบวนการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซิ่ง และขั้นตอนที่สองคือกระบวนการหมักน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอล ในกระบวนการไฮโดรไลซิสส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์เซลลูเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและกระบวนการหมักโดยใช้ยีสต์หรือแบคทีเรีย ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อขั้นตอนไฮโดรไลซีสนั้นประกอบไปด้วยความพรุนของวัสดุ (พื้นที่ผิวที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้) ความเป็นผลึกของเส้นใยเซลลูโลสรวมถึงขนาดและส่วนประกอบของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากการมีลิกนินและเฮมิเซลลูโลสจะมีผลทำให้การเข้าถึงของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลสทำงานได้ยากขึ้น ทำให้มีผลต่อการกระบวนการไฮโดรไลซีส ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัตถุดิบจากธรรมชาติ เศษวัสดุจากอุตสากรรมและการเกษตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัตถุดิบจากธรรมชาติเศษวัสดุจากอุตสาหกรรมและการเกษตร

วัสดุลิกโนเซลลูโลส	ร้อยละของเซลลูโลส	ร้อยละของเฮมิเซลลูโลส	ร้อยละของลิกนิน
ไม้เนื้อแข็ง (hardwood stem)	40-55	24-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน (softwood stem)	45-50	25-35	25-35
เปลือกถั่ว (nut shell)	25-30	25-30	30-40
ซังข้าวโพด (corn cob)	45	35	15
หญ้า (grass)	25-40	35-50	10-30
กระดาษ (paper)	85-99	0	0-15
ฟางข้าว (wheat straw)	30	50	15
ขยะประเภทต่างๆ (sorted refuse)	60	20	20
ใบไม้ (leaves)	15-20	80-85	0
ใยเมล็ดฝ้าย (cotton seed hair)	80-95	5-20	0
กระดาษหนังสือพิมพ์ (newspaper)	40-55	25-40	18-30
ของเสียทางเคมีจากการผลิตกระดาษ (waste papers from chemical pulp)	60-70	10-20	5-10
ของเสียจากสุกร (swine waste)	6.0	28	NA
มูลวัว ควาย (solid cattle manure)	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
หญ้าคอสทอล เบอมิวดา (coastal Bermuda grass)	25	35.7	6.4
หญ้าสวิช (switch grass)	45	31.4	12.0

หมายเหตุ: NA; Not Available

ที่มา: Reshamwala *et al*. (1995); Cheung and Anderson (1997); Boopathy (1998); Dewes and Hunsche (1998)

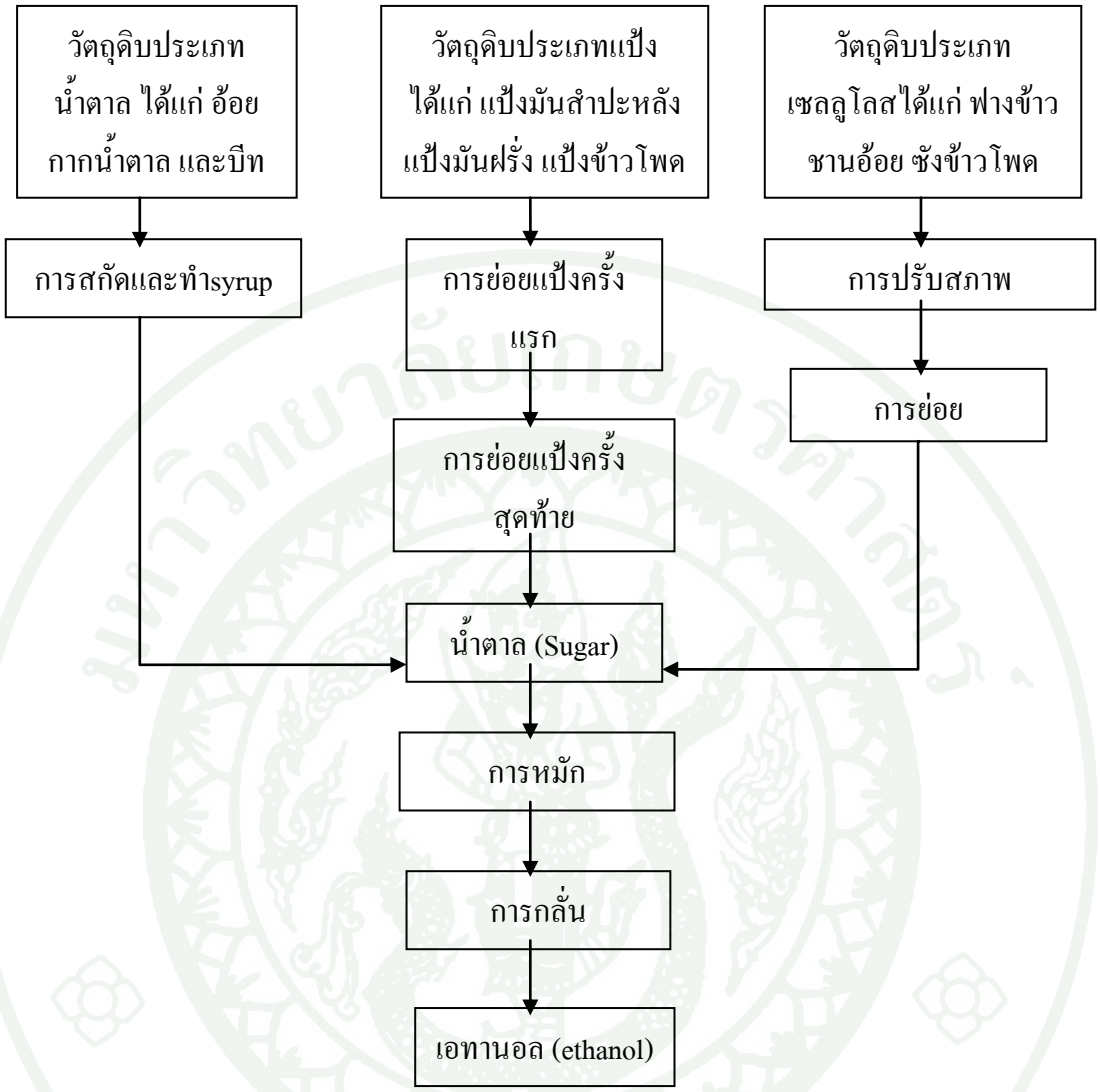
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.1 กระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นเอทานอล

ขั้นตอนแรกในการเปลี่ยนวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลคือการลดขนาดและการ ปรับสภาพของวัตถุดิบ (pretreatment) เป้าหมายของการปรับสภาพคือการเปลี่ยนแปลงหรือการกำจัดโครงสร้างและส่วนประกอบต่างๆที่เป็นตัวขวางการทำงานของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการเพิ่มอัตราการทำงานของเอนไซม์และผลของน้ำตาลที่ได้จากการหมักจากเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลส (Mosier *et al*., 2005) กระบวนการปรับสภาพนั้นเป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับกระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลส การปรับสภาพวัตถุดิบจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัสดุพวกเซลลูโลสเพื่อที่จะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ง่ายในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ในการปรับสภาพวัตถุดิบจะสำเร็จได้จะต้องมีเงื่อนไขดังนี้คือ (1) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลหรือความสามารถในการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลในกระบวนการไฮโดรไลซีส (2) หลีกเลี่ยงการย่อยสลายหรือการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต (3) หลีกเลี่ยงองค์ประกอบของการสร้างสารยับยั้งหรือต่อต้านของกระบวนการไฮโดรไลซีสและกระบวนการหมักและ (4) ความคุ้มค่าเชิงพาณิชย์ ภาพรวมของการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตรประเภทต่างๆแสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลมีกระบวนการที่สำคัญก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักให้เป็นเอทานอลด้วยจุลินทรีย์โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

- การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)
- การย่อยหรือไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตรประเภทต่างๆ

ที่มา: เจริญศักดิ์ และคณะ (2546)

3.3.1.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนคุณสมบัติทางด้านกายภาพคือทำให้ชั้นแมทริกซ์ของวัสดุลิกโนเซลลูโลสถูกทำลายซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์ที่ไปมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำงานได้ง่ายขึ้น ในการศึกษาจะแสดงให้เห็นถึงกระบวนการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรับสภาพมีความสำคัญมากที่สุดที่จะเป็นตัววัดความสำเร็จของเทคโนโลยีในการแปลงเซลลูโลส เนื่องจาก เป็นตัวช่วยแสดงให้เห็นถึงความคุ้มค่าทางพาณิชย์ในการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลได้ จุดประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบคือเป็นการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความพรุนความวัสดุ กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีอยู่ด้วยกันหลายกระบวนสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธี (วิธี ก-ง) ซึ่งแต่ละวิธีมีวิธีการปรับสภาพ ดังนี้

ก) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment)

เป็นวิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงโดยการตัด การบด การสั่น มีผลทำให้เกิดการลดผลึก (cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น ความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่ขนาดสุดท้ายของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้น

ข) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพ (Physical-chemical pretreatment)

ข.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion)

วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (McMillan, 1994) การระเบิดด้วยไอน้ำโดยส่วนใหญ่แล้วจะที่อุณหภูมิช่วง 160-260 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 0.69-4.82 เมกะปาสคาล วัตถุดิบจะถูกผสมกับไอน้ำอิ่มตัวที่ความดันสูง แล้วทำการลดความดันอย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้เกิดการแยกเอาเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากกันที่อุณหภูมิสูง โดยส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะละลายในน้ำที่ควบแน่นจากไอน้ำปัจจัยที่มีผลในกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ เวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของวัสดุตั้งต้นที่ใช้และ ปริมาณความชื้นที่อยู่ในวัตถุดิบ (Duff and Murray, 1996) จากการศึกษาพบว่าค่าที่ดีที่สุดในการละลาย เฮมิเซลลูโลสและการเกิดกระบวนการไฮโดรไลซีส สามารถเกิดได้ภายใต้เงื่อนไขสภาวะอย่างใดอย่างหนึ่งดังนี้คือสภาวะที่ใช้อุณหภูมิสูง และมีการใช้เวลาที่ต่ำ (270 องศาเซลเซียส, 1 นาที) และที่สภาวะ การใช้อุณหภูมิที่ต่ำและเวลาที่ใช้มีค่าสูง (190 องศาเซลเซียส, 10 นาที) การศึกษาของ (Wright, 1998) พบว่าที่การใช้อุณหภูมิต่ำและ เวลาที่ใช้นานกว่าพบว่าผลที่ได้มีค่าสูงการเติมกรดเช่นพวก กรดซัลฟิวริก หรือการเติม ซัลเฟอร์ไดออกไซค์ ในกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำพบว่ามีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการไฮโดรไลซีส และเป็นการลดสารที่จะเป็นตัวต่อต้านในการเกิดปฏิกิริยาอื่นที่สำคัญและยังเป็นการทำให้มีการกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้สมบูรณ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยิ่งขึ้น ข้อดีของวิธีการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ มีการสูญเสียพลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ด้วยวิธีทางกล การแปลงสภาพโดยวิธีทางกลจะใช้พลังงานสูงกว่าร้อยละ 70 เป็นที่ทราบกันดีว่าวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำนั้นจะมีผลโดยตรงกับวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เป็นไม้เนื้อแข็ง และวัตถุดิบพวกของเหลือใช้ทางการเกษตร แต่จะมีผลน้อยมากต่อวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เป็นไม้เนื้ออ่อน (Clark and Mackie, 1987) วัสดุที่ผ่านกระบวนการนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการไฮโดรไลซีส แต่ข้อจำกัดของกระบวนการนี้ก็คือในการทำลายแยกส่วนประกอบออกจากกันในส่วนของลิกนินมักเกิดไม่สมบูรณ์ และมักเกิดเป็นกลุ่มของสารประกอบที่ไปตัวยับยั้งการเกิดจุลชีพ เพราะว่าองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ถูกย่อยออกมาจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลลินทรีย์ การใช้เอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Enzymatic hydrolysis) รวมถึงการหมักด้วย เนื่องจากองค์ประกอบที่ได้จากการย่อยออกมาเป็นสารที่เป็นตัวต่อต้านและเป็นสารพิษต่อจุลินทรีย์กระบวนการไฮโดรไลซีส และกระบวนการหมักทำให้ต้องมีการล้างด้วยน้ำเพื่อทำให้สารที่เป็นพิษเหล่านี้ออกไป การล้างมีผลทำให้น้ำตาลที่ได้ถูกชะล้างหรือสูญเสียไปด้วย

ข.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammoniafiberexplosion)

วิธีการนี้ใช้แอมโมเนียที่อุณหภูมิสูงให้ความดันสูงระยะหนึ่ง แล้วทำการลดความดันลง ซึ่งมีผลต่อวัถุดิบ วัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการนี้จะมีอัตราการเป็นน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของเฮมิเซลลูโลส ได้ผลไม่ดีกับพืชที่มีลิกนินอยู่มาก ในกระบวนการนี้สามารถนำแอมโมเนียกลับมาใช้ได้ใหม่ และไม่ก่อให้เกิดตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ค) วิธีการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก

ง) วิธีทางเคมี (Chemical pretreatment)

ง.1 การทำปฏิกิริยากับโอโซน (O_3)

โอโซนสามารถใช้การแตกตัวลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุ พวกฟางข้าวได้ วิธีนี้มีจุดเด่นคือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเอาลิกนินออกได้ดี ไม่มีสารพิษที่จะไปยับยั้งการทำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิกิริยาในส่วนต่างๆ กระบวนการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ผลเสียของวิธีนี้คือค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

ง.2 การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ด่าง

การใช้ด่างในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีผลต่อวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส และผลของด่างที่ใช้ในกระบวนการแปลงสภาพจะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุนั้นด้วย (McMillan, 1994) กลไกการทำงานของด่างนั้นเชื่อว่าจะไปเพิ่มการพองตัวภายในโมเลกุลภายในต่อสายพันธะภายในของไซแลนในเฮมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อทำการกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อภายใน การใช้ด่างเจือจางในวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายในเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยา ทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส ลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ และสามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและ คาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน อย่างไรก็ตามการใช้ด่างเพื่อปรับสภาพมักจะไม่มีผลต่อวัสดุพวกไม้เนื้ออ่อนเท่าไม้เนื้อแข็ง

ง.3 การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้กรด

กระบวนการปรับสภาพโดยการใช้กรดนั้นมีจุดประสงค์คือเพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัสดุชีวมวล ชนิดของกรดที่นำมาปรับสภาพมีมากมายหลายประเภทได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก ไนตริก หรือ ฟอสฟอริก ในกระบวนการแปลงสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจางเพื่อเพิ่มการทำงานของกระบวนไฮโดรไลซีส (Palmqvist *et al*., 2002) ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบ การใช้กรดเจือจางเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจศึกษากันมากและแพร่หลายที่สุด (Mussatto *et al*., 2005) การใช้กรดเจือจางเพื่อปรับสภาพวัสดุที่อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดฟอสฟอริกมักจะถูกใช้สำหรับการเปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ตามด้วยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้เกิดเป็นกลูโคส (Silverstein *et al*., 2007) ในการใช้กรดเจือจางจะมีอยู่ 2 รูปแบบที่ใช้คือ

(1) ปริมาณสารตั้งต้นน้อย (ร้อยละ5-10 [w/w]), ที่อุณหภูมิสูง (T> 433 K) และ

(2) ปริมาณสารตั้งต้นมาก (ร้อยละ10-40 [w/w]), ที่อุณหภูมิต่ำ (T< 433 K)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยทั่วไปแล้วพบว่าเมื่อทำการปรับสภาพที่อุณหภูมิสูงและเวลาที่ใช้น้อยกว่าจะมีผลทำให้พบปริมาณไซโลสสูงและการทำงานของเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีกว่า ที่อุณหภูมิสูงการใช้กรดเจือจางพบว่ามีผลต่อการเพิ่มการย่อยเซลลูโลส ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นและความเข้มข้นที่ใช้ โดยส่วนใหญ่ร้อยละ 80 และ 95 ของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลสสามารถได้คืนมาโดยการใช้กรดเจือจางในการปรับสภาพจากการใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น นอกจากนั้นความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่ใช้เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดสารที่เป็นพิษ อุณหภูมิที่เหมาะสม (<160 องศาเซลเซียส) ได้มีการพิสูจน์ว่าเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของเฮมิเซลลูโลส ในอีกด้านหนึ่งเมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 160 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อเซลลูโลสมากกว่าซึ่งพบว่าจะมีการเกิดปริมาณน้ำตาลที่สูงและมีการสลายส่วนประกอบของลิกนิน (McMillan *et al*., 1994) การทำงานของกรดเจือจางในการแปลงสภาพจะมีผลไปยังกระบวนการไฮโดรไลซิสขององค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสที่สามารถผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การมีอยู่ของเซลลูโลส เพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์โดยที่มีการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและส่วนที่เป็นลิกนิน โดยทั่วไปแล้วการใช้กรดเจือจางผสมกับวัสดุชีวมวลและทำที่อุณหภูมิสูงที่ 160-220 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาสั้นที่ไปไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสให้เป็นไซโลสและน้ำตาลตัวอื่นและจากนั้นจะมีการทำลายไซโลสให้เป็นเฟอฟูรัล กระบวนการไฮโดรไลซีสโดยไม่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนพบว่าผลผลิตที่ได้มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 20 ในขณะที่เมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพแล้วได้ผลผลิตมากกว่า ร้อยละ90 (Hamelinck *et al*., 2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 กระบวนการปรับสภาพของวัสดุลิกโนเซลลูโลส

วิธีการปรับสภาพ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
การระเบิดด้วยไอน้ำ (ด้วย H_2SO_4, SO_2, CO_2) ทำที่ความดันไอน้ำอิ่มตัวสูงและลดความดันอย่างรวดเร็วที่160-260 องศาเซลเซียส (0.7-4.8 MPa) เป็นเวลามากกว่า 10 นาที	ได้ผลดีกับไม้เนื้อแข็ง มีข้อเสียคือไซแลนจะสลายเกิดตัวยับยั้งจุลินทรีย์	Kuznetsov *et al*., (2002)
การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (NH^+_3) ใช้แอมโมเนียที่อุณหภูมิสูงให้ความดันสูงระยะหนึ่ง แล้วทำการลดความดันลง 1-2 กรัม แอมโมเนียต่อกรัมน้ำหนักแห้งที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	สูญเสียไซแลนน้อยกว่าการระเบิดด้วยกรดไม่มีการสร้างสารยับยั้งแต่ไม่ค่อยได้ผลต่อส่วนของลิกนินและได้แอมโมเนียคืนกลับมา	Holtzapple *et al*., (1991)
ไฮโดรไลซิสด้วยกรด ใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง(H_2SO_4) กรดไฮโดรคลอลิก (HCI)	มีผลต่อการแยกองค์ประกอบของเส้นใย โดยพบว่ากรดสามารถแยกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดี ส่วนลิกนินพบว่าสามารถแยกได้ดีในสารละลายด่าง	Mishima *et al*., (2008) Ragg *et al*., (1987) Carrasco *et al*., (1992)
ไฮโดรไลซิสด้วยด่าง ใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ $Ca(OH)_2$และแอมโมเนีย (NH_3)	มีผลต่อการทำลายส่วนลิกนินและเอสเทอร์ เพิ่มพื้นที่ผิวในการทำปฏิกิริยา	Fan *et al*., (1987) Chang *et al*., (1998) Kaar *et al*., (2000)
วิธีการทางชีวภาพ ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์	สูญเสียพลังงานน้อยและช่วยลดความเป็นผลึก	Costa *et al*., (2002) Crawford *et al*., (1984)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.1.2 ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

เมื่อกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบเสร็จสิ้นลง เซลลูโลสจะถูกเตรียมขึ้นมาสำหรับกระบวนการไฮโดไลซีสนั่นคือการทำให้โมเลกุลเซลลูโลสแตกตัวออกโดยการใช้น้ำดังแสดงในสมการที่ 4 (Vessia *et al*., 2005)

$$(C_6H_{12}O_5)_n + nH_2O \longrightarrow nC_6H_{12}O_6 \qquad (4)$$

ปฏิกิริยานี้จะถูกเร่งด้วยกรดเจือจาง, กรดเข้มข้นหรือจะเป็นเอนไซม์เซลลูเลสก็ได้ ซึ่งการใช้เอนไซม์จะมีข้อได้เปรียบมากกว่าเมื่อใช้สภาวะปานกลาง (พีเอช = 4.8 และอุณหภูมิ 318-323 K) จะให้ผลที่มีค่าสูงและค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กรดหรือเบสขั้นตอนในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสจะได้น้ำตาลกลูโคสออกมามีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมาหลายปี โดยส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการใช้เอนไซม์หรือไม่ก็เป็นกรดในการทำปฏิกิริยา จากการทดลองผ่านมา เอนไซม์มักจะมีราคาสูงในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ส่วนกรดจะมีราคาถูกกว่า ถึงแม้ว่าค่าใช้จ่ายในการกำจัดกรดภายหลังจะสูงมากแต่ถ้าเทียบกับเอนไซม์ก็ยังมีราคาต่ำกว่า แต่ข้อเสียของกรดก็คือเมื่อทำที่อุณหภูมิสูงแล้วกรดจะไปมีผลทำลายทำให้การเกิดกลูโคสน้อยลง

- การไฮโดรไลซิสด้วยกรด

จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าภายใต้สภาวะที่ถูกควบคุม การไฮโดรไลซีสด้วยกรดของวัสดุลิกโนเซลลูโลสจะสามารถผลิตไซโลสจากไซแลนโดยที่จะไม่เปลี่ยนเซลลูโลสิกและบางส่วนของลิกนิน(ยังเหมือนเดิม) ไซแลนจะเป็นส่วนที่ไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแม้มีปริมาณกรดน้อยเนื่องจากมันมีโครงสร้างเป็นแบบอะมอฟัสต์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลลูโลสที่ต้องใช้สภาวะที่รุนแรงกว่าเนื่องจากมันเป็นโครงสร้างที่เป็นผลึก (Rahman, 2007) การไฮโดรไลซีสด้วยกรดจากอ้อยที่ประกอบด้วยไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ในระหว่างกระบวนไฮโดรไลซีสด้วยกรดไซโลสจะถูกสลายอย่างรวดเร็วไปเป็นเฟอฟูรัลและผลผลิตอื่นๆ ซึ่งผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายนี้จะเป็นตัวยับยั้งต่อพวกจุลินทรีย์ต่างๆ ตัวยับยั้งเหล่านี้จะมีผลกระทบที่ต่างกันอย่างพวกเฟอฟูรัล, 5-ไฮดรอกซีเฟอฟูรัลจะมีผลต่อการเติบโตของยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Rao Rs *et al*., 2007) การใช้กรดที่มีความเข้มข้นมากจะไปมีผลทำให้ลดการเป็นผลึกของเซลลูโลสซึ่งถือว่าเป็นข้อดีแต่ข้อเสียก็คือการสูญเสียน้ำตาลออกไปทำให้น้ำตาลที่ได้มีค่าน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

ในการใช้เอนไซม์ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสนั้นจะต้องมีความเฉพาะเจาะจงสูง ถึงจะมีผลดีต่อกระบวนการ ผลผลิตของกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ส่วนใหญ่คือ น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งโดยส่วนใหญ่คือกลูโคส ค่าใช้จ่ายในกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับการไฮโดรไลซีสด้วยกรดหรือด่างเพราะว่าการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์จะทำในสภาวะที่เป็นกลาง (พีเอช = 4.8 และอุณหภูมิ 318-323 K) และมักจะไม่เกิดการปัญหากัดกร่อน การเกิดตัวยับยั้งกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เป็นที่นิยมในปัจจุบันเนื่องจากผลผลิตที่ได้มีค่ามากและดีกว่าการไฮโดรไลซีสด้วยกรดหรือด่างและเอนไซม์ที่ผลิตมีค่าลดต่ำลงเนื่องจากความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทางชีววิทยามีเทคโนโลยีอยู่สองแบบที่ได้รับการพัฒนาในปัจจุบันคือ การใช้เอนไซม์และวิธีการเปลี่ยนจุลินทรีย์โดยตรง การไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจะเป็นขั้นตอนที่ช้ามากเพราะว่ามีการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสเป็นตัวขัดขวาง โดยโครงสร้างของสารตั้งต้นเองเช่น ลิกนินและส่วนของเฮมิเซลลูโลส, พื้นที่ผิว, และความเป็นผลึก (Pan, 2006) เนื่องจากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์จะมีผลทำให้เกิดการละลายของกลูแคน และรูปแบบบางอย่างของการปรับสภาพที่ไปเพิ่มน้ำตาลจากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ การปรับสภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะมีผลทำให้มีส่วนของเซลลูโลสเหลืออยู่เหมือนเดิมเกือบจะทั้งหมดซึ่งใกล้เคียงกับทฤษฎี (Zhang *et al*., 2006) การย่อยเซลลูโลสขั้นต้นเกิดจากการที่โมเลกุลถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์เซลลูเลสเอนไซม์จะย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้แต่ข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์เกิดจากการที่สับเสรตละลายน้ำได้น้อย เมื่อย่อยได้ก็จะถูกย่อยต่อจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลโมเลกุลคู่

4. ลักษณะของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์

การหมักแอลกอฮอล์เป็นกรรมวิธีที่รู้จักกันมานาน เนื่องจากปัญหาพลังงานทำให้เทคโนโลยีการผลิตแอลกอฮอล์ก้าวหน้าไปอย่างมาก มีการค้นคว้าวิจัยหลายแนวทางโดยมีวิธีการที่แตกต่างกันออกไป แต่ทั้งนี้ก็เพื่อหาทางลดต้นทุนการผลิตลงให้มากที่สุด เทคโนโลยีการหมักแอลกอฮอล์แบ่งออกเป็น ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1 การหมักแบบกะ (Batch Fermentation)

เป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่องซึ่งทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปในระบบแล้วจะไม่มีการเติมสารอาหารใดๆเพิ่มลงไปอีก ในการหมักแต่ละชุดต้องมีการเตรียมเชื้อตั้งต้นใหม่ทุกครั้ง ถ้าคิดเฉพาะช่วงเวลาของการหมักใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 8 -10 เป็นวิธีที่ใช้กันมากในโรงงานอุตสาหกรรม โดยเป็นถังสำหรับใส่สารอาหารและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแล้วกวนให้ผสมกัน มีการควบคุมอุณหภูมิ ความเป็นกรด ด่างเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น จนได้ผลผลิตตามที่ต้องการ จึงถ่ายออกเพื่อนำไปแยกแอลกอฮอล์ให้บริสุทธิ์อีกขั้นตอนหนึ่ง

ข้อดี	ข้อเสีย
- เหมาะกับการผลิตที่มีปริมาตรไม่มากนัก - ในการหมักแต่ละครั้ง ยีสต์ที่ใช้มีความแข็งแรงและว่องไวดี ทั้งนี้เพราะต้องเตรียมยีสต์ขึ้นใหม่เสมอทำ ให้การผ่าเหล่า (Mutation)เกิดขึ้นยาก - การควบคุมให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดช่วงการหมักทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน	- ต้องเตรียมยีสต์เริ่มต้นและวัตถุดิบทุกครั้งของการหมักแต่ละชุด ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก - ต้องเสียเวลาเพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง

4.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch Fermentation)

กระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องหรือเป็นช่วงๆ เพื่อให้ จุลินทรีย์เจริญและใช้อาหารได้อย่างเต็มที่ หลังจากที่ใส่เชื้อเริ่มต้นแล้วโดยไม่มีการถ่ายออกซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์แบบครั้งคราวตรงที่ปริมาตรอาหารในการหมักแบบกึ่งกะจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่ส่วนการเลี้ยงแบบต่อเนื่องนั้นปริมาตรอาหารคงที่แม้ว่าจะเติมอาหารด้วยปริมาตรเท่าใดอาหารเก่าพร้อมกับเซลล์จุลินทรีย์ก็จะถูกดึงออกมาด้วยปริมาตรเท่ากันภายในเวลาเดียวกัน การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้เพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอยาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation)

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด จำนวนจุลินทรีย์จะถูกรักษาระดับสมดุลโดยการกำจัดน้ำหมักออกไปบางส่วนแล้วแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ในอัตราการไหลเดียวกัน คือ มีการเติมอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากเซลล์ตลอดเวลา ทำให้จุลินทรีย์เพิ่มได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในด้านอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข้อดี	ข้อเสีย
- สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้ - สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและการก่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่ - สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่โดยการแปรค่าอัตราเจือจาง (dilution rate)	- ไม่เหมาะกับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ - การเจริญแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์เกิดจากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้เร็วกว่า - การเจริญในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อน

4.4 กระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยให้เป็นน้ำตาลแยกกับการหมัก (separate hydrolysis and fermentation; SHF)

ในระบบนี้จะเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อน จากนั้นจึงจะหมักน้ำตาลให้เป็น เอทานอล โดยใช้เซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพให้เป็นน้ำตาลแล้ว สามารถทำการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสโดยใช้กรดและเอนไซม์ โดยการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น จุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ โปรโตซัว แบคทีเรีย แอคติโนไมซิส และเชื้อรา เป็นต้น ลักษณะการย่อยสลายโดยเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์และเซลลูโลส ซึ่งจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง น้ำตาลกลูโคสจะไม่ถูกสลายต่อไป ส่วนการย่อยสลายด้วยกรด เช่น การใช้กรดซัลฟูริคเข้มข้นร้อยละ 70 หรือมากกว่า กรดไฮโดรคลอริคร้อยละ 40 หรือมากกว่าเครื่องมือจะต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ซึ่งเครื่องมือประเภทนี้จะมีราคาแพง นอกจากนี้โครงสร้างที่เป็นผลึกจำเป็นต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงและต้องใช้อุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15-20 นาที ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่น เช่น furfural และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ จากนั้นเมื่อได้น้ำตาลที่ต้องการจากการย่อยสลายแล้วจึงนำไปใช้ในกระบวนการหมักน้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลต่อไป (Cantarella *et al*., 2004)

4.5 กระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยให้เป็นน้ำตาลพร้อมกับการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation; SSF)

จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับเชื้อยีสต์ โดยที่เอนไซม์เซลลูเลสจะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นวัสดุหมักให้เป็นน้ำตาลจากนั้นยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นเอทานอลต่อเนื่องไปจนสิ้นสุดกระบวนการ ซึ่งก็คือการทำให้จุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลในเวลาเดียวกัน เป็นการลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเอทานอลก่อนการหมัก รวมทั้งช่วยประหยัดพลังงานในกระบวนการผลิตด้วย

Mishima *et al*., (2008) ได้ศึกษากระบวนการย่อยผักตบชาวและจอกน้ำให้เป็นน้ำตาล และทำการเปรียบเทียบกระบวนการหมักของ 2 วิธีคือการย่อยร่วมกับการหมัก simultaneous saccharification and fermentation mode (SSF) และการย่อยแบบแยกกับการหมัก separated hydrolysis and fermentation mode (SHF) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2346 สามารถผลิตเอทานอลจากผักตบชวาและจอกน้ำได้ 14.4 และ 14.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้สายพันธุ์แบคทีเรียลูกผสม *Escherichia coli* KO11 ผลิตเอทานอลจากผักตบชวาและจอกน้ำได้ 16.9 และ 16.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าการย่อยร่วมกันกับการหมัก simultaneous saccharification and fermentation mode (SSF) ใช้ระยะเวลารวมที่สั้นกว่าและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการย่อยแบบแยกกับการหมัก separated hydrolysis and fermentation mode (SHF)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.ยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลส (xylose-fermenting yeast)

โดยอาศัยลักษณะการหมักเอทานอลจากไซโลสสามารถแบ่งยีสต์ ออกเป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ยีสต์ที่ไม่สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสทั้งในสภาพที่มีและไม่ออกซิเจนเนื่องจากยีสต์กลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ไซโลสรีดักเตส และเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ตัวอย่างเช่น *Saccharomyces* spp. *S. cerevisiae* (Kotter and Ciriacy, 1993; Jeffries, 1990)

กลุ่มที่ 2 ยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสเฉพาะในสภาพที่มีออกซิเจน โดยยีสต์กลุ่มนี้มีเอนไซม์ไซโลสรีดักเตสที่ใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์ (co-enzyme) และเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสที่ใช้ NAD เป็นโคเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น *Candida utilis* และ *C. tropicalis* เป็นต้น (Jeffries, 1982)

กลุ่มที่ 3 ยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ยีสต์กลุ่มนี้มีเอนไซม์ไซโลสรีดักเตส ที่ใช้ทั้ง NADPH และ NADH เป็นโคเอนไซม์ ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสที่ใช้ NAD เป็นโคเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น *Pachysolen tannophilus* *Pichia stipitis* *Candida shehatae* และ *C. tenuis* เป็นต้น (Deverell, 1983; Jeffries, 1982; Linko *et al*., 1986; Jeffries, 1990; Slininger, 1982)

6. เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์ที่ให้เอทานอล

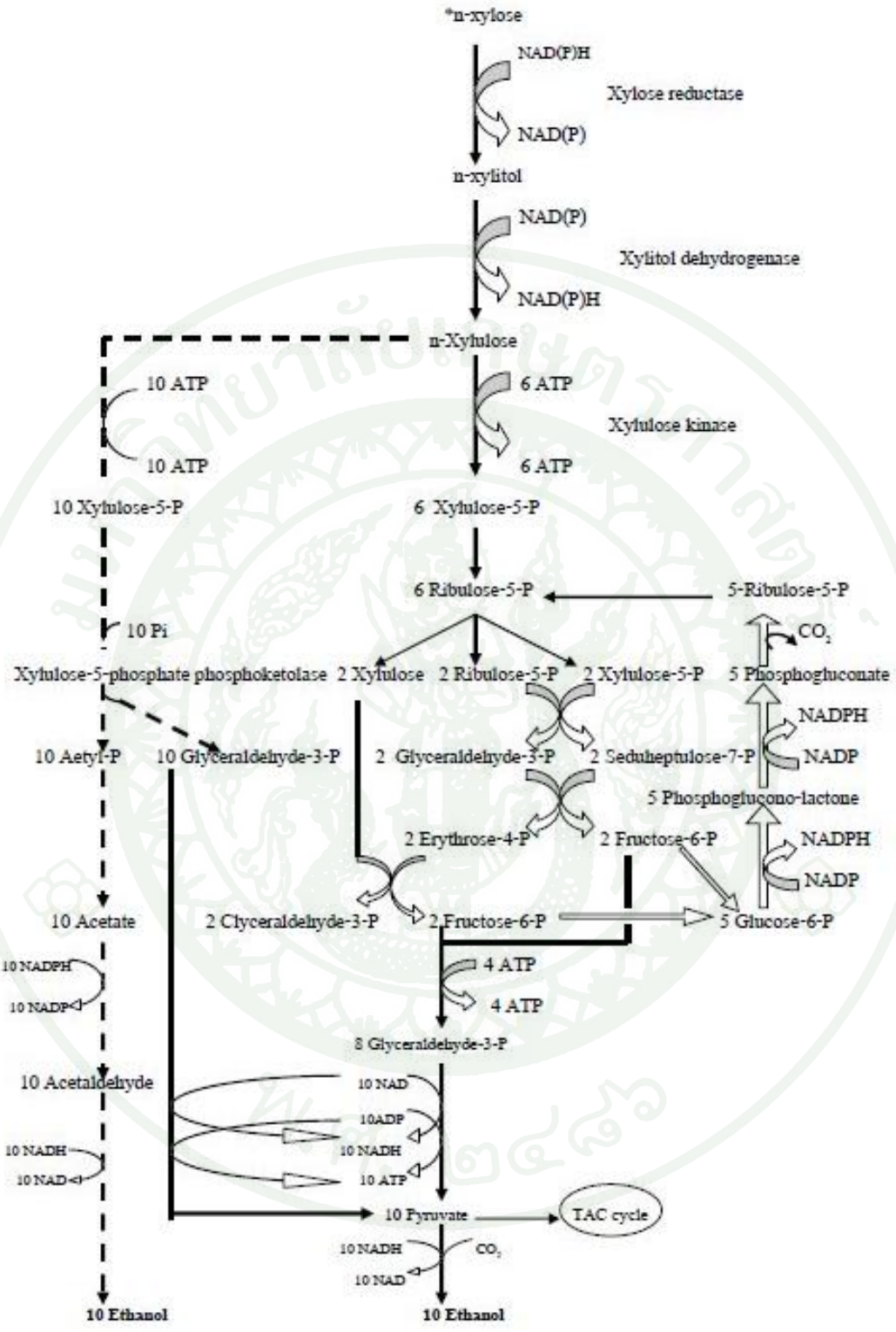
ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต โดยมียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถหมักไซโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส และได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอล ตัวอย่างยีสต์ที่หมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส เช่น *P. Stipitis* (Linko *et al*., 1986) *Pa. tannophilus* (Fanta *et al*., 1984) และ *C. shehatae* (Parekh *et al*., 1986) การหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสจะอาศัยวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) ปฏิกิริยาเริ่มจากไซโลสจะถูกรีดิวส์โดยการเร่งของเอนไซม์ไซโลสรีดักเตส ที่มี NADPH หรือ NADH เป็นโคเอนไซม์ไปเป็นไซลิทอล จากนั้นไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นไซลูโลสโดยการเร่งของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส โดยมี NAD เป็นโคเอนไซม์จากนั้นไซลูโลสจะเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอรีเรชั่น โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าที่โมเลกุลของไซลูโลสเกิดเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต โดยการเร่งของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไซลูโลไคเนส (xylulokinase) จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ที่ได้อาจเข้าสู่วิถีที่แตกต่างกัน 2 วิถี คือ วิถีฟอสฟอคีโตเลท(phosphoketolate bypass) และวิถีเพนโตสฟอสเฟต (Jeffries, 1982)

กรณีที่ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต จะเกิดปฏิกิริยาหลายขั้นตอน โดยอาศัยการเร่งของเอนไซม์ ribulose-3-epimerase ribose-phosphate isomerase transaldolase และ transketolase ได้เป็น glyceraldehyde-3-phosphate และ fructose-6-phosphate จากนั้นจะเข้าสู่วิถีไกลคอลิซิส (glycolysis) และวิถีการหมักเอทานอล (ethanol fermentation) ได้เป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนในกรณีที่ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต เข้าสู่วิถีฟอสฟอคีโตเลท ไซลูโลสจะถูกเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphate และ acetyl phosphate โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟอสฟอคีโตเลส (phosephoketolase) (Jeffries, 1990; Rizzi *et al*., 1988; Ditzelmuller *et al*., 1984) glyceraldehyde-3-phoaphate ที่จะเข้าสู่วิถีไกลคอลิซิลได้เป็นไพรูเวท ซึ่งอาจเปลี่ยนต่อไปเป็นเอทานอล หรือเข้า tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) (Prior *et al*., 1989) วิถีเมแทบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์ แสดงในภาพที่ 9

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

ที่มา: Prior *et al*. (1989)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอลจากไซโลส

มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการหมักเอทานอลจากไซโลส เช่น

7.1 ความเข้มข้นของไซโลส

ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์จะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของยีสต์ และสภาพแวดล้อมอย่างอื่น โดยความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสที่เหมาะสมเท่านั้นยีสต์จึงจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสสูงเกินหรือต่ำเกินไป ปริมาณของเอทานอลที่ผลิตจะลดลง เช่น ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ *Pachysolen tannophilus* Y-2460 *Pichia stipitis* Y-7124 *P. stipitis* Y-11545 และ *C. shehatae* Y- 12856 ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 50 50 100 200 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Slininger *et al*., 1982)

7.2 ความเข้มข้นของเอทานอล

ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ โดยมีรายงานว่า *C.shehatae* CBS 5712 ให้เอทานอลสูงสุด 25 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *C.shehatae* ATCC 22984 ให้เอทานอลสูงสุด 100 กรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาใน *P.stipitis* ก็ให้ผลเช่นเดียวกันโดย *P. stipitis* CBS 5776 ให้เอทานอลสูงสุด 33 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *P.stipitis* CBS 5773 ให้เอทานอลสูงสุดถึง 57 กรัมต่อลิตร (Slininger *et al*., 1982) จากข้อมูลสามารถอธิบายได้ว่า การทนต่อเอทานอลของยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันและสภาวะในการการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันซึ่งมีผลต่อการทนความเข้มข้นของเอทานอลของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวด้วย

7.3 ชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาผลของชนิด และปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการหมักเอทานอลจากไซโลสโดยยีสต์ พบว่า *Pa. tannophilus* สามารถใช้ยูเรีย แอมโมเนียซัลเฟต และไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน แต่ถ้าในสภาพขาดออกซิเจน อัตราการหมักเอทานอลจะลดลง ส่วน *C. shehatae* ATCC 22984 ไม่สามารถใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ถ้าใช้กรด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แคสอะมิโน (casamino acid) เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะมีอัตราการหมักเอทานอลที่สูงขึ้น (Jeffries, 1985)

7.4 ค่าพีเอช (pH)

ค่าพีเอช เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการหมักเอทานอลจากไซโลส โดยยีสต์แต่ละชนิดจะมีพีเอช ที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากไซโลสแตกต่างกัน อีกทั้งถ้าสภาพแวดล้อมต่างกัน แม้เป็นยีสต์ชนิดเดียวกัน พีเอชที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากไซโลสจะแตกต่างกัน (Slininger *et al*., 1982) พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากไซโลสของ *Pa. tannophilus* NRRL-Y2460 เท่ากับ 2.5 (Prior *et al*., 1989) พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากไซโลสของ *C. shehatae* CBS 2779 และ *P. stipitis* CBS 7126 คือ 4.0-5.5

7.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการหมักเอทานอลจากไซโลส โดย Slininger *et al*., (1982) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการหมักเอทานอลจากไซโลสของ *Pa. tannophilus* NRRL-Y2460 คือ 32 องศาเซลเซียส (คมสัน, 2530) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการหมักเอทานอลจากไซโลสของ *P. stipitis* CBS 5773 คือ 30 องศาเซลเซียส

7.6 ออกซิเจน

ในการหมักเอทานอลจากไซโลส การให้ออกซิเจนมากเกินไปหรือน้อยเกินไปมีผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ลดลง ยีสต์หลายชนิดสามารถหมักเอทานอลจากไซโลสได้ทั้งในสภาพไม่มีออกซิเจน มีออกซิเจน และสภาพที่มีออกซิเจนจำกัด แต่ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะแตกต่างกัน มีรายงานที่ศึกษาถึงสภาพการให้ออกซิเจน ไม่ให้ออกซิเจน และสภาพมีออกซิเจนจำกัดต่อการหมักเอทานอลของยีสต์เช่น *C. shehatae* CSIR-Y 492 พบว่าในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัด ปริมาณเอทานอลที่เชื้อผลิตได้สูงสุด (du Preeze and Van der Walt, 1983; du Preeze *et al*., 1983) เช่นเดียวกับเชื้อกลายพันธุ์ของ *Candida* sp. XF217 (Baillargeon *et al*., 1983) ทั้งนี้เนื่องจากสภาพที่ให้ออกซิเจนมากเกินไป ทำให้อัตราการหายใจของเซลล์ และปริมาณของเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการหมักเอทานอลลดลง (Debus *et al*., 1983)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ คือ การกำจัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยที่เซลล์จุลินทรีย์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน (Karel *et al*., 1985) และยังสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง สภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นอาจจะกำลังเจริญ กำลังพักตัวหรือตายก็ได้ โดยที่ระบบเอนไซม์หรือ biocatalyst ไม่ล้มเหลว การตรึงเซลล์จุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 5 วิธีการดังนี้

8.1 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีดูดซับ (adsorption method)

เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับอยู่กับสารที่เป็นตัวนำของแข็ง ซึ่งแรงยึดระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับผิวของแข็งอาจจะเป็นพันธะไอออนิก พันธะไฮโดรโฟบิก หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักธรรมชาติทางเคมี เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิมิลิก (diaminopimelic acid) และ เฮกโซซามีน (hexosamine) ซึ่งสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุกับตัวนำที่ใช้ได้ โดยแรงดูดซับจะขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของเซลล์ รวมทั้งปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง การตรึงเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อน และมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความกรด-ด่าง ความแรงของไอออน การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์ แต่ก็อาจปรับปรุงแรงดูดซับให้สูงขึ้นได้โดยทำการเชื่อมไขว้หลังการดูดซับ นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ยังมีอัตราการดูดซับเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยของตัวนำค่อนข้างต่ำ แต่ก็อาจแก้ไขได้โดยการใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับ

8.2 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีพันธะโควาเลนท์ (covalent binding method)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์เนื่องจากได้ผลดี แต่ไม่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สารเคมีซึ่งมักมีพิษ จึงอาจทำให้เซลล์ตายและเอนไซม์ถูกทำลายได้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารพาหะ โดยสารที่ใช้เป็นตัวยึดจับนั้นสามารถเชื่อมต่อกับหมู่อะตอมซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ผิวเซลล์ เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ซัลฟ์ไฮดริล หมู่อิมมิดาโซล หรือหมู่ฟีนอล ของโปรตีน วิธีนี้มี ข้อดีคือ เซลล์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย แต่ก็มีข้อเสีย คือ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง เนื่องจากการสร้างพันธะโควาเลนท์ตามปกติจำเป็นต้องใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารตัวนำที่มีการดัดแปลงโดยใช้สารเคมี ซึ่งมักจะมีความเป็นพิษและอาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียวและเอนไซม์ที่ต้องการเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการเตรียม

8.3 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการเชื่อมไขว้ (Cross linking method)

เป็นการใช้สารเคมีเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าไว้ด้วยกัน โดยใช้สารเคมีพวก glutaraldehyde toluene การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ใช้ปฏิกิริยาที่ต่างกัน ได้แก่ เชื่อมเซลล์กับสารตัวกลาง ดูดเกาะเซลล์ที่ผิวหน้าสารยึดเกาะเชื่อมเซลล์กับเซลล์ หรือการกักเซลล์ไว้ในสารที่มีรูพรุน

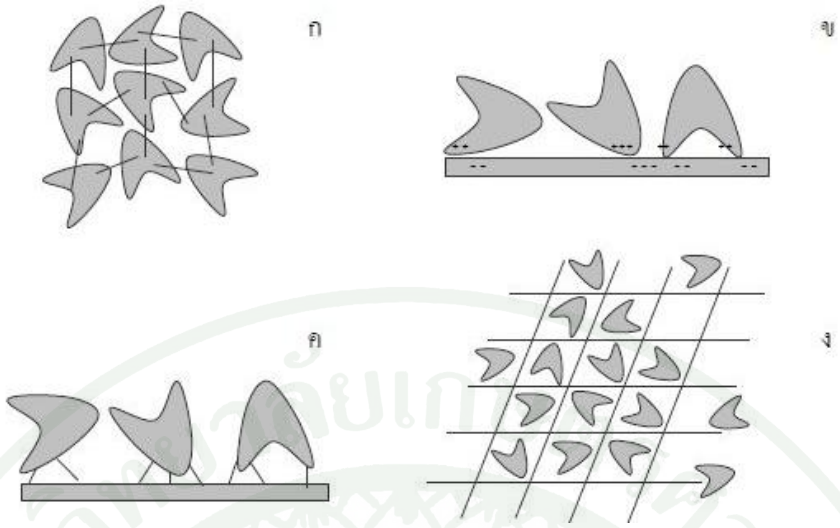
8.4 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับ (Entrapment method)

เป็นวิธีการตรึงเซลล์ในสารประกอบพวกเจลที่จับกันเป็นโพลิเมอร์ มีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็กกันเซลล์หลุด แต่วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ต้องผ่านออกมาได้ วิธีนี้นิยมใช้มากแต่พบปัญหาคือเกิดปฏิกิริยาช้าเพราะมีเจลกั้น ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยใช้ glutaraldehyde เชื่อมไว้

8.5 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการรวมตัวของเซลล์ (self aggregation by flocculation)

เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยอาศัยการรวมตัวของเซลล์ เซลล์จะถูกเชื่อมกับเซลล์ด้วยแรงพันธะอ่อน การตรึงเซลล์วิธีนี้มีข้อเสีย คือเซลล์บางส่วนอาจหลุดได้ เพราะไม่มีการใช้สารอื่นช่วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

ก.การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการเชื่อมไขว้

ข.การตรึงเซลล์ด้วยวิธีดูดซับ

ค.การตรึงเซลล์ด้วยวิธีพันธะโควาเลนท์

ง.การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับ

ที่มา: Bicherstaff (1997)

การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

คุณสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์โดยทั่วไปพิจารณาจาก (ภาวิณี, 2531)

1.1 ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ และสิ่งแวดล้อม

1.2 ไม่กระทบกระเทือนต่อระบบเมแทบอลิซึม

1.3 ความจุของสารพาหะ และการตรึง

1.4 การตรึงเซลล์ในสภาวะปลอดเชื้อ จะต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนได้สูง เนื่องจากต้องทำให้สารพาหะนั้นปลอดเชื้อซึ่งต้องใช้อุณหภูมิ และความดันสูง

1.5 การตรึงเซลล์ปริมาณมากควรจะเลือกใช้สารพาหะที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ เพื่อช่วยให้สารอาหารผ่านได้ดีขึ้น

1.6 เป็นสารพาหะที่มีราคาถูก และสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่4 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการต่างๆ

Method	Support/Reagent	Cell type	Product
Adsorption	Fritted glass	*Escherichia coli*	Biomass
	Glass fiber pads	*Zymomonas mobilis*	Ethanol
	Wood chip	*Saccharomyces cerevisiae*	Ethanol
	Anionic ion Exchange	*Saccharomyces cerevisiae*	Ethanol
Covalent Binding	Cellolose	*Saccharomyces cerevisiae*	Ethanol
	Aminopropyl silica	*Saccharomyces cerevisiae*	Ethanol
	Metal hydroxides	*Acetobacter*	Acetic acid
Flocculation	Chitosan	*Lactobacillus brevis*	Glucose isomerase
	Polyelectrolytes	*Saccharomyces cerevisiae*	Invertase
Cross linking	Glutaraldehyde	*Streptomyces oblivaceus*	Glucose isomerase
	Formaldehyde	*Ascophyllum nodosum*	Metal Adsorption
	Diazotized benzidine	*Streptomyces* sp	Glucose isomerase
Entrapment	Polyacrylamine	*Saccharomyces cerevisiae*	Ethanol
	Alginate	*Saccharomyces cerevisiae*	Invertase
	Sodium alginate	*Saccharomyces cerevisiae*	Ethanol
	Agarose	*Antinoplanes missourensis*	Glucose isomerase
	Kappa-carrageenan	*Bacillus amyloliquifaciens*	α -amylaes

ที่มา: Hashimoto and Furukawa, (1987); Gourdun and Rus, (1990); Klien and wagner, (1983); Grobillotn *et al.,* (1994) and Scragg, (1988)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9.ถังชีวปฏิกรณ์ (bioreactor)

9.1 รูปแบบของถังชีวปฏิกรณ์ที่ใช้ในระบบการหมัก
สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด คือ

9.1.1 ถังชีวปฏิกรณ์แบบถาด (tray bioreactor)

มีภาพแบบที่ง่าย แต่ควบคุมสภาวะในการหมักได้ยาก มีข้อจำกัดในเรื่องขนาดของถาด ใช้พื้นที่และแรงงานมาก ปริมาณผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำ บริเวณกลางถาดจะมีอุณหภูมิสูงและขาดออกซิเจน (Sangsurasak and Mitchell, 1996)

9.1.2 ถังชีวปฏิกรณ์แบบหมุน (rotating drum bioreactor)

ประกอบด้วยภาชนะบรรจุภาพทรงกระบอกแนวนอนหรือเอียงติดอยู่บนลูกกลิ้งที่ทำ หน้าที่เป็นตัวยึดและหมุนถังชีวปฏิกรณ์ การผสมกันภายในถังเกิดขึ้นโดยการกลิ้งหรือหมุนถังชีวปฏิกรณ์อย่างช้าๆ อาจมีเหล็กกั้นในถังเพื่อช่วยในการกวนอาหาร สำ หรับถังชีวปฏิกรณ์ชนิดนี้มักพบปัญหาการรวมตัวเป็นก้อนของอาหาร หรืออาจเกิดการสึกกันระหว่างอนุภาคเป็นผลทำให้จุลินทรีย์ตาย นอกจากนี้การควบคุมอุณหภูมิสามารถทำ ได้ยากเนื่องจากไม่สามารถระบายความร้อนด้วยระบบน้ำหล่อเย็นเหมือนถังชีวปฏิกรณ์แบบแพคเบด

9.1.3 ถังชีวปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed-bed bioreactor)

ถังชีวปฏิกรณ์ชนิดนี้จะบรรจุอาหารให้อยู่กับที่ในคอลัมน์ทรงกระบอกสูง มีแผ่นเพลทมีรูรองรับอยู่ที่ด้านล่างของหอซึ่งจะมีการอัดอากาศชื้นไหลผ่านรูขึ้นมาผ่านแพคเบดแล้วไหลออกทางด้านบน ถังชีวปฏิกรณ์แบบแพคเบดนี้มีข้อดีคือสามารถควบคุมตัวแปรของระบบได้ดีกว่าแบบถาด การควบคุมอุณหภูมิสามารถทำได้โดยปรับปริมาณและอุณหภูมิของอากาศที่ไหลเข้า นอกจากนี้ยังมีสัดส่วนปริมาณวัสดุหมักต่อปริมาตรของถังชีวปฏิกรณ์สูงกว่าถังแบบหมุนทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9.1.4 ถังชีวปฏิกรณ์แบบมีใบกวน (stirred bioreactor)

มีลักษณะเหมือนถังชีวปฏิกรณ์แบบหมุนแต่จะมีใบกวนสำ หรับผสม ซึ่งใบกวนจะทำ ลายเส้นใยของเชื้อราทำ ให้มีผลต่อการเจริญของราบางสายพันธุ์ (Beizhong *et al*., 1999)

9.1.5 ถังชีวปฏิกรณ์แบบฟลูอิไดซ์เบด (air-solid fluidized bed bioreactor)

ลักษณะของถังชีวปฏิกรณ์เป็นหอสูง มีอากาศอัดผ่านทางด้านล่างด้วยความเร็วที่ทำ ให้อาหารลอยตัวได้ แต่การควบคุมสภาวะในการหมักทำ ได้ยากลักษณะของถังชีวปฏิกรณ์แต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 1 และจากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าถังชีวปฏิกรณ์แบบแพคเบดเหมาะต่อระบบการหมักแบบแห้งและมีศักยภาพสูงในการพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรม

9.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (media preparation) (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในระบบการหมักแบบแห้ง แตกต่างจากที่ใช้ในระบบการหมักในสภาพอาหารเหลว เนื่องจากต้องการเพียงวัตถุดิบซึ่งมักจะมีสารอาหารที่จำ เป็นเพียงพอต่อกระบวนการหมักอยู่แล้ว หรืออาจต้องการเพิ่มอีกเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ในบางครั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักยังติดมากับวัตถุดิบอีกด้วย และวัตถุประสงค์ในการเตรียมวัตถุดิบเพื่อเปลี่ยนสภาพทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์สามารถนำ ไปใช้ได้และเอื้ออำนวยต่อสภาวะในการหมัก

9.3 การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ (culture inoculation) (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

ก่อนที่กระบวนการหมักจะเริ่มต้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับสภาพไว้แล้ว ซึ่งในระบบการหมักแบบแห้งจะใช้หัวเชื้อในรูปของสปอร์

9.4 การส่งถ่ายมวล (mass transfer) (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

ข้อจำกัดสำหรับขั้นตอนการส่งถ่ายมวลในระบบการหมักแบบแห้งสามารแบ่งออกได้เป็น 2 ประการคือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9.4.1 การส่งถ่ายมวลระหว่างอนุภาค (interparticle mass transfer)

9.4.2 การส่งถ่ายมวลภายในอนุภาค (intraparticle mass transfer)

9.5 การส่งถ่ายความร้อน (heat transfer) (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

ในระหว่างการหมักจะมีการสะสมความร้อนซึ่งเกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารของจุลินทรีย์ มีผลทำ ให้อุณหภูมิในถังชีวปฏิกรณ์สูงขึ้น และไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์รวมไปถึงการทำ งานของเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมการให้อากาศเพื่อลดอุณหภูมิควบคู่ไปกับการควบคุมปริมาณความชื้นหรือความชื้นสัมพัทธ์ด้วย

9.6 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ (product recovery) (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักสามารถใช้วิธีการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอาหารเหลว ทั้งนี้ขึ้นกับลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้และความต้องการที่สำคัญ เช่น ถ้าผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำ ไปใช้ได้โดยตรงอาจใช้วิธีการทำแห้ง (drying) โดยไม่ต้องแยกน้ำออกมาก่อน แต่ถ้าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นเอนไซม์จะต้องทำ การสกัดเอนไซม์ออกมา ซึ่งสามารถทำได้โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 11 ลักษณะของถังหมักชีวภาพชนิดต่างๆ ที่ใช้ในระบบการหมัก
(ก) ถังหมักแบบถาด (ข) ถังหมักแบบตัวถังหมุน
(ค) ถังหมักแบบแพคเบด (ง) ถังหมักแบบมีใบกวน

ที่มา: http://www.sake-world.com/FAQ_Other_Topics/Ingredients/The_Koji/the_koji.html (ก)
http://www.ftns.wau.nl/prock/Research/Arjen/Bioreactors.htm (ข และ ง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nishizawa *et al*., (1984) ทำ การทดลองหมักเอทานอลแบบรีพีทแบทช์จาก *S. cerevisiae* IFO 2347 โดยหลังจากการหมักที่ได้ปริมาณเอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร น้ำหมักจะถูกถ่ายออกไปคงเหลือไว้ในถังหมัก 25 % รวมทั้งมีการนำ เซลล์ที่ได้จากการกรองน้ำหมักที่ถ่ายออกไปผ่านอุปกรณ์ที่เรียกว่า hollow fiber เข้ามาร่วมด้วย พบว่าทำ ให้สามารถทำการหมักติดต่อกันได้ถึง 25 ครั้ง โดยที่ได้ผลผลิตเอทานอลคงที่ ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในแต่ละครั้งการหมักก็คงที่ประมาณ 80 % และเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบนำ เซลล์กลับมาใช้ใหม่อย่างเดียว พบว่าการหมักแบบรีพีทแบทช์ร่วมกับการนำ เซลล์กลับมาใช้ใหม่ให้ผลอัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่า 2 เท่า บางครั้งเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในการนำ เซลล์กลับมาใช้ใหม่ เช่น เยื่อกรอง เครื่องเหวี่ยง อาจนำเซลล์ยีสต์ที่สามารถตกตะกอนได้มาใช้

Sukumaran *et al*., (2008) ได้ทำการศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยฟางข้าวให้เป็นน้ำตาล เพื่อผลิตเอทานอล ซึ่งการใช้ 50 FPU ของ cellulase และ 10 ยูนิตของ B-glucosidase ต่อกรัมฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 6.3 กรัมต่อลิตร จากฟางข้าว และ 17.79 กรัมต่อลิตร จากชายอ้อย ซึ่งฟางข้าวจะถูกไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ โยใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตเอทานอลโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ปริมาณเอทานอล 0.093 กรัมต่อกรัมของฟางข้าวที่ถูกปรับสภาพ

ลัคขณา และคณะ (2008) ศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำข้าวฟ่างหวาน โดยใช้ยีสต์สองสายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 และ *S. cerevisiae* NP 01 ถูกตรึงรูปในซังข้าวโพด โดยทำการหมักแบบครั้งคราวพบว่าการตรึงรูปเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 บนซังข้าวโพดขนาด 6 × 6 × 6 ลูกบาศก์มิลลิเมตร สามารถให้ผลผลิตของเอทานอลสูงกว่าการตรึงรูปบนซังข้าวโพดขนาด 12 × 12 × 12 ลูกบาศก์มิลลิเมตร เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเอทานอล (P), ผลผลิตของเอทานอล ($Y_{p/s}$) และความสามารถในการผลิต (Q_p) พบว่ามีค่าเป็น 102.39±1.11 กรัมต่อลิตร 0.48±0.01 และ 2.13±0.02 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในการหมักแบบรีพีทแบทช์ พบว่า สามารถทำการหมักต่อเนื่องกันได้อย่างน้อย 8 รอบ และพบว่าภายใต้สภาวะการตรึงรูปและการหมักแบบกะซ้ำ ให้ค่า P (90.75±3.05 กรัมต่อลิตร) และค่า Q_p (1.89±0.06 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) จากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP 01 มีค่าต่ำกว่าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) ในขณะที่ $Y_{p/s}$ ที่ได้จากสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ในการตรึงรูปเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 บนซังข้าวโพด พบว่าค่า P, $Y_{p/s}$ และ Q_p ที่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นั้นสูงกว่าการตรึงรูปบนเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$)

Kumar *et al*., (2011) ศึกษาการผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยการตรึงเซลล์ยีสต์ *Kluyveromyces* SP IIPE453 ในชานอ้อยหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด พบว่ากระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด สามารถเพิ่มผลผลิตได้ดีกว่าการหมักแบบแบทช์ การตรึงเซลล์สามารถปรับปรุงอัตราการหมักโดยทำให้มีความเข้มข้นเซลล์ที่สูงช่วยป้องกันเซลล์จากผลกระทบที่เป็นพิษของพีเอชต่ำ อุณหภูมิสูง และสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก สายพันธุ์ยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces* SP. IIPE453 ถูกตรึงบนชานอ้อยและบรรจุในคอลัมน์ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด หมักในสภาวะที่มีอัตราการเจือจางเท่ากับ 1.25 ต่อชั่วโมง โดยการให้อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร สามารถให้ปริมาณผลผลิตสูงสุด 21.87 ± 0.75 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 17.5 ± 0.60 กรัมต่อลิตร

พรเทพ และคณะ (2555) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานในระบบการหมักที่อุณหภูมิสูงโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงคือ ความเป็นกรดด่างที่ 5.5 เซลล์ยีสต์เริ่มต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไปทดสอบการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดมีค่าเท่ากับ 106.82 กรัมต่อลิตร ในส่วนท้ายของงานวิจัย ได้ประเมินผลผลิตของข้าวฟ่างหวานสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลในเชิงพาณิชย์ เมื่อวิเคราะห์ถึงต้นทุนในการปลูกข้าวฟ่างหวาน และต้นทุนในการผลิตน้ำเชื่อมจากข้าวฟ่างหวาน พบว่ามีต้นทุนในการผลิตประมาณ 656.10 บาทต่อตัน และ 6,299.10 บาทต่อตัน ตามลำดับ ต้นทุนหลักในการปลูกข้าวฟ่างหวานคือ การขนส่ง การเตรียมดิน และการเก็บเกี่ยว ในขณะที่ต้นทุนหลักในการผลิตน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานคือ ค่าวัตถุดิบ ค่าไฟฟ้า และค่าขนย้ายต้นข้าวฟ่างหวานเข้าลูกหีบ สำหรับต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน โดยคิดคำนวณจากต้นทุนในการเตรียมวัตถุดิบมีต้นทุนการผลิตโดยประมาณ 9.79 และ 47.00 บาทต่อลิตร เมื่อใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานสดและน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบในการผลิตตามลำดับ อย่างไรก็ตามหากคำนวณต้นทุนการผลิตโดยนำต้นทุนในกระบวนการผลิตเอทานอลมาคำนวณร่วมด้วย ต้นทุนการผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเป็น 15.915 และ 53.125 บาทต่อลิตร ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ทำการเก็บและเตรียมตัวอย่างวัชพืชน้ำ

1.1 สวิงช้อนวัชพืชน้ำ (ขนาดตาข่าย 5 มิลลิเมตร)

1.2 มีดสับให้ตัวอย่างวัชพืชเป็นชิ้นเล็กขนาด 1-2 เซนติเมตร

1.3 ถุงพลาสติกสีดำ (ขนาด30×50 เซนติเมตร)

1.4 เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven) (รุ่น Model 600, ยี่ห้อ Memmert, Germany)

1.5 เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Peristaltic pump) (รุ่น BT600N, บริษัท Tianpeng, China)

1.6 หม้อนึ่งไอน้ำ แรงดันสูง (Autoclave) (รุ่น ES 315, TOMY SKIEO, Japan)

1.7 เครื่องเขย่า (Vortex mixer) (รุ่น KMC-1300V, บริษัท Vision Scientific, Korea)

1.8 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (รุ่น VS-124, บริษัท Dwyer Instruments, U.S.A.)

1.9 เครื่องชั่งสาร (Balance) (รุ่น A 13 VA, บริษัท Sartorius, Germany)

1.10 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (รุ่น Model 992, บริษัท M-LAB, Thailand)

1.11 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate stirrer)(รุ่น HTS-1003, บริษัท Learning management system, Japan)

1.12 เครื่องบ่มเขย่าเชื้อ (shaking Incubator) (รุ่น NB-205, บริษัท N-BIOTEC, Korea)

1.13 เครื่องปั่น (Super blender) (รุ่น MX-T110PN, ยี่ห้อ National, Taiwan)

1.14 โถดูดความชื้น (Desiccator)

1.15 ไมโครปิเปต (รุ่น Micro pipette, บริษัท Huawei Scientific Instrument, China)

1.16 กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

1.17 เครื่อง Ultrasonic bath (บริษัท LUKADENT ประเทศเยอรมนี)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำ

2.1 กล้องจุลทรรศน์ Light microscope (รุ่น CX31RBSFA, ยี่ห้อ Olympus, U.S.A.)

2.2 เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatograhy) (SugarPax Column (บริษัท Bio-Rad) and refractive index detector, บริษัท Shimadzu class LC-10, Japan)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (รุ่น Novaspec III, บริษัท Amersham Biosciences, England)

2.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (รุ่น M-3408, บริษัท Hanna, Mauritius)

3. สารเคมีที่ใช้ในและการวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.1 เอทานอล (99.9%C_2H_5OH) (บริษัท Merck)

3.2 กรดซัลฟิวริก (98.0% H_2SO_4) (บริษัท Merck)

3.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (บริษัท Merck)

3.4 กรดไฮโดรคลอริก (36% HCl) (บริษัท Merck)

3.5 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต ($NaKC_4H_4O6{\cdot}4H_2O$) (บริษัท Carlo Erba Reagenti)

3.6 โซเดียมอะซิเตต ($C_2H_3O_2Na$) (บริษัท Merck)

3.7 กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) (บริษัท Merck)

3.8 โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate)

3.9 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

4.0 ไตรบิวทิล ฟอสเฟต (Tributyl phosphate)

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว

4.1 บีกเกอร์ (Beaker) (ยี่ห้อ Schott Duran, Germany)

4.2 ฟลาสก์ (Erlenmayer flask) (ยี่ห้อ Schott Duran, Germany)

4.3 กระบอกตวง (Graduated Cylinder) (ยี่ห้อ Schott Duran, Germany)

4.4 ขวดเชิงปริมาตร (Volumetric flask) (ยี่ห้อ Schott Duran, Germany)

4.5 หลอดทดลอง (Test tube) (ยี่ห้อ Schott Duran, Germany)

4.6 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

5. ตัวอย่างวัชพืชน้ำที่ใช้ในการศึกษาและวัสดุสำหรับตรึงเซลล์

5.1 ผักตบชวา (water hyacinth) (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)

5.2 จอกน้ำ (water lettuce) (*Pistia stratiotes* L.)

5.3 ธูปฤาษี (Cattail) (*Typha angustifolia* L.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.4 ชานอ้อย (bagasse)

5.5 ซังข้าวโพด (corn cob)

5.6 ลำต้นข้าวฟ่าง (sweet sorghum stem)

5.7 แคลเซียมอัลจิเนท (Ca-alginate)

6.จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี (วว.))

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ

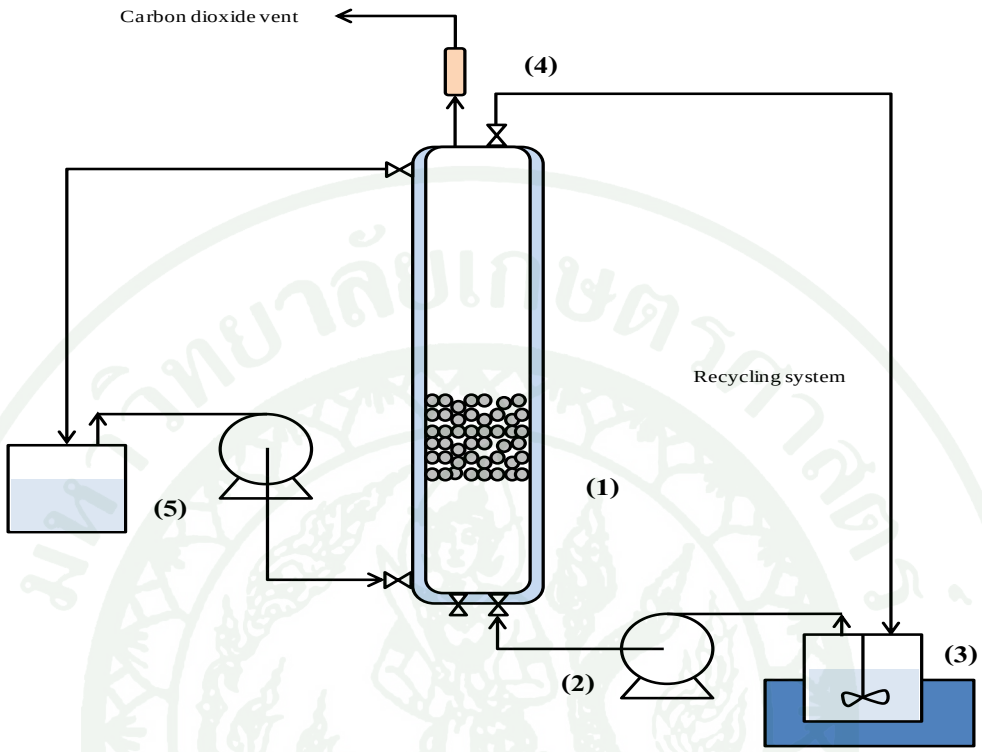
7.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อ ใช้อาหารวุ้นเอียง YMA (Yeast extract peptone dextrose agar slant) (ภาคผนวก ก)

7.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้น ใช้อาหารเหลว YM (Yeast extract peptone dextrose agar broth) (ภาคผนวก ก)

7.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักเอทานอล ใช้อาหารที่ผลิตจากน้ำตาลรีดิวซ์ของวัชพืชน้ำ (ภาคผนวก ก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ถังหมักแบบแพคเบด



ภาพที่ 12 ชุดอุปกรณ์การผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด

โดยให้

(1) แบบจำลองถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดบรรจุวัสดุตรึงเซลล์

(2) เครื่องสูบน้ำหมักเข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึง ควบคุมอัตราการไหลเข้าถัง ด้วย peristaltic pump

(3) ถังหมักแบบกวนที่ทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมัก (Storage stirred tank) ควบคุมพีเอชและอุณหภูมิ

(4) น้ำหมักออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงเวียนกลับสู่ถังพักน้ำหมัก

(5) น้ำหล่อเย็นเข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงเพื่อควบคุมอุณหภูมิน้ำหมักภายในถัง

ถังแพคเบดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นคอลัมน์แพคเบดที่ทำจากแก้วใส ความหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงรูปบรรจุใส่ในคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร, ความยาว 15 เซนติเมตร) ร้อยละ 80 ของปริมาตรคอลัมน์ โดยใช้ของเหลวที่ได้จากการเตรียมน้ำตาลในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยควบคุมอัตราการไหลของ peristaltic pump ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์องค์ประกอบเส้นใยของวัชพืชน้ำ

เก็บตัวอย่างวัชพืชน้ำ ได้แก่ผักตบชวา ธูปฤาษี จอกน้ำ จากแหล่งน้ำบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และแหล่งน้ำจาก ต.สระกะเทียม อ.เมือง จ. นครปฐม นำวัชพืชน้ำส่วนใบและลำต้นไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งลม ตากแดดให้แห้ง และนำไปบดเป็นชิ้นเล็กๆด้วยเครื่องปั่น (ร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 0.5 มิลลิเมตร) อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิท นำไปศึกษาองค์ประกอบของเส้นใย (AOAC,1990)

2. การปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสวัชพืชน้ำเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสวัชพืชน้ำ ด้วย 3 วิธีการที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี โดยศึกษาถึงความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และทำปฏิกิริยาร่วมกับความร้อนในสภาวะความดันสูง หรือการเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เพื่อการปรับสภาพวัตถุดิบวัชพืชน้ำก่อนกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (นันทิกาและคณะ, 2554) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และให้ความร้อนเพิ่มขึ้น ในการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยดีขึ้นและได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น

2.1 แช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร่วมกับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

การปรับสภาพด้วยวิธี alkaline/oxidative ดัดแปลงจากวิธีการของ Mishima *et al*., (2008) โดยชั่งตัวอย่างวัชพืชน้ำ ปริมาณ 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 31 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ต่อไปเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างของผสมมาทำการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ โดยการปรับพีเอช 5.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมเอนไซม์ทางการค้า เซลลูเลส 20 ยูนิต และไซแลนเนส 10 ยูนิตต่อกรัมชีวมวล บ่มบนเครื่องเขย่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(incubator shaker) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างสวนใสไปตรวจวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (James,1995)

2.2 แช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิก

วิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH)พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิก โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Goshadrou *et al*., (2011) โดยชั่งตัวอย่างวัชพืชน้ำปริมาณ 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง โดยใช้เครื่อง Ultrasonic bath ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างของผสมมาทำการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ โดยการปรับพีเอช 5.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมเอนไซม์ทางการค้า เซลลูเลส 20 ยูนิต และไซแลนเนส 10 ยูนิตต่อกรัมชีวมวล บ่มบนเครื่องเขย่า (incubator shaker) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างสวนใสไปตรวจวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (James,1995)

2.3 แช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร่วมกับหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง

วิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง ดัดแปลงจากวิธีการของ รัชพล (2011) ชั่งตัวอย่างวัชพืชน้ำ ปริมาณ 1 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ส่วนผสมทั้งหมดนำไปย่อยด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างของผสมมาทำการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ โดยการปรับพีเอช 5.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมเอนไซม์ทางการค้า เซลลูเลส 20 ยูนิต และไซแลนเนส 10 ยูนิตต่อกรัมชีวมวล บ่มบนเครื่องเขย่า (incubator shaker) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างสวนใสไปตรวจวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (James,1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและการตรึงเซลล์

3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

การเพาะเชื้อเริ่มต้นทำตามวิธีการของ กรรณิการ์ (2553) โดยนำเชื้อ (Dry yeast) *Candida shehatae* TISTR 5843 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM (YM broth) ซึ่งประกอบไปด้วย Yeast extract 1.5 กรัม Peptone 2.5 กรัม Malt extract 2.5 กรัม น้ำตาลไซโลส 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และปรับพีเอช 5.0 นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อเชื้อมีการเจริญซึ่งสังเกตได้จากความขุ่นของเซลล์ จะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1-2 วัน สำหรับใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 99 มิลลิลิตร โดยบ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช 5.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการรวมกล้าเชื้อทั้งหมดในฟลาส์กมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำสารละลายของเซลล์โดยล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 น้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 2 ครั้ง เพื่อใช้เป็นสารละลายเซลล์เข้มข้น

3.2 การตรึงเซลล์ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและวัสดุตรึงจากธรรมชาติ

3.2.1 การตรึงเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

นำสารละลายเซลล์เข้มข้นในข้อ 3.1 จำนวน 8 กรัม (ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 น้ำหนักต่อปริมาตร และทำการหยดสารละลายผสมโดยใช้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อเบอร์ 18G เพื่อให้ได้ขนาดเซลล์ตรึงรูปที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 เซนติเมตร โดยหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่แช่ในน้ำแข็ง ซึ่งถูกกวนเบาๆ ด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก เซลล์ตรึงรูปที่ได้นำไปแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ใหม่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ตรึงรูปเกิดความคงตัวอย่างสมบูรณ์ ก่อนนำไปใช้งาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2 การตรึงเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ด้วยวัสดุตรึงจากธรรมชาติ

วัสดุตรึงเซลล์จากธรรมชาติได้แก่ ชานอ้อย ต้นข้าวฟ่างหวาน ซังข้าวโพด จำนวน 5 กรัม ทำให้แห้งและบดให้เป็นผงขนาดร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 0.5 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที ใส่วัสดุตรึงแต่ละชนิด ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีสารละลายเซลล์ยีสต์น้ำหนัก 8 กรัม ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YM ที่พีเอช 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดการหมัก 8-12 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนน้ำที่มียีสต์อิสระที่ไม่ถูกตรึงออกให้เหลือแต่ชิ้นวัสดุตรึงที่มียีสต์เซลล์ตรึงรูป ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 200 มิลลิลิตร 1 ครั้ง แล้วนำไปใช้ในการหมักเอทานอลต่อไป

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของวัชพืชน้ำหลังจากผ่านขบวนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสโดยการหมักแบบกะ ในฟลาส์กระดับห้องปฏิบัติการ

นำเม็ดเจลอัลจิเนตและวัสดุตรึงธรรมชาติที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ (ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ใส่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีส่วนผสมของน้ำวัชพืชที่ถูกปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสตามในข้อ 2 และนำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วในการกวนเท่ากับ 120 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตลอดการหมัก โดยเก็บทุก 6 ชั่วโมง ทำการหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ความขุ่นเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ตลอดจนคำนวณประสิทธิภาพการหมัก เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาในการนำไปใช้กับการหมักครั้งต่อไป โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำส่วนใสไปใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือด้วยวิธี DNS และความเข้มข้นเอทานอล ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Shimadzu (Class LC10 ประเทศญี่ปุ่น)

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของพืชน้ำหลังจากผ่านขบวนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสโดยการหมักแบบกึ่งกะ ในฟลาส์กระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการหมักเอทานอลด้วยเทคนิคกึ่งกะ ดัดแปลงจากวิธีการของ (Limtong ,1987) โดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ตามข้อ 3.1 และเซลล์ตรึงรูปตามข้อ 3.2 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ปริมาณเซลล์ตรึงรูปด้วยวัสดุต่างๆที่ใช้เท่ากับร้อยละ 3 ของปริมาตรอาหารเหลว ปริมาตรรวมทั้งหมด 200 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองเป็น 3 แบบ คือ แบบที่ 1 ทำการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทดลองโดยทำการเติมอาหารแบบครั้งเดียว โดยการเตรียมอาหารจากวัชพืชน้ำเริ่มต้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นชั่วโมงที่ 12 เติมอาหารวัชพืชน้ำอีก100 มิลลิลิตร แบบที่ 2 ทำการเติมอาหารวัชพืชน้ำแบบ 2 ครั้ง โดยการเตรียมอาหารจากวัชพืชน้ำเริ่มต้นจากปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมอาหารชั่วโมงที่ 6 และ 12 ครั้งละ 50 มิลลิลิตร และแบบที่ 3 ทำการเติมอาหารวัชพืชน้ำแบบ 2 ครั้ง โดยการเตรียมอาหารจากวัชพืชน้ำเริ่มต้นจากปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมอาหารชั่วโมงที่ 6 และ 12 ครั้งละ 60 และ 40 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 120 รอบต่อนาที พีเอช 5.0 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง วิเคราะห์ความขุ่นเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของพืชน้ำหลังจากผ่านขบวนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสโดยการหมักแบบกะซ้ำในฟลาส์กระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองโดยทำการหมักแบบกะ จนความเข้มข้นของเอทานอลเหลืออยู่ร้อยละ 50 ทำการหยุดหมัก โดยหยุดกวนและปล่อยให้เซลล์ยีสต์ตกตะกอนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงถ่ายน้ำหมักส่วนบนออกไปร้อยละ 80 แล้วจึงเติมอาหารใหม่ที่มีปริมาณเท่ากับปริมาณน้ำหมักที่ถ่ายออก ทำการหมักเช่นเดียวกับการหมักแบบกะตามข้อ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง วิเคราะห์ความขุ่นเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด

7. การศึกษาการหมักเอทานอลของพืชน้ำหลังจากผ่านขบวนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสโดยการหมักในถังหมักแบบแพคเบด

สภาวะการหมักที่เหมาะสมจะเลือกจากการทดลองข้างต้น ได้แก่ การหมักแบบกะ การหมักกึ่งกะและการหมักแบบกะซ้ำ โดยเซลล์ตรึงรูปในระดับฟลาสก์ เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ปริมาณกล้าเชื้อที่ถูกตรึงเซลล์ด้วยวัสดุต่างๆใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของปริมาตรอาหารเหลวัชพืชน้ำทั้งหมด ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก เอทานอลในถังหมักแบบแพคเบดโดยทำการศึกษา 2 ปัจจัยได้แก่ อัตราการเจือจางเข้าถังหมักชีวภาพแบบแพคเบดที่แตกต่างกัน คือ 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นแตกต่างกัน คือ 200 220 และ 240 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับพีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 4.5-5.0 ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ ความเข้มข้นของเอทานอล ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณประสิทธิภาพการหมักเพื่อเปรียบเทียบผลผลิตได้ ($Y_{p/s}$) และอัตราผลผลิต (Q_p) ในการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ เมื่อครบรอบการหมักแต่ละรอบ (48 ชั่วโมง) จะทำการล้าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คอลัมน์ที่บรรจุเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.6 และทำการใส่สารอาหารน้ำตาลรีดิวซ์วัชพืชน้ำสำหรับการผลิตเอทานอลเข้าไปใหม่ แล้วทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดิม จนกระทั่งปริมาณเอทานอลลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับการหมักในแบทช์แรก

สูตรคำนวณโดย

$$\text{ผลผลิตได้ (Yield efficiency)} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

$$\text{อัตราผลผลิต (Ethanol productivity)} = \frac{\text{ผลผลิตได้}}{\text{เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)}}$$

$$\text{ประสิทธิภาพการหมัก (Yield efficiency)} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร) x 0.51}} \times 100$$

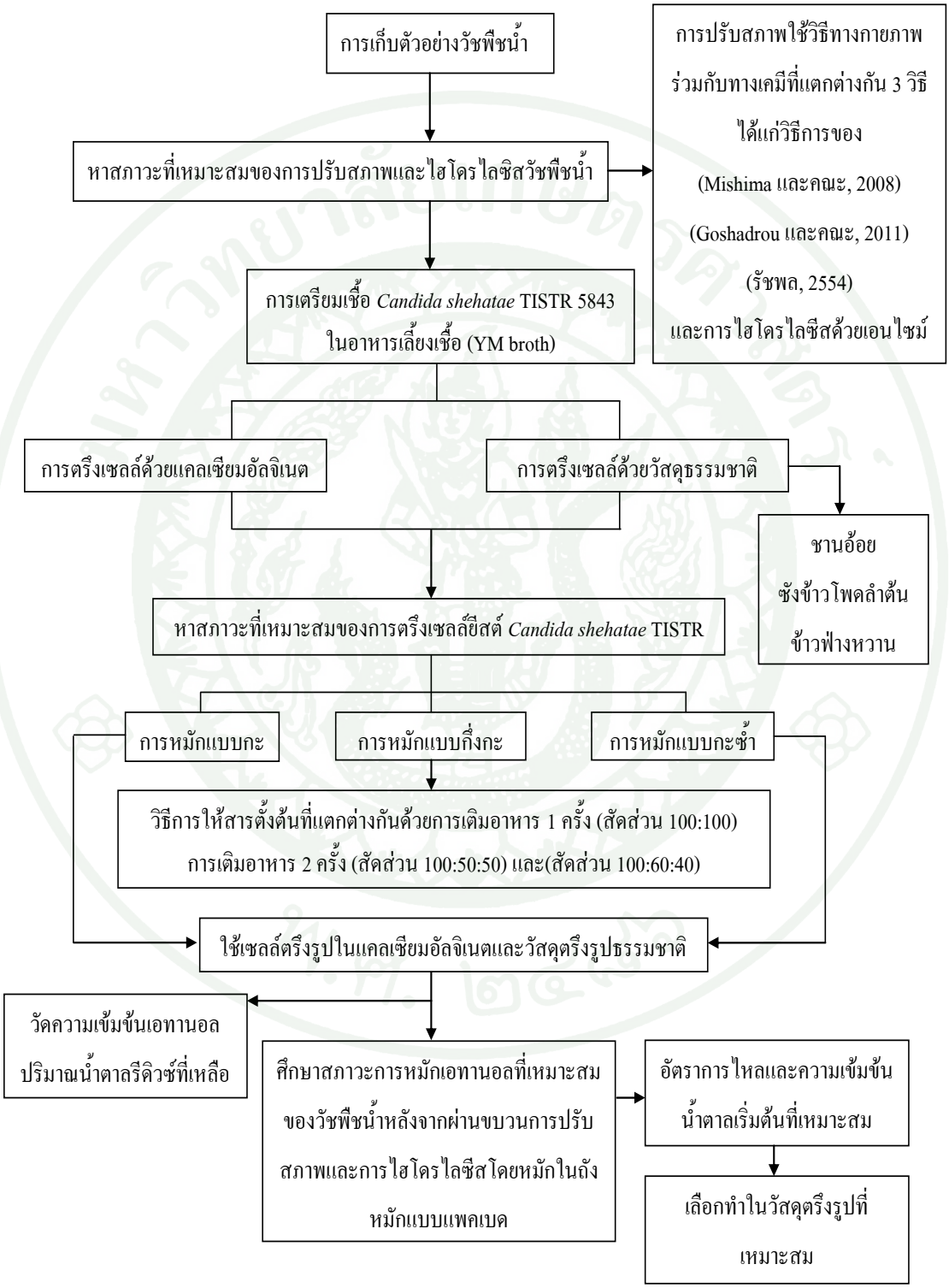
8. การใช้สถิติในการวิเคราะห์ผลข้อมูล

ขั้นตอนในการวิจัยและผลการทดลองทั้งหมดจากการวิจัยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Desing (CRD)) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของสองชุดข้อมูลโดยวิธี univariate-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95.0 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. วิธีการ (Methodology)

แผนผังการปฏิบัติงานมีดังต่อไปนี้



ภาพที่ 13 แสดงแผนการดำเนินงานวิจัย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสวัชพืชน้ำให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในการหมักเอทานอล

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสวัชพืชน้ำให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีการปรับสภาพที่แตกต่างกัน 3 วิธีการ จัดเป็นวิธีการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับทางเคมี พบว่าวิธีการที่ 2 คือการปรับสภาพโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) พร้อมกับเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงโดยใช้เครื่องอุลตร้าโซนิก ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด ดังนั้นการทดลองในครั้งต่อไปจะเลือกวิธีการปรับสภาพดังกล่าวมาใช้สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป จากรายงานของ(Zhao and Xia, 2009) ได้อธิบายว่าลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งของน้ำตาลเพนโตส และเฮกโซส ซึ่งมีปริมาณของน้ำตาลไซโลสและกลูโคส ที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส ตามลำดับ และเมื่อหมักน้ำตาลไซโลสและกลูโคสร่วมกัน สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ ซึ่งการคำนวณวัตถุดิบวัชพืชน้ำเริ่มต้นสำหรับการผลิตเอทานอลของวัชพืชน้ำแต่ละชนิดจึงใช้ปริมาณวัตถุดิบเริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน โดยปริมาณวัตถุดิบที่ใช้จะถูกคำนวณจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากวัชพืชน้ำแต่ละชนิด

ผลจากการปรับสภาพวัชพืชน้ำด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับทางเคมีที่แตกต่างกัน 3 วิธี พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวิธีการปรับสภาพ วิธีที่ 2 (NaOH+ Ultrasonic) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของวัชพืชน้ำ 3 ชนิดสูงที่สุดโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (p<0.05) เมื่อเทียบกับวิธีที่เหลือ (ภาพภาคผนวกที่ ค1) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาตัวอย่างวัชพืชน้ำทั้ง 3 ชนิด พบว่า ผักตบชวาให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ซึ่งมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างผักตบชวา จอกน้ำ ธูปฤาษี เท่ากับ 0.596±0.004 0.149±0.003 และ 0.553±0.001 กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างวัชพืชน้ำที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่า วิธีการปรับสภาพวัชพืชน้ำในวิธีที่ 2 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับทุกวิธี โดยมีความสอดคล้องกับผลวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลที่ทำการตรวจวัดยืนยันผลด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งมีค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสสูงสุดจากผักตบชวาเท่ากับ 0.173 และ0.230 กรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมทั้งหมดเท่ากับ 0.403±0.028 (ตารางที่ 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของวัชพืชน้ำวัดโดยใช้วิธี DNS และเครื่อง HPLC

DNS method	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ; g/g_s)**		
	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3
ผักตบชวา	$0.550\pm0.012^{a,y}$	$0.596\pm0.004^{a,x}$	$0.461\pm0.006^{a,z}$
จอกน้ำ	$0.051\pm0.076^{c,y}$	$0.149\pm0.003^{c,x}$	$0.057\pm0.011^{c,y}$
ธูปฤาษี	$0.542\pm0.020^{b,y}$	$0.553\pm0.001^{b,x}$	$0.280\pm0.007^{b,z}$
HPLC *	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3
ผักตบชวา			
กลูโคส (g/g_s)	$0.170\pm0.127^{bc,x}$	$0.173\pm0.091^{c,x}$	$0.125\pm0.176^{d,y}$
ไซโลส (g/g_s)	$0.210\pm0.106^{b,xy}$	$0.230\pm0.063^{b,x}$	$0.190\pm0.056^{c,y}$
น้ำตาลรีดิวซ์รวมทั้งหมด*	$0.381\pm0.233^{a,y}$	$0.403\pm0.028^{a,x}$	$0.315\pm0.120^{a,z}$
จอกน้ำ			
กลูโคส (g/g_s)	$0.016\pm0.014^{d,y}$	$0.049\pm0.000^{d,x}$	$0.015\pm0.014^{g,y}$
ไซโลส (g/g_s)	$0.032\pm0.007^{cd,y}$	$0.068\pm0.000^{d,x}$	$0.032\pm0.021^{fg,y}$
น้ำตาลรีดิวซ์รวมทั้งหมด	$0.048\pm0.021^{c,y}$	$0.117\pm0.000^{d,x}$	$0.047\pm0.007^{f,y}$
ธูปฤาษี			
กลูโคส (g/g_s)	$0.178\pm0.007^{bc,x}$	$0.169\pm0.007^{c,xy}$	$0.095\pm0.028^{e,z}$
ไซโลส (g/g_s)	$0.215\pm0.014^{b,x}$	$0.219\pm0.049^{b,x}$	$0.122\pm0.042^{d,y}$
น้ำตาลรีดิวซ์รวมทั้งหมด	$0.393\pm0.021^{a,x}$	$0.388\pm0.057^{ab,x}$	$0.217\pm0.070^{b,y}$

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±S.D. ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ^{xyz} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) * หมายถึงผลรวมของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด HPLC* หมายถึงน้ำตาลรีดิวซ์ของวัชพืชน้ำที่ถูกวัดจากเครื่อง HPLC และ g/g_s หมายถึงกรัมของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมของตัวอย่าง โดยวิธีการปรับสภาพ วิธีที่ 1 คือ NaOH+H_2O_2; วิธีที่ 2 คือ NaOH+Ultrasonic; วิธีที่ 3 คือ NaOH+Autoclave

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการปรับสภาพด้วยวิธีที่ 2 (ตารางที่ 6) พบว่า ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ และอัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี มีค่าเป็น 0.596, 0.149 และ 0.553 กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และอัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 0.025,0.006 และ0.023 กรัมต่อกรัมตัวอย่างต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวาของ Mishima *et al*., (2006; 2008) ซึ่งมีค่าอัตราการ ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 0.002 และ0.007 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้นต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการปรับสภาพวัชพืชน้ำด้วยวิธีการปรับสภาพวิธีที่ 2 เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับสิ่งอ้างอิงต่างๆ

วิธีการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำ			
	เวลาทำปฏิกิริยา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g_p/g_s)	Productivity* (g_p/g_s/h)	สิ่งอ้างอิง
วิธีที่ 2 NaOH+Ultrasonic				
ผักตบชวา	24	0.596	0.025	งานวิจัยนี้
จอกน้ำ	24	0.149	0.006	งานวิจัยนี้
ธูปฤาษี	24	0.553	0.023	งานวิจัยนี้
$NaOH/H_2O_2$	24	0.040	0.002	Mishima *et al.,* (2006)
Alkaline/oxidative (A/0)	96	0.688	0.007	Mishima *et al.,* (2008)

หมายเหตุ: g_p คือ กรัมของน้ำรีดิวซ์; g_s คือ กรัมของสารตั้งต้น; * Volumetric productivity of Reducing Sugar (Productivity (g_p/g_s/h) คำนวณจาก น้ำตาลรีดิวซ์ (g_p/g_s)หารด้วยเวลาทำปฏิกิริยา (ชม.)

จากการศึกษาการใช้วัชพืชน้ำทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี พบว่าสามารถนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ โดยเฉพาะผักตบชวาให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณสูง โดยสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีการทางเคมีคือการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยทำร่วมกับการเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง โดยใช้เครื่องอุลตร้าโซนิกแล้วย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ ผักตบชวาจึงเป็นวัชพืชน้ำที่น่าสนใจที่ควรส่งเสริมให้นำมาเป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตเอทานอล และพัฒนากระบวนการผลิตพลังงานทดแทนอย่างยั่งยืนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลการศึกษาองค์ประกอบเส้นใยของวัชพืชน้ำ

เนื่องจากผลของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์พร้อมกับเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงโดยใช้เครื่องอุลตร้าโซนิก (NaOH+Ultrasonic) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด จึงนำเส้นใยของวัชพืชน้ำที่ผ่านการปรับสภาพดังกล่าว ไปศึกษาองค์ประกอบเส้นใยของวัชพืชน้ำตัวอย่างน้ำหนักแห้งก่อนและหลังการปรับสภาพแสดงดังตารางภาคผนวกที่ ค1

งานวิจัยนี้สนใจพัฒนาการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปรับสภาพวัชพืชน้ำ โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงด้วยการเขย่าด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิก ซึ่งการปรับสภาพทางเคมีโดยมากจะใช้กรดอ่อนจำพวกกรดเกลือหรือกรดไนตริกเจือจาง กระบวนการที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือการใช้กรดกำมะถันเจือจาง ข้อเสียของกระบวนการนี้คือการใช้อุณหภูมิที่สูงจะทำให้เกิดสารข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์และเป็นพิษต่อกระบวนการหมักในขั้นตอนต่อไป (ฐิติมาและคณะ, 2554) การปรับสภาพสามารถทำได้ด้วยด่างเช่นกัน โดยด่างจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสบู่ (Saponification) ของพันธะเอสเตอร์ระหว่างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสกับสารอื่น เช่น ลิกนิน ทำให้ลิกนินซึ่งเป็นตัวขัดขวางหลุดออกจากโครงสร้าง ดังนั้นปริมาณเฮมิเซลลูโลสจึงเพิ่มขึ้น มีรายงานว่ารูพรุนของวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพิ่มขึ้น จากการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางทำให้วัสดุเกิดการพองตัวส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น ระดับขั้นของพอลิเมอร์ไรเซชั่น (Degree of Polymerization) และความเป็นผลึกลดลง เกิดการแยกตัวของโครงสร้างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เจือจางนี้สามารถลดเปอร์เซ็นต์ของลิกนินลงได้ในไม้เนื้อแข็ง และส่งผลดีต่อสารจำพวกฟางที่มีปริมาณลิกนินต่ำ แต่ไม่เหมาะกับวัสดุที่มีลิกนินสูง (Zheng *et al*., 2009)

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเส้นใยของวัชพืชน้ำตัวอย่างน้ำหนักแห้งก่อนการปรับสภาพ พบว่ามีส่วนประกอบที่เป็นเซลลูโลสสูงที่สุดจากผักตบชวา จอกน้ำ ธูปฤาษี คือ 41.17 26.03 และ41.60 ตามลำดับ ส่วนหลังจากการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงโดยใช้เครื่องอุลตร้าโซนิก และทำการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ พบว่ามีส่วนประกอบที่เป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส จะมีปริมาณองค์ประกอบเส้นใยเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณลิกนิกจะลดลง เนื่องจากว่าวิธีการปรับสภาพด้วย NaOH ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงจะช่วยลดความเป็นผลึกโครงสร้างที่แข็งแรงของเซลลูโลส และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวภายนอกและความพรุนของวัตถุดิบได้ทำให้สามารถย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลสเฮมิเซลลูโลสได้ดีขึ้นและยังทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้น (Goshadrou *et al*., 2011) เมื่อพิจารณาส่วนที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ พบว่าปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในตัวอย่างวัชพืชน้ำทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณที่ไม่เท่ากัน (ตารางที่ 7) โดยเฉพาะจอกน้ำมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่ต่ำกว่าผักตบชวาและธูปฤาษี และหลังจากทำการปรับสภาพผักตบชวาและธูปฤาษี พบว่ามีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีปริมาณที่สูงขึ้นและใกล้เคียงกัน จากผลการศึกษาพบว่างานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ (ฐิติมา และคณะ, 2554) ที่ได้ศึกษาการปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่าปริมาณลิกนินลดลง เมื่อปรับสภาพด้วยไอน้ำและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งการปรับสภาพด้วย ไอน้ำร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถทำให้ปริมาณลิกนินลดลงต่ำสุด ซึ่งส่งผลให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นสูงสุด จากผลการทดลองจึงมีความเป็นไปได้ในการนำวัชพืชน้ำดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ โดยการย่อยองค์ประกอบเส้นใยของวัชพืชน้ำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด และนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตเอทานอล พลังงานทดแทนน้ำมันเบนซินที่กำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

ตารางที่ 7 องค์ประกอบเส้นใย ก่อน-หลังการปรับสภาพโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิก

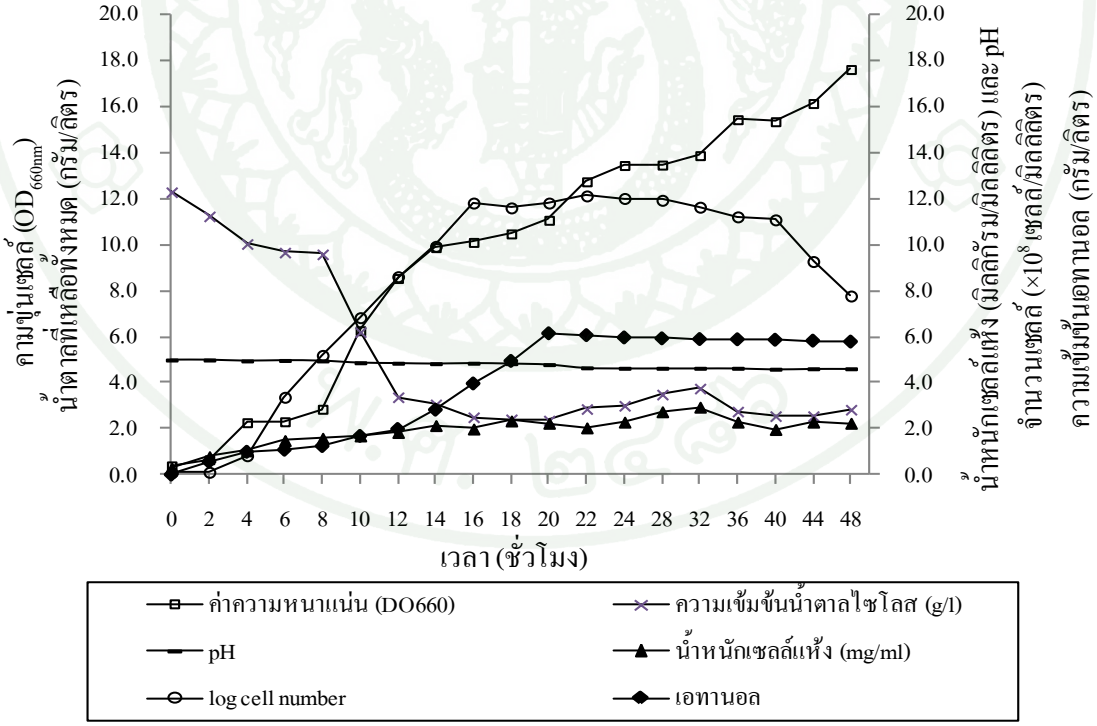
ตัวอย่างวัชพืชน้ำ	องค์ประกอบเส้นใยก่อนการปรับสภาพ			องค์ประกอบเส้นใยหลังการปรับสภาพ		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ผักตบชวา	41.17 ±0.18^{a,y}	19.48 ±0.15^{a,y}	2.92 ±0.20^{b,y}	43.87 ±0.80^{a,x}	21.90 ±0.64^{a,x}	1.91 ±0.31^{c,x}
จอกน้ำ	26.03 ±0.89^{b,y}	7.68 ±0.33^{c,y}	3.38 ±0.13^{b,y}	27.37 ±0.87^{b,y}	8.76 ±0.51^{c,x}	2.73 ±0.34^{b,x}
ธูปฤาษี	41.60 ±0.44^{a,y}	16.20 ±0.17^{b,y}	7.83 ±0.36^{a,y}	43.91 ±0.92^{a,x}	18.60 ±0.67^{b,x}	6.73 ±0.52^{a,x}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±S.D. ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวคอลัมน์เดียวกันแสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ ^{xyz} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวแถวเดียวกันแสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843 ในอาหารเหลว YM (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช 5.0 (ภาพที่ 14) ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวัดค่าความหนาแน่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและชั่งน้ำหนักแห้งตัวเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าที่ช่วงเวลา 6-16 ชั่วโมงแรก เชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) และหลังจากชั่วโมงที่ 18 เป็นต้นไป เชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 มีแนวโน้มการเจริญเติบโตค่อนข้างคงที่ โดยพบว่า เชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและปรับพีเอช 5.0 โดยให้ค่าความหนาแน่น (OD660) สูงสุดเท่ากับ 17.63 และมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าค่าพีเอช ตลอดการหมักค่อนข้างคงที่ ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด 6.14 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 18 ซึ่งผลผลิตที่ได้เป็นไปตามทฤษฎีของการหมักเอทานอล ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงรูปที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและปรับพีเอช 5.0 ในการทำการทดลองขั้นต่อไป



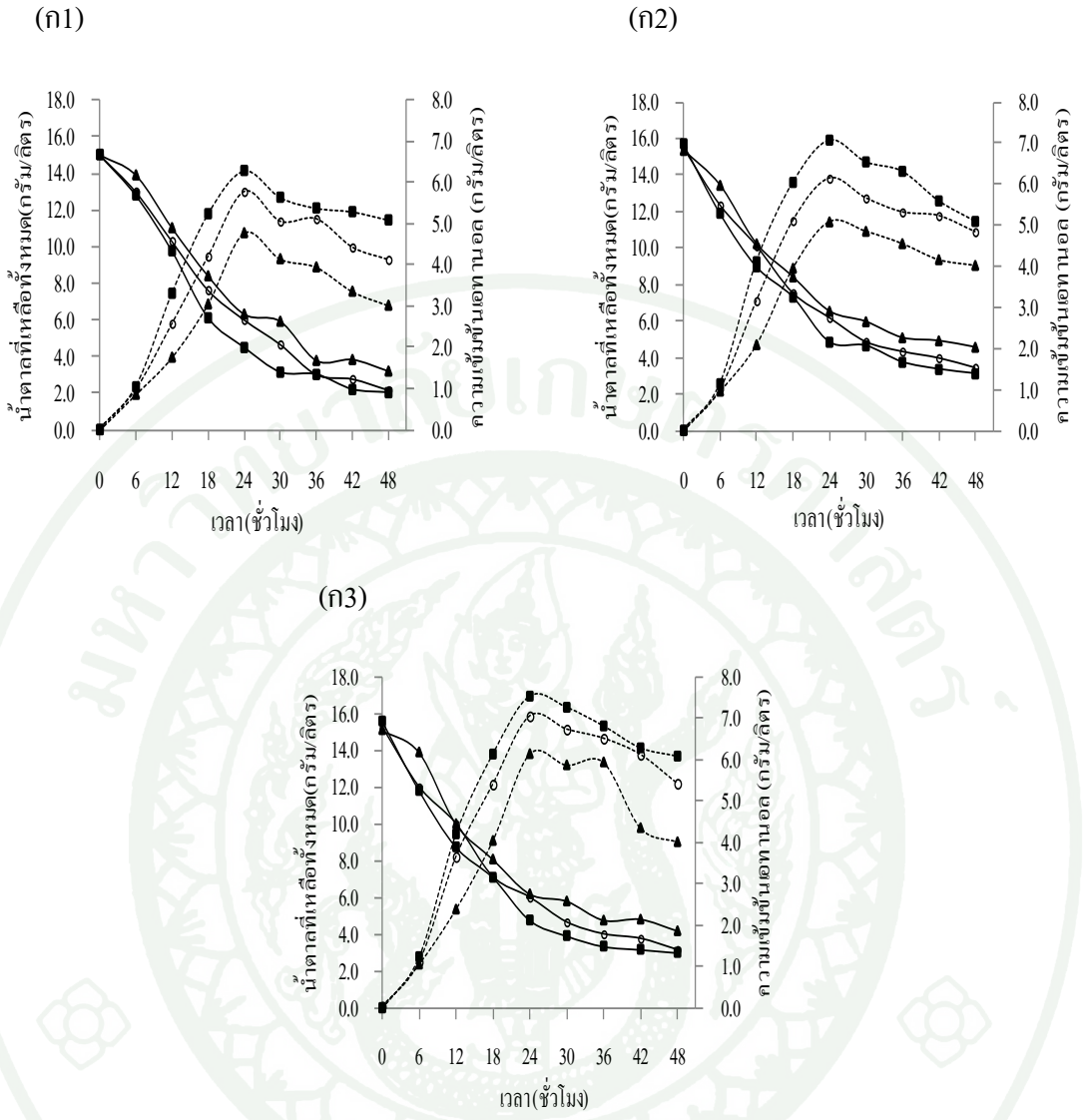
ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเซลล์ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่เวลาเปลี่ยนไป ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1 ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นและความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำ

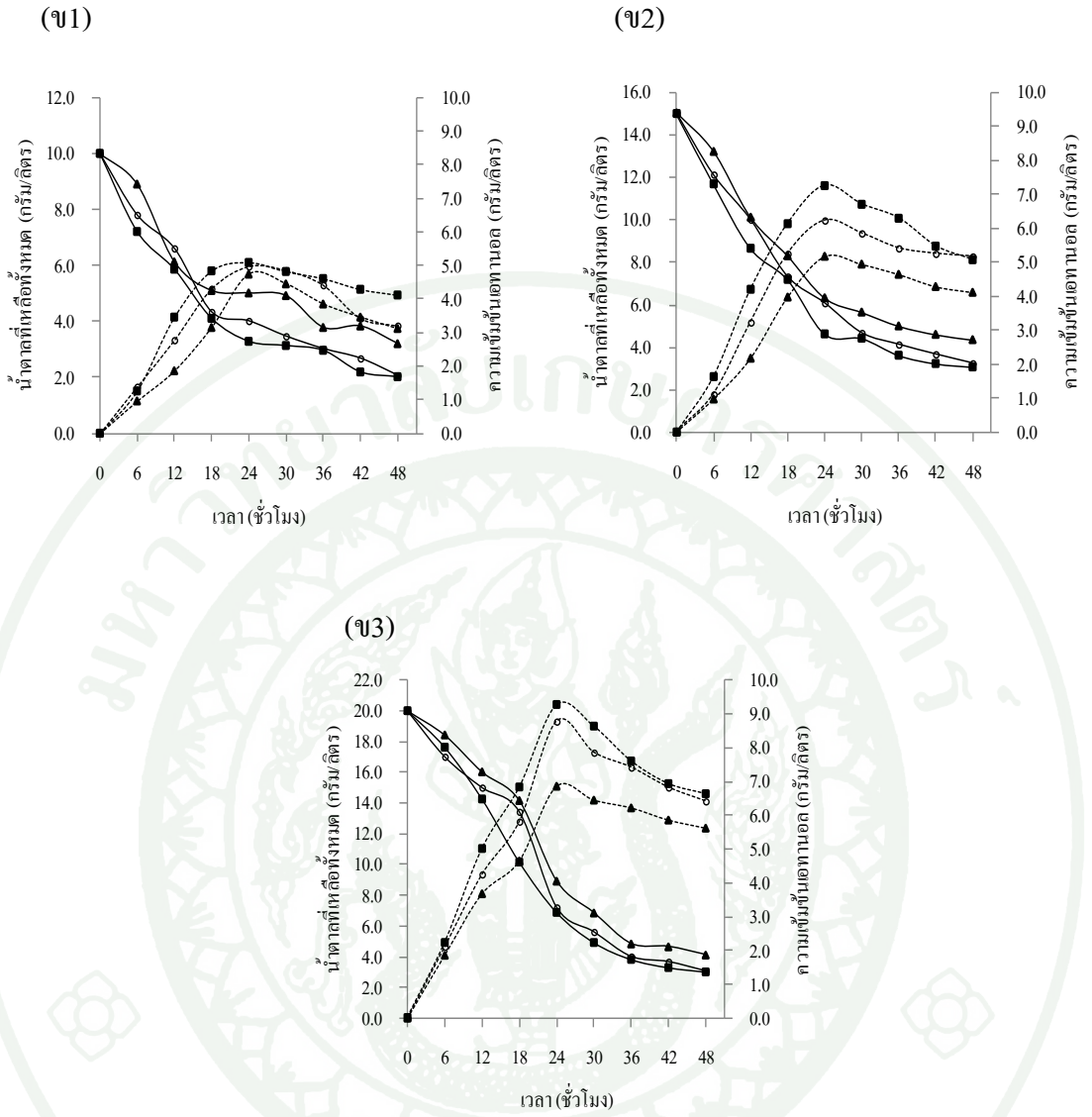
จากผลการศึกษาความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น และความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการใช้น้ำตาลสำหรับการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำในการหมักแบบกะโดยใช้ยีสต์ *C.shehatae* TISTR 5843 เลี้ยงในอาหารเหลวที่ผลิตจากน้ำตาลรีดิวซ์ของวัชพืชน้ำ YM (ภาคผนวก ก) เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช 5.0 (ภาพที่ 15) พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงขึ้นในระหว่างการหมักไม่มีผลต่อความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น ซึ่งการใช้เซลล์อิสระในการหมักแบบกะ พบว่าให้ความเข้มข้นเอทานอลมากที่สุดที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก เมื่อให้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่มากขึ้นจะส่งผลให้การผลิตเอทานอลมากขึ้นด้วย ดังนั้นความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะถูกเลือกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป และที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 10, 15 และ20 กรัมต่อลิตรให้ผลที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน พบว่าไม่มีช่วง lag phase หลังจากที่เซลล์ยีสต์ถูกใส่ลงในน้ำตาลรีดิวซ์ของวัชพืชน้ำ (ภาพที่ 16) แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำไม่ได้มีสารใด ๆ ในระดับที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์ และพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงขึ้นเป็นผลมาจากความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงขึ้นด้วย ซึ่งจากการทดลองนำเซลล์ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 มาทำการหมักเอทานอลในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเหลวน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นตั้งแต่ 10, 15 และ20 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 2, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งปริมาตรอาหารเหลวน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า *C. shehatae* TISTR 5843 สามารถใชน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำได้ และหมักเอทานอลได้สูงสุดจากผักตบชวา จอกน้ำ ธูปฤาษี ซึ่งได้เท่ากับ 9.28, 6.86 และ 8.78 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่าผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี สามารถนำมาเป็นวตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้ และผักตบชวาเป็นวัชพืชน้ำที่ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุด โดยเป็นที่น่าสนใจสำหรับการปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ด้วยการหาสภาวะที่เหมาะในการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำด้วยกระบวนการหมักแบบกะ กึ่งกะ และกะซ้ำ ต่อไป ซึ่งศึกษาในแง่ของความเข้มข้นเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักที่สูงขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 ผลของความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น สำหรับการหมักเอทานอลแบบแบทช์จากวัชพืชน้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843: ผักตบชวา (■), จอกน้ำ (▲) และ ธูปฤาษี (○) ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 1×10^{6}(ก1), 1×10^{7} (ก2) และ 1×10^{8} (ก3) น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (——) และความเข้มข้นเอทานอล (- - - -)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



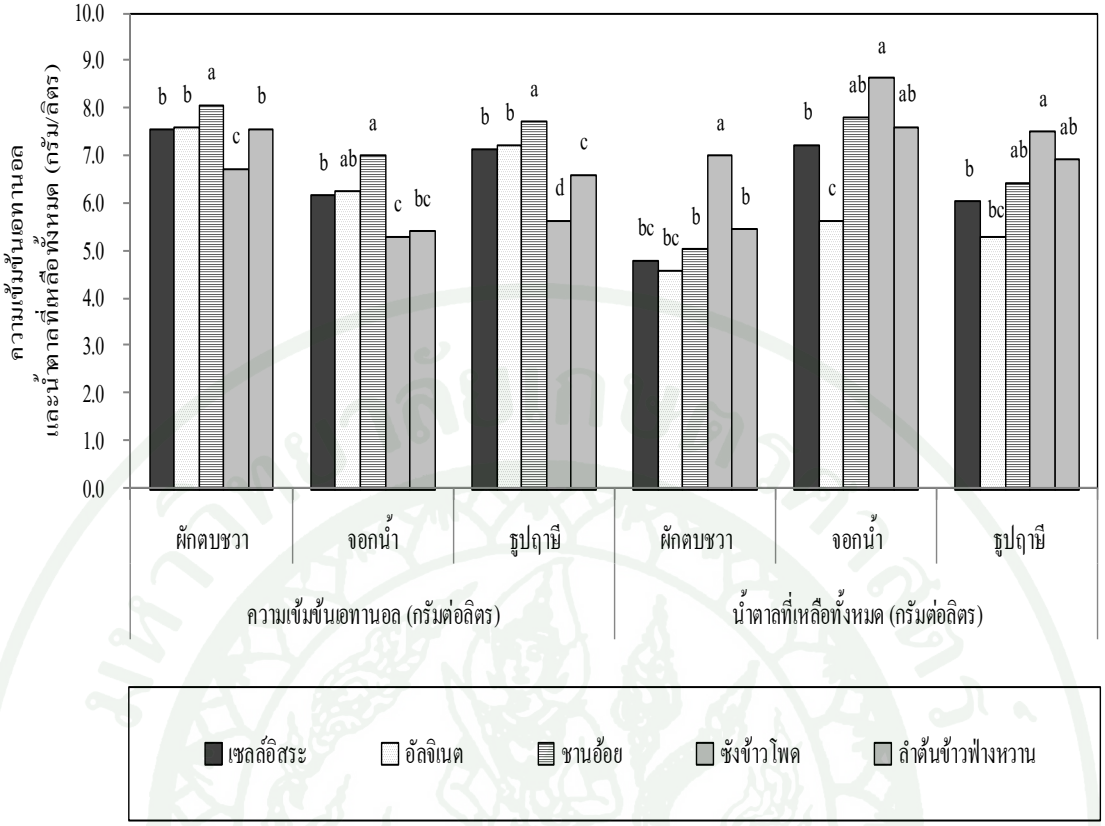
ภาพที่ 16 ผลความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการใช้น้ำตาลสำหรับการหมักเอทานอลแบบกะจากวัชพืชน้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843:ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 10 (ข1), 15 (ข2) และ20 (ข3) กรัมต่อลิตรของ ผักตบชวา (■), จอกน้ำ (▲) และ ธูปฤาษี (○) น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (——) และความเข้มข้นเอทานอล (- - - -)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของวัชพืชน้ำหลังจากผ่านขบวนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสโดยการหมักแบบกะ ในฟลาส์กระดับห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดลองการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำด้วยกระบวนการหมักแบบกะ ภายใต้สภาวะเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ปรับพีเอชเริ่มต้น 5.0 ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 15 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมงโดยใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ *C.shehatae* TISTR 5843 ในอัลจิเนต ชานอ้อย ซังข้าวโพด และลำต้นข้าวฟ่างหวาน (ภาพที่ 17) พบว่าความเข้มข้นเอทานอลสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการปรับปรุงกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปในอัลจิเนต ชานอ้อย และลำต้นข้าวฟ่างหวาน ซึ่งให้ความเข้มข้นเอทานอลที่ใกล้เคียงกัน โดยเซลล์อิสระสามารถหมักเอทานอลให้เกิดได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 และความเข้มข้นเอทานอลจะต่ำลงในชั่วโมงที่ 30 และ 36 แต่เซลล์ที่ถูกตรึงรูปในอัลจิเนต ชานอ้อย ซังข้าวโพด และลำต้นข้าวฟ่างหวานจะเกิดเอทานอลที่สูงสุดในชั่วโมงที่ 30 เมื่อครบเวลาการหมักที่ 36 ชั่วโมง ความเข้มข้นเอทานอลจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก การใช้เซลล์ตรึงรูปโดยใช้วิธีการห่อหุ้มเซลล์ในอัลจิเนต และเซลล์ถูกดูดซับไว้ในวัสดุตรึงธรรมชาติทำให้ส่งผลต่อการนำน้ำตาลเข้าไปใช้ภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงรูปสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้ช้ากว่าเซลล์อิสระ จึงทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงรูปเกิดการผลิตเอทานอลที่ช้ากว่าเซลล์อิสระ และพบว่าผักตบชวากับธูปฤาษีให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ใกล้เคียงกัน ส่วนจอกน้ำให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ต่ำกว่าวัชพืชน้ำทั้งสองชนิดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวก ที่ ค1-3) ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดจากการหมักแบบกะโดยใช้เซลล์อิสระ ที่ได้จากผักตบชวา จอกน้ำ ธูปฤาษีคือ 7.54±0.99, 6.15±0.79 และ 7.12±0.38 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตคือ 7.57±1.29, 6.23±0.65 และ 7.21±0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปด้วยชานอ้อยคือ 8.06±0.42, 6.98±0.56 และ 7.70±0.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปด้วยซังข้าวโพดคือ 6.71±0.16, 5.28±0.86 และ 5.62±1.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปด้วยลำต้นข้าวฟ่างหวานคือ 7.56±0.43, 5.39±0.66 และ 6.59±0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าการเจริญของเซลล์ *C.shehatae* TISTR 5843 เมื่อวัดเป็นค่าความขุ่นของเซลล์โดยวัดที่เวลาเดียวกันในชั่วโมงที่ 24 ให้ความขุ่นเซลล์สูงถึง 16.10, 13.60 และ15.28 ของผักตบชวา จอกน้ำ ธูปฤาษี ตามลำดับ และการเจริญค่อยๆลดลงไปจนถึงเวลาที่ 36 ชั่วโมง (ตารางภาคผนวก ที่ ค22) ซึ่งการลดลงของจำนวนเซลล์ยีสต์จะมีผลทำให้การผลิตเอทานอลลดลงด้วย จึงพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 30 ของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำมีการผลิตเอทานอลลงลด เพราะเกิดจากเซลล์ยีสต์มีจำนวนลดลงเรื่อยๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 การผลิตเอทานอลสูงสุด และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงรูปในวัสดุตรึงต่างๆโดยยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จากการคำนวณอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) และผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) ของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะโดยยีสต์ *C.shehatae* TISTR 5843 หมักในวัสดุตรึงรูปที่แตกต่างกัน หมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (ตารางที่ 8) พบว่าผักตบชวามีอัตราการผลิตเอทานอลที่สูงที่สุด รองลงมาคือธูปฤาษี ส่วนจอกน้ำมีอัตราการเกิดเอทานอลที่ต่ำกว่าวัชพืชน้ำทั้งสองชนิด โดยเซลล์อิสระมีอัตราการเกิดเอทานอลและผลผลิตเอทานอลมากที่สุดจากผักตบชวา, จอกน้ำ และธูปฤาษี (Q_p) เท่ากับ 0.31, 0.26 และ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.49, 0.41 และ 0.48 กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ ตามลำดับ เนื่องจากเซลล์อิสระมีการผลิตเอทานอลได้เร็วกว่าเซลล์ตรึงรูปจึงมีอัตราการเกิดเอทานอลที่มากกว่า โดยเซลล์ที่ถูกตรึงรูปในอัลจิเนต ชานอ้อย และลำต้นข้าวฟ่างหวาน มีอัตราการเกิดเอทานอลและผลผลิตเอทานอลที่ได้ใกล้เคียงกับเซลล์อิสระจึงเป็นผลดีที่จะศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำด้วยการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงรูปในกระบวนการหมักแบบอื่นๆ เช่นการหมักแบบกะซ้ำ เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักให้ดีขึ้นต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) ของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่สภาวะเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

วัชพืชน้ำ	($Y_{p/s}$) (กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ) (ค่าเฉลี่ย±S.D.)					(Q_p) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) (ค่าเฉลี่ย±S.D.)				
	เซลล์อิสระ*	เซลล์ตรึงรูป**				เซลล์อิสระ	เซลล์ตรึงรูป			
		แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้าวฟ่างหวาน		แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้าวฟ่างหวาน
ผักตบชวา	0.48±	0.49±	0.48±	0.41±	0.47±	0.31±	0.25±	0.27±	0.22±	0.25±
	$0.01^{a,x}$	$0.01^{a,x}$	$0.01^{a,x}$	$0.01^{a,y}$	$0.01^{a,x}$	$0.01^{a,x}$	$0.02^{a,y}$	$0.00^{a,xy}$	$0.01^{a,y}$	$0.01^{a,y}$
จอกน้ำ	0.41±	0.41±	0.41±	0.31±	0.32±	0.26±	0.21±	0.23±	0.18±	0.18±
	$0.00^{b,x}$	$0.01^{b,x}$	$0.01^{b,x}$	$0.00^{c,y}$	$0.00^{b,y}$	$0.01^{b,x}$	$0.01^{b,y}$	$0.01^{b,x}$	$0.01^{ab,y}$	$0.01^{b,y}$
ธูปฤาษี	0.47±	0.48±	0.46±	0.34±	0.40±	0.30±	0.24±	0.26±	0.19±	0.22±
	$0.01^{a,x}$	$0.00^{a,x}$	$0.02^{ab,x}$	$0.01^{b,y}$	$0.02^{ab,y}$	$0.00^{a,x}$	$0.01^{a,y}$	$0.01^{ab,y}$	$0.02^{a,z}$	$0.02^{a,yz}$

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\leq0.05$) และ x, y, z,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์($p\leq0.05$) (* การเกิดเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก; **การเกิดเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 30 ของการหมัก)

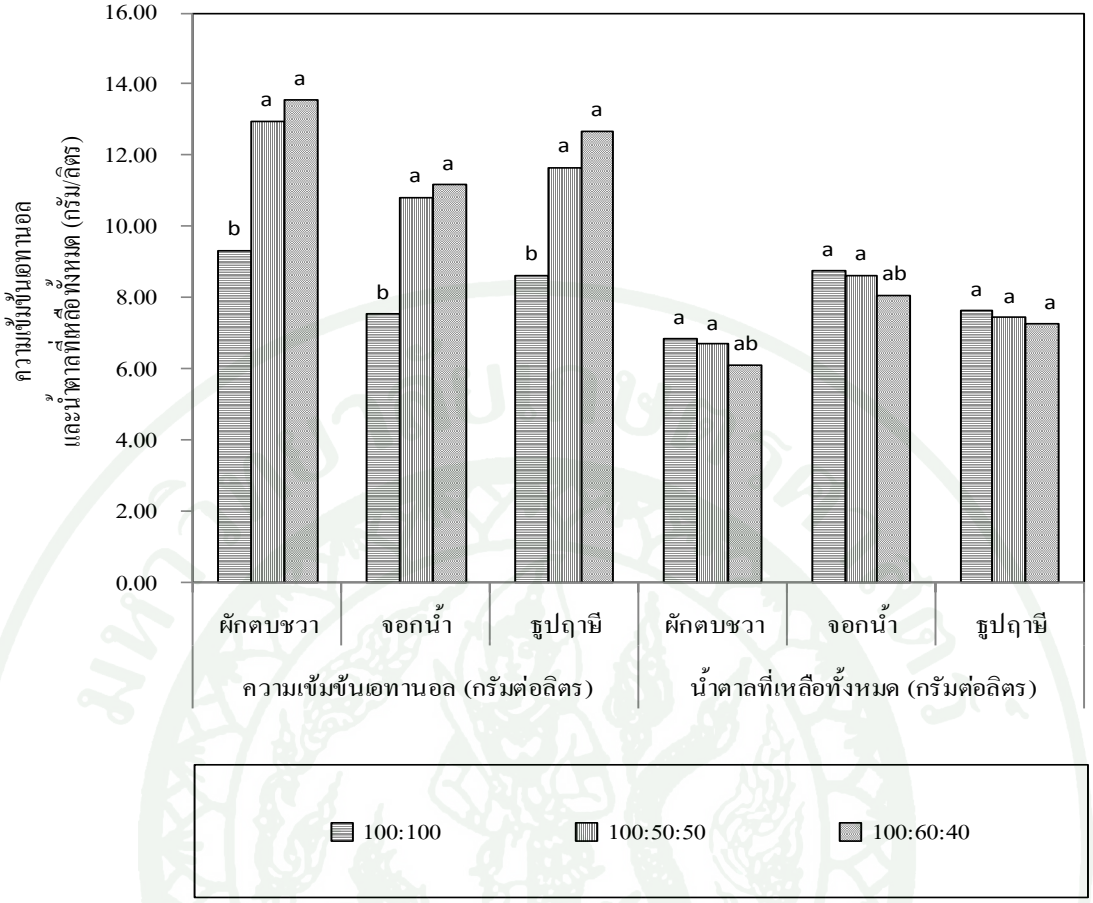
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของพืชน้ำหลังจากผ่านขบวนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสโดยการหมักแบบกึ่งกะ ในฟลาส์กระดับห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดลองในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ เวลาในการหมักดำเนินไปถึง 36 ชั่วโมง ระบบการหมักแบบกึ่งกะ มีอัตราการใช้น้ำตาลและอัตราการผลิตเอทานอลในช่วงแรกเป็นไปในแนวเดียวกันกับระบบการหมักแบบกะ เมื่อเติมอาหารใหม่เพิ่มเข้าไปในระบบการหมักแบบกึ่งกะ จะมีอัตราการใช้สารตั้งต้นและอัตราการผลิตเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ในการหมักแบบกึ่งกะ การเติมอาหารครั้งแรกและครั้งที่สองได้ดำเนินการที่ 6 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งวิธีการให้สารตั้งต้นด้วยการเติมอาหารวัชพืชน้ำที่อธิบายไว้ในขั้นตอนการทดลอง พบว่าวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลในการหมักแบบกึ่งกะ เป็นการให้สารตั้งต้นโดยการเติมอาหารวัชพืชน้ำสองครั้งที่มีปริมาณอาหารเริ่มต้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วยการเติมอาหารสองครั้งที่ชั่วโมง 6 และ 12 ด้วยร้อยละ 60 และร้อยละ 40 ของปริมาณอาหารทั้งหมด 200 มิลลิลิตร (100:60:40) ซึ่งให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดในผักตบชวาและธูปฤาษี ซึ่งดูได้จากประสิทธิภาพการหมัก (Ey) (ตารางที่ 9) ที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระหว่างการหมักแบบกะ และหมักแบบกึ่งกะ พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ในตอนท้ายของการหมัก มีความคล้ายกันในทั้งสองระบบการหมัก แต่ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดในการหมักกะจะให้ความเข้มข้นเอทานอลที่ต่ำกว่าการหมักแบบกึ่งกะ แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำสามารถปรับปรุงกระบวนการหมักให้ดีขึ้นโดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ จากรายงานของ (Zoecklein *et al*., 1995) พบว่าปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมดจะสะสมเพิ่มขึ้นหลังจากที่มีการเติมอาหารใหม่เข้าไป ในขณะที่ปริมาณการเติมอาหารและปริมาณการทำงานเริ่มต้นเท่ากัน ซึ่งการสะสมน้ำตาลที่สูงขึ้นอาจจะเป็นข้อเสียของการหมักแบบกึ่งกะ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้อื่นๆ (by-products) เช่น glycerol, succinate, alpha-ketogutarate, butanediol และ diacetyl อาจจะมีการผลิตสารดังกล่าวในระหว่างการหมักทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอทานอลของยีสต์ได้

Altıntas *et al*., (2002) รายงานว่าวิธีการเติมอาหารให้เหมาะสมต่อระบบการหมักเอทานอลสามารถปรับปรุงการผลิตในกระบวนการหมักเอทานอลให้ได้ผลผลิตที่ดีขึ้นได้ สำหรับการศึกษาครั้งนี้การหมักแบบกึ่งกะ จะมีการเติมอาหารวัชพืชน้ำในปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางภาคผนวกที่ ค4-6) ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่เท่ากัน วิธีการให้สารตั้งต้นด้วยการเติมอาหารที่ต่างกันไม่ได้ส่งผลกระทบต่อค่า P, Y_{ps} และ Q_p ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการคำนวณค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสำหรับการหมักในระดับอุตสาหกรรมได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะที่เติมอาหารวัชพืชน้ำครั้งเดียว (100:100) และเติมอาหารวัชพืชน้ำสองครั้ง ได้แก่ (100:50:50) และ(100:60:40) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ผลการทดลองที่ได้รับจากการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอทานอลที่มีประสิทธิภาพจากวัชพืชน้ำเป็นไปได้เมื่อใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในแง่ของความเข้มข้นของเอทานอลและผลผลิต แต่ผลผลิตที่ได้อาจต่ำกว่าระบบการหมักแบบอื่น ๆ เช่นหมักแบบกะซ้ำ หรือการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้การตรึงเซลล์ (Amutha and Gunasekaran ,2001; Go¨ksungur and Zorlu ,2001; Ogbonna *et al*., 2001) ดังนั้นควรจะทำการศึกษาต่อไปเพื่อหาวิธีการหมักที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำ เพราะอาจนำไปสู่การปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลได้ดียิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างไรก็ตาม การผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบกึ่งกะที่มีเติมอาหารน้ำตาลรีดิวซ์ 2 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ด้วยการหมักกึ่งกะ ที่มีการป้อนอาหารน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำ 2 ครั้ง โดยแบ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใส่ครั้งละร้อยละ 60 และร้อยละ 40 เริ่มต้นจากการเตรียมอาหารน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และเติมอาหารน้ำตาลรีดิวซ์ใส่ 2 ครั้งที่ 6 และ 12 ชั่วโมง ครั้งละ 60 และ 40 มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นได้ปริมาตรสุดท้ายรวมทั้งหมดเท่ากับ 200 มิลลิลิตร พบว่าผลการเจริญของ *C. shehatae* TISTR 5843 สูงกว่าการทดลองหมักแบบกึ่งกะที่เติมอาหารน้ำตาลรีดิวซ์ครั้งเดียว โดยให้ปริมาณความขุ่นเซลล์สูงสุดก่อนป้อนอาหารน้ำตาลครั้งสุดท้ายที่ 12 ชั่วโมงในน้ำตาลรีดิวซ์จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษีเท่ากับ 15.34, 12.81 และ14.28 ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ค24) และค่าความขุ่นเซลล์ยังคงเพิ่มขึ้นไปเรื่อย ๆ จนถึง 17.61, 11.18 และ16.75ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 24 เปรียบเทียบกับการหมักแบบกึ่งกะที่เติมอาหารน้ำตาลรีดิวซ์ครั้งเดียวซึ่งมีความขุ่นเซลล์ก่อนป้อนอาหารน้ำตาลรีดิวซ์ครั้งสุดท้ายที่ 12 ชั่วโมง น้อยกว่า คือได้เท่ากับ 14.44, 8.26 และ 13.67 จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ค23) เป็นไปได้ที่เนื่องจากเวลาในการป้อนอาหารเร็วขึ้นของการเติมอาหารน้ำตาลรีดิวซ์ 2 ครั้ง จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลก่อนการป้อนอาหารทั้งสองครั้งไม่ลดต่ำจนหมด จึงมีน้ำตาลพอเพียงกับการเจริญของเซลล์ยีสต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบกะ พบว่าการหมักแบบกึ่งกะที่มีการป้อนอาหารน้ำตาล 2 ครั้งนี้ให้ผลการเจริญที่วัดเป็นค่าความขุ่นของเซลล์สูงกว่าเช่นกัน ในส่วนของปริมาณเอทานอลที่ได้ก็มีแนวโน้มสูงตามปริมาณเซลล์ที่ได้เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งค่าตัวแปรทางจลนศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ ในการหมักแบบกึ่งกะโดยมีการเติมอาหารปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 9) พบว่าผักตบชวาให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด ในทุกๆการเติมอาหารของการหมักแบบกึ่งกะ โดยการเติมอาหารวัชพืชน้ำสองครั้งที่มีปริมาณอัตราส่วนการเติม (100:60:40) ให้ความเข้มข้นเอทานอลที่มากกว่าการเติมอาหารครั้งเดียว และการเติมอาหารสองครั้งในอัตราส่วนการเติม (100:50:50) ความเข้มข้นเอทานอลจากผักตบชวา จอกน้ำ ธูปฤาษี สำหรับการเติมอาหารในอัตราส่วน(100:60:40) เท่ากับ 13.54 ±0.62, 11.17 ±0.79 และ 12.68 ±0.49 ตามลำดับ ส่งผลให้อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p)และผลผลิตเอทานอล (Y_{ps}) มีค่าที่สูงขึ้นด้วย ซึ่งมากกว่าการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำแบบกะ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกับ Roukas (1996) พบว่าการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ได้จากหัวบีทที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ เมื่อนำมาทดลองหมักแบบกึ่งกะให้ผลดีกว่าการหมักแบบกะ และสามารถนำเทคนิคการตรึงเซลล์มาใช้กับระบบกึ่งกะได้ ซึ่งจะให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการหมักแบบกะที่ใช้การตรึงเซลล์เหมือนกัน แต่ในการหมักแบบกึ่งกะพบว่าถ้าใช้ระบบเซลล์อิสระ จะให้ผลการหมักเอทานอลที่ดีกว่าการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงรูป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ค่าตัวแปรทางจลนศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำในการหมักแบบกึ่งกะโดยมีการเติมอาหารปริมาณที่แตกต่างกัน โดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค่าตัวแปร	ผักตบชวา			จอกน้ำ			ธูปฤาษี		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
P* (กรัม/ลิตร)	9.33 ±0.33^{b}	12.96 ±1.00^{a}	13.54 ±0.62^{a}	7.54 ±0.44^{b}	10.82 ±0.83^{a}	11.17 ±0.79^{a}	8.64 ±0.91^{b}	11.66 ±0.81^{a}	12.68 ±0.49^{a}
Y_{ps} (กรัม/กรัม)	0.47 ±0.01^{a}	0.46 ±0.01^{ab}	0.48 ±0.01^{a}	0.38 ±0.01^{a}	0.39 ±0.01^{a}	0.40 ±0.01^{a}	0.43 ±0.01^{a}	0.42 ±0.01^{ab}	0.45 ±0.01^{a}
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	0.39 ±0.01^{b}	0.54 ±0.01^{a}	0.56 ±0.01^{a}	0.31 ±0.01^{b}	0.45 ±0.01^{a}	0.47 ±0.01^{a}	0.37 ±0.01^{b}	0.47 ±0.01^{a}	0.50 ±0.01^{a}
E_y (%)	91.47±0.00^{ab}	90.76±0.01^{ab}	94.82±0.01^{a}	73.92±0.01^{b}	75.77±0.00^{ab}	78.22±0.00^{a}	84.71±0.01^{a}	81.65±0.02^{ab}	88.80±0.01^{a}

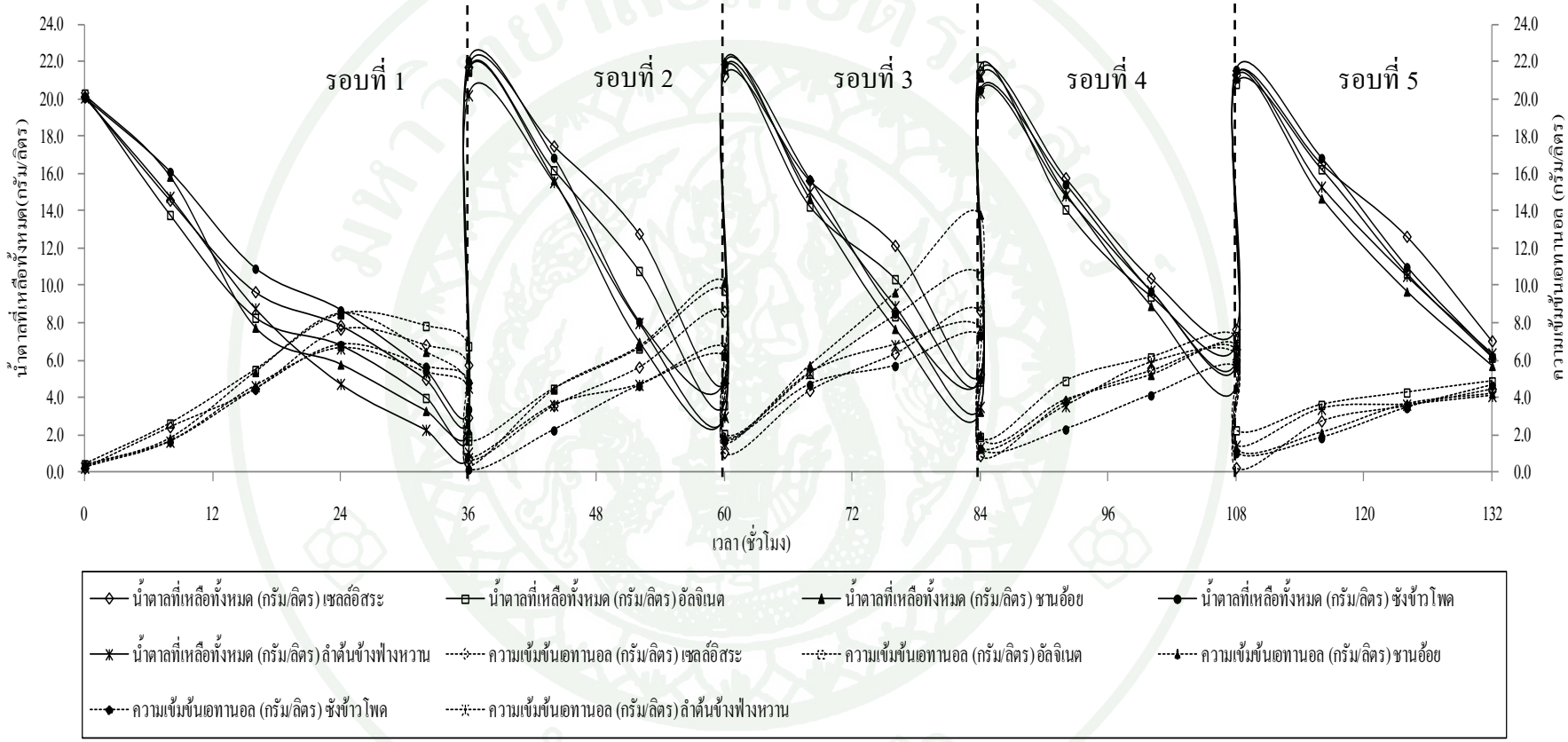
หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) โดยทำการศึกษาสัดส่วนการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอทานอลที่แตกต่างกัน 3 ชุด คือ ชุดที่ 1 (สัดส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ชุดที่ 2 (สัดส่วน 1:0.5:0.5 โดยปริมาตร) และ ชุดที่ 3 (สัดส่วน 1:0.6:0.4 โดยปริมาตร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

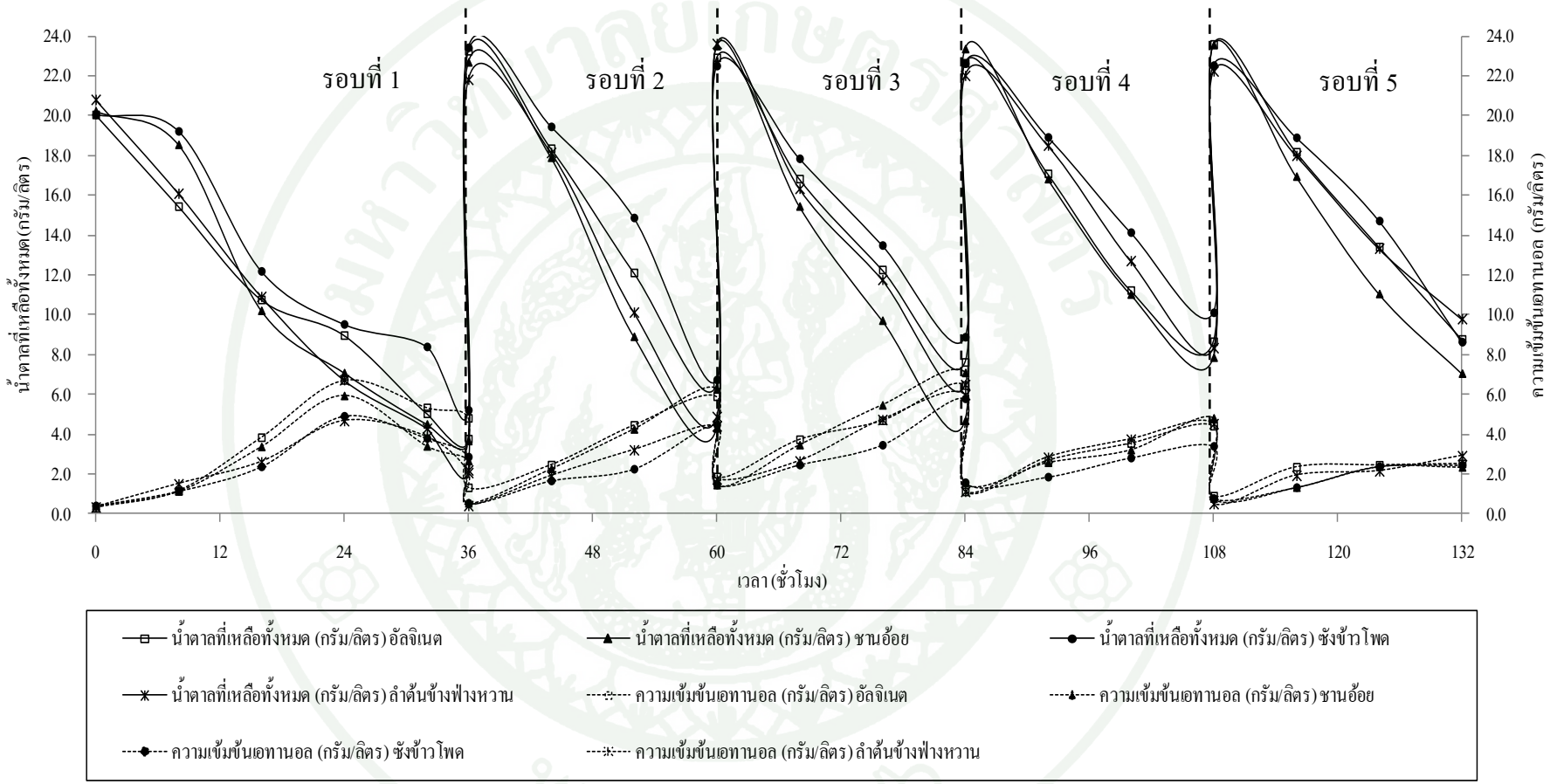
6. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของพืชน้ำหลังจากผ่านขบวนการปรับสภาพและการไฮโดรซีสโดยการหมักแบบกะซ้ำในฟลาส์กระดับห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดลองการหมักเอทานอลแบบกะซ้ำ พบว่าการทำกะซ้ำโดยการเติมอาหารน้ำตาลรีดิวซ์วัชพืชน้ำเข้าไปใหม่ แทนน้ำส่าที่ถ่ายออกที่เวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าการหมักของกะแรกจะผลิตเอทานอลสูงที่สุดจะเกิดในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก โดยจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลใกล้หมดจนอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ และเนื่องจากผลการทดลองที่เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง ให้ผลการเจริญสูงสุดและที่สำคัญให้ผลปริมาณเอทานอลที่สูงด้วยเช่นกัน ดังนั้นเวลาการหมักที่ 24 ชั่วโมง จึงเหมาะที่จะเป็นเวลาในการยุติการหมักเพื่อให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงทำการออกแบบการหมักแบบกะซ้ำเช่นเดิมอีกครั้งโดยทำการหมักแบบกะติดต่อกัน 5 ครั้ง และในการหมักแต่ละครั้งเมื่อทำการหมักครบ 24 ชั่วโมง จึงหยุดหมักโดยหยุดเขย่า ทิ้งให้เซลล์ยีสต์ตกตะกอนลงด้านล่างของขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงถ่ายน้ำส่าส่วนบนออกไปและเติมอาหารใหม่เข้าแทนที่ การทดลองครั้งนี้พบว่าผลการทดลองของการหมักรอบแรกปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ โดยการหมักด้วยการใช้เซลล์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตในผักตบชวาให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดได้เท่ากับ 8.47 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง เนื่องจากการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เป็นไปอย่างช้าจากการที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่ำ ซึ่งไม่เป็นไปตามวิธีการทดลองที่ตั้งไว้ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเมื่อวัดเป็นค่าความขุ่นของเซลล์ของผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 0.84, 0.71 และ0.55 (ตารางภาคผนวกที่ ค25) และนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นทั้งหมดเท่ากับ 1.61×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ในการหมักรอบต่อมาโดยเฉพาะการหมักรอบที่ 2 และรอบที่ 3 พบว่าปริมาณ เอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้สูงสุดถึง 9.73 และ 10.55 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 19) และพบว่าการหมักด้วยการใช้เซลล์ตรึงรูปด้วยชานอ้อยในผักตบชวาให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดได้เท่ากับ 8.53 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งการหมักรอบต่อมารอบที่ 2 และรอบที่ 3 พบปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้สูงสุดถึง 10.23 และ 13.87 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมงในรอบของการหมักนั้นๆ (ตารางภาคผนวกที่ค9) ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้เซลล์ที่ตรึงรูปด้วยชานอ้อยสามารถให้ความเข้มข้นเอทานอลที่สูงกว่าการใช้เซลล์ตรึงรูปในอัลจิเนต จึงเป็นผลดีต่อการใช้วัสดุตรึงจากธรรมชาติที่สามารถหาได้ง่าย ราคาประหยัด วิธีการเตรียมไม่ยุ่งยากนักมาทดแทนการใช้อัลจิเนต ซึ่งเป็นวัสดุตรึงที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยาก และที่สำคัญมีราคาแพงกว่า ส่วนการหมักแบบกะซ้ำในจอกน้ำและธูปฤาษี พบว่าการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงรูปในอัลจิเนตและชานอ้อยให้ความเข้มข้นเอทานอลที่ใกล้เคียงกัน จึงได้เลือกวัสดุตรึงรูปเซลล์ยีสต์โดยใช้อัลจิเนต และชานอ้อยสำหรับการทดลองต่อไป คือการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

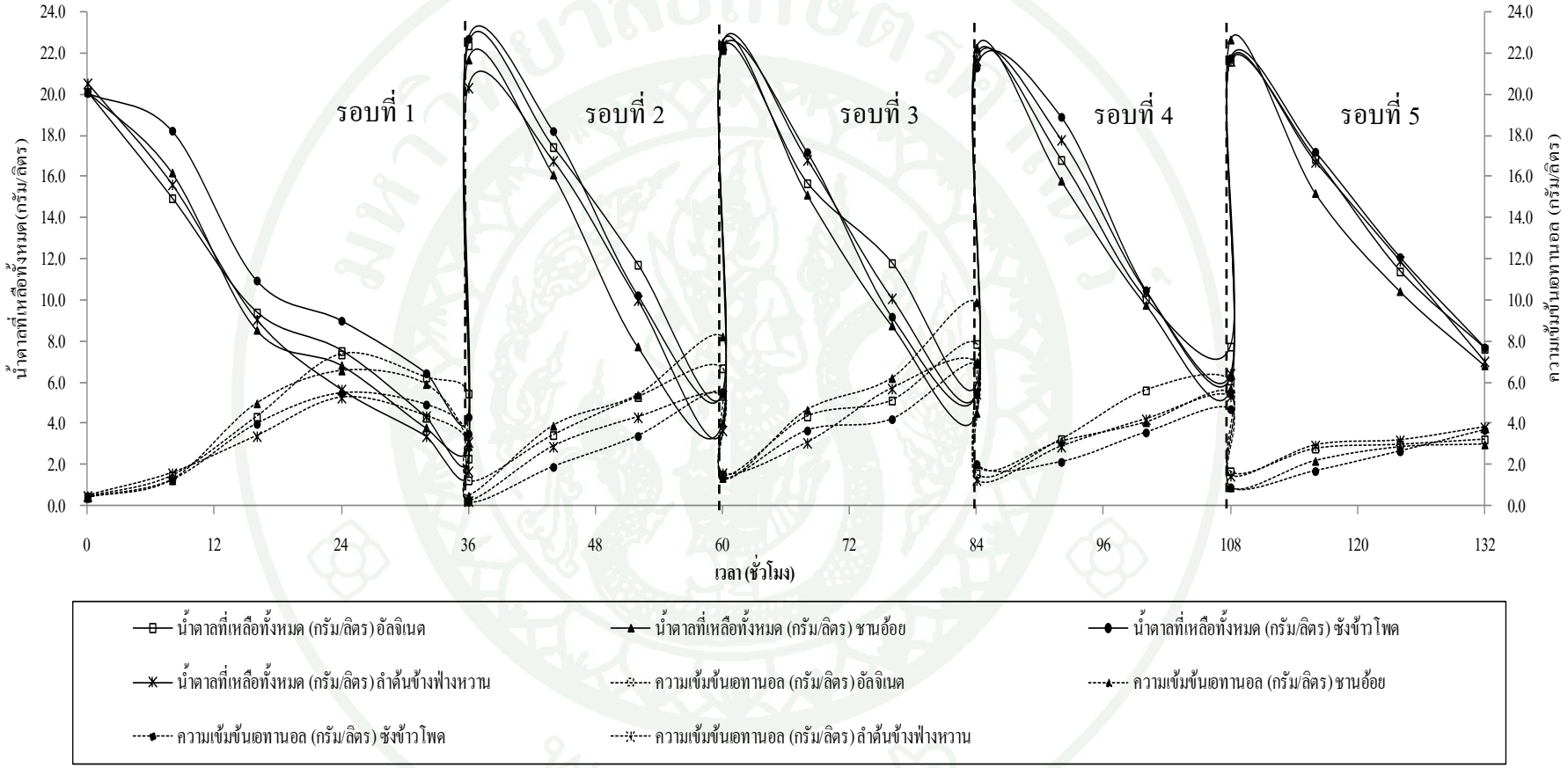


ภาพที่ 19 การหมักเอทานอลและการใช้น้ำตาลจากผักตบชวาของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยวัสดุตรึงต่างๆ ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ



ภาพที่ 20 การหมักเอทานอลและการใช้น้ำตาลจากจอกน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยวัสดุตรึงต่างๆ ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 การหมักเอทานอลและการใช้น้ำตาลจากธูปฤาษีของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยวัสดุตรึงต่างๆ ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

จากการคำนวณอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) และผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) ของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำที่ได้จากกระบวนการหมักในการหมักแบบกะซ้ำ ของยีสต์ *C.shehatae* TISTR 5843 เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้น 5.0 ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (ตารางที่ 10-12) ในแบทช์แรก และในการหมักแบบกะซ้ำในรอบต่อๆไป รอบละ 24 ชั่วโมง ในวัสดุตรึงรูปที่แตกต่างกัน พบว่าผักตบชวามีอัตราการผลิตเอทานอลที่สูงที่สุด โดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงรูปในชานอ้อยมีอัตราการเกิดเอทานอลและผลผลิตเอทานอลมากที่สุด จากผักตบชวา, จอกน้ำ และธูปฤาษี (Q_p) เท่ากับ 0.58, 0.30 และ 0.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ($Y_{p/s}$)เท่ากับ 0.63, 0.30 และ 0.44 กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ ตามลำดับ ซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงรูปในอัลจิเนต และชานอ้อยมีอัตราการเกิดเอทานอลและผลผลิตเอทานอลที่ใกล้เคียงกัน โดยทุกๆวัสดุตรึงรูปให้ผลผลิตเอทานอล และอัตราการเกิดเอทานอลสูงสุดที่ได้จากการหมักเอทานอลด้วยผักตบชวา สามารถทำการหมักแบบกะซ้ำได้ถึง 4 รอบ ซึ่งให้ประสิทธิภาพการหมักที่มากกว่าร้อยละ 50 ตามที่กำหนดไว้ในขั้นตอนการทดลอง เมื่อทำการหมักแบบกะซ้ำไปถึงรอบที่ 5 พบว่าประสิทธิภาพ การหมักลดลงน้อยกว่าร้อยละ 50 จึงหยุดหมักในรอบที่ 5 ของการหมักในทุกวัสดุตรึงรูป ซึ่งพบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงรูปในชานอ้อยของการหมักเอทานอลจากผักตบชวาให้ประสิทธิภาพการหมักสูงที่สุดซึ่งสูงถึง 122.99% ในรอบที่ 3 ของการหมัก เมื่อทำการหมักในรอบที่ 4 และ5 ประสิทธิภาพการหมักจึงค่อยๆลดลงในรอบที่ 5 ของการหมักประสิทธิภาพการหมักลดลงเหลือ 39.10% จึงหยุดหมักเอทานอลในรอบที่ 5 (ตารางที่ 10) และพบว่าอัตราการเกิดเอทานอลและผลผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักแบบกะซ้ำมีค่ามากกว่าการหมักแบบกะ ตามรายงานของ Nishizawa *et al*., (1984) ได้กล่าวว่ากระบวนการหมักแบบกะซ้ำ ก็เป็นการหมักแบบกะเช่นกันเพียงแต่หลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลงจะทำการถ่ายน้ำหมักออกไปส่วนหนึ่ง และเหลือน้ำส่าอีกส่วนหนึ่งไว้ในถังหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักรอบต่อไป ซึ่งจะเห็นได้ว่าการหมักวิธีนี้จะช่วยลดระยะเวลาระหว่างการหมักในแต่ละครั้ง เช่น ระยะเวลาที่เสียไปกับการเตรียมถังหมัก การเตรียมกล้าเชื้อเป็นต้น ทำให้การหมักในแต่ละครั้งมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูงคงที่ส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้สูง แต่อย่างไรก็ตาม Espinosa *et al*., (1987) รายงานว่าในระบบที่มีการนำ เซลล์กลับมาใช้ใหม่นั้น หลังจากใช้ไป 3-4 ครั้ง และเมื่อหมักเอทานอลได้สูงถึง 100 - 110 กรัมต่อลิตร ยีสต์จะใช้เวลาในการหมักเอทานอลนานขึ้น นอกจากนี้ยังอาจมีการปรับปรุงกระบวนการหมักแบบกึ่งกะไปร่วมใช้กับวิธีอื่น ๆ เช่น พบว่าการนำเซลล์ที่ถูกตรึงมาใช้กับการหมักแบบกึ่งกะ จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ปกติที่ไม่ถูกตรึงรูป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) สูงสุด และประสิทธิภาพการหมักของการผลิตเอทานอลจากผักตบชวาที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

รอบการหมัก	Yp/s (กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ)				Qp (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)				ประสิทธิภาพการหมัก (%)			
	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน
รอบที่ 1	$0.42^{ab,A}$	$0.42^{bc,A}$	$0.34^{a,B}$	$0.33^{ab,B}$	$0.35^{b,A}$	$0.36^{c,A}$	$0.28^{ab,B}$	$0.28^{ab,B}$	$82.18^{b,A}$	$82.70^{c,A}$	$66.61^{a,B}$	$64.70^{b,B}$
รอบที่ 2	$0.45^{a,A}$	$0.48^{b,A}$	$0.28^{ab,C}$	$0.33^{ab,B}$	$0.41^{ab,A}$	$0.43^{b,A}$	$0.26^{ab,B}$	$0.28^{ab,B}$	$88.57^{b,B}$	$93.41^{b,A}$	$55.35^{b,D}$	$64.67^{b,C}$
รอบที่ 3	$0.49^{a,B}$	$0.63^{a,A}$	$0.33^{a,C}$	$0.36^{a,C}$	$0.44^{a,B}$	$0.58^{a,A}$	$0.30^{a,C}$	$0.32^{a,C}$	$95.58^{a,B}$	$122.99^{a,A}$	$65.48^{a,D}$	$70.08^{a,C}$
รอบที่ 4	$0.33^{b,A}$	$0.32^{c,A}$	$0.28^{ab,B}$	$0.31^{b,A}$	$0.30^{b,A}$	$0.28^{cd,B}$	$0.24^{b,B}$	$0.26^{ab,B}$	$65.66^{c,A}$	$63.31^{d,A}$	$53.94^{b,B}$	$60.78^{bc,AB}$
รอบที่ 5	$0.23^{c,A}$	$0.20^{d,A}$	$0.22^{b,A}$	$0.19^{c,B}$	$0.20^{c,A}$	$0.18^{d,B}$	$0.19^{c,B}$	$0.17^{b,B}$	$45.84^{d,A}$	$39.10^{e,C}$	$42.17^{c,B}$	$37.60^{c,C}$

หมายเหตุ: a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) สูงสุด และประสิทธิภาพการหมักของการผลิตเอทานอลจากจอกน้ำที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

รอบการหมัก	Yp/s (กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ)				Qp (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)				ประสิทธิภาพการหมัก (%)			
	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน
รอบที่ 1	$0.34^{a,A}$	$0.29^{ab,B}$	$0.25^{a,C}$	$0.22^{ab,C}$	$0.28^{a,A}$	$0.25^{ab,A}$	$0.21^{a,A}$	0.19^{ab}	$65.72^{a,A}$	$57.56^{a,A}$	$48.11^{ab,B}$	$44.06^{ab,B}$
รอบที่ 2	$0.25^{ab,A}$	$0.28^{ab,A}$	$0.19^{ab,B}$	$0.20^{ab,AB}$	$0.25^{a,A}$	$0.26^{ab,A}$	$0.19^{ab,B}$	$0.18^{ab,B}$	$49.76^{b,B}$	$54.27^{ab,A}$	$37.51^{b,C}$	$39.63^{b,C}$
รอบที่ 3	$0.28^{ab,A}$	$0.30^{a,A}$	$0.26^{a,AB}$	$0.25^{a,B}$	$0.27^{a,,A}$	$0.30^{a,A}$	$0.24^{a,AB}$	$0.25^{a,AB}$	$55.31^{ab,AB}$	$59.18^{a,A}$	$50.50^{a,B}$	$49.65^{a,B}$
รอบที่ 4	$0.20^{b,A}$	$0.21^{b,A}$	$0.15^{ab,B}$	$0.21^{ab,A}$	$0.18^{b,A}$	$0.20^{ab,A}$	$0.14^{ab,B}$	$0.19^{ab,A}$	$38.27^{c,B}$	$40.46^{b,A}$	$29.55^{c,C}$	$40.32^{b,A}$
รอบที่ 5	$0.11^{c,A}$	$0.10^{c,A}$	$0.11^{b,A}$	$0.13^{b,A}$	$0.11^{c,A}$	$0.10^{b,A}$	$0.10^{b,A}$	$0.12^{b,A}$	$21.02^{d,A}$	$19.57^{c,B}$	$21.43^{d,A}$	$25.72^{c,A}$

หมายเหตุ: a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95

A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) สูงสุด และประสิทธิภาพการหมักของการผลิตเอทานอลจากฐูปฤาษีที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

รอบการหมัก	Yp/s (กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ)				Qp (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)				ประสิทธิภาพการหมัก (%)			
	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ข้างฟ่างหวาน
รอบที่ 1	$0.37^{a,A}$	$0.33^{b,A}$	$0.27^{a,B}$	$0.26^{b,B}$	$0.31^{a,A}$	$0.27^{c,A}$	$0.23^{ab,A}$	$0.22^{ab,A}$	$71.72^{a,A}$	$63.96^{c,B}$	$53.52^{b,C}$	$50.17^{b,C}$
รอบที่ 2	$0.30^{ab,A}$	$0.38^{b,A}$	$0.24^{ab,B}$	$0.26^{b,B}$	$0.28^{b,A}$	$0.34^{b,A}$	$0.23^{ab,AB}$	$0.22^{ab,AB}$	$58.56^{b,B}$	$74.37^{b,A}$	$47.73^{c,D}$	51.74^{C}
รอบที่ 3	$0.35^{a,AB}$	$0.44^{a,A}$	$0.31^{a,B}$	$0.31^{a,B}$	$0.33^{a,B}$	$0.41^{a,A}$	$0.29^{a,C}$	$0.29^{a,C}$	$69.60^{a,B}$	$86.14^{a,A}$	$61.00^{a,C}$	$60.65^{a,C}$
รอบที่ 4	$0.28^{b,A}$	$0.25^{c,A}$	$0.22^{ab,B}$	$0.25^{b,A}$	$0.25^{b,A}$	$0.23^{c,A}$	$0.20^{ab,A}$	$0.22^{ab,A}$	$54.55^{b,A}$	$48.40^{d,B}$	$43.25^{c,C}$	$48.06^{c,B}$
รอบที่ 5	$0.15^{c,A}$	$0.13^{d,B}$	$0.17^{b,A}$	$0.18^{c,A}$	$0.13^{c,A}$	$0.12^{d,AB}$	$0.15^{b,A}$	$0.16^{b,A}$	$29.32^{c,B}$	$25.82^{e,C}$	$33.21^{d,A}$	$34.54^{d,A}$

หมายเหตุ: a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95

A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การศึกษาการหมักเผลิตอทานอลของวัชพืชน้ำหลังจากผ่านขบวนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสโดยการหมักในถังหมักแบบแพคเบด

7.1 ผลของอัตราการไหลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อการผลิตเอทานอลในถังหมักแบบแพคเบด

อาหารวัชพืชน้ำมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ถูกส่งผ่านคอลัมน์แพคเบดในอัตราการไหลที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1.0 -2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปในอัลจิเนตซึ่งเป็นตัวควบคุมสำหรับการตรึงเซลล์ (ภาพที่ 22-24) พบว่าที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดที่ได้จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 21.90±0.12, 18.31±0.22 และ20.42±0.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ค12-14) คิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเท่ากับ 83.49±0.22%, 75.80±0.11% และ 80.08±0.09% ตามลำดับ ส่วนที่อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดรองลงมาซึ่งได้จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 18.93±0.42, 17.27±0.35 และ18.09±0.55 กรัมต่อลิตร และที่อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการไหลอื่นซึ่งได้ความเข้มข้นเอทานอลจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 16.89±0.60, 14.12±0.55 และ15.53±0.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอัตราไหลจะทำให้เกิดการผลิตเอทานอลลดลง ดังนั้นจึงเลือกอัตราไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อทำการทดลองต่อไป ด้วยการหมักเอทานอลในแพคเบดจากอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำที่แตกต่างกันตั้งแต่ 200-240 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยีสต์ที่ตรึงรูปในอัลจิเนต เปรียบเทียบกับชานอ้อยซึ่งเป็นวัสดุตรึงจากธรรมชาติที่สามารถให้ผลผลิตเอทานอลดีกว่าวัสดุตรึงธรรมชาติชนิดอื่นๆในการทดลองที่ผ่านมา เพื่อศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมในการหมักแบบต่อเนื่องโดยหมักในถังหมักแบบแพคเบด

7.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นของอาหารวัชพืชน้ำต่อการผลิตเอทานอลในถังหมักแบบแพคเบด

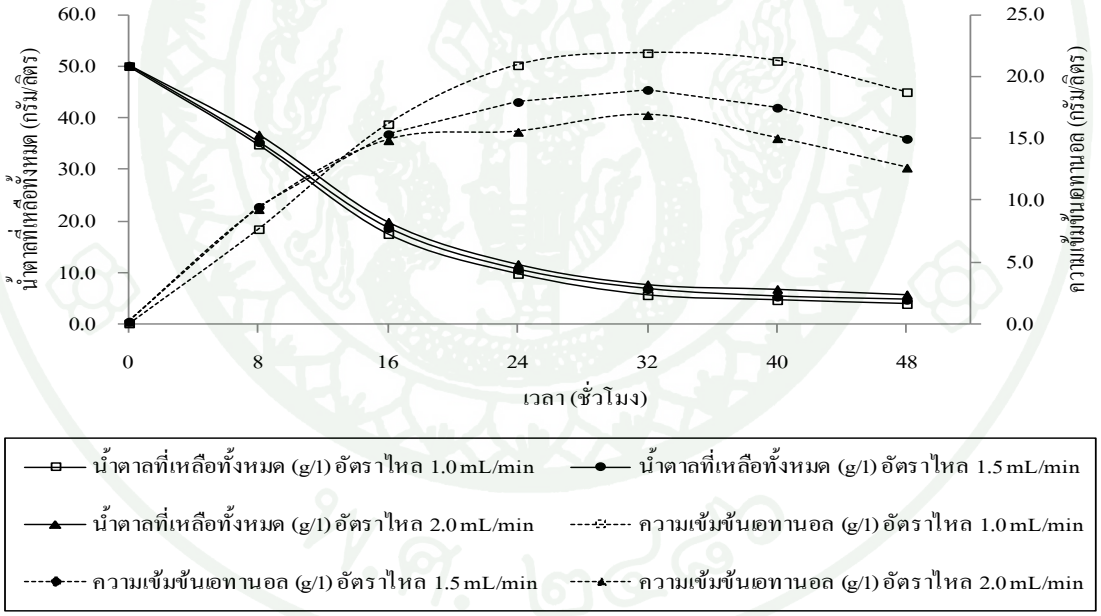
อาหารหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำที่แตกต่างกันตั้งแต่ 200-240 กรัมต่อลิตร ถูกป้อนผ่าน perristaltic pump ไปในคอลัมน์ที่อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที (จากภาพที่ 25-30) พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในอาหาร 220 กรัมต่อลิตร หมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ได้รับจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 94.79±0.46, 78.09±0.48 และ85.46±0.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ตารางภาคผนวกที่ ค15-ค20) โดยคิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเท่ากับ 84.48±0.02%, 69.60±0.13% และ76.17±0.24% ตามลำดับ แต่เมื่อหมักในอาหารหมักจากวัชพืชน้ำที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 240 กรัมต่อลิตร จะทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ลดลงซึ่งได้รับจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 68.39±0.28, 64.97±0.38 และ 67.30±0.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร้อยละประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเท่ากับ 55.88±0.15%, 53.08±0.52% และ54.98±0.41% ตามลำดับ ซึ่งค่าผลผลิตเอทานอล (Q_p) จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารวัชพืชน้ำได้เพิ่มขึ้น และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงมาก ดังนั้นความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำด้วยถังหมักแบบแพคเบดคือ 220 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการหมักแบบกะซ้ำในระบบการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด พบว่าการใช้เซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนต และชานอ้อยให้ความเข้มข้นเอทานอลที่ใกล้เคียงกัน สามารถหมักเอทานอลให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดติดต่อกัน 2 รอบ เมื่อทำการหมักแบบกะซ้ำในรอบที่ 3 พบว่าความเข้มข้นเอทานอลลดลง ซึ่งต่ำกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในแบทช์แรก จึงหยุดหมักในรอบที่ 3 ของการหมัก โดยเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงรูปด้วยชายอ้อย หมักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตรให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 90.36±3.87, 78.39±0.47 และ83.13±0.34 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 28-30) ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดในรอบแรกของการหมัก ที่ได้รับจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 0.43±0.18, 0.35±0.34 และ 0.39±0.45 สำหรับเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปในอัลจิเนต และ0.41±0.12, 0.36±0.52 และ0.38±0.14 สำหรับเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปชานอ้อย จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ (อนุชิต, 2551) ซึ่งทำการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์แพคเบด (packed-bed) ขนาด 1 ลิตร โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ตรึงรูปบนวัสดุเปลือกรังไหมบาง ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นตัวพยุงเซลล์ได้เป็นอย่างดีทั้งในกระบวนการผลิตแบบกะ แบบกะแบบทำซ้ำ และแบบต่อเนื่อง โดยคุณสมบัติที่เป็นที่พึงพอใจคือการที่เข้าได้เป็นอย่างดีกับเซลล์ยีสต์และคุณสมบัติที่ดีเชิงกล ส่งผลทำให้ได้ อัตราการผลิตเอทานอลที่สูง อัตราการตรึงเซลล์ที่สูง ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูง และระบบมีความเสถียรสำหรับการใช้งานเป็นเวลานาน ซึ่งเมื่อป้อนสารตั้งต้นน้ำตาลที่ 220 กรัมต่อลิตร ที่ อัตราเจือจาง 0.36 ต่อชั่วโมง สามารถทำให้ได้อัตราผลผลิตสูงสุดถึง 19.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเอทานอล 52.83 กรัมต่อลิตร ในขณะที่จะได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ 80.72 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.034 ต่อชั่วโมง โดยเมื่อพิจารณากระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด ซึ่งใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงรูปบนวัสดุตรึงจะให้ผลดีในหลายๆด้าน เช่น ให้ผลได้ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น, ง่ายต่อกระบวนการแยกสารผลิตภัณฑ์, สามารถนำตัวเร่งปฏิกิริยา (เซลล์ยีสต์) กลับมาใช้ใหม่ และให้อัตราการผลิตเอทานอลที่สูงกว่าการหมักเอทานอลแบบกะ

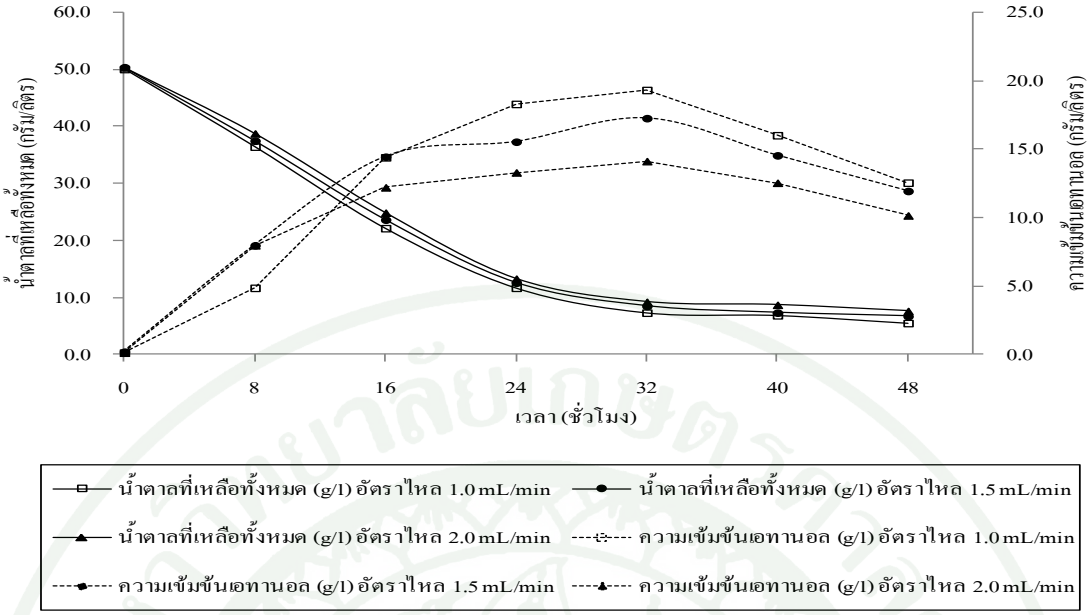
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ภูวิศ, 2550)ได้ศึกษาการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในอัลจิเนตเสริมใยบวบ หมักในถังหมักแบบแพคเบดที่มีการบรรจุวัสดุตรึงไว้ภายในคอลัมน์ และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 32 ± 1 องศาเซลเซียส โดยศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 202, 222 และ 248 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางในถังหมักที่ 0.11, 0.16, 0.20 และ 0.30 ต่อชั่วโมง โดยพบว่าได้อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด เมื่อดำเนินการที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 222 กรัมต่อลิตร ได้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ 81.29 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจางในถังหมัก 0.11 ต่อชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัลจิเนตเสริมใยบวบเป็นวัสดุตรึงที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการนำมาใช้ตรึงเซลล์ยีสต์ในถังหมักแบบแพคเบดสำหรับการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง เนื่องด้วยวัสดุตรึงเซลล์ที่ได้พัฒนาขึ้นมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดีและมีโครงสร้างที่มีรูพรุนสูง ทำให้สามารถนำมาใช้กับกระบวน การผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องอย่างน้อย 30 วันที่ให้อัตราการผลิตเอทานอลสูงโดยไม่ทำให้เสถียรภาพของระบบเปลี่ยนแปลง ข้อมูลดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

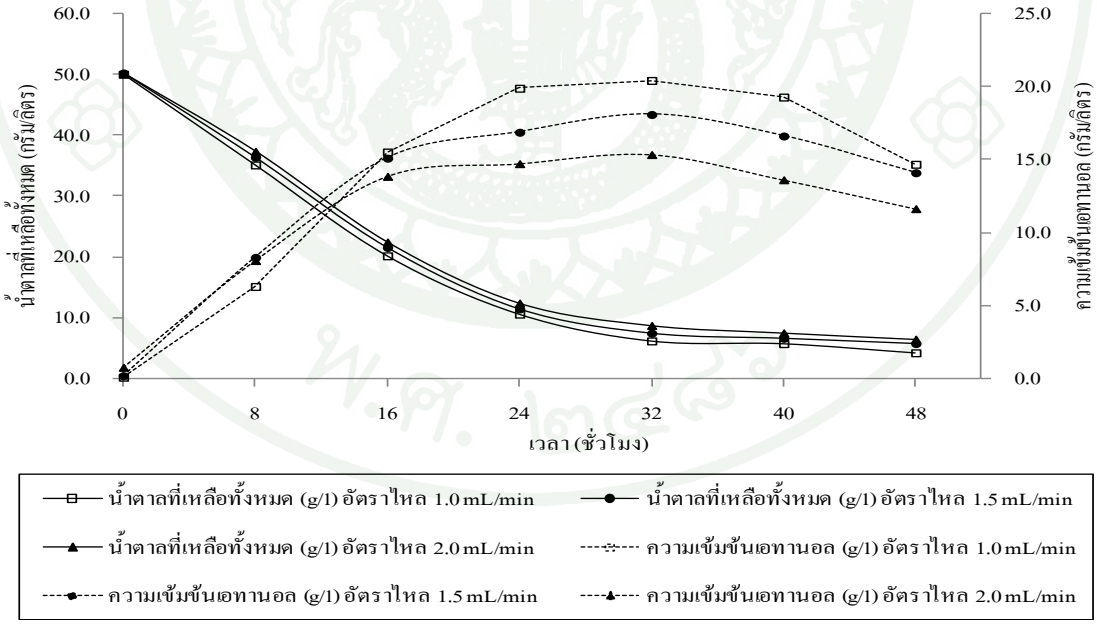


ภาพที่ 22 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากผักตบชวาของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

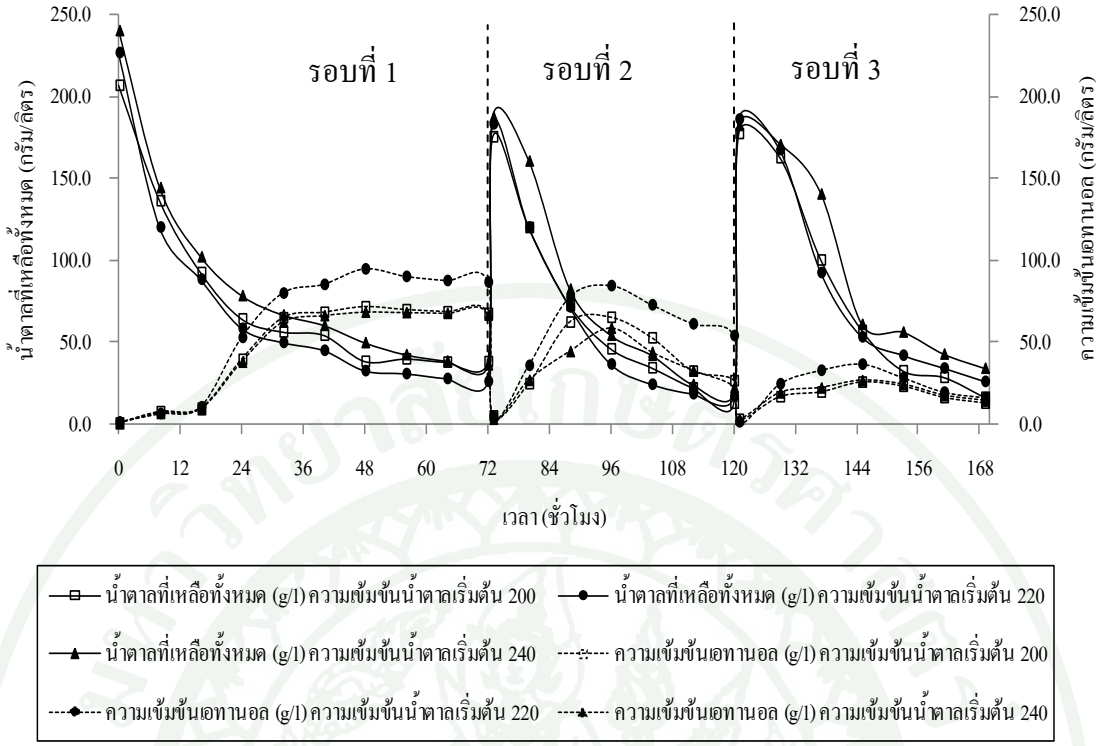


ภาพที่ 23 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากจอกน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที



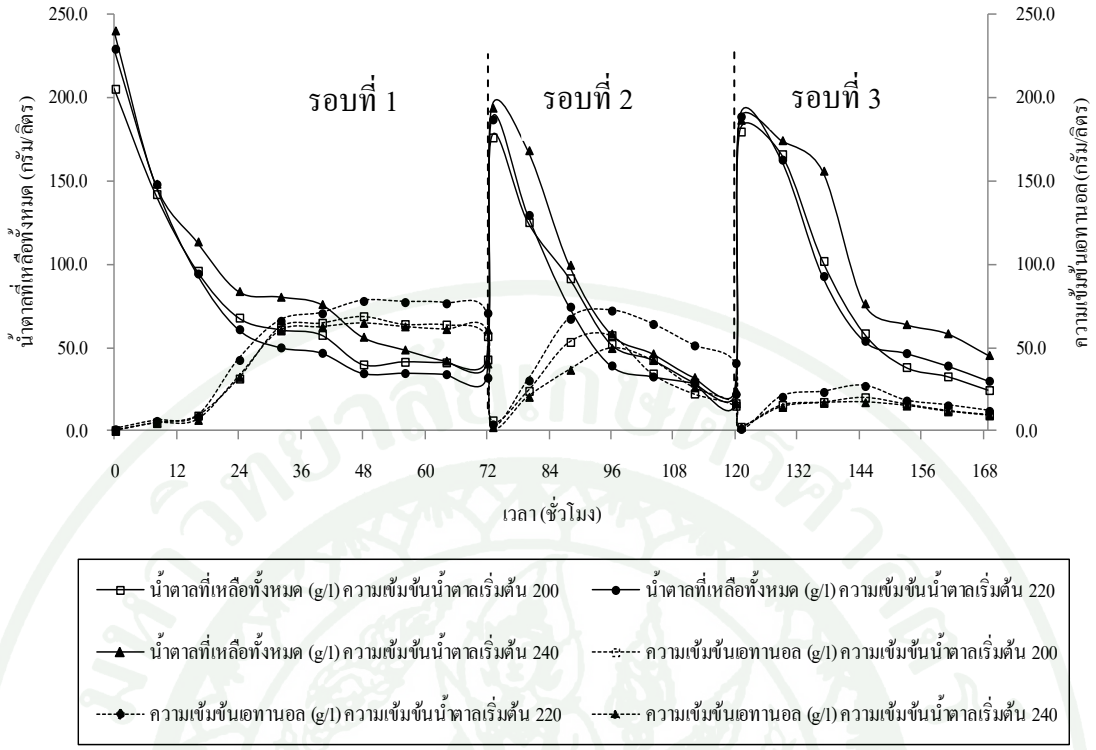
ภาพที่ 24 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากธูปฤาษีของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



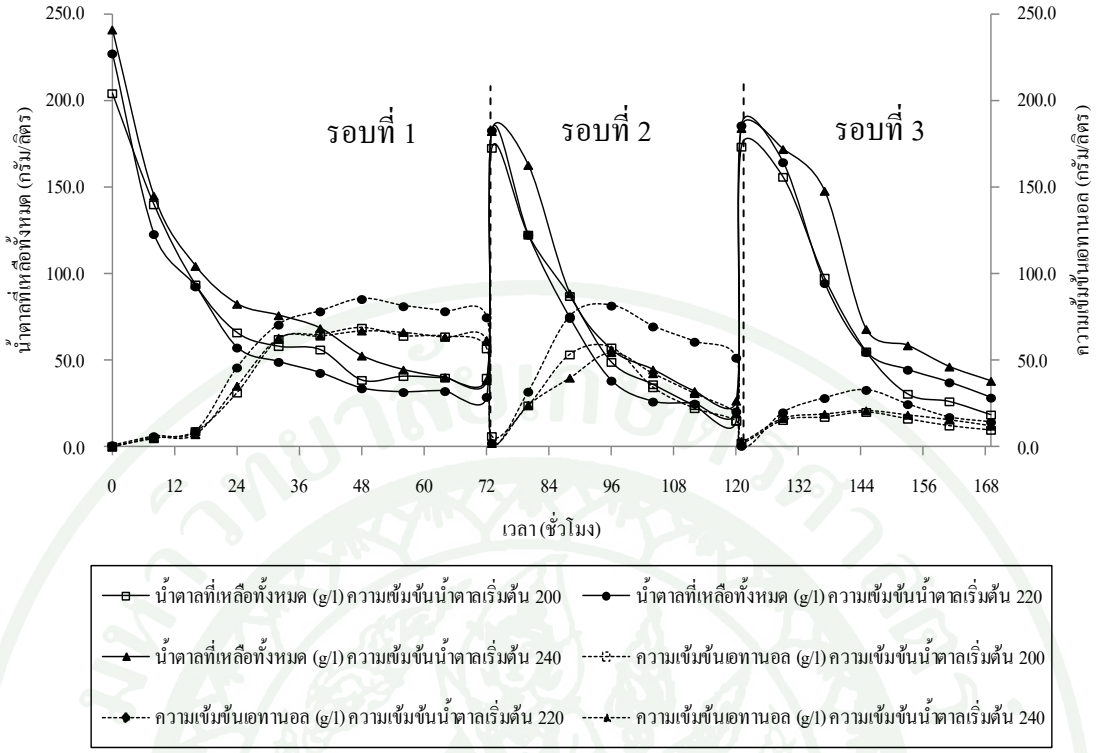
ภาพที่ 25 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากผักตบชวา ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



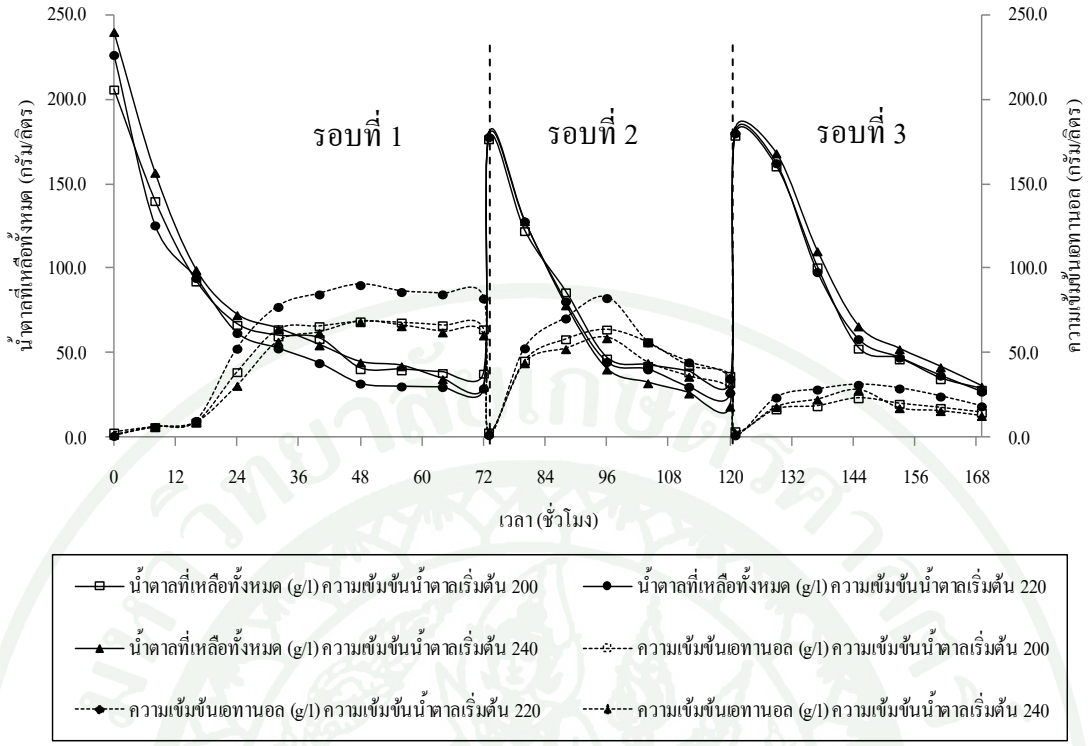
ภาพที่ 26 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากจอกน้ำ ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



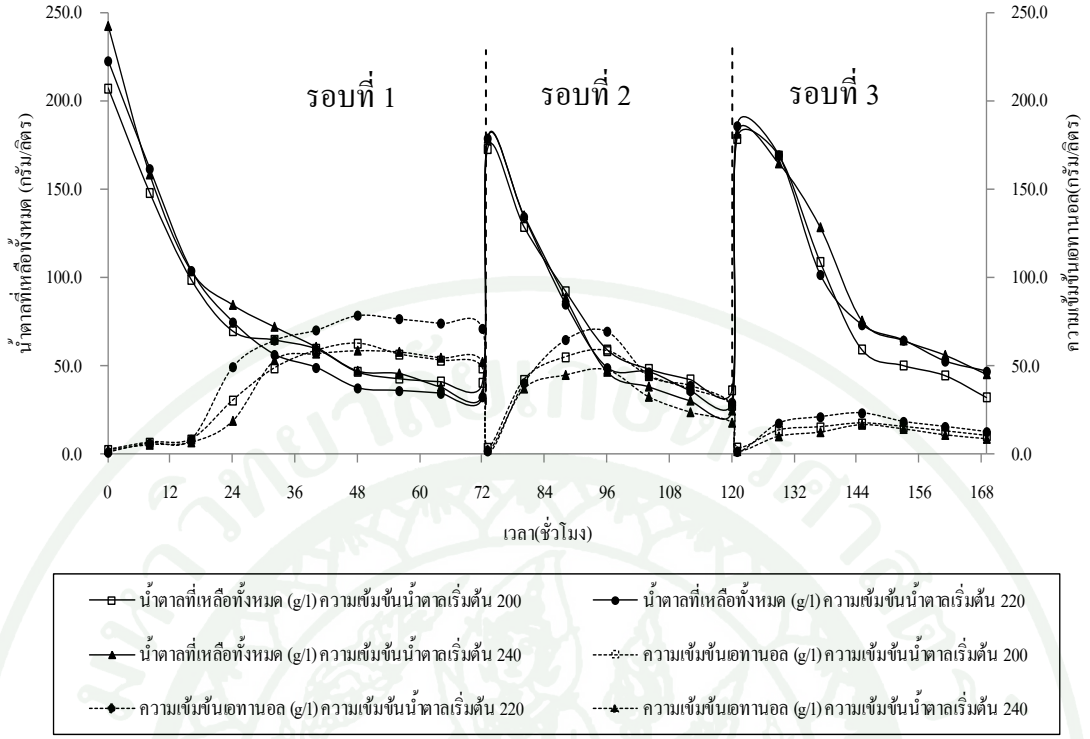
ภาพที่ 27 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากธูปฤาษี ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



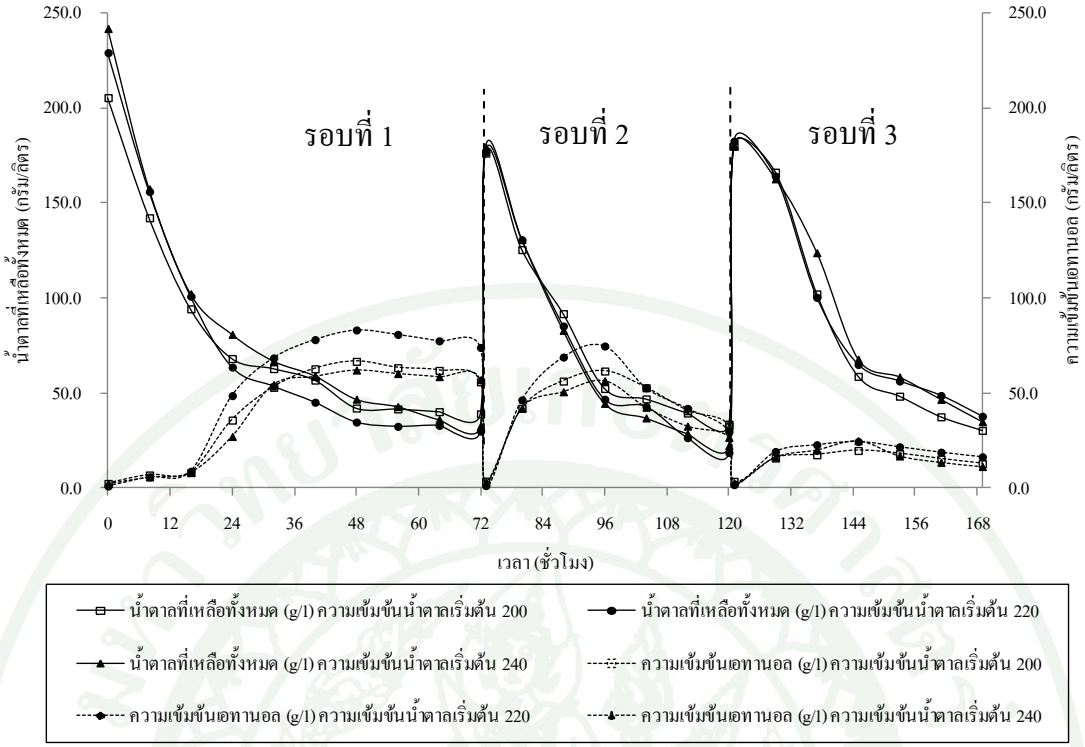
ภาพที่ 28 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากผักตบชวา ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 29 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากจอกน้ำ ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 30 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากธูปฤาษีของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ

แม้ว่าจะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณา คือ เป็นวัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดทั้งปี หาได้ง่าย และมีราคาถูก สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบ และต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง ให้พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก ที่สำคัญวัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารมนุษย์ สำหรับประเทศไทยวัตถุดิบที่ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอลมีเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง (ตารางที่ 13) แสดงศักยภาพของวัตถุดิบแต่ละชนิดในการผลิตเอทานอล จากผลการทดลองการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ พบว่า ผักตบชวาสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ปริมาตรสูงสุด รองลงมาคือ ธูปฤาษี และจอกน้ำ ตามลำดับ เป็นที่น่าสนใจว่าปริมาตรเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร/ตัน) ให้ปริมาตรที่น้อยกว่าวัตถุดิบ ประเภทน้ำตาลและแป้ง แต่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า เนื่องจากไม่เสียค่าใช้จ่ายในการซื้อวัตถุดิบ ซึ่งจากข้อมูลจะเห็นว่าวัตถุดิบ ประเภทแป้ง (ธัญพืช เช่น ข้าวโพด) ที่มีน้ำหนัก 1 ตัน สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ปริมาตรสูงสุด รองลงมาคือ กากน้ำตาล มันสำปะหลัง ข้าวฟ่างหวาน อ้อย และหญ้าเนเปียร์ลูกผสม ตามลำดับ ซึ่งจากข้อมูลต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรแต่ละชนิด พบว่าวัตถุดิบที่เป็นมันสำปะหลัง เมื่อนำมาผลิตเป็นเอทานอลมีต้นทุนการผลิตต่ำสุด รองลงมาคือ ข้าวฟ่างหวาน อ้อย ข้าวโพด และกากน้ำตาล หญ้าเนเปียร์ลูกผสมตามลำดับ โดยจะเห็นว่าต้นทุนการผลิตเอทานอลจะสูงขึ้นเมื่อใช้วัตถุดิบที่เป็นประเภทลิกโนเซลลูโลส คือ หญ้าเนเปียร์ลูกผสม เนื่องจากวัตถุดิบดังกล่าวเป็นพืชเหลือใช้ทางการเกษตร เป็นพืชเส้นใยที่มีโครงสร้างของเซลลูโลส เฮมมิเซลลูโลส และลิกนิน จึงต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพการผลิตเพิ่มขึ้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนของการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสวัตถุดิบให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาล ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในต้นทุนการผลิตของขั้นตอนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซีสมากกว่าวัตถุดิบประเภทน้ำตาล หรือประเภทแป้ง ในงานวิจัยนี้ก็เช่น เป็นการศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ โดยมีการปรับปรุงกระบวนการผลิตตั้งแต่ขั้นตอนการปรับสภาพจนถึงขั้นตอนการหมัก ซึ่งการคิดต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ ทั้ง 3 ชนิด จะคำนวณโดยคิดจากค่าใช้จ่ายสารเคมี (บาทต่อกรัม) ในขั้นตอนการปรับสภาพ การไฮโดรไลซีส และขั้นตอนการหมัก (ตารางผนวกที่ 26) จากการคำนวณพบว่าต้นทุนการผลิตเอทานอลจากผักตบชวา มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า กากน้ำตาล และวัตถุดิบประเภทแป้ง (ธัญพืช เช่น ข้าวโพด) แต่ต้นทุนการผลิตเอทานอลจากจอกน้ำ และธูปฤาษีมีต้นทุนการผลิตที่สูงใกล้เคียงกับวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง เมื่อพิจารณา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในภาพรวมต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ ทั้ง 3 ชนิด ยังมีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่ามันสำปะหลัง ซึ่งมีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 8.94 บาทต่อลิตร เป็นพืชสะสมแป้งที่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวัชพืชนี้สำหรับงานวิจัยนี้ พบว่ามันสำปะหลังเป็นพืชที่มีอายุเก็บเกี่ยวนาน 12 เดือน รอบของการเก็บเกี่ยวผลผลิต 1 ครั้ง ต่อปี มีมวลสด 4.33 ตัน/ไร่/ปี และมีมวลแห้ง1.58 ตัน/ไร่/ปี จึงอาจจะเป็นปัญหาในอนาคตว่าอาจเกิดการขาดแคลนวัตถุดิบมันสำปะหลังไม่เพียงพอต่อความต้องการในระบบการผลิตของอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลได้ แต่เมื่อศึกษาถึงอัตราการเจริญ และอายุเก็บเกี่ยว ของวัชพืชน้ำมีอัตราการเจริญที่รวดเร็ว พบว่าผักตบชวามีอายุเก็บเกี่ยว 4 เดือน และรอบของการเก็บเกี่ยวผลผลิต 3 ต่อปี มีมวลสด 148.56 ตัน/ไร่/ปี และมีมวลแห้ง 11.83 ตัน/ไร่/ปี จอกน้ำมีอายุเก็บเกี่ยว 3 เดือน และรอบของการเก็บเกี่ยวผลผลิต 4 ต่อปี มีมวลสด 60.25 ตัน/ไร่/ปี และมีมวลแห้ง 4.3 ตัน/ไร่/ปี และธูปฤาษี มีอายุเก็บเกี่ยว 12 เดือน และรอบของการเก็บเกี่ยวผลผลิต 1 ต่อปี มีมวลสด 15.01 ตัน/ไร่/ปี และมีมวลแห้ง 4.04 ตัน/ไร่/ปี (ตารางผนวกที่ 27) จากข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อดีของการใช้วัชพืชน้ำเป็นพืชพลังงานทดแทนสำหรับการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบต้นทุนและปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ (1ตัน)	ราคาวัตถุดิบ (บาท/กิโลกรัม)	ปริมาตรเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร/ตัน)	ต้นทุนการผลิตเอทานอล (บาท/ลิตร)
กากน้ำตาล	3.80	260.0	15.20
อ้อย	0.80	70.0	11.42
มันสำปะหลัง	0.60	180.0	8.94
ข้าวฟ่างหวาน	1.50	70.0	10.00
ธัญพืช (เช่น ข้าวโพด)	5.34	375.0	14.24
หญ้าเนเปียร์ลูกผสม	0.14	8.0	17.50
ผักตบชวา	0.38	38.70	9.89
จอกน้ำ	0.38	27.28	14.03
ธูปฤาษี	0.38	31.90	11.98

หมายเหตุ: ต้นทุนการผลิตเอทานอลของโรงงานสำหรับวัตถุดิบประเภทน้ำตาล และประเภทแป้งประมาณลิตรละ 5.20 บาท และ6.20 บาท ตามลำดับ (กระทรวงพลังงาน, 2554)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการศึกษาวิจัยการใช้วัชพืชน้ำทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี พบว่าสามารถนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ โดยเฉพาะผักตบชวาให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณสูง โดยสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีการทางเคมีคือ การปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยทำร่วมกับการเขย่าด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิก แล้วย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ และการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ พบว่าผักตบชวาให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดในทุกกระบวนการหมัก ดั้งนั้นผักตบชวาจึงเป็นวัชพืชน้ำที่น่าสนใจที่ควรส่งเสริมให้นำมาเป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตเอทานอล และพัฒนาอย่างยั่งยืนต่อไป

2. จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพสำหรับการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ โดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ในกระบวนการหมักแบบกะสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยการใช้เซลล์ตรึงรูปในอัลจิเนต และวัสดุตรึงธรรมชาติ พบว่าการตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อยให้ผลผลิตเอทานอลที่ใกล้เคียงกับการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย ต่อมาจึงทำการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ และกะซ้ำ ผลจากการหมักแบบกึ่งกะพบว่า การเพิ่มจำนวนครั้งการเติมอาหารวัชพืชน้ำให้มากขึ้น จะช่วยลดระยะเวลาในการหมักได้ และเพิ่มผลผลิตเอทานอลจากความเข้มน้ำตาลเริ่มต้นที่เท่ากันกับการหมักแบบกะ สำหรับการหมักแบบกะซ้ำ ทำการหมักได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดติดกันได้ 4 รอบ ซึ่งความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดได้จากผักตบชวาที่ทำการหมักด้วยการตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย และอัลจิเนต จึงเลือกวัสดุตรึงรูป 2 ชนิดนี้ไปศึกษาต่อในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด

3. เมื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ที่มีการตรึงเซลล์ในถังหมักแบบแพคเบดด้วยอัลจิเนต และชานอ้อย พบว่า ที่อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 220 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำ ได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดจากผักตบชวา จอกน้ำ ธูปฤาษี เท่ากับ 94.79, 78.09 และ 85.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราการเกิดเอทานอล(Q_p) และร้อยละประสิทธิภาพการหมักสูงสุดได้รับจากผักตบชวาเท่ากับ 1.97 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ84.48 % ตามลำดับ และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถหมักแบบกะซ้ำในถังหมักแบบแพคเบดได้เอทานอลสูงสุดอีก 2 รอบ แต่เมื่อทำการหมักแบบกะซ้ำในรอบที่ 3 พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลลดลงมาก เนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงรูปอาจมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้นจึงใช้น้ำตาลได้น้อยลง จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถใช้วัชพืชน้ำเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้ เป็นการใช้ประโยชน์และกำจัดวัชพืชน้ำเพื่อการพัฒนาการผลิตพลังงานทดแทนให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

4. จากการประเมินต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ โดยคิดคำนวณต้นทุนจากค่าสารเคมีสำหรับขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบและการไฮโดรไลซีสให้เป็นน้ำตาล ตลอดจนการหมัก มีต้นทุนการผลิตโดยประมาณของผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษีเท่ากับ 9.89, 14.03 และ 11.98 บาทต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งต้นทุนการผลิตต่ำกว่าอ้อย ข้าวโพด และกากน้ำตาล

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการหาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพิ่มเติม เนื่องจากการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำจะมีน้ำตาลผสมระหว่างไซโลสและกลูโคส จึงจำเป็นที่ต้องใช้เชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* และ *C. Shehatea* TIS5843 ซึ่งอาจทำได้ให้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงขึ้นได้ ทั้งนี้ในการทดลองมีการปรับปรุงกระบวนการผลิต โดยใช้เซลล์ตรึงรูป สามารถทำให้เพิ่มผลผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาถึงความเหมาะสมของการตรึงเซลล์มากขึ้น เช่นศึกษาถึงจลศาสตร์การดูดซับของเซลล์ในตัวตรึงวัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆ

2. ควรมีศึกษาการขยายการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อการผลิตเอทานอลได้ในปริมาณมากขึ้น และมีความเหมาะสมกับกระบวนการหมักในแบบรีพีทแบทช์ เช่นการติดตั้งชุดคอนโทลสำหรับควบคุมอุณหภูมิ อัตราการไหลเข้าของสารตั้งต้น และเพื่อให้ง่ายต่อการเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อน ควรที่จะมีการทำถังหมักแบบแพคเบดที่มีวาล์วปิดเปิดในการเก็บตัวอย่าง

3. ปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเทรต วิธีการปรับสภาพ ปริมาณและชนิดของเอนไซม์ และสายพันธุ์ของเชื้อ ที่สำคัญคือสภาวะการหมักที่เหมาะสม ซึ่งการปรับสภาพด้วยวิธีการที่เหมาะสมสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตเอทานอลได้ โดยปริมาณเอนไซม์ที่ใช้คงเดิม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรรณิการ์ แก้วมาก. 2553. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเซลล์ตรึงรูปของเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843 โดยใช้โซเดียมอัลจิเนต เพื่อใช้การผลิตเอทานอล.**ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คมสัน พิระภัทรุ่งสุริยา. 2534. **การคัดเลือกและการกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

จิระศักดิ์ แสงพุ่ม และคณะ. 2000. ผลของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมตัวดูดซับจากผักตบชวาสำหรับการดูดซับไอเบนซิน. **วารสารวิศวกรรมและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิต** 4(1): 48-54.

จรูญ คำนวนตา ประดิษฐ์ ครุวัณณา ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และวิชชุพร ว่องสุวรรณเลิศ. 2525. รายงานการสำรวจการหมักแอลกอฮอล์ของโรงงานแห่งหนึ่งในช่วงวิกฤติการของการหมัก. **วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย.** 1 (1): 6-13.

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ และคณะ. 2546. **การศึกษาต้นแบบโรงงานเอทานอลโดยการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตจากมันเส้น** .สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ

ฐิติมา คาไชยใหญ่ สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย และ ศุภรินทร์ ไชยกลางเมือง. 2554. **การปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยไอน้ำ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เพื่อผลิตเอทานอล.การประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้ งที่ 21**: Energy Technology, 1-6

นิพัทธ์ ศรีตระกูล. 2549. **การพัฒนากระบวนการผลิตไวน์มะม่วงแก้วแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดบรรจุ โดยเซลล์ตรึงรูป *Saccharomyces cerevisiae***. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นันทิกา คล้ายชม เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ อนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. 2554. **การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากซางข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด**. วิศวกรรมสาร มก. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปล่งศักดิ์ ภู่ขจร. 2546. **การใช้เรซินผักตบชวาบำบัดสีจากน้ำเสียย้อมผ้า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาสาธารณสุขศาสตร มหาบัณฑิตสาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. **การตรึงเอนไซม์และเซลล.** ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภูวิศ บางรักษ์. 2550. **การผลิตเอธานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในตัวพยุงแอลจีเนทเสริมใยบวบ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พรเทพ ถนนแก้ว และ ประสิทธิ์ ใจศิล. 2555. **การประยุกต์ใช้ยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 ในการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน.** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2554. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทผักตบชวาโดยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล.** Veridian E-Journal, SU Vol.4 No.1 : 891-901

ลัคขณา เหล่าไพบูลย์ และ พัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2551. **การผลิตเอทานอลจากน้ำข้าวฟ่างหวานด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ถูกตรึงรูปบนซังข้าวโพด.** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม**. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เวสารัช สุนทรชัยบรูณ์ และ รัชพล พะวงศ์รัตน. 2556. **การใช้ประโยชน์วัสดุพยุงจากขยะธรรมชาติสาหรับการตรึงเซลล์ และประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล**. Veridian E-Journal, SU Vol.6 No. 1:795-807

ศิริพร ลุนพรม และ สิริแข พงษ์สวัสดิ์. 2553. **การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากรากต้นธูปฤาษี**. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 3 ณ ศูนย์ประชุมสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ

ศิริวรรณ จอมทอง. 2538. **การสร้างยีสต์สายพันธุ์ใหม่เพื่อใช้สำหรับผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสโดยใช้เทคนิคโปรโตฟลาสต์ฟิวชัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนุชิต รัตนพันธุ์. 2551. **การตรึงยีสต์โดยใช้เปลือกรังไหมบางสำหรับการผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่อง**. สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อำพร คล้ายแก้ว. 2539. **วัชพืชบริเวณอ่างเก็บน้ำโครงการชลประทานในท้องที่ภาคเหนือของประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อำพล เสนาณรงค์. 2544. **ธูปฤาษี**. ชีวปริทรรศ์ 3 (6) : 2-3.

Altıntas. MM, U¨ lgen KO¨ , Kirdar B, O¨ nsan ZI, Oliver SG . 2002. **Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors**. Enzyme Microb Technol 31, pp. 640–647.

Amutha R, and Gunasekaran P. 2001. **Production of ethanol from liquefied cassava starch using co-immobilized cells of Zymomonas mobilis and Saccharomyces diastaticus**. J Biosci Bioeng 92, pp. 560–564

Anjanabha B. and Pawan K. 2010. **Water hyacinth as a potential biofuel crop. EJEAFChe**., 9(1) , pp. 112-122.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

AOAC. 1990. **Standard method for examination of water and waste water**. American Public Health Assosiation,Washington, DC

Baillargeon, M.W., N.B. Jansen and G.T. Tsao. 1983. **Effect of oxygen uptake rate on ethanol production by a xylose fermenting yeast mutant, *Candida* sp. XF217**. Biotechnol. Lett. 5 : 339-344.

Bastawde, K.B. 1992. **Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action.** World **J. of Microbiol.** and Biotechnol. 8 : 355-368.

Bei-Zhong Han Frans M, Rombouts M, Robert Nout J . 1999. **A Chinese fermented soybean food**. J. Food Microbiol. 65: 1-10.

Beom seo, H., H. Joo kim. O. Kyu Lee. J. Hye Ha, H. Yong Lee and K. Hwan Jung. 2009. **Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process**. J Ind Microbiol Biotechnol 36: 285-292.

Bickerstaff, G. F. 1997. **Immobilisation of Enzyme and Cells**. Methods in Biotechnology Human Press, 1-12

Browing, B.L. 1963. **Method in wood chemistry, pp.389-407**. Interscience Publishers, New York, London.

Boopathy, R., 1998. **Biological treatment of swine waste using anaerobic baffled reactors**. Bioresour. Technol. 64, 1–6.

Browning, B. L. 1967. **The Chemistry of Wood**. New York : Interscience Publisher.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cantarella, M., Cantarella L., Gallifuoco A., Frezzini R., Spera A. and Alfani F. 2004. **A study in UF-membrane reactor on activity and stability of nitrile hydratase from Microbacterium imperiale CBS 498-74 resting cells for propioamide production**. J. Mol. Catal. B-Enzym. 29/1-6, 105.

Carrasco, F., Roy, C., 1992 .**Kinetic study of dilute – acid prehydrolysis of xylan containing Biomass** .Wood Sci Technol 26, 189-208.

Chang, V.S., Nagwani, M., Holtzapple, M.T., 1998. **Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw**. Appl. Biochem. Biotechnol. 74, 135–159.

Cheung, S.W., Anderson, B.C., 1997. **Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. Bioresour**. Technol. 59, 81–96.

Clark, T.A., Mackie, K.L., 1987. **Steam explosion of the soft-wood** .Pinus radiata with sulphur dioxide addition. I. Process optimization. J. Wood Chem. Technol. 7, 373–403.

Costa, S. M., Gonçalves, A. R., Esposito, E. 2002 .**Action of white-rot fungus Panus tigrinus on sugarcane bagasse** Applied Biochemistry and Biotechnology 98-100, 357-364.

Cowling, E.B. and T.K. 1976. **Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes**. Bioeng. Symp. 6 : 94-123.

Crawford, D. L., Pometto, A. L., Crawford, R. L., 1984. **Production of useful lignin polymers by bioconversion of lignocellose with Streptomyces** . Biotech Avds 2, 217-232.

Debus, D., H.Mether, D. Sechulze and H.Dellweg. 1983. **Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus***. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17 : 287-291.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dekker, R.F.H. 1982. **Ethanol production from D-xylose and other sugars by the yeast *Pachysolen tannophilus*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 17 : 287-291.

Deverell, K. F. 1983. **Ethanol production from xylose and hydrolysates using *Pachysolen tannophilus***. Biotechnol. Lett. 5 : 475-480

Dewes, T., Hunsche, E., 1998. **Composition and Microbial degradability in the soil of farmyard manure from ecologically-managed farms**. Biol. Agric. Hortic. 16, 251–268.

Ditzellmuller, G., C.P. Kubicek, W. Wohrer and M. Rohr. 1984. **Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus***. :purification and properties of xylose reductase. Can. J. Microbiol. 30 : 1330-1336

Du Preeze, J.C. and J.P. van der Walt. 1983. **fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida Shehatae***. Biotechnol. Lett. 5 : 357-362.

Duff, S. J. B. & Murray, W. D. 1996. **Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review**. Bioresource Technology, 55, 1-33.

Eriksson, K.E.L. 1990. **Biotechnology in the pulp and paper industry**. Wood Science and Technology 24 : 79-101

Eriksson, K.E.L., R.A. Blanchette. And P. Ander. 1990. **Microbial and Enzymatic Degardation of Wod and Wood Component**. Springer Verlag, Berlin. 407 p.

Fan, L. T., Gharpuray, M. M., Lee, Y. H.1987.**Cellulosehydrolysis .biotechnologyMonographs**. Springer, 57.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Fanta, G.F., T.P. Abbott, A.I. Herman, R.C. Burr and W.M. Doane. 1984. **Hydrolysis of wheat straw hemicellulose with trifluoroacetic acid : Fermentation of xylose with *Pachysolen tannophilus***. Biotcehnol. Bioeng. 26 : 1122-1125

Go¨ksungur Y, and Zorlu N. 2001. **Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor**. Turk J Biol 25, pp. 265–275

Goshadrou A, Karimi K, Taherzadeh MJ. 2011. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by Mucor hiemalis. Ind Crops Prod 34:1219–1225.

Gottlieb, S. and M.J. Pelezar. 1951 **Microbiologica aspects of lignin degradation**. Bacteriol. Bacteriol. Rev. 15 :55-76

Gourdon R, Bhande S, Rus E, Sofer SS. 1990. **Comparison of Cadmium biosorption by gram positive and gram negative bacteria from activated sludge.** Biotechnol. Lett., 12: 839-842

Groboillot , A., Boadi, D.K., Poncelet, D. and Neufel, R.J. 1994. **Immobilization of cells for application in the food industry**. Critical Reviews in Biotechnology 14,75-108

James, C. S. 1995. **Determination of nitrogen and protein by the Kjeldahl method using the Kjeltec instrument**. Analytical Chemistry of Food. The Alden Press, Oxford. pp. 88-89.

Janshekar, H. and A. Fiechter. 1983. **lignin : biosythesis, application, and biodegradation**. Adv. Biochem. Eng. 27 :117-179

Jeffries, T. W. 1990. **Fermentation of D-xylose and cellobiose. In-Yeasts**. Verachtert, eds. H., de Mot, R. Marcel. Dekker Inc., New York, 349-396

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Jeffries, T.W. 1982. **A comparison of *Candida shehatae* and *Pachysolen tannophilus* for conversion of xylose to ethanol.** Biotechnol. Bioeng. Symp. 15: 149-166

Jeffries, T.W. and H.K. Sreenath. 1988. **Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures by *Candida shehatae***. Biotechnol. Bioeng. Symp. 31 : 502-506.

Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. 2005. **Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short, middle, and long term**. Biomass and Bioenergy 28(4):384-410.

Hashimoto, S., Furukawa, K., 1987. **Immobilization of activated sludge by PVA-boric acid method**. Biotechnol. Bioeng. 30, 52–89.

Holtzapple, M. T., Jun, J. H., Ashok, G., Patibandla, S. L., Dale, B. E., 1991. **The ammonia freeze explosion (AFEX) process** . Applied Biochemistry and Biotechnology 28/29, 59-74.

Kaar, W. E., Holtzapple, M. T. 2000. **Using lime pretreatment to facilitate the enzyme\hydrolysis of corn stover**. Biomass and Bioenergy 00, 1-11.

Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R., 1985. **Immobilization of whole cells: engineering principles**. Chemical Engineering Science 40, 1321–1354

Klein J, Wagner F. 1983. **Methods for immobilization of microbial cells**. In: Chibata, I., Wingard, L.B. (Eds.), Applied Biochemistry and Bioengineering. Immobilized Microbial Cells, vol. 4. Academic Press, New York, pp. 12–51.

Kotter, P. and M. Ciriacy. 1993. **Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae***. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 : 776-783

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A. A., Kaliafas, M., Kanellaki, M., Marchant, R., and Banat, I. M. 2003. **Wine Production Using Yeast Immobilized on Quince Pieces Biocatalyst at Temperatures between 30 °C and 0 °C**. *Food Chemistry* 82: 353-360.

Kumar S, Singh, S.P., Mishra, I.M. and Adhikari, D.K. 2011. **Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IIPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor**, Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels, 2(1), 1-6.

Kuznetsov B, N., Kuznetsova, S. A., Danilov, V. G., Kozlov, I. A., 2002 .**New catalytic processes for a sustainable chemistry of cellulose production fromwood biomass**. Catalysis Today 75, 211-217.

Limtong, S. 1987. **Ethanol fermentation by flocculent yeast.** Ph.D. thesis, Osaka University.

Limtong, S., M. Kishimoto, H. Funahashi, T. Seki, T. Yoshida and H. Tagushi. 1987. **Simulationand optimization of fed-batch culture for ethanol production from molasses**. Bioproc. Eng**.** 2: 141 - 147.

Linko, Y. Y., H. Kautola, S. Uotila and P. Linko. 1986. **Alcoholic fermentation of D-xylose by immobilized *Pichia stipitis* yeast**. Biotechnol. Lett. 8 :47-52

McMillan, J.D., 1994. **Pretreatment of lignocellulosic biomass**. In:Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292–324

Mishima, D., M. Tateda., M. Ike and M, Fujita. 2006. **Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes**. Bioresour. Technol. 97(16): 2166-2172.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mishima, D., Kuniki, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M., Fujita, M. 2008. **Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes L.*)**" Bioresource Technology . 99:2495–2500.

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

Mussatto, S.I., G. Dragone and I.C. Roberto. 2005. **Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii***. Process Biochem. 40: 3801–3806.

Nigam, J.N. 2002. **Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose–fermenting yeast**. Research Journal of Biotechnology. 97 pp. 107–116

Nishizawa, Y., Y. Mitani, K. Fukunishi and S. Nagai. 1984. **Ethanol production by repeated batch culture with hollow fibers**. J. Ferment. Tech. 62 (1): 41-47.

Ogbonna, J. C., H. Mashima and H. Tanaka. 2001. **Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor**. Bioresources Technology. 76:1-8.

Page DH. 1976. **A note on the cell-well structure of softwood tracheids**. Wood Fiber.7,pp.246-248

Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. 2002. **Fermentation of Lignocel-lulosic Hydrolysates**. I: Inhibition and Detoxification. Bioresource Tech V. 74: 17-24.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pan, X., Gilkes N., Kadla J.,Pye K.,Saka S.,Gregg D.,Ehara K.,Xie D.,Lam D., Saddler J.N.. 2006. **Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: Optimization of process yields**. Biotechnology and Bioengineering. 94(5):851-861.

Parekh, S.R., Y. Shiyuan and M. Wayman. 1986. **Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysis for increased ethanol production**. Appl. Microbiol Biotechnol. 25 : 300-304

Prior, B. A., S.G. Kilian and J.C. Du Preeze. 1989. **Fermentation of D- xylose by the yeast *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*** : Prospects and problems. Proc. Biochem. 21 : 21-32

Ragg, P. L., Fields, P. R., 1987. **The development of a process for the hydroysis of lignocellulosic waste**. Phil Trans R Soc Lond A321, 537-547

Rahman SHA, Choudhury JP, Ahmad AL, Kamaruddin AH. 2007. **Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose**. Biores. Technol. 98(3): 554-559.

Ramalingham, A. and R.K. Finn. 1977. **The vacuferm process: A new approach to fermentation alcohol**. Biotechnol. Bioeng**.** 19: 583-589.

Rao RS, Bhadra B, Shivaji S. 2008. **Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks**.Lett Appl Microbiol 47:19–24

Reshamwala S, Shawky BT, Dale BE. 1995. **Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switch grass**. Appl Biochem Biotechnol, 51/52: 43-55.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rizzi, M., P. Eriemann, N. A. Bui-Thanh and H. Dellweg. 1988. **Xylose fermentation by yeast : Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis***. Appl. Microbiol Biotechnol. 29 : 148-154

Roukas, T. 1996. **Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture**. J. Food Eng. 27: 87-96.

Sangsurasak, P. and D.A. Mitchell. 1995. **Incorporation of death kinetic into a 2-dimensional dynamic heat transfer model for solid state fermentation**. J. Chem. Tech. Biotechnol. 64: 253-260.

Sarkanen, K. V. and C.H. Ludwig. 1971. **Lignin : occurrence, formation, structure and reaction Wiley-Interscience**, New York. 245 p.

Scragg, A.H. 1988. **Immobilized enzymes and cells. In Biotechnology for Engineers**: Biological Systems in Technological Processes, A.H. Scragg (ed.), Ellis Horwood, London, pp. 235-253.

Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D., Osborne, J., 2007. **A comparison of chemical pre-treatment methods for improving saccharification of cotton stalks**. Bioresource Technology, 98, 3000-3011

Slininger, P.J., R.J. Bothast, J.E. van Cauwenberge and C.P. Kurtzman. 1982. **Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus***. Biotechnol. Bioeng. 24:371-384.

Sukumaran, Rajeev K.; Singhania, R. R., Mathew, G. M., and Pandey, A. 2009. **Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production.** Renewable Energy, February, vol. 34, no. 2, p. 421-424.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Van Uden, N. 1984b. **Temperature Profiles of Yeast. In: Advances in Microbial Physiology.** Vol. 25. Rose, A.H. and Tempest, D.W. (Eds.). Academic Press, London, p. 195

Vessia O. Finder P. Skreiberg O. 2005. **Biofuels from lignocellulosic material** - In the Norwegian context 2010 – Technology, Potential and Costs, NTNU, Trondheim.

Wright JD. 1998. **Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis**. Chem Eng Prog; 84: 62–74

Yudkin, M. and Offord, R. 1973. **Comprehensible biochemistry**. American ed, Biochemistry Bibliography: p. 547-550.

Zhang, Y. and Pan, Z. 2006. **Dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of saline biomass for sugar production**. American Society of Agricultural and Biological Engineers, ASABE paper number 067003.

Zhao J. and Xia L. 2009. **Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain**. Fuel Processing Technology 90: 1193-1197.

Zheng M., X. Li, L. Li, X. Yang, Y. He. 2009. **Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment**. Bioresource Technology 100: 5140-5145.

Zoecklien BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS . 1995. **Laboratory procedures. In: Wine analysis and production**. Chapman & Mall, New York, pp. 310-516

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

และอาหารวัชพืชน้ำสำหรับหมักเอทานอล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **Yeast extract-Malt extract (YM) agar** ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 5.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. **Yeast extract-Malt extract (YM) broth** ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 5.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักเอทานอล (YM) broth ประกอบด้วย

Yeast extract	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
น้ำตาลรีดิวซ์วัชพืชน้ำ	100	มิลลิลิตร

(ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นขึ้นอยู่กับการทดลองแต่ละกระบวนการหมัก)

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอชเป็น 5.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

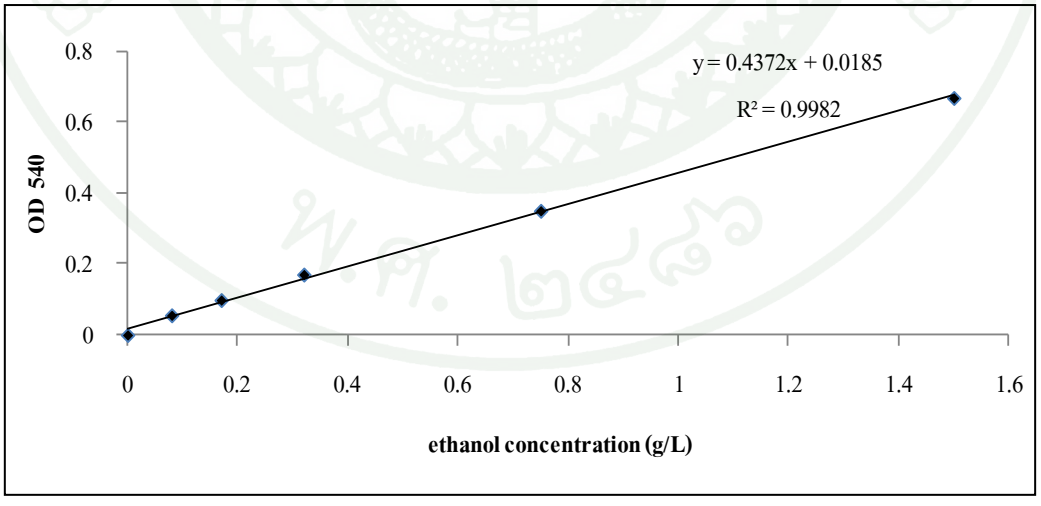
ใช้วิธีไดโครเมท (Beom seo *et al*., 2009)

การเตรียมสารเคมี

1. เตรียม Acid dichromate solution โดยละลาย potassium dichromate 10 กรัม ใน 5MH_2SO_4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ผสมเข้าด้วยกัน แล้วเก็บในขวดสีชา
2. ใช้สารละลาย Tri-n-butyl phosphate (TBP) เป็นตัวสกัดเอทานอล

ตารางผนวกที่ ข1 การเตรียมเอทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 0.75 0.325 0.1725 และ0.08625 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นสารละลายที่ใช้	**สารละลายมาตรฐาน (% v/v)**				
(มิลลิลิตร)	**0.08**	**0.17**	**0.32**	**0.75**	**1.50**
เอทานอล	0.008	0.017	0.032	0.075	0.15
น้ำกลั่น	9.99	9.98	9.96	9.92	9.85



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

1. ผสมสารละลาย TBP ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับตัวอย่างเอทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้เกิดการแยกชั้น
3. ดูดชั้นของสารละลายชั้นบนไปใส่หลอดใหม่
4. เติม Acid dichromate solution ปริมาตร 0.35 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
5. ดูดสารละลายชั้นล่างไปใส่หลอดใหม่ และเจือจางด้วยน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หาปริมาณเอทานอลทั้งหมดโดยเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและไซโลสโดยวิธี DNS (Miller L.G., 1959)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS)

การเตรียมสารเคมี

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เตรียมโดยชั่ง DNS 5 กรัม ในน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 87.5 มิลลิลิตร) คนให้ละลายจนเข้ากันหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนใส แล้วเติม K-Na tartrate ลงไปทีละน้อยจนครบ 150 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

น้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เตรียมโดยชั่งไซโลส 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซโลสความเข้มข้นที่ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

สลล.มาตรฐานไซโลสความเข้มข้น (g/l)	ปิเปตสลล.ไซโลส	ปิเปตน้ำกลั่น
0	-	1 มิลลิลิตร
0.2	0.2 มิลลิลิตร	0.8 มิลลิลิตร
0.4	0.4 มิลลิลิตร	0.6 มิลลิลิตร
0.6	0.6 มิลลิลิตร	0.4 มิลลิลิตร
0.8	0.8 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร
1.0	1.0 มิลลิลิตร	-

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์ (ที่ผ่านการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้ว)

2. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น 5 นาที

5. เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น540 นาโนเมตร เทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้นในช่วง 0.2-1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่นแทน)

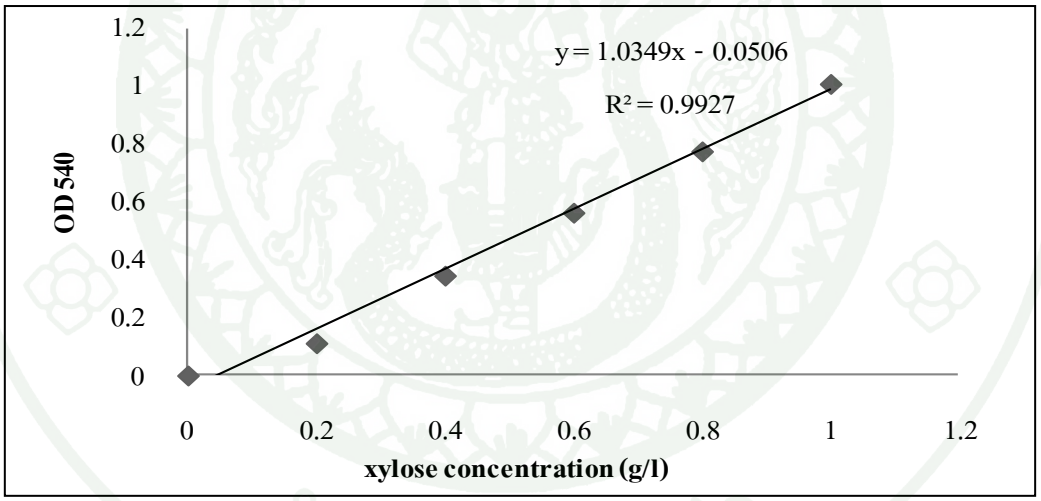
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหากราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสและไซโลส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส 1.0 กรัม/ลิตร โดยนำกลูโคสหรือไซโลส 0.1 กรัมละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

นำค่าการดูดกลืนแสงเทียบกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัม/ ลิตร)} = \frac{\text{ค่าความชันกราฟมาตรฐาน}}{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่540นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}$$



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสโดยวิธี DNS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC

1. สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เอทานอล

column : SugarPax (Bio-Rad) ขนาด 6.5×300 mm.

Mobile phase : Deionized water

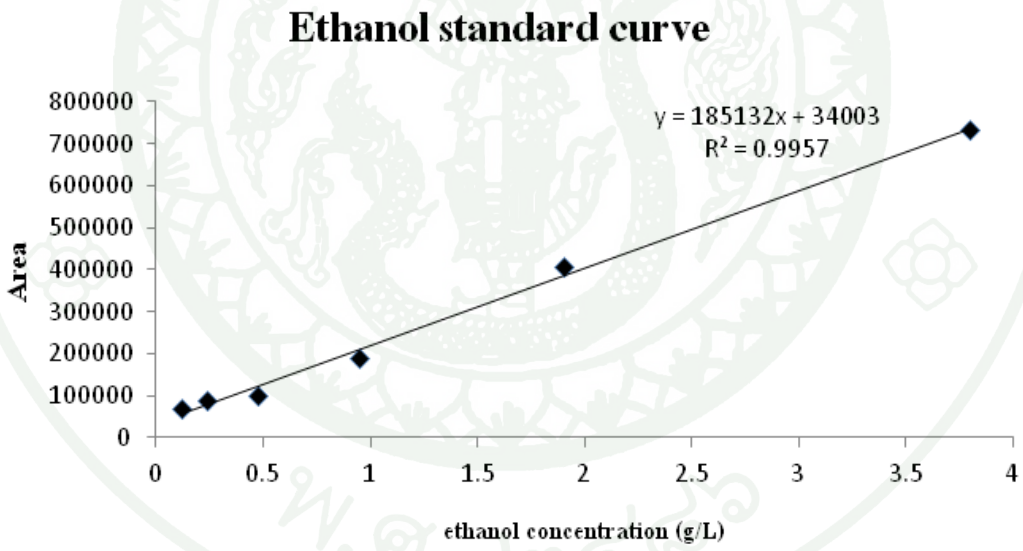
Flow rate : 0.5 มิลลิลิตร/นาที

Detertor : Refractive Index Detector

Column detector : 85 องศาเซลเซียส

2. ฉีดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC บันทึกพื้นที่กราฟ

3. นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างเอทานอลที่วิเคราะห์เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลตรฐานเพื่อหาความเข้มข้น



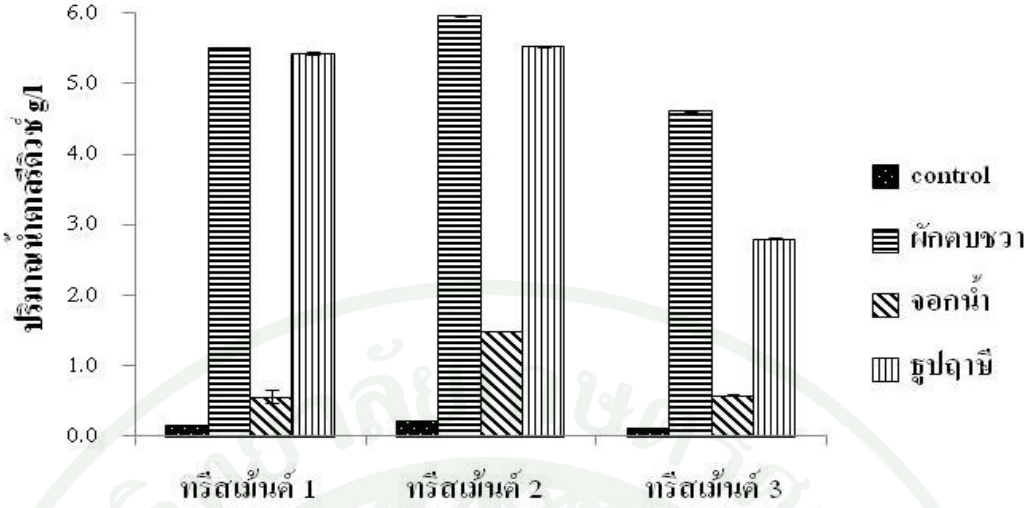
ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานเอทานอลจากเครื่อง HPLC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

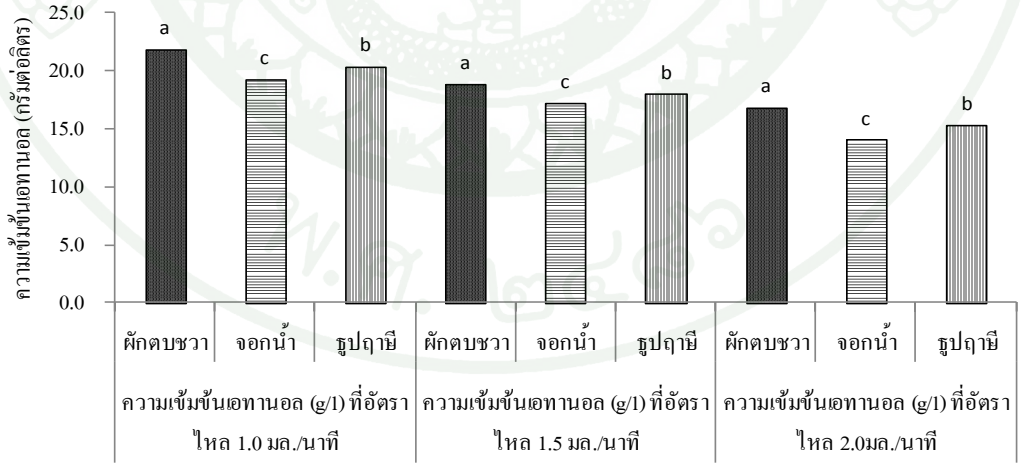
ภาคผนวก ค

ภาพผลการทดลอง และตารางแสดงผลการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

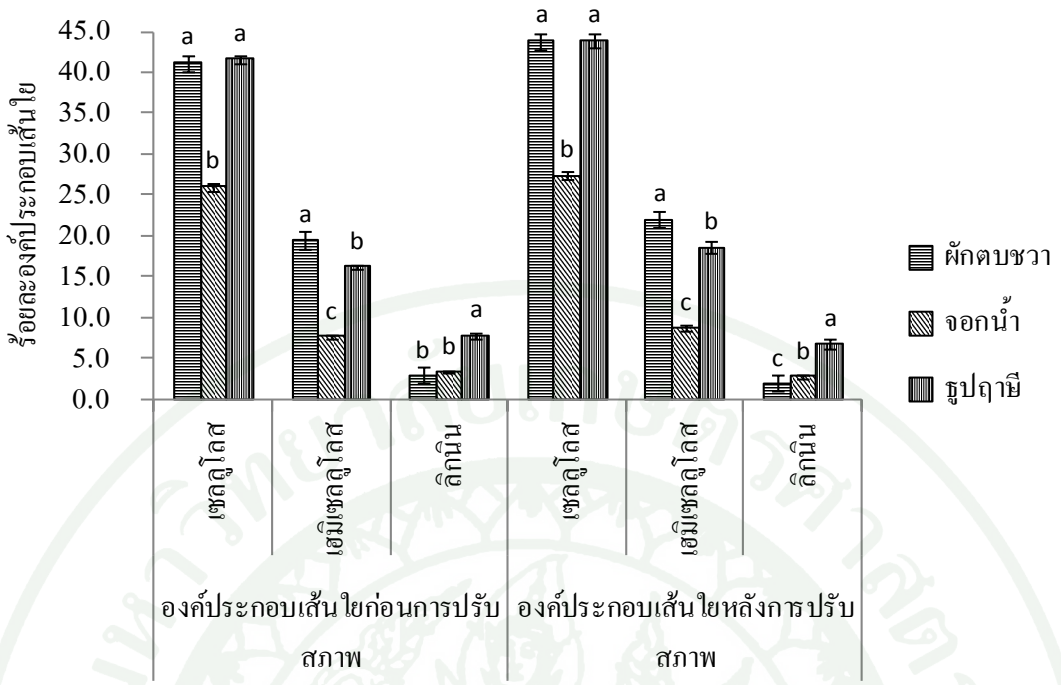


ภาพผนวกที่ ค1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำ 3 ชนิด จากการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับทางเคมีที่แตกต่างกัน ทรีสเม้นต์ที่ 1) ใช้สารละลาย NaOH รวมกับ H_2O_2 ทรีสเม้นต์ที่ 2) ใช้สารละลายNaOH พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิก และทรีสเม้นต์ที่ 3) ใช้สารละลาย NaOH ร่วมกับหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง และทำการไฮโดรไลซีสโดยเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส (20 และ 10 หน่วย ต่อกรัมสารตั้งต้น ตามลำดับ) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (control ใช้น้ำกลั่นเติมลงวัชพืชน้ำแทนสารละลาย NaOH)



ภาพผนวกที่ ค2 ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้จากวัชพืชน้ำ 3 ชนิด หมักในถังหมักแบบแพคเบด ที่อัตราไหลต่างกันในชั่วโมงที่ 24

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



`ภาพผนวกที่ ค3 องค์ประกอบเส้นใย ก่อน-หลังการปรับสภาพโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. กระบวนการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำแบบกะ

ตารางผนวกที่ ค1 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด และความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ของการผลิตเอทานอลจากผักตบชวา ด้วยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ ภายใต้สภาวะพีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในวัสดุตรึงรูปที่ต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±S.D.)					ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±S.D.)				
		เซลล์ตรึงรูป					เซลล์ตรึงรูป			
	เซลล์อิสระ	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ลำต้นข้าวฟ่างหวาน	เซลล์อิสระ	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ลำต้นข้าวฟ่างหวาน
0	15.61±0.65^{a}	15.54±0.06^{e}	15.74±0.06^{e}	15.25±0.06^{a}	15.22±0.02^{a}	0.01±0.06^{e}	0.01±0.01^{e}	0.17±0.06^{e}	0.21±0.02^{e}	0.17±0.03^{e}
6	12.84±0.58^{b}	12.56±0.56^{d}	12.57±0.56^{d}	12.97±0.37^{b}	13.10±0.56^{b}	1.24±0.56^{d}	1.26±0.05^{d}	1.94±0.43^{d}	1.40±0.22^{d}	1.80±0.51^{d}
12	9.77±0.95^{c}	9.39±0.21^{c}	10.05±0.21^{c}	10.62±0.29^{c}	10.16±0.32^{c}	4.21±0.21^{c}	4.27±0.15^{c}	4.70±0.32^{c}	3.41±0.54^{cd}	4.46±0.08^{cd}
18	7.11±0.58^{d}	7.04±1.09^{b}	7.51±1.09^{b}	8.72±0.19^{d}	7.88±0.46^{d}	6.14±1.09^{b}	6.19±0.90^{b}	6.70±0.12^{b}	4.25±0.34^{c}	6.29±0.21^{c}
24	4.79±0.91^{e}	5.52±0.99^{a}	6.81±0.99^{a}	7.45±0.84^{d}	6.42±0.63^{e}	7.54±0.99^{a}	7.12±0.81^{ab}	7.50±0.54^{ab}	6.17±0.56^{ab}	7.44±0.83^{ab}
30	3.94±0.36^{ef}	4.57±0.87^{ab}	5.02±0.87^{ab}	6.98±0.36^{e}	5.44±0.21^{ef}	7.28±0.87^{ab}	7.57±1.29^{a}	8.06±0.42^{a}	6.71±0.16^{a}	7.56±0.43^{a}
36	3.37±0.78^{f}	2.76±0.52^{ab}	4.08±0.52^{ab}	6.01±0.72^{f}	4.49±0.94^{f}	7.31±0.52^{ab}	7.09±0.61^{ab}	7.46±0.31^{b}	5.89±0.27^{b}	7.04±0.58^{b}

หมายเหตุ: a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค2 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด และความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ของการผลิตเอทานอลจากจอกน้ำ ด้วยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ ภายใต้สภาวะพีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในวัสดุตรึงรูปที่ต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±S.D.)					ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±S.D.)				
		เซลล์ตรึงรูป					เซลล์ตรึงรูป			
	เซลล์อิสระ	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ลำต้นข้าวฟ่างหวาน	เซลล์อิสระ	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ลำต้นข้าวฟ่างหวาน
0	15.14±0.04^{a}	15.24±0.01^{a}	15.99±0.04^{a}	15.80±0.03^{a}	15.95±0.04^{a}	0.00±0.06^{d}	0.00±0.06^{e}	0.24±0.24^{e}	0.21±0.43^{e}	0.22±0.44^{e}
6	13.93±0.95^{a}	13.69±0.99^{b}	13.87±0.23^{b}	13.65±0.47^{b}	13.54±0.76^{b}	1.06±0.87^{d}	1.11±0.11^{d}	1.75±0.54^{d}	1.24±0.27^{d}	1.26±0.26^{d}
12	10.83±0.57^{b}	10.28±0.45^{c}	11.46±0.42^{c}	11.20±0.38^{b}	11.13±0.56^{c}	2.39±0.55^{c}	2.46±0.68^{c}	3.10±0.32^{c}	2.33±0.64^{c}	2.63±0.16^{c}
18	8.10±1.01^{c}	7.90±0.58^{d}	9.48±0.76^{d}	10.34±1.74^{c}	10.07±0.35^{d}	4.05±0.43^{b}	4.19±0.69^{b}	4.60±0.18^{b}	3.28±0.34^{b}	3.46±0.35^{b}
24	7.21±0.18^{d}	6.88±1.67^{e}	8.42±0.52^{de}	9.48±0.30^{d}	8.91±0.26^{d}	6.15±0.79^{a}	5.35±0.85^{b}	6.46±0.26^{a}	4.26±0.90^{ab}	5.24±0.84^{ab}
30	5.82±0.95^{d}	5.62±0.45^{e}	7.78±0.26^{e}	8.62±0.46^{e}	7.60±0.46^{e}	5.95±0.93^{a}	6.23±0.65^{a}	6.98±0.56^{a}	5.28±0.86^{a}	5.39±0.66^{a}
36	4.78±1.13^{d}	4.45±0.57^{e}	5.64±0.29^{f}	7.44±0.24^{e}	6.84±0.19^{f}	5.88±0.77^{a}	5.85±0.75^{a}	6.27±0.60^{ab}	4.60±0.70^{ab}	5.18±0.29^{b}

หมายเหตุ: a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด และความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ของการผลิตเอทานอลจากธูปฤาษี ด้วยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงรูปของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ ภายใต้สภาวะพีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในวัสดุตรึงรูปที่ต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±S.D.)					ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±S.D.)				
		เซลล์ตรึงรูป					เซลล์ตรึงรูป			
	เซลล์อิสระ	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ลำต้นข้าวฟ่างหวาน	เซลล์อิสระ	แคลเซียมอัลจิเนต	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ลำต้นข้าวฟ่างหวาน
0	15.26±0.21^{a}	15.16±0.15^{a}	15.83±0.23^{a}	15.58±0.53^{a}	15.50±0.14^{a}	0.03±0.15^{e}	0.03±0.15^{f}	0.29±0.13^{f}	0.22±0.13^{e}	0.20±0.04^{e}
6	13.02±0.16^{b}	12.99±0.38^{b}	13.26±0.13^{b}	13.45±0.42^{b}	13.12±0.09^{b}	1.12±0.17^{d}	1.18±0.23^{e}	1.82±0.43^{e}	1.35±0.47^{d}	1.62±0.06^{d}
12	10.52±0.77^{c}	9.85±0.72^{c}	10.79±0.04^{c}	11.07±0.31^{bc}	10.38±0.08^{c}	3.66±0.26^{c}	3.67±0.24^{d}	3.47±0.04^{d}	2.84±0.38^{c}	3.65±0.06^{c}
18	7.14±0.61^{d}	7.84±1.54^{cd}	8.65±0.06^{d}	9.27±0.62^{d}	8.80±0.18^{d}	5.41±0.60^{b}	5.45±0.80^{c}	5.57±0.36^{c}	3.70±0.74^{b}	4.43±0.15^{b}
24	6.02±0.19^{e}	6.45±0.67^{cd}	7.37±0.16^{d}	8.37±0.34^{d}	7.68±0.24^{e}	7.12±0.38^{a}	6.64±0.50^{b}	6.75±0.06^{ab}	4.81±0.30^{ab}	6.00±0.04^{ab}
30	4.67±0.78^{f}	5.27±0.77^{d}	6.42±0.38^{e}	7.50±0.46^{e}	6.90±0.21^{f}	7.06±0.28^{a}	7.21±0.34^{a}	7.70±0.36^{a}	5.62±1.46^{a}	6.59±0.06^{a}
36	4.02±0.10^{f}	3.89±0.67^{d}	4.29±0.27^{f}	7.13±0.22^{f}	5.83±0.49^{f}	6.74±0.31^{ab}	6.41±0.39^{ab}	6.38±0.20^{b}	4.74±0.20^{ab}	5.71±0.09^{b}

หมายเหตุ: a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. กระบวนการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำแบบกึ่งกะ

ตารางผนวกที่ ค4 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะ ที่เติมอาหารวัชพืชน้ำครั้งเดียว (100:100) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	$0.25\pm0.38^{g,B}$	$0.40\pm0.24^{g,A}$	$0.05\pm0.11^{g,C}$	$20.06\pm0.21^{a,A}$	$20.02\pm0.26^{b,A}$	$20.04\pm0.89^{b,A}$
6	$1.38\pm0.90^{f,B}$	$1.02\pm0.18^{f,C}$	$1.63\pm0.39^{f,A}$	$14.23\pm0.56^{b,A}$	$14.80\pm0.19^{c,A}$	$14.35\pm0.62^{c,A}$
8	$5.02\pm0.83^{d,A}$	$3.47\pm0.62^{d,C}$	$4.18\pm0.42^{d,B}$	$10.33\pm0.34^{c,C}$	$12.31\pm0.59^{d,A}$	$11.82\pm0.61^{d,B}$
12^{a}	$6.44\pm0.29^{c,A}$	$4.26\pm0.09^{c,C}$	$5.67\pm0.18^{c,B}$	$6.43\pm0.22^{d,C}$	$8.77\pm0.28^{e,A}$	$7.64\pm0.22^{e,B}$
12^{b}	$3.53\pm0.12^{e,A}$	$1.76\pm0.06^{e,C}$	$2.51\pm0.08^{e,B}$	$21.05\pm0.09^{a,C}$	$23.74\pm0.10^{a,A}$	$22.52\pm0.15^{a,B}$
18	$5.83\pm0.22^{c,A}$	$3.23\pm0.19^{d,C}$	$4.68\pm0.26^{d,B}$	$10.22\pm0.17^{c,C}$	$12.28\pm0.35^{d,A}$	$11.43\pm0.36^{d,B}$
24	$9.33\pm0.04^{a,A}$	$7.54\pm0.15^{a,C}$	$8.64\pm0.12^{a,B}$	$6.85\pm0.23^{d,C}$	$8.76\pm0.46^{e,A}$	$7.63\pm0.14^{e,B}$
30	$8.12\pm0.43^{b,A}$	$6.04\pm0.17^{b,C}$	$7.18\pm0.21^{b,B}$	$4.51\pm0.42^{e,B}$	$5.34\pm0.15^{f,A}$	$4.88\pm0.06^{f,B}$
36	$6.29\pm0.40^{c,A}$	$4.36\pm0.15^{c,C}$	$5.46\pm0.34^{c,B}$	$3.19\pm0.31^{f,B}$	$4.83\pm0.38^{g,A}$	$3.78\pm0.12^{g,B}$

หมายเหตุ: a = ก่อนการเติมอาหารวัชพืชน้ำ, b = หลังการเติมอาหารวัชพืชน้ำ

a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค5 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะ ที่เติมอาหารวัชพืชน้ำสองครั้ง (100:50:50) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	$0.16\pm0.11^{h,A}$	$0.14\pm0.32^{h,A}$	$0.15\pm0.27^{h,A}$	$20.06\pm0.36^{a,A}$	$20.06\pm0.21^{a,A}$	$20.08\pm0.35^{a,A}$
6^{a}	$3.44\pm0.10^{f,A}$	$2.23\pm0.16^{f,B}$	$2.82\pm0.32^{f,AB}$	$10.76\pm0.05^{e,C}$	$13.20\pm0.58^{d,A}$	$11.68\pm0.20^{d,B}$
6^{b}	$1.45\pm0.16^{g,A}$	$0.94\pm0.09^{g,C}$	$1.18\pm0.26^{g,B}$	$20.21\pm0.68^{a,A}$	$20.01\pm0.62^{a,A}$	$20.22\pm0.09^{a,A}$
8	$5.02\pm0.22^{e,A}$	$3.16\pm0.74^{e,C}$	$4.27\pm0.40^{d,B}$	$14.70\pm0.72^{b,C}$	$16.08\pm0.35^{b,A}$	$15.22\pm0.55^{b,B}$
12^{a}	$6.15\pm0.39^{d,A}$	$5.30\pm0.42^{d,B}$	$5.61\pm0.52^{c,B}$	$12.28\pm0.80^{d,C}$	$15.49\pm0.22^{c,A}$	$14.34\pm0.78^{c,B}$
12^{b}	$4.96\pm0.20^{e,A}$	$3.24\pm0.53^{e,B}$	$3.49\pm0.16^{e,B}$	$20.04\pm0.57^{a,A}$	$20.02\pm0.40^{a,A}$	$20.20\pm0.23^{a,A}$
18	$10.38\pm0.53^{b,A}$	$7.97\pm0.11^{c,C}$	$8.61\pm0.38^{b,B}$	$13.59\pm0.19^{c,C}$	$15.23\pm0.86^{c,A}$	$14.36\pm0.40^{c,B}$
24	$12.96\pm0.49^{a,A}$	$10.82\pm0.04^{a,C}$	$11.66\pm0.12^{a,B}$	$6.68\pm0.44^{f,C}$	$8.63\pm0.18^{e,A}$	$7.45\pm0.12^{e,B}$
30	$10.24\pm0.62^{b,A}$	$8.37\pm0.28^{b,B}$	$8.71\pm0.24^{b,B}$	$4.20\pm0.32^{g,C}$	$6.61\pm0.51^{f,A}$	$5.12\pm0.62^{f,B}$
36	$9.20\pm0.58^{c,A}$	$7.52\pm0.61^{c,C}$	$8.28\pm0.96^{bc,B}$	$3.27\pm0.64^{h,B}$	$4.31\pm0.79^{g,A}$	$3.43\pm0.32^{g,B}$

หมายเหตุ: a = ก่อนการเติมอาหารวัชพืชน้ำ, b = หลังการเติมอาหารวัชพืชน้ำ

a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค6 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะ ที่เติมอาหารวัชพืชน้ำสองครั้ง (100:60:40) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	$0.32\pm0.35^{h,A}$	$0.36\pm0.14^{h,A}$	$0.25\pm0.28^{h,A}$	$20.06\pm0.45^{a,A}$	$20.13\pm0.85^{a,A}$	$20.07\pm0.11^{b,A}$
6^{a}	$4.14\pm0.06^{f,A}$	$2.44\pm0.67^{f,C}$	$3.68\pm0.18^{f,B}$	$10.44\pm0.20^{c,C}$	$12.96\pm0.37^{c,A}$	$11.71\pm0.54^{d,B}$
6^{b}	$2.64\pm0.22^{g,A}$	$1.69\pm0.11^{g,B}$	$2.08\pm0.61^{g,A}$	$20.78\pm0.29^{a,A}$	$21.32\pm0.23^{a,A}$	$21.12\pm0.26^{a,A}$
8	$5.42\pm0.25^{de,A}$	$3.22\pm0.38^{f,C}$	$4.38\pm0.07^{e,B}$	$13.69\pm0.70^{b,C}$	$15.43\pm0.49^{b,A}$	$14.29\pm0.42^{c,B}$
12^{a}	$6.48\pm079^{d,A}$	$4.26\pm0.06^{e,C}$	$5.43\pm0.36^{d,B}$	$6.36\pm0.34^{e,C}$	$8.44\pm0.42^{e,A}$	$7.36\pm0.53^{f,B}$
12^{b}	$4.26\pm0.06^{ef,A}$	$2.42\pm0.61^{fg,C}$	$3.58\pm0.16^{f,B}$	$21.18\pm0.07^{a,A}$	$21.73\pm0.15^{a,A}$	$21.36\pm0.33^{a,A}$
18	$8.94\pm1.03^{c,A}$	$5.52\pm0.25^{d,C}$	$7.69\pm0.86^{cd,B}$	$9.04\pm0.23^{d,B}$	$10.40\pm0.63^{d,A}$	$9.64\pm0.16^{e,B}$
24	$13.54\pm0.44^{a,A}$	$11.17\pm0.48^{a,C}$	$12.68\pm0.11^{a,B}$	$6.12\pm0.78^{e,C}$	$8.07\pm0.86^{e,A}$	$7.27\pm0.87^{f,B}$
30	$11.07\pm1.00^{b,A}$	$8.09\pm0.15^{b,C}$	$9.35\pm0.32^{b,B}$	$4.11\pm0.64^{f,C}$	$6.45\pm0.26^{f,A}$	$5.28\pm0.26^{g,B}$
36	$10.22\pm1.40^{b,A}$	$7.43\pm0.49^{c,C}$	$8.63\pm0.19^{c,B}$	$3.12\pm0.52^{g,B}$	$4.18\pm0.18^{g,A}$	$3.36\pm0.34^{h,B}$

หมายเหตุ: a = ก่อนการเติมอาหารวัชพืชน้ำ, b = หลังการเติมอาหารวัชพืชน้ำ

a, b, c,… ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple range test ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.กระบวนการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำแบบกะซ้ำ

ตารางผนวกที่ ค7 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์อิสระ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะซ้ำ	0	0.22±0.02^{f,A}	0.21±0.01^{f,A}	0.25±0.01^{e,A}	20.14±0.01^{a,A}	20.16±0.01^{a,A}	20.11±0.01^{a,A}
รอบที่ 1	8	2.43±0.23^{e,A}	1.06±0.11^{e,C}	1.28±0.43^{d,B}	14.59±0.43^{b,C}	16.35±0.35^{b,A}	15.35±0.53^{b,B}
	16	4.48±0.45^{d,A}	2.85±0.42^{c,C}	3.33±0.52^{c,B}	9.68±0.24^{c,C}	12.86±0.64^{c,A}	10.39±0.21^{c,B}
	24	7.67±0.36^{a,A}	5.42±0.22^{a,C}	6.56±0.15^{a,B}	7.87±0.13^{d,C}	10.88±0.72^{d,A}	8.52±0.64^{d,B}
	32	6.84±0.65^{b,A}	5.24±0.34^{a,C}	6.24±0.24^{a,A}	4.98±0.25^{e,C}	7.05±0.23^{e,A}	5.28±0.32^{e,B}
	36	5.75±0.21^{c,A}	4.42±0.53^{b,C}	5.26±0.17^{b,A}	2.93±0.17^{f,C}	4.88±0.42^{f,A}	3.60±0.11^{f,B}
กะซ้ำ	0	0.69±0.24^{d,A}	0.33±0.62^{d,B}	0.23±0.26^{d}	21.74±0.38^{a,AB}	23.36±0.54^{a,A}	22.47±0.17^{a,A}
รอบที่ 2	8	3.57±0.56^{c,A}	1.67±0.27^{c,C}	2.43±0.67^{c,B}	17.49±0.76^{b,C}	19.66±0.63^{b,A}	18.73±0.37^{b,B}
	16	5.63±0.78^{b,A}	3.67±0.32^{b,C}	4.58±0.83^{b,B}	12.79±0.47^{c,C}	14.12±0.48^{c,A}	13.61±0.29^{c,B}
	24	8.43±0.33^{a,A}	5.76±0.68^{a,C}	6.78±0.23^{a,B}	4.79±0.85^{d,C}	7.69±0.37^{d,A}	6.44±0.23^{d,B}
กะซ้ำ	0	1.04±0.61^{d,A}	0.87±0.23^{d,B}	0.52±0.33^{d,C}	21.24±0.36^{a,B}	23.93±0.47^{a,A}	21.65±0.65^{a,B}
รอบที่ 3	8	4.38±0.14^{c,A}	2.64±0.29^{c,C}	3.44±0.25^{c,B}	15.65±0.25^{b,C}	18.84±0.32^{b,A}	16.78±0.73^{b,B}
	16	6.36±0.26^{b,A}	3.80±0.31^{b,C}	4.62±0.75^{b,B}	12.16±0.67^{c,C}	14.27±0.46^{c,A}	12.79±0.48^{c,B}
	24	8.65±0.69^{a,A}	5.97±0.25^{a,C}	7.26±0.32^{a,B}	5.26±0.32^{d,C}	8.73±0.52^{d,A}	6.85±0.82^{d,B}
กะซ้ำ	0	0.89±0.68^{d,A}	0.12±0.37^{d,C}	0.58±0.36^{d,B}	21.50±0.27^{a,B}	22.66±0.18^{a,A}	21.97±0.19^{a,B}
รอบที่ 4	8	3.79±0.25^{c,A}	1.79±0.54^{c,C}	2.64±0.17^{c,B}	15.79±0.39^{b,C}	18.70±0.56^{b,A}	17.85±0.25^{b,B}
	16	5.46±0.13^{b,A}	2.85±0.57^{b,C}	4.71±0.41^{b,B}	10.41±0.21^{c,C}	13.44±0.17^{c,A}	12.34±0.34^{c,B}
	24	6.60±0.16^{a,A}	3.62±0.19^{a,C}	5.78±0.51^{a,B}	7.67±0.36^{d,C}	9.36±0.37^{d,A}	8.24±0.65^{d,B}
กะซ้ำ	0	0.24±0.42^{d}	0.61±0.08^{d}	0.67±0.63^{d,B}	21.32±0.24^{a}	22.60±0.28^{a,A}	21.48±0.53^{a,B}
รอบที่ 5	8	2.75±0.53^{c,A}	1.56±0.36^{c}	1.78±0.14^{c,B}	16.25±0.58^{b}	19.49±0.26^{b,A}	17.88±0.62^{b,B}
	16	3.57±0.64^{b,A}	2.46±0.56^{b}	2.78±0.37^{b,B}	12.65±0.64^{c}	14.52±0.39^{c,A}	13.59±0.18^{c,B}
	24	4.47±0.67^{a,A}	2.73±0.27^{a}	3.53±0.31^{a,B}	7.04±0.23^{d}	9.58±0.41^{d,A}	8.23±0.71^{d,B}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) และ A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค8 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะซ้ำ	0	$0.42\pm0.01^{e,A}$	$0.31\pm0.04^{f,B}$	$0.45\pm0.07^{f,A}$	$20.31\pm0.03^{a,A}$	$20.06\pm0.02^{a,A}$	$20.11\pm0.02^{a,A}$
รอบที่ 1	8	$2.61\pm0.09^{d,A}$	$1.16\pm0.24^{e,C}$	$1.47\pm0.21^{e,B}$	$13.79\pm0.28^{b,C}$	$15.45\pm0.38^{b,A}$	$14.95\pm0.24^{b,B}$
	16	$5.48\pm0.13^{c,A}$	$3.85\pm0.33^{d,C}$	$4.33\pm0.25^{d,B}$	$8.28\pm0.35^{c,C}$	$10.76\pm0.63^{cf,A}$	$9.39\pm0.57^{c,B}$
	24	$8.47\pm0.79^{a,A}$	$6.72\pm0.13^{a,C}$	$7.36\pm0.12^{a,B}$	$6.77\pm0.22^{d,C}$	$8.98\pm0.07^{d,A}$	$7.52\pm0.17^{d,B}$
	32	$7.84\pm0.93^{b,A}$	$5.34\pm0.09^{b,C}$	$6.24\pm0.30^{b,B}$	$3.98\pm0.57^{e,C}$	$5.05\pm0.78^{e,A}$	$4.28\pm0.07^{e,B}$
	36	$6.75\pm0.02^{c,A}$	$4.82\pm0.47^{c,C}$	$5.46\pm0.07^{c,B}$	$1.93\pm0.32^{f,C}$	$3.78\pm0.18^{f,A}$	$2.30\pm0.39^{f,B}$
กะซ้ำ	0	$1.69\pm0.30^{d,A}$	$1.33\pm0.14^{d,B}$	$1.23\pm0.08^{d,C}$	$21.51\pm0.02^{a,C}$	$23.26\pm0.28^{a,A}$	$22.37\pm0.08^{a,B}$
รอบที่ 2	8	$4.47\pm0.08^{c,A}$	$2.47\pm0.20^{c,C}$	$3.43\pm1.90^{c,B}$	$16.19\pm0.34^{b,C}$	$18.36\pm0.56^{b,A}$	$17.43\pm0.62^{b,B}$
	16	$6.63\pm1.03^{b,A}$	$4.47\pm0.80^{b,C}$	$5.28\pm0.63^{b,B}$	$10.79\pm0.60^{c,C}$	$12.12\pm0.19^{c,A}$	$11.71\pm0.26^{c,B}$
	24	$9.73\pm0.39^{a,A}$	$5.90\pm0.41^{a,C}$	$6.68\pm0.18^{a,B}$	$3.59\pm0.41^{d,C}$	$6.49\pm0.46^{d,A}$	$5.34\pm0.56^{d,B}$
กะซ้ำ	0	$2.04\pm0.06^{d,A}$	$1.87\pm0.08^{d,B}$	$1.52\pm0.60^{d,C}$	$21.64\pm0.06^{a,C}$	$22.93\pm0.10^{a,A}$	$22.15\pm0.69^{a,A}$
รอบที่ 3	8	$5.28\pm0.35^{c,A}$	$3.74\pm0.72^{c,C}$	$4.34\pm0.36^{c,B}$	$14.25\pm0.69^{b,C}$	$16.84\pm0.82^{b,A}$	$15.68\pm0.28^{b,B}$
	16	$8.36\pm0.47^{b,A}$	$4.70\pm0.35^{b,C}$	$5.12\pm0.54^{b,B}$	$10.35\pm0.13^{c,C}$	$12.27\pm0.14^{c,A}$	$11.79\pm0.42^{c,B}$
	24	$10.55\pm0.41^{a,A}$	$6.47\pm0.12^{a,C}$	$7.86\pm0.67^{a,B}$	$4.86\pm0.24^{d,C}$	$7.63\pm0.48^{d,A}$	$5.85\pm0.50^{d,B}$
กะซ้ำ	0	$1.89\pm0.12^{d,A}$	$1.12\pm0.17^{d,C}$	$1.58\pm0.08^{d,B}$	$21.80\pm0.49^{a,B}$	$22.66\pm0.77^{a,A}$	$21.87\pm0.61^{a,B}$
รอบที่ 4	8	$4.89\pm0.20^{c,A}$	$2.69\pm1.29^{c,C}$	$3.24\pm0.29^{c,B}$	$14.09\pm0.72^{b,C}$	$17.10\pm0.73^{b,A}$	$16.81\pm0.94^{b,B}$
	16	$6.16\pm0.54^{b,A}$	$3.55\pm0.12^{b,C}$	$5.61\pm0.42^{b,B}$	$9.41\pm0.29^{c,C}$	$11.24\pm0.17^{c,A}$	$10.04\pm0.68^{c,B}$
	24	$7.30\pm0.41^{a,A}$	$4.42\pm0.23^{a,C}$	$6.08\pm0.16^{a,B}$	$6.77\pm0.18^{d,C}$	$8.66\pm0.22^{d,A}$	$7.74\pm0.04^{d,B}$
กะซ้ำ	0	$2.24\pm0.64^{d,A}$	$0.91\pm0.12^{d,C}$	$1.67\pm0.11^{d,B}$	$20.82\pm0.27^{a,C}$	$23.60\pm0.10^{a,A}$	$21.58\pm0.38^{a,B}$
รอบที่ 5	8	$3.61\pm0.22^{c,A}$	$2.36\pm0.39^{c,C}$	$2.78\pm0.28^{c,B}$	$16.25\pm0.18^{b,C}$	$18.19\pm0.66^{b,A}$	$16.86\pm0.44^{b,B}$
	16	$4.27\pm0.09^{b,A}$	$2.46\pm0.25^{b,C}$	$2.98\pm0.30^{b,B}$	$10.65\pm0.61^{c,C}$	$13.42\pm0.08^{c,A}$	$11.39\pm0.48^{c,B}$
	24	$4.87\pm0.14^{a,A}$	$2.53\pm0.15^{a,C}$	$3.23\pm0.07^{a,B}$	$6.14\pm0.51^{d,C}$	$8.78\pm0.16^{d,A}$	$7.63\pm0.67^{d,B}$

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\leq0.05$) และ A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\leq0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค9 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะซ้ำ	0	$0.32\pm0.06^{f,B}$	$0.42\pm0.04^{f,A}$	$0.39\pm0.01^{f,A}$	$20.22\pm0.11^{a,A}$	$20.24\pm0.08^{a,A}$	$20.16\pm0.16^{a,A}$
รอบที่ 1	8	$1.81\pm0.24^{e,A}$	$1.15\pm0.28^{e,C}$	$1.24\pm0.21^{e,B}$	$15.85\pm0.46^{b,C}$	$18.56\pm0.28^{b,A}$	$16.20\pm0.31^{b,B}$
	16	$5.37\pm0.57^{d,A}$	$3.38\pm0.56^{d,C}$	$4.98\pm0.78^{c,B}$	$7.75\pm0.28^{c,C}$	$10.22\pm0.59^{c,A}$	$8.55\pm0.67^{c,B}$
	24	$8.53\pm0.29^{a,A}$	$5.94\pm0.44^{a,C}$	$6.58\pm0.30^{a,B}$	$5.78\pm0.54^{d,C}$	$7.09\pm0.14^{d,A}$	$6.84\pm0.10^{d,B}$
	32	$6.45\pm0.62^{b,A}$	$3.41\pm0.72^{b,C}$	$5.92\pm0.49^{b,B}$	$3.29\pm0.18^{e,C}$	$4.51\pm0.21^{e,A}$	$3.81\pm0.68^{e,B}$
	36	$4.71\pm0.31^{c,A}$	$2.67\pm0.08^{c,C}$	$3.09\pm0.11^{d,B}$	$2.25\pm0.62^{f,,C}$	$3.68\pm0.42^{f,A}$	$2.90\pm0.49^{f,B}$
กะซ้ำ	0	0.29 ± 0.49^{d}	$0.55\pm0.49^{d,A}$	$0.49\pm0.56^{d,B}$	$21.48\pm0.06^{a,B}$	$22.70\pm0.70^{a,A}$	$21.69\pm0.20^{a,B}$
รอบที่ 2	8	$4.44\pm0.11^{c,A}$	$2.27\pm0.62^{c,C}$	$3.89\pm0.27^{c,B}$	$15.67\pm0.32^{b,C}$	$17.91\pm0.39^{b,A}$	$16.10\pm0.51^{b,B}$
	16	$6.74\pm0.07^{b,A}$	$4.26\pm0.23^{b,C}$	$5.39\pm0.44^{b,B}$	$6.99\pm0.30^{c,C}$	$8.92\pm0.64^{c,A}$	$7.75\pm0.64^{c,B}$
	24	$10.23\pm0.17^{a,A}$	$6.28\pm0.19^{a,C}$	$8.22\pm0.19^{a,B}$	$3.02\pm0.61^{c,C}$	$4.31\pm0.27^{d,A}$	$4.03\pm0.34^{d,B}$
กะซ้ำ	0	$1.91\pm0.12^{d,A}$	$1.46\pm0.18^{d,B}$	1.35 ± 0.34^{d}	$22.03\pm0.41^{a,B}$	$23.52\pm0.79^{a,A}$	$22.52\pm0.32^{a,B}$
รอบที่ 3	8	$5.73\pm0.84^{c,A}$	$3.47\pm0.69^{c,C}$	$4.66\pm0.63^{c,B}$	$14.65\pm0.27^{b,C}$	$15.56\pm0.35^{b,A}$	$15.12\pm0.14^{b,B}$
	16	$9.64\pm0.34^{b,A}$	$5.47\pm0.21^{b,C}$	$6.21\pm0.14^{b,B}$	$7.69\pm0.82^{c,C}$	$9.72\pm0.29^{c,A}$	$8.77\pm0.25^{c,B}$
	24	$13.82\pm0.83^{a,A}$	$7.10\pm0.32^{a,C}$	$9.29\pm0.41^{a,B}$	$3.24\pm0.26^{d,C}$	$4.70\pm0.06^{d,A}$	$4.52\pm0.33^{d,B}$
กะซ้ำ	0	$1.99\pm0.66^{d,A}$	$1.59\pm0.56^{d,C}$	$2.03\pm0.58^{d,B}$	$21.17\pm0.48^{a,B}$	$23.37\pm0.88^{a,A}$	$22.27\pm0.21^{a,B}$
รอบที่ 4	8	$3.89\pm0.26^{c,A}$	$2.59\pm0.47^{c,C}$	$3.13\pm0.81^{c,B}$	$14.94\pm0.16^{b,C}$	$16.84\pm0.48^{b,A}$	$15.80\pm0.14^{b,B}$
	16	$5.21\pm0.45^{b,A}$	$3.22\pm0.26^{b,C}$	$4.06\pm0.17^{b,B}$	$8.92\pm0.25^{c,C}$	$11.04\pm0.37^{c,A}$	$9.77\pm0.46^{c,B}$
	24	$6.84\pm0.13^{a,A}$	$4.82\pm0.53^{a,C}$	$5.50\pm0.22^{a,B}$	$4.56\pm0.08^{d,C}$	$7.87\pm0.17^{d,A}$	$5.69\pm0.23^{d,B}$
กะซ้ำ	0	$1.22\pm0.08^{d,A}$	$0.79\pm0.49^{d,C}$	$0.90\pm0.69^{d,B}$	$21.12\pm0.36^{a,B}$	$23.57\pm0.36^{a,A}$	$22.66\pm0.01^{a,B}$
รอบที่ 5	8	$2.13\pm0.30^{c,A}$	$1.34\pm0.43^{c,C}$	$2.18\pm0.24^{c,B}$	$14.69\pm0.42^{b,C}$	$16.96\pm0.65^{b,A}$	$15.20\pm0.18^{b,B}$
	16	$3.65\pm0.52^{b,A}$	$2.39\pm0.81^{b,C}$	$2.85\pm0.34^{b,B}$	$9.69\pm0.51^{c,C}$	$11.07\pm0.31^{c,A}$	$10.43\pm0.29^{c,B}$
	24	$4.21\pm0.32^{a,A}$	$2.35\pm0.25^{a,C}$	$2.98\pm0.09^{a,B}$	$5.70\pm0.20^{d,C}$	$7.06\pm0.11^{d,A}$	$6.83\pm0.12^{d,B}$

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\leq0.05$) และ A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\leq0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค10 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยซังข้าวโพด ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะซ้ำ	0	$0.36\pm0.16^{e,A}$	$0.32\pm0.02^{d,A}$	$0.39\pm0.05^{e,A}$	$20.08\pm0.08^{a,A}$	$20.06\pm0.04^{a,A}$	$20.06\pm0.02^{a,A}$
รอบที่ 1	8	$1.62\pm0.59^{d,A}$	$1.15\pm0.67^{e,C}$	$1.24\pm0.78^{d,B}$	$16.11\pm0.34^{b,C}$	$19.23\pm0.69^{b,A}$	$18.23\pm0.20^{b,B}$
	16	$4.43\pm0.58^{c,A}$	$2.38\pm0.41^{c,C}$	$3.98\pm0.69^{c,B}$	$10.91\pm0.38^{c,C}$	$12.20\pm0.47^{c,A}$	$10.95\pm0.31^{c,B}$
	24	$6.82\pm0.17^{a,A}$	$4.92\pm0.87^{a,C}$	$5.48\pm0.60^{a,B}$	$8.67\pm0.22^{d,C}$	$9.53\pm0.27^{d,A}$	$8.99\pm0.68^{d,B}$
	32	$5.65\pm0.36^{b,A}$	$3.81\pm0.20^{b,C}$	$4.92\pm0.37^{b,B}$	$5.41\pm0.48^{e,C}$	$8.41\pm0.18^{e,A}$	$6.45\pm0.56^{e,B}$
	36	$4.82\pm0.47^{c,A}$	$2.87\pm0.33^{c,C}$	$3.49\pm0.19^{c,B}$	$3.37\pm0.43^{f,C}$	$5.22\pm0.15^{f,A}$	$4.31\pm0.46^{f,B}$
กะซ้ำ	0	$0.29\pm0.13^{d,A}$	$0.15\pm0.10^{d,C}$	$0.19\pm0.02^{d,B}$	$22.07\pm0.14^{a,B}$	$23.43\pm0.35^{a,A}$	$22.70\pm0.38^{a,B}$
รอบที่ 2	8	$2.24\pm0.09^{c,A}$	$1.67\pm0.14^{c,C}$	$1.89\pm0.14^{c,B}$	$16.86\pm0.54^{b,C}$	$19.46\pm0.25^{b,A}$	$18.21\pm0.41^{b,C}$
	16	$4.62\pm0.15^{b,A}$	$4.26\pm0.31^{b,C}$	$5.39\pm0.27^{b,B}$	$8.07\pm0.25^{c,C}$	$14.88\pm0.42^{c,A}$	$10.23\pm0.63^{c,C}$
	24	$6.23\pm0.28^{a,A}$	$6.28\pm0.45^{a,C}$	$8.22\pm0.22^{a,B}$	$4.87\pm0.47^{d,C}$	$6.75\pm0.16^{d,A}$	$5.46\pm0.37^{d,C}$
กะซ้ำ	0	$1.65\pm0.73^{d,A}$	$1.46\pm0.16^{d,B}$	$1.35\pm0.12^{d,C}$	$21.91\pm0.15^{a,C}$	$22.51\pm0.09^{a,A}$	$22.16\pm0.58^{a,B}$
รอบที่ 3	8	$4.68\pm0.54^{c,A}$	$3.47\pm0.57^{c,C}$	$4.66\pm0.29^{c,B}$	$15.69\pm0.28^{b,C}$	$17.86\pm0.31^{b,A}$	$17.19\pm0.77^{b,A}$
	16	$5.69\pm0.32^{b,A}$	$5.47\pm0.19^{b,C}$	$6.21\pm0.48^{b,B}$	$8.50\pm0.52^{c,C}$	$13.50\pm0.20^{c,A}$	$9.19\pm0.17^{c,B}$
	24	$7.32\pm0.43^{a,A}$	$7.10\pm0.89^{a,C}$	$9.29\pm0.81^{a,B}$	$4.96\pm0.41^{d,C}$	$8.89\pm0.03^{d,A}$	$5.41\pm0.26^{d,B}$
กะซ้ำ	0	1.25 ± 0.60^{d}	$1.59\pm0.18^{d,C}$	$2.03\pm0.06^{d,A}$	$20.51\pm0.66^{a,C}$	$22.63\pm0.48^{a,A}$	$21.30\pm0.39^{a,B}$
รอบที่ 4	8	$2.29\pm0.32^{c,A}$	$1.86\pm0.04^{c,C}$	$2.13\pm0.51^{c,A}$	$15.43\pm0.28^{b,C}$	$18.93\pm0.62^{b,A}$	$18.90\pm0.47^{b,A}$
	16	$4.11\pm0.67^{b,A}$	$2.82\pm0.27^{b,C}$	$3.56\pm0.11^{b,B}$	$9.69\pm0.32^{c,C}$	$14.15\pm0.71^{c,A}$	$10.48\pm0.91^{c,B}$
	24	$5.64\pm0.46^{a,A}$	$3.41\pm0.34^{a,C}$	$4.70\pm0.19^{a,B}$	$5.86\pm0.74^{d,C}$	$10.12\pm0.69^{d,A}$	$6.26\pm0.23^{d,B}$
กะซ้ำ	0	$1.02\pm0.09^{d,A}$	$0.79\pm0.51^{c,C}$	$0.90\pm0.16^{d,B}$	$21.58\pm0.05^{a,B}$	$22.54\pm0.46^{a,A}$	$21.75\pm0.51^{a,B}$
รอบที่ 5	8	$1.83\pm0.42^{c,A}$	$1.34\pm0.80^{b,C}$	$1.69\pm0.73^{c,B}$	$16.05\pm0.33^{b,C}$	$18.91\pm0.30^{b,A}$	$17.21\pm0.32^{b,B}$
	16	$3.43\pm0.11^{b,A}$	$2.39\pm0.66^{a,C}$	$2.65\pm0.09^{b,B}$	$10.99\pm0.18^{c,C}$	$14.73\pm0.83^{c,A}$	$12.09\pm0.54^{c,B}$
	24	$4.64\pm0.59^{a,A}$	$2.46\pm0.59^{a,C}$	$3.68\pm0.23^{a,B}$	$6.20\pm0.24^{d,C}$	$8.64\pm0.28^{d,A}$	$7.70\pm0.29^{d,B}$

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\leq0.05$) และ A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\leq0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค11 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยลำต้นข้าวฟ่างหวาน ในการหมักแบบกะซ้ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงต่อรอบ

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะซ้ำ	0	0.24±0.04^{e}	0.34±0.02^{e,B}	0.48±0.03^{f,A}	20.10±0.02^{a,A}	20.82±0.06^{a,A}	20.53±0.04^{a,A}
รอบที่ 1	8	1.63±0.32^{d,A}	1.50±0.24^{d,B}	1.58±0.39^{c,B}	14.77±0.23^{b,C}	16.10±0.46^{b,A}	15.62±0.26^{b,B}
	16	4.61±0.18^{c,A}	2.61±0.15^{c,C}	3.38±0.24^{c,B}	8.78±0.16^{c,C}	10.92±0.23^{c,A}	9.05±0.31^{c,B}
	24	6.63±0.37^{a,A}	4.68±0.29^{a,C}	5.25±0.83^{a,B}	4.73±0.38^{d,C}	6.73±0.20^{d,A}	5.65±0.45^{d,B}
	32	5.35±0.28^{b,A}	3.86±0.38^{b,C}	4.36±0.48^{b,B}	2.27±0.48^{e,C}	4.30±0.35^{e,A}	3.38±0.29^{e,B}
	36	4.54±0.56^{c,A}	2.07±0.18^{c,C}	3.10±0.29^{c,B}	1.04±0.24^{f,C}	2.20±0.22^{f,A}	1.68±0.14^{f,B}
กะซ้ำ	0	0.75±0.81^{d,A}	0.41±0.78^{d,B}	0.23±0.19^{d,C}	20.22±0.49^{a,C}	21.82±0.84^{a,A}	20.32±0.19^{a,B}
รอบที่ 2	8	3.59±0.29^{c,A}	1.91±0.55^{c,C}	2.87±0.79^{c,B}	15.56±0.18^{b,C}	18.15±0.12^{b,A}	16.76±0.22^{b,B}
	16	4.68±0.44^{b,A}	3.21±0.67^{b,C}	4.30±0.33^{b,B}	8.00±0.39^{c,C}	10.13±0.48^{c,A}	9.99±0.86^{c,B}
	24	6.67±0.47^{a,A}	4.41±0.62^{a,C}	5.36±0.25^{a,B}	2.96±0.12^{d,C}	4.89±0.34^{d,A}	3.66±0.27^{d,B}
กะซ้ำ	0	1.50±0.23^{d,B}	1.75±0.84^{d,A}	1.58±0.35^{d,B}	21.63±0.05^{a,C}	23.62±0.16^{a,A}	22.42±0.16^{a,B}
รอบที่ 3	8	5.31±0.91^{c,A}	2.65±0.32^{c,C}	3.06±0.63^{c,B}	15.03±0.66^{b,C}	17.35±0.86^{b,A}	16.81±0.59^{b,B}
	16	6.81±0.37^{b,A}	4.74±0.47^{b,C}	5.70±0.42^{b,B}	8.90±0.42^{c,C}	11.77±0.68^{c,A}	10.08±0.91^{c,B}
	24	7.73±0.64^{a,A}	5.98±0.58^{a,C}	6.93±0.62^{a,B}	3.50±0.68^{d,C}	6.49±0.56^{d,A}	5.45±0.41^{d,B}
กะซ้ำ	0	1.31±0.32^{d,A}	1.12±0.19^{d,C}	1.25±0.59^{d,B}	20.36±0.23^{a,C}	22.02±0.25^{a,A}	21.65±0.60^{a,B}
รอบที่ 4	8	3.54±0.19^{c,A}	2.84±0.65^{c,C}	2.87±0.68^{c,B}	14.84±0.10^{b,C}	18.52±0.18^{b,A}	17.78±0.69^{b,B}
	16	5.86±0.67^{b,A}	3.75±0.28^{b,C}	4.20±0.36^{b,B}	9.73±0.14^{c,C}	12.72±0.50^{c,A}	10.40±0.48^{c,B}
	24	6.31±0.89^{a,A}	4.53±0.41^{a,C}	5.31±0.70^{a,B}	5.66±0.56^{d,C}	8.34±0.69^{d,A}	6.41±0.26^{d,B}
กะซ้ำ	0	1.42±0.11^{d,A}	0.51±0.09^{d,B}	1.46±0.64^{d,A}	21.29±0.07^{a,B}	22.24±0.23^{a,A}	21.63±0.51^{a,B}
รอบที่ 5	8	3.39±0.46^{c,A}	1.93±0.49^{c}	2.93±0.49^{c,B}	15.31±0.32^{b,C}	18.00±0.38^{b,A}	16.71±0.17^{b,B}
	16	3.62±0.06^{b,A}	2.15±0.14^{b}	3.18±0.56^{b,A}	10.53±0.69^{c,C}	13.34±0.52^{c,A}	11.90±0.87^{c,B}
	24	4.08±0.84^{a,A}	2.92±0.88^{a}	3.81±0.96^{a,A}	6.37±0.26^{d,C}	9.80±0.72^{d,A}	7.02±0.37^{d,B}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) และ A, B, C,… ในแนวนอนเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. กระบวนการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำ หมักในถังแพคเบด

4.1เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำในแพคเบด โดยให้อัตราไหลที่ต่างกัน

ตารางผนวกที่ ค12 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	0.05±0.06^{f}	0.13±0.04^{g}	0.09±0.03^{f}	50.04±0.02^{a}	50.06±0.03^{a}	50.03±0.04^{a}
8	7.67±0.18^{e}	4.86±0.11^{f}	6.31±0.21^{e}	34.81±0.24^{b}	36.45±0.12^{b}	35.13±0.28^{b}
16	16.16±0.37^{d}	14.40±0.25^{d}	15.52±0.14^{c}	17.45±0.16^{c}	22.14±0.43^{c}	20.19±0.14^{c}
24	20.92±0.25^{b}	18.31±0.22^{b}	19.89±0.28^{b}	9.71±0.32^{d}	11.68±0.56^{d}	10.60±0.35^{d}
32	21.90±0.12^{a}	19.33±0.41^{a}	20.42±0.64^{a}	5.58±0.46^{e}	7.31±0.16^{e}	6.19±0.28^{e}
40	21.27±0.46^{a}	16.02±0.13^{c}	19.29±0.16^{b}	4.62±0.17^{f}	6.85±0.67^{f}	5.74±0.57^{e}
48	18.75±0.32^{c}	12.55±0.07^{e}	14.68±0.35^{d}	3.88±0.31^{g}	5.49±0.27^{g}	4.24±0.17^{g}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค13 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	0.21±0.02^{f}	0.20±0.02^{f}	0.19±0.04^{f}	50.12±0.06^{a}	50.38±0.02^{a}	50.24±0.03^{a}
8	9.48±0.11^{e}	7.97±0.15^{e}	8.30±0.23^{e}	35.28±0.21^{b}	37.48±0.34^{b}	36.28±0.42^{b}
16	15.35±0.30^{c}	14.45±0.24^{c}	15.10±0.43^{c}	18.62±0.45^{c}	23.62±0.25^{c}	21.56±0.19^{c}
24	17.95±0.26^{b}	15.54±0.48^{b}	16.88±0.27^{b}	10.57±0.62^{d}	12.57±0.37^{d}	11.45±0.45^{d}
32	18.93±0.42^{a}	17.27±0.35^{a}	18.09±0.52^{a}	6.78±0.16^{e}	8.48±0.34^{e}	7.41±0.24^{e}
40	17.49±0.48^{bc}	14.55±0.18^{c}	16.62±0.71^{b}	5.32±0.28^{f}	7.32±0.41^{f}	6.62±0.57^{f}
48	14.97±0.29^{d}	11.94±0.52^{d}	14.10±0.36^{d}	4.70±0.36^{g}	6.70±0.09^{g}	5.76±0.32^{g}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค14 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	0.18±0.04^{f}	0.12±0.03^{f}	0.77±0.06^{f}	50.18±0.04^{a}	50.36±0.02^{a}	50.16±0.03^{a}
8	9.29±0.23^{e}	7.97±0.32^{e}	8.09±0.18^{e}	36.78±0.32^{b}	38.76±0.26^{b}	37.38±0.13^{b}
16	14.86±0.34^{c}	12.21±0.18^{c}	13.86±0.27^{c}	19.85±0.15^{c}	24.86±0.17^{c}	22.47±0.41^{c}
24	15.54±0.16^{b}	13.30±0.48^{b}	14.73±0.54^{b}	11.66±0.27^{d}	13.28±0.41^{d}	12.42±0.36^{d}
32	16.89±0.65^{a}	14.12±0.35^{a}	15.35±0.28^{a}	7.73±0.19^{e}	9.22±0.22^{e}	8.74±0.28^{e}
40	15.02±0.53^{bc}	12.54±0.26^{c}	13.62±0.34^{c}	6.82±0.48^{ef}	8.69±0.18^{f}	7.52±0.54^{f}
48	12.64±0.42^{d}	10.16±0.54^{d}	11.64±0.68^{d}	5.78±0.52^{f}	7.61±0.69^{g}	6.48±0.23^{g}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค15 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะช้ำ	0	0.76±0.03^{h}	0.56±0.02^{h}	0.48±0.04^{g}	206.8±0.04^{a}	205.4±0.03^{a}	204.2±0.03^{a}
รอบที่ 1	8	7.68±0.24^{g}	5.17±0.31^{g}	6.73±0.25^{f}	136.4±0.17^{b}	142.2±0.45^{b}	140.04±0.14^{b}
	16	9.76±0.34^{f}	9.30±0.16^{f}	9.39±0.47^{e}	92.55±0.20^{c}	96.23±0.67^{c}	93.87±0.34^{c}
	24	39.56±0.14^{e}	31.51±0.35^{e}	36.16±0.33^{d}	64.28±0.28^{d}	68.10±0.24^{d}	66.20±0.58^{d}
	32	64.94±0.58^{d}	62.44±0.47^{c}	64.21±0.36^{bc}	56.31±0.76^{e}	60.79±0.54^{e}	58.33±0.32^{e}
	40	68.28±0.56^{b}	65.00±0.54^{b}	57.34±0.08^{c}	54.34±0.89^{f}	57.74±0.78^{f}	56.35±0.23^{ef}
	48	71.69±0.67^{a}	68.93±0.34^{a}	70.30±0.50^{a}	38.41±0.54^{g}	40.03±0.78^{gh}	38.83±0.62^{f}
	56	69.90±0.19^{b}	64.20±0.43^{b}	67.16±0.68^{b}	39.89±0.19^{h}	41.58±0.12^{g}	41.03±0.17^{g}
	64	68.64±0.21^{b}	63.94±0.63^{c}	65.23±0.23^{b}	37.91±0.44^{i}	41.24±0.13^{g}	40.14±0.39^{g}
	72	67.59±0.64^{c}	56.98±0.26^{d}	61.37±0.86^{c}	38.22±0.12^{h}	42.96±0.14^{g}	40.07±0.47^{g}
กะช้ำ	0	5.05±0.24^{f}	6.45±0.74^{g}	5.43±0.43^{f}	175.4±0.48^{a}	176.2±0.38^{a}	172.6±0.27^{a}
รอบที่ 2	8	24.74±0.57^{ef}	24.13±0.59^{d}	22.44±0.28^{e}	120.0±0.25^{b}	125.4±0.18^{b}	122.6±0.66^{b}
	16	62.33±0.36^{b}	53.50±0.17^{b}	56.72±0.68^{b}	72.39±0.35^{c}	91.72±0.21^{c}	87.19±0.25^{c}
	24	65.23±0.55^{a}	57.54±0.40^{a}	59.46±0.21^{a}	46.02±0.58^{d}	52.32±0.69^{d}	49.19±0.15^{d}
	32	52.72±0.18^{c}	34.56±0.12^{c}	43.68±0.51^{c}	34.45±0.08^{e}	42.76±0.09^{e}	36.32±0.87^{e}
	40	32.42±0.24^{d}	22.52±0.56^{de}	30.04±0.54^{d}	22.20±0.16^{f}	29.16±0.73^{f}	24.26±0.64^{f}
	48	26.61±0.36^{e}	15.22±0.43^{f}	22.49±0.25^{e}	12.80±0.65^{g}	16.74±0.24^{g}	15.42±0.52^{g}
กะช้ำ	0	2.97±0.42^{f}	2.56±1.12^{f}	3.19±0.84^{f}	177.4±0.11^{a}	179.8±0.48^{a}	173.3±0.11^{a}
รอบที่ 3	8	16.77±0.61^{d}	15.68±0.69^{cd}	17.27±0.12^{c}	162.6±0.14^{b}	166.2±0.27^{b}	155.9±0.26^{b}
	16	19.65±0.28^{c}	17.47±0.27^{b}	18.31±0.43^{b}	100.2±0.49^{c}	102.1±0.36^{c}	97.8±0.41^{c}
	24	25.70±0.61^{a}	20.31±0.97^{a}	22.27±0.58^{a}	57.22±0.67^{d}	58.69±0.24^{d}	55.26±0.73^{d}
	32	23.14±0.45^{b}	16.42±0.32^{c}	18.46±0.43^{b}	32.64±0.16^{e}	38.42±0.32^{e}	30.81±0.11^{e}
	40	16.26±0.62^{d}	12.48±0.67^{d}	14.62±0.15^{d}	28.61±0.64^{f}	32.84±0.45^{f}	26.47±0.25^{f}
	48	12.86±0.41^{e}	10.02±0.71^{e}	11.87±0.62^{e}	16.42±0.27^{g}	24.62±0.56^{g}	18.86±0.61^{g}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค16 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะช้ำ	0	1.39±0.02^{h}	1.07±0.03^{g}	1.15±0.04^{h}	226.8±0.03^{a}	229.5±0.02^{a}	227.1±0.01^{a}
รอบที่ 1	8	6.54±0.11^{g}	6.09±0.23^{f}	6.37±0.31^{g}	120.3±0.11^{b}	148.2±0.17^{b}	122.9±0.41^{b}
	16	10.67±0.36^{f}	8.60±0.49^{e}	9.28±0.68^{f}	88.52±0.52^{b}	94.55±0.63^{b}	92.74±0.19^{b}
	24	52.97±0.19^{e}	42.68±0.27^{d}	45.97±0.43^{e}	58.52±0.38^{d}	61.15±0.16^{d}	57.47±0.23^{d}
	32	80.02±0.38^{d}	66.16±0.33^{c}	70.69±0.35^{d}	49.93±0.16^{e}	50.22±0.49^{e}	49.22±0.18^{e}
	40	85.32±0.64^{cd}	70.71±0.75^{bc}	78.34±0.29^{c}	45.11±0.65^{ef}	46.97±0.53^{f}	42.86±0.79^{f}
	48	94.79±0.46^{a}	78.09±0.48^{a}	85.46±0.62^{a}	32.71±0.46^{f}	34.77±0.36^{g}	33.97±0.17^{g}
	56	90.19±0.28^{b}	77.40±0.53^{ab}	81.33±0.16^{b}	30.89±0.39^{g}	34.84±0.18^{g}	31.81±0.68^{h}
	64	87.67±0.42^{c}	76.69±0.21^{b}	78.42±0.27^{c}	27.91±0.32^{h}	34.17±0.31^{g}	32.38±0.34^{g}
	72	86.74±0.19^{c}	70.87±0.67^{bc}	74.92±0.84^{cd}	26.22±0.17^{i}	32.07±0.14^{h}	29.01±0.96^{i}
กะช้ำ	0	4.67±0.45^{g}	4.04±0.26^{g}	2.44±0.56^{g}	183.3±0.23^{a}	187.1±0.06^{a}	182.7±0.43^{a}
รอบที่ 2	8	35.94±0.34^{f}	30.38±0.42^{f}	32.03±0.19^{f}	120.3±0.13^{b}	129.7±0.25^{b}	122.5±0.51^{b}
	16	77.62±0.53^{b}	67.37±0.57^{b}	75.38±0.76^{b}	71.56±0.61^{c}	74.64±0.29^{c}	74.54±0.14^{c}
	24	84.56±0.39^{a}	72.33±0.30^{a}	81.67±0.23^{a}	36.74±0.29^{d}	39.39±0.15^{d}	38.40±0.09^{d}
	32	72.87±0.16^{c}	64.26±0.78^{c}	69.64±0.52^{c}	24.40±0.25^{e}	32.76±0.26^{e}	26.33±0.22^{e}
	40	61.27±0.34^{d}	51.42±0.43^{d}	60.83±0.63^{d}	18.63±0.56^{f}	28.83±0.14^{f}	25.14±0.63^{f}
	48	54.12±0.21^{e}	40.86±0.56^{e}	51.61±0.24^{e}	17.21±0.67^{g}	22.24±0.62^{g}	20.63±0.57^{g}
กะช้ำ	0	1.47±0.67^{g}	1.31±0.18^{g}	0.78±0.16^{f}	186.2±0.09^{a}	188.8±0.33^{a}	185.6±0.38^{a}
รอบที่ 3	8	24.71±0.18^{d}	20.56±0.64^{c}	20.11±0.71^{c}	167.5±0.63^{b}	162.9±0.34^{b}	164.4±0.46^{b}
	16	32.93±0.69^{b}	23.46±0.45^{b}	24.36±0.32^{b}	92.55±0.47^{c}	93.04±0.67^{c}	94.64±0.08^{c}
	24	36.67±0.21^{a}	27.08±0.86^{a}	33.05±0.08^{a}	53.32±0.76^{d}	54.18±0.10^{d}	54.84±0.59^{d}
	32	28.42±0.45^{c}	18.29±0.65^{d}	24.84±0.73^{b}	42.12±0.23^{e}	46.81±0.35^{e}	44.68±0.24^{e}
	40	19.60±0.48^{e}	15.41±0.27^{e}	17.38±0.26^{d}	34.28±0.64^{f}	39.32±0.62^{f}	37.42±0.52^{f}
	48	16.24±0.27^{f}	12.10±0.53^{f}	14.56±0.45^{e}	26.14±0.17^{g}	30.17±0.75^{g}	28.59±0.37^{g}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค17 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 240 กรัมต่อลิตร

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะซ้ำ	0	0.26±0.02^{h}	0.23±0.01^{g}	0.27±0.03^{i}	240.2±0.02^{a}	240.5±0.03^{a}	240.9±0.04^{a}
รอบที่ 1	8	6.58±0.13^{g}	4.82±0.50^{f}	5.69±0.18^{h}	144.4±0.81^{b}	148.5±0.46^{b}	145.1±0.23^{b}
	16	8.85±0.45^{f}	6.73±0.26^{e}	7.53±0.48^{g}	102.17±0.47^{c}	113.81±0.23^{c}	104.6±0.18^{c}
	24	37.86±0.16^{e}	32.56±0.61^{d}	35.48±0.25^{f}	78.47±0.78^{d}	84.04±0.04^{d}	82.70±0.59^{d}
	32	62.28±0.29^{d}	60.40±0.23^{c}	63.26±0.67^{d}	66.71±0.32^{e}	80.63±0.53^{e}	76.13±0.21^{e}
	40	66.25±0.79^{c}	62.73±0.43^{b}	64.43±0.52^{c}	60.34±0.67^{f}	76.26±0.22^{f}	68.65±0.56^{f}
	48	68.39±0.28^{a}	64.97±0.38^{a}	67.30±0.16^{a}	49.81±0.12^{g}	56.62±0.75^{g}	52.83±0.87^{g}
	56	68.10±0.32^{a}	62.84±0.27^{b}	66.42±0.10^{b}	42.49±0.08^{h}	48.96±0.26^{h}	44.75±0.14^{h}
	64	67.64±0.49^{b}	61.24±0.41^{bc}	63.65±0.39^{d}	38.61±0.56^{i}	42.29±0.38^{i}	40.44±0.48^{i}
	72	66.59±0.18^{c}	60.98±0.15^{c}	61.87±0.64^{e}	36.22±0.24^{j}	40.56±0.12^{j}	38.67±0.67^{j}
กะซ้ำ	0	3.03±0.34^{f}	2.39±0.28^{g}	2.43±0.73^{g}	187.4±0.59^{a}	194.1±0.18^{a}	182.6±0.26^{a}
รอบที่ 2	8	26.77±0.40^{d}	20.57±0.34^{e}	24.44±0.27^{f}	160.61±0.25^{b}	168.6±0.25^{b}	162.8±0.19^{b}
	16	44.33±0.67^{b}	36.79±0.87^{c}	40.09±0.60^{c}	82.48±0.69^{c}	99.84±0.37^{c}	88.79±0.45^{c}
	24	58.65±0.13^{a}	49.87±0.17^{a}	54.86±0.26^{a}	54.32±0.17^{d}	58.57±0.91^{d}	56.43±0.24^{d}
	32	43.87±0.38^{b}	42.66±0.22^{b}	42.69±0.71^{b}	42.14±0.29^{e}	46.66±0.54^{e}	44.82±0.34^{e}
	40	32.62±0.17^{c}	26.24±0.46^{d}	31.21±0.54^{d}	24.30±0.36^{f}	32.43±0.53^{f}	30.13±0.27^{f}
	48	22.40±0.56^{e}	16.62±0.37^{f}	19.65±0.23^{e}	19.60±0.24^{g}	24.31±0.65^{g}	26.94±0.18^{g}
กะซ้ำ	0	2.67±0.25^{g}	2.54±0.57^{g}	3.69±0.15^{g}	182.3±0.20^{b}	186.8±8.19^{b}	184.13±0.55^{b}
รอบที่ 3	8	19.10±0.51^{d}	14.50±0.85^{d}	16.87±0.21^{d}	170.6±0.02^{c}	174.2±0.67^{d}	171.9±0.17^{c}
	16	22.14±0.09^{c}	16.92±0.31^{b}	19.25±0.42^{b}	140.5±0.37^{e}	156.3±0.14^{g}	147.87±0.29^{f}
	24	26.64±0.10^{a}	17.36±0.94^{a}	21.68±0.31^{a}	60.97±0.23^{h}	76.70±0.10^{j}	68.16±0.83^{i}
	32	24.18±0.45^{b}	15.32±0.35^{c}	18.74±0.18^{c}	56.28±0.28^{h}	64.21±0.38^{j}	58.75±0.46^{i}
	40	17.43±0.36^{e}	11.84±0.26^{e}	15.92±0.57^{e}	42.83±0.75^{j}	58.72±0.74^{jk}	46.52±0.38^{m}
	48	14.16±0.25^{f}	9.41±0.47^{f}	12.46±0.46^{f}	34.19±0.46^{j}	45.68±0.28^{k}	38.26±0.57^{n}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค18 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะซ้ำ	0	3.11±0.02^{f}	2.38±0.02^{h}	2.34±0.04^{g}	206.1±0.06^{a}	206.8±0.05^{a}	205.4±0.04^{a}
รอบที่ 1	8	6.33±0.32^{e}	6.49±0.15^{g}	6.80±0.29^{f}	140.1±0.22^{b}	147.8±0.24^{b}	142.2±0.20^{b}
	16	8.99±0.18^{d}	8.27±0.38^{f}	8.04±0.12^{e}	92.51±0.78^{c}	98.63±0.56^{c}	94.23±0.34^{c}
	24	38.86±0.53^{c}	30.33±0.21^{e}	35.68±0.48^{d}	66.83±0.37^{d}	69.61±0.22^{d}	68.10±0.48^{d}
	32	64.24±0.75^{bc}	48.55±0.45^{d}	52.95±0.56^{cd}	60.03±0.82^{e}	64.69±0.75^{e}	62.79±0.89^{e}
	40	66.08±0.26^{b}	58.44±0.94^{b}	62.68±0.25^{b}	58.45±0.97^{f}	59.65±0.45^{f}	56.74±0.29^{f}
	48	68.90±0.47^{a}	62.50±0.34^{a}	66.60±0.39^{a}	40.60±0.15^{g}	46.63±0.36^{g}	42.03±0.07^{g}
	56	68.24±0.29^{a}	56.34±0.26^{bc}	63.27±0.45^{b}	39.89±0.32^{gh}	42.81±0.68^{h}	41.58±0.12^{gh}
	64	66.61±0.45^{b}	52.87±0.76^{c}	61.84±0.89^{bc}	38.32±0.64^{h}	41.13±0.21^{h}	40.14±0.24^{h}
	72	64.19±0.31^{bc}	48.52±0.55^{d}	55.81±0.26^{c}	37.96±0.56^{j}	40.41±0.58^{j}	38.96±0.76^{i}
กะซ้ำ	0	3.19±0.64^{g}	3.62±0.27^{g}	3.59±0.35^{f}	176.7±0.25^{a}	172.6±0.29^{a}	176.2±0.52^{a}
รอบที่ 2	8	45.68±0.46^{d}	42.02±0.42^{d}	41.85±0.41^{d}	122.4±0.12^{b}	128.6±0.18^{b}	125.4±0.27^{b}
	16	58.34±0.23^{b}	54.79±0.87^{b}	56.23±0.02^{b}	86.10±0.46^{c}	92.19±0.27^{c}	91.72±0.60^{c}
	24	64.07±0.69^{a}	58.30±0.08^{a}	61.51±0.87^{a}	46.91±0.18^{d}	59.19±0.39^{d}	52.32±0.77^{d}
	32	56.47±0.73^{c}	44.18±0.12^{c}	52.69±0.79^{c}	42.53±0.74^{e}	48.26±0.37^{e}	46.83±0.36^{e}
	40	42.53±0.42^{e}	36.65±0.43^{e}	40.63±0.67^{de}	38.65±0.26^{f}	42.31±0.64^{f}	39.42±0.76^{f}
	48	36.67±0.21^{f}	27.35±0.23^{f}	32.58±0.42^{e}	32.35±0.72^{g}	36.14±0.23^{g}	33.54±0.25^{g}
กะซ้ำ	0	3.90±0.09^{f}	3.74±0.53^{e}	3.47±0.13^{f}	178.8±0.17^{a}	178.3±0.31^{a}	179.8±0.25^{a}
รอบที่ 3	8	16.77±0.83^{de}	13.34±0.32^{c}	15.74±0.61^{d}	160.6±0.36^{b}	168.9±0.64^{b}	166.2±0.43^{b}
	16	18.65±0.41^{c}	15.15±0.43^{b}	17.44±0.24^{c}	100.89±0.67^{c}	108.8±0.11^{c}	102.1±0.38^{c}
	24	23.37±0.36^{a}	17.34±0.29^{a}	19.68±0.54^{a}	52.76±0.98^{d}	59.26±0.26^{d}	58.69±0.07^{d}
	32	20.12±0.45^{b}	15.32±0.25^{b}	18.02±0.26^{b}	46.38±0.63^{e}	50.21±0.51^{e}	48.27±0.26^{e}
	40	17.68±0.32^{d}	12.84±0.45^{cd}	15.22±0.37^{d}	34.66±0.74^{f}	44.58±0.44^{f}	37.43±0.76^{f}
	48	14.86±0.24^{e}	10.24±0.64^{d}	12.76±0.42^{e}	28.42±0.24^{g}	32.19±0.63^{g}	30.27±0.21^{g}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค19 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะช้ำ	0	1.11±0.02^{i}	0.82±0.09^{i}	0.99±0.03^{i}	226.6±0.02^{a}	222.3±0.01^{a}	229.1±0.09^{d}
รอบที่ 1	8	6.42±0.16^{h}	5.95±0.54^{h}	5.77±0.15^{h}	125.7±0.94^{b}	161.3±0.31^{b}	156.0±0.82^{b}
	16	9.98±0.09^{g}	8.14±0.17^{g}	8.74±0.37^{g}	94.56±1.61^{c}	103.6±0.82^{c}	100.9±0.23^{c}
	24	52.73±1.72^{f}	49.21±0.27^{f}	48.58±0.28^{f}	61.99±0.33^{d}	74.49±0.15^{d}	63.60±0.47^{d}
	32	77.45±4.94^{e}	64.26±0.82^{e}	68.43±0.49^{e}	52.89±0.53^{e}	56.11±0.35^{e}	53.55±0.22^{e}
	40	84.89±2.00^{c}	70.01±0.35^{d}	78.04±0.76^{c}	44.20±0.25^{f}	48.75±0.56^{f}	45.10±0.68^{f}
	48	90.36±3.87^{a}	78.39±0.47^{a}	83.13±0.34^{a}	32.09±0.39^{g}	37.21±0.25^{g}	34.65±0.39^{g}
	56	86.21±1.58^{b}	76.41±0.19^{ab}	80.80±0.46^{b}	30.39±0.21^{h}	35.70±0.43^{h}	32.41±0.26^{h}
	64	84.88±1.76^{c}	73.89±0.68^{c}	77.42±0.33^{c}	30.02±0.17^{h}	34.17±0.34^{hi}	32.92±0.15^{h}
	72	82.40±0.80^{d}	70.88±0.26^{d}	73.92±0.24^{d}	29.21±0.39^{i}	32.21±0.73^{i}	29.88±0.54^{i}
กะช้ำ	0	1.64±0.31^{g}	1.59±0.76^{g}	1.23±0.29^{g}	177.9±0.27^{a}	178.5±0.08^{a}	176.7±0.17^{a}
รอบที่ 2	8	52.95±2.21^{d}	40.10±0.08^{d}	46.33±0.61^{d}	128.0±0.28^{b}	134.1±0.18^{b}	130.6±0.61^{b}
	16	70.63±1.20^{b}	64.58±0.62^{b}	68.86±0.44^{b}	80.69±0.32^{c}	84.63±0.46^{c}	85.19±0.72^{c}
	24	82.70±1.18^{a}	69.30±0.56^{a}	74.68±0.23^{a}	44.87±0.56^{d}	48.66±0.13^{d}	46.66±0.48^{d}
	32	56.48±1.58^{c}	44.18±0.28^{c}	60.69±0.53^{c}	40.50±0.87^{e}	46.26±0.63^{e}	42.84±0.30^{e}
	40	44.62±0.34^{e}	38.61±0.14^{e}	41.85±0.62^{e}	30.17±0.32^{f}	35.64±0.36^{f}	32.42±0.67^{f}
	48	34.88±0.28^{f}	27.76±0.53^{f}	29.68±0.41^{f}	26.63±0.76^{g}	29.10±0.42^{g}	28.21±0.43^{g}
กะช้ำ	0	1.44±0.06^{f}	1.24±0.34^{g}	1.73±0.01^{f}	180.2±0.23^{a}	185.5±0.71^{a}	182.5±0.98^{a}
รอบที่ 3	8	23.78±0.65^{de}	17.29±0.42^{d}	19.18±0.21^{d}	162.5±0.45^{b}	169.1±0.11^{d}	164.1±0.56^{b}
	16	28.25±1.48^{c}	20.89±0.36^{b}	22.73±0.72^{b}	98.06±0.32^{c}	101.4±0.46^{c}	100.3±0.24^{c}
	24	31.35±1.41^{a}	23.11±0.14^{a}	24.43±0.38^{a}	58.36±0.18^{d}	72.96±0.51^{d}	64.96±0.41^{d}
	32	29.17±0.64^{b}	18.24±0.45^{c}	21.64±0.63^{c}	47.45±0.54^{e}	64.21±0.17^{e}	56.25±0.57^{e}
	40	24.43±0.32^{d}	15.38±0.22^{e}	18.81±0.96^{de}	36.82±0.62^{f}	52.38±0.61^{f}	48.63±0.32^{f}
	48	18.61±0.28^{e}	12.45±0.46^{f}	16.36±0.31^{e}	27.32±0.43^{g}	46.67±0.74^{g}	37.71±0.73^{g}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค20 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากวัชพืชน้ำของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยชานอ้อย ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 240 กรัมต่อลิตร

เวลา		ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะชั้ำ	0	1.82±0.04^{i}	2.38±0.06^{j}	2.24±0.03^{i}	240.2±0.05^{a}	242.3±0.04^{a}	241.8±0.06^{a}
รอบที่ 1	8	6.35±0.67^{h}	5.36±0.28^{f}	5.79±0.17^{h}	156.9±0.17^{b}	158.3±0.45^{b}	157.4±0.41^{b}
	16	9.22±0.34^{g}	6.70±0.11^{e}	8.24±0.37^{g}	99.24±0.23^{c}	103.6±0.18^{c}	102.2±0.15^{c}
	24	30.75±0.17^{f}	18.87±0.56^{d}	27.07±0.28^{f}	72.62±0.55^{d}	84.49±0.40^{d}	80.84±0.38^{d}
	32	56.85±0.45^{e}	53.18±0.49^{b}	54.39±0.26^{e}	64.36±0.28^{e}	72.11±0.24^{e}	66.82±0.26^{e}
	40	62.02±0.12^{c}	56.92±0.25^{ab}	58.68±0.09^{c}	54.71±0.31^{f}	60.75±0.31^{f}	59.03±0.73^{f}
	48	68.43±0.40^{a}	58.60±0.35^{a}	62.03±0.11^{a}	44.57±0.43^{g}	47.21±0.56^{g}	46.72±0.24^{g}
	56	66.08±0.23^{b}	57.91±0.46^{ab}	60.20±0.23^{b}	42.32±0.38^{h}	45.70±0.24^{h}	42.80±0.44^{h}
	64	62.41±0.15^{c}	54.60±0.22^{b}	58.56±0.31^{c}	34.70±0.19^{i}	38.17±0.34^{i}	36.04±0.27^{i}
	72	60.60±0.48^{d}	52.18±0.18^{c}	56.97±0.73^{d}	30.21±0.22^{j}	34.21±0.68^{j}	32.63±0.56^{j}
กะชั้ำ	0	3.19±0.05^{f}	2.60±0.93^{g}	2.87±0.39^{g}	179.4±0.36^{a}	178.5±0.46^{a}	179.5±0.17^{a}
รอบที่ 2	8	44.13±0.66^{c}	37.15±0.78^{c}	42.09±0.57^{c}	128.3±0.64^{b}	135.1±0.07^{b}	130.8±0.28^{b}
	16	52.47±0.22^{b}	44.84±0.53^{b}	50.62±0.34^{b}	78.41±0.93^{c}	88.63±0.48^{c}	82.92±0.19^{c}
	24	58.94±0.13^{a}	47.77±0.21^{a}	56.43±0.21^{a}	40.42±0.46^{d}	46.66±0.57^{d}	44.51±0.49^{d}
	32	44.27±0.31^{c}	32.48±0.78^{e}	42.48±0.61^{c}	32.30±0.30^{e}	38.26±0.66^{e}	36.83±0.25^{e}
	40	36.15±0.24^{d}	23.76±0.32^{e}	32.54±0.67^{d}	26.21±0.23^{f}	30.34±0.64^{f}	28.62±0.54^{f}
	48	28.75±0.56^{e}	17.82±0.45^{f}	26.65±0.86^{e}	18.44±0.12^{g}	24.68±0.32^{g}	22.25±0.76^{g}
กะชั้ำ	0	2.79±0.86^{g}	1.74±0.45^{f}	2.69±0.26^{f}	182.2±0.47^{a}	181.3±0.38^{a}	180.2±0.31^{a}
รอบที่ 3	8	18.17±0.57^{c}	10.10±0.50^{d}	16.27±0.09^{c}	168.3±0.62^{b}	164.5±0.73^{b}	162.7±0.67^{b}
	16	22.61±0.14^{b}	12.46±0.29^{c}	20.04±0.27^{b}	110.4±0.20^{c}	128.4±0.16^{c}	123.8±0.18^{c}
	24	28.23±0.08^{a}	16.67±0.63^{a}	24.83±0.52^{a}	65.94±0.69^{d}	75.65±0.23^{d}	67.76±0.42^{d}
	32	17.54±0.23^{d}	14.28±0.26^{b}	16.81±0.28^{c}	52.38±0.16^{e}	64.39±0.15^{e}	58.42±0.27^{e}
	40	15.82±0.46^{e}	10.92±0.75^{d}	13.48±0.34^{d}	41.72±0.21^{f}	56.16±0.36^{f}	46.61±0.31^{f}
	48	12.94±0.56^{f}	8.69±0.16^{e}	11.26±0.82^{e}	30.24±0.63^{g}	45.27±0.28^{g}	34.87±0.24^{g}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค21 อัตราการเกิดเอทานอล (Q_p) และผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) สูงสุด และประสิทธิภาพการหมักของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 หมักในถังหมักแบบแพคเบด ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมงต่อรอบ

ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น	หมักแบบกะซ้ำ (จำนวนรอบ)	วัสดุตรึง	Qp (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)			Yp/s (กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ)			ประสิทธิภาพการหมัก (%)		
			ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
200 กรัม/ลิตร	รอบที่1	อัลจิเนต	1.49^{b}	1.44^{b}	1.46^{b}	0.36^{a}	0.34^{a}	0.35^{a}	70.29^{a}	67.58^{a}	68.92^{a}
		ชานอ้อย	1.44^{b}	1.30^{b}	1.39^{b}	0.34^{a}	0.31^{a}	0.33^{a}	67.55^{ab}	61.28^{a}	65.30^{a}
	รอบที่2	อัลจิเนต	2.72^{a}	2.40^{a}	2.48^{a}	0.33^{a}	0.29^{b}	0.30^{a}	63.95^{b}	56.42^{b}	58.30^{b}
		ชานอ้อย	2.67^{a}	2.43^{a}	2.56^{a}	0.32^{a}	0.29^{b}	0.31^{a}	62.81^{b}	57.15^{b}	60.30^{ab}
	รอบที่3	อัลจิเนต	1.07^{c}	0.85^{c}	0.93^{c}	0.13^{b}	0.10^{c}	0.11^{b}	25.20^{c}	19.91^{c}	21.83^{c}
		ชานอ้อย	0.97^{c}	0.72^{c}	0.82^{c}	0.12^{b}	0.09^{c}	0.10^{b}	22.91^{cd}	17.00^{c}	19.29^{c}
220 กรัม/ลิตร	รอบที่1	อัลจิเนต	1.97^{b}	1.63^{b}	1.78^{b}	0.43^{a}	0.35^{a}	0.39^{a}	84.48^{a}	69.60^{a}	76.17^{a}
		ชานอ้อย	1.88^{b}	1.63^{b}	1.73^{b}	0.41^{a}	0.36^{a}	0.38^{a}	80.53^{a}	69.86^{a}	74.09^{a}
	รอบที่2	อัลจิเนต	3.52^{a}	3.01^{a}	3.40^{a}	0.38^{b}	0.33^{a}	0.37^{a}	75.37^{b}	64.46^{ab}	72.79^{ab}
		ชานอ้อย	3.45^{a}	2.89^{a}	3.11^{a}	0.38^{b}	0.31^{ab}	0.34^{ab}	73.70^{b}	61.76^{ab}	66.56^{b}
	รอบที่3	อัลจิเนต	1.53^{c}	1.13^{c}	1.38^{c}	0.17^{c}	0.12^{b}	0.15^{b}	32.68^{c}	24.13^{b}	29.46^{c}
		ชานอ้อย	1.31^{c}	0.96^{c}	1.02^{c}	0.14^{c}	0.11^{b}	0.11^{b}	27.94^{cd}	20.60^{b}	21.77^{d}

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค21 (ต่อ)

ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น	หมักแบบกะซ้ำ (จำนวนรอบ)	วัสดุตรึง	Qp (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)			Yp/s (กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ)			ประสิทธิภาพการหมัก (%)		
			ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
240 กรัม/ลิตร	รอบที่1	อัลจิเนต	1.42^{b}	1.35^{b}	1.40^{b}	0.28^{a}	0.27^{a}	0.28^{a}	55.88^{a}	53.08^{a}	54.98^{a}
		ชานอ้อย	1.43^{b}	1.22^{b}	1.29^{bc}	0.29^{a}	0.24^{ab}	0.26^{a}	55.91^{a}	47.88^{ab}	50.68^{ab}
	รอบที่2	อัลจิเนต	2.44^{a}	2.08^{a}	2.29^{a}	0.24^{a}	0.21^{ab}	0.23^{a}	47.92^{b}	40.74^{b}	44.82^{b}
		ชานอ้อย	2.46^{a}	1.99^{a}	2.35^{a}	0.25^{a}	0.20^{ab}	0.24^{a}	48.15^{b}	39.03^{b}	46.11^{b}
	รอบที่3	อัลจิเนต	1.11^{c}	0.72^{c}	0.89^{c}	0.11^{b}	0.07^{b}	0.09^{b}	21.76^{c}	14.19^{c}	17.38^{c}
		ชานอ้อย	1.18^{c}	0.69^{c}	1.03^{c}	0.12^{b}	0.07^{b}	0.10^{b}	23.07^{c}	13.62^{c}	20.29^{c}

หมายเหตุ: a,b,c,... ในแนวตั้งเป็นค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวัดความขุ่นเซลล์ (OD660 nm) ของ *C. shehatae* TISTR ในกระบวนการหมักเอทานอล

ตารางผนวกที่ ค22 ค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าความขุ่นเซลล์(OD660 nm) เซลล์อิสระของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะ

เวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นเซลล์ (OD660 nm)		
	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	1.40	1.36	1.45
6	1.90	1.80	1.98
12	11.50	9.50	10.30
18	15.10	12.10	14.63
24	16.10	13.60	15.28
30	15.90	12.40	14.68
36	15.60	11.60	13.81
42	15.10	11.50	13.64
48	14.70	10.50	12.85
54	14.20	9.90	12.78
60	13.20	8.80	11.67

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค23 ค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าความขุ่นเซลล์(OD660 nm) เซลล์อิสระของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะ โดยให้ปริมาตรน้ำตาลเริ่มต้นที่100 มิลลิลิตร และเติมน้ำตาลครั้งเดียวชั่วโมงที่ 12 ปริมาตร100 มิลลิลิตร(100:100)

เวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นเซลล์ (OD660 nm)		
	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	2.25	2.40	2.05
6	4.38	3.02	3.63
8	8.02	5.47	7.78
12	14.44	8.26	13.67
12	3.53	1.76	2.51
18	10.83	6.23	9.68
24	12.33	9.54	11.64
30	11.12	8.04	10.18
36	10.29	7.36	9.46

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค24 ค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าความขุ่นเซลล์(OD660 nm) เซลล์อิสระของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกึ่งกะโดยให้ปริมาตรน้ำตาลเริ่มต้นที่100 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลสองครั้งเติมอาหารสองครั้ง ที่ชั่วโมง 6 และ12 คือ (50:50) และ(60:40)

เวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นเซลล์ (OD660 nm) (100:50:50)			ค่าความขุ่นเซลล์ (OD660 nm) (100:60:40)		
	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	2.20	2.12	1.98	2.24	2.20	2.17
6	4.35	3.29	3.40	4.97	3.75	4.52
6	2.60	1.83	2.23	2.57	1.96	2.41
8	8.64	6.65	7.68	9.30	6.78	8.25
12	14.70	10.18	12.93	15.34	12.81	14.28
12	4.26	2.42	3.58	4.74	2.80	3.66
18	10.60	7.56	9.55	16.12	10.50	14.87
24	12.30	7.94	10.50	17.61	11.18	16.75
30	11.40	7.62	10.20	16.78	10.92	15.06
36	10.50	8.05	10.01	16.17	10.37	15.58

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค25 ค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าความขุ่นเซลล์(OD660 nm) เซลล์อิสระของ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการหมักแบบกะซ้ำ

เวลา (ชั่วโมง)		ค่าความขุ่นเซลล์ (OD660 nm)		
		ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
กะซ้ำ	0	0.84	0.71	0.55
รอบที่	8	3.43	2.06	3.28
	12	6.82	4.85	6.33
	24	10.24	7.42	9.56
	32	8.84	6.24	7.24
	36	5.75	6.42	6.26
กะซ้ำ	0	8.21	4.33	5.23
รอบที่	12	9.72	6.67	7.43
	24	10.31	7.47	9.58
กะซ้ำ	0	11.60	6.87	8.52
รอบที่	12	9.18	5.64	7.44
	24	7.26	6.80	6.62
กะซ้ำ	0	6.78	5.12	5.58
รอบที่	12	10.83	7.79	8.64
	24	8.74	6.85	7.71
กะซ้ำ	0	9.24	6.61	8.67
รอบที่	12	9.78	5.56	7.78
	24	10.57	7.46	8.88

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค26 การคิดคำนวณต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ

วัตถุดิบ/สารเคมี	ราคา บาท/ กรัม	ผักตบชวา ปริมาณที่ใช้ (กรัม)	จอกน้ำ ปริมาณที่ใช้ (กรัม)	ธูปฤาษี ปริมาณที่ใช้ (กรัม)
ขั้นตอนปรับสภาพ		20	20	20
1. โซเดียมไฮดรอดไซด์ (NaOH)	0.31	0.10	0.10	0.10
2.กรดไฮโดรคลอริก (1M HCl) (mL)	0.09	0.04	0.04	0.04
ขั้นตอนการไฮโดรไลซีส				
1.เอนไซม์เซลลูเลส (บาท/ลิตร)	0.09	0.0005	0.0005	0.0005
2.เอนไซม์ไซลาเนส (บาท/ลิตร)	0.26	0.0013	0.0013	0.0013
ขั้นตอนการหมัก				
1. yeast extract	2.42	0.10	0.10	0.10
2. แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH4)_2SO_4$	0.18	0.20	0.20	0.20
3. โพแทสเซียมไดโฮโดรเจน ฟอสเฟต(KH_2PO_4)	0.95	0.05	0.05	0.05
4. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.22	0.10	0.10	0.10
รวมราคาสารเคมี		**0.38**	**0.38**	**0.38**
ปริมาตรเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร/ตัน)		**38.70**	**27.28**	**31.94**
ต้นทุนการผลิต (บาท/ลิตร)		**9.89**	**14.03**	**11.98**
ประสิทธิภาพการหมักเอทานอล (%)		80.38	43.45	60.28
ความเข้มข้นเอทานอล (กรัม/ลิตร)		7.54	6.15	7.12
เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)		24	24	24

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค27 กลุ่มพืชที่ใช้ชีวมวลเหนือดินทั้งหมด เป็นวัตถุดิบผลิตพลังงาน

ลำดับที่	ชนิดพืช	อายุการเก็บเกี่ยว (เดือน)	รอบเก็บเกี่ยวผลผลิต (ครั้งต่อปี)	ส่วนเหนือดินทั้งหมด		สัดส่วนมวลแห้ง	สัดส่วน	สัดส่วน
				มวลสด (ตัน/ไร่/ปี)	มวลแห้ง (ตัน/ไร่/ปี)	ต่อมวลสด (%)	เซลลูโลส (%มวลแห้ง)	ลิกนิน (%มวลแห้ง)
1	อ้อยป่า NRCT 01-2	12	1	60.58	20.47	33.8	42.05	8.64
2	อ้อยปลูก ROC24	12	1	46.57	20.61	44.3	37.08	7.5
3	ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	4	2	-	11.51	-	26.93	13.06
4	ข้าวฟ่างหวาน	3	2	25.34	7.21	28.5	34.01	16.09
5	มันสำปะหลัง	10	1	4.33	1.58	36.6	-	-
6	หญ้าเนเปียร์	2	6	43.28	6.51	15.1	-	-
7	ผักตบชวา	4	3	148.56	11.83	8	31.58	4.38
8	จอกน้ำ	3	4	60.25	4.3	7.1	20.91	5.4
9	ธูปฤาษี	12	1	15.01	4.04	26.9	39.59	12.23

ที่มา: พรชัย และคณะ (2555)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวสุจิตรา รอดหมวน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	31 ธันวาคม 2530
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประวัติการทำงาน	2552-2554: นักวิทยาศาสตร์ หน่วยงานหมักส่า บริษัทไทยแอลกอฮอล์ จำกัด (มหาชน) 2548-2549: พนักงานตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ และจัดทำบัญชีวัตถุดิบการผลิต บริษัท ส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องราชบุรี จำกัด
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์