



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอทานอลจากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันโดยเชื้อผสมที่คัดเลือก

Mixed cultures of palm kernel meal for ethanol production by
selected microorganisms

คณะนักวิจัย

ผศ.ดร. นิสา แซ่หลี่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

ประจำปีงบประมาณ 2558 สัญญารับทุนเลขที่ WU58122

การผลิตเอทานอลจากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันโดยเชื้อผสมที่คัดเลือก

Mixed cultures of palm kernel meal for ethanol production by selected
microorganisms

คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

ชื่อ-สกุล : ผศ. ดร. นิสา แซ่หลี่

หน่วยงาน : สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ที่อยู่ : มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

โทรศัพท์ : 075-672365, 086-9425366 โทรสาร: 075-672302

E-mail address : snisa@wu.ac.th

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ดำเนินได้ด้วยการได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน 2558 จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และความร่วมมือจาก ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่คอยให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน ตลอดจนความร่วมมือจากผู้ช่วยวิจัยทุกท่าน

จึงขอขอบคุณทุก ๆ หน่วยงานเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผศ.ดร.นิสา แซ่หลี

หัวหน้าโครงการ

กันยายน 255

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญ	ii
สารบัญรูป	iii
สารบัญตาราง	iv
บทคัดย่อ	v
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	2
วิธีการทดลอง	5
ผลการทดลองและวิจารณ์	8
สรุปผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	20

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันก่อน (a) และหลัง (b) การสกัดด้วยเฮกเซน	8
2	การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ <i>Aspergillus niger</i> และ Yeast Hmi 194 โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control	8
3	การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ <i>Aspergillus oryzae</i> และ Yeast Hmi 194 โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control	9
4	การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ <i>Trichoderma</i> sp. และ Yeast Hmi 194 โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control	10
5	การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ <i>Penicillium</i> sp. และ Yeast Hmi 194 โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control	11
6	การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ <i>Monascus</i> sp. และ Yeast Hmi 194 โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control	12
7	Main effects plot for means	16

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่า % Conversion สูงสุด ของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออก เมื่อทำการหมักแบบ One-step co-culture system ร่วมกับ Yeast Hmi ๑๙๔ ร่วมกับเชื้อต่างๆ	13
2	Response table for mean	16
3	แสดงค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก เมื่อออกแบบการหมักด้วย Taguchi Design L๒๗	17
4	แสดงค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก เมื่อทดสอบการหมักแบบ two stage co-culture โดยเชื้อ <i>A. oryzae</i> และยีสต์ทนร้อน Hmi ๑๙๔	19

การผลิตเอทานอลจากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันโดยเชื้อผสมที่คัดเลือก
Mixed cultures of palm kernel meal for ethanol production by selected
microorganisms

บทคัดย่อ

ผลการทดสอบหมักกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันและย่อยด้วยกรด การทดสอบพบว่า การหมักร่วมระหว่าง *Aspergillus niger* และยีสต์ทนร้อน Hmi 194 แบบ One-step co-culture system เมื่อใช้อาหารที่ไม่ผ่านการเจือจาง ที่สภาวะที่ทดสอบ pH 5.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติมน้ำอาหารและเอนไซม์ hemicellulase พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดและให้เอทานอลสูงสุด 97.04 % ของค่าตามทฤษฎี

คำสำคัญ (keywords) : ethanol, co-culture fermentation

การผลิตเอทานอลจากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันโดยเชื้อผสมที่คัดเลือก

Mixed cultures of palm kernel meal for ethanol production by selected microorganisms

1. บทนำ

เอทานอล (Ethanol) เป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญยิ่ง นอกจากให้พลังงานแล้วยังจัดเป็นเชื้อเพลิงสะอาด อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในประเทศไทยปัจจุบันใช้น้ำตาลและแป้งเป็นหลักเป็นวัตถุดิบหลัก แนวทางการผลิตเอทานอลต้นทุนต่ำ นิยมใช้วัสดุเหลือทิ้ง เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว แกลบ ชี้อ้อย กากและเปลือกเมล็ดปาล์มน้ำมัน ต่างๆ ซึ่งมีราคาถูกและมีปริมาณสูง อย่างไรก็ตามการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวต้องประสบปัญหาต้นทุนสูงจากเทคโนโลยีการพรีทรีทเมนต์ ผลได้เอทานอลตามทฤษฎี (Theoretical Yield) ต่ำ และส่วนประกอบที่ได้จากการย่อยสลายประกอบ lignocellulosic materials เหล่านี้ยังมีส่วนผสมสารยับยั้งหลายชนิด เช่น furfural ปะปนมากับ hydrolysate product ทำให้การหมักเพื่อให้เกิดเอทานอลต้องประสบปัญหา การทดลองนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกที่ทนต่อสภาวะอุณหภูมิสูงและทนต่อสภาวะของสารเคมียับยั้งดังกล่าวแทนการใช้สายพันธุ์ยีสต์นำเข้าเพื่อผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม จะช่วยให้ประหยัดต้นทุนและประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลดีขึ้น การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม เช่น กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน (palm kernel meal) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์ม มาใช้เป็นวัตถุดิบในการทดสอบการผลิตเอทานอลจึงน่าสนใจเนื่องจากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน ประกอบด้วยแหล่งสารอาหารปริมาณสูง เช่น mannan, xylan, cellulose, protein, minerals และสารอื่นๆ จากคุณสมบัติดังกล่าวเมื่อผ่านการพรีทรีทเมนต์ จะให้ส่วนประกอบหลักเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ mannose, xylose, glucose และน้ำตาลอื่นๆ ซึ่งเหมาะที่จะนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้ในการหมักของเชื้อที่ผลิตเอทานอลได้ โดยทั่วไปแล้วการผลิตเอทานอลนิยมใช้ยีสต์ในการหมัก ยีสต์หลายสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตเอทานอล เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Candida tropicalis* อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์ต่างๆ ไป เหล่านี้ไม่สามารถหมัก hydrolysates ที่ได้จากการย่อยลิกโนเซลลูโลสได้หมด เนื่องจากขาดความสามารถในการย่อยและใช้น้ำตาลบางชนิด เช่น C5 และการไม่ทนสภาวะจำกัด เช่น สารยับยั้ง บางชนิด ดังนั้น การพัฒนาเทคนิคการหมักร่วมของเชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าว จะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล จาก lignocellulosic materials ดีขึ้น โดยเชื้อราหลายชนิด เช่น *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monilia* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสได้ แต่พบว่าผลได้เอทานอลค่อนข้างต่ำ ดังนั้นแนวทางการใช้เชื้อผสมในการหมักร่วมระหว่างเชื้อราและยีสต์ที่คัดเลือก จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอลได้ดียิ่งขึ้น

2. วัตถุประสงค์

2.1 นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอลในสภาวะอะโปโอดิก เช่น การทนอุณหภูมิสูง และการทนสารยับยั้ง มาทดสอบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลร่วมกับเชื้ออื่นๆ เช่น เชื้อรา โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นวัตถุดิบอันเป็นตัวแทนหนึ่งสำหรับวัตถุดิบเซลลูโลสที่มีราคาถูกที่มีส่วนประกอบของน้ำตาล C5 และ C6

2.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการหมักร่วมของเชื้อ โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน เป็นวัตถุดิบ เพื่อศึกษาแนวทางเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจาก lignocellulosic materials

2.3 ศึกษาผลได้เอทานอลในการหมักร่วม ที่สภาวะต่างๆ ที่ทดสอบ

3. การตรวจเอกสาร

เอทานอล (Ethanol) จัดเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอันดับหนึ่ง แทนพลังงานฟอสซิลจากธรรมชาติ เนื่องจากเอทานอลนอกจากจะให้พลังงานแล้วยังจัดเป็นเชื้อเพลิงสะอาด ปัจจุบันประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ของเอทานอลที่ใช้อยู่ มาจากกระบวนการหมัก อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล ประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์ นิยมใช้วัตถุดิบน้ำตาลจากอ้อย และ beet root ที่เหลือ 39 เปอร์เซ็นต์ นิยมใช้แป้งจากธัญพืชต่างๆ เช่น เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวเจ้า เป็นต้น เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบแป้งและน้ำตาล มีการศึกษาและใช้กันอย่างแพร่หลาย เรียกว่า เทคโนโลยีพร้อมใช้ ซึ่งมีกระบวนการง่าย ๆ เริ่มจาก การนำวัตถุดิบ มาผ่านการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาล จากนั้นผ่านกระบวนการหมักด้วยยีสต์แล้วผ่านกระบวนการแยกโดยการกลั่น และทำให้บริสุทธิ์ เพื่อให้ได้ เปอร์เซ็นต์เอทานอลสูงๆ ถึง 95-100 เปอร์เซ็นต์

สำหรับประเทศไทย วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เช่น แป้ง น้ำตาลทราย มีจำกัด และถูกนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ มากกว่า ดังนั้นการหันมาสนใจนำวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic materials) ที่มีปริมาณมากและมีราคาต้นทุนถูกกว่ามาใช้ในการผลิตเอทานอล เช่น ชานอ้อย รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า ชังและเปลือกข้าวโพด ฟางข้าว ชี้เลื่อย แกลบ เปลือกต้นสาकु กากมะพร้าว เปลือกกล้วย เปลือกแอปเปิ้ล และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน จึงจัดเป็นแหล่งวัตถุดิบที่น่าสนใจในการผลิตเอทานอลต้นทุนต่ำ

แนวทางหนึ่งในการนำกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน(Palm kernel meal; PKM) จัดเป็นวัสดุเหลือใช้ (by-product) ที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญในการผลิตเอทานอลและเป็นตัวแทนของแหล่งวัตถุดิบที่มีส่วนประกอบของน้ำตาล C5 และ C6 นอกจากนี้ยังประกอบด้วยแหล่งธาตุอาหารที่สำคัญและพลังงานที่จำเป็นสำหรับใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ การศึกษาพบว่ากากเนื้อเมล็ดในปาล์ม มี

ส่วนประกอบทางโภชนาการสูง เช่น โปรตีน เยื่อใย ไขมัน เถ้า ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรก แคลเซียม และ ฟอสฟอรัส อยู่ในช่วง 89.82-94.85, 13.51-16.63, 15.11-17.06, 9.68-23.77, 42.68-53.42, 0.18-0.31 และ 0.50-0.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด เช่น กรดอะมิโนไลซีน เมไทโอนีน ทรีโอนีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน วาลีน ฮิสติดีน อาร์จินีน และเฟนิลอะลานีน พบในปริมาณ 0.42, 0.22, 0.51, 0.82, 0.49, 0.66, 0.35, 0.81 และ 0.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ยังพบว่าส่วนประกอบของกากเนื้อเมล็ดในปาล์มมีโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (Non starch polysaccharide, NSP) ประมาณ 60-74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง 78 เปอร์เซ็นต์ของส่วนนี้จะอยู่ในรูปแบบแนน ที่เหลือจะพบในรูปแบบอื่น ๆ เช่น เซลลูโลส และ xylan ประมาณ 12 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Choct, 2001)

อย่างไรก็ตามการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้จาก lignocellulosic materials ต้นทุนการผลิตยังสูงเมื่อเทียบกับราคาต้นทุนการผลิตแก๊สโซลีน เนื่องจากเป็นวัตถุดิบ ค่อนข้างจำกัด การนำไปใช้งานโดยตรงทำได้ยาก ต้องประสบปัญหาสำคัญๆ เช่น เมื่อนำมาผ่านการ pretreatment เนื่องจากเซลลูโลส ยังประกอบด้วยส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ ที่ไม่ใช่แป้ง ทำให้ทำให้มีสารยับยั้งอื่นๆ ปะปนมา ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเชื้อต่างๆไป ที่ใช้ในการหมักเอทานอล นอกจากนี้ ส่วนประกอบที่ได้จากการย่อย (Hydrolysate products) นอกเหนือจากเป็นแหล่งน้ำตาลตั้งต้นที่เป็นน้ำตาล C6 เช่น glucose, fructose ที่เชื้อยีสต์ต่างๆไป เช่น *Saccharomyces cerevisiae* สามารถนำไปใช้ได้ดีแล้ว ยังประกอบด้วยน้ำตาลที่มี C5 เช่น xylose ซึ่งเป็นปัญหาในการนำไปหมักโดยเชื้อส่วนใหญ่ (Olsson and Gahn-Hagerdal, 1996) หากสามารถคิดค้นหาวิธีการนำสารตั้งต้นดังกล่าวมาใช้ได้โดยตรง จะช่วยให้เกิดความคุ้มค่าเป็นอย่างมาก แนวทางในการแก้ไขปัญหา คือ พัฒนาระบบการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดังกล่าว หรือพัฒนาเทคนิคการหมักเพื่อให้สามารถแก้ไขปัญหการถูกยับยั้งจากสารยับยั้งขณะเดียวกันก็ให้สามารถนำน้ำตาล C5 และ C6 มาใช้ได้

การผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักสามารถทำได้โดยเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Candida* sp., *Pichia* sp. (Yu and Zhang, 2003) ซึ่งการผลิตแอลกอฮอล์ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาล ความเข้มข้นของเอทานอล ปริมาณออกซิเจน ความเป็นกรดต่าง และสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ (Cheung and Anderson, 1997, Sun and Cheng, 2002) และความสามารถในการใช้น้ำตาลของยีสต์ ปัจจุบันการใช้เทคนิคการหมัก เช่น simultaneous saccharification and fermentation (SSF) มาใช้ในการหมัก ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้นและยังช่วยลดต้นทุนและพลังงานในขั้นตอนการกลั่นอีกด้วย (Ohgren et al., 2006)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษานำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ได้นำมาใช้เพื่อศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ แบคทีเรีย และเชื้อรา สำหรับการผลิตเอทานอลเช่น การพัฒนาเชื้อที่สามารถหมักน้ำตาล C5 ได้ (Olsson and Gahn-Hagerdal, 1996) การพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง *Hansenula*

polymorpha ให้สามารถใช้วัตถุดิบได้ทั้งแป้งและไซแลน (Voronovsky et al., 2009) การนำยีนส์ α -amylase และ ยีนส์ glucoamylase ใส่ใน *S. cerevisiae* (Yamada et al., 2009) การนำยีนส์ที่ผลิตเอนไซม์ glucoamylase จาก *Rhizopus oryzae* ใส่ใน *S. cerevisiae* Kyokai no.7 (Kosugi et al., 2009) เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด อย่างไรก็ตามถึงแม้จะได้เชื้อที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นในการผลิตเอทานอล ปัจจุบันก็ยังไม่มียีสต์ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลจาก lignocellulosic material เนื่องจากผลได้เอทานอลยังค่อนข้างต่ำ เช่น เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบ จะให้ผล 83 % ของผลได้เอทานอลตามทฤษฎี เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 21 ชั่วโมง (Palmarola-Adrados et al., 2005) Gupta et al., 2009 ศึกษาการผลิตเอทานอลจากไม้เนื้อแข็ง โดยหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis*-NCIM 3498 ได้ผลได้ 0.39 และ 0.49 g/g ของผลได้เอทานอลตามทฤษฎี ตามลำดับ เนื่องจากมีสารยับยั้งเช่น hydroxymethyl furfural และ furfural เกิดขึ้น

จะเห็นได้ว่าปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้การผลิตเอทานอลลดลงเนื่องจาก สภาพการหมักไม่เหมาะสม หรือเกิด สภาพกดดัน (stress environment) เช่น สัดส่วนสารอาหาร สัดส่วนคาร์บอน-ไนโตรเจนไม่เหมาะสม อุณหภูมิเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนความเป็นกรดต่างระหว่างการหมัก เชื้อที่ใช้ในการหมักไม่ทนปริมาณเอทานอล ที่สูงหรือเกิด สภาพกดดันอื่นๆ ที่เปลี่ยนแปลงไป ที่มีผลต่อคุณสมบัติของเชื้อที่ใช้ในการหมัก ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลลดลง และการจะหาเชื้อที่มีมากคุณสมบัติทุกประการที่กล่าวถึง ปัจจุบันยังไม่สามารถทำได้

ดังนั้นแนวทางการใช้เชื้อผสมจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการผลิตเอทานอลจาก lignocellulosic materials เช่น การใช้เชื้อที่ทนอุณหภูมิสูงร่วมกับเชื้อที่ทนต่อสารยับยั้งและสามารถหมักน้ำตาล C5 และ C6 ได้ จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการผลิตเอทานอลจาก lignocellulosic material อันจะมีประโยชน์ในการที่พัฒนากระบวนการหมักเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจาก lignocellulosic materials ต่อไปในอนาคต

4. วิธีการทดลอง

4.1 เชื้อจุลินทรีย์

4.1.1 เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. และ *Monascus* sp.

4.1.2 ยีสต์ที่ได้จากการคัดเลือก เป็นยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ Yeast Hmi 194

4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ Yeast Hmi 194

โดยนำเชื้อดังกล่าวจาก stock culture จากๆ ถ่ายลง MM agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เก็บไว้เป็น stock culture สำหรับการทดสอบต่อไป

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ ยีสต์ Hmi 194 สำหรับการหมัก โดยถ่ายเชื้อจาก MM agar slant ลงในอาหาร YM Broth บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.2.2 การเตรียม Spore Suspension ของเชื้อราที่ทดสอบ

ถ่ายเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. และ *Monascus* sp. ที่คัดเลือกจาก stock culture ลงบนอาหาร PDA agar plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเกิด spore ประมาณ 5-7 วัน ชูด spore และนับจำนวนด้วย Haemocytometer จากนั้น ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1.0×10^6 spores/ml โดยใช้ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เตรียมไว้สำหรับเป็นหัวเชื้อ

4.3 การเตรียมกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน

ในการทดลองใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน (Palm Kernel Press Cake) โดยนำตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน นำมาผ่านการบดด้วยเครื่องบด จากนั้นทำการวิเคราะห์ไขมัน และความชื้น แล้วทำการสกัดตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน ด้วย Hexane ที่อุณหภูมิ 40 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง และผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้ในถุงพลาสติก เป็นตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

4.4 การย่อยกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสกัดไขมัน (Palm Kernel Press Cake)

เตรียมตัวอย่าง โดยย่อยกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสกัดไขมัน โดยทำการทดสอบย่อยด้วยกรด sulfuric acid อัตราส่วน 1 %v/v โดยใช้ความร้อนขึ้น 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับใช้ในการหมัก

4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักร่วมเพื่อผลิตเอทานอลระหว่างยีสต์ Hmi 194 และเชื้อรา

ต่าง ๆ ดังนี้ เพื่อหาเชื้อที่เหมาะสม ดังนี้

- *Aspergillus niger* + Yeast Hmi 194
- *Aspergillus oryzae* + Yeast Hmi 194
- *Trichoderma* sp. + Yeast Hmi 194
- *Penicillium* sp. + Yeast Hmi 194
- *Monascus* sp. + Yeast Hmi 194

4.5.1 การหมักแบบ One-step co-culture system

โดยนำตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสกัดไขมัน และผ่านการย่อยตามข้อ 4.4 เติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการหมัก จากนั้นถ่ายหัวเชื้อราและยีสต์ ลงไป สัดส่วน 1:1 ปกป้องให้เกิดการหมักเอทานอล 4-8 วัน โดยการหมักจะทำการทดลองใน scale ขนาด 0.5 ลิตร โดยทำการศึกษาและเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ ทุก 2 วัน ตัวอย่างที่ได้นำมา centrifuge และเก็บส่วนใส ไว้สำหรับวิเคราะห์ดังนี้

- ปริมาณเอทานอล โดยใช้ Modified Dichromate method (Magri et al., 1997)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วย DNS Method

- ผลได้ของ ethanol ที่ได้จากการหมักจริง เปรียบเทียบกับผลได้ตามทฤษฎี (Theoretical Yield)
- % conversion ของเซลลูโลส ไปเป็น ethanol

4.6 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก แบบ one step co-culture system

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ ข้อ 4.5.1 โดยออกแบบการทดลองทางสถิติ ศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

A : ค่าความเจือจางกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ได้จากการย่อย (4:0, 2:2, 1:3)

B: ปริมาณและชนิดสารอาหาร (Media I, Media II, Media III)

C: pH (5, 5.5, 6)

D: อุณหภูมิ (35, 37, 40 องศาเซลเซียส)

E: ระยะเวลาในการให้อากาศ (3, 5, 7วัน)

F: การเติมเอนไซม์ (Accelerace, Hemicellulase, Azyme)

G: ชนิดเชื้อราที่ใช้ (*A. niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma* sp.)

H: ยีสต์ (BK, Hmi194, Hmi180)

โดยเก็บตัวอย่าง สำหรับวิเคราะห์ดังนี้

- ปริมาณเอทานอล โดยใช้ HPLC Method
- ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป HPLC Method
- ผลได้ของ ethanol ที่ได้จากการหมักจริง เปรียบเทียบกับผลได้ตามทฤษฎี (Theoretical Yield)
- % conversion ของเซลลูโลส ไปเป็น ethanol

4.7 การหมักแบบ two-step co-culture system และสภาวะที่ทดสอบ

โดยนำตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสกัดไขมัน และผ่านการย่อย ตามข้อ 4.4 เติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการหมัก ตามสภาวะที่ได้จากการทดสอบในขั้น one

stage co-culture จากนั้นถ่ายหัวเชื้อรา *A. oryzae* และยีสต์ Hmi 194 ลงไป สัดส่วน 1:1 ปล่อยให้เกิดการหมักเอทานอล 4-8 วัน โดยการหมักจะทำการทดลองใน scale ขนาด 0.5 ลิตร โดยทำการศึกษาและเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ ทุก 2 วัน ตัวอย่างที่ได้นำมา centrifuge และเก็บส่วนใส ไว้สำหรับวิเคราะห์ดังนี้

- ปริมาณเอทานอล โดยใช้ HPLC Method
- ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป HPLC Method
- ผลได้ของ ethanol ที่ได้จากการหมักจริง เปรียบเทียบกับผลได้ตามทฤษฎี (Theoretical Yield)
- % conversion ของเซลลูโลส ไปเป็น ethanol

โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักร่วม ดังนี้

- การเติมและไม่เติมเอนไซม์ Hemicellulase

- ทดสอบระยะเวลาที่เติมหัวเชื้อยีสต์ Hmi194 ที่เวลา 0, 2, 3, 5, 7, 9 วันทำการหมักเช่นเดียวกับข้อ 4.6 เป็นระยะเวลา 11 วัน โดยทำการศึกษาและเก็บตัวอย่างที่ 9 และ 11 วัน ตัวอย่างที่ได้นำมาสกัดเก็บส่วนใส สำหรับวิเคราะห์ดังนี้

- ปริมาณเอทานอล โดยใช้ HPLC Method
- ผลได้ของ ethanol ที่ได้ เปรียบเทียบกับผลได้ตามทฤษฎี (Theoretical Yield)
- % conversion ของเซลลูโลส ไปเป็น ethanol

5. ผลการทดลองและวิจารณ์

5.1 ผลจากการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วย *Aspergillus niger* และ Yeast Hmi 194

กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันจะผ่านการสกัดด้วยเฮกเซน (รูปที่ 1) เพื่อลดปริมาณไขมันก่อนทำการหมัก การทดลองเบื้องต้นทำการหมักแบบ One-step co-culture system เพื่อหาเชื้อราที่

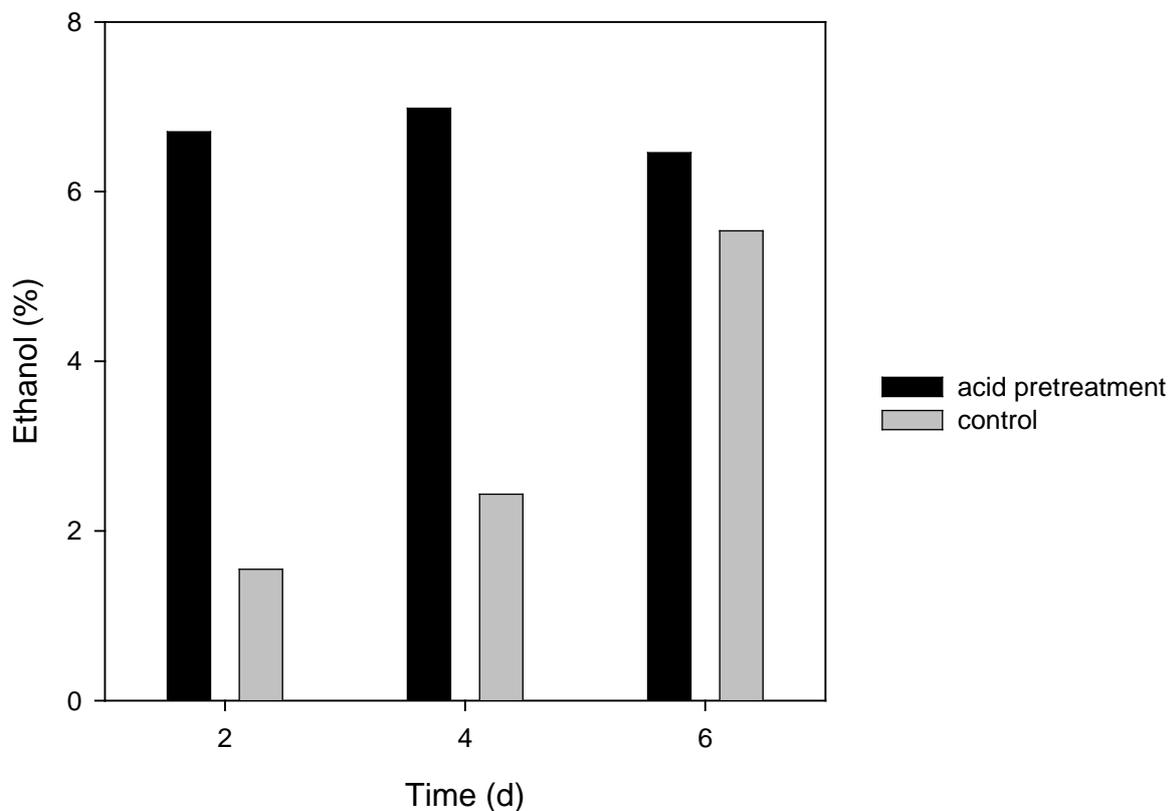
เหมาะสมในการผลิตเอทานอลร่วมกับยีสต์ทนร้อน Yeast Hmi 194 โดยเชื้อราที่ทดสอบ ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. และ *Monascus* sp. โดยผลการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* และ Yeast Hmi ๑๙๔ (รูปที่ ๒) โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control จะให้ปริมาณเอทานอล ๖.๗๑, ๖.๙๘, ๖.๔๖ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการ pretreatment จะให้ผลเอทานอล ๑.๕๕, ๒.๔๓ และ ๕.๕๔ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ โดยปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออก จะสูงสุดในวันที่ ๔ ให้ค่า ๖.๙๘ % มีค่าเท่ากับ ๓๔.๙ % conversion (g/๑๐๐g) (ตารางที่ ๑) ในขณะที่ชุดควบคุมให้ค่าเอทานอลสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 5.45 % มีค่าเท่ากับ ๒๗.๗ % conversion (g/๑๐๐g)



(a)

(b)

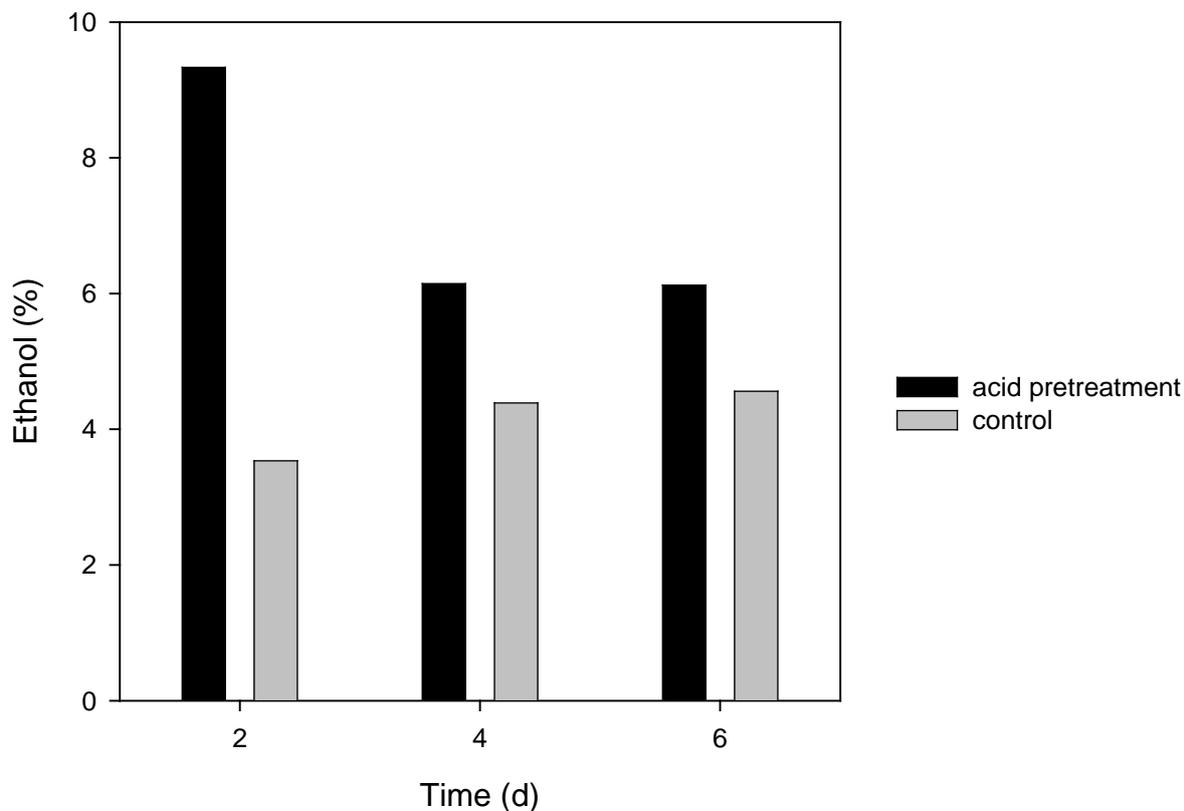
รูปที่ 1 กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันก่อน (a) และหลัง (b) การสกัดด้วยเฮกเซน



รูปที่ ๒ การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* และ Yeast Hmi ๑๙๔ โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control

5.2 ผลจากการหมักการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วย *Aspergillus oryzae* และ Yeast Hmi 194

ผลการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Aspergillus oryzae* และ Yeast Hmi ๑๙๔ (รูปที่ ๓) โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control จะให้ปริมาณเอทานอล ๙.๓๓, ๖.๑๕ และ ๖.๑๒ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการ pretreatment จะให้ผลเอทานอล ๓.๕๔, ๔.๓๙ และ ๔.๕๖ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ โดยปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกจะสูงสุดในวันที่ ๒ ให้ค่า ๙.๓๓ % มีค่าเท่ากับ ๔๖.๗ % conversion (g/๑๐๐g) (ตารางที่ ๑) ในขณะที่ชุดควบคุมให้ค่าเอทานอลสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 4.56 % มีค่าเท่ากับ ๒๒.๘ % conversion (g/๑๐๐g)

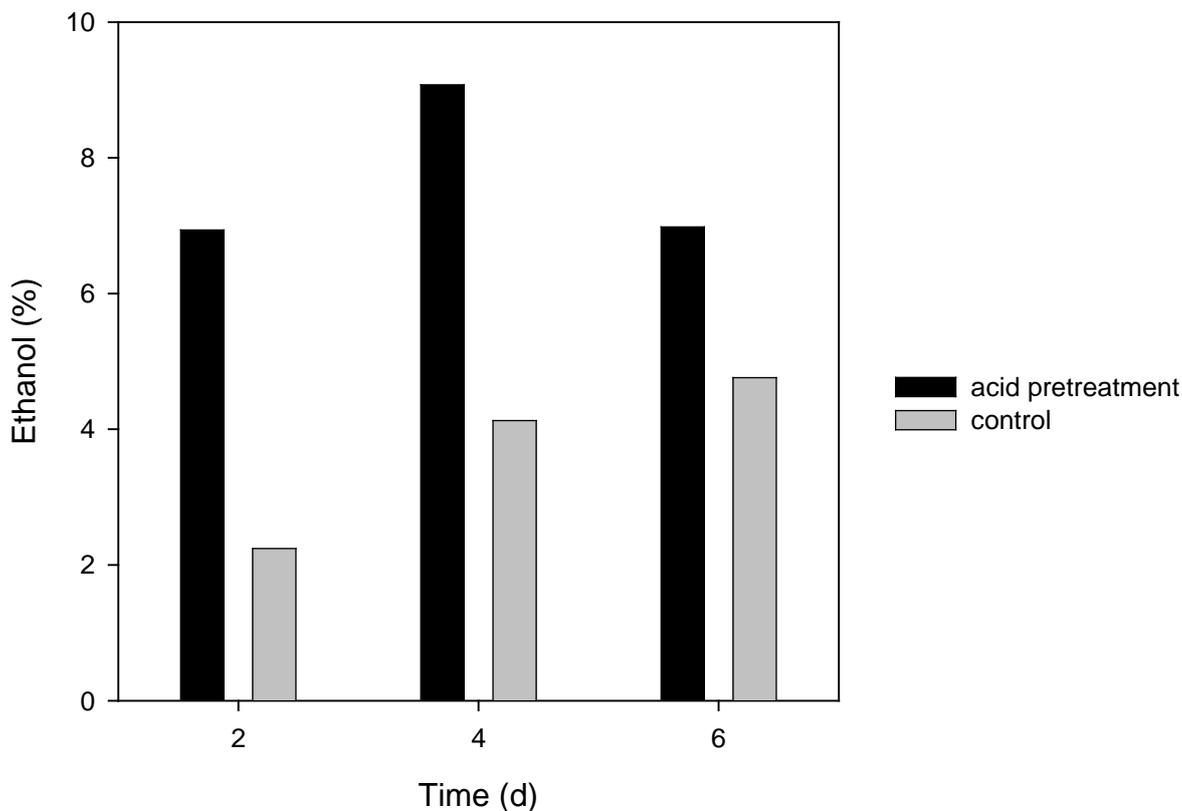


รูปที่ ๓ การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Aspergillus oryzae* และ Yeast Hmi ๑๙๔ โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control

5.3 ผลจากการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วย *Trichoderma* sp. และ

Yeast Hmi 194

ผลการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp. และ Yeast Hmi ๑๙๔ (รูปที่ ๔) โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control จะให้ปริมาณเอทานอล ๖.๙๔, ๙.๐๘ และ ๖.๙๘ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการ pretreatment จะให้ผลเอทานอล ๒.๒๔, ๔.๑๓ และ ๔.๗๖ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ โดยปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออก จะสูงสุดในวันที่ ๔ ให้ค่า ๙.๐๘ % มีค่าเท่ากับ ๔๕.๔ % conversion (g/๑๐๐g) (ตารางที่ ๑) ในขณะที่ชุดควบคุมให้ค่าเอทานอลสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 4.76 % มีค่าเท่ากับ ๒๓.๘ % conversion (g/๑๐๐g)

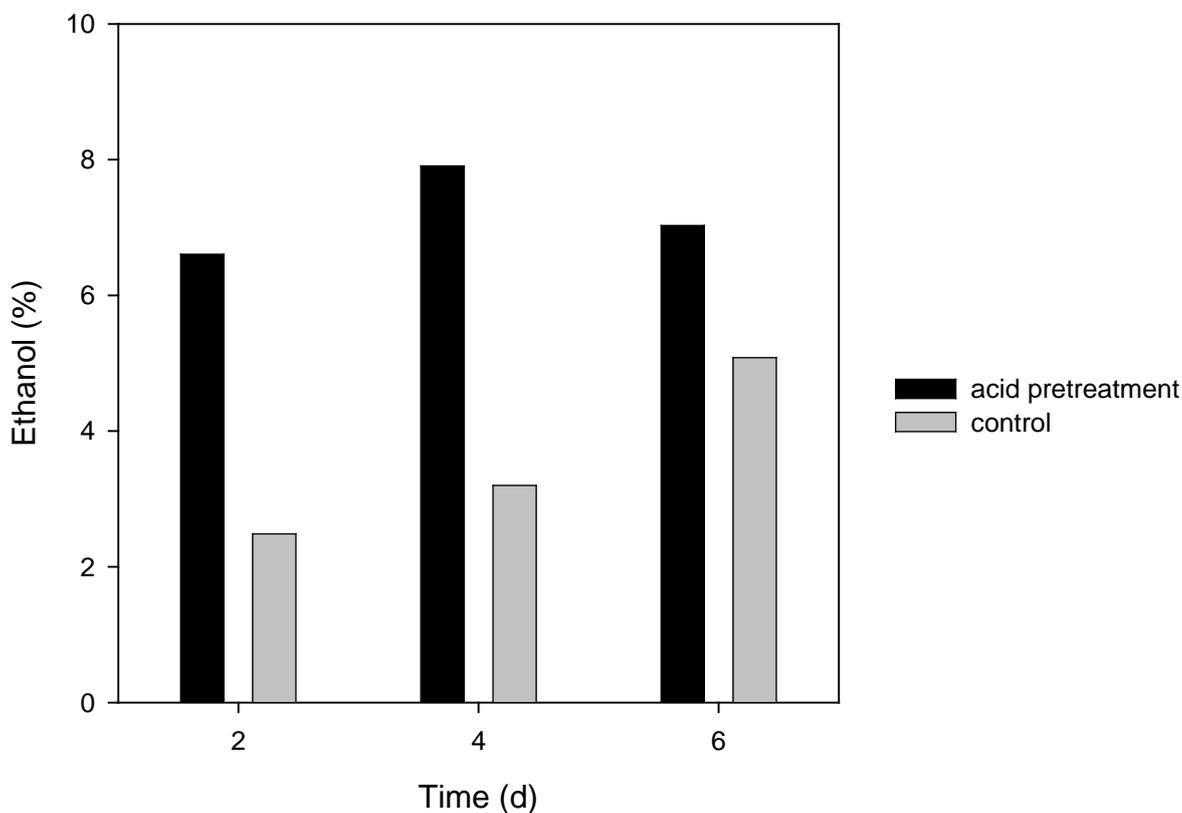


รูปที่ ๔ การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Trichoderma* sp. และ Yeast Hmi ๑๙๔ โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control

5.4 ผลจากการหมักการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วย *Penicillium* sp. และ Yeast Hmi 194

ผลการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Penicillium* sp. และ Yeast Hmi ๑๙๔ (รูปที่ ๕) โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control จะให้ปริมาณเอทานอล ๖.๖๑, ๗.๙๑ และ ๗.๐๓ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการ pretreatment จะให้ผลเอทานอล ๒.๔๙, ๓.๒๐ และ ๕.๐๘ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ โดยปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออก จะสูงสุดในวันที่ ๔ ให้ค่า ๗.๙๑ % มีค่าเท่ากับ ๓๙.๕ %

conversion (g/100g) (ตารางที่ ๑) ในขณะที่ชุดควบคุมให้ค่าเอทานอลสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 5.08 % มีค่าเท่ากับ ๒๕.๔ % conversion (g/100g)

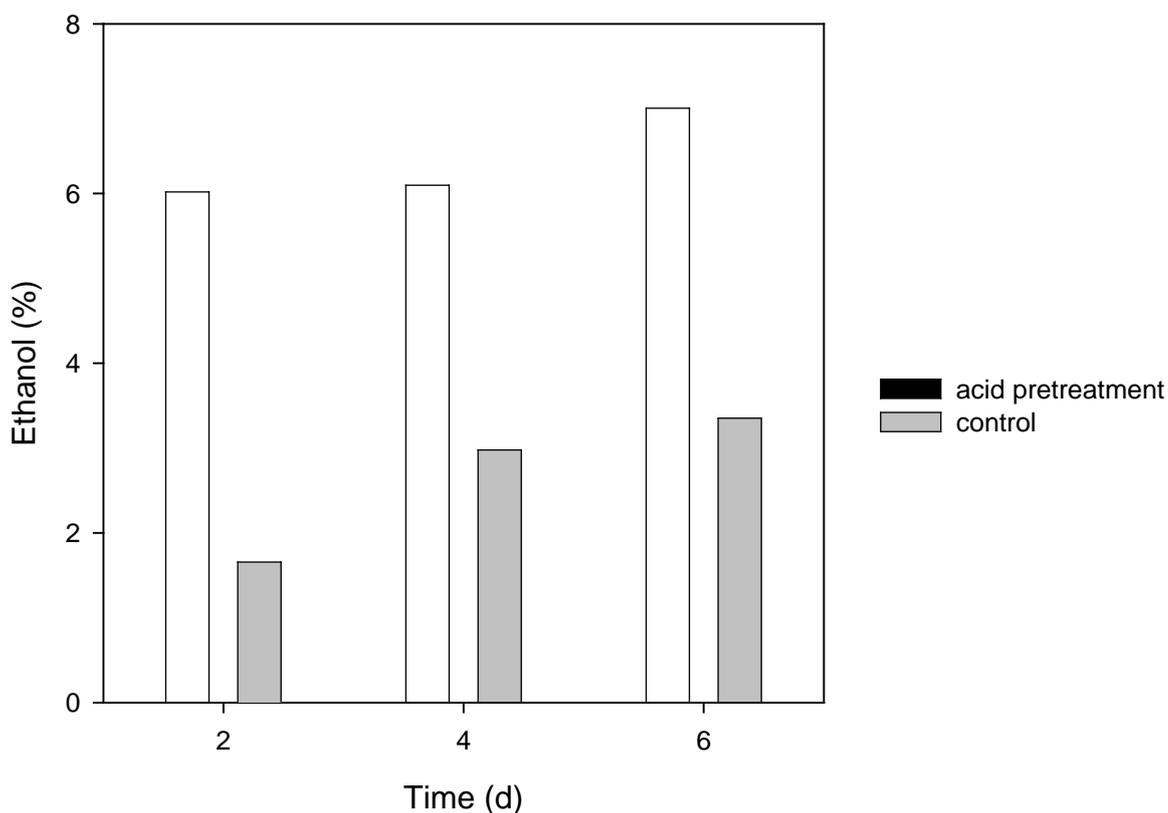


รูปที่ ๕ การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Penicillium* sp. และ Yeast Hmi ๑๙๔ โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control

5.5 ผลจากการหมักการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วย *Monascus* sp. และ Yeast Hmi 194

ผลการหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Monascus* sp. และ Yeast Hmi ๑๙๔ (รูปที่ ๖) โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control จะให้ปริมาณเอทานอล ๖.๐๒, ๖.๑๐ และ ๗.๐๐ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการ pretreatment จะให้ผลเอทานอล ๑.๖๖ ,

๒.๙๘ และ ๓.๓๕ % ในวันที่ ๒, ๔ และ ๖ ตามลำดับ โดยปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออก จะสูงสุดในวันที่ ๖ ให้ค่า ๗.๐๐ % มีค่าเท่ากับ ๓๕.๐ % conversion (g/๑๐๐g) (ตารางที่ ๑) ในขณะที่ชุดควบคุมให้ค่าเอทานอลสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 5.08 % มีค่าเท่ากับ ๑๖.๘ % conversion (g/๑๐๐g)



รูปที่ ๖ การผลิตเอทานอล เมื่อหมักแบบ One-step co-culture system ด้วยเชื้อ *Monascus* sp.

และ Yeast Hmi ๑๙๔ โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออกและผ่านการ pretreatment เปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 1 ค่า % Conversion สูงสุด ของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออก เมื่อทำการหมักแบบ One-step co-culture system ร่วมกับ Yeast Hmi ๑๙๔ ร่วมกับเชื้อต่างๆ

เชื้อ	% Conversion สูงสุด (g/100g)
<i>Aspergillus niger</i>	34.9
<i>Aspergillus oryzae</i>	46.7
<i>Trichoderma</i> sp.	45.4
<i>Penicillium</i> sp.	39.5
<i>Monascus</i> sp.	35.0

เมื่อเปรียบเทียบค่า % Conversion สูงสุด ของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมันออก เมื่อทำการหมักแบบ One-step co-culture system ร่วมกับ Yeast Hmi ๑๙๔ ร่วมกับเชื้อต่างๆ พบว่า *Aspergillus oryzae* ให้ค่า % Conversion สูงสุดเท่ากับ ๔๖.๗ % (g/๑๐๐g) รองลงมาเป็นเชื้อ *Trichoderma* sp. ให้ค่า % Conversion สูงสุดเท่ากับ ๔๕.๔ % (g/๑๐๐g) ตามลำดับ

5.6 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก แบบ one step co-culture system

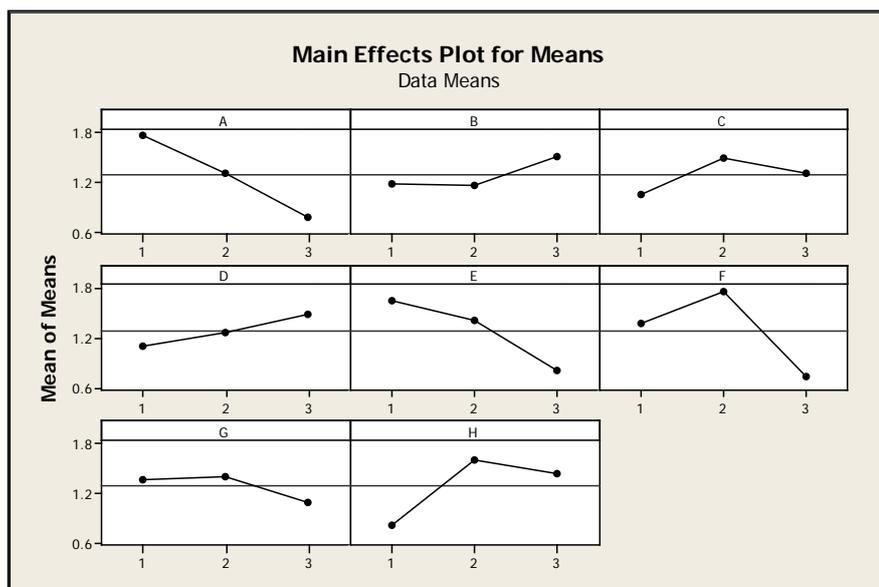
จากการออกแบบการทดลองทางสถิติ Taguchi Design เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการหมัก 7 ปัจจัย (A B C D E F G H) ปัจจัยละ 3 ระดับ (1 2 3) โดยกำหนดค่าปัจจัยที่ต้องการทดสอบ A, B, C, D, E, F, G, H ดังรายละเอียด เมื่อ A คือค่าความเจือจางกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเจือจางด้วยน้ำ (4:0, 2:2, 1:3) B คือค่าปริมาณและชนิดสารอาหาร (Media I, Media II, Media III) C คือค่า pH (5, 5.5, 6) D คือค่าอุณหภูมิ (35, 37, 40 องศาเซลเซียส) E คือค่าระยะเวลาในการให้อากาศ (3, 5, 7 วัน) F คือค่าการเติมเอนไซม์ (Accelerace, Hemicellulase, Azyme) G คือค่าชนิดเชื้อราที่ใช้ (*A. niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma* sp.) และ H คือค่ายีสต์ (BK, Hmi194, Hmi180) โดยนำค่าเฉลี่ยเอทานอลที่ได้ มาเปรียบเทียบทางสถิติได้ค่าความสัมพันธ์แสดงดังตารางที่ 2 และ กราฟรูปที่ 7 โดยผลแสดงให้เห็นว่าค่าความเจือจางกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเจือจางด้วยน้ำ (A) ที่ 4:0 จะให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด 1.77 รองลงมา

1.32 และ 0.78 สำหรับการเจือจาง 2:2 และ 1:3 ตามลำดับ ผลการให้อากาศ (E) ที่ 3 วัน จะให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด 1.64 รองลงมา 1.40 และ 0.82 สำหรับ 5 และ 7 วัน ตามลำดับ ผลการให้อากาศ (E) ที่ 3 วัน จะให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด 1.64 รองลงมา 1.40 และ 0.82 สำหรับ 5 และ 7 วัน ตามลำดับ ชนิดเชื้อราที่ใช้ (G) *A. oryzae* จะให้ผลดีที่สุดเมื่อหมักร่วมกับยีสต์ Hmi ๑๙๔ โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการหมักเป็น media III และค่า pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อการหมัก คือ F A E H C D B G ตามลำดับ ดังตารางที่ ๒ โดยการเติมเอนไซม์เป็นปัจจัยที่มีผลมากที่สุด รองลงมาเป็น ค่าความเจือจางกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเจือจางด้วยน้ำ ค่าปริมาณและชนิดสารอาหาร ชนิดเชื้อยีสต์ pH อุณหภูมิ สารอาหาร และเชื้อราที่ใช้ทดสอบตามลำดับ โดยปริมาณเอทานอลคิดตามค่าทฤษฎีสูงสุดเท่ากับ ๙๗.๔ % (R๑๖) โดยน้ำตาลถูกใช้ในการหมักได้สูงสุดที่ ๙๙.๓ % (R๒๓) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ ๒ Response table for mean

Level	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1.77	1.19	1.05	1.10	1.64	1.37	1.37	0.82
2	1.32	1.16	1.50	1.27	1.40	1.76	1.41	1.61
3	0.78	1.52	1.31	1.49	0.82	0.74	1.09	1.44
Delta	0.99	0.35	0.45	0.38	0.82	1.02	0.32	0.79
Rank	2	7	5	6	3	1	8	4



รูปที่ ๗ Main effects plot for means

ตารางที่ ๓ แสดงค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก เมื่อออกแบบการหมักด้วย Taguchi Design L๒๗

RUN	A	B	C	D	E	F	G	H	ค่าเอทานอลตามทฤษฎี (%)	Sugar conversion (%)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.0	32.0
2	1	1	1	1	2	2	2	2	71.8	72.2
3	1	1	1	1	3	3	3	3	2.5	18.9
4	1	2	2	2	1	1	1	2	73.6	72.6
5	1	2	2	2	2	2	2	3	62.1	78.1
6	1	2	2	2	3	3	3	1	0.0	19.5
7	1	3	3	3	1	1	1	3	75.9	66.9
8	1	3	3	3	2	2	2	1	49.1	37.5
9	1	3	3	3	3	3	3	2	34.7	70.3
10	2	1	2	3	1	2	3	1	86.9	87.2
11	2	1	2	3	2	3	1	2	65.2	94.3
12	2	1	2	3	3	1	2	3	56.7	95.5
13	2	2	3	1	1	2	3	2	55.6	95.9
14	2	2	3	1	2	3	1	3	49.3	92.2
15	2	2	3	1	3	1	2	1	15.3	94.5
16	2	3	1	2	1	2	3	3	97.4	88.3
17	2	3	1	2	2	3	1	1	6.5	26.3

ตารางที่ 3 (ต่อ)

18	2	3	1	2	3	1	2	2	62.4	96.3
19	3	1	3	2	1	3	2	1	25.8	98.2
20	3	1	3	2	2	1	3	2	79.1	98.1
21	3	1	3	2	3	2	1	3	71.2	99.3
22	3	2	1	3	1	3	2	2	49.9	98.8
23	3	2	1	3	2	1	3	3	35.4	99.3
24	3	2	1	3	3	2	1	1	32.2	96.0
25	3	3	2	1	1	3	2	3	76.0	98.9
26	3	3	2	1	2	1	3	1	74.5	99.0
27	3	3	2	1	3	2	1	2	86.5	94.3

๕.๗ การหมักแบบ two stage co-culture

เมื่อทำการหมักโดยใช้ผลที่ได้จากข้อ ๕.๖ และทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการหมักมากที่สุดคือการเติม เอนไซม์ hemicellulase โดยทำการหมักโดยเชื้อ *A. oryzae* และยีสต์ทนร้อน Hmi ๑๙๔ และทดสอบ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมเชื้อยีสต์ทนร้อน Hmi ๑๙๔ พบว่าได้ผลดังตารางที่ ๔ ผลการทดสอบพบว่า เมื่อเติมเชื้อพร้อมกันจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ ๓.๖๕ % และ ๔.๔๓ % และการเติมเอนไซม์ในกาก เนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อยจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการไม่เติมเอนไซม์

ตารางที่ ๔ แสดงค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก เมื่อทดสอบการหมักแบบ two stage co-culture โดยเชื้อ *A. oryzae* และยีสต์ทนร้อน Hmi ๑๙๔

การทดสอบที่	การเติม Hemicellulase	ระยะเวลาที่เติม Hmi ๑๙๔	เอทานอล (%)
๑	-	๐	3.65
๒	-	๒	1.57
๓	-	๓	0.74
๔	-	๕	0.30
๕	-	๗	0.22
๖	-	๙	0.12
๗	✓	๐	4.43
๘	✓	๒	1.10
๙	✓	๓	0.94
๑๐	✓	๕	0.57
๑๑	✓	๗	0.14
๑๒	✓	๙	0.12

6. สรุปผลการทดลอง

การทดลองการหมักกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่สกัดไขมัน และผ่านการย่อยด้วยกรด แล้วทำการทดสอบหมักแบบ One-step co-culture system ของ Yeast Hmi ๑๙๔ ร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. และ *Monascus* sp. พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 6.98, 9.33, 9.08, 7.91 และ 7.00 ๔ โดยให้ค่า % Conversion สูงสุด เท่ากับ ๓๔.๙, ๔๖.๗, ๔๕.๔, ๓๙.๕ และ ๓๕.๐ % (g/๑๐๐g) ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการหมักพบว่าปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลคือ เอนไซม์ Hemicellulase โดยการหมักให้ปริมาณเอทานอลคิดตามค่าทฤษฎีสูงสุดเท่ากับ ๙๗.๔ % (R๑๖) และปริมาณน้ำตาลถูกใช้ในการหมักได้สูงสุดที่ ๙๙.๓ % ส่วนการเติมเอนไซม์ในระกว่าการหมักแบบ Two stage co-culture system จะให้ผลปริมาณเอทานอลต่ำกว่า เมื่อหมักโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* ร่วมกับยีสต์ทนร้อน Hmi194

7. เอกสารอ้างอิง

- Cheung SM and BC Anderson. 1997. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solid. *Biores Technol* 59:81-96.
- Choct M. 2001. Nutritional constraints to alternative ingredients. *ASA Technical Bulletin* Vol. AN31-2001.
- Ghose TK, Panda T, Bisaria VS. 1985. Effect of culture phasing and mannanase on production of cellulase and hemicellulase by mixed culture of *Trichoderma reesei* D 1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804. *Biotech Bioeng.* 27:9.
- Julio XH, Hertz PF, Ayub MAZ. 2002. Cellulase and xylanase production by isolated amazom *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid state cultivation. *Braz Microbiol* 33:213-218.
- Kurakake M, Komaki T. 2001. Production of β -mannanase and β -mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties. *Curr Microbiology* 42:377-380.

Lin TC, Chen C. 2004. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. Proc Biochem. 39:1103-1109.

Olsson L and B Gahn-Hagerdal. 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme Microb 18:312-331.

Ohgren K, A Rudolf, M Galbe, G Zacchi. 2006. Fuel ethanol production from steam- pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. Biom Bioener 30:863-869.

Sun Y and J Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. Biores Technol 83:1-11.

Yu Z and H Zhang. 2003. Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. Biom Bioene 24:257-262.