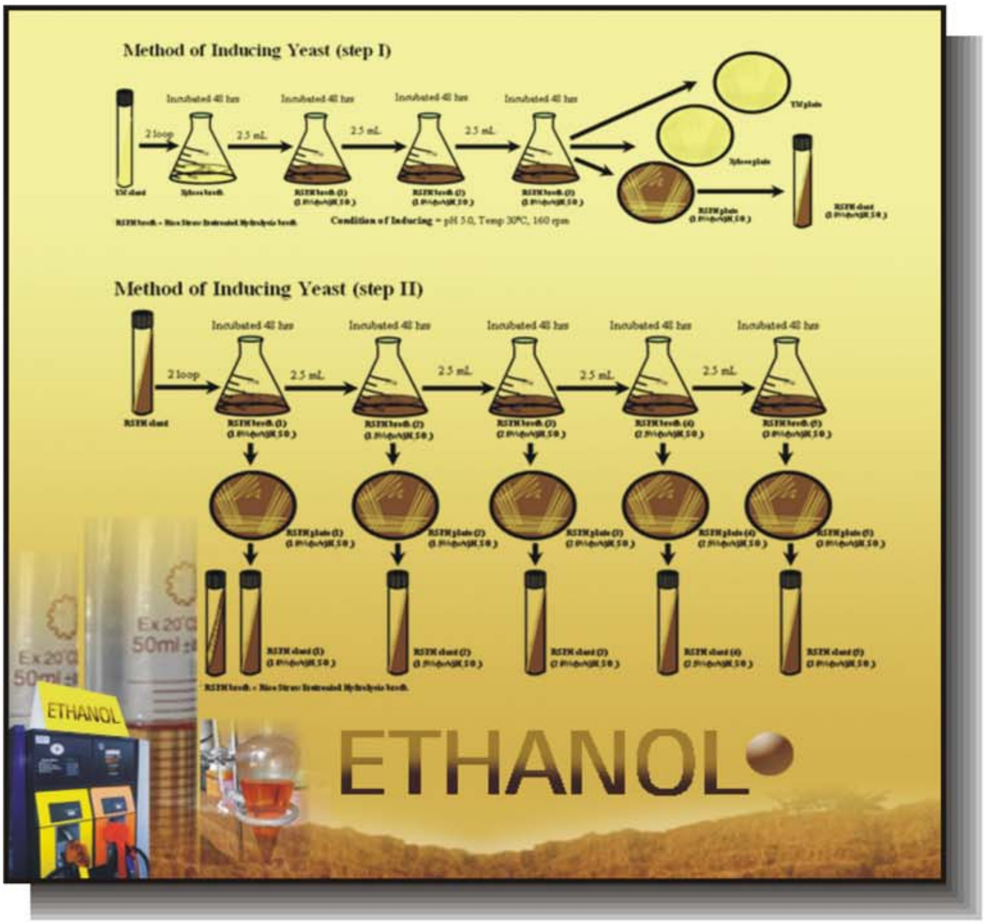
วว.

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-19 / ย. 3 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต เอทานอลจากฟางข้าวและวัสดุเซลลูโลสอื่น ๆ



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-19
การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลอย่างยั่งยืน

โครงการย่อยที่ 3
วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอล
จากฟางข้าวและวัสดุเซลลูโลสอื่นๆ

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวและวัสดุเซลลูโลสอื่นๆ

โดย

ธีรภัทร ศรีนรคุตร	**วิษณุ ปั้นพันธุ์**
เทพฤทธิ์ กัณหานนท์	**ยุทธศักดิ์ สุบการี**
ยุทธศักดิ์ รัตนสงฆ์	**สุทธิ์กมล สุทธิกุล**
นันทนา บำรุงเชื้อ	**วีรวรรณ แซ่เจ่น**
ปิยะวรรณ เดชคง	**สุทธพงศ์ พงษ์พุฒิ**

บรรณาธิการ
ลิขิต หาญจางสิทธิ์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
พิสุทธิ์ พลับสวาท

วว., กรุงเทพฯ 2554

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางเกษมศรี หอมชื่น)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัท บริษัท สยามวิคตอรี่ จำกัด, มหาชน และบริษัท อีสเอเชีย จำกัด มหาชน ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างเอนไซม์ เพื่อใช้ในการทดลอง.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ฑ
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	4
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	23
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	33
4. สรุปผลการทดลอง	109
5. ข้อเสนอแนะ	111
6. เอกสารอ้างอิง	112
ภาคผนวก ก	115
ภาคผนวก ข	121
ภาคผนวก ค	122
ภาคผนวก ง	123
ภาคผนวก จ	144

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่	1.1	ปริมาณของเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุทางการเกษตร	6
ตารางที่	1.2	ปริมาณน้ำตาล Xylose และ Furfural จากการไฮโดรไลซิสเส้นใยปาล์ม ขนาดต่างๆ ที่เตรียมด้วยวิธีต่างๆ ด้วยกรดซัลฟิวริก	9
ตารางที่	3.1	ปริมาณฟางข้าวขนาดต่างๆ ที่ได้จากการบดด้วยเครื่องสับผักตบชวา	33
ตารางที่	3.2	องค์ประกอบทางเคมีของฟางข้าว	34
ตารางที่	3.3	ปริมาณสารต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 0.00-30.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยความกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 1.00% (w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที	39
ตารางที่	3.4.	ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความ เข้มข้น 0.00-1.75 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที	42
ตารางที่	3.5	ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความ เข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 7-60 นาที	43
ตารางที่	3.6	ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความ เข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 110-121°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที	45
ตารางที่	3.7	ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความ เข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที โดยมีการแช่ ตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง ก่อนเตรียม	46
ตารางที่	3.8	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อ สารละลาย กรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 49

ตารางที่ 3.10 ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 52

ตารางที่ 3.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 53

ตารางที่ 3.12 ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 55

ตารางที่ 3.13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 56

ตารางที่ 3.14 ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 58

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่	3.15	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	59
ตารางที่	3.16	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	61
ตารางที่	3.17	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	62
ตารางที่	3.18	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง	63
ตารางที่	3.19	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	64
ตารางที่	3.20	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	66
ตารางที่	3.21	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

			หน้า
ตารางที่	3.22	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	69
ตารางที่	3.23	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	71
ตารางที่	3.24	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	72
ตารางที่	3.25	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	73
ตารางที่	3.34	ปริมาณต่างๆที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v) H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และ 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที	78
ตารางที่	3.27	สรุปปริมาณต่างๆ เมื่อมีการเพิ่มความรุนแรงในการเตรียม และปริมาณฟางข้าวเริ่มต้น	83
ตารางที่	3.28	ไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	88

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่	3.29	ไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	93
ตารางที่	3.30	ไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	101
ตารางที่	3.31	การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์	103
ตารางที่	3.32	การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 1 (Inducing yeast step I)	104
ตารางที่	3.33	การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II)	106
ตารางที่	3.34	การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II)	106
ตารางที่	3.35	การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก	107
ตารางที่	3.36	การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก	108

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่	ง1.	ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 0.00-30.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที	123
ตารางที่	ง2.	ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.00-1.75%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที	123
ตารางที่	ง3.	ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 7-60 นาที	124
ตารางที่	ง4.	ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 110-121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที	124
ตารางที่	ง5.	ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการแช่ฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที	124
ตารางที่	ง6.	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	125
ตารางที่	ง7.	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	125
ตารางที่	ง8.	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	126

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ง9. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 126

ตารางที่ ง10. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 127

ตารางที่ ง11. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 127

ตารางที่ ง12. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 128

ตารางที่ ง13. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 128

ตารางที่ ง14. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 129

ตารางที่ ง15. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 129

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ง16. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 130

ตารางที่ ง17. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 131

ตารางที่ ง18. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 131

ตารางที่ ง19. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 132

ตารางที่ ง20. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 132

ตารางที่ ง21. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 133

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่	ง22.	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	133
ตารางที่	ง23.	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	134
ตารางที่	ง24.	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	134
ตารางที่	ง25.	ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที	135
ตารางที่	ง26.	การเปลี่ยนแปลงระหว่างการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที	135
ตารางที่	ง27.	การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *S.cerevisiae* TISTR 5596 จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วเอนไซม์เซลลูเลส	136
ตารางที่	ง28.	การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P.stipitis* จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	136

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ง29. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *C.shehatae* จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 137

ตารางที่ ง30. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *S.cerevisiae* TISTR 5596 จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 137

ตารางที่ ง31. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P.stipitis* จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 138

ตารางที่ ง32. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *C.shehatae* จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 138

ตารางที่ ง33. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^6 เซลล์ต่อลิตร จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 139

ตารางที่ ง34. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1×10^7 เซลล์ต่อลิตร จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 139

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ง35. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^7 เซลล์ต่อลิตร จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 140

ตารางที่ ง36. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8×10^8 เซลล์ต่อลิตร จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 140

ตารางที่ ง37. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ 141

ตารางที่ ง38. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 1 (Inducing yeast step I) 141

ตารางที่ ง39. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) 142

ตารางที่ ง40. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) 142

ตารางที่ ง41. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก 143

ตารางที่ ง42. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก 143

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1.	ฟางข้าว	5
รูปที่ 1.2.	การเผาฟางข้าว	6
รูปที่ 1.3.	การแยกองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช	7
รูปที่ 1.4.	ปริมาณน้ำตาลไซโลสจากการไฮโดรไลซิสทะลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ	10
รูปที่ 1.5.	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไซโลสเป็นฟูเฟอร์รัล	10
รูปที่ 1.6.	ปริมาณฟูเฟอร์รับจากการไฮโดรไลซิสทะลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ	11
รูปที่ 1.7.	ปริมาณของกรดแอซีติกจากการไฮโดรไลซิสของทะลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ	12
รูปที่ 1.8.	กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส	14
รูปที่ 1.9.	การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของเซลลูโลสด้วยอัตราการเขย่าที่แตกต่างกัน	19
รูปที่ 1.10	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล	
รูปที่ 1.11.	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล	20
รูปที่ 2.1.	กระบวนการเหนี่ยวนำยีสต์ให้สามารถเจริญเติบโตและหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าว	31
รูปที่ 2.2.	การปรับสภาพเชื้อด้วยสารอาหารที่ได้จากการไฮโดรไลซีสฟางข้าวด้วยกรดความเข้มข้นต่างๆ	32
รูปที่ 3.1.	ฟางข้าว (Rice straw)	35
รูปที่ 3.2.	เครื่องสับผักตบชวา	35
รูปที่ 3.3.	ฟางข้าวหลังบดด้วยเครื่องสับผักตบชวา	35
รูปที่ 3.4.	ลักษณะของฟางข้าวขนาดต่างๆ ปริมาณ 10 กรัม หลังบดด้วยเครื่องสับผักตบชวา และร่อนผ่านตะแกรงขนาดต่างๆ	36
รูปที่ 3.5.	กระบวนการลดขนาดของฟางข้าว	37
รูปที่ 3.6.	ปริมาณต่างๆ จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 0.00-30.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยความกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.00 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที	40

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.7. ลักษณะของฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร 40

รูปที่ 3.8. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.00-1.75 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที 42

รูปที่ 3.9. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 7-60 นาที 44

รูปที่ 3.10. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 110-121°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที 45

รูปที่ 3.11. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที โดยมีการแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง ก่อนเตรียม 47

รูปที่ 3.12. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 48

รูปที่ 3.13. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 51

รูปที่ 3.14. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 53

รูปที่ 3.15. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 54

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.16. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 56

รูปที่ 3.17. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 58

รูปที่ 3.18. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 59

รูปที่ 3.19. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 60

รูปที่ 3.20. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 61

รูปที่ 3.21. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 64

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.22. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 66

รูปที่ 3.23. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 67

รูปที่ 3.24. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 69

รูปที่ 3.25. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 70

รูปที่ 3.26. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 72

รูปที่ 3.27. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที 73

รูปที่ 3.28. ขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร และถังหมักขนาด 5,000 มิลลิลิตร 74

รูปที่ 3.29. ลักษณะของฟางข้าวหลังเตรียมด้วยกรด 75

รูปที่ 3.30. ลักษณะของฟางข้าวหลังบด 75

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.31. ขั้นตอนในการผลิตน้ำตาลจากฟางข้าว ด้วยการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ ในระดับถังหมักขนาด 5000 มิลลิลิตร 76

รูปที่ 3.32. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Accellerase 1000™) ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการกวน 160 รอบต่อนาที 77

รูปที่ 3.33. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Accellerase 1000™) ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการกวน 160 รอบต่อนาที 77

รูปที่ 3.34. การไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมโดย (———) 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที (-------) 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1,000 ปริมาณ 45 FPU/g Dry substrate residues 79

รูปที่ 3.35. สมดุลมวลของฟางข้าวที่เตรียม 81

รูปที่ 3.36. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที เมื่อใช้ปริมาณฟางข้าวสูงกว่า 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร 82

รูปที่ 3.37. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในระหว่างการหมักเอทานอลระดับฟลาสก์จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 (A), *P. stipitis* (B) และ *C. shehatae* TISTR 5843(C) 86

รูปที่ 3.38. เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 87

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.39. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในระหว่างการหมักเอทานอลระดับฟลาสก์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 (A), *P. stipitis* (B) และ *C. shehatae* TISTR 5843(C) 90

รูปที่ 3.40. เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 93

รูปที่ 3.41. เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 94

รูปที่ 3.42. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในระหว่างการหมักเอทานอลระดับฟลาสก์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 x10^6 (A), 1 x10^7 (B), 5 x10^7 (C) และ 1 x10^8 (D) เซลล์ต่อมิลลิลิตร 97

รูปที่ 3.43. เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 x10^6, 1 x10^7, 5 x10^7 และ 1 x10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 100

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.44. กระบวนการปรับสภาพเชื้อยีสต์ในขั้นต้น (Inducing yeast step I) 103

รูปที่ 3.45. กระบวนการปรับสภาพเชื้อยีสต์ในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) 105

TECHNOLOGICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT OF ETHANOL PRODUCTION FROM RICE STRAW AND OTHER CELLULOSIC MATERIALS

Teerapatr Srinorakutara, Yuttasak Subkaree, Nantana Bamrungchue, Yuttasak Ratanasong, Suthkamol Suttikul, Vishnu Panphan, Tepparit Kanhanont, Piyawan Dechkong, and Suthapong Pongpoot

ABSTRACT

The effects of rice straw (0.00-30.00 mm) pretreatment with diluted sulfuric acid (H_2SO_4) from 0.50 to 1.75%(w/v), autoclaving temperature from 110 to 121^oC, and autoclaving time from 7 to 60 min were investigated in this study. The results showed that rice straw sizes of 2.00-5.00 mm pretreated with 1.00% (w/v) H_2SO_4, at 121^0C for 15 min were the optimal conditions for pretreatment. At these conditions, reducing sugar of 28.68±1.62 g/l, holocellulose conversion of 41.59±2.47%(w/w), furfural of 0.13 g/l and solid residue after pretreatment of 64.81±0.50%(w/w) were obtained. The reducing sugar and holocellulose conversion increased to 49.87±0.15 g/l and 48.21±0.16%(w/w), respectively, and solid residue decreased to 54.79± 0.93%(w/w) when pretreated with 3.0%(w/v) H_2SO_4 at 121^0C for 30 min as amount of furfural, a weak point of these conditions, increased to 0.62 g/l.

However, both pretreatment methods gave the similar optimal conditions for enzyme hydrolysis by using Accellerase 1,000^{TM} 45 FPU/g dry residue substrate at 50^oC, pH 5.0 with agitation of 160 rpm. It was found that rice straw pretreated with 3.0%(w/v) H_2SO_4 gave the reducing sugar (77.12±4.38 g/l) and holocellulose conversion (69.43±2.34%, w/w) which were higher than those of using 1.00%(w/v) H_2SO_4 (reducing sugar 68.04±1.77 g/l and holocellulose conversion 56.07±2.09%, w/w) as cellulose conversion was similar.

When rice straw pretreated with 3.0%(w/v) H_2SO_4 was crushed using fruit blender, it gave lower viscosity than 1.00%(w/v) H_2SO_4 leading to easy processing of hydrolysis in the fermenter and could increase the initial amount of rice straw. In case of increased rice straw to 17.5 g/100 ml H_2SO_4 solution, the reducing sugar increased to 96.00±3.14 g/l as holocellulose conversion did not increase (70.22±1.92%, w/w). The reducing sugar was, however, not increased although amount of rice straw was added up 20.0 g/100 ml H_2SO_4 solution as holocellulose and cellulose conversion were decreased.

The reducing sugar obtaining from pretreatment with 1.00%(w/v) H_2SO_4 and Accellerase 1,000^{TM} hydrolysis was fermented using *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. It was found that it could produce 23.71 and 22.49 g/l of ethanol, respectively, as both yeasts could not grow and produce ethanol from solution pretreated with 3.0%(w/v) H_2SO_4 and Accellerase 1,000^{TM} hydrolysis. However, when *Saccharomyces cerevisiae* was replaced, it could grow in the both solutions (Solutions pretreated with 1.00% and 3.0%(w/v) H_2SO_4 and Accellerase 1,000^{TM} hydrolysis) but it could produce ethanol only 19.54 and 23.28 g/l, respectively.

วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว และวัสดุเซลลูโลสอื่นๆ

ธีรภัทร ศรีนรคุตร[1], ยุทธศักดิ์ สุบการี[1], นันทนา บำรุงเชื้อ[1], ยุทธศักดิ์ รัตนสงฆ์[1], สุทธิ์กมล สุทธิกุล[1], วิษณุ ปั้นพันธุ์[1], เทพฤทธิ์ กัณหานนท์[1], ปิยะวรรณ เดชคง[1] และสุทธพงศ์ พงศ์พุฒิ[1]

บทคัดย่อ

ฟางข้าว วัสดุเซลลูโลสและเป็นของเหลือทิ้งทางเกษตร, ถูกนำมาบดย่อยเพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสม ก่อนนำเตรียมด้วยการใช้กรดเจือจางและความร้อน, แล้วนำไปไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์, ได้เป็นน้ำตาลและทดลองหมักด้วยยีสต์ จนได้ผลิตภัณฑ์เอทานอล. จากงานวิจัยนี้พบว่า ฟางข้าวขนาดเหมาะสม 2.00-5.00 มิลลิเมตร ถูกเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 1.0% (w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที, จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 28.68 ± 1.62 กรัมต่อลิตร, Holocellulose conversion 41.59±2.47%(w/w), ปริมาณฟูเฟอร์รัล 0.13 กรัมต่อลิตร และเหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียม 64.81±0.50% (w/w). เมื่อเพิ่มระดับความรุนแรงของการเตรียมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3.0%(w/v) อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที สามารถเพิ่มน้ำตาลรีดิวซ์และ Holocellulose conversion เป็น 49.87±0.15 กรัมต่อลิตรและ 48.21±0.16%(w/w), ตามลำดับ และปริมาณฟางข้าวเหลือ 54.79±0.93% (w/w). แต่มีจุดด้อยคือปริมาณฟูเฟอร์รัลเพิ่มขึ้นเป็น 0.62 กรัมต่อลิตร.

อย่างไรก็ตาม การเตรียมทั้งสองวิธี จะมีสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสเหมือนกัน คือ ใช้เอนไซม์ Accellerase 1000™ ในปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate, พีเอช 5.0, อุณหภูมิ 50°ซ., ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที, พบว่า ฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3.0%(w/v) จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (77.12±4.38 กรัมต่อลิตร) และ Holocellulose conversion (69.43±2.34%, w/w) สูงกว่าการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.0% (w/v), ซึ่งให้น้ำตาลรีดิวซ์และ Holocellulose conversion เพียง 68.04±1.77 กรัมต่อลิตร และ 56.07± 2.09%(w/w) ตามลำดับ แต่ Cellulose conversion จะใกล้เคียงกัน.

----

[1]ฝ่ายเทคโนโลยีพลังงาน, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

สายละลายที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3.0%(w/v) เมื่อปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้ พบว่ามีความหนืดน้อยกว่าสายละลายที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.0%(w/v), ทำให้ง่ายต่อการไฮโดรไลซิสในถังหมัก และสามารถเพิ่มปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นให้สูงขึ้นได้. จากการเพิ่มปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นเป็น 17.5 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร จะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงถึง 96.00±3.14 กรัมต่อลิตร, แต่ปริมาณ Holocellulose conversion ไม่เพิ่มขึ้น (70.22±1.92%, w/w). เมื่อเพิ่มปริมาณฟางข้าวเป็น 20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปริมาณ Holocellulose conversion และ Cellulose conversion ลดลง.

น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.0% (w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เมื่อหมักด้วยเชื้อยีสต์ *P. stipitis* และ *C. shehatae* พบว่า ผลิตเอทานอลได้ 23.71 และ 22.49 กรัมต่อลิตร, ตามลำดับ. แต่เชื้อทั้งสองชนิดไม่สามารถเจริญและใช้น้ำตาลที่ได้จากการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3.0% (w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ได้. หากเปลี่ยนไปใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่า สามารถเจริญเติบโตได้ดี ทั้งในสารละลายที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.0 และ 3.0% (w/v) แต่สามารถผลิตเอทานอลได้เพียง 19.54 และ 23.28 กรัมต่อลิตร, ตามลำดับ.

1. บทนำ

1.1 ที่มาและปัญหา

ปัจจุบัน ปัญหาการขาดแคลนพลังงานและเชื้อเพลิงถือว่าเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยกำลังเผชิญกับปัญหานี้เช่นกัน, ทั้งนี้ เนื่องจากประเทศไทยมีแหล่งทรัพยากรด้านพลังงานที่จำกัด จึงไม่เพียงพอต่อความต้องการในประเทศ, โดยเฉพาะน้ำมันเชื้อเพลิงจากแหล่งปิโตรเลียมประเภทน้ำมันเบนซินและดีเซลที่มีอัตราการใช้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง. ปัจจุบันประเทศไทยต้องสูญเสียเงินตราจากการนำเข้าน้ำมันสำเร็จรูปสูงกว่ารายได้จากการส่งออกข้าวและมันสำปะหลังรวมกัน, อีกทั้งราคาน้ำมันมีแนวโน้มจะสูงขึ้น ทำให้มีความพยายามหาแหล่งพลังงานทดแทนจากแหล่งอื่น. จากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีพืชผลทางการเกษตรมากมาย การผลิตเชื้อเพลิงจากผลิตผลทางการเกษตรจึงนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง, โดยการนำผลผลิตทางการเกษตรที่มีปัญหาราคาตกต่ำมาแปรรูปเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงหรือสารปรับปรุงคุณรูปน้ำมันเชื้อเพลิง เช่น การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง, อ้อย และธัญพืชอื่นๆ เป็นต้น.

อย่างไรก็ตาม การนำมันสำปะหลัง, อ้อย และธัญพืชต่างๆ มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล จะเป็นการแย่งอาหารของมนุษย์, อาจจะทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ขึ้นในอนาคต, เช่น ปัญหาการขาดแคลนอาหารหรือราคาอาหารที่สูงขึ้น เป็นต้น. ดังนั้น จึงควรหาวัตถุดิบชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เช่น ชีวมวลต่างๆ.

หญ้าชนิดต่างๆ วัชพืช และวัสดุเศษเหลือจากการเกษตร เช่น ฟางข้าว, ใบอ้อย, ทะลายปาล์ม เป็นต้น เป็นชีวมวลที่มีจุดเด่นคือ สามารถนำมาใช้ใหม่ได้อีกและมีอยู่ในปริมาณมาก. เศษวัสดุเหล่านี้มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส, ซึ่งสามารถจะเปลี่ยนแปลงเป็นเอทานอลได้. ดังนั้น ในการนำวัสดุเหล่านี้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตเอทานอล จะมีข้อดีมากมาย เช่น เป็นการกำจัดและเพิ่มมูลค่าให้วัสดุเศษเหลือ ซึ่งอาจเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย และเป็นเส้นทางหนึ่งในการผลิตเอทานอลโดยไม่มีผลกระทบต่ออาหารของมนุษย์.

สำหรับงานวิจัยฉบับนี้ จะมุ่งเน้นการศึกษาวิจัยหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากฟางข้าว เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล และมีความมุ่งหวังที่จะใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตเอทานอลต่อไป.

1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 ฟางข้าว (Rice straw)

ฟางข้าว (รูปที่ 1.1) เป็นผลพลอยได้จากการปลูกข้าว ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตข้าวนาปีและนาปรังเป็นหลัก สามารถผลิตข้าวได้ปริมาณปีละ 21 – 25 ล้านตัน ทำให้มีวัสดุเหลือจากการเกษตร ที่เรียกว่า ฟางตอซัง ประมาณ 3 เท่าของเมล็ดข้าว หรือจะได้ฟางคิดเป็นปริมาณ 63- 75 ล้านตัน (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2548).

รูปที่ 1.1. ฟางข้าว.

จำนวนฟางข้าวที่เหลือจากการผลิตได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ตัวอย่างเช่น ใช้เป็นวัสดุการเกษตรเช่น ใช้ทำปุ๋ย เป็นต้น, ใช้ปรับปรุงดิน, ใช้ทำกระดาษ, ใช้ทำผลิตภัณฑ์เครื่องจักสาน, ใช้ผลิตสารให้ความหวานไซลิทอล (xylitol) (กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2552). แต่ฟางข้าวจำนวนมหาศาลที่ได้นี้แทบจะไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มคุณค่าและมูลค่าในเชิงเศรษฐกิจ ยังผลให้เกษตรกรนิยมเผาทำลายฟางข้าว (รูปที่ 1.2), เพื่อประโยชน์ในการเตรียมดินทำนาในปีต่อไปเป็นสำคัญ. การเผาฟางข้าวทิ้งของเกษตรกรนี้ ทำให้เกิดการสูญเสียคุณค่าและมูลค่าเชิงเศรษฐกิจอย่างมาก, ทั้งยังก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกชนิดต่าง ๆ นำมาซึ่งมลพิษทางอากาศ, เกิดผลเสียต่อระบบนิเวศในบริเวณที่มีการเผาฟางทิ้ง. ทั้งนี้ เนื่องจากความร้อนจากการเผาฟาง จะทำลายสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อยู่ในผิวดิน, รวมทั้งอินทรีย์วัตถุที่เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานของสิ่งมีชีวิตนานาชนิดที่อยู่ในดินและบนผิวดิน. นอกจากนี้ การเผาฟางยังทำให้ธาตุอาหารพืชสูญเสียออกไปจากระบบนิเวศเกษตร, การเผาฟางทิ้งทำให้เกิดฝนกรด, ทำให้ภูมิอากาศเปลี่ยน, ทัศนวิสัยเลวลงในการเดินทางบก และการจราจรทางอากาศ. ดังนั้น การศึกษาค้นคว้าวิจัยการใช้ประโยชน์จากฟางข้าวในด้านต่างๆ จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าและคุณค่าทางเศรษฐกิจทั้งยังเพิ่มคุณรูปสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศได้อีกด้วย (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2548).

รูปที่ 1.2. การเผาฟางข้าว.

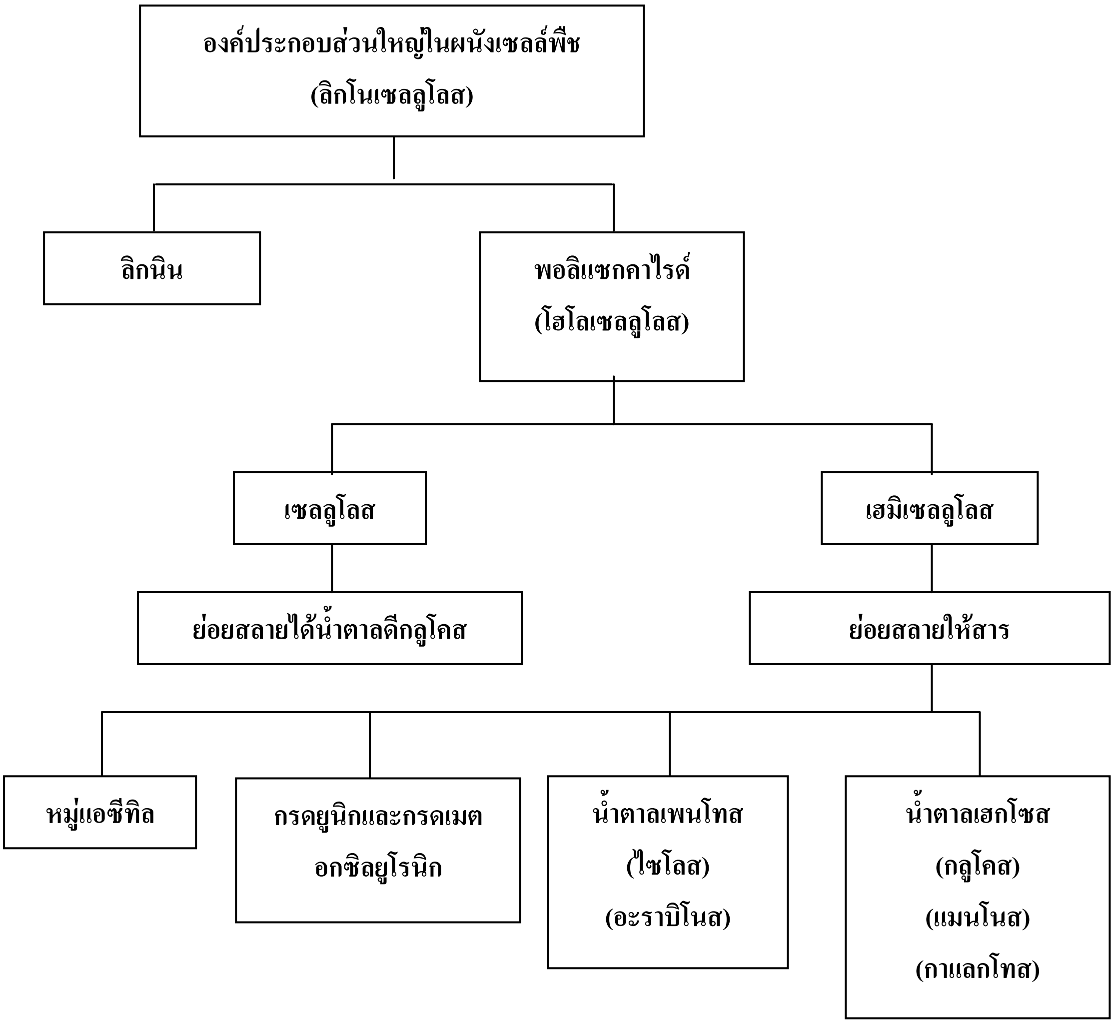
1.2.2 องค์ประกอบของฟางข้าว

ฟางข้าวเป็นทรัพยากรธรรมชาติประเภทหนึ่ง ที่ใช้แล้วสามารถเกิดกลับมาใช้ใหม่ได้อีก. ส่วนประกอบหลักของฟางข้าวได้แก่ เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) หรือเรียกรวมกันว่า ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) (รูปที่ 1.3). จากการรายงานที่ผ่านมา ฟางข้าวมีปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนินประมาณ 32-47, 19-27 และ 5-24, เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก, ตามลำดับ (Karimi *et al.* 2006). เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในฟางข้าวกับวัตถุดิบชนิดอื่นแล้ว (ตารางที่ 1.1), ฟางข้าวมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่สูง, มีศักยภาพเพียงพอที่จะสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ และด้วยลักษณะทางกายรูป (รูปที่ 1.1) ซึ่งฟางข้าวมีขนาดไม่ใหญ่มากและง่ายต่อการลดขนาดให้เล็กลงตามที่ต้องการ ทำให้ต้นทุนในการลดขนาดถูกลง.

ตารางที่ 1.1. ปริมาณของเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุทางการเกษตร

ชนิดของวัสดุเศษเหลือ	ส่วนประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
เศษไม้เหลือทิ้ง	45-56	10-25	18-30	-
ฟางข้าว	32-47	19-27	5-24	17.5
ฟางข้าวสาลี	30.5	28.4	18.0	2.4
ชานอ้อย	33.4	30.0	18.9	2.4
ซังข้าวโพด	45	35	15	-
ต้นมันสำปะหลัง	32.2	13.85	26.96	-

ที่มา: กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545).



รูปที่ 1.3. การแยกองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช.

ที่มา: Greulch (1973) อ้างโดย กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545).

1.2.3 การผลิตเทานอลจากฟางข้าว (Ethanol production from rice straw)

สำหรับขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก คือ การเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment) เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของลิกโนเซลลูโลส เพื่อให้เอนไซม์, กรด และจุลินทรีย์ สามารถเข้าถึงและย่อยได้ง่ายขึ้น. การย่อย (Hydrolysis) เป็นการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเพนโทส และเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเฮกโซส. ขั้นตอนการหมัก (Fermentation) เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทา-นอล (ปิยะจอมขวัญและคณะ 2548).

1.2.3.1 การเตรียมฟางข้าว (Rice straw pretreatment)

การเตรียมฟางข้าวหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำตาล ที่สามารถใช้ในการผลิตเอทานอลนั้น มีหลายวิธี ได้แก่ การเตรียมด้วยกรด, การเตรียมด้วยด่าง, เป็นต้น ซึ่งในแต่ละวิธีจะมีข้อดีขอเสียแตกต่างกันไป. การเตรียมฟางข้าวหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเจือจาง เป็นวิธีที่มีการประยุกต์ใช้กันอย่างมากมาย, ที่สามารถใช้ในการเตรียมวัตถุดิบก่อนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ หรือสามารถใช้ในการไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลได้โดยตรง. การใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริกในการเตรียมลิกโนเซลลูโลส ถึงแม้ว่ากรดเป็นสารเคมีที่ไฮโดรไลซิสเซลลูโลสได้ดี, แต่กรดเข้มข้นมีฤทธิ์การกัดกร่อนและเป็นอันตราย จึงต้องการถังปฏิกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน. ปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาโดยใช้กรดเจือจางในการเตรียมลิกโนเซลลูโลส จนสามารถเพิ่มการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสได้, แต่การใช้กรดจะทำให้ต้นทุนสูงและพีเอชจะมีผลในขั้นตอนการหมักด้วย (Sun and Cheng 2002). ดังเช่นในการเตรียมทะลายปาล์มเปล่าโดยวิธีการแช่ทะลายปาล์มเปล่าในสารละลายกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง. จากนั้น นำไปต้มโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส, ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, เป็นระยะเวลา 5 นาที, ปรากฏว่า ทะลายปาล์มเปล่าหลังจากการเตรียมมีปริมาณเซลลูโลส 62.9±0.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก, ปริมาณเฮมิเซลลูโลส 4.6±0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และปริมาณลิกนิน 4.5±0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากทะลายปาล์มเปล่าที่มีปริมาณเซลลูโลส 50.4±1.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก, ปริมาณเฮมิเซลลูโลส 12.9±1.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และปริมาณลิกนิน 10.0±1.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Umikalsom *et al.* 1997). ในการต้มฟางข้าวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ในสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, แล้วใช้ฟางข้าวที่ต้มเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลโดยใช้ระบบ SSF ทำให้ผลิตเอทานอลได้ 19±1 กรัมต่อลิตรและผลผลิต 0.24 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Saha *et al.* 2005).

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเมื่อถูกเตรียมด้วยกรดเจือจาง จะทำให้ได้น้ำตาลเกิดขึ้น ซึ่งจะมีทั้งน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (ไซโลส) และน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (กลูโคส). น้ำตาลเหล่านี้สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้. การเตรียมฟางข้าวหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ให้ปริมาณน้ำตาลสูงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ขนาดของฟางข้าว, ปริมาณกรด, อุณหภูมิ, ระยะเวลา, เป็นต้น.

การลดขนาดของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส จะสามารถเพิ่มอัตราการไฮโดรไลซิสได้จากการที่เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับทำปฏิกิริยา. กรดความเข้มข้นปานกลางจะไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสให้เป็นไซโลส. ขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมวัตถุดิบอย่างหนึ่ง โดยการย่อยเฮมิเซลลูโลสให้เป็นไซโลส และย่อยสารโมเลกุลต่ำอื่นๆ จะทำให้เซลลูโลสมีความอ่อนตัวและนุ่มต่อการย่อยด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์ต่อไป (Aziz *et al.* 2002). อย่างไรก็ตาม จากการทดลองของ Aziz *et al*. (2002) เองพบว่า ในการไฮโดรไลซิสของเส้นปาล์มขนาดต่างๆ, เส้นใยปาล์มขนาดใหญ่กว่า 0.4 มิลลิเมตร จะให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 1.2.

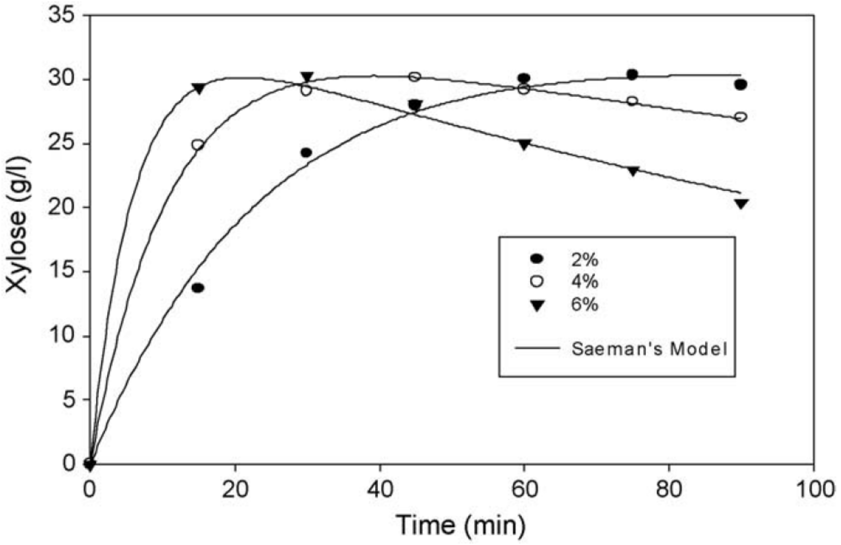
ตารางที่ 1.2. ปริมาณน้ำตาล Xylose และ Furfural จากการไฮโดรไลซิสเส้นใยปาล์มขนาดต่างๆ ที่เตรียมด้วยวิธีต่างๆ ด้วยกรดซัลฟิวริก

Treatment	Xylose (g litre^{-1})	Furfural (g litre^{-1})
Non-treated OPPF (PI)		
Ground without sieving	31.4	0.8
Ground and sieved		
>0.4 mm	44.5	1.0
0.3 - 0.4 mm	40.2	0.9
< 0.3 mm	28.2	0.5
Bleached OPPF (PII)		
Ground without sieving	39.3	1.1
Ground and sieved		
>0.4 mm	67.8	1.6
0.3 - 0.4 mm	44.4	1.8
<0.3 mm	30.6	1.3
Alkali treated OPPF (PIII)		
Ground without sieving	23.6	0.2
Ground and sieved		
>0.4 mm	29.2	0.5
0.3 - 0.4 mm	26.4	0.6
<0.3 mm	18.7	0.4

ที่มา: Aziz *et al*. (2002).

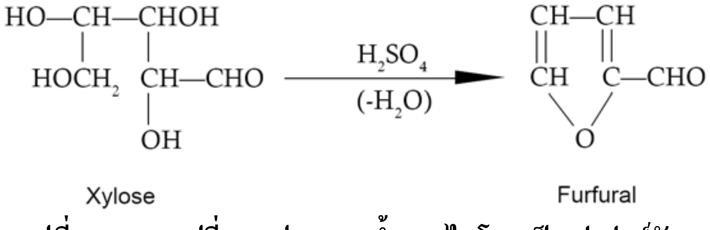
ได้เคยมีการใช้กรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นในการเตรียมวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส, ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการไฮโดรไลซิสเซลลูโลส. อย่างไรก็ตาม กรดเข้มข้นเป็นพิษ, กัดกร่อน, เป็นอันตราย และต้องการถังปฏิกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน. กรดเข้มข้นต้องมีการนำกลับมาใช้ใหม่อีกครั้งหลังจากการไฮโดรไลซิสแล้ว (Sun and Cheng 2002). กรดเจือจางมีการใช้ในการเตรียมวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสสำเร็จแล้ว การเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง และเพิ่มการไฮโดรไลซิสของเซลลูโลส.

ในการไฮโดรไลซิสของทะลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2-6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (รูปที่ 1.3), จะเห็นได้ว่า ปริมาณน้ำตาลไซโลสจะเพิ่มอย่างรวดเร็ว เมื่อความเข้มข้นกรดเพิ่มขึ้น. อย่างไรก็ตาม การไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงที่สุด 31.1 กรัมต่อลิตร (91.2 เปอร์เซ็นต์). ส่วนที่ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 30.7 และ 30.27 กรัมต่อลิตร, ตามลำดับ. ทั้งนี้ กรดที่มีความเข้มข้นสูงจะมีข้อเสียคือ เมื่อระยะเวลาการไฮโดรไลซิสนานขึ้น กรดจะย่อยน้ำตาลไซโลสที่ได้ต่อไปเป็นฟูเฟอร์รัล (รูปที่ 1.4 และ 1.5), ทำให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้ลกลง (Rahman *et al.* 2006).



รูปที่ 1.4. ปริมาณน้ำตาลไซโลสจากการไฮโดรไลซิสทะลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ.

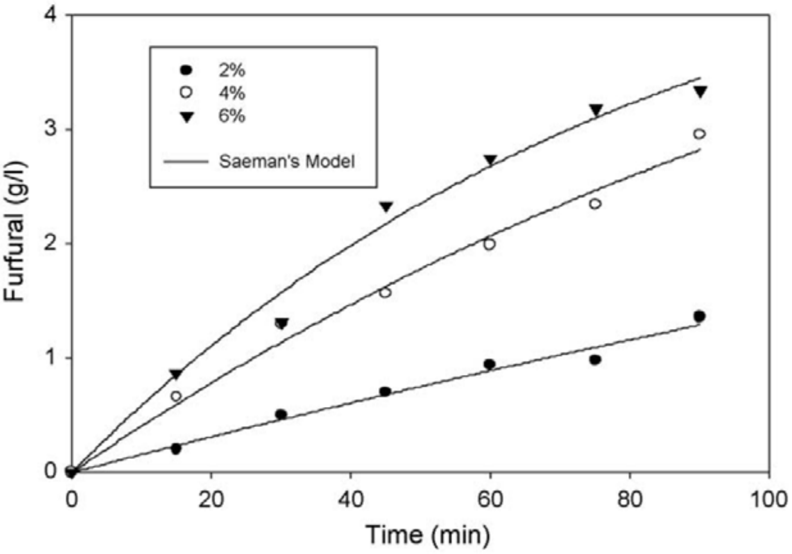
ที่มา: Rahman *et al.* (2006)



รูปที่ 1.5. การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไซโลสเป็นฟูเฟอร์รัล.

ที่มา: Aziz *et al*. (2002).

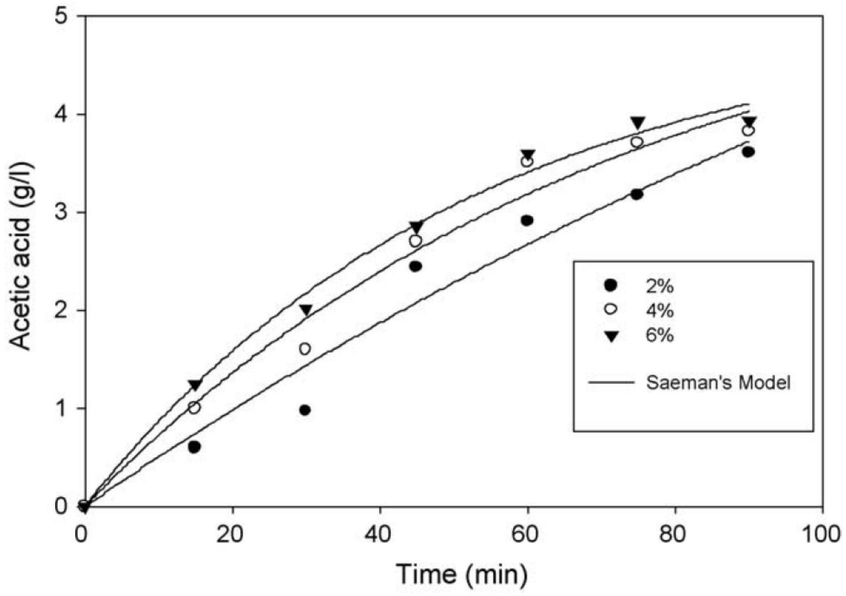
จากข้างต้น จะเห็นได้ว่า การเตรียมฟางข้าว หรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส นอกจากจะให้น้ำตาลเกิดขึ้นแล้ว ยังมีสารตัวอื่นเกิดขึ้นตามมาด้วย อย่างเช่น กรดแอซีติก, ฟูเฟอร์รัล และไฮดรอกซีเมทิลฟูเฟอร์รัล, เป็นต้น. ในส่วนของฟูเฟอร์รัล จะเกิดมาจากการแตกตัวของไซเลน ให้น้ำตาลไซโลส และมีการสลายตัวเป็นฟูเฟอร์รัลขึ้น (Aziz *et al.* 2002). ในส่วนของน้ำตาลกลูโคส จะสลายตัวเป็นไฮดรอกซีเมทิลฟูเฟอร์รัล. ทั้งนี้ปริมาณที่ได้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของกรด, อุณหภูมิ, ความดัน และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา, เป็นต้น. จากการรายงานของ Rahman *et al.* (2006) ในการไฮโดรไลซิสของทะลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริก พบว่า เมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเพิ่มขึ้นจาก 2 เป็น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณฟูเฟอร์รัลจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน ตามรูปที่ 1.6. ปริมาณฟูเฟอร์รัลมากที่สุด 3.3 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก, จึงเป็นสาเหตุให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสลดลงตามรูปที่ 1.4.



รูปที่ 1.6. ปริมาณฟูเฟอร์รับจากการไฮโดรไลซิสทะลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ.

ที่มา: Rahman *et al.* (2006).

ส่วยกรดแอซีติกจะเกิดมาจากกลุ่มแอซีทิลของเฮมิเซลลูโลส, โดยในระหว่างการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก จะไฮโดรไลซิสกลุ่มแอซีทิลให้กลายเป็นกรดแอซีติก (รูปที่ 1.7). ปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้, โดยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะทำให้เกิดกรดแอซีติกสูงสุด 3.93 กรัมต่อลิตร, แต่เมื่อลดปริมาณกรดซัลฟิวริกเป็น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกรดแอซีติกจะเหลือเพียง 0.59 กรัมต่อลิตร.



รูปที่ 1.7. ปริมาณของกรดแอซีติกจากการไฮโดรไลซิสของทะลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ.

ที่มา: Rahman *et al*. (2006).

สารที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักเอทานอลโดยจะลดอัตราการเจริญจำเพาะ, ลดอัตราและปริมาณการผลิตเอทานอล, ลดปริมาณเซลล์ (Oliva *et al.* 2005), โดยกรดแอซีติกและฟูเฟอร์รัล เป็นตัวยับยั้งต่ออัตราการเจริญจำเพาะที่รุนแรง.

สารฟูเฟอร์รัลเป็นตัวยับยั้งที่รุนแรงต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *K.marxianus*, โดยปริมาณฟูเฟอร์รัล 2 กรัมต่อลิตรทำให้เชื้อต้องใช้ระยะเวลาพักตัวนานขึ้น และการเจริญจะไม่เกิดขึ้นจนกระทั่งเชื้อจุลินทรีย์จะรีดิวซ์ฟูเฟอร์รัล เป็นฟูเฟอร์ริลแอลกอฮอล์.

ฟูเฟอร์รัลเป็นสารหลักในการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งปริมาณฟูเฟอร์รัล 2 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อ *K. marxianus* CECT 10875 จะมีการพักตัวประมาณ 8 ชั่วโมง.

ฟูเฟอร์รัลและกรดแอซีติกเป็นสารยับยั้งต่อการเจริญเติบโตและการหมักเอทานอล ด้วยเชื้อ *K. marxianus* CECT 10875.

1.2.3.2 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Enzyme hydrolysis)

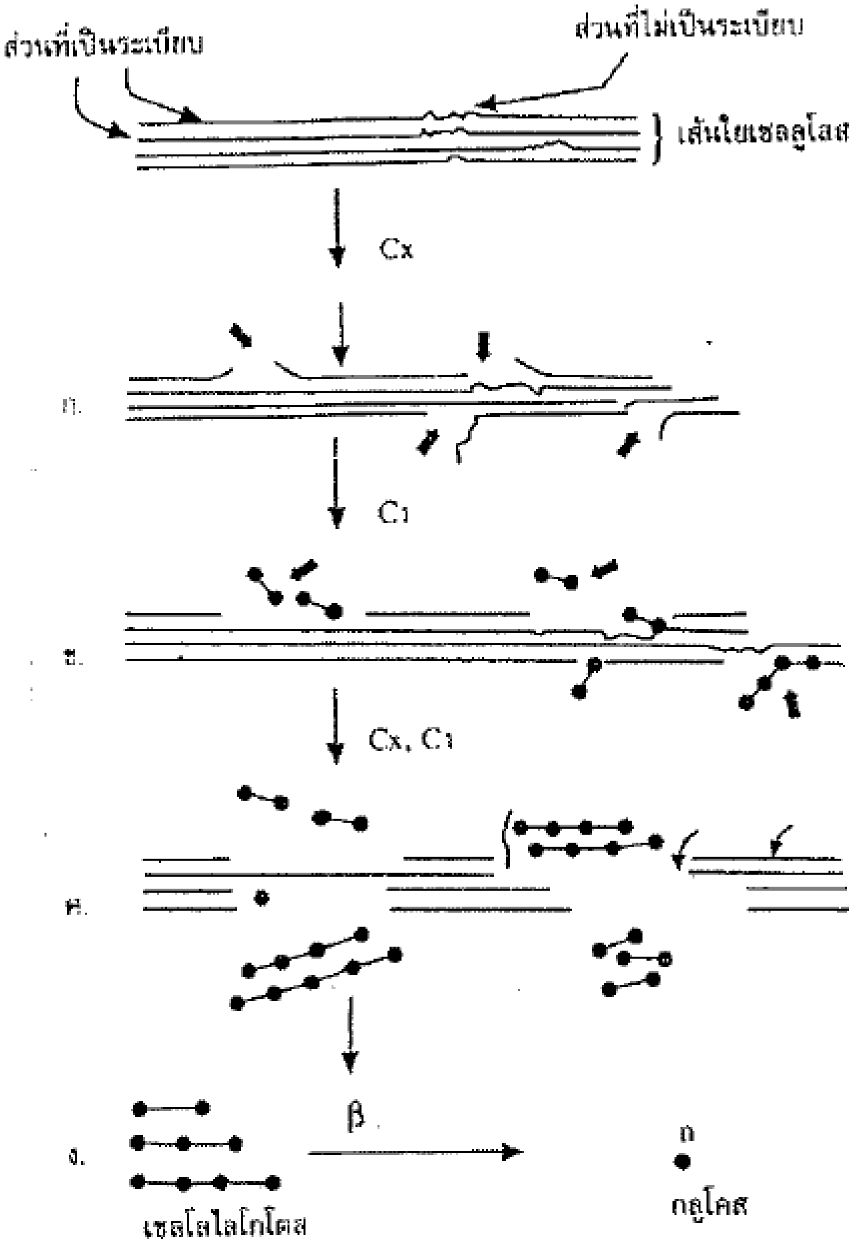
ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน แต่องค์ประกอบที่สำคัญที่จะนำมาใช้ คือเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส. ทั้งสององค์ประกอบนี้มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน จึงต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน. เซลลูโลสจะมีโครงสร้างที่เป็นกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β-1, 4-Glucosidic linkage. ดังนั้น ในการย่อยสลายเซลลูโลส จึงต้องใช้เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เชิงซ้อน 3 ส่วน ดังนี้.

<u>Endoglucanase</u> (1, 4-β-D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย β-1, 4-glucosidic linkage โดยจะตัดแบบสุ่มภายในสายจะได้ Cello-oligosaccharide, Glucose, Cellobilose.

<u>Exoglucanase</u> (1, 4-β-D-glucan cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ร่วมกับ Endoglucanase ในการย่อยเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ Cellobiose.

<u>β–Glucosidase</u> (β-D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย Cellobiose และCello-oligosaccharide ได้เป็นกลูโคส.

สำหรับขั้นตอนในการไฮโดรไลซิสจะมีอยู่ 3 ขั้นตอน คือ 1) เกิดการแพร่ของเอนไซม์ในของเหลว, 2) เกิดการเคลื่อนย้ายของเอนไซม์จากของเหลวไปที่ผิวหน้าของสารตั้งต้น และ 3) เกิดการดูดซับของเซลลูโลสเข้าไปหาเอนไซม์เกิดเป็น Enzyme-cellulose complex (Cao and Tan 2002). จากนั้น จะเกิดการย่อยสลายเซลลูโลส ดังแสดงในรูปที่ 1.8. โดย Petterson อ้างโดย ยงสุวรรณไพศาล (2546) อธิบายว่า เส้นใยเซลลูโลสจะประกอบด้วย ส่วนที่เป็นระเบียบและส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ, เอนไซม์ Cx_(Endoglucanase) เข้าไปย่อยสลายส่วนที่ไม่เป็นระเบียบตามรูป ก. ทำให้เส้นใยเซลลูโลสขาดเป็นช่วงๆ. เอนไซม์ C1 (Exoglucanase) เข้าไปย่อยส่วนปลายของเส้นใยที่ขาดออกมาตามรูป ข. จากนั้น สายโซโมเลกุลของเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลที่สั้นลงโดยเอนไซม์ Cx และ C1 ดังรูป ค. และสายโซโมเลกุลที่สั้นลงนั้นถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส ดังรูป ง.



รูปที่ 1.8. กลไกลการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส.

ที่มา: ยงสุวรรณไพศาล (2546).

สำหรับการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายนั้น จะต้องทราบปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส. ในวัตถุดิบบางชนิดอาจจะมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสน้อย จึงไม่จำเป็นที่จะต้องเติมเอนไซม์ที่ไปย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เพื่อเป็นการลดต้นทุน. แต่สำหรับเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ต้องการและมีอยู่มาก จำเป็นที่จะต้องเติมเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยเฉพาะเซลลูเลสและ

บีตา-กลูโคซิเดส. ส่วนประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด ดังต่อไปนี้.

1. ปริมาณสารตั้งต้น (Substrate concentration)

ในการศึกษาปริมาณใบอ้อยที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสช่วง 2.5-25 เปอร์เซ็นต์ ของ Krishna *et al.* (1998) พบว่า ปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสมคือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่จะทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสที่ดีที่สุด. แต่ถ้าเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นจาก 5 เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ จะไปจำกัดการไฮโดรไลซิส เนื่องจากเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น.

2. ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ (Type and concentration of enzyme)

เอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเซลลูไบโอสเป็นน้ำตาลกลูโคส. ถ้าในเอนไซม์เซลลูเลสมีเอนไซม์ชนิดนี้อยู่มาก จะทำให้ในระบบลดตัวยับยั้งเอนไซม์ Endoglucanase และ Exoglucanase ส่งผลให้การไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นได้ดี. จากการเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Chaetomium globosum* กับเอนไซม์ทางการค้าของ Umikalsom *et al.* (1998) ในการไฮโดรไลซิสทะลายปาล์มเปล่าที่เตรียมด้วยวิธี 2.0% NaOH/Soaking 30°C/Autoclaving 121°C, 15psi, 5min., ผลปรากฏว่า การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *Chaetomium globosum* จะให้น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าการใช้เอนไซม์ทางการค้า, เนื่องจากในเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Chaetomium globosum* มีปริมาณบีตา-กลูโคซิเดสสูงกว่า. จากการศึกษาของ Chen *et al.* (2006) ในการไฮโดรไลซิส corn cob ที่เตรียมด้วยวิธี 1% H_2SO_4/Boiling 108°C, 3 hr. ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ZU-02 โดยไม่เติมเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส, ผลปรากฏว่าได้ผลผลิตเพียง 67.5 เปอร์เซ็นต์. ในการไฮโดรไลซิสครั้งนี้ พบว่า เกิดการสะสมของน้ำตาลเซลลูไบโอส จึงไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-1,4-endoglucanase และ β-1,4-exoglucanase. แต่เมื่อเติมเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจากเชื้อ *Aspergillu niger* ZU-07 ลงไป สามารถที่จะเพิ่มผลผลิตได้ถึง 83.9 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการเพิ่มบีตา-กลูโคซิเดสเพียง 6.5 CBU/g substrate.

Hang and Woodams (2001) ได้ทำการศึกษาการไฮโดรไลซิส corn cob ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า 3 ชนิด ได้แก่ Rapidase Pomalig, Celluclast 1.5L และ Clarex ML, ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, พีเอช 5.0 ในเวลา 48 ชั่วโมง, พบว่า เอนไซม์ชนิด Rapidase Pomalig ไฮโดรไลซิสได้น้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า Celluclast 1.5L และClarex ML. โดย Rapidase Pomalig สามารถที่จะเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จาก 106±8 กรัมต่อกิโลกรัมเป็น 550±10 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะเป็นไซโลส, กลูโคส, อะราบิโนส และเซลลูไบโอส ปริมาณ 35, 45, 3 และ 17 เปอร์เซ็นต์, ตามลำดับ.

นอกจากปริมาณเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส ที่ทำให้การไฮโดรไลซิสสามารถเกิดขึ้นได้ดีแล้ว, ชนิดของเอนไซม์เซลลูเลสจะมีผลต่อการไฮโดรไลซิสด้วย, เช่น เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแหล่งของคาร์บอนแตกต่างกันจะสามารถไฮโดรไลซิสวัตถุดิบแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน. จากรายงานของ Juhasz *et al.* (2005), เมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C30 โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (Solka floc, Spruce, Willow และ Corn strover) ไปทำการไฮโดรไลซิส พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันจะสามารถไฮโดรไลซิสได้ปริมาณที่แตกต่างกัน. โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากการใช้ corn strover จะสามารถไฮโดรไลซิสได้ดีที่สุด. จากการศึกษาของ Liming and Xueliang (2004) โดยการไฮโดรไลซิส corn cob residue ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ZU-02 ปริมาณเอนไซม์เพียง 20 IU/g substrate ได้ผลผลิตของการไฮโดรไลซิสถึง 90.4 เปอร์เซ็นต์. จากการเปรียบเทียบการไฮโดรไลซิส Diary manure ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากทางการค้า ที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma reesei* และเชื้อ *Trichoderma reesei* ผสมกับ *Aspergillus phoenicis*, ปรากฏว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบผสม (*Trichoderma reesei* ผสมกับ *Aspergillus phoenicis*) มีประสิทธิภาพสูงกว่าเอนไซม์ทางการค้า และเอนไซม์ที่ผลิตด้วยเชื้อ *Trichoderma reesei* เพียงชนิดเดียว (Wen *et al*. 2005).

ในการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบอ้อยช่วง 10-100 FPU/g substrate ของ Krishna *et al.* (1998) พบว่า ที่ปริมาณเอนไซม์ 100 FPU/g substrate จะให้ปริมาณการไฮโดรไลซิสมากที่สุด. แต่เนื่องจากการใช้เอนไซม์ตั้งแต่ 40-100 FPU/g substrate มีการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้นเพียง 13 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น. การใช้เอนไซม์ที่สูงจะเป็นการเพิ่มต้นทุนในการไฮโดรไลซิส, ดั้งนั้น จึงเลือกให้ที่ 40 FPU/g subdtrate เป็นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส. จากการทดลองหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในช่วง 0.8-140 FPU/g substrate ของกิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) พบว่า ที่ปริมาณเอนไซม์ 4.079 FPU/g substrate เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการเปลี่ยนแป้งของเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาล. เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลของเหง้ามันสำปะหลังมีค่าเพิ่มขึ้น. แต่เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์มากเกินไป จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จนกระทั่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ปฏิกิริยาจึงหยุด ไม่มีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นอีก.

3. พีเอช (pH)

ในการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบอ้อยช่วง 3.5-6.0 ของ Krishna *et al.* (1998) พบว่า ที่พีเอช 4.5 จะเป็นพีเอชที่ทำให้ เกิดการไฮโดรไลซิสได้มากที่สุด. แต่จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสเหง้ามันสำปะหลังช่วง 4.0-6.0 ของกิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) พบว่า ที่พีเอช 4.8 จะเป็นพีเอชที่ให้ค่าการเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด เนื่องจากค่าความเป็นกรดเบสมีผลทำให้กรดแอมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์มีการแตกตัวของอิออนให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการจับของเอนไซม์กับสารตั้งต้น.

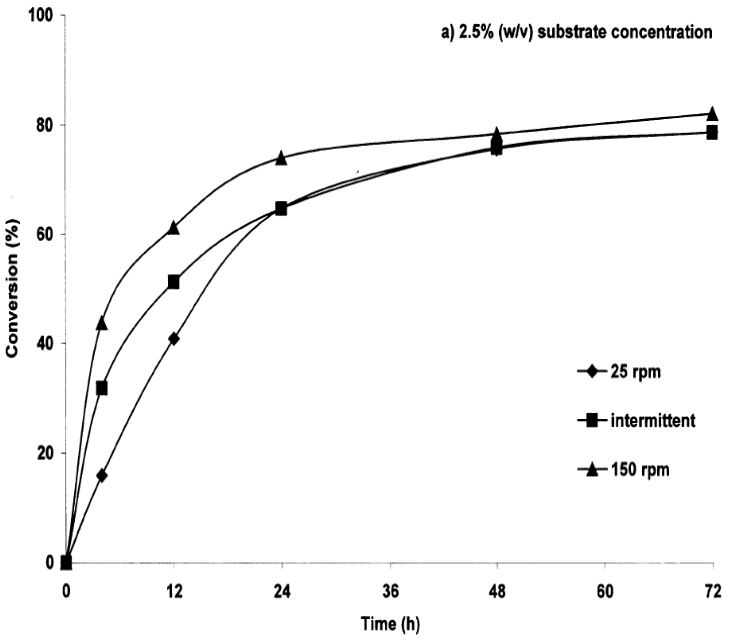
4. อุณหภูมิ (Temperature)

จาการศึกษาอุณหภูมิในการไฮโดรไลซิสใบอ้อยช่วง 35-65 องศาเซลเซียส ของ Krishna *et al.* (1998) พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องสาเซลเซียส การไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นได้เร็ว และได้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุด. แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60 และ 65 องศาเซลเซียส การไฮโดรไลซิสลดลง. ส่วนอุณหภูมิต่ำว่า 50 องศาเซลเซียส (35-50 องศาเซลเซียส) การไฮโดรไลซิสจะเพิ่มขึ้นตามอุณภูมิที่เพิ่มขึ้น. จากการรายงานของของกิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ในการศึกษาอุณหภูมิในการไฮโดรไลซิสเหง้ามันสำปะหลังช่วง 35-60 องศาเซลเซียส, ปรากฏว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส เนื่องจาก เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ทั้งเอนไซม์และสารตั้งต้นมีพลังงานจลน์เพิ่มขึ้น, ทำให้การชนกันต่อหน่วยเวลาเพิ่มขึ้น. แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เนื่องจาก ที่อุณภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีหรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา.

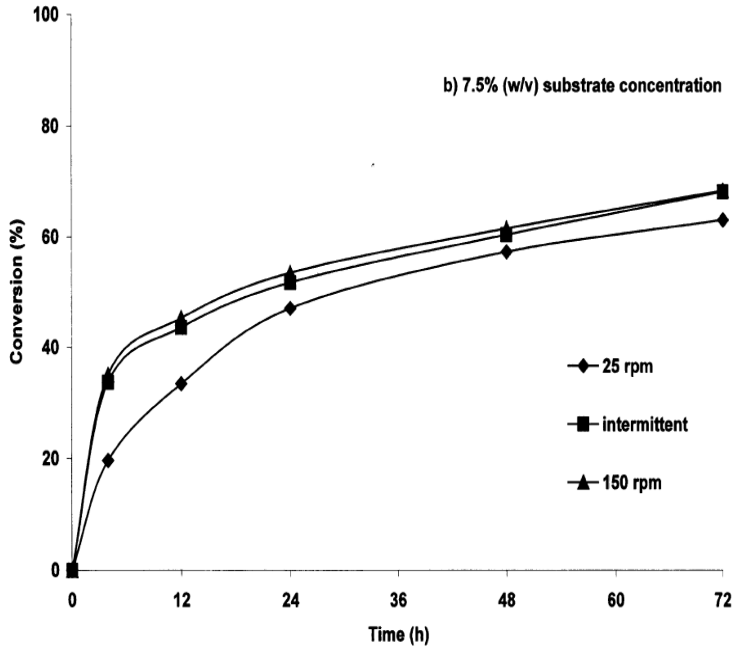
5. อัตราการเขย่า (Stering)

Ingesson *et al.* (2001) กล่าวว่า ในการไฮโดรไลซิสโดยใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการเขย่าที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (25, 100, 150 รอบต่อนาที) จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสุดท้ายเล็กน้อย (72 ชั่วโมง) แต่จะมีผลต่ออัตราการไฮโดรไลซิสเริ่มต้นมาก ดังแสดงในรูปที่ 16a. สำหรับอัตราการเขย่าสูงสุด (150 รอบต่อนาที) จะมีอัตราการไฮโดรไลซิสเริ่มต้นสูงสุด และมีการเปลี่ยนแปลงสุดท้ายมากสุด (82 เปอร์เซ็นต์), ตามด้วยอัตราการเขย่าปานกลางและอัตราการเขย่าต่ำสุด (100 และ 25 รอบต่อนาที ตามลำดับ) และทั้งสองมีอัตราการไฮโดรไลซิสสุดท้ายเป็น 79 เปอร์เซ็นต์.

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นเป็น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1.9b) อัตราการไฮโดรไลซิสเริ่มต้นและการเปลี่ยนแปลงหลัง 72 ชั่วโมง ลดลงในทั้ง 3 อัตราการเขย่า. สำหรับอัตราการเขย่าสูงสุด (150 รอบต่อนาที) และอัตราการเขย่าปานกลาง (100 รอบต่อนาที) จะมีการเปลี่ยนแปลงเท่ากันคือ 68 เปอร์เซ็นต์. ส่วนอัตราการเขย่าต่ำสุด 25 รอบต่อนาที จะมีการเปลี่ยนแปลงต่ำกว่าเล็กน้อย (63 เปอร์เซ็นต์). จากข้อมูลข้างต้นจะอธิบายได้ว่า ปัจจัยของการเขย่าจะมีผลต่อการ adsorption และ desorption. ทุกอัตราการเขย่าจะมีอัตราการ adsorption เริ่มต้นอย่างรวดเร็ว ตามด้วยการ desorption ของเอนไซม์, ซึ่งจะดำเนินอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดเวลา. ปัจจัยนี้จะมีผลเป็นอย่างมาก ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 150 รอบต่อนาที, ซึ่ง 35 เปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ที่เติมลงไปจะถูกดูดซับภายในเวลา 4 ชั่วโมง. ส่วนที่อัตราการเขย่า 25 รอบต่อนาที จะมีการดูดซับที่ต่ำกว่า.



(a)



(b)

รูปที่ 1.9. การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของเซลลูโลสด้วยอัตราการเขย่าที่แตกต่างกัน.
(a) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
(b) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

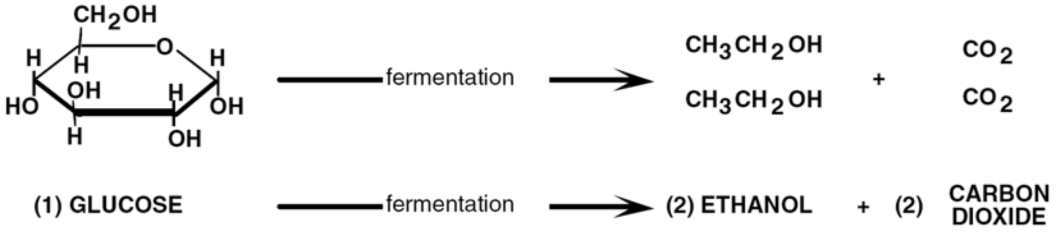
ที่มา: Ingesson *et al*. (2001).

1.2.3.3 การหมักเอทานอล (Ethanol fermentation)

ในกระบวนการผลิตเอทานอล, กระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์เปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล ดังสมการ.

น้ำตาล + ยีสต์ ⟶ เอทานอล + คาร์บอนไดออกไซด์ + พลังงาน

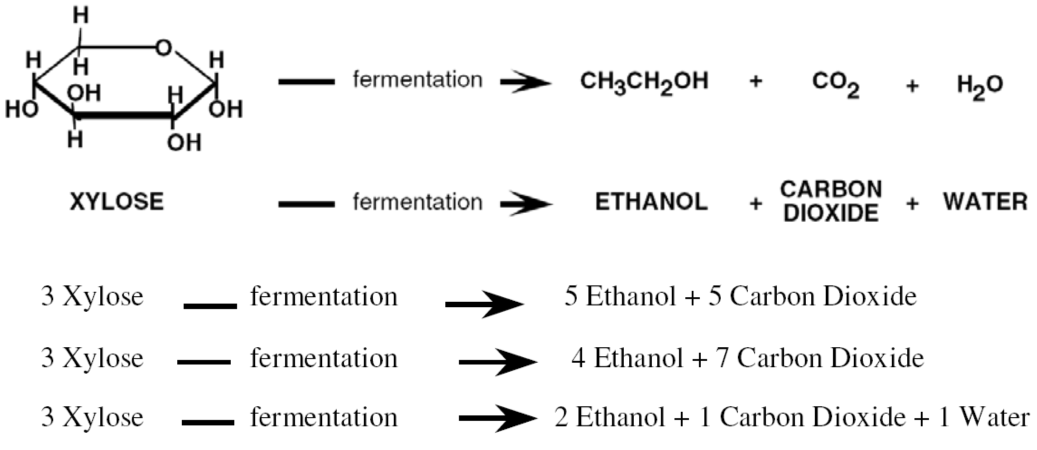
Murphy and McCarthy (2005) ได้รายงานการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเอทานอลจากน้ำตาลแต่ละประเภทว่า น้ำตาลแต่ละประเภทเมื่อนำมาหมักเป็นเอทานอลจะได้ปริมาณเอทานอล และผลผลิตอื่นๆ ที่แตกต่างกัน. ตัวอย่างเช่น กลูโคส 1 โมเลกุล เมื่อนำมาหมักเป็นเอทานอล จะได้เอทานอล 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล, ดังรูปที่ 1.10.



รูปที่ 1.10. การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล.

ที่มา: Murphy and McCarthy (2005).

ส่วนน้ำตาลไซโลส, เมื่อนำมาหมักจะเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำออกมาด้วย. ส่วนเอทานอลจะได้ในปริมาณที่ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสภาวะและสายพันธ์เชื้อที่ใช้, ดังรูปที่ 1.11.



รูปที่ 1.11. การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล.

ที่มา: Murphy and McCarthy (2005).

สำหรับจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลนั้นมีหลายชนิด อย่างเช่น *Saccaromyces cerevisiae, Zymomonas mobis, Kluyveromyces marxianus* เป็นต้น. ระบบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล จะมีทั้งระบบต่อเนื่องและระบบครั้งคราว, แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้แบบครั้งคราว. อุณหภูมิที่ใช้หมักโดยทั่วไปประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าการหมักเครื่องดื่ม. การหมักที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ใช้ระยะเวลาการหมักน้อยลง จึงช่วยลดต้นทุนการผลิต (ศิริโภค 2544).

Karimi *et al.* (2006) ทำการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวด้วยกรดเจือจาง, ผลปรากฏว่า เชื้อ *Mucor indicus* สามารถผลิตเอานอลได้ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส, แต่ไม่สามารถผลิตเอทานอลจากไซโลสได้ ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ, แต่ภายใต้สภาวะมีอากาศ สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้, โดยสามารถผลิตเอทานอลได้ทั้งหมด 0.24 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล. ส่วนเชื้อ *Pichia stipitis* สามารถผลิตเอทานอลได้สูง 0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล.

แกล้วกล้า (2538) อ้างโดยกิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5013 พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน, จะได้เอทานอลเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร.

กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ได้ทำการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสเหง้ามันสำปะหลัง ด้วยเชื้อ *Zymomonas mobilis* strain TISTR 405 โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 ภายในเวลา 60 ชั่วโมง, จะได้เอทานอล 10.60 กรัมต่อลิตร และผลผลิต 69.84 เปอร์เซ็นต์.

Srinorakutara *et al.* (2004) ได้ผลิตเอทานอลจากของเสียของโรงงานแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งในขั้นตอนแรกทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ได้ปริมาณน้ำตาล 122.4 กรัมต่อลิตร. ต่อจากนั้นหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 10 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นเชื้อ $1x\ 10^7$ CFU/mL ใช้อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, ปรากฏว่า ผลิตเอทานอลได้มากที่สุด 3.84 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 36 ชั่วโมง. แต่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง ได้เอทานอล 3.62 เปอร์เซ็นต์.

Chen *et al.* (2007) ผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของ corn cob ที่เตรียมด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเชื้อ *Saccharomyces ceresiae* 316 โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 95.3 กรัมต่อลิตร, สามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 45.7 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลาเพียง 18 ชั่วโมง.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 ฟางข้าว

ฟางข้าว นำมาบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดน้อยกว่า 30 มิลลิเมตร เก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติก. จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ ก่อนที่จะนำมาใช้.

2.1.1.1 เอนไซม์

1. เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้ายี่ห้อ Accellerase 1,000™ จากบริษัท สยามวิคตอรี่ จำกัด (มหาชน), มีกิจกรรมเท่ากับ 367.2 $\pm$ 3.10 FPU/mL วัดด้วยวิธี Filter Paper Activity ที่พีเอช 4.8, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Ghose 1985).

2. เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้ายี่ห้อ Celluclast 1.5L จากบริษัท อีสเอเชียติก จำกัด (มหาชน), มีกิจกรรมเท่ากับ 290.3 $\pm$ 0.95 FPU/mL วัดด้วยวิธี Filter Paper Activity ที่พีเอช 4.8, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Ghose 1985).

2.2 อุปกรณ์

1. เครื่องฆ่าเชื้อ (Autoclave).
2. ขวดสำหรับเตรียมฟางข้าว (Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร).
3. ผ้าขาวบางที่อบและชั่งน้ำหนักแล้ว.
4. กรวยกรอง.
5. บีกเกอร์.
6. ช้อนตักสาร.
7. ตู้อบ.
8. ตะแกรงสำหรับร่อนฟางข้าว.
9. เครื่องสับผักตบชวา.
10. ผ้าปิดจมูก.
11. เครื่อง GC.
12. หลอดทดลอง.

2.3 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก.
2. DNS (Dinitrosalicylic acid).
3. Citrate buffer.
4. น้ำกลั่น.

2.4 วิธีการดำเนินงาน

2.4.1 วิธีการเก็บรักษาฟางข้าว

นำฟางข้าวไปลดขนาดให้น้อยกว่า 30 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องสับผักตบชวา. จากนั้น เก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง ให้พ้นความชื้น, เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป.

2.4.2 ศึกษาวิธีการเตรียมทางกายภาพเพื่อหาขนาดอนุภาคที่เหมาะสม

นำฟางข้าวที่ลดขนาดด้วยเครื่องสับผักตบชวา ที่มีขนาดน้อยกว่า 30 มิลลิเมตร ร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดอนุภาคต่างๆ ดังนี้.

1. ขนาด 0.00-0.80 มิลลิเมตร.
2. ขนาด 0.80-1.25 มิลลิเมตร.
3. ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร.
4. ขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร.
5. ขนาด 5.00-15.00 มิลลิเมตร.
6. ขนาด 15.00-30.00 มิลลิเมตร.

ชั่งฟางข้าวขนาดต่างๆ ปริมาณ 10 กรัม, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนฟางข้าวกับสารละลายเท่ากับ 1:10). ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที. กรองแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็ง, นำส่วนของของเหลวไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสารยับยั้ง (Furfural). ส่วนของแข็งนำไปอบให้แห้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่เหลือ. ขนาดฟางข้าวที่เหมาะสมจะต้องให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง, มีปริมาณสารยับยั้งต่ำ.

2.4.3 ศึกษาวิธีการเตรียมทางเคมีเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

2.4.3.1 หาความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 10 กรัม, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นเป็น 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 และ 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนฟางข้าวกับสารละลายเท่ากับ 1:10). ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที. กรองแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็ง, นำส่วนของของเหลวไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสารยับยั้ง. ส่วนของแข็งนำไปอบให้แห้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่เหลือ. ความเข้มข้นกรดที่เหมาะสมจะต้องให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงและปริมาณสารยับยั้งต่ำ.

2.4.3.2 หาระยะเวลาที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 10 กรัม, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนฟางข้าวกับสารละลายเท่ากับ 1:10). ให้ความร้อนด้วยฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7, 15, 30, 45 และ 60 นาที. กรองแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็ง, นำส่วนของของเหลวไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสารยับยั้ง. ส่วนของแข็งนำไปอบให้แห้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่เหลือ. ระยะเวลาที่เหมาะสมจะต้องให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงและปริมาณสารยับยั้งต่ำ.

2.4.3.3 หาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 10 กรัม, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนฟางข้าวกับสารละลายเท่ากับ 1:10). ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110, 115 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.2. กรองแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็ง, นำส่วนของของเหลวไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสารยับยั้ง. ส่วนของแข็งนำไปอบให้แห้ง วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่เหลือ อุณหภูมิที่เหมาะสมจะต้องให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูง ปริมาณสารยับยั้ง (Furfural) ต่ำ.

2.4.4 ศึกษาระเวลาการแช่ตัวอย่างในกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสม ก่อนการเตรียม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 10 กรัม เติมกรดซัลฟุริกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนฟางข้าวกับสารละลาย

เท่ากับ 1:10) แช่ตัวอย่างเป็นเวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.3 เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.2 กรองแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็ง, นำส่วนของของเหลวไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสารยับยั้ง. ส่วนของแข็งนำไปอบให้แห้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่เหลือ. ระยะเวลาการแช่ที่เหมาะสมจะต้องให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงและปริมาณสารยับยั้งต่ำ.

2.4.5 ศึกษาการไฮโดรไลซิสฟางข้าวด้วยเอนไซม์

2.4.5.1 ชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 10 กรัม, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร, แช่ตัวอย่างเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4. หลังจากนั้น ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.3, เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.2. ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง, ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร. จากนั้น เติมเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ (Accellerase 1000^{TM}, Celluclast 1.5L และ Accellerase 1000^{TM} + Celluclast 1.5L) ปริมาณ 20 FPU/g substrate, บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, ชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.5.2 ปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 7.5, 10.0, 12.5 15.0, 17.5 และ 20.0 กรัม, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร, แช่ตัวอย่างเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4. หลังจากนั้น ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.3, เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.2. ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง, ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร. จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสชนิดที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.1 ปริมาณ 20 FPU/g substrate, บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, ปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสม จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.5.3 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.2, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร, แช่ตัวอย่างเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4. หลังจากนั้น ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.3, เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.2. ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง, ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร. จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสชนิดที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.1 ปริมาณ 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 FPU/g substrate, บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.5.4 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.2, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร, แช่ตัวอย่างเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4. หลังจากนั้น ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.3, เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.2. ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง, ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร. จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสชนิดที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.1, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.3. บ่มที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, อุณหภูมิที่เหมาะสม จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.5.5 พีเอชที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.2, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร, แช่ตัวอย่างเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4. หลังจากนั้น ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.3, เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.2. ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง, ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.0, 4.5, 4.8, 5.0, 5.2 และ 5.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร. จากนั้น เติมเอนไซม์เซลลูเลสชนิดที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.1, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.3. บ่มด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.4, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, อุณหภูมิที่เหมาะสมจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.6 ศึกษาการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ จากสภาวะการเตรียมฟางข้าวที่รุนแรง (3.0%,w/v H_2SO_4 อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที)

2.4.6.1 ชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.1, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร. หลังจากนั้นให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที. ทำให้เย็นแล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์. จากนั้น เติมเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ (Accellerase 1000™, Celluclast 1.5L และAccellerase 1000™ + Celluclast 1.5L) ปริมาณ 20 FPU/g substrate, บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, ชนิดเอนไซม์ที่เหมาะสม จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.4.2 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.1, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร. หลังจากนั้นให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที. ทำให้เย็นแล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์. เติมเอนไซม์ชนิดที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4.1 ปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 FPU/g substrate, บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.1, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร. หลังจากนั้นให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที. ทำให้เย็นแล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์. เติมเอนไซม์ชนิดที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4.1, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4.2 . บ่มที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, อุณหภูมิที่เหมาะสม จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.4.4 หาพีเอชที่เหมาะสม

ชั่งฟางข้าวขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.2, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5.1, เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร. หลังจากนั้นให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที. ทำให้เย็น แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.0, 4.5, 4.8, 5.0, 5.2 และ 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์. เติมเอนไซม์ชนิดที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4.1, ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4.2. บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.4.3, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น, พีเอชที่เหมาะสม จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ % Saccharification ที่สูง.

2.4.7 ศึกษาการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ในระดับถังหมัก 5,000 มิลลิลิตร

ชั่งฟางข้าวขนาดและปริมาณ แล้วเตรียมด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5 และ 2.4.6 (ปริมาณ 30 ขวด). จากนั้น ทำให้เย็นโดยการแช่ในน้ำ. ถ่ายฟางข้าวมารวมกันและปรับพีเอชให้ใกล้เคียง 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์. แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้จนละเอียด, เติมเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.5 และ 2.4.6, แล้วผสมให้เข้ากัน. จากนั้นใส่ลงไปในถังหมักขนาด 5,000 มิลลิลิตร, ไฮโดรไลซิสที่พีเอช 5.0, อุณหภูมิ 50°ซ., อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที, เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง. เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3 , 6, 9 ,12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที. นำสารละลายใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.

2.4.8 ศึกษาการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการเตรียม และการไฮโดรไลซิสฟางข้าว

2.4.8.1 ศึกษาชนิดของเชื้อในการหมักเอทานอล

นำสารละลายที่ได้จากการเตรียมและการไฮโดรไลซิสจากข้อ 2.4.7, มาเติมด้วย Yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 7H_2O$ 0.025 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)HPO_4$ 0.50 กรัมต่อลิตร, ปรับพีเอชให้ได้ 5.0. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที, ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง. จากนั้น เติมเชื้อชนิดต่างๆ (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* และ *Candida shehatae*) ที่เตรียมเชื้อเริ่มต้นด้วย YM broth, โดยเติมลงไปให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, หมักที่อุณหภูมิ 30°ซ. เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง, วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเชื้อยีสต์.

2.4.8.2 ศึกษาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

นำสารละลายที่ได้จากการเตรียม และการไฮโดรไลซิสจากข้อ 2.4.7, มาเติมด้วย Yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 7H_2O$ 0.025 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)HPO_4$ 0.50 กรัมต่อลิตร, ปรับพีเอชให้ได้ 5.0. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที, ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง. จากนั้น เติมเชื้อที่ได้จากข้อ 2.4.8.1 ปริมาณต่างๆ (เชื้อเริ่มต้น 5 x 10^6,1 x 10^7, 5 x10^7 และ 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร), หมักที่อุณหภูมิ 30°ซ. เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง, วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเชื้อยีสต์.

2.4.8.3 ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอล

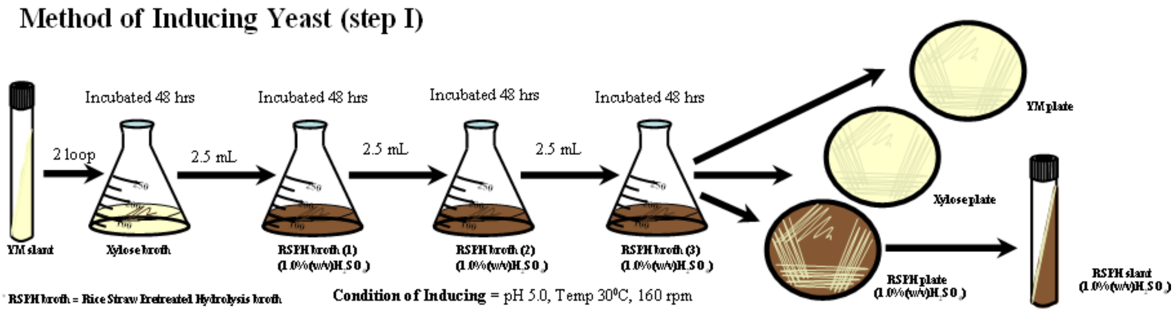
วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ (ครั้งที่ 1)

นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ใน YM slant (*P.stipitis* และ *C.shehatae*) ถ่ายลงสู่ Xylose broth, บ่มที่อุณภูมิ 30°ซ. เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง, เพื่อให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตและปรับสภาพเข้าสู่การใช้น้ำตาลไซโลส. จากนั้น ถ่ายเชื้อลงสู่สารอาหารที่เตรียมจากละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0% (w/v) (RSPH broth), ตามรูปที่ 3.42 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง. จากนั้น ถ่ายลงสู่สารอาหารที่เตรียมจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงเช่นเดิม เป็นจำนวน 2 ครั้ง. จากนั้น เขี่ยเชื้อลงบ่นอาหารแข็งที่เตรียมด้วยสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0%, w/v (RSPH plate). เก็บเชื้อบนวุ้นเอียงที่เตรียมด้วยสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0%,w/v (RSPH slant) เก็บไว้ในตู้เย็น.

ในการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำข้างต้น ทำโดยถ่ายเชื้อยีสต์จากข้างต้น ลงในสารอาหารที่ประกอบด้วย YM broth 50 มิลลิลิตรและสารละลายที่ได้จากการเตรียมและการไฮโดรไลซิสฟางข้าว 50 มิลลิลิตร, บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก (รูปที่ 2.1).

น้ำหมักเตรียมโดยนำสารละลายที่ได้จากการเตรียมและการไฮโดรไลซิสจากข้อ 4.7, มาเติมด้วย Yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 7H_2O$ 0.025 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)HPO_4$ 0.50 กรัมต่อลิตร, ปรับพีเอชให้ได้ 5.0. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที, ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง. จากนั้น เติมเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเตรียมเชื้อข้างต้นปริมาณ 1x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร,

บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง, วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอล.



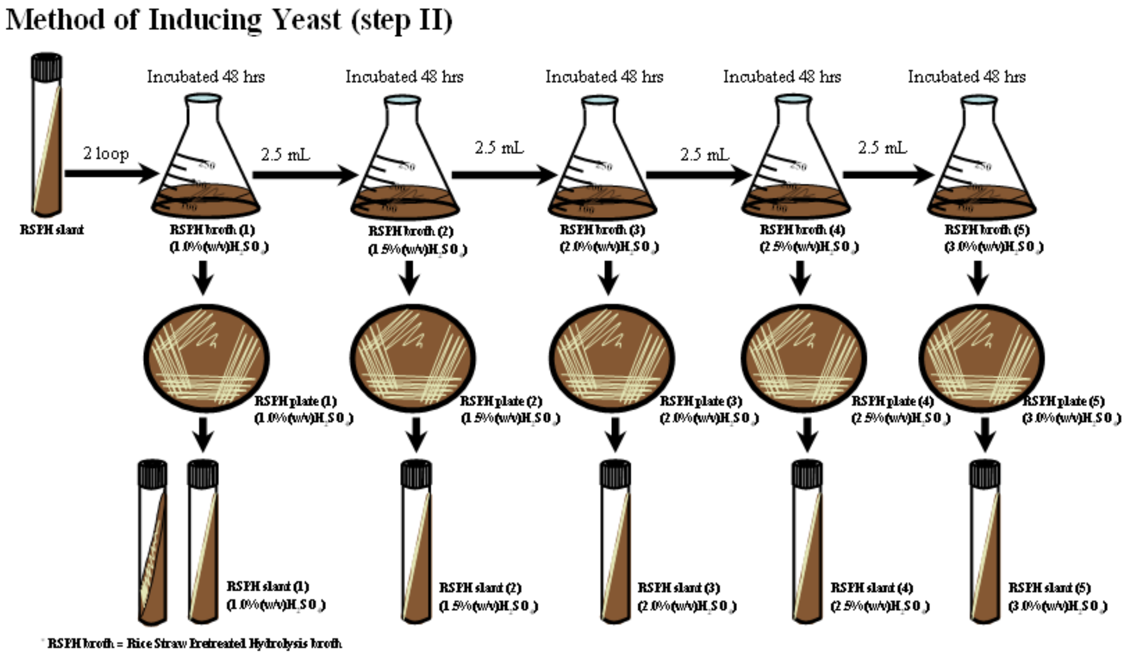
รูปที่ 2.1. กระบวนการเหนี่ยวนำยีสต์ให้สามารถเจริญเติบโตและหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าว.

วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ (ครั้งที่ 2)

ถ่ายเชื้อยีสต์ที่ได้ทำการเหนี่ยวนำในขั้นต้น (ปรับปรุงสายพันธุ์ครั้งที่ 1) จาก RSPH slant ลงสู่สารอาหารที่เตรียมจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0%(w/v). จากนั้น ถ่ายเชื้อลงสู่สารอาหารที่เตรียมจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0%(w/v) ตามลำดับ. โดยแต่ละความเข้มข้นจะบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง, เก็บเชื้อที่ได้ ในแต่ละความเข้มข้นไว้บน RSPH slant ตามรูปที่ 3.43.

ในการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำครั้งที่ 2 ที่ระดับความเข้มข้นกรดสุดท้าย (3.0%,w/v), ทำโดยถ่ายเชื้อยีสต์จากข้างต้น ลงในสารอาหารที่ประกอบด้วย YM broth 50 มิลลิลิตรและสารละลายที่ได้จากการเตรียม 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก.

น้ำหมักเตรียมโดยนำสารละลายที่ได้จากการเตรียมและการไฮโดรไลซิสจากข้อ 2.4.7, มาเติมด้วย Yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 7H_2O$ 0.025 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)HPO_4$ 0.50 กรัมต่อลิตร, ปรับพีเอชให้ได้ 5.0. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที, ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง. จากนั้น เติมเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเตรียมเชื้อข้างต้นปริมาณ 1x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง, วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอล (รูปที่ 2.2).



รูปที่ 2.2. การปรับสภาพเชื้อด้วยสารอาหารที่ได้จากการไฮโดรไลซีสฟางข้าวด้วยกรดความเข้มข้นต่างๆ.

2.4.8.4 ศึกษาการหมักเอทานอลแบบนึ่งฆ่าเชื้อ และไม่นึ่งฆ่าเชื้อ

นำสารละลายที่ได้จากการเตรียมและการไฮโดรไลซิสจากข้อ 2.4.7, มาเติมด้วย Yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_47H_2O$ 0.025 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)HPO_4$ 0.50 กรัมต่อลิตร, ปรับพีเอชให้ได้ 5.0. แบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที, ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง. ส่วนอีกชุดไม่ต้องทำการฆ่าเชื้อ. จากนั้น เติมเชื้อยีสต์เริ่มต้นปริมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง, วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอล.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการปรับสภาพฟางข้าวทางกายภาพ (การลดขนาด)

ฟางข้าวเริ่มต้นจะมีขนาดประมาณ 20-30 เซนติเมตร มีลักษณะดังรูปที่ 3.1. หลังจากบดด้วยเครื่องสับผักตบชวา (รูปที่ 3.2) ด้วยอัตรา 18.18 กิโลกรัมต่อชั่วโมง, จะมีขนาดน้อยกว่า 30 มิลลิเมตร (ประมาณ 3 เซนติเมตร) มีลักษณะดังรูปที่ 3.3 และ 3.4, เหลือปริมาณฟางข้าวหลังบด 91.50%(w/w). โดยสามารถสรุปกระบวนการลดขนาดของฟางข้าว เพื่อให้ได้ขนาดตามที่ต้องการได้ตามรูปที่ 3.5, ซึ่งจากการร่อนเพื่อแยกขนาดตามที่ต้องการ จะให้ปริมาณแตกต่างกันตามตารางที่ 3.1.

ตารางที่ 3.1. ปริมาณฟางข้าวขนาดต่างๆ ที่ได้จากการบดด้วยเครื่องสับผักตบชวา

Size (mm)	Contents (%,w/w)
0.00-0.80	2.61
0.80-1.25	1.57
1.25-2.00	6.40
2.00-5.00	34.60
5.00-15.00	24.41
15.00-30.00	30.42

จะเห็นได้ว่า หลังจากบดด้วยเครื่องสับผักตบชวา ขนาดของฟางข้าวที่ได้โดยส่วนมากจะมีขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ (ขนาดมากกว่า 2.00 มิลลิเมตร) จะมีประมาณ 90%(w/w), ส่วนขนาดเล็ก (ขนาดน้อยกว่า 2.00 มิลลิเมตร) จะได้ประมาณ 10%(w/w) เท่านั้น. ดังนั้น ในการลดขนาดของฟางข้าว ถ้าต้องการฟางข้าวที่มีขนาดใหญ่กว่า 2.00 มิลลิเมตรขึ้นไปหรืออยู่ในช่วง 2.00-30.00 มิลลิเมตร, เครื่องสับผักตบชวา จะเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการใช้ลดขนาดฟางข้าวให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ. แต่ถ้าต้องการฟางข้าวที่มีขนาดน้อยกว่า 2.00 มิลลิเมตร จะยังเป็นเครื่องมือที่ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้เพียงเครื่องเดียว อาจจะต้องมีเครื่องบดเพิ่มเติมหรือทำการบดซ้ำอีกครั้ง.

จากผลการศึกษา พบว่า ฟางข้าวจะมีองค์ประกอบตามตารางที่ 3.2, จะเห็นได้ว่า จะมีองค์ประกอบส่วนสำคัญที่สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ค่อนข้างสูง (ปริมาณโฮโลเซลลูโลส 65.7%,w/w), ซึ่งในองค์ประกอบส่วนนี้แบ่งเป็นปริมาณเซลลูโลสถึง 38.8%(w/w). โดยองค์ประกอบส่วนเซลลูโลสนี้ เป็นองค์ประกอบส่วนสำคัญมาก เนื่องจากประกอบด้วยน้ำตาลกลูโลส ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลสูง. นอกจากนี้ ฟางข้างยังมีข้อดีอีกอย่างหนึ่ง คือ ฟางข้าวมีปริมาณลิกนินต่ำ (11.4%,w/w) ทำให้ง่ายต่อการไฮโดรไลซิส.

จากปริมาณความชื้น จะเห็นได้ว่า ฟางข้าวมีปริมาณความชื้นที่น้อยมาก (5.9% w/w) ซึ่งจะเป็นผลดีในการเคลื่อนย้ายฟางข้าว, สามารถขนย้ายได้ง่าย ในปริมาณมากและได้ส่วนที่เป็นเนื้อฟางข้าวจริงๆ.

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพ (ข้างต้น) ไม่ว่าจะเป็นลักษณะของฟางข้าวที่มีลักษณะบาง, ง่ายต่อการลดขนาด, ความชื้นต่ำ และลักษณะองค์ประกอบทางเคมี, จะเห็นได้ว่า ฟางข้าวจะเป็นชีวมวลชนิดหนึ่งที่มีแน้วโน้ม และมีโอกาสความเป็นไปได้สูง ในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตเอทานอล.

ตารางที่ 3.2. องค์ประกอบทางเคมีของฟางข้าว

Chemical compositoin	Contents (%,w/w)
Holocellulose	65.7
Cellulose	38.8
Hemicellulose	26.9
Lignin	11.4
Moisture	5.9

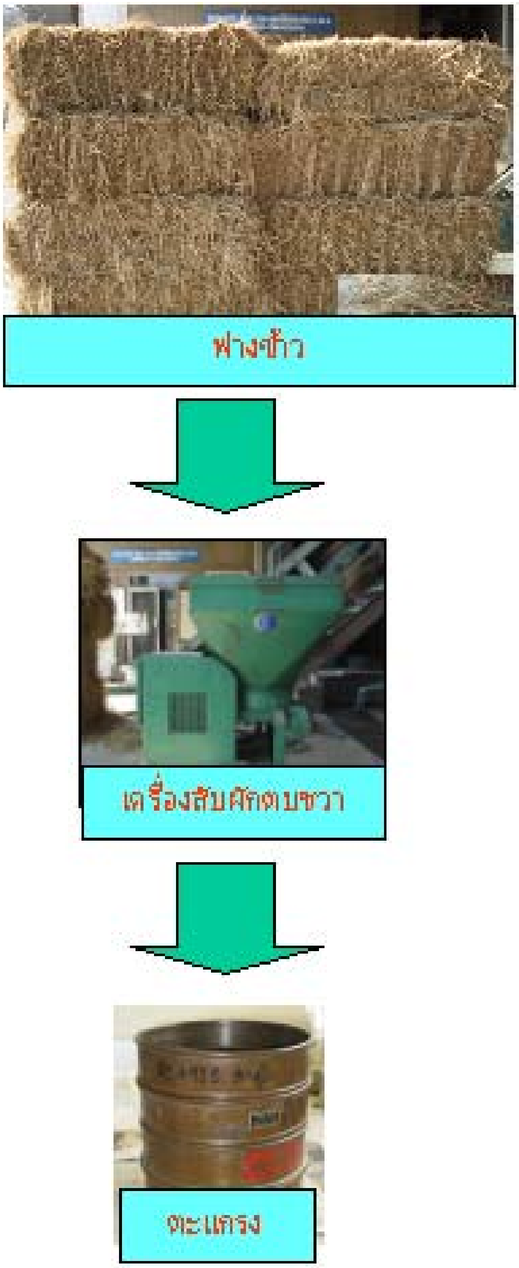
รูปที่ 3.1. ฟางข้าว (Rice straw).

รูปที่ 3.2. เครื่องสับผักตบชวา.

รูปที่ 3.3. ฟางข้าวหลังบดด้วยเครื่องสับผักตบชวา.

0.00-0.80 mm   0.80-1.25 mm   1.25-2.00 mm   2.00-5.00 mm   5.00-15.00 mm   15.00-30.00 mm

รูปที่ 3.4. ลักษณะของฟางข้าวขนาดต่างๆ ปริมาณ 10 กรัม หลังบดด้วยเครื่องสับผักตบชวา และร่อนผ่านตะแกรงขนาดต่างๆ.



รูปที่ 3.5. กระบวนการลดขนาดของฟางข้าว.

3.2 ผลการเตรียมฟางข้าวด้วยวิธีทางเคมี

3.2.1 ขนาดฟางข้าวที่เหมาะสม

จากการทดลองหาขนาดฟางข้าวที่เหมาะสมช่วง 0.00-30.00 มิลลิเมตร (ปริมาณฟางข้าว 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร) ในการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที.

ผลปรากฏว่า เมื่อขนาดของฟางข้าวเพิ่มขึ้น จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น. โดยฟางข้าวขนาด 0.00-0.80 มิลลิเมตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 25.13 ± 0.45 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.6), เมื่อขนาดฟางข้าวเพิ่มเป็น 1.25-2.00 มิลลิเมตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มเป็น 30.44 ± 0.68 กรัมต่อลิตร และฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกับขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร (30.36 ± 0.59 กรัมต่อลิตร). อย่างไรก็ตาม เมื่อขนาดของฟางข้าวเพิ่มมากกว่า 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลง. โดยขนาดของฟางข้าวเพิ่มขึ้นเป็น 5.00-15.00 มิลลิเมตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือเพียง 28.56 ± 0.77 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.6).

จากผลการทดลองที่เมื่อขนาดของฟางข้าวใหญ่ขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น. ทั้งนี้ อาจเกิดจากฟางข้าวขนาดเล็กถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกได้ดี และอาจจะถูกย่อยสลายต่อกลายเป็นฟูเฟอร์รัล, จึงอาจจะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลดลง. จากการศึกษาการไฮโดรไลซิสของทะลายปาล์มด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 ถึง 6%(w/v) ที่อุณหภูมิ 120°ซ. เป็นระยะเวลา 0 ถึง 90 นาที ของ Rahman *et al.* (2006) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกและระยะเวลาการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น จะทำให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสลดลง ปริมาณฟูเฟอร์รัลเพิ่มขึ้น, เนื่องจากน้ำตาลไซโลสถูกสลายกลายเป็นฟูเฟอร์รัลนั่นเอง, ซึ่งพบในการศึกษาครั้งนี้เช่นเดียวกัน. ในสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าว สามารถตรวจพบฟูเฟอร์รัล. อย่างไรก็ตาม ปริมาณฟูเฟอร์รัลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.6) จากการใช้ฟางข้าวขนาดเล็ก (0.00-0.80 มิลลิเมตร) และฟางข้าวขนาดใหญ่ (2.00-5.00 มิลลิเมตร) มีปริมาณฟูเฟอร์รัลใกล้เคียงกัน (0.20-0.23 กรัมต่อลิตร).

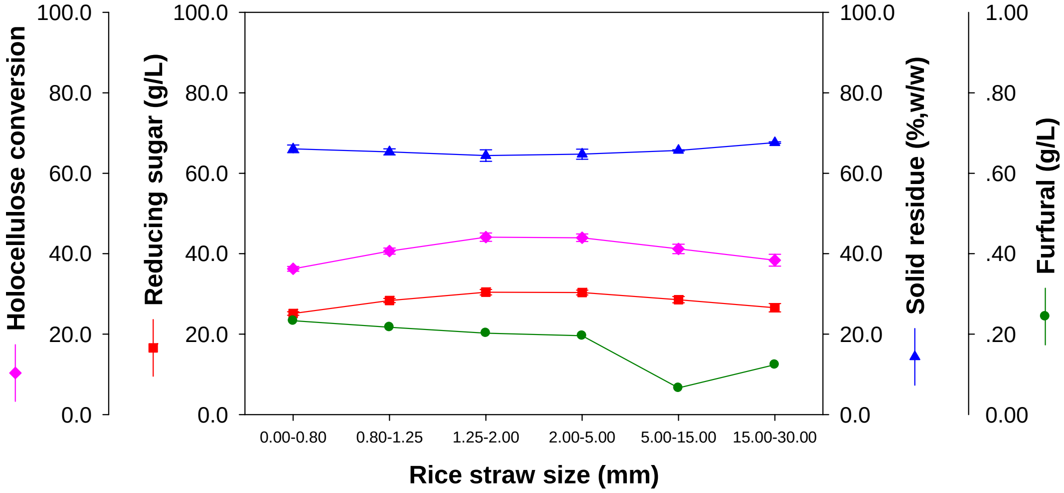
ดังนั้น จากผลการทดลอง ฟางข้าวขนาดเล็กมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าฟางข้าวขนาดใหญ่ อาจจะไม่ใช่เป็นผลมาจากการสลายตัวของน้ำตาลรีดิวซ์เป็นฟูเฟอร์รัล. แต่อาจจะเป็นผลมาจากฟางข้าวขนาดเล็กจะอัดตัวกันแน่นมากกว่าฟางข้าวขนาดใหญ่ดังรูปที่ 3.4, ทำให้การสัมผัสระหว่างสารละลายกรดซัลฟิวริกกับฟางข้าวเกิดขึ้นได้ยาก, อีกทั้งในระหว่างการเตรียมไม่ได้ทำการ

กวน. ส่วนฟางข้าวขนาดใหญ่ การสัมผัสระหว่างสารละลายกรดกับฟางข้าวเกิดขึ้นได้มากกว่า, การไฮโดรไลซิสจึงเกิดขึ้นได้สูงกว่า. แต่เมื่อฟางข้าวมีขนาดใหญ่เพิ่มมากขึ้นอีก การสัมผัสจะเกิดได้ยาก เนื่องจาก ฟางข้าวมีขนาดใหญ่เกินไป (มากกว่า 5.00 มิลลิเมตร) จะมีปริมาตรมากเกินกว่าที่สารละลายกรดจะสัมผัสได้, การไฮโดรไลซิสจึงลดลงตามไปด้วย (รูปที่ 3.7).

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าฟางข้าวขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร และ 2.00-5.00 มิลลิเมตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน, แต่ฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร จะใช้พลังงานในการบดน้อยกว่าขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร. อีกทั้งในการบดด้วยเครื่องสับผักตบชวาจะให้ฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร มากกว่าฟางข้าวขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3.3). ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า ฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร เป็นขนาดฟางข้าวที่เหมาะสมในการเตรียม. เมื่อนำมาเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้สภาวะนี้จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 30.36 ± 0.59 กรัมต่อลิตร, Holocellulose conversion 35.02 ± 0.49%(w/w) และเหลือปริมาณฟางข้าวหลังจากการเตรียม 64.75±1.26 % (w/w).

ตารางที่ 3.3. ปริมาณสารต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 0.00-30.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยความกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.00% (w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

Rice straw (mm)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/L)	Holocellulose conversion	Furfural (g/L)
0.00-0.80	66.07 ± 0.94	25.13 ± 0.45	28.51 ± 0.59	0.23
0.80-1.25	65.33 ± 0.76	28.35 ± 0.52	32.52 ± 0.58	0.22
1.25-2.00	64.40 ± 1.42	30.44 ± 0.68	35.15 ± 0.84	0.20
2.00-5.00	64.75 ± 1.26	30.36 ± 0.59	35.02 ± 0.49	0.20
5.00-15.00	65.69 ± 0.16	28.56 ± 0.77	32.26 ± 0.89	0.07
15.00-30.00	67.60 ± 0.20	26.57 ± 1.03	29.53 ± 1.02	0.12



รูปที่ 3.6. ปริมาณต่างๆ จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 0.00-30.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยความกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.00 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที.

รูปที่ 3.7. ลักษณะของฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร.

(a) หลังจากเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v)

(b) หลังเตรียมด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที (ฟางข้าว 10 กรัม ต่อปริมาณกรดซัลฟิวริก 100 มิลลิลิตร).

3.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสม

จากการศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกช่วง 0.50-1.75 %(w/v) ในการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที, ผลปรากฏว่า ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกแตกต่างกันจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันตามตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.8. ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกเพิ่มสูงขึ้น จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น. โดยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.50 %(w/v) จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 13.13±0.38 กรัมต่อลิตร (Holocellulose conversion 14.75±0.47 %,w/w) และจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 31.27±0.47 กรัมต่อลิตร (Holocellulose conversion 36.86±1.05%,w/w) เมื่อใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v). ในขณะที่การใช้น้ำกลั่นแทนกรดซัลฟิวริกในการไฮโดรไลซิส จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 4.12±0.08 กรัมต่อลิตรเท่านั้น. แสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มของกรดซัลฟิวริกเพิ่มสูงขึ้น จะมีความสามารถในการย่อยฟางข้าวให้เป็นน้ำตาลได้ดีขึ้น. อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้นกรดมากกว่า 1.00 %(w/v) จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย, อาจเนื่องมาจากฟางข้าวส่วนที่สามารถย่อยได้ด้วยกรดเจือจางเหลืออยู่น้อย ทำให้เมื่อความเข้มข้นสูงมากกว่า 1.00 %(w/v) การย่อยสลายเป็นน้ำตาลได้ปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น. ดังนั้น จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้และปริมาณ Holocellulose conversion จะสรุปได้ว่า กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม.

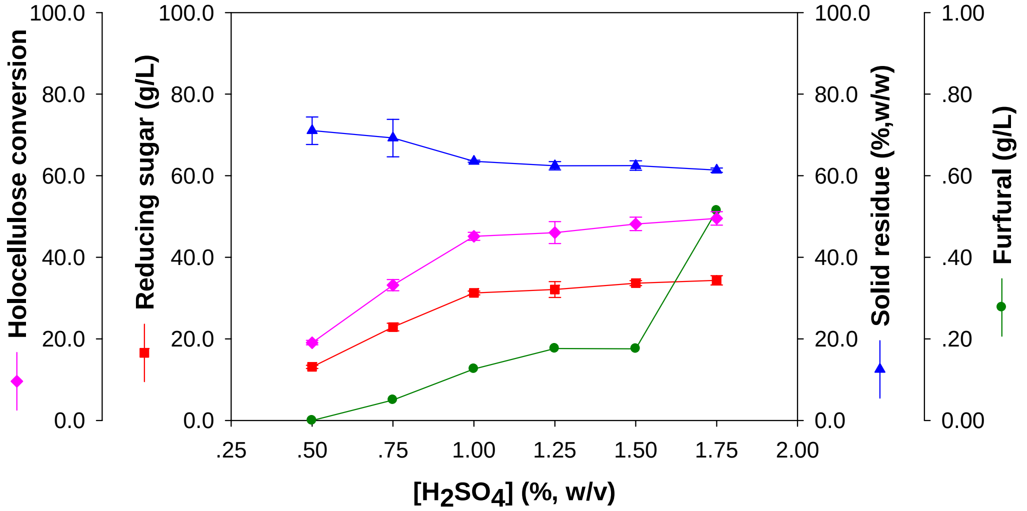
กรดซัลฟิวริกนอกจากจะสามารถย่อยฟางข้าวให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้แล้ว ยังสามารถย่อยน้ำตาลต่อไปให้เป็นฟูเฟอร์รัลได้ ซึ่งสารตัวนี้จะมีผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก. จากผลการทดลอง (ตารางที่ 3.4 และ รูปที่ 3.8) จะเห็นได้ว่า ปริมาณฟูเฟอร์รัลจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกเพิ่มขึ้น. โดยปริมาณฟูเฟอร์รัลจะเพิ่มขึ้นจาก 0.00 เป็น 0.18 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกเพิ่มขึ้นจาก 0.50 เป็น 1.50 %(w/v). แต่เมื่อความเข้มข้นกรดสูงมากกว่า 0.50 %(w/v), ปริมาณฟูเฟอร์รัลจะเพิ่มอย่างรวดเร็ว, โดยจะเพิ่มขึ้นเป็น 0.51 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นกรดเพิ่มเป็น 0.75 %(w/v). ดังนั้น จากปริมาณฟูเฟอร์รัลที่ได้ จะสรุปได้ว่า ความเข้มข้นกรดต่ำกว่า 0.50 %(w/v) เป็นปริมาณที่เหมาะสม.

จากผลการทดลองหาปริมาณความเข้มข้นกรดที่เหมาะสม ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที, สามารถสรุปได้ว่า กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) เป็นปริมาณความเข้มข้นกรดที่เหมาะสมในการเตรียม. โดยภายใต้สภาวะนี้ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 31.27±0.47 กรัมต่อลิตร, Holocellulose conversion

36.86±1.05 %(w/w), ปริมาณฟูเฟอร์รัล 0.13 กรัมต่อลิตร และเหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียม 63.54±0.26 %(w/w).

ตารางที่ 3.4. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.00-1.75 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

[H_2SO_4] %,(w/v)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/L)	Holocellulose conversion	Furfural (g/L)
0.00	84.81 ± 2.02	4.12 ± 0.08	3.09 ±0.10	0.00
0.50	71.04 ± 3.37	13.13 ± 0.38	14.75 ± 0.47	0.00
0.75	69.24 ± 4.58	22.88 ± 0.94	26.76 ± 1.30	0.05
1.00	63.54 ± 0.26	31.27 ± 0.47	36.86 ± 1.05	0.13
1.25	62.46 ± 1.01	32.11 ± 1.94	37.92 ± 2.41	0.18
1.50	62.47 ± 1.16	33.65 ± 0.61	36.67 ± 1.52	0.18
1.75	61.37 ± 0.52	34.35 ± 1.15	41.93 ± 1.24	0.51



รูปที่ 3.8. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.00-1.75 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที.

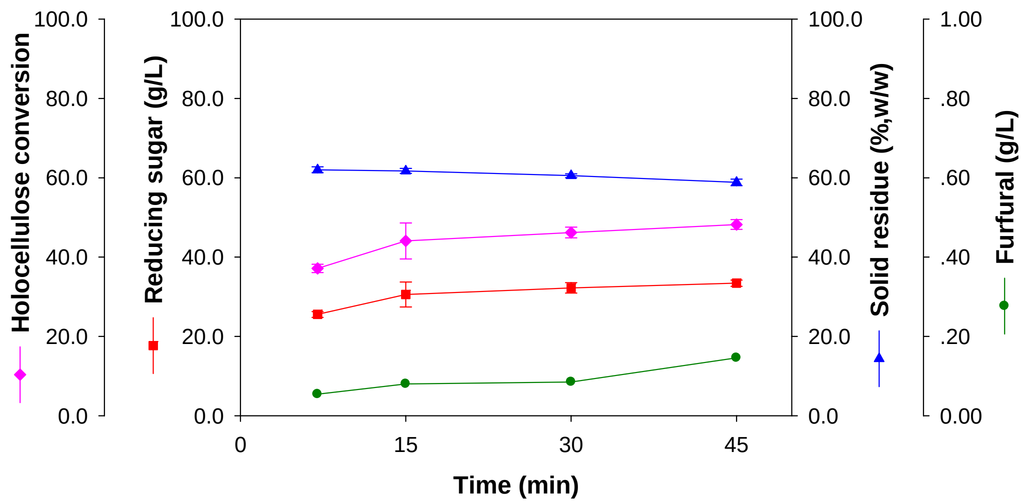
3.2.3 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม

จากการศึกษาระยะเวลาช่วง 7-60 นาที ในการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ., ผลปรากฏว่า เมื่อระยะเวลาในการเตรียมเพิ่มขึ้นจาก 7 นาที เป็น 15 นาที ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 25.55±0.73 กรัมต่อลิตร เป็น 30.58±3.14 กรัมต่อลิตร. ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จะเป็นการเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างฟางข้าวกับกรดซัลฟิวริกนั่นเอง, ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น. อย่างไรก็ตาม เมื่อระยะเวลาในการเตรียมเพิ่มมากขึ้น (เป็นระหว่าง 15-60 นาที), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสของฟางข้าวจะไม่แตกต่างกัน. ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวช่วง 15-60 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 29-33 กรัมต่อลิตร, Holocellulose conversion 30-40 %(w/w) (ตารางที่ 3.5 และ รูปที่ 3.9). ส่วนปริมาณฟูเฟอร์รัลที่เกิดขึ้น จากการใช้ระยะเวลา 15-30 นาที มีปริมาณใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับการใช้ระยะเวลาในการเตรียม 7 นาที. ส่วนระยะเวลา 45 และ 60 นาที จะให้ปริมาณฟูเฟอร์รัลสูงกว่าการใช้ระยะเวลา 7-30 นาที.

จากการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. สามารถสรุปได้ว่า ระยะเวลาการเตรียม 15 นาที เป็นระยะเวลาที่น้อยที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูง, ปริมาณสารยับยั้งต่ำ, จึงคัดเลือกให้เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียม. ภายใต้สภาวะนี้จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 30.58±3.14 กรัมต่อลิตร, Holocellulose conversion 36.55±3.34 %(w/w), ปริมาณฟูเฟอร์รัล 0.13 กรัมต่อลิตร และเหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียม 61.72±0.64 %(w/w).

ตารางที่ 3.5. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 7-60 นาที

Time (min)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/L)	Holocellulose conversion	Furfural (g/L)
7	62.01 ± 0.76	25.55 ± 0.73	30.33 ± 0.74	0.054
15	61.72 ± 0.64	30.58 ± 3.14	36.55 ± 3.34	0.126
30	60.51 ± 0.49	32.23 ± 1.31	38.94 ± 0.72	0.085
45	58.84 ± 0.82	33.42 ± 0.78	40.66 ± 0.86	0.146
60	58.70 ± 1.78	29.79 ± 0.89	35.78 ± 0.99	0.230



รูปที่ 3.9. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 7-60 นาที.

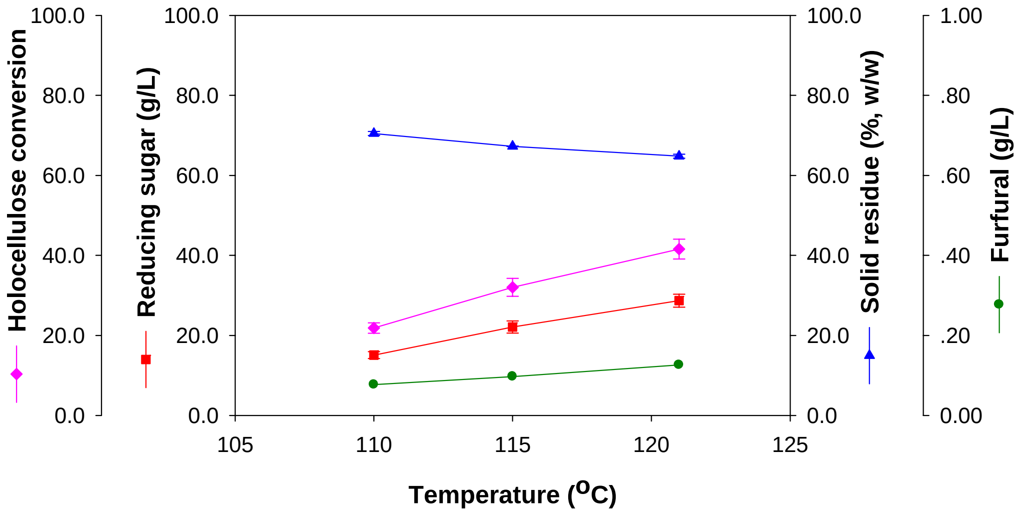
3.2.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการศึกษาอุณหภูมิช่วง 110-121 องศาเซลเซียส ในการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) เป็นเวลา 15 นาที, ผลปรากฏว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย. การเตรียมที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 15.09±0.86 กรัมต่อลิตร (Holocellulose conversion 17.93±1.27 %w/w). แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 121°ซ. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มสูงเป็น 28.68±1.62 กรัมต่อลิตร (Holocellulose conversion 33.41±2.00 %w/w) ดังแสดงในตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.10. ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิ จะเป็นการเพิ่มความสามารถของกรดในการย่อยสลายฟางข้าวให้มีมากขึ้น ส่วนปริมาณฟูเฟอร์รัลจะเพิ่มสูงขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น.

จากการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) เป็นเวลา 15 นาที, สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นอุณหภูมิที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงและปริมาณสารยับยั้งต่ำ, จึงคัดเลือกให้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียม. ภายใต้สภาวะนี้จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 28.68±1.62 กรัมต่อลิตร, Holocellulose conversion 33.41±2.00 %(w/w), ปริมาณฟูเฟอร์รัล 0.13 กรัมต่อลิตร และเหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียม 64.81±0.50 %(w/w).

ตารางที่ 3.6. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 110-121°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที

Temperature (^{0}C)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/L)	Holocellulose conversion	Furfural (g/L)
110	70.46 ± 0.52	15.05 ± 0.86	17.93 ± 1.27	0.077
115	67.27 ± 0.05	22.10 ± 1.50	26.46 ± 1.68	0.097
121	64.81 ± 0.50	28.68 ± 1.62	33.41 ± 2.00	0.126



รูปที่ 3.10. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 110-121°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที.

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมฟางข้างด้วยกรดซัลฟิวริก พบว่า ฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที, เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมฟางข้าว เพื่อใช้ในการทดลองถัดไป. ภายใต้สภาวะนี้จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 28.68±1.62 กรัมต่อลิตร, Holocellulose conversion 33.41±2.00 %(w/w), ปริมาณฟูเฟอร์รัล 0.13 กรัมต่อลิตร และเหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียม 64.81±0.50 %(w/w).

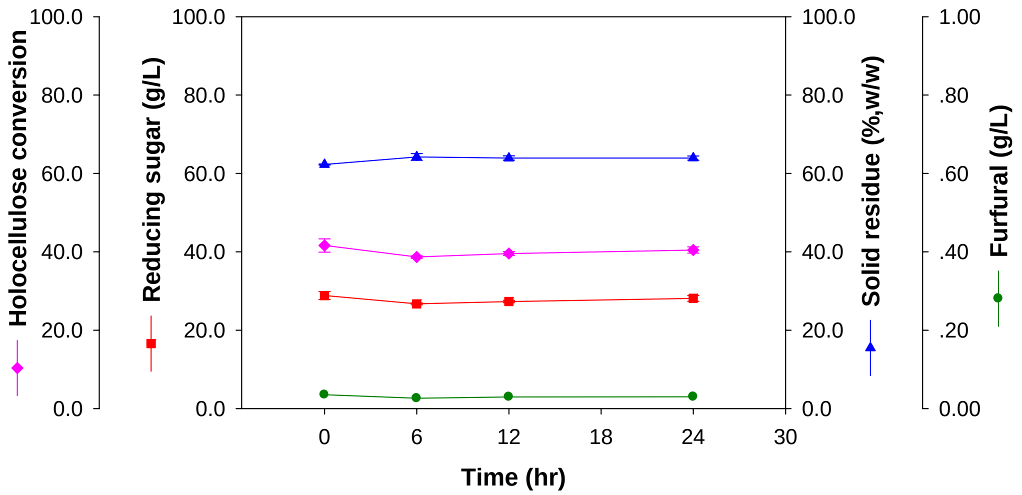
จะเห็นได้ว่า ภายใต้สภาวะนี้นอกจากจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงแล้ว จะให้ปริมาณฟูเฟอร์รัลต่ำด้วย. จากการรายงานของ Nigam (2001), ปริมาณฟูเฟอร์รัลเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร จะไม่มีผลต่อการลดลงของปริมาณการผลิตเอทานอล, แต่เมื่อความเข้มข้นของฟูเฟอร์รัลมากกว่า 1.50 กรัมต่อลิตร ทำให้การเจริญของยีสต์ และการผลิตเอทานอลลดลงร้อยละ 90.4 และ 85.1, ตามลำดับ.

3.2.5 ผลการศึกษาการแช่ตัวอย่างก่อนการเตรียมด้วยสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น

จากการศึกษาระยะเวลาการแช่ฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ในสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเตรียมด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้างต้น (อุณหภูมิ 121°ซ. ระยะเวลา 145 นาที), ผลปรากฏว่า การแช่ฟางข้าวในสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) เป็นระยะเวลาต่างๆ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกัน. โดยจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 26-28 กรัมต่อลิตร, ส่วนปริมาณฟูเฟอร์รัลจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อระยะเวลาการแช่ฟางข้าวเพิ่มขึ้น. โดยปริมาณฟูเฟอร์รัลมีปริมาณ 0.03-0.04 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่า 0.25 กรัมต่อลิตร จะไม่เป็นปัญหาต่อระบบการหมักเอทานอลมากหนัก (ตารางที่ 3.7 และ รูปที่ 3.11). ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่า ไม่จำเป็นต้องแช่ตัวอย่างในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ก่อนการเตรียมด้วยสภาวะที่เหมาะสม.

ตารางที่ 3.7. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที โดยมีการแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง ก่อนเตรียม

Time (hr)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/L)	Holocellulose conversion	Furfural (g/L)
0	62.27 ± 0.16	28.83 ± 1.01	33.70 ± 1.23	0.035
6	64.22 ± 0.86	26.72 ± 0.26	31.84 ± 0.28	0.026
12	63.92 ± 0.56	27.31 ± 0.32	32.71 ± 0.88	0.029
24	63.94 ± 0.52	28.12 ± 0.72	33.59 ± 0.39	0.030



รูปที่ 3.11. ปริมาณต่างๆ หลังจากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที โดยมีการแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง ก่อนเตรียม.

3.3 ผลการศึกษาการไฮโดรไลซิสฟางข้าวด้วยเอนไซม์

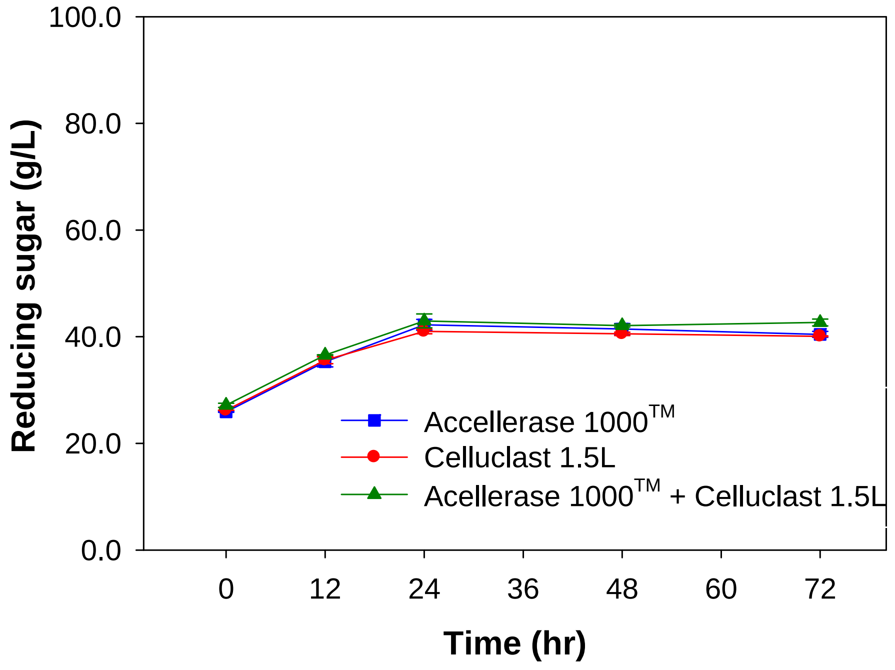
3.3.1 ชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม

จากการศึกษาชนิดของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าสองชนิดคือ Accellerase 1000™ และ Celluclast 1.5L ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิลิตร ที่เตรียมด้วยสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น, ผลปรากฏว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิด ให้ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3.8). โดยจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 40 กรัมต่อลิตร. ส่วนการผสมระหว่างเอนไซม์ทั้งสองชนิด จะให้ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าเล็กน้อย. ส่วนการเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว (Rice straw conversion) จากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ จะสูงกว่าการไฮโดรไลซิสด้วย Celluclast 1.5L. ส่วนปริมาณ Holocellulose และ Cellulose conversion ก็เช่นกัน การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ จะสูงกว่าการไฮโดรไลซิสด้วย Celluclast 1.5L.

ส่วนความเร็วในการไฮโดรไลซิสระหว่างเอนไซม์ทั้งสองชนิด มีลักษณะใกล้เคียงกันตามรูปที่ 3.12. โดยในการไฮโดรไลซิสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง, เอนไซม์ Accellerase 1000™ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 42.24 กรัมต่อลิตร (1.76 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ใกล้เคียงกับการไฮโดรไลซิสด้วย Celluclast 1.5L (1.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง), ดังแสดงในตารางที่ 3.9.

ตารางที่ 3.8. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อ สารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Enzyme	Reducing sugar (g/L)	Rice straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
Accellerase 1000™	40.44 ± 0.54	387.44 ± 7.31	53.07 ± 1.00	32.27 ± 1.59	46.61 ± 2.73	90.5 ± 0.7
Celluclast 1.5L	40.10 ± 0.09	363.71 ± 2.16	49.82 ± 0.30	29.24 ± 0.05	42.57 ± 0.65	85.5 ± 0.7
Accellerase 1000™ + Celluclast 1.5L	42.68 ± 0.64	405.13 ± 9.29	55.50 ± 1.27	34.18 ± 2.51	42.95 ± 0.97	89.5 ± 0.7



รูปที่ 3.12. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, Holocellulose conversion, Cellulose conversion และความเร็วระหว่างการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด, บ่งบอกได้ว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถใกล้เคียงกันในการไฮโดรไลซิส. อย่างไรก็ตาม ปริมาณต้นทุน (ราคา) ของเอนไซม์ Accellerase 1000™ (200 บาทต่อกิโลกรัม) มีราคาถูกกว่าเอนไซม์ Celluclast 1.5L (1500 บาทต่อกิโลกรัม), ดังนั้น จึงคัดเลือกให้เอนไซม์ Accellerase 1000™ เป็นเอนไซม์ที่เหมาะสม และใช้ในการศึกษาการไฮโดรไลซิสฟางข้าวถัดไป.

ตารางที่ 3.9. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Enzyme		
	Accellerase 1000™	Celluclast 1.5L	Accellerase 1000™ + Celluclast 1.5L
0	25.93 ± 0.09	26.20 ± 0.00	27.16 ± 0.38
12	35.29 ± 0.94	35.60 ± 0.64	36.58 ± 0.02
24	42.24 ± 1.01	40.99 ± 0.41	42.96 ± 1.30
48	41.45 ± 1.03	40.54 ± 0.31	42.10 ± 0.28
72	40.44 ± 0.54	40.10 ± 0.01	42.68 ± 0.64

3.3.2 ปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสม

จากการศึกษาปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสมช่วง 7.5-20.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ในการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิลิตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v)อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที. จากนั้น ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิด Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที, ผลปรากฏว่า เมื่อปริมาณฟางข้าวเพิ่มขึ้น จะให้ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.13), โดยจะเพิ่มขึ้นจาก 27.70 กรัมต่อลิตร เป็น 66.17 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณฟางข้าวจาก 7.5 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร เป็น 20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร, ตามลำดับ (ตารางที่ 3.10). แต่การเพิ่มของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อปริมาณฟางข้าวเพิ่มจาก 7.5 กรัม เป็น 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร และเมื่อฟางข้าวเพิ่มมากกว่านี้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นไม่มากนัก (รูปที่ 3.13).

อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว (Rice straw conversion) และ Holocellulose conversion เมื่อใช้ปริมาณฟางข้าวมากกว่า 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร จะมีปริมาณลดลงอย่างชัดเจน (รูปที่ 3.13). โดยที่การใช้ปริมาณฟางข้าว 7.5 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 350.94 mg/g Ds และเมื่อเพิ่มปริมาณฟางข้าวเป็น 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 343.27 mg/g Ds, จะลดลงเหลือ 286.22 mg/g Ds เมื่อปริมาณฟางข้าวเพิ่มเป็น 20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 3.10).

การเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว (Rice straw conversion) และ Holocellulose conversion จะมีการเปลี่ยนแปลงเหมือนกัน และจะมีการเปลี่ยนแปลงตรงข้ามกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, บ่งบอกได้ว่า จะเหลือปริมาณเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส หลังจากการเตรียมและการไฮโดรไลซิสสูง เมื่อปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นเพิ่มสูงขึ้น. อาจจะมีสาเหตุมาจาก ที่ปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นสูง จะมีความหนืดสูง ส่งผลให้เอนไซม์เข้าจับกับเซลลูโลสได้ยาก. อย่างไรก็ตาม ปริมาณ Cellulose conversion มีปริมาณใกล้เคียงกัน เมื่อปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นสูงขึ้น, แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีอยู่ ถึงแม้ว่าจะมีความหนืดเพิ่มขึ้นก็ตาม.

ดังนั้น สาเหตุที่ทำให้ปริมาณการเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว และ Holocellulose conversion ลดลง อาจจะมาจากสาเหตุอื่น ที่ไม่ใช่ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์. โดยสาหตุที่ทำให้ปริมาณ Holocellulose conversion ลดลง น่าจะเกิดมาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังจากการเตรียมด้วยกรด, ซึ่งเมื่อปริมาณฟางข้าวมากกว่า 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังจากการเตรียมไม่เพิ่มขึ้น ชี้ให้เห็นว่า เฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้น้อยลง จึงทำให้ปริมาณ Holocellulose conversion ลดลง.

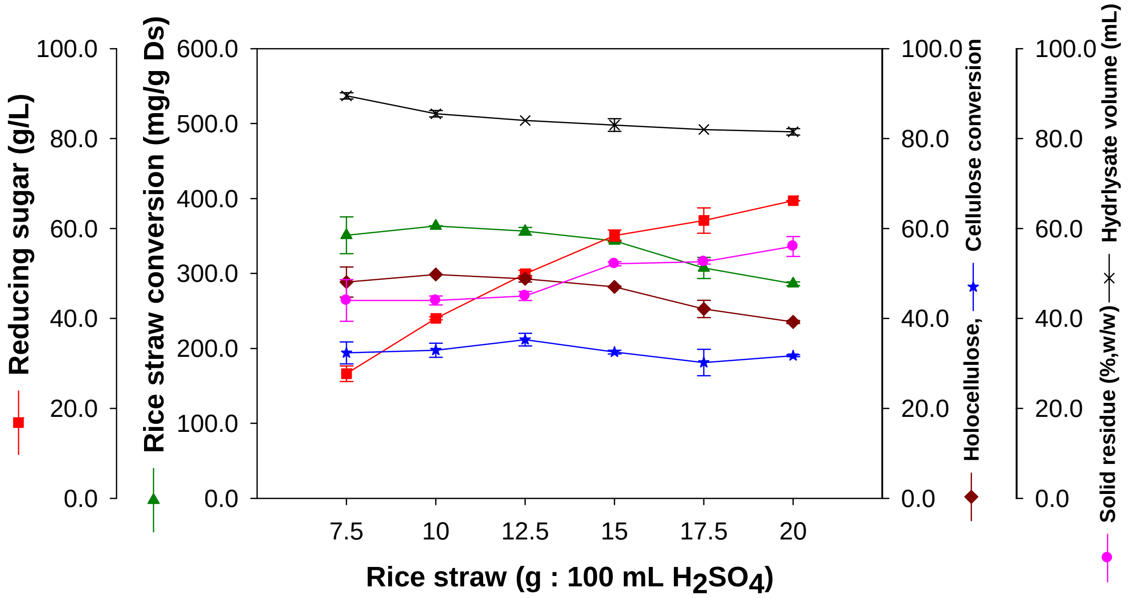
ฟางข้าวที่เหลือและปริมาตรสารละลายที่ได้ จะมีการเปลี่ยนแปลงเหมือนกัน โดยฟางข้าวที่เหลือหลังจากการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น, แต่สารละลายที่ได้จะมีปริมาตรลดลง. ฟางข้าวที่เหลือเพิ่มขึ้นหมายถึง ปริมาณโฮโลเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซิสเป็นน้ำตาลได้น้อยลง. ส่วนปริมาตรของสารละลายที่ได้น้อยลง หมายถึง ฟางข้าวถูกย่อยได้น้อย, น้ำที่ฟางข้าวดูดซับไว้ออกมาน้อยด้วย.

ถึงแม้ว่าปริมาณ Cellulose conversion ไม่แตกต่างกัน เมื่อปริมาณฟางข้าวเพิ่มขึ้น (ที่ 72 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิส) แต่การไฮโดรไลซิสในช่วงแรก (ที่ 12 และ 24 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิส) ปริมาณ Cellulose conversion ลดลง เมื่อปริมาณฟางข้าวเพิ่มขึ้นเป็น 17.5 และ 20.0

กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.14 และตารางที่ 3.11). บ่งบอกได้ว่า ที่ปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นสูง เอนไซม์จะมีประสิทธิภาพต่ำลง, เนื่องจาก มีความหนืดสูง ทำให้เอนไซม์เข้าจับกับเซลลูโลสได้ยาก.

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการไฮโดรไลซิส และเมื่อระยะเวลานานกว่า 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย. ปริมาณ Cellulose conversion เกิดขึ้นประมาณ 32%(w/w) แสดงให้เห็นว่า เซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้เล็กน้อย ซึ่งอาจจะเกิดจาก การยับยั้งเอนไซม์จากน้ำตาลที่เกิดขึ้น.

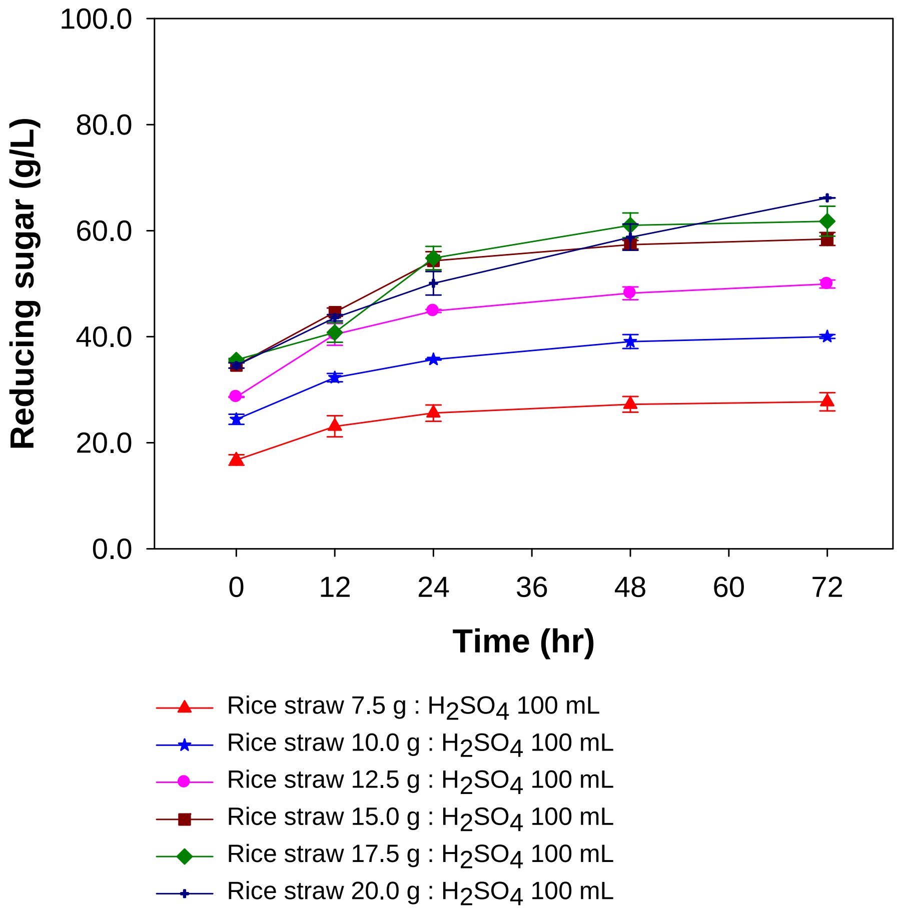
จากเหตุผลข้างต้น สรุปได้ว่า ปริมาณฟางข้าวเริ่มต้น 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร เป็นปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสม เนื่องจากให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง, ปริมาณ Rice straw conversion, Holocellulose conversion และ Cellulose conversion ใกล้เคียงกับที่ปริมาณฟางข้าวต่ำกว่านี้.



รูปที่ 3.13. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.10. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Rice straw (g : 100 mL H_2SO_4)	Reducing sugar (g/L)	Rice straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
7.5	27.70 ± 1.72	350.94 ± 24.51	48.07 ± 3.36	32.22 ± 2.44	43.99 ± 4.62	89.5 ± 0.7
10.0	40.02 ± 0.36	363.33 ± 0.07	49.77 ± 0.01	32.91 ± 1.56	44.0 ± 1.0	85.5 ± 0.7
12.5	49.93 ± 0.74	356.32 ± 5.23	48.81 ± 0.72	35.28 ± 1.39	45.0 ± 1.0	84.0 ± 0.0
15.0	58.42 ± 1.23	343.27 ± 1.29	47.02 ± 0.18	32.52 ± 0.41	52.15 ± 0.46	83.0 ± 1.4
17.5	61.76 ± 2.82	307.34 ± 14.11	42.10 ± 1.93	30.19 ± 2.94	52.59 ± 0.50	82.0 ± 0.0
20.0	66.17 ± 0.00	286.22 ± 2.39	39.21 ± 0.33	31.70 ± 0.22	56.00 ± 2.22	81.5 ± 0.7



รูปที่ 3.14. **ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.**

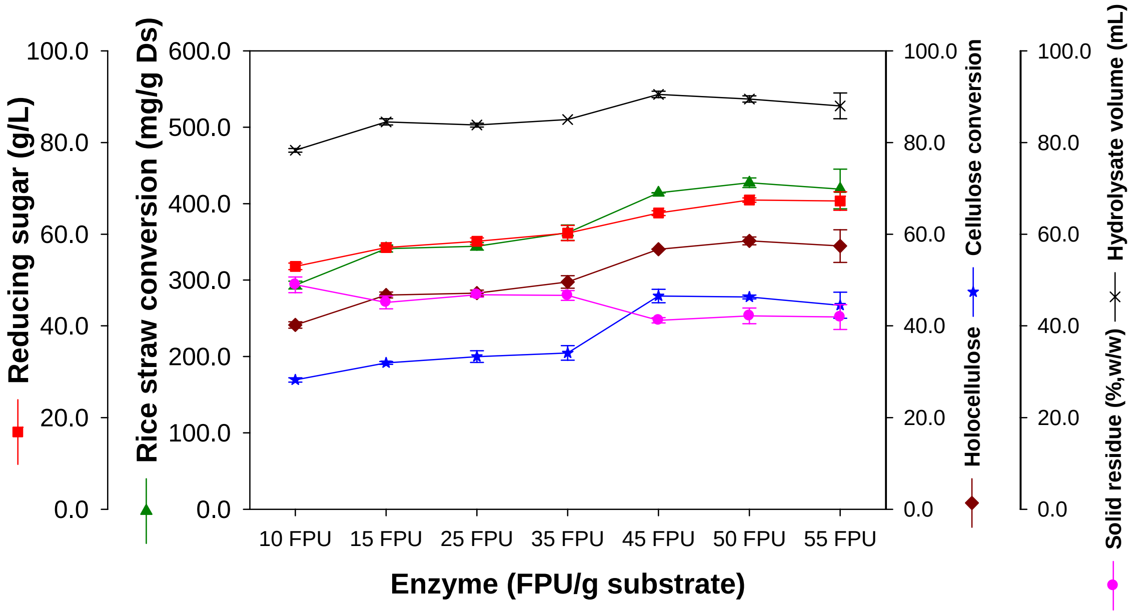
ตารางที่ 3.11. **ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที**

Time (hr)	**Rice straw contents (g : 100 mL H_2SO_4)**					
	7.5	**10.0**	**12.5**	**15.0**	**17.5**	**20.0**
0	16.74 ± 0.98	24.39 ± 0.96	28.61 ± 0.11	34.56 ± 0.51	35.61 ± 0.28	34.57 ± 0.48
12	23.08 ± 1.99	32.28 ± 0.78	40.41 ± 2.04	44.62 ± 0.79	40.78 ± 1.84	43.56 ± 0.61
24	25.57 ± 1.54	35.69 ± 0.10	44.83 ± 0.29	54.30 ± 1.71	54.81 ± 2.22	50.06 ± 2.21
48	27.23 ± 1.48	39.05 ± 1.31	48.19 ± 1.20	57.32 ± 0.79	61.02 ± 2.31	58.76 ± 2.48
72	27.70 ± 1.72	40.02 ± 0.36	49.93 ± 0.74	58.42 ± 1.23	61.76 ± 2.82	66.17 ± 0.00

3.3.3 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

จากการศึกษาปริมาณเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 10-55 FPU/g Dry residue substrate ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิลิตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ผลปรากฏว่า เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น จะทำให้การไฮโดรไลซิสได้น้ำตาลเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.15). โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นจาก 52.98 กรัมต่อลิตร เป็น 67.43 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จาก 10 เป็น 50 FPU/g Dry residue substrate. ส่วนการเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว (Rice straw conversion) จะเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน และจะเพิ่มอย่างเห็นได้ชัด เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มจาก 10 เป็น 45 FPU/g Dry residue substrate, หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ (ตารางที่ 3.12). ปริมาณ Holocellulose conversion และ Cellulose conversion จะลักษณะการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกันคือ จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น.



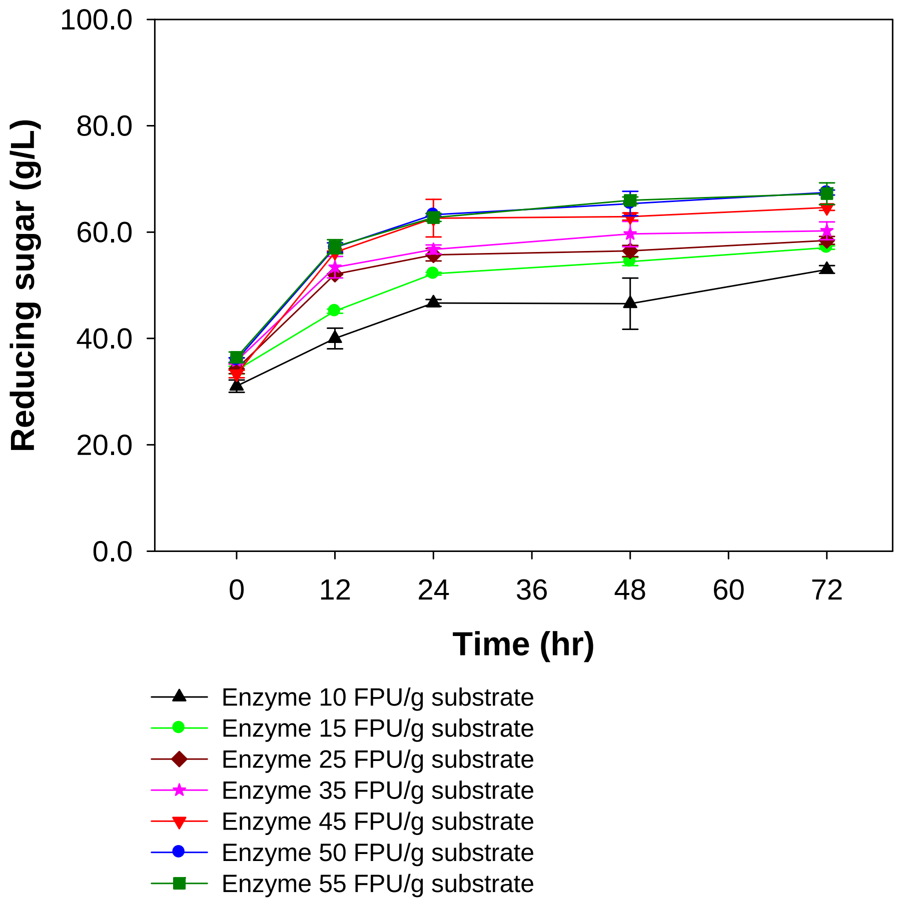
รูปที่ 3.15. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.12. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Enzyme (FPU/g Dry residue substrate)	Reducing sugar (g/L)	Rice straw conversion(mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
10	52.98 ± 0.73	293.44 ± 5.12	40.20 ± 0.70	28.20 ± 0.46	48.98 ± 1.71	78.3 ± 0.4
15	57.09 ± 0.30	341.17 ± 4.66	46.74 ± 0.64	31.93 ± 0.33	45.11 ± 1.39	84.5 ± 0.7
25	58.44 ± 0.65	344.12 ± 4.85	47.14 ± 0.66	33.29 ± 1.27	46.80 ± 0.52	83.8 ± 0.4
35	60.24 ± 1.67	361.91 ± 9.98	49.58 ± 1.37	34.09 ± 1.59	46.64 ± 1.07	85.0 ± 0.0
45	64.61 ± 0.53	414.16 ± 0.19	56.73 ± 0.03	46.52 ± 1.48	41.23 ± 0.58	90.5 ± 0.7
50	67.43 ± 0.47	427.32 ± 6.24	58.54 ± 0.85	46.30 ± 0.42	42.19 ± 1.70	89.5 ± 0.7
55	67.23 ± 2.01	419.11 ± 25.99	57.41 ± 3.56	44.50 ± 2.86	41.93 ± 2.70	88.0 ± 2.8

จากรูปที่ 3.16 จะเห็นได้ว่า ความเร็วในการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น. โดยที่ระยะเวลาการไฮโดรไลซิส 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะพิ่มขึ้นจาก 46.67 กรัมต่อลิตร เป็น 62.63 กรัมต่อลิตร เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 10 เป็น 45 FPU/g Dry residue substrate และเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มมากกว่านี้ ความเร็วในการไฮโดรไลซิสจะคงที่. โดยที่ปริมาณเอนไซม์ 55 FPU/g Dry residue substrate จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 62.74 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.13).

ดังนั้น จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ปริมาณเอนไซม์ 45 FPU/g Dry residue substrate เป็นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส.



รูปที่ 3.16. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.13. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

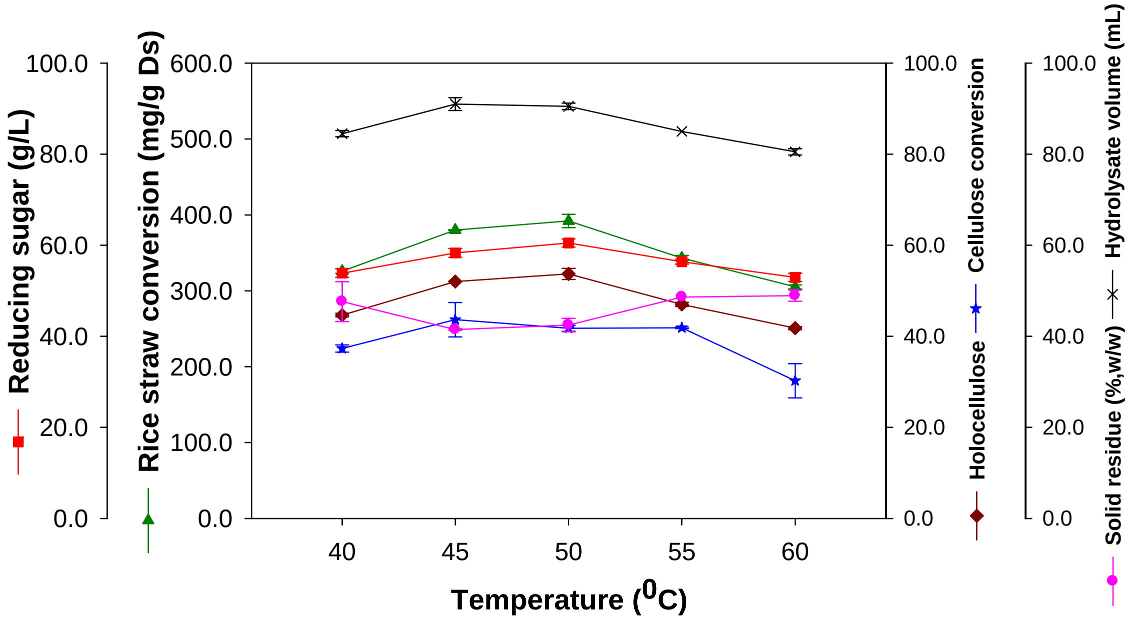
Time	**Enzyme (FPU/g Dry residue substrate)**						
(hr)	**10**	**15**	**25**	**35**	**45**	**50**	**55**
0	31.03 ± 1.17	34.05 ± 0.74	34.32 ± 0.90	35.78 ± 0.53	33.32 ± 0.71	35.93 ± 0.43	36.46 ± 1.02
12	39.99 ±1.93	45.13 ± 0.38	52.10 ± 0.09	53.40 ± 2.03	56.22 ± 0.22	57.12 ± 0.87	57.25 ± 1.34
24	46.67 ± 0.64	52.18 ± 0.26	55.74 ± 1.17	56.74 ± 0.84	62.63 ± 3.55	63.28 ± 0.25	62.74 ± 0.74
48	46.54 ± 4.80	54.47 ± 0.78	56.45 ± 1.07	59.64 ± 2.39	62.93 ± 0.68	65.36 ± 2.31	65.98 ± 0.66
72	52.98 ± 0.73	57.09 ± 0.30	58.44 ± 0.73	60.24 ± 1.67	64.61 ± 0.53	67.43 ± 0.47	67.23 ± 2.01

3.3.4 อุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการศึกษาอุณหภูมิช่วง 40-55°ซ. ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิลิตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00 %(w/v) อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที, จากนั้นไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที, ผลปรากฏว่า อุณหภูมิ 45 และ 50°ซ. ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน และสูงกว่าที่อุณหภูมิ 40, 55 และ 60°ซ. (รูปที่ 3.17), โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 58.31-60.49 กรัมต่อลิตร. ส่วนการเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว และปริมาณ Holocellulose conversion ก็เช่นเดียวกัน, ที่อุณหภูมิ 45 และ 50°ซ. จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 40, 55 และ 60 °ซ. ส่วนปริมาณ Cellulose conversion ในช่วงอุณหภูมิ 45-55°ซ. จะให้ปริมาณใกล้เคียงกัน และสูงกว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 60°ซ. บ่งบอกว่า เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 45-55°ซ. (รูปที่ 3.17 และ ตารางที่ 3.14).

จากรูปที่ 3.18 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 45 และ 50°ซ. จะให้ความเร็วในการไฮโดรไลซิสสูงกว่าที่อุณหภูมิ 40, 55 และ 60°ซ. โดยที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิส อุณหภูมิ 45 และ 50°ซ. จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณ 55.60-55.97 กรัมต่อลิตร. ส่วนที่ระยะเวลาการไฮโดรไลซิส 12 ชั่วโมง อุณหภูมิช่วง 50-60°ซ. จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าที่อถณหภูมิ 40-45°ซ. (ตารางที่ 3.15).

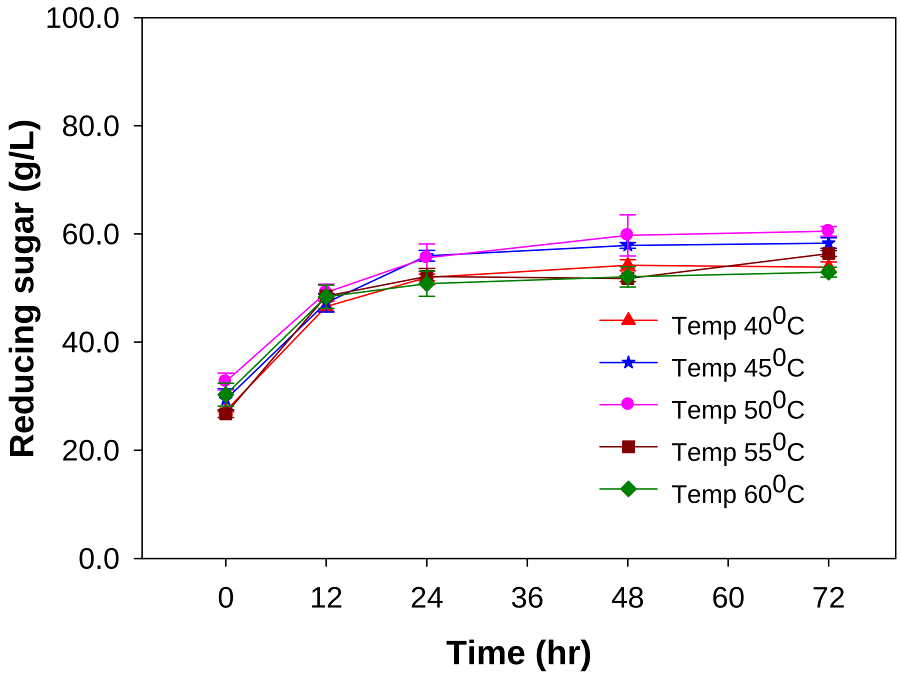
ดังนั้น จากผลการทดลองข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิการไฮโดรไลซิสช่วง 45-55 °ซ. เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม. อย่างไรก็ตาม เมื่อสังเกตุความเร็วที่ 12 และ 24 ชั่วโมง จะทำให้อุณหภูมิ 50°ซ. เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ในการไฮโดรไลซิส.



รูปที่ 3.17. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.14. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Temperature (°C)	Reducing sugar (g/L)	Rice straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
40	53.87 ± 0.94	325.92 ± 2.97	44.65 ± 0.41	37.33 ± 0.78	47.62 ± 4.37	84.5 ± 0.7
45	58.31 ± 0.99	379.92 ± 0.52	52.04 ± 0.07	43.66 ± 3.78	41.48 ± 0.17	91.0 ± 1.4
50	60.49 ± 0.90	391.95 ± 8.82	53.69 ± 1.21	41.76 ± 0.68	42.46 ± 1.46	90.5 ± 0.7
55	56.39 ± 0.54	343.21 ± 3.31	47.02 ± 0.45	41.87 ± 0.16	48.61 ± 0.00	85.0 ± 0.0
60	52.93 ± 0.90	305.10 ± 2.48	41.79 ± 0.34	30.24 ± 3.77	48.94 ± 1.26	80.5 ± 0.7



รูปที่ 3.18. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.15. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Temperature (°C)				
	40	45	50	55	60
0	27.27 ± 0.17	29.41 ± 1.96	32.70 ± 1.56	26.73 ± 0.66	30.30 ± 2.12
12	46.58 ± 0.99	47.29 ± 1.72	49.18 ± 1.54	48.49 ± 0.31	48.39 ± 2.16
24	51.95 ± 0.63	55.97 ± 1.00	55.60 ± 2.53	52.14 ± 1.48	50.80 ± 2.33
48	54.20 ± 1.04	57.87 ± 0.53	59.72 ± 3.80	51.74 ± 0.55	52.08 ± 1.87
72	53.87 ± 0.94	58.31 ± 0.99	60.49 ± 0.90	56.39 ± 0.54	52.93 ± 0.90

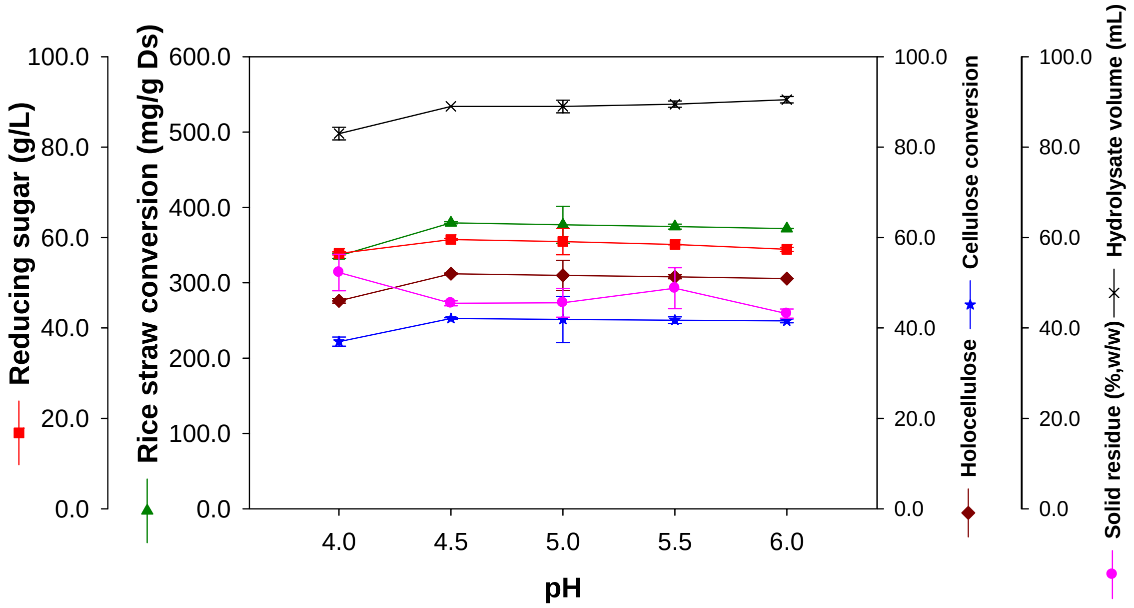
3.3.5 พีเอชที่เหมาะสม

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมช่วง 4.0-6.0 ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิลิตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที, จากนั้นไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ผลปรากฏว่า พีเอชช่วง 4.5-6.0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน และปริมาณที่สูงกว่าที่พีเอช 4.0 (รูปที่ 3.19). ส่วนการเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว (Rice straw conversion), Holocellulose conversion และปริมาณ Cellulose conversion ก็เช่นเดียวกัน ที่พีเอช 4.5-6.0 ให้ปริมาณดีที่สุด (ตารางที่ 3.16).

อย่างไรก็ตาม เมื่อสังเกตุที่เวลา 24 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิส จะเห็นได้ว่าพีเอช 4.5-5.5 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าที่พีเอช 4.0 และ 6.0.

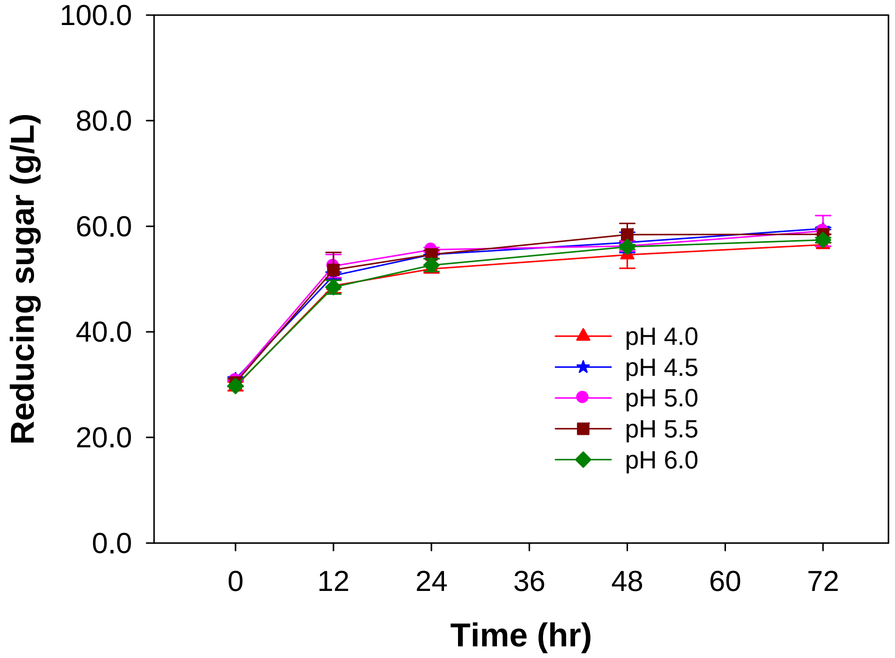
ดังนั้น จากการทดลอง สามารถสรุปได้ว่า พีเอชช่วง 4.5-5.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสม, แต่จะใช้พีเอช 5.0 เป็นพีเอชที่ใช้ในการทดลองถัดๆไป.



รูปที่ 3.19. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.16. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

pH	Reducing sugar (g/L)	Rice straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
4.0	56.50 ± 0.36	335.80 ± 3.56	46.00 ± 0.49	36.99 ± 1.02	52.29 ± 4.04	83.0 ± 1.4
4.5	59.57 ± 0.21	379.63 ± 1.33	52.00 ± 0.18	42.09 ± 0.17	45.47 ± 0.54	89.0 ± 0.0
5.0	59.12 ± 2.91	376.91 ± 24.49	51.63 ± 3.35	41.89 ± 5.09	45.58 ± 3.17	89.0 ± 1.4
5.5	58.46 ± 0.05	374.63 ± 3.30	51.32 ± 0.45	41.74 ± 0.72	48.79 ± 4.53	89.5 ± 0.7
6.0	57.38 ± 0.46	371.86 ± 0.07	50.94 ± 0.01	41.57 ± 0.41	43.18 ± 1.01	90.5 ± 0.7



รูปที่ 3.20. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accelerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.17. **ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000^{TM} ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที**

Time (hr)	pH				
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
0	29.66 ± 0.83	31.10 ± 0.32	30.81 ± 0.09	30.38 ± 0.76	29.73 ± 0.03
12	48.73 ± 1.32	50.65 ± 0.66	52.46 ± 2.18	51.73 ± 3.30	48.46 ± 1.32
24	51.92 ± 0.75	54.64 ± 0.02	55.56 ± 0.44	54.67 ± 0.76	52.63 ± 1.19
48	54.56 ± 2.54	56.93 ± 1.92	56.28 ± 0.98	58.40 ± 2.13	56.08 ± 0.43
72	56.50 ± 0.36	59.57 ± 0.21	59.12 ± 2.91	58.46 ± 0.05	57.38 ± 0.46

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4 ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 15 นาที, สามารถสรุปได้ว่า ปริมาณฟางข้าว 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร, เอนไซม์ Accellerase 1000^{TM} ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate, พีเอช 5.0, อุณหภูมิ 50°ซ., อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที, เป็นสภาวะที่เหมาะสม.

3.4 ผลการศึกษาการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วยสภาวะที่รุนแรงขึ้น

จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วยสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้กรดเจือจาง จากการทดลองข้างต้น (1.00%,w/v H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ยังมีปริมาณต่ำอยู่, ถึงแม้จะมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสให้สูงขึ้นก็ตาม. ดังนั้น จึงทำการเตรียมฟางข้าวด้วยสภาวะและความเข้มข้นกรดที่รุนแรงขึ้น (3.00%w/v H_2SO_4,121°ซ., 30 นาที) เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ให้สูงขึ้น.

3.4.1 ชนิดเอนไซม์ที่เหมาะสม

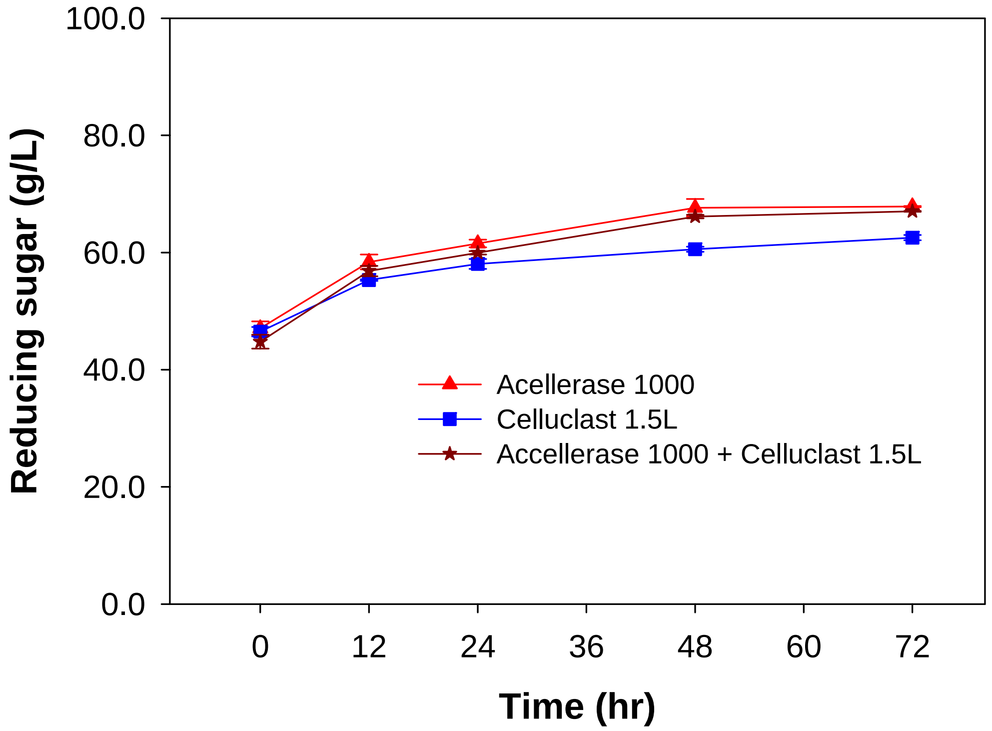
จากการศึกษาชนิดเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4,121°ซ., 30 นาที, พบว่า เมื่อระยะเวลาการไฮโดรไลซิสผ่านไป 72 ชั่วโมง การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000^{TM} จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Celluclast 1.5L, โดยได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 67.86 และ 62.54 กรัมต่อลิตร, ตามลำดับ (ตารางที่ 3.18). ส่วนการผสมระหว่างเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะให้ผลเช่นเดียวกับเอนไซม์ Accellerase 1000^{TM} เพียงชนิดเดียว คือได้น้ำตาลรีดิวซ์ 67.04 กรัมต่อลิตร. ในทำนองเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว (Rice straw conversion) พบว่า การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase

1000™ และเอนไซม์ผสม (Accellerase 1000™ + Celluclast 1.5L) ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสูงกว่าการไฮโดรไลซิสด้วย Celluclast 1.5L, คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 432.30, 436.03 และ 404.98 mg/ g Ds, ตามลำดับ. ส่วนปริมาณ Holocellulose และ Cellulose conversion ก็ได้ผลในทำนองเดียวกัน คือการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ และเอนไซม์ผสมจะสูงกว่าการไฮโดรไลซิสด้วย Celluclast 1.5L เพียงชนิดเดียว.

ส่วนความเร็วในการไฮโดรไลซิสในรูปที่ 3.21, จะเห็นได้ว่า ในเวลา 12 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์สองชนิดจะใกล้เคียงกัน. แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปมากกว่า 24 ชั่วโมงการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ และเอนไซม์ผสมจะสูงกว่าการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Celluclast 1.5L. ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากการไฮโดรไลซิสด้วย Accellerase 1000™ ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า Celluclast 1.5L, อีกทั้งเอนไซม์ Accellerase 1000™ มีราคาต่ำกว่าเอนไซม์ Celluclast 1.5L, จึงสามารถสรุปได้ว่า เอนไซม์ Acellerase 1000™ มีความเหมาะสมมากกว่ามากกว่าเอนไซม์ Celluclast 1.5L (ตารางที่ 3.19).

ตารางที่ 3.18. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Enzyme	Reducing sugar (g/L)	Rice straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
Accellerase 1000	67.86 ± 0.10	432.30 ± 0.93	59.22 ± 0.13	30.71 ± 1.92	40.53 ± 2.31	90.0 ± 0.0
Celluclast 1.5L	62.54 ± 0.44	404.98 ± 6.51	55.48 ± 0.89	24.08 ± 1.32	36.95 ± 1.11	91.5 ± 2.1
Accellerase 1000 + Celluclast 1.5L	67.04 ± 0.07	436.03 ± 1.14	59.73 ± 0.16	33.56 ± 1.65	38.43 ± 0.93	92.0 ± 0.0



รูปที่ 3.21. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

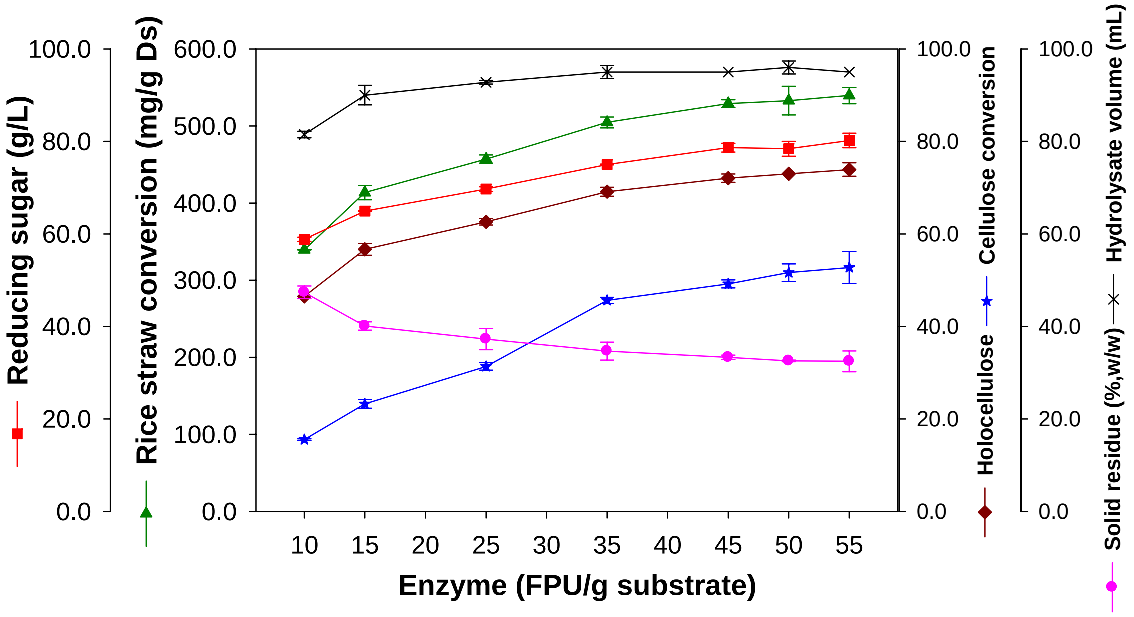
ตารางที่ 3.19. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Enzyme		
	Acellerase 1000	Celluclast 1.5L	Acellerase 1000 + Celluclast 1.5L
0	47.08 ± 1.18	46.50 ± 0.80	44.79 ± 1.20
12	58.38 ± 1.28	55.29 ± 0.12	56.85 ± 0.89
24	61.54 ± 0.65	58.04 ± 0.84	59.95 ± 0.29
48	67.65 ± 1.49	60.57 ± 0.45	66.13 ± 0.29
72	67.86 ± 0.10	62.54 ± 0.44	67.04 ± 0.07

3.4.2 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

จากการศึกษาปริมาณเอนไซม์ Accellerase 1000™ ที่เหมาะสม ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.00%(w/w) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 30 นาที, จากนั้นไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ10-55 FPU/ g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ผลปรากฏว่า เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้การไฮโดรไลซิสได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 3.22). โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นจาก 58.84 เป็น 78.67 กรัมต่อลิตร เมื่อเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 10 เป็น 45 FPU/g Dry residue substrate. อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์มากขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะคงที่. โดยที่การเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 50-55 FPU/g substrate จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 78.41-80.20 กรัมต่อลิตร, จากการที่ปริมาณเซลลูโลสที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือน้อยลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จึงไม่เพิ่มขึ้น, แม้จะมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ก็ตาม (ตารางที่ 3.20). ปริมาณการเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว (Rice straw conversion), Holocellulose conversion และ Cellulose conversion มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเช่นเดียวกัน คือมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น. โดยที่ปริมาณเอนไซม์ 10 FPU/g Dry residue substrate จะให้ปริมาณปริมาณ Holocellulose และ Cellulose conversion เท่ากับ 46.5 และ 15.5 %(w/w), ตามลำดับ, และจะเพิ่มเป็น 72 และ 50 %(w/w), ตามลำดับ, เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 45 FPU/g Dry residue substrate ที่เวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อปริมาณเอนไซม์มากกว่านี้ ปริมาณ Holocellulose และ Cellulose conversion จะคงที่, เนื่องจากปริมาณเซลลูโลสเหลืออยู่น้อย ทำให้การไฮโดรไลซิสเกิดน้อยลง.



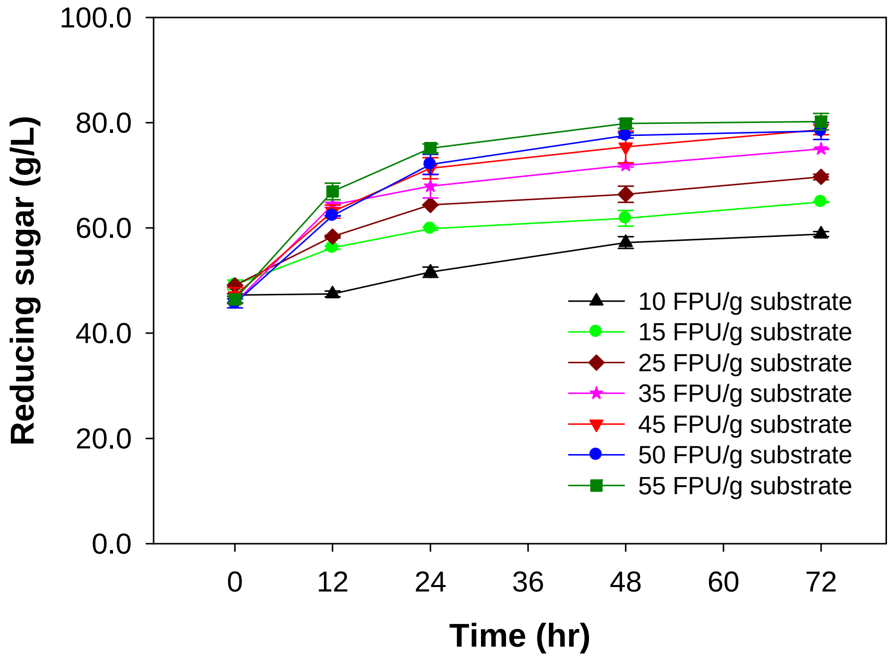
รูปที่ 3.22. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.20. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Enzyme (FPU/g Dry residue substrate)	Reducing sugar (g/L)	Rice straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
10	58.84 ± 0.47	339.43 ± 0.08	46.50 ± 0.01	15.53 ± 0.18	47.38 ± 1.36	81.5 ± 0.7
15	64.92 ± 0.09	413.59 ± 9.21	56.66 ± 1.26	23.24 ± 0.94	40.09 ± 0.90	90.0 ± 2.1
25	69.69 ± 0.53	457.12 ± 5.26	62.62 ± 0.72	31.35 ± 0.81	37.26 ± 2.28	92.8 ± 0.4
35	75.01 ± 0.08	504.68 ± 7.08	69.13 ± 0.97	45.63 ± 0.67	34.67 ± 1.93	95.0 ± 1.4
45	78.67 ± 0.95	529.08 ± 5.00	72.08 ± 0.90	49.20 ± 0.87	33.32 ± 0.48	95.0 ± 0.0
50	78.41 ± 1.61	532.92 ± 18.56	73.0 ± 2.54	51.63 ± 1.91	32.56 ± 0.17	96.0 ± 1.4
55	80.20 ± 1.57	539.62 ± 10.58	73.92 ± 1.45	52.74 ± 3.47	32.46 ± 2.25	95.0 ± 0.0

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า Productivity จะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น. โดยที่ เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 10 FPU/g substrate จะมีปริมาณ Productivity 0.82 g/L/hr และจะเพิ่มขึ้นเป็น 1.09 g/L/hr. เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากกว่านี้ Productivity จะคงที่, เนื่องจากปริมาณเซลลูโลสเหลืออยู่น้อย ทำให้การไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นได้น้อยลงนั่นเอง (รูปที่ 3.23).

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น จะให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, Holocellulose conversion, Cellulose conversion และ Productivity มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนกระทั่งปริมาณเอนไซม์สูงถึง 45 FPU/g substrate, ปริมาณต่างๆ จะเริ่มคงที่ (รูปที่ 3.22, 3.23 และตารางที่ 3.20, 3.21). ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ปริมาณเอนไซม์ 45 FPU/g substrate เป็นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสฟางข้าว ที่พีเอช 5.0, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.



รูปที่ 3.23. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

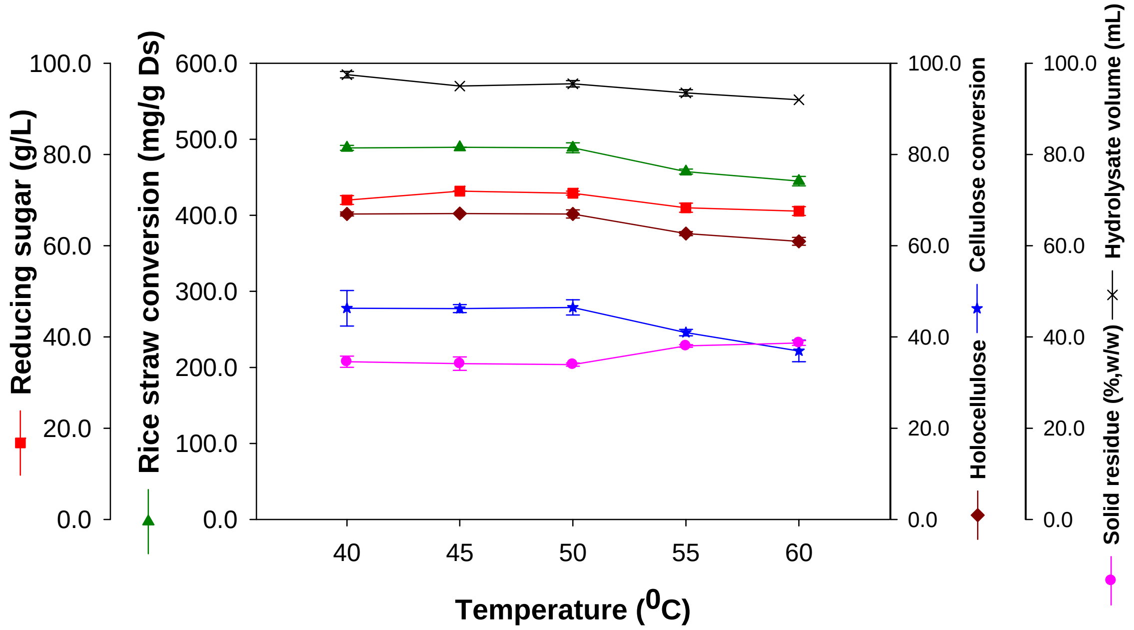
ตารางที่ 3.21. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time	**Enzyme (FPU/g Dry residue substrate)**						
(hr)	**10**	**15**	**25**	**35**	**45**	**50**	**55**
0	47.23 ± 0.25	49.18 ± 0.91	49.09 ± 0.07	45.77 ± 0.07	47.13 ± 1.52	45.66 ± 0.87	46.40 ± 0.65
12	47.45 ± 0.54	56.24 ± 0.33	58.36 ± 0.25	64.39 ± 0.48	63.10 ± 1.23	62.30 ± 0.05	66.94 ± 1.59
24	51.60 ± 0.97	59.86 ± 0.27	64.36 ± 0.10	67.91 ± 2.21	71.34 ± 2.00	72.08 ± 1.91	75.14 ± 0.84
48	57.22 ± 1.10	61.83 ± 1.50	66.41 ± 1.55	71.87 ± 0.28	75.40 ± 3.02	77.59 ± 0.50	79.82 ± 0.88
72	58.84 ± 0.47	64.92 ± 0.09	69.69 ± 0.53	75.01 ± 0.08	78.67 ± 0.95	78.41 ± 1.61	80.20 ± 1.57

3.4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการศึกษาอุณหภูมิช่วง 40-60°ซ. ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.00%(w/v) อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 30 นาที, จากนั้นไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิช่วง 40-50 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, Holocellulose conversion, Cellulose conversion ที่มีปริมาณใกล้เคียงกัน, เท่ากับประมาณ 70 กรัมต่อลิตร (Rice straw conversion 490 mg/g Ds) 67 และ 46 %(w/w), ตามลำดับ (รูปที่ 3.24 และตารางที่ 3.22) ที่เวลา 72 ชั่วโมง. แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 55-60 องศาเซลเซียส ผลของน้ำตาลที่ได้จะต่ำกว่า. ดังนั้น การไฮโดรไลซิสในช่วงอุณหภูมิ 40- 50 องศาเซลเซียสจึงเป็นช่วงที่เหมาะสม.



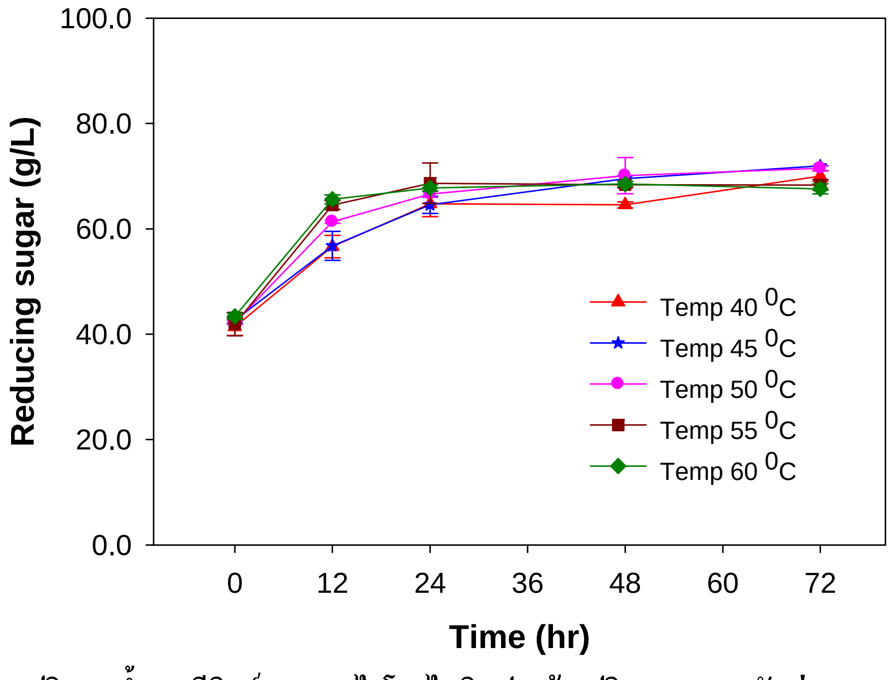
รูปที่ 3.24. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.22. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Temperature (^{0}C)	Reducing sugar (g/L)	Rie straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
40	70.01 ± 0.97	488.72 ± 3.28	66.95 ± 0.45	46.29 ± 3.89	34.57 ± 1.23	97.5 ± 0.7
45	71.97 ± 0.02	489.41 ± 0.21	67.04 ± 0.03	46.21 ± 0.88	34.15 ± 1.49	95.0 ± 0.0
50	71.52 ± 0.43	488.89 ± 6.62	66.97 ± 0.91	46.48 ± 1.67	33.95 ± 0.35	95.5 ± 0.7
55	68.33 ± 1.00	457.45 ± 3.23	62.66 ± 0.44	40.97 ± 0.70	38.04 ± 0.31	93.5 ± 0.7
60	67.58 ± 0.96	445.00 ± 6.27	60.96 ± 0.86	36.93 ± 2.37	38.68 ± 0.53	92.0 ± 0.0

อย่างไรก็ตาม ในรูปที่ 3.25 แสดงให้เห็นว่า การไฮโดรไลซิสด้วยอุณหภูมิที่สูงกว่า 50°ซ. จะมีความเร็วในการไฮโดรไลซิส (12 ชั่วโมงแรกของการไฮโดรไลซิส) สูงกว่าการไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50°ซ. แต่เมื่อการไฮโดรไลซิสใช้ระยะเวลานานกว่า 24 ชั่วโมง การไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50°ซ. จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า, อาจเนื่องมาจากฟางข้าวที่ได้หลังจากการเตรียมมีความหนืดสูง ทำให้การถ่ายเทความร้อนจากเครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิเข้าสู่ฟางข้าวใน 12 ชั่วโมงแรกของการไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิสูง ถ่ายเทได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ, ทำให้การไฮโดรไลซิสในช่วงแรกที่อุณหภูมิสูงเกิดขึ้นด้เร็วกว่า. แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปนานกว่า 12 ชั่วโมง ฟางข้าวเริ่มหลอมเป็นเนื้อเดียวกัน, อุณหภูมิที่สูงกว่า 50°ซ. เกิดการถ่ายเทอุณหภูมิเข้าสู่ฟางข้าวได้เต็มที่, ทำให้ระบบในการย่อยอุณหภูมิสูงเท่ากับอุณหภูมิที่ควบคุมอย่างแท้จริง ทำให้อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม จึงทำให้การไฮโดรไลซิสเมื่อระยะเวลาผ่านไปนานกว่า 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ต่ำกว่าการไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 50°ซ. (รูปที่ 3.25 และ ตารางที่ 3.23).

ดังนั้น เมื่อพิจารณาผลของน้ำตาลรีดิวซ์, การเปลี่ยนแปลงของฟางข้าว Holocellulose conversion และ Cellulose conversion, อีกทั้งความเร็วในการไฮโดรไลซิส, จึงอาจสรุปได้ว่าอุณหภูมิ 50°ซ. เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม.



รูปที่ 3.25. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

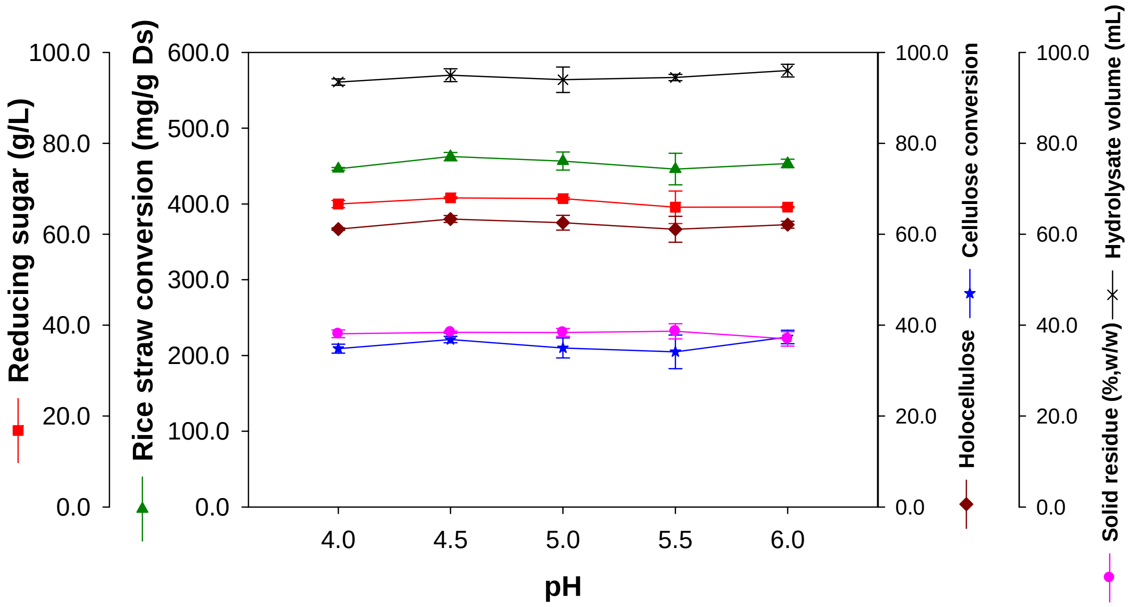
ตารางที่ 3.23. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Temperature (^{0}C)				
	40	45	50	55	60
0	41.41 ± 1.63	42.62 ± 0.58	42.21 ± 0.40	41.94 ± 2.23	43.40 ± 0.59
12	56.65 ± 2.14	56.78 ± 2.75	61.33 ± 0.27	64.50 ± 0.82	65.61 ± 0.84
24	64.75 ± 2.43	64.55 ± 1.62	66.59 ± 0.60	68.66 ± 3.84	67.74 ± 0.61
48	64.55 ± 0.57	69.53 ± 0.54	70.10 ± 3.42	68.38 ± 0.59	68.51 ± 0.48
72	70.01 ± 0.97	71.97 ± 0.02	71.52 ± 0.43	68.33 ± 1.00	67.58 ± 0.96

3.4.5 พีเอชที่เหมาะสม

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.00 %(w/v) อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 30 นาที, จากนั้นไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate, พีเอช 4.0-6.0, อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

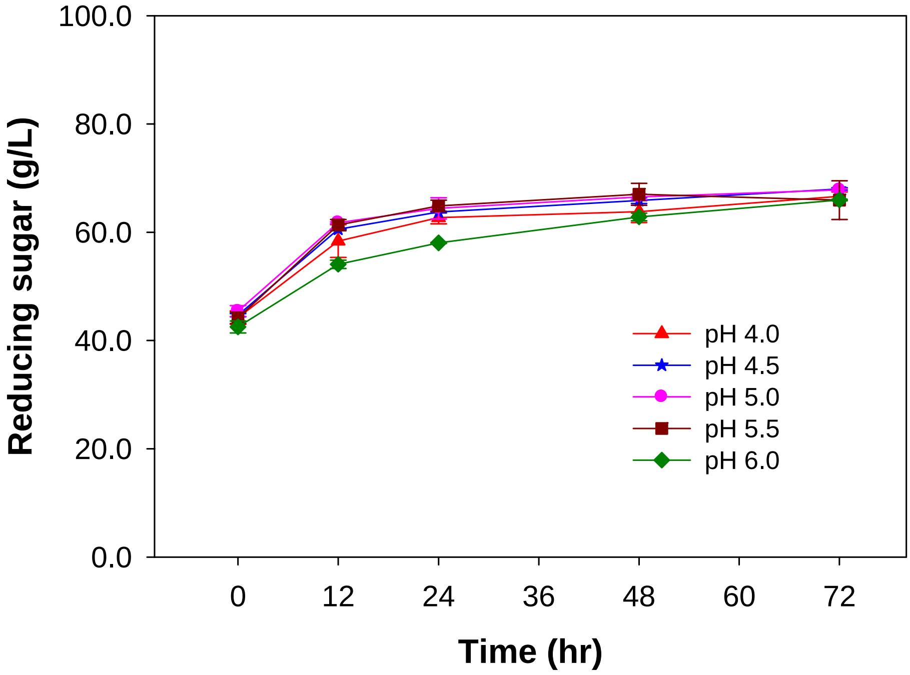
ผลปรากฏว่า ในชั่วโมงที่ 72 พีเอช 4.0-6.0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, Holocellulose conversion, Cellulose conversion และ Productivity ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3.26). โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 65-68 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.24). ดังนั้น จากผลการทดลองจึงอาจจะสรุปได้ว่า พีเอช 4.0-6.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสม. อย่างไรก็ตาม เมื่อสังเกตความเร็วในการไฮโดรไลซิส (รูปที่ 3.27) จะเห็นได้ว่า ที่ระยะเวลาการไฮโดรไลซิส 12 ชั่วโมง, พีเอช 4.0 และ 6.0, จะไฮโดรไลซิสได้ต่ำกว่า ที่พีเอช 4.5-5.5 (รูปที่ 3.27 และ ตารางที่ 3.25). ดังนั้น พีเอชที่เหมาะสมจากการสังเกตจากความเร็วในการไฮโดรไลซิสคือ พีเอช 4.5-5.5, แต่เนื่องจาก ฟางข้าวที่ได้หลังจากการเตรียมจะมีความหนืดสูง ยากต่อการปรับพีเอช, โดยเฉพาะการเขย่าให้ทั่วถึง. ดังนั้น จึงคัดเลือกให้พีเอชที่เหมาะสม คือ 5.0 เพื่อเป็นการควบคุมให้พีเอชอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมได้ดีที่สุด.



รูปที่ 3.26. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

ตารางที่ 3.24. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

pH	Reducing sugar (g/L)	Rice straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (mL)
4.0	66.66 ± 0.79	446.26 ± 1.89	61.13 ± 0.26	34.83 ± 0.97	38.10 ± 0.84	93.5 ± 0.7
4.5	68.01 ± 0.21	462.56 ± 5.51	63.36 ± 0.75	36.81 ± 0.71	38.44 ± 0.27	95.0 ± 1.4
5.0	67.83 ± 0.27	456.54 ± 11.93	62.54 ± 1.63	34.98 ± 2.21	38.39 ± 0.86	94.0 ± 2.8
5.5	65.94 ± 3.57	446.05 ± 20.79	61.10 ± 2.85	34.13 ± 3.71	38.66 ± 1.67	94.5 ± 0.7
6.0	65.97 ± 0.16	453.43 ± 5.60	62.11 ± 0.77	37.39 ± 1.48	36.98 ± 1.58	96.0 ± 1.4



รูปที่ 3.27. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที.

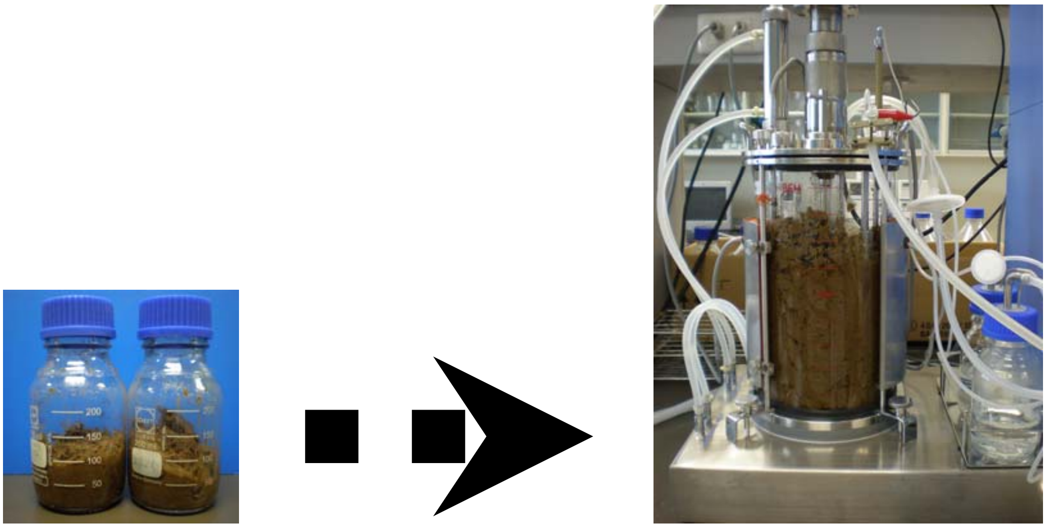
ตารางที่ 3.25. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	pH				
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
0	44.23 ± 1.24	44.68 ± 0.31	45.44 ±1.01	44.18 ± 1.04	42.51 ± 1.12
12	58.38 ± 3.01	60.55 ± 0.03	61.76 ± 0.16	61.34 ± 1.03	54.08 ± 0.77
24	62.71 ± 1.13	63.74 ± 0.15	64.41 ± 1.95	64.87 ± 1.08	58.03 ± 0.11
48	63.81 ± 2.01	65.86 ± 0.54	66.55 ± 0.49	67.02 ± 2.02	62.84 ± 0.72
72	66.66 ± 0.79	68.01 ± 0.21	67.83 ± 0.27	65.94 ± 3.57	65.97 ± 0.16

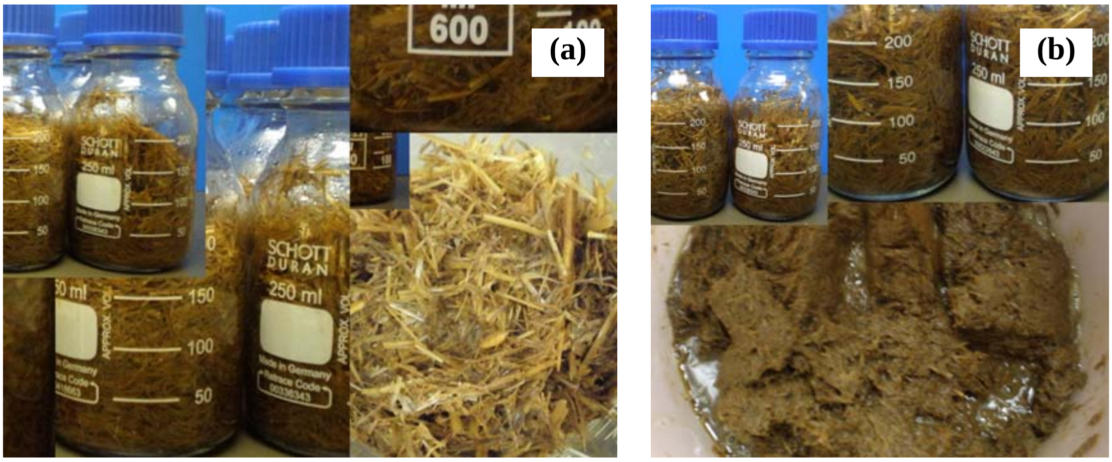
จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณฟางข้าว 15 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4 ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นระยะเวลา 30 นาที, สามารถสรุปได้ว่า เอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate, พีเอช 5.0, อุณหภูมิ 50°ซ., อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสม.

3.5 ผลการศึกษาการไฮโดรไลซิสฟางข้าวด้วยเอนไซม์ในระดับถังหมัก 5,000 มิลลิลิตร

เป็นการขยายขนาดการไฮโดรไลซิสจากขนาด 100 มิลลิลิตร (ขวดดูเรนขนาด 250 มิลลิลิตร) เป็นขนาด 3000 มิลลิลิตร (ถังหมักขนาด 5,000 มิลลิลิตร), ดังแสดงในรูปที่ 3.28. เนื่องจากฟางข้าวหลังจากการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกจะมีความหนืดค่อนข้างสูง (สังเกตุจากขณะปรับพีเอชในระดับขวดดูแรน จะต้องออกแรงในการคนมาก) และมีลักษณะเป็นของแข็ง (รูปที่ 3.29), คาดว่า ในการขยายขนาดขึ้นในระดับถังหมัก ใบพัดไม่สามารถจะหมุนได้ (อาจจะทำให้ความเสียหายแก่ถังหมักได้). ดังนั้น จึงต้องทำการปั่นฟางข้าวหลังจากเตรียมให้มีขนาดเล็กลงเพื่อลดความหนืด (รูปที่ 3.30). การผลิตน้ำตาลจากฟางข้าวในระดับถังหมักจะมีขั้นตอนตามรูปที่ 3.31.



รูปที่ 3.28. ขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร และถังหมักขนาด 5,000 มิลลิลิตร.



รูปที่ 3.29. ลักษณะของฟางข้าวหลังเตรียมด้วยกรด.

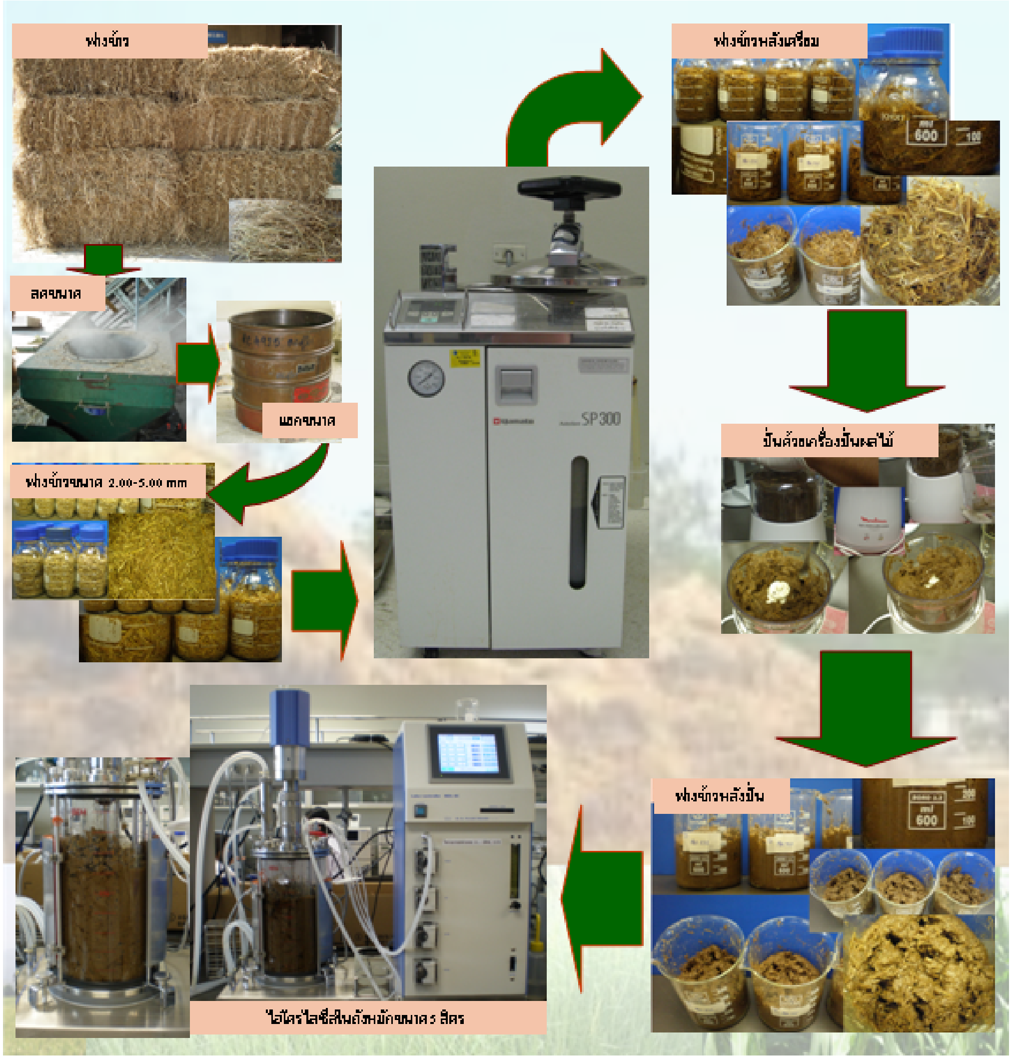
(a) 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 15 min.

(b) 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 30 min.

รูปที่ 3.30. ลักษณะของฟางข้าวหลังบด.

(a) 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที.

(b) 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที.



รูปที่ 3.31. ขั้นตอนในการผลิตน้ำตาลจากฟางข้าว ด้วยการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ในระดับถังหมักขนาด 5000 มิลลิลิตร.

ในการศึกษาการไฮโดรไลซิสฟางข้าวหลังจากเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก ในระดับถังหมักขนาด 5000 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate จะมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพตามรูปที่ 3.32 และ 3.33. ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที, ฟางข้าวจะถูกย่อยเป็นเนื้อเดียวกันภายในชั่วโมงที่ 3 (รูปที่ 3.32). ส่วนการเตรียมฟางข้าวด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ฟางข้าวจะถูกย่อยเป็นเนื้อเดียวกันเร็วกว่า (ภายใน 1 ชั่วโมง). ฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที (รูปที่ 3.33). เนื่องจากการเตรียมฟางข้าวด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที สารละลายจะมีความหนืดต่ำกว่า 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที ทำให้ง่ายต่อการกวน (การผสม) และการถ่ายเทความร้อนให้เข้าสู่สภาวะที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์. ส่วนการเตรียมฟางข้าวด้วย

1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที, สารละลายจะมีความหนืดสูง ทำให้ยากต่อการกวน (การผสม) และการถ่ายเทความร้อน, ส่งผลให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพต่ำ. การไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วยด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที, มีแนวโน้มที่จะสามารถเพิ่มปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นให้สูงกว่านี้ได้ เนื่องจากสารละลายมีความหนืดค่อนข้างต่ำ, ซึ่งมีโอกาสได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น. แต่การไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที, เนื่องจากได้สารละลายที่มีความหนืดสูง ทำให้ยากต่อการเพิ่มฟางข้าวเริ่มต้นให้สูงขึ้น.

1 hr 2 hr 3 hr 6 hr 9 hr 12 hr 24 hr 48 hr 72 hr

รูปที่ 3.32. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Accellerase 1000™) ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการกวน 160 รอบต่อนาที.

1 hr 2 hr 3 hr 6 hr 9 hr 12 hr 24 hr 48 hr 72 hr

รูปที่ 3.33. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Accellerase 1000™) ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการกวน 160 รอบต่อนาที.

ดังนั้น จากการสังเกตจากลักษณะทางกายภาพในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และ 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที, จะเห็นได้ว่า การเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที มีความเหมาะสมและมีแนวโน้มที่จะสามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ให้สูงขึ้น.

ตารางที่ 3.34. ปริมาณต่างๆที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และ 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที

Hydrolysis	Pretreatment	
	1.00%(w/v)H_2SO_4	3.00%(w/v)H_2SO_4
Initial rice straw (g : 100 mL)	15	15
Rice straw residue after pretreated (%,w/w)	64.81 ± 0.50	54.79 ± 0.93
Acellerase 1000™ (mL)	51.48	39.51
Reducing sugar after pretreated (g/L)	32.69 ± 3.03	45.81 ± 2.24
Reducing sugar after hydrolysis (g/L)	68.04 ± 1.77	77.12 ± 4.38
Furfural after pretreated (g/L)	0.13	0.62
Hydrolysis rate at 6 hrs (g/l.hr)	3.40	2.38
Rice straw conversion (mg/g Ds)	409.34 ± 15.26	506.82 ± 17.09
Holocellulose conversion (%,w/w)	56.07 ± 2.09	69.43 ± 2.34
Cellulose conversion (%,w/w)	49.37 ± 7.26	47.73 ± 2.16
Hydrolysis volume (mL)	2520.0 ± 28.3	2755.0 ± 63.6
Solid residue (%,w/w)	51.75 ± 0.91	44.71 ± 0.65

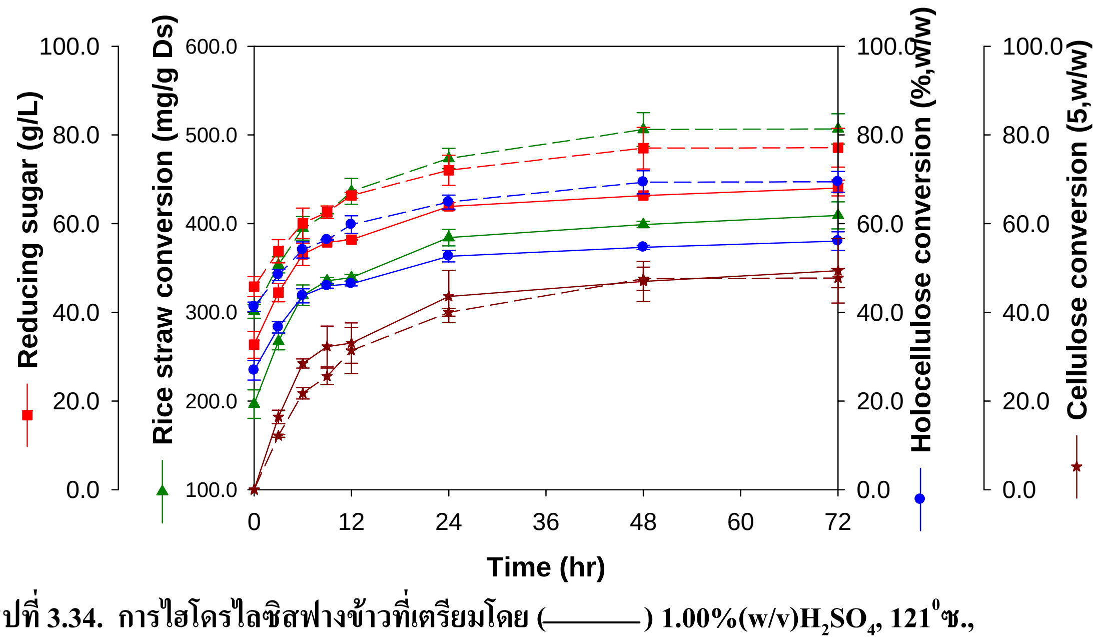
การเตรียมฟางข้าวด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะเหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียมน้อยกว่าการเตรียมฟางข้าวด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที (ตารางที่ 3.26). ส่งผลให้ใช้ปริมาณเอนไซม์ในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสน้อยกว่าด้วยเช่นกัน.

อีกทั้งฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, Rice straw conversion และ Holocellulose conversion หลังจากการเตรียมและการไฮโดรไลซิสสูงกว่าฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที (ตารางที่ 3.26 และรูปที่ 3.34). โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเพียง 68.04±1.77 กรัมต่อลิตร, ซึ่งน้อยกว่าการเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 77.12±4.38 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.26).

ส่วนปริมาณสารละลายที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซิส (Hydrolysate volume) การเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะให้ปริมาณมากกว่า, ซึ่งจะตรงกันข้ามกับปริมาณฟางข้าวที่เหลือหลังจากการไฮโดรไลซิส. การเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะเหลือ

ปริมาณฟางข้าวต่ำกว่า, แสดงว่า การเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ฟางข้าวจะถูกไฮโดรไลซิสได้สมบูรณ์กว่าการเตรียมฟางข้าวด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที.

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที จะมีปริมาณต่ำกว่าการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00% (w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที, แต่อัตราการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis rate) และ Cellulose conversion ของฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที จะใกล้เคียงกันกับฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที. บ่งบอกได้ว่า ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที มีปริมาณใกล้เคียงกับฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที (ตารางที่ 3.26 และรูปที่ 3.34). อีกทั้งในการเตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที จะมีปริมาณฟูเฟอร์รัลน้อยกว่าการเตรียมด้วย 3.00% (w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที, ซึ่งเหตุผลเหล่านี้จะทำให้การการเตรียมด้วย 1.00%(w/v) H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที มีข้อได้เปรียบในกระบวนการหมักมากกว่าการเตรียมด้วย 3.00%(w/v) H_2SO_4, 121 °ซ., 30 นาที.

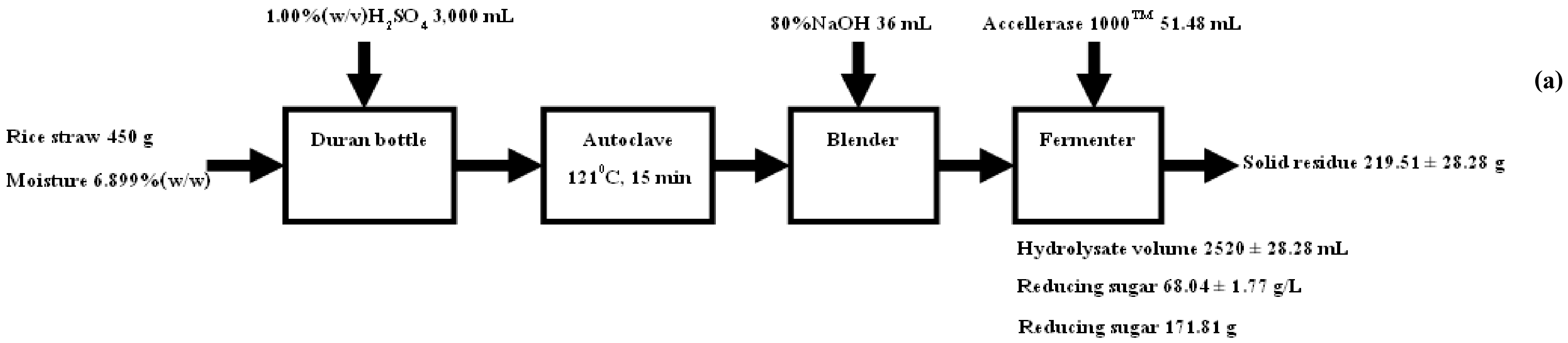


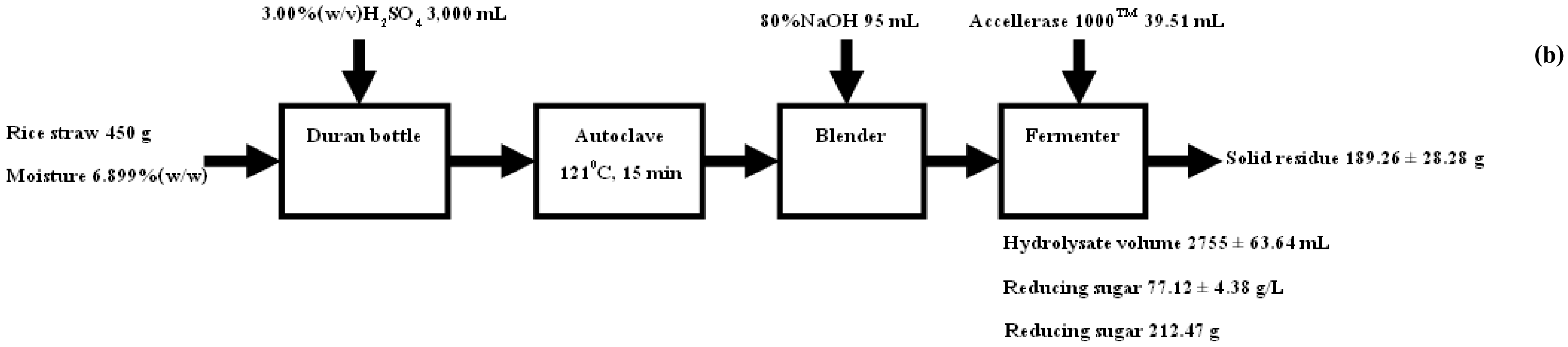
รูปที่ 3.34. การไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมโดย (———) 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที (------) 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ด้วยเอนไซม์ Accellerase 1,000 ปริมาณ 45 FPU/g Dry substrate residues.

ถึงแม้ว่าปริมาณฟางข้าวที่เหลือหลังจากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที มีปริมาณน้อยกว่าฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121 °ซ., 15 นาที และเป็นการยืนยันว่าฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะถูกไฮโดรไลซิสได้สมบูรณ์กว่าฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที. อย่างไรก็ตาม ปริมาณฟางข้าวที่เหลือหลังไฮโดรไลซิสยังคงมีปริมาณสูงอยู่ (ตารางที่ 3.26), ซึ่งจากการสังเกตุฟางข้าวมีปริมาณโฮโลเซลลูโลส 65.7%(w/w). ดังนั้น ถ้าการไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะเหลือปริมาณฟางข้าว 34.3%(w/w). แต่ปริมาณฟางข้าวที่เหลือจากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมทั้ง 2 วิธี จะเหลือปริมาณฟางข้าวมากกว่า, โดยเฉพาะฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที จะเหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียมมากถึง 51.75±0.91%(w/w). บ่งบอกได้ว่า การไฮโดรไลซิสเกิดได้น้อยมาก. ส่วนฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121 °ซ., 30 นาที จะมีปริมาณฟางข้าวที่เหลือสูงกว่าที่คาดการณ์ไว้เล็กน้อย. แต่ปริมาณโฮโลเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้น้อย, โดยมีปริมาณการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเพียง 69.43±2.34%(w/w) เท่านั้น (ตารางที่ 3.26), ซึ่งอาจจะเกิดจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ยังไม่สมบูรณ์, น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้อาจจะเป็น Oligosaccharide, disaccharide เป็นต้น, ทำให้การวิเคราะห์ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณน้อย. การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มอย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงแรก, ทั้งในส่วนของฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และ 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที (รูปที่ 3.34). แต่เมื่อระยะเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง การไฮโดรไลซิสจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย, ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากเซลลูโลสส่วนที่สามารถย่อยได้เหลือปริมาณน้อยลงหรือเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากน้ำตาลที่เกิดขึ้น.

จากการสมดุลมวลในรูปที่ 3.35 จะเห็นได้ว่า การเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ให้ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาตรสารละลายที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซิสสูงและเหลือปริมาณฟางข้าวหลังไฮโดรไลซิสต่ำกว่ากว่าการเตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที. อีกทั้งการเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะใช้ระยะเวลาและระดับในการปั่นหลังเตรียมต่ำกว่า รวมทั้งการใช้ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสต่ำกว่าด้วย (ตารางที่ 3.26).

ดังนั้น จากผลการทดลองข้างต้นจะทำให้การเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที มีความเหมาะสมมากกว่าการเตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที. อย่างไรก็ตาม การเตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที มีปริมาณฟูเฟอร์รัลมากกว่า, ซึ่งจะทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้ยาก. ดังนั้น จึงควรจะทำการทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากวิธีการเตรียม 2 วิธีนี้ต่อไป.





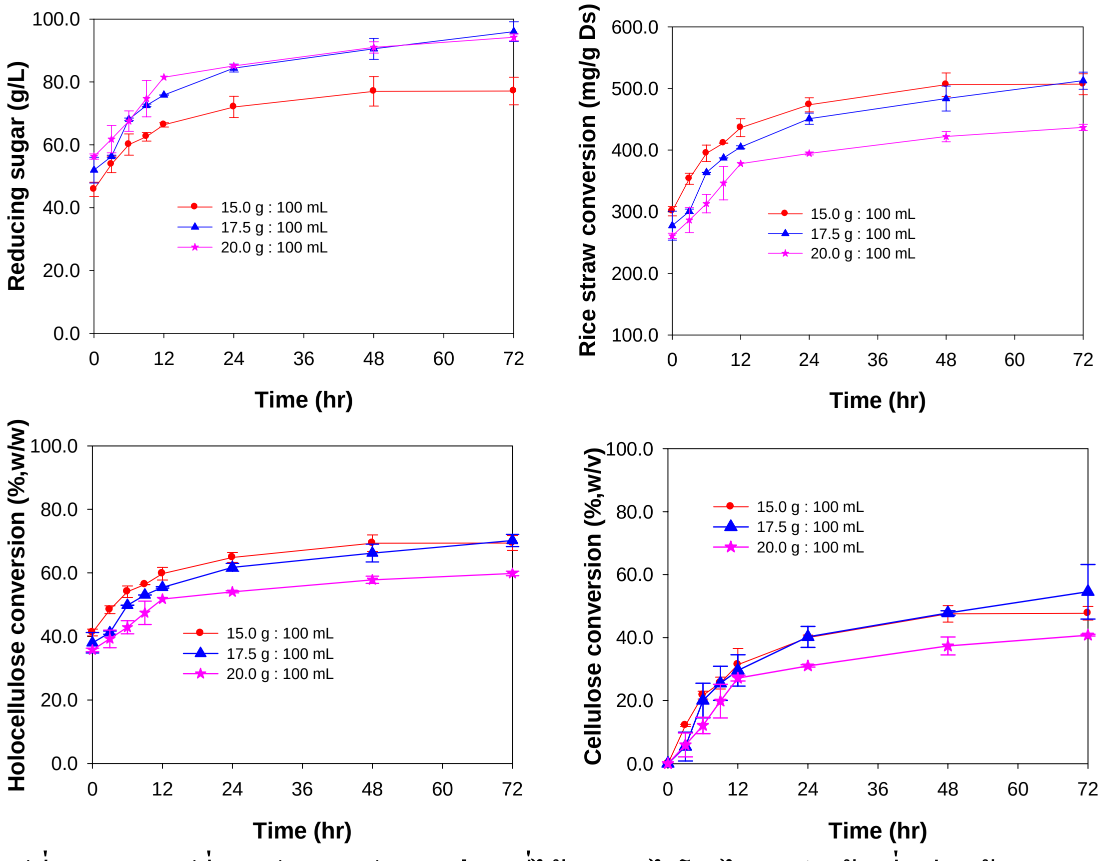
รูปที่ 3.35. สมดุลมวลของฟางข้าวที่เตรียม.

(a) 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที.

(b) 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จากนั้นไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000 ปริมาณ 45 FPU/g Dry substrate residues.

3.6 ผลการศึกษาการไฮโดรไลซิสฟางข้าวด้วยเอนไซม์ในระดับถังหมัก 5,000 มิลลิลิตร ด้วยปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นสูงๆ (ปริมาณฟางข้าว 17.5 และ 20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร)

ในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที เมื่อใช้ปริมาณฟางข้าวมากกว่า 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 5,000 มิลลิลิตร, จะปรากฏผลดังนี้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นสูงขึ้น (รูปที่ 3.36). โดยเมื่อใช้ปริมาณฟางเพิ่มขึ้นจาก 15.0 เป็น 17.5 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด. แต่เมื่อปริมาณฟางข้าวเพิ่มสูงขึ้นถึง 20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่ได้เพิ่มสูงขึ้น. อีกทั้งเมื่อปริมาณฟางข้าวเพิ่มสูงขึ้นถึง 20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร, ปริมาณ Rice staw conversion, Holocellulose conversion และ Cellulose conversion ลดลง เนื่องมาจากเมื่อปริมาณฟางข้าวเพิ่มสูงขึ้น ความหนืดเพิ่มขึ้น ทำให้การไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นได้ยาก.



รูปที่ 3.36. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที เมื่อใช้ปริมาณฟางข้าวสูงกว่า 15.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร.

ตารางที่ 3.27. สรุปปริมาณต่างๆ เมื่อมีการเพิ่มความรุนแรงในการเตรียม และปริมาณฟางข้าวเริ่มต้น

Rice Straw g : 100 mL H_2SO_4	Pretreated	Reducing suagr (g/L)	Rice straw conversion (mg/g Ds)	Holocellulose conversion (%,w/w)	Cellulose conversion (%,w/w)
15.0	1.0%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 15 min	68.04 ± 1.77	409.34 ± 15.26	56.07 ± 2.09	49.37 ± 7.26
15.0	3.0%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 30 min	77.12 ± 4.38	506.82 ± 17.09	69.43 ± 2.34	47.73 ± 2.16
17.5	3.0%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 30 min	96.00 ± 3.14	512.58 ± 14.00	70.22 ± 1.92	54.57 ± 8.68
20.0	3.0%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 30 min	94.20 ± 1.09	436.74 ± 5.07	59.83 ± 0.70	40.79 ± 0.25

ในการเพิ่มปริมาณหรือการขยายขนาดการไฮโดรไลซิสให้มีขนาดใหญ่ขึ้นจากระดับขวดดูแรน 250 มิลลิลิตร เพิ่มเป็นถังหมักขนาด 5,000 มิลลิลิตร โดยทำในระดับปริมาณ 3,500 มิลลิลิตร, ผลปราฏกว่า สามารถไฮโดรไลซิสได้ดีขึ้นและสามารถควบคุมพีเอชของการไฮไดรไลซิสได้ดี. อย่างไรก็ตาม ความหนืดยังคงเป็นปัญหาต่อการไฮโดรไลซิส, โดยจะเห็นได้ชัดเมื่อเพิ่มปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นให้สูงว่าระดับ 17.5 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่เพิ่มขึ้นและส่งผลให้ ปริมาณ Holocellulose และ Cellulose conversion ลดลงด้วย (ตารางที่ 3.27).

3.7 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอล

3.7.1 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าว โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์

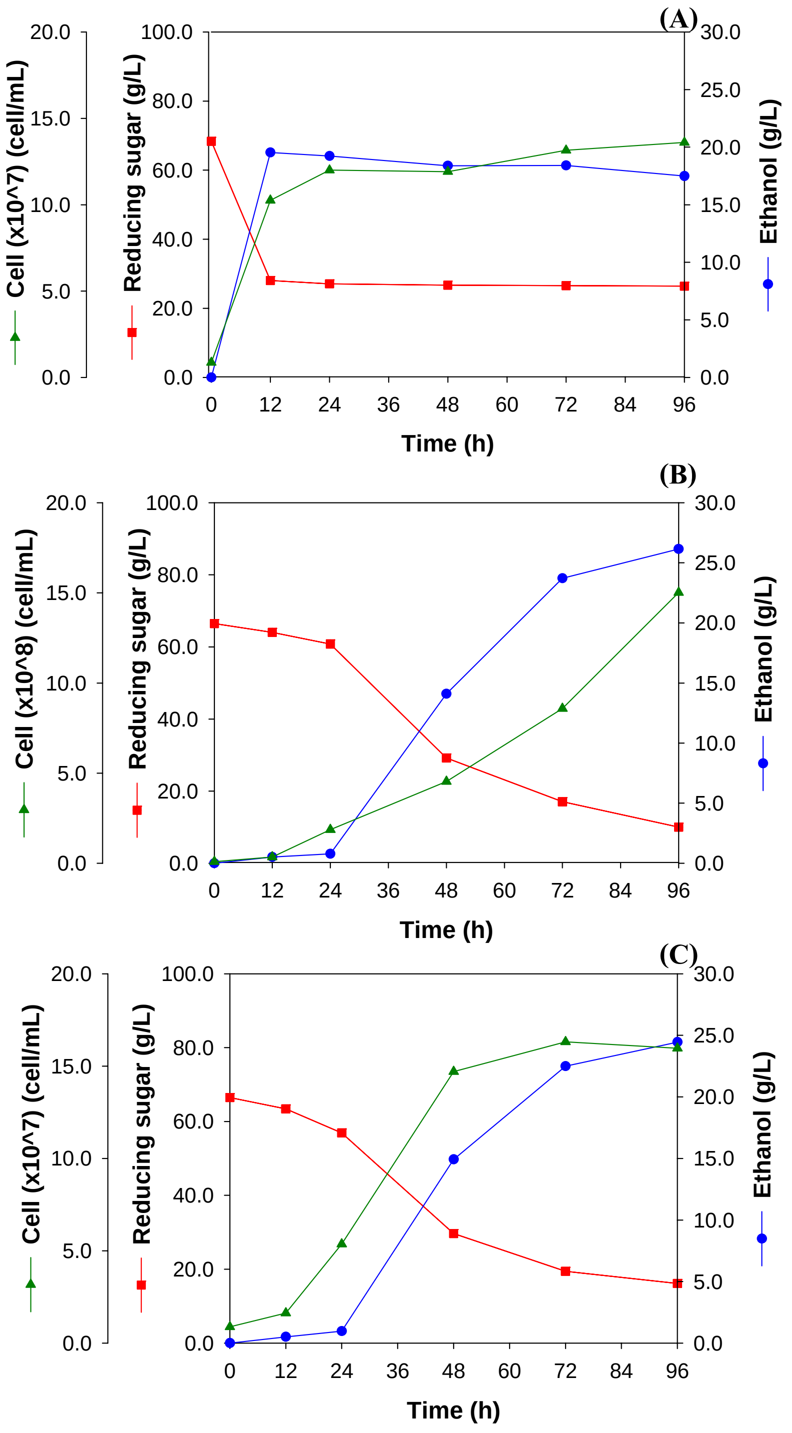
1. ฟางข้าวเตรียมด้วย 1.0%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}ซ. เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000 ปริมาณ 45 FPU/g substrate

การผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อยฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ปริมาณ 15 กรัม ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 45 FPU/ g substrate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง, เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596, *Pichia stipitis* และ *Candida shehatae* TISTR 5843 โดย

ใช้เชื้อเริ่มต้น 1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง, เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS และปริมาณเอทานอล. ผลการทดลองแสดงตามรูปที่ 3.37 และตารางที่ 3.28, ตามลำดับ.

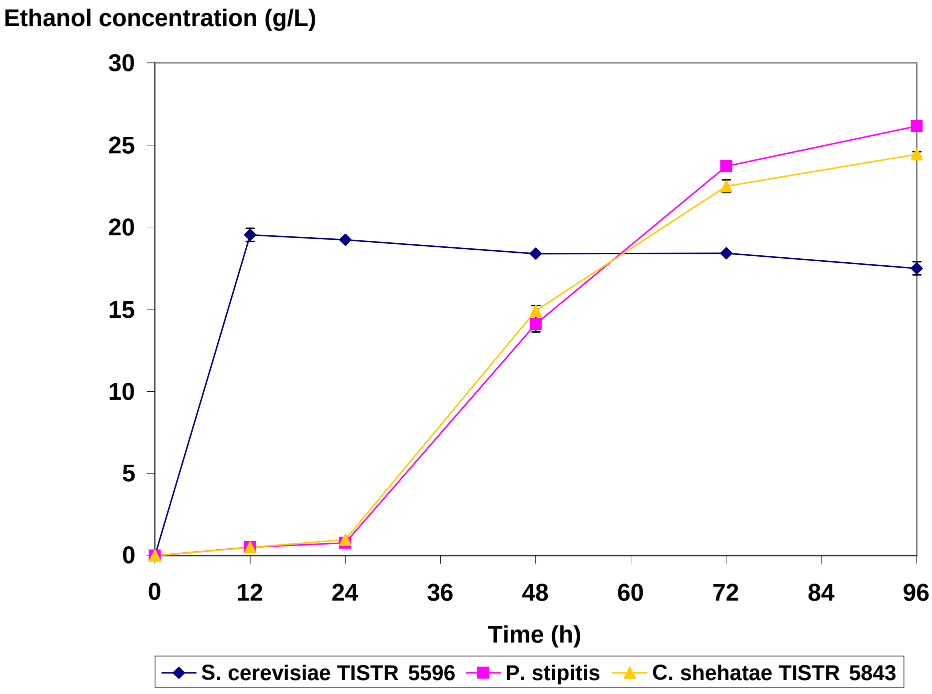
จากรูปที่ 3.37A, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596. เมื่อเริ่มกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.86x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 68.34 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไปในชั่วโมงที่ 12, ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะถูกใช้อย่างรวดเร็วจนเหลือ 28.06 กรัมต่อลิตร. ในขณะที่มีการผลิตเอทานอลเท่ากับ 19.54 กรัมต่อลิตร (2.47 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร). หลังจากนั้น ปริมาณเซลล์, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก. จากผลการทดลองจะเห็นว่า เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้. เนื่องจากการทดลองนี้มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 26.41 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) (ประมาณ 26 กรัมต่อลิตร). จากงานวิจัยของ Mosier *et al.* (2005) ระบุว่า การเตรียมวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเจือจางจะสามารถย่อยองค์ประกอบในส่วนเฮมิเซลลูโลส ทำให้ได้น้ำตาลไซโลสเป็นหลัก. สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ คือ น้ำตาลที่เหลือเป็นน้ำตาลไซโลส, แสดงว่า น้ำตาลที่เชื้อสามารถใช้ในการหมักเอทานอลเป็นน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากขั้นตอนการไฮโดรไลซิส. สอดคล้องกับงานวิจัยของ Margeot *et al.* (2009) ที่รายงานว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้. จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัล ได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นในการเจริญและหมักเอทานอล. โดยจะเห็นได้ว่า ในการทดลองนี้เชื้อสามารถเจริญและหมักเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 12 ชั่วโมงเท่านั้น. สอดคล้องกับงานวิจัยของ Margeot *et al.* (2009) ที่รายงานว่ายีสต์ *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนทานต่อสารยับยั้งที่เกิดจากการเตรียมและย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้.

จากรูปที่ 3.37B, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *P. stipitis*. เมื่อเริ่มกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.89x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 66.50 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไป ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นค่อนข้างช้า เมื่อเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* TISTR 5596. จนในชั่วโมงที่ 24 จึงเพิ่มปริมาณเซลล์เป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะถูกใช้อย่างช้าๆ, เช่นเดียวกับปริมาณเอทานอลจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามการใช้น้ำตาล. ปริมาณเซลล์ของเชื้อนี้จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในชั่วโมงที่ 96, จนมีปริมาณเซลล์เป็น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือ 17.07 กรัมต่อลิตร. ในขณะที่ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 72, มีปริมาณเท่ากับ 23.71 กรัมต่อลิตร (3.00 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร). จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสได้ ดังจะเห็นได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายในชั่วโมงที่ 96 เหลือเพียง 10.02 กรัมต่อลิตร (ได้เอทานอล 26.15 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 3.31 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร). เมื่อพิจารณาจากน้ำตาลไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลที่ได้หลังการเตรียมซึ่งมีประมาณ 26 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการไฮโดรไลซิสประมาณ 40 กรัมต่อลิตร, จะเห็นได้ว่า น้ำตาลทั้งสองชนิดนี้ถูกใช้ไปมากกว่า 40 กรัมต่อลิตร, แสดงว่า เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้. อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *P. stipitis* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัล ได้น้อยกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 ในการเจริญและหมักเอทานอล, เนื่องจากต้องอาศัยระยะเวลาเพื่อปรับตัวและต้องใช้ระยะเวลาถึง 72 ชั่วโมง กว่าจะผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง.



รูปที่ 3.37. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในระหว่างการหมักเอทานอลระดับฟลาสก์จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เปรียบเทียบการผลิตเอทานอล โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 (A), *P. stipitis* (B) และ *C. shehatae* TISTR 5843(C).

จากรูปที่ 3.37C, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอล จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *C. shehatae* TISTR 5843. เมื่อเริ่มกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.88x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 66.51 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไป ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นค่อนข้างช้า เมื่อเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* TISTR 5596 และ *P. stipitis*, จนในชั่วโมงที่ 48 จึงเพิ่มปริมาณเป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, หลังจากนั้น ปริมาณเซลล์จะเริ่มคงที่. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะถูกใช้อย่างช้าๆ, ปริมาณเอทานอลจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามการใช้น้ำตาล. จนในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณเอทานอลจะเริ่มคงที่มีปริมาณเท่ากับ 22.49 กรัมต่อลิตร (2.85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร), น้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 19.46 กรัมต่อลิตร. ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 24.44 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 3.09 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 16.17 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เชื้อนี้สามารถใช้ทั้งน้ำตาลไซโลสและกลูโคสได้. แสดงว่า เชื้อนี้มีคุณสมบัติคล้ายกับ *P. stipitis* คือสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ และเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัล ได้น้อยกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 ในการเจริญและหมักเอทานอล, เนื่องจากต้องอาศัยระยะเวลาเพื่อปรับตัวและต้องใช้ระยะเวลาถึง 72 ชั่วโมง กว่าจะผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่สูง.



รูปที่ 3.38. เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.

ตารางที่ 3.28. ไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

สายพันธุ์	*P* (g/L)	*P* (%v/v)	Q_p	$Y_{p/s}$	*E*	*t*
S. cerevisiae TISTR 5596	19.54	2.47	1.63	0.485	95.11	12
P. stipitis	23.71	3.00	0.33	0.480	94.06	72
C. shehatae TISTR 5843	22.49	2.85	0.31	0.478	93.72	72

P = ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) และ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)

Q_p = อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง),

$Y_{p/s}$ = ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้),

t = ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)

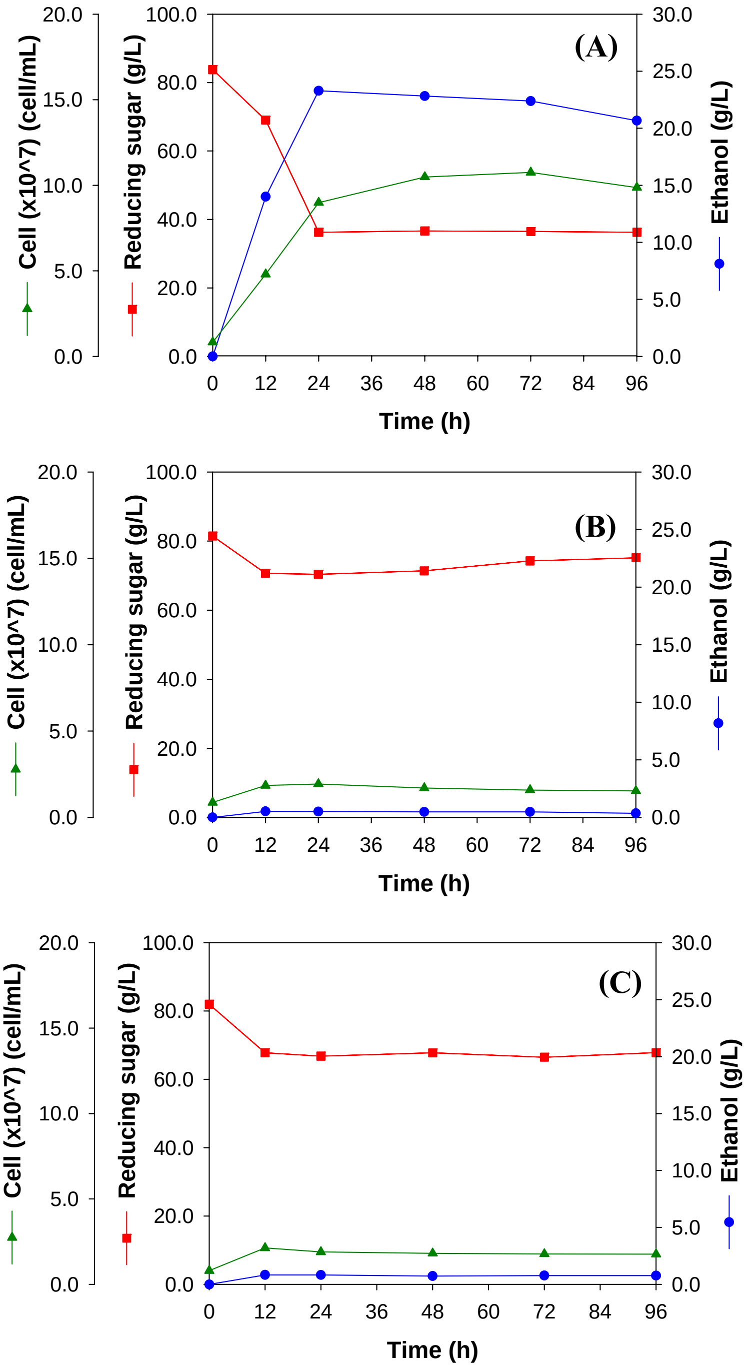
E = ประสิทธิภาพผลได้เอทานอล (เปอร์เซ็นต์)

เมื่อเปรียบเทียบค่าไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์, พบว่า *S.cerevisiae* TISTR 5596, *P. stipitis* และ *C. shehatae* TISTR 5843 มีประสิทธิภาพผลได้เอทานอลเท่ากับ 95.11, 94.06 และ 93.72 เปอร์เซ็นต์, ตามลำดับ. อัตราผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.63, 0.33 และ 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, ตามลำดับ. ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.485, 0.480 และ 0.478 กรัมเอทานอลต่อกรัมกรัมน้ำตาลที่ใช้, ตามลำดับ (ตารางที่3.28). จากผลการทดลองแม้ว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่ดีกว่า *P. stipitis* และ *C. shehatae* TISTR 5843, ตามลำดับ, แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จาก *S. cerevisiae* TISTR 5596 เท่ากับ 19.54 กรัมต่อลิตร (2.47 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) พบว่า ต่ำกว่าที่ได้จาก *P. stipitis* และ *C. shehatae* TISTR 5843, ซึ่งได้เอทานอลค่อนข้างสูงเท่ากับ 23.71 และ 22.49 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 3.00 และ 2.85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร, ตามลำดับ (รูปที่ 3.38) และตารางที่ 3.28.

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ จาก hydrolysate ฟางข้าวขนาด 2-5 มิลลิเมตร ปริมาณ 15 กรัม ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0% w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 45 FPU/ g substrate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง, จะให้ผลที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับทฤษฎี แต่ปริมาณเอทานอลที่ได้ยังถือว่าต่ำอยู่. ทั้งนี้ น่าจะมีสาเหตุจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นสำหรับการหมัก ซึ่งได้แก่ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0% w/v และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ ยังมีความเข้มข้นที่ต่ำอยู่. จึงมีข้อสันนิษฐานว่า หากเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริกที่เข้มข้นขึ้นหรือการใช้สภาวะการเตรียมที่รุนแรงขึ้น จะสามารถทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้นได้ ซึ่งจะส่งผลให้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้นด้วย.

2. ฟางข้าวเตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ. เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000 ปริมาณ 45 FPU/g substrate

การทดลองนี้ จึงเพิ่มความรุนแรงในการเตรียมฟางข้าวให้มากขึ้น โดยใช้ฟางข้าวขนาด 2-5 มิลลิเมตร ปริมาณ 15 กรัม ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0% w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 45 FPU/ g substrate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง, เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 , *Pichia stipitis* และ *Candida shehatae* TISTR 5843 โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง, เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS และปริมาณเอทานอล. ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.39-3.40 และตารางที่ 3.29, ตามลำดับ.



รูปที่ 3.39. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในระหว่างการหมักเอทานอลระดับฟลาสก์จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เปรียบเทียบการผลิตเอทานอล โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 (A), *P. stipitis* (B) และ *C. shehatae* TISTR 5843(C).

จากรูปที่ 3.39A, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอล จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596. เมื่อเริ่มกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.83 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 83.80 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไป พบว่า เชื้อมีการเจริญได้ช้า สังเกตุได้จาก การเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นจำนวน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ต้องใช้ระยะเวลานานถึง 24 ชั่วโมง (ในขณะที่ถ้าเปรียบเทียบกับ hydrolysate ฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%w/v ให้ความร้อน 15 นาที เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วมีจำนวนเป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาเพียง 12 ชั่วโมง). ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้อย่างช้าๆ จนเหลือเพียง 36.28 กรัมต่อลิตร, ในขณะที่มีการผลิตเอทานอลเท่ากับ 23.28 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 2.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในชั่วโมงที่ 24. หลังจากนั้น ปริมาณเซลล์, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเตรียมฟางข้าวด้วยสภาวะที่รุนแรงขึ้น ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นจริง และถึงแม้ว่าน้ำตาลที่สูงขึ้นจะทำให้ได้เอทานอลสูงขึ้น (จาก 19.54 เป็น 23.28 กรัมต่อลิตร) แต่ต้องใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นอีก 12 ชั่วโมง. เนื่องจากว่า การเตรียมโดยใช้สภาวะที่รุนแรงในการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลในปริมาณที่สูงขึ้น ส่งผลต่อการเจริญและผลิตเอทานอลโดยยีสต์ ทำให้ยีสต์ต้องใช้เวลาปรับตัวนานขึ้น.

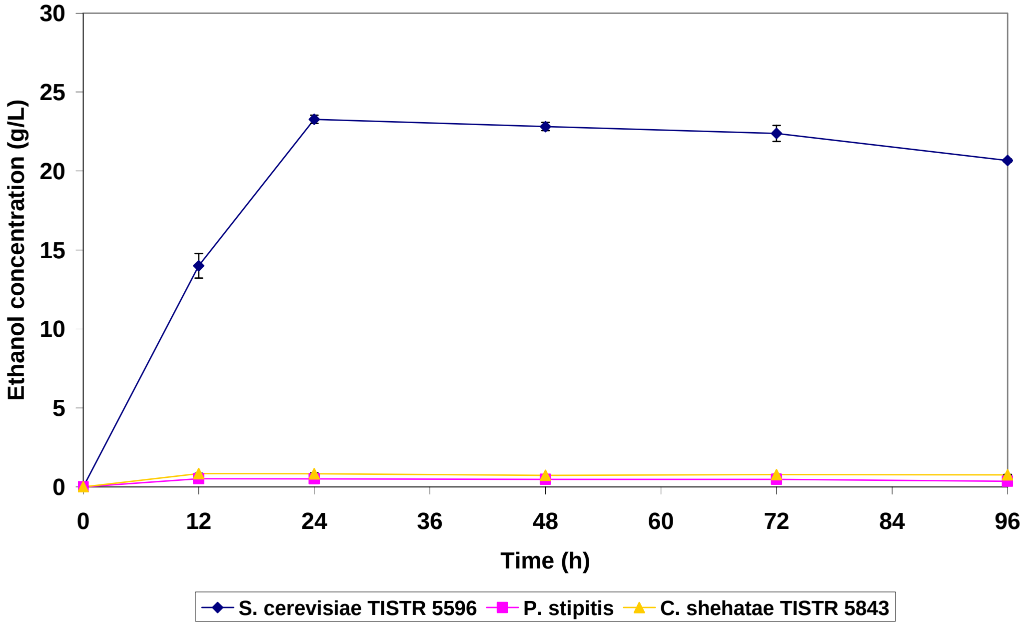
จากผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองข้อที่1, นั่นคือ *S. cerevisiae* TISTR 5596 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้ได้แต่น้ำตาลกลูโคส, ทำให้เหลือน้ำตาลรีดิวซ์บางส่วนที่คาดว่าเป็นน้ำตาลไซโลส ซึ่งเชื้อนี้ไม่สามารถใช้ได้. อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัลได้ดี, เนื่องจากยังสามารถเจริญและหมักเอทานอลได้ แม้จะใช้สภาวะที่รุนแรงขึ้นในการผลิตน้ำตาลจากฟางข้าว.

จากรูปที่ 3.39B, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอล จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *P. stipitis*. เมื่อเริ่มกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.87 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 81.47 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไป พบว่า เชื้อมีการเจริญ

ได้ช้าและน้อยมาก. ดังจะเห็นได้จากที่ระยะเวลาของการหมัก 24 ชั่วโมง, ปริมาณเซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเพียงเล็กน้อยเป็น 1.93×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ในขณะที่ถ้าเปรียบเทียบกับ hydrolysate ฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%w/v ให้ความร้อน 15 นาที ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงเท่ากัน เชื้อเจริญอย่างรวดเร็วมีจำนวนเป็น 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร). ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปเพียงเล็กน้อยและเหลือ 70.66 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12. ในขณะที่มีการผลิตเอทานอลที่ต่ำมากเท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 0.07 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเท่านั้น, ซึ่งคาดว่า น้ำตาลที่เชื้อใช้ไปน่าจะเป็นการใช้เพื่อการเจริญเป็นหลัก. หลังจากนั้น ปริมาณเซลล์, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเตรียมฟางข้าวด้วยสภาวะที่รุนแรงขึ้น ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นจริง, แต่การเตรียมโดยใช้สภาวะที่รุนแรงในการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลในปริมาณที่สูงขึ้น ส่งผลอย่างมากต่อการเจริญและผลิตเอทานอลโดย *P. stipitis*. ดังนั้น จากผลการทดลองแสดงว่า การเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 3%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอทานอลโดย *P. stipitis*.

จากรูปที่ 3.39C, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอลจาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *C. shehatae* TISTR 5843. เมื่อเริ่มกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.81×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 81.95 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไปพบว่า เชื้อมีการเจริญได้ช้าและน้อยมาก. ดังจะเห็นได้จาก เมื่อระยะเวลาผ่านไป ปริมาณเซลล์ยังคงมีจำนวนเป็น 10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปเพียงเล็กน้อยและเหลือ 67.76 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12. ในขณะที่มีการผลิตเอทานอลที่ต่ำมากเท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 0.11 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเท่านั้น, ซึ่งคาดว่า น้ำตาลที่เชื้อใช้ไป น่าจะใช้เพื่อการเจริญเป็นหลัก. หลังจากนั้น ปริมาณเซลล์, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเตรียมฟางข้าวด้วยสภาวะที่รุนแรงขึ้น ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นจริง, แต่การเตรียมโดยใช้สภาวะที่รุนแรงในการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล ในปริมาณที่สูงขึ้น, ส่งผลอย่างมากต่อการเจริญและผลิตเอทานอลโดย *C. shehatae* TISTR 5843 ในลักษณะเดียวกันกับผลการผลิตเอทานอลโดย *P. stipitis*. ดังนั้น จากผลการทดลองแสดงว่า การเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 3%(w/v) ให้

ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอทานอลโดย *C. shehatae* TISTR 5843.



รูปที่ 3.40. เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.

ตารางที่ 3.29. ไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

สายพันธุ์	*P* (g/L)	*P* (%v/v)	Q_p	$Y_{p/s}$	*E*	*t*
S. cerevisiae TISTR 5596	23.28	2.95	0.93	0.490	96.06	24
P. stipitis	0.52	0.07	0.04	0.048	9.49	12
C. shehatae TISTR 5843	0.84	0.11	0.07	0.059	11.57	12

P = ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) และ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)

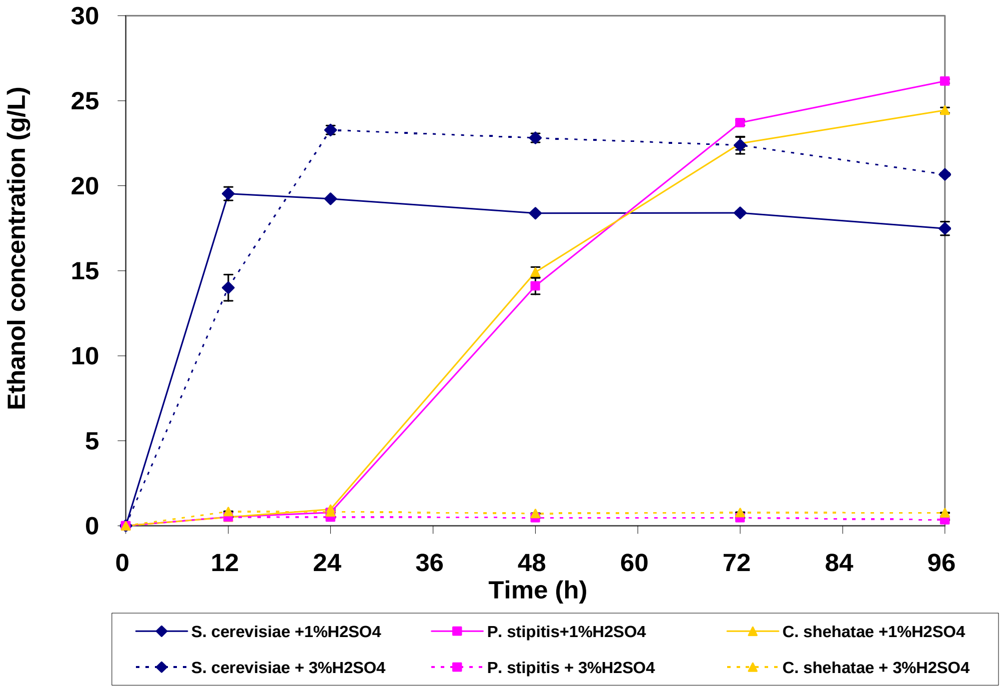
Q_p = อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$Y_{p/s}$ = ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้)

t = ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)

E = ประสิทธิภาพผลได้เอทานอล (เปอร์เซ็นต์)

เมื่อเปรียบเทียบค่าไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596, *P. stipitis* และ *C. shehatae* TISTR 5843 มีประสิทธิภาพผลได้เอทานอลเท่ากับ 96.06, 9.49 และ 11.57 เปอร์เซ็นต์, ตามลำดับ. อัตราผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.93, 0.04 และ 0.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, ตามลำดับ. ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.490, 0.048 และ 0.059 กรัมเอทานอลต่อกรัมกรัมน้ำตาลที่ใช้, ตามลำดับ (ตารางที่ 3.29). จากผลการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 เป็นเชื้อเดียวที่สามารถผลิตเอทานอลจาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้, ผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 23.28 กรัมต่อลิตร (2.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร). ส่วน *P. stipitis* และ *C. shehatae* TISTR 5843 พบว่า ผลิตเอทานอลได้ต่ำมากเท่ากับ 0.52 และ 0.84 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเพียง 0.07 และ 0.11 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร, ตามลำดับ (รูปที่ 3.40 และตารางที่ 3.29).



รูปที่ 3.41. เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ 3 สายพันธุ์ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.

เมื่อเปรียบเทียบการเตรียมฟางข้าวให้ได้น้ำตาลด้วยการใช้สภาวะที่รุนแรงในการทำปฏิกิริยาต่างกันและหมักเอทานอลโดยยีสต์สามสายพันธุ์ (รูปที่ 3.41), พบว่า การเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 1% w/v ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส, แม้ว่าจะทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ต่ำกว่าการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0% w/v ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส, แต่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์. เนื่องจากที่สภาวะการเตรียมดังกล่าว จะเกิดสารยับยั้งการเจริญและหมักเอทานอล เช่น เฟอร์ฟูรัลในระดับที่ไม่ส่งผลกระทบต่อยีสต์มากนัก, เห็นได้จากประสิทธิภาพผลได้เอทานอลที่ค่อนข้างสูงของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์. ในขณะที่การเตรียมฟางข้าวโดยการใช้สภาวะที่รุนแรงขึ้น, เกิดสารยับยั้งในระดับที่มีผลเสียต่อยีสต์ โดยเฉพาะ *P. stipitis* และ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ค่อนข้างมาก, จะเห็นได้จากการที่ ยีสต์สองสายพันธุ์นี้ไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยสภาวะที่รุนแรงนี้ได้.

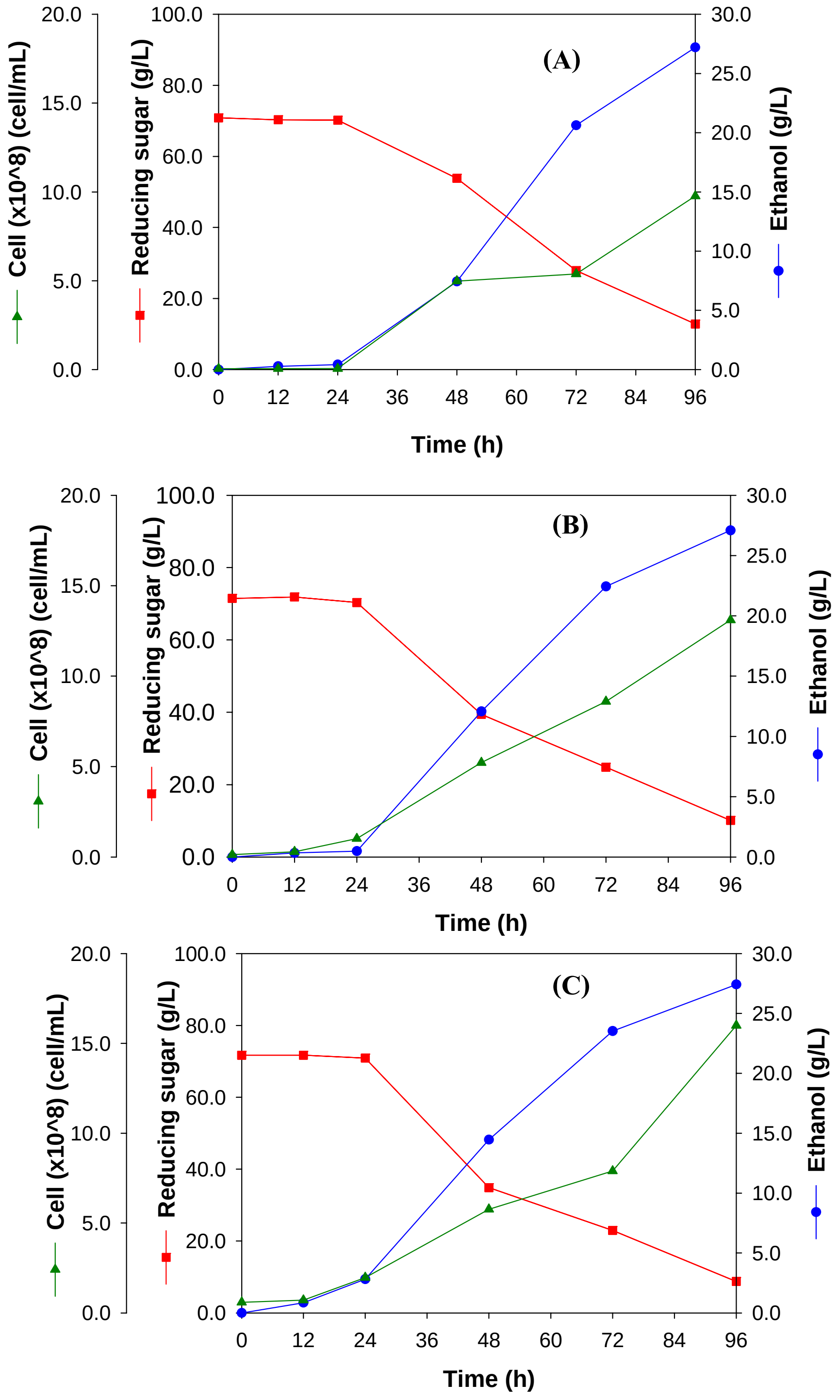
แม้ว่าการเตรียมฟางข้าวด้วยสภาวะที่รุนแรง (กรดซัลฟิวริก 3.0% w/v ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที) จะทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่สูง และยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 จะยังสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น 3.74 กรัมต่อลิตร แต่ต้องใช้ระยะเวลามากขึ้นอีก 12 ชั่วโมง. นอกจากนั้น ยีสต์สายพันธุ์นี้แม้จะสามารถต้านทานและปรับตัวต่อสารยับยั้งได้, แต่เชื้อนี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลหลักที่ได้จากการเตรียมด้วยกรดเจือจางได้. ดังนั้น เพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ จึงควรเลือกใช้เชื้อที่สามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส ซึ่งได้แก่ *P. stipitis* และ *C. shehatae* TISTR 5843.

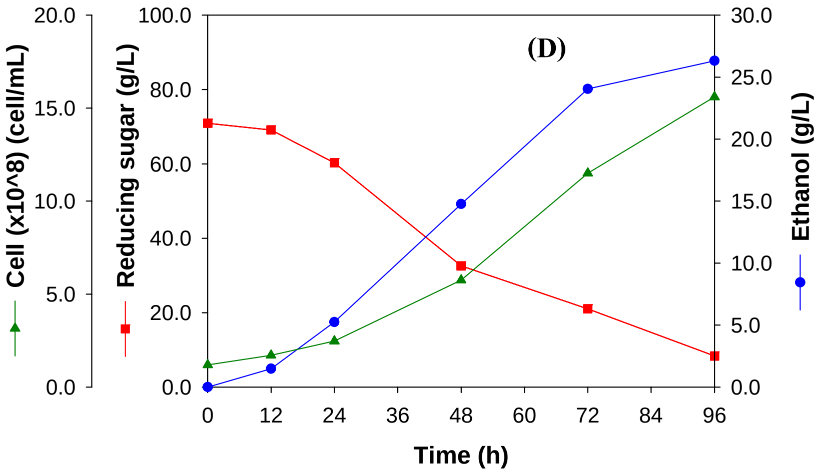
จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 1% w/v ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เป็นสภาวะที่ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลมากกว่าการใช้สภาวะที่รุนแรงขึ้น. เมื่อเปรียบเทียบยีสต์สามสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตเอทานอล จะเห็นได้ว่า *P. stipitis* เป็นเชื้อที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการเตรียมและไฮโดรไลซิสฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง เนื่องจากสามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลไซโลสและกลูโคส และสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงกว่า *C. shehatae* TISTR 5843.

อย่างไรก็ตาม ผลการผลิตเอทานอลโดย *P. stipitis* จากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริก 1% w/v ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ได้เอทานอล 23.71 กรัมต่อลิตร ต้องใช้ระยะเวลาถึง 72 ชั่วโมง. ทั้งนี้ นอกจากผลของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นทำให้เชื้อต้องใช้เวลาในการปรับตัวแล้ว ยังอาจมีสาเหตุจาก ยีสต์สายพันธุ์นี้มีขนาดเซลล์ที่ค่อนข้างเล็ก (เมื่อเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* TISTR 5596 และ *C. shehatae* TISTR 5843) จึงอาจทำให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใช้อาจไม่เหมาะสม. ดังนั้น การทดลองต่อไปจึงทำการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดย *P. stipitis*.

3.7.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม ในการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อยฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0% (w/v) โดย *P. stipitis*

การผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อยฟางข้าวขนาด 2-5 มิลลิเมตร ปริมาณ 15 กรัม ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0% w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 45 FPU/ g substrate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง, เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดยยีสต์ *Pichia stipitis* โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7 และ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง, เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง, เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS และปริมาณเอทานอล. ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.42 และ 3.43 และตารางที่ 3.30, ตามลำดับ.


(A)
(B)
(C)
Cell (x10^8) (cell/mL)
Reducing sugar (g/L)
Ethanol (g/L)
Time (h)



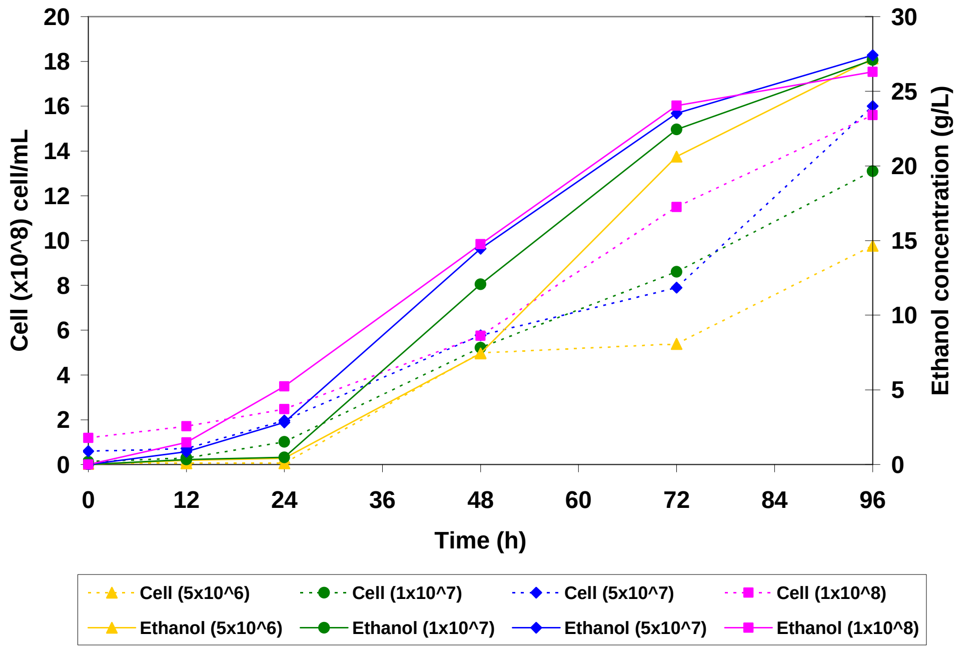
รูปที่ 3.42. **การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในระหว่างการหมักเอทานอลระดับฟลาสก์จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เปรียบเทียบการผลิตเอทานอล โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 x10^6 (A), 1 x10^7 (B), 5 x10^7 (C) และ 1 x10^8 (D) เซลล์ต่อมิลลิลิตร.**

จากรูปที่ 3.42A, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอลจาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *P. stipitis*. เมื่อเริ่มกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5.3 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 70.86 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไป ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ, จนในชั่วโมงที่ 48, จึงเพิ่มปริมาณเซลล์เป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะถูกใช้อย่างช้าๆ เช่นเดียวกับปริมาณเอทานอลจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามการใช้น้ำตาล. ปริมาณเซลล์ของเชื้อนี้จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนในชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณเซลล์เป็น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือ 27.87 กรัมต่อลิตร. ขณะที่ปริมาณเอทานอลค่อยๆ เพิ่มขึ้น จนเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 72, มีปริมาณเท่ากับ 20.62 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 2.61 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสได้, จะเห็นได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายในชั่วโมงที่ 96 เหลือเพียง 12.84 กรัมต่อลิตร (ได้เอทานอล 27.20 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 3.44 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร).

จากรูปที่ 3.42B, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอล จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *P. stipitis*, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร. เมื่อเริ่มกระบวนการหมักพบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 71.49 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไป ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ, จนในชั่วโมงที่ 24 จึงเพิ่มปริมาณเซลล์เป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะถูกใช้อย่างช้าๆ เช่นเดียวกับปริมาณเอทานอลจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามการใช้น้ำตาล. ปริมาณเซลล์ของเชื้อนี้จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณเซลล์เป็น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือ 24.81 กรัมต่อลิตร. ขณะที่ปริมาณเอทานอลค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 72, มีปริมาณเท่ากับ 22.44 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 2.84 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสได้, จะเห็นได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายในชั่วโมงที่ 96 เหลือเพียง 10.09 กรัมต่อลิตร (ได้เอทานอล 27.09 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 3.43 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร).

จากรูปที่ 3.42C, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอล จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *P. stipitis*, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร. เมื่อเริ่มกระบวนการหมักพบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5.93×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 71.72 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไปปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ, จนในชั่วโมงที่ 24 จึงเพิ่มปริมาณเซลล์เป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะถูกใช้อย่างช้าๆ เช่นเดียวกับปริมาณเอทานอลจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามการใช้น้ำตาล. ปริมาณเซลล์ของเชื้อนี้จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในชั่วโมงที่ 96, มีปริมาณเซลล์เป็น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือ 22.95 กรัมต่อลิตร, ขณะที่ปริมาณเอทานอลค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 72, มีปริมาณเท่ากับ 23.52 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 2.97 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสได้, จะเห็นได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายในชั่วโมงที่ 96 เหลือเพียง 8.76 กรัมต่อลิตร (ได้เอทานอล 27.41 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 3.47 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร).

จากรูปที่ 3.42D, แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักในระหว่างการหมักเอทานอล จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *P. stipitis*, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร. เมื่อเริ่มกระบวนการหมักพบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.19×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 70.91 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไป เนื่องจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีจำนวนสูงอยู่แล้วทำให้ใช้ระยะเวลาเพียง 72 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์เป็น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร. ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะถูกใช้อย่างช้าๆ, เช่นเดียวกับปริมาณเอทานอลจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามการใช้น้ำตาล, น้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือ 21.04 กรัมต่อลิตร, ขณะที่ปริมาณเอทานอลค่อยๆ เพิ่มขึ้น จนเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 72, มีปริมาณเท่ากับ 24.05 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 3.04 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสได้, จะเห็นได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายในชั่วโมงที่ 96 เหลือเพียง 8.36 กรัมต่อลิตร (ได้เอทานอล 26.31 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร).



รูปที่ 3.43. เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $5 x10^6$, $1 x10^7$, $5 x10^7$ และ $1 x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.

ตารางที่ 3.30. ไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	*P* (g/L)	*P* (%v/v)	Q_p	$Y_{p/s}$	*E*	*t*
$5x10^6$	20.62	2.61	0.29	0.480	94.05	72
$1x10^7$	22.44	2.84	0.31	0.481	94.25	72
$5x10^7$	23.52	2.97	0.33	0.482	94.56	72
$1x10^8$	24.05	3.04	0.33	0.482	94.54	72

P = ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) และ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)

Q_p = อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$Y_{p/s}$ = ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้)

t = ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)

E = ประสิทธิภาพผลได้เอทานอล (เปอร์เซ็นต์)

เมื่อเปรียบเทียบค่าไคเนติกส์พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $5 x10^6$, $1 x10^7$, $5 x10^7$ และ $1 x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, ตามลำดับ (ตารางที่ 3.30), พบว่า มีประสิทธิภาพผลได้เอทานอลเท่ากับ 94.05, 94.25, 94.56 และ 94.54 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 2.61, 2.84, 2.97 และ 3.04 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร, ตามลำดับ. อัตราผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.29, 0.31, 0.33 และ 0.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, ตามลำดับ. ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.480, 0.481, 0.482 และ 0.482 กรัมเอทานอลต่อกรัมกรัมน้ำตาลที่ใช้, ตามลำดับ. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *P. stipitis* ที่ต่างกันตั้งแต่ $5x10^6$ ถึง $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไม่ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลแตกต่างกัน. เชื้อเริ่มต้นปริมาณน้อย ($5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) สามารถเจริญได้ทันกับเชื้อเริ่มต้นที่มีปริมาณมากกว่าได้, ทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกับเชื้อเริ่มต้นที่มีปริมาณมากกว่า. ในขณะที่ข้อสันนิษฐานที่ว่า ถ้าเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้สูงขึ้นจะสามารถทำให้เชื้อเจริญได้เร็วขึ้นและปริมาณเซลล์ที่มากนั้นจะทำให้ได้เอทานอลสูงโดยใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่า 72 ชั่วโมงได้. ผลการทดลอง พบว่า แม้ว่าจะใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่สูงขึ้น, ผลการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณสูงต้องใช้ระยะเวลานานถึง 72 ชั่วโมง, แสดงว่า น้ำตาลที่

ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยสภาวะดังกล่าว น่าจะมีปริมาณสารยับยั้งที่รบกวนต่อการเจริญและผลิตเอทานอลโดย *P. stipitis*, ทำให้เชื้อต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวค่อนข้างนาน.

3.7.3 ผลการศึกษาการปรับปรุงสายพันธ์ยีสต์เพื่อการผลิตเอทานอล

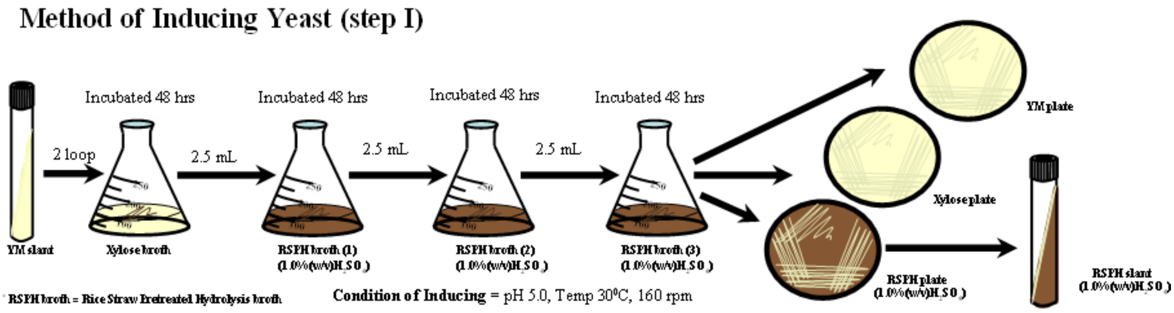
จากการทดลองหมักเอทานอลด้วยเชื้อชนิดต่างๆ (*S. cerevisiae*, *P. stipitis* และ *C. shehatae*) ปรากฏว่า เชื้อ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้รวดเร็วที่สุด, ทั้งในสารละลายที่เตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และ 3.0%(w/v) แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นได้ทั้งหมด. เนื่องจากเชื้อ *S.cerevisia* ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสหรือน้ำตาลที่เกิดการขั้นตอนการเตรียมได้นั่นเอง. ส่วนเชื้อ *P.stipitis* และ *C.shehatae* ถึงแม้ว่าไม่สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ในสารละลายที่เตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และสามารถผลิตเอทานอลในสารละลายที่เตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) ได้ช้า, แต่อย่างไรก็ตาม มีแนวโน้มที่สามารถใช้น้ำตาลในสารละลายที่เตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) ได้มากกว่า *S.cerevisiae* และมีแนวโน้มที่จะสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าด้วย. จากการที่ เชื้อ *P.stipitis* และ *C.shehatae* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสหรือน้ำตาลที่เกิดจากกระบวนการเตรียมในการผลิตเอทานอลได้ (รูปที่ 3.41).

อีกทั้ง ในการทดลองเพิ่มความอัตราเร็วในการหมักเอทานอล โดยการเพิ่มปริมาณเชื้อ *P.stipitis* เริ่มต้น ในการผลิตเอทานอล. ผลการการทดลองชี้ให้เห็นว่า ไม่สามารถทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 3.43 และตารางที่ 3.30).

ทั้งนี้ ในการหมักเอทานอลจากข้างต้น โดยเฉพาะการใช้เชื้อ *P. stipitis* และ *C. shehatae* ที่เชื้อเหล่านี้ใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้น้อย และผลิตเอทานอลได้ค่อนข้างช้านั้น อาจจะเนื่องมาจากเชื้อที่ใช้ยังไม่คุ้นเคยกับสภาวะของสารละลายที่เกิดจากการเตรียมด้วยกรด, ไม่ว่าจะเป็น 1.0%(w/v) หรือ 3.0%(w/v), ทำให้เชื้อต้องใช้เวลาในการปรับตัวนานและเมื่อความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการเตรียมสูงขึ้น (3.0%,w/v) ทำให้เชื้อไม่สามารถที่จะปรับตัวได้, ส่งผลให้ไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้. ดังนั้น ในการปรับสภาพเชื้อให้คุ้นเคยกับสภาวะของสารละลาย น่าจะทำให้ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของเชื้อเร็วขึ้น และสามารถใช้น้ำตาลในการหมักเอทานอลได้มากขึ้น.

ในการปรับสภาพยีสต์ให้มีความคุ้นเคย จะทำโดยการนำเชื้อไปเลี้ยงในสภาวะของสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด ซึ่งก่อนอื่นจะนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ใน YM slant ถ่ายลงสู่ Xylose broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง, เพื่อกระตุ้นให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตและ

ปรับสภาพให้เชื้อคุ้นเคยกับการใช้น้ำตาลไซโลส. จากนั้น ถ่ายเชื้อลงสู่สารละลายที่เตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) (RSPH broth) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง. หลังจากนั้น จึงถ่ายเชื้อลงสู่สารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) อีกครั้ง. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำเช่นเดิมประมาณ 3 ครั้ง. จากนั้น จึงเขี่ยเชื้อลงบน RSPH plate หรือสารอาหารแข็งที่เตรียมด้วยสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และต่อจากนั้น ให้เก็บเชื้อบนวุ้นเอียงที่เตรียมจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0%(w/v) (RSPH slant) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเติบโต และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นตามรูปที่ 3.44.



หมายเหตุ : RSPH = Rice Straw Pretreated Hydrolysis

รูปที่ 3.44. กระบวนการปรับสภาพเชื้อยีสต์ในขั้นต้น (Inducing yeast step I).

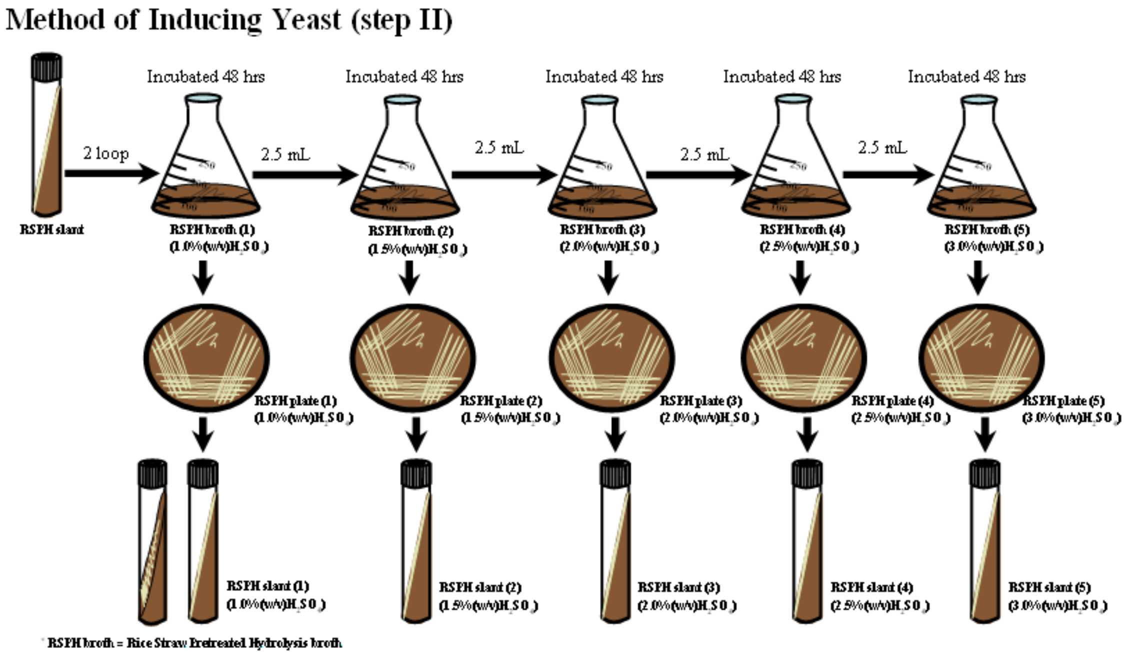
ตารางที่ 3.31. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์

Time (hr)	Natrual *P. stipitis*			Natrual *C.shehatae*		
	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)
0	72.05 ± 0.91	0.24 ± 0.02	1.00×10^{7}	68.78 ± 1.57	0.27 ± 0.01	1.00×10^{7}
24	63.57 ± 1.42	4.82 ± 0.30	3.15×10^{8}	68.46 ± 2.36	1.57 ± 0.23	1.48×10^{7}
48	32.42 ± 0.91	16.72 ± 0.42	6.15×10^{8}	65.66 ± 1.52	2.56 ± 0.89	0.63×10^{7}
72	17.74 ± 2.40	19.78 ± 0.36	1.11×10^{9}	63.70 ± 1.58	2.85 ± 0.63	1.28×10^{7}

ตารางที่ 3.32. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 1 (Inducing yeast step I)

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step I)			Induced *C.shehatae* (step I)		
	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)
0	76.03 ± 1.68	0.27 ± 0.02	1.00×10^{7}	71.06 ± 1.83	0.91 ± 0.02	1.00×10^{7}
24	65.66 ± 0.55	5.05 ± 0.17	2.82×10^{8}	68.26 ± 3.12	3.06 ± 0.19	1.60×10^{7}
48	36.50 ± 1.01	15.79 ± 0.30	5.18×10^{8}	62.15 ± 0.36	4.52 ± 0.43	1.97×10^{7}
72	24.33 ± 0.30	19.48 ± 1.26	8.22×10^{8}	60.73 ± 2.95	4.59 ± 0.52	1.37×10^{7}

การหมักเอทานอลจากการสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ด้วยเชื้อยีสต์ที่ได้จากการปรับสภาพตามรูปที่ 3.44, จะเห็นได้ว่า เชื้อทั้งสองชนิดไม่สามารถเพิ่มอัตราเร็วให้เห็นได้แตกต่างอย่างชัดเจนนัก (ตารางที่ 3.31 และ 3.32). ทั้งนี้ในการปรับสภาพเชื้อ ใช้สารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดเพียง 1.0%(w/v) ซึ่งอาจจะเป็นระดับความเข้มข้นกรดที่ต่ำเกินไป ที่จะช่วยให้การเจริญเติบโตและการหมักเอทานอลดีขึ้น. ดังนั้น จึงทำการทดลองเพิ่มการปรับสภาพจากขั้นตอนที่ 1 ที่ใช้การปรับสภาพเพียงการใช้สารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0%(w/v) ซ้ำประมาณ 3 ครั้ง, เป็นการปรับสภาพโดยการใช้สารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด ที่มีความเข้มข้นของกรดเพิ่มสูงขึ้นจาก 1.0%(w/v) เพิ่มขึ้นที่ละ 0.5%(w/v) จนถึง 3.0%(w/v) ตามรูปที่ 3.45. กระบวนการปรับสภาพยีสต์ในขั้นตอนที่ 2 (Inducing yeast step II) น่าจะสงผลให้การเจริญเติบโตและการหมักเอทานอลเกิดได้ดีขึ้น. ในการปรับสภาพเชื้อในครั้งที่ 2 นี้ จะใช้เชื้อเริ่มต้นจากเชื้อที่ได้จากการปรับสภาพในขั้นที่ 1, โดยถ่ายเชื้อลงสู่อาหารที่เตรียมจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0%(w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง. จากนั้น ถ่ายเชื้อลงสู่สารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.5%(w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง. ทำเช่นเดิม, แต่เปลี่ยนสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดจาก 1.5%(w/v) เป็น 2.0, 2.5 และ 3.0%(w/v), ตามลำดับ. เก็บเชื้อที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นไว้บนวุ้นเอียงที่ทำจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดแต่ละความเข้มข้นตามรูปที่ 3.45.



รูปที่ 3.45. กระบวนการปรับสภาพเชื้อยีสต์ในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II).

ในการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ปรับสภาพด้วยสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรดความเข้มข้นที่สูงขึ้น, ผลปรากฏว่า ทั้งเชื้อ *P. stipitis* และ *C. shehatae* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) ได้ดีขึ้น อย่างเห็นได้ชัดตามตารางที่ 3.33. โดยเฉพาะเชื้อ *C.shehatae* จะสามารถผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้น และในปริมาณที่สูงมาก.

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีการปรับสภาพเชื้อยีสต์ถึง 2 ครั้ง เพื่อให้เชื้อคุ้นเคยกับสภาวะของสารละลายได้มากขึ้นและทำให้ยีสต์มีความสามารถเพิ่มมากขึ้นในการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ ได้ก็ตาม, แต่เชื้อยีสต์ที่ได้มีการปรับสภาพถึง 2 ครั้ง ยังไม่สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์. ตารางที่ 3.34 ชี้ให้เห็นว่าเชื้อไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตได้เลย.

ตารางที่ 3.33. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II)

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step II)			Induced *C.shehatae* (step II)		
	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)
0	71.19 ± 0.49	0.31 ± 0.02	1.00×10^7	70.84 ± 2.51	1.14 ± 0.05	1.00×10^7
24	61.49 ± 0.40	6.10 ± 0.26	3.70×10^8	68.02 ± 5.06	6.38 ± 0.62	2.57×10^7
48	30.12 ± 0.62	18.07 ± 1.16	6.73×10^8	36.24 ± 2.17	16.15 ± 1.47	1.35×10^8
72	14.92 ± 0.39	22.23 ± 0.60	1.37×10^9	27.93 ± 0.75	17.12 ± 2.52	1.26×10^8

ตารางที่ 3.34. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II)

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step II)			Induced *C.shehatae* (step II)		
	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)
0	76.82 ± 2.59	0.33 ± 0.01	1.00×10^7	77.25 ± 0.34	0.33 ± 0.04	1.00×10^7
24	80.94 ± 2.23	0.41 ± 0.01	1.48×10^7	79.31 ± 1.73	0.74 ± 0.14	1.48×10^7
48	80.59 ± 0.34	0.35 ± 0.03	0.63×10^7	78.96 ± 2.01	0.74 ± 0.19	0.63×10^7
72	75.62 ± 1.31	0.33 ± 0.03	1.28×10^7	79.86 ± 0.27	0.67 ± 0.19	1.28×10^7

3.7.4 การหมักเอทานอลโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ และไม่นึ่งฆ่าเชื้อ สารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

ในการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อที่มีการปรับสภาพถึง 2 ครั้ง, ถึงแม้ว่า จะมีแนวโน้มในการผลิตเอทานอลในสารละลายที่เตรียมฟางข้าวด้วยกรด 1.0%(w/v) ได้สูงขึ้น. อย่างไรก็ตาม อัตราเร็วในการผลิตเอทานอลยังช้าอยู่มาก. อีกทั้ง ในสารละลายที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวด้วยกรด 3.0%(w/v) เชื้อยีสต์ไม่สามารถแม้แต่เจริญหรือใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้. ทั้งหมดนี้ อาจจะเกิดจากสารยับยั้งที่เกิดในกระบวนการเตรียมฟางข้าวเป็นหลัก, รวมทั้ง ก่อนการหมักเอทานอลจะเตรียม

สารละลายโดยจะนำไปฆ่าเชื้ออีกครั้ง ซึ่งอาจก่อให้เกิดการผลิตสารยับยั้งเพิ่มขึ้นอีก. ดังนั้น ถ้าไม่ใช้กระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนการหมัก, อาจจะทำให้ปริมาณสารยับยั้งก่อนการหมักมีน้อยลง ซึ่งจะส่งผลให้การหมักเอทานอลเกิดได้เร็วขึ้นและได้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นด้วย.

ในการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรดและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ โดยวิธีไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก, แสดงให้เห็นว่า ในสารละลายที่เตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) เชื้อยีสต์ทั้ง 2 ชนิด (*P.stipitis* และ *C.shehatae*) สามารถเจริญเติบโตและใช้ปริมาณน้ำตาลได้เร็วขึ้น (ตารางที่ 3.35). ทั้งนี้ ในสารละลายที่เตรียมด้วยกรด เชื้อยีสต์ทั้ง 2 สามารถจะเจริญเติบโตและใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้เช่นกัน (ตารางที่ 3.36). ชี้ให้เห็นได้ชัดว่า การนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมักนั้น ส่งเสริมให้เกิดปริมาณสารยับยั้งเพิ่มขึ้น.

ผลการทดลองปรากฏว่า สารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที เชื้อสามารถเจริญได้ดีและผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้น. ส่วนสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้. ดังนั้น ในการหมักสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ที่ผ่านมา, เชื้อไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้, อาจจะเนื่องมาจาก เมื่อมีการฆ่าเชื้ออีกครั้ง ทำให้มีปริมาณของสารยับยั้งเพิ่มขึ้น ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้นั่นเอง.

ตารางที่ 3.35. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step II)			Induced *C.shehatae* (step II)		
	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)
0	65.60 ± 2.24	0.77 ± 0.04	1.00×10^7	61.13 ± 2.99	1.42 ± 0.07	1.00×10^7
24	28.62 ± 0.49	28.90 ± 0.35	3.28×10^8	27.45 ± 0.71	29.02 ± 0.32	2.90×10^8
48	26.57 ± 0.53	26.24 ± 0.13	2.85×10^8	25.25 ± 0.61	26.18 ± 0.92	2.85×10^8
72	23.72 ± 0.45	22.87 ± 0.79	3.25×10^8	23.98 ± 0.12	22.36 ± 0.67	2.78×10^8

ตารางที่ 3.36. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step II)			Induced *C.shehatae* (step II)		
	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)	Reducing sugar (g/L)	EtOH (g/L)	Yeast (cell/mL)
0	73.97 ± 0.80	0.57 ± 0.03	1.00×10^{7}	72.69 ± 0.66	1.29 ± 0.03	1.00×10^{7}
24	78.11 ± 0.85	0.63 ± 0.03	1.53×10^{7}	76.76 ± 0.42	1.353 ± 0.05	6.25×10^{7}
48	41.59 ± 1.16	27.14 ± 0.71	2.73×10^{8}	37.44 ± 0.52	30.24 ± 0.54	2.48×10^{8}
72	36.08 ± 0.78	28.91 ± 0.13	3.20×10^{8}	34.60 ± 0.05	28.46 ± 0.66	2.82×10^{8}

4. สรุปผลการทดลอง

4.1 ฟางข้าวที่มีลักษณะบาง ง่ายต่อการลดขนาด, มีความชื้นต่ำสามารถเคลื่อนย้ายในปริมาณมากๆ ได้ง่าย และมีองค์ประกอบทางเคมี, โดยเฉพาะเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูง, ทำให้ฟางข้าวจะเป็นชีวมวลชนิดหนึ่งที่มีแนวโน้มและมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตเอทานอล.

4.2 ฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร เป็นขนาดที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเตรียมด้วย กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที (1.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที). ภายใต้สภาวะนี้ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 28.68±1.62 กรัมต่อลิตร, Holocellulose conversion 41.59±2.47%(w/w), เหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียม 64.81±0.50%(w/w). ส่งผลให้มีปริมาณฟูเฟอร์รัลเกิดขึ้น 0.13 กรัมต่อลิตร. เมื่อนำฟางข้าวที่เตรียมด้วยสภาวะนี้ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสม, ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และHolocellulose เพิ่มขึ้นเป็น 68.08±1.77 กรัมต่อลิตร และ 56.07±2.09%(w/w) ตามลำดับ.

4.3 เมื่อเพิ่มระดับความรุนแรงของการเตรียมเป็น 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที สามารถเพิ่มน้ำตาลรีดิวซ์และ Holocellulose conversion เป็น 49.87±0.15 กรัมต่อลิตรและ 48.21±0.16%(w/w) ตามลำดับ และเหลือปริมาณฟางข้าวหลังเตรียม 54.79±0.93%(w/w). แต่มีจุดด้อยคือปริมาณฟูเฟอร์รัลเพิ่มขึ้นเป็น 0.62 กรัมต่อลิตร. เมื่อนำฟางข้าวที่ได้ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ด้วยสภาวะเช่นเดียวกับการเตรียมด้วย 1.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ Holocellulose conversion สูงขึ้นถึง 77.12±4.38 กรัมต่อลิตร และ 69.43±2.34%(w/w) ตามลำดับ.

4.4 ในการไฮโดรไลซิสในระดับถังหมัก จะไม่สามารถไฮโดรไลซิสฟางข้าวหลังเตรียมได้โดยตรง เนื่องจากมีความหนืดสูงมาก, ไม่สามารถกวนได้, จึงต้องปั่นฟางข้าวหลังเตรียมด้วยเครื่องปั่นผลไม้ก่อนที่จะนำไปไฮโดรไลซิส. จากผลการไฮโดรไลซิสปรากฏว่า การเตรียมฟางข้าวด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะย่อยได้ดีกว่าและเร็วกว่า, เนื่องจากความหนืดต่ำกว่า, สามารถกวน หรือว่าผสมได้ดีกว่า. อีกทั้งการเตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะ

สามารถเพิ่มปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นให้สูงถึง 17.5 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตรได้ และสามารถให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 96.00 ± 1.09 กรัมต่อลิตร. อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มปริมาณฟางข้าวสูงขึ้นถึง 20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร น้ำตาลรีดิวซ์ไม่เพิ่มขึ้น.

4.5 สารละลายที่เตรียมด้วยด้วย 1.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที แล้วไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ สามารถหมักเป็นเอทานอลได้ง่ายกว่าสารละลายที่เตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานถึง 96 ชั่วโมง.

4.6 เชื้อ *P. stipitis* และ *C. shehatae* สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเตรียมด้วย 1.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ได้เกือบทั้งหมด, แต่เชื้อไม่สามารถเจริญและใช้น้ำตาลที่ได้จากการเตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 30 นาที. ทั้งนี้เนื่องจากการเตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที จะมีสารยับยั้งเกิดขึ้นมากมาย โดยเฉพาะฟูเฟอร์รัล. ส่วนเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถเจริญและเติบโตได้ดี ทั้งในสารละลายที่เตรียมด้วย 1.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และ 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 30 นาที แต่ใช้น้ำตาลที่เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์เท่านั้น. เชื้อ *S. cerevisiae* ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมได้ แต่สามารถทนต่อสารยับยั้งได้ดี.

4.7 การเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้สูงขึ้น ไม่สามารถเพิ่มทั้งอัตราเร็วในการผลิตเอทานอลและปริมาณเอทานอลได้, เนื่องจากในสารละลายที่ได้มีปริมาณสารยับยั้งที่รบกวนต่อการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอล, ทำให้เชื้อต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวค่อนข้างนาน.

4.8 การปรับสภาพหรือการเหนี่ยวนำเชื้อ สามารถเพิ่มอัตราเร็วในการหมักสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วย 1.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที, แต่ยังไม่ดีพอที่จะสามารถหมัก 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ได้ เนื่องจากการการฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งก่อนการหมัก ซึ่งจะเป็นการเพิ่มปริมาณสารยับยั้ง.

4.9 ในการหมักสารละลายที่ได้จากการเตรียมและการไฮโดรไลซิส โดยไม่ต้องทำการฆ่าเชื้อจะสามารถผลิตเอทานอลได้เร็ว และสามารถผลิตเอทานอลจากสารละลายที่เตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 30 นาที ได้.

5. ข้อเสนอแนะ

5.1 ฟางข้าว เป็นวัตถุดิบอย่างหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตน้ำตาล เพื่อนำมาผลิตเอทานอล โดยในการที่จะให้ได้มาซึ่งเอทานอลความเข้มข้นสูงๆ เพื่อให้คุ้มค่าต่อการผลิต จำเป็นต้องทำให้มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงก่อน. สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง คือ ปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นต้องสูง. แต่เมื่อเพิ่มปริมาณฟางข้าวเริ่มต้นให้สูงขึ้น ปัญหาสำคัญที่ตามมา คือ ความหนืดที่เพิ่มขึ้น. ดังนั้น ควรจะหาเครื่องมือหรือวิธีการกวน หรือการผสมให้ฟางข้าวกับเอนไซม์ผสมกันให้ดี, จะทำให้การไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นได้ดี และเร็วกว่านี้ได้.

5.2 ในการเตรียมด้วยความรุนแรงสูงๆ ถึงแม้ว่าจะมีผลดีที่จะสามารถเพิ่มปริมาณฟางข้าวให้สูงขึ้น ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นได้. แต่การเพิ่มความรุนแรงของการเตรียมเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดสารยับยั้งต่อกระบวนการหมักด้วย. ดังนั้น การหาวิธีที่เตรียมโดยไม่ให้เกิดสารยับยั้งกระบวนการหมักจะเป็นผลดีอย่างมากหรือการหาวิธีที่สามารถลดพิษ (detox) ในเบื้องต้นก่อนการหมักจะเป็นผลดีอย่างมากเช่นกัน.

6. เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว กระทรวงเกษตร และสหกรณ์. 2552. การใช้ประโยชน์จากฟางข้าว, [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.brrd.in.th/rkb/data_008/rice_xx2-08_produce0019.html, [เข้าถึงเมื่อ : 8 กันยายน 2552].

กิ่งสุวรรณรัตน์, พรรณวิไล. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้าสันสำปะหลัง. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

แกล้วกล้า, ระวีวรรณ. 2538. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะจอมขวัญ, เกื้อกูล., วัลลภาทิตย์, สิทธิโชค., ลำชัยภูมิ, บุญเรียง และศรีรอต, กล้าณรงค์., 2548. โอกาสของมันสำปะหลังกับอุตสาหกรรม. หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยงสุวรรณไพศาล, วรรณภา. 2546. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัสดุเศษเหลือทิ้งจากกล้วยโดย *Aspergillus niger*. พิษณุโลก: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2548. โครงการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ประโยชน์จากฟางข้าว, [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://ricestraw.rdi.ku.ac. th/ object.html, [เข้าถึงเมื่อ : 17 กันยายน 2552].

Aziz, A. A., Das, K., Husin, M. and Mokhtar, A., 2002. Effects of physical and chemical pre-treatments on xylose and glucose production from oil palm press fiber. *Journal of Oil Palm Research*, **14**, pp. 10-17.

Cao, Y. and Tan, H., 2002. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbo. Res.*, **337**, pp. 1291-1296.

Chen, M., Xia, L. and Xue, P., 2007. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *Inter. Biodeter.&Biodegrad.* **59**, pp. 85-89.

Delgenes, J. P., Moletta, R. and Navarro, J. M., 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonase mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*, *Enzyme and Microbial Technology*. **19**, pp. 220-225.

Ghose, T. K., 1987. Measurement of cellulase activity, *Pure and Appl. Chem.* **59** pp. 257-268.

Hang, Y. D. and Woodams, E. E., 2001. Enzymatic production of reducing sugar from corn cobs. *Lebensm Wiss Technol.* **34**, pp. 140-142.

Ingresson, H., Zacchi, G., Yang, B., Esteghlalian, A. R. and Saddler, J., 2001. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. *J. Biotechnol.* **88**, pp. 177–182.

Karimi, K., Emtiazi, G. and Taherzadeh, M. J. 2006. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*, *Process Biochemistry*, **41**, pp. 653-658.

Krishna, S. H., Prasanthi, K., Chowdary, G. V. and Ayyanna, C., 1998. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Proc Biochem.* **33**, pp. 825-830.

Liming, X. and Xueliang, S. 2004. High-yeild cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Biores. Technol.* **91**, pp. 259-262.

Mandels M, Andreotti R, and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulose, *Biotechnol Bioeng Symp.* **6**, pp. 21–33.

Margeot, A. Hahn-Hagerdal, B. Slade, R. and Monot, F. 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol, *Environmental Biotechnology*. **20**, pp. 372-380.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analyt. Chem.* **31**, pp. 426-428.

Mosier, N., Hendrickson, R., Ho N., Sedlak, M. and Ladisch, M. L., 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover, *Biores. Technol.* **96**, pp. 1986-1993.

Murphy, J. D. and McCarthy, K. 2004. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Appl. Energ.* **82**, pp. 148–166.

Nigam, J. N. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*, *J. Biotechnol.* **87**, pp. 17-27.

Oliva, J. M., Negro, M. J., Sáez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., González, A. and Ballesteros, M. 2005. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochemistry.

Pettersson, L. G. 1975. The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose by *Trichoderma viride*. *In* Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Bailey, M., Enari, F. M., and Linko, M. (eds.), Helsinki, The Finnish National Fund for Research and Development (SITRA).

Rahman, S. H. A., Choudhury, J. P. and Ahmad, A. L. 2006. Production of xylose from oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid, *Biochemical Engineering Journal*, **30**, pp. 97-103.

Srinorakutara, T., Suesat, C., Pitiyont, B., Kitpreechavanit, W. and Cattithammanit, S. 2004. Utilization of waste from cassava starch plant for ethanol production. The Joint International Conference On " Sustainable Energy and Environment (SEE), Hua Hin, Thailand., pp. 344 –349.

Sternberg, D, Vijayakumar, P, and Reese, E. T. 1997. beta-Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose, *Can. J. Microbiol.*, **23**, pp. 139–147.

Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. **83**, pp. 1–11.

Umikalsom, M. S., Ariff, A. B. and Karim, M. I. A. 1998. Saccharification of pretreatment oil palm empty fruit bunch fiber using cellulase of *Chaetomium globosum*, *Agric. Food Chem.* **46**, pp. 3359-3364.

Wen, Z., Liao, W. and Chen, S. 2005. Production of cellulase/ß-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Proc. Biochem.,* **40** pp. 3087-3094.

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

1. ปริมาณความชื้น

ชั่งเส้นใยปาล์มที่บดละเอียดประมาณ 0.5000 กรัม ใส่ใน Moisture can ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว (W_1) นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะมีน้ำหนักคงที่. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น, ชั่งน้ำหนัก (W_2) คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร.

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{(W_2 - W1) \times 100}{\text{ปริมาณเส้นใยปาล์ม(กรัม)}}$$

2. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959)

สารเคมี

1. 3,5-Dinitrosalicylic acid.
2. Sodium hydroxide.
3. Sodium potassium tartrate.

วิธีการวิเคราะห์

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางในระดับที่เหมาะสมลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร. จากนั้น เติมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid reagent) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว. แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดระยะเวลา 10 นาที ย้ายลงในน้ำเย็นทันที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แช่ไว้ประมาณ 10 นาที. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร. จากนั้นนำไปเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส**.**

3. วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography (Agilent Technologies 6890N Network System) โดยใช้ Headspace (Agilent Technologies G1888 Network Headspace Sampler) ในการฉีดตัวอย่างเข้าไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC.

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column	: HP-INNOWAX 19091 N-133
Column description	: ท่อเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 0.251 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร.
Column Tempurature	: 120 องศาเซลเซียส (15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 120 องศาเซลเซียส).
Inject Tempurature	: 220 องศาเซลเซียส.
Detector	: FID (flame-ionized detector).
Carier gas, flow rate	: Helium อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที.

4. วิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (พันธุ์เพ็ง 2523)

วัสดุอุปกรณ์

1. Hemacytometer.
2. กล้องจุลทรรศน์.
3. Methylene blue.

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตต์ตัวอย่างมาเจือจางในสารละลาย 0.2% methyl blue ในหลอดทดสอบ โดยกะอัตราส่วนอย่างคร่าวๆ ผสมให้เข้ากัน.

2. เช็ดสไลด์และ Cover glass ของ Hemacytometer ให้สะอาด, วาง Cover glass ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตต์ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 1 มาแตะที่ขอบ Cover glass, ปล่อยให้สารละลายของเซลล์แทรกไประหว่าง cover glass และสไลด์จนเต็มพอดี และทำอีกด้านหนึ่งในทำนองเดียวกัน.

3. นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า, โดยถือว่าเซลล์ที่ติดสีทึบหมดทั้งเซลล์เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว, ส่วนเซลล์ที่ไม่ติดสีเป็นเซลล์ที่มีชีวิต. การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะนับเซลล์ที่ไม่ติดสีทั้งหมดที่อยู่ในตารางใหญ่, เซลล์ที่อยู่คาบเส้นทั้งด้านขวา และด้านล่าง. ส่วนเซลล์ที่คาบเส้นอยู่ทางด้านซ้ายและด้านบนจะไม่นับ. จำนวนเซลล์ที่นับได้ต้องอยู่ระหว่าง 10-30 เซลล์, ถ้ามากหรือน้อยกว่านั้น จะต้องทำการเจือจางใหม่. ทำการนับทีละ field ตามแนวทะแยงซ้ายขวา จนกระทั่งได้จำนวนเซลล์รวมทั้งหมดประมาณ 300 เซลล์.

การคำนวน

ขนาดความลึกของ Hemacytometer	= 0.1	mm
ขนาดพื้นที่ 1 ช่องใหญ่ของ Hemacytometer	= 0.2 x 0.2	mm^2
ปริมาตร 1 ช่องใหญ่ของ Hemacytometer	= 0.2 mm x 0.2 mm x 0.1 mm	
	= 0.02 cm x 0.02 cm x 0.01 cm	
	= 0.000004 cm^3	
	= 0.000004 ml	
	= 4×10^{-6} ml	

เซลล์ต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เฉลี่ยนที่นับได้ใน 1 ช่องใหญ่ (Y) x 10^6 x (1/4) x Dilution

= Y x 10^6 x (1/4) x Dilution

5. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

5.1 กิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase ด้วยวิธี Filter Paper Assay (Mandels *et al.* (1976) อ้างโดย Ghose (1987))

วัสดุอุปกรณ์

1. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No. 1) ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร.
2. โซเดียมซิเทรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลล์ลา พีเอช 4.8.
3. ตัวอย่างเอนไซม์เซลลูเลส.
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส.

วิธีการทดลอง

1. เติมโซเดียมซิเทรตบัฟเฟอร์ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขนาดปริมาตรอย่างน้อย 25 มิลลิลิตร.
2. เติมเอนไซม์ (เจือจางด้วยโซเดียมซิเทรตบัฟเฟอร์) เจือจางในระดับที่เหมาะสม อย่างน้อย 2 ระดับการเจือจาง (ย่อยให้ได้ปริมาณน้ำตาลใกล้เคียง 2.0 มิลลิกรัม).
3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที เพื่อให้เอนไซม์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากนั่นใส่กระดาษกรอง แล้วผสมให้เข้ากัน.
4. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที.
5. เติมสารละลาย DNS ปริมาณ 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน.
6. แช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำเย็นทันที.
7. เติมน้ำกลั่นปริมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน.

8. ตั้งทิ้งไว้จนกระดาษกรองตกตะกอน ประมาณ 20 นาที.

9. นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร.

Spectro Zero

1. ซิเทรตบัฟเฟอร์ 1.5 มิลลิลิตร.
2. สารละลาย DNS 3.0 มิลลิลิตร.
3. ต้มเป็นเวลา 5 นาที
4. ใช้ปรับค่าการดูดกลื่นแสดงให้เป็นศูนย์.

Enzyme blank

1. ซิเทรตบัฟเฟอร์ 1.0 มิลลิลิตร.
2. เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร.
3. เติม DNS reagent 3.0 มิลลิลิตร.
4. ต้มเป็นเวลา 5 นาที.

กราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เจือจางดังต่อไปนี้.

สารมาตรฐานกลูโคส 1 มิลลิลิตร + บัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร = 1:1.5 = 6.7 กรัมต่อลิตร.

สารมาตรฐานกลูโคส 1 มิลลิลิตร + บัฟเฟอร์ 1.0 มิลลิลิตร = 1:2.0 = 5.0 กรัมต่อลิตร.

สารมาตรฐานกลูโคส 1 มิลลิลิตร + บัฟเฟอร์ 2.0 มิลลิลิตร = 1:3.0 = 3.3 กรัมต่อลิตร.

สารมาตรฐานกลูโคส 1 มิลลิลิตร + บัฟเฟอร์ 4.0 มิลลิลิตร = 1:5.0 = 2.0 กรัมต่อลิตร.

วิธีการ

1. เติมสารมาตรฐานกลูโคส 0.5 มิลลิลิตร.
2. เติมซิเทรตบัฟเฟอร์ 1.0 มิลลิลิตร.
3. เติมสารละลาย DNS 3.0 มิลลิลิตร.
4. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที.

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

1. เตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส (กราฟเส้นตรง).
2. ใช้กราฟมาตรฐาน เปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.
3. คำนวณความเข้มข้นของเอนไซม์.

$$\text{ปริมาณความเข้มข้น} = \frac{1}{\text{ระดับเจือจาง}} = \frac{\text{ปริมาณเอนไซม์}}{\text{ปริมาตรทั้งหมด}}$$

4. คำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ย่อยได้ปริมาณน้ำตาล 2.0 มิลลิกรัม โดยการเขียนกราฟระหว่างปริมาณกลูโคส กับความเข้มข้นของเอนไซม์ ด้วยกราฟ Semi logarithmic.

5. คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ (FPU):

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (FPU)} = \frac{0.37}{\text{ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยให้น้ำตาล 2.0 กรัม}} \quad \text{(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}$$

5.2 กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ด้วยวิธี Cellobiase assay (Sternberg *et al.* (1977) อ้างโดย Ghose (1987))

วัสดุอุปกรณ์

1. เซลลูไบโอส 15 mM (ในสารละลายซิเทรตบัพเฟอร์).
2. 0.05 M Citrate buffer pH 4.8.
3. ตัวอย่างเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส.
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

เติมสารละลายเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร (เจือจางในซิเทรตบัพเฟอร์) ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง (ควรจะทำ 2 Dilution ในแต่ละตัวอย่าง) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเซลลูไบโอส 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วย้ายหลอดทดลองลงในน้ำเย็นทันที หากมีตะกอนแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใส่ไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS Method

Cellubiose blank

1. เติมสารละลายเซลลูไบโอส 1.0 มิลลิลิตร.
2. เติมซิเทรตบัฟเฟอร์ 1.0 มิลลิลิตร.
3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที.
4. แช่ในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำเย็น.

Enzyme blank

1. เติมซิเทรตบัฟเฟอร์ 1.0 มิลลิลิตร.
2. เติมเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร.
3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที.
4. แช่ในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำเย็น.

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

1. คำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส หลังจากการย่อย.

2. นำปริมาณที่ได้คูณด้วย 2 เพื่อเปลี่ยนเป็นปริมาณในหน่วยมิลลิกรัม.

3. เปลี่ยนการเจือจางเอนไซม์เป็นความเข้มข้นของเอนไซม์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ = 1/ระดับการเจือจาง = ปริมาตรของเอนไซม์/ปริมาตรทั้งหมด

4. คำนวณหาปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยได้น้ำตาลกลูโคส 1.0 มิลลิกรัม โดยการเขียนกราฟระหว่างปริมาณกลูโคส กับปริมาณเอนไซม์ ด้วยกราฟ semilogarithmic.

5. คำนวณปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูไบเอส.

เซลลูไบเอส = 0.0926/ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยได้น้ำตาล 1.0 มิลลิกรัม

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. เตรียมสารละลายซิเทรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.5, 4.8, 5.0 และ 5.5

1. เตรียมสารละลาย Citric acid monohydrate ปริมาณ 0.05 โมลาร์ (ชั่ง Citric acid monohydrate 2.104 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร).

2. เตรียมสารละลาย Tri-sodium citrate ปริมาณ 0.05 โมลาร์ (ชั่ง Tri-sodium citrate 4.4115 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 300 มิลลิลิตร).

3. นำสารละลาย Citric acid monohydrate ใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นค่อยๆเติมสารละลาย Tri-sodium citrate จนได้พีเอชตามที่ต้องการ และเก็บไว้ในขวดสีชา.

2. เตรียม DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) reagent

ชั่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid จำนวน 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบน hot plate. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (32 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน, แล้วค่อยๆ เติม sodium potassium tartrate 600 กรัม. ปรับปริมาตรให้ครบ 2,000 มิลลิลิตร, เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง.

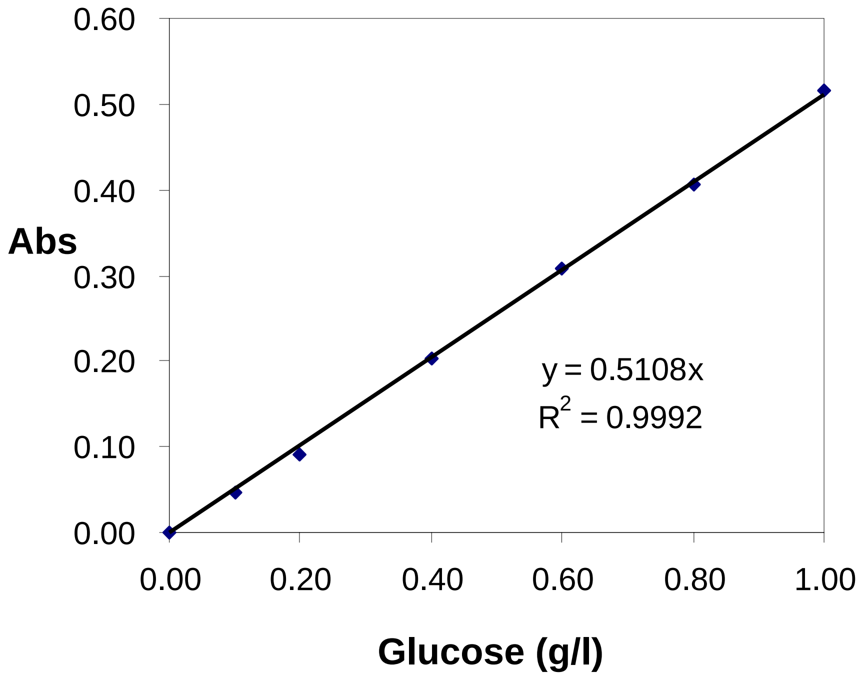
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 1.0 กรัมต่อลิตร โดยการชั่งน้ำตาลกลูโคสที่อบแห้งแล้วปริมาณ 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร. ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายที่ได้ ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร.

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



ภาคผนวก ง
ข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลอง

1. ผลการเตรียมฟางข้าว

1.1 ผลการศึกษาหาขนาดฟางข้าวที่เหมาะสม

ตารางที่ ง1. ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 0.00-30.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

Rice straw (mm)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/l)	Holocellulose Conversion	Furfural (g/l)	Volume (ml)
0.00 - 0.80	66.07 ± 0.94	25.13 ± 0.45	28.51 ± 0.59	0.23	78.7 ± 0.6
0.80 - 1.25	65.33 ± 0.76	28.35 ± 0.52	32.52 ± 0.58	0.22	80.0 ± 1.0
1.25 - 2.00	64.40 ± 1.42	30.44 ± 0.68	35.15 ± 0.84	0.20	79.7 ± 0.6
2.00 - 5.00	64.75 ± 1.26	30.36 ± 0.59	35.02 ± 0.49	0.20	79.7 ± 0.6
5.00 - 15.00	65.69 ± 0.16	28.56 ± 0.77	32.26 ± 0.89	0.07	78.3 ± 0.6
15.00 - 30.00	67.60 ± 0.20	26.57 ± 1.03	29.53 ± 1.02	0.12	77.0 ± 1.0

1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นกรดที่เหมาะสม

ตารางที่ ง2. ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.00-1.75%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

H_2SO_4 (%, w/v)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/l)	Holocellulose Conversion	Furfural (g/l)	Volume (ml)
0.00	84.81 ± 2.02	4.12 ± 0.08	3.09 ±0.10	0.00	51.7 ± 1.5
0.50	71.04 ± 3.37	13.13 ± 0.38	14.75 ± 0.47	0.000	77.3 ± 0.6
0.75	69.24 ± 4.58	22.88 ± 0.94	26.76 ± 1.30	0.050	80.7 ± 0.6
1.00	63.54 ± 0.26	31.27 ± 0.47	36.86 ± 1.05	0.126	81.7 ± 0.6
1.25	62.46 ± 1.01	32.11 ± 1.94	37.92 ± 2.41	0.176	82.3 ± 0.6
1.50	62.47 ± 1.16	33.65 ± 0.61	36.67 ± 1.52	0.176	82.3 ± 0.6
1.75	61.37 ± 0.52	34.35 ± 1.15	41.93 ± 1.24	0.514	84.7 ± 0.6

1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม

ตารางที่ ง3. ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 7-60 นาที

Autoclave time (min)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/l)	Holocellulose Conversion	Furfural (g/l)	Volume (ml)
7	62.01 ± 0.76	25.55 ± 0.73	30.33 ± 0.74	0.05	81.7 ± 0.6
15	61.72 ± 0.64	30.58 ± 3.14	36.55 ± 3.34	0.08	83.0 ± 1.0
30	60.51 ± 0.49	32.23 ± 1.31	38.94 ± 0.72	0.09	84.3 ± 1.2
45	58.84 ± 0.82	33.42 ± 0.78	40.66 ± 0.86	0.15	84.3 ± 0.6
60	58.70 ± 1.78	29.79 ± 0.89	35.78 ± 0.99	0.23	83.3 ± 0.6

1.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ตารางที่ ง4. ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1.00%(w/v) ที่อุณหภูมิ 110-121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

Temperature (^{0}C)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/l)	Holocellulose Conversion	Furfural (g/l)	Volume (ml)
110	70.46 ± 0.52	15.05 ± 0.86	17.93 ± 1.27	0.077	82.0 ± 1.0
115	67.27 ± 0.05	22.10 ± 1.50	26.46 ± 1.68	0.097	82.7 ± 0.6
121	64.81 ± 0.50	28.68 ± 1.62	33.41 ± 2.00	0.126	80.3 ± 0.6

1.5 ผลการศึกษาการแช่ตัวอย่างก่อนการเตรียมด้วยสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น

ตารางที่ ง5. ปริมาณต่างๆ ที่ได้จากการแช่ฟางข้าวขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร ในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.00%(w/v) เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

Soaking time (hr)	Solid residue (%,w/w)	Reducing sugar (g/l)	Holocellulose Conversion	Furfural (g/l)	Volume (ml)
0	62.27 ± 0.16	28.83 ± 1.01	33.70 ± 1.23	0.04	81.0 ± 1.0
6	64.22 ± 0.86	26.72 ± 0.26	31.84 ± 0.28	0.03	82.3 ± 0.6
12	63.92 ± 0.56	27.31 ± 0.32	32.71 ± 0.88	0.03	82.7 ± 1.2
24	63.94 ± 0.52	28.12 ± 0.72	33.59 ± 0.39	0.03	83.0 ± 1.0

2. ผลการไฮโดรไลซิสฟางข้าวด้วยเอนไซม์

2.1 ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม

ตารางที่ ง6. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Enzyme		
	Acellerase 1000	Celluclast 1.5 l	Acellerase 1000 + Celluclast 1.5 l
0	25.93 ± 0.09	26.20 ± 0.00	27.16 ± 0.38
12	35.29 ± 0.94	35.60 ± 0.64	36.58 ± 0.02
24	42.24 ± 1.01	40.99 ± 0.41	42.96 ± 1.30
48	41.45 ± 1.03	40.54 ± 0.31	42.10 ± 0.28
72	40.44 ± 0.54	40.10 ± 0.01	42.68 ± 0.64

ตารางที่ ง7. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Enzyme	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
Acellerase 1000	40.44 ± 0.54	387.44 ± 7.31	53.07 ± 1.00	32.27 ± 1.59	46.61 ± 2.73	90.5 ± 0.7
Celluclast 1.5L	40.10 ± 0.09	363.71 ± 2.16	49.82 ± 0.30	29.24 ± 0.05	42.57 ± 0.65	85.5 ± 0.7
Acellerase 1000 + Celluclast 1.5L	42.68 ± 0.64	405.13 ± 9.29	55.50 ± 1.27	34.18 ± 2.51	42.95 ± 0.97	89.5 ± 0.7

2.2 ผลการศึกษาปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสม

ตารางที่ ง8. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัมต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Rice straw contents (g : 100 mL H_2SO_4)					
	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
0	16.74 ± 0.98	24.39 ± 0.96	28.61 ± 0.11	34.56 ± 0.51	35.61 ± 0.28	34.57 ± 0.48
12	23.08 ± 1.99	32.28 ± 0.78	40.41 ± 2.04	44.62 ± 0.79	40.78 ± 1.84	43.56 ± 0.61
24	25.57 ± 1.54	35.69 ± 0.10	44.83 ± 0.29	54.30 ± 1.71	54.81 ± 2.22	50.06 ± 2.21
48	27.23 ± 1.48	39.05 ± 1.31	48.19 ± 1.20	57.32 ± 0.79	61.02 ± 2.31	58.76 ± 2.48
72	27.70 ± 1.72	40.02 ± 0.36	49.93 ± 0.74	58.42 ± 1.23	61.76 ± 2.82	66.17 ± 0.00

ตารางที่ ง9. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 7.5-20.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Rice straw (g : 100 mL H_2SO_4)	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
7.5	27.70 ± 1.72	350.94 ± 24.51	48.07 ± 3.36	32.22 ± 2.44	43.99 ± 4.62	89.5 ± 0.7
10.0	40.02 ± 0.36	363.33 ± 0.07	49.77 ± 0.01	32.91 ± 1.56	44.0 ± 1.0	85.5 ± 0.7
12.5	49.93 ± 0.74	356.32 ± 5.23	48.81 ± 0.72	35.28 ± 1.39	45.0 ± 1.0	84.0 ± 0.0
15.0	58.42 ± 1.23	343.27 ± 1.29	47.02 ± 0.18	32.52 ± 0.41	52.15 ± 0.46	83.0 ± 1.4
17.5	61.76 ± 2.82	307.34 ± 14.11	42.10 ± 1.93	30.19 ± 2.94	52.59 ± 0.50	82.0 ± 0.0
20.0	66.17 ± 0.00	286.22 ± 2.39	39.21 ± 0.33	31.70 ± 0.22	56.00 ± 2.22	81.5 ± 0.7

2.3 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ตารางที่ ง10. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time	Enzyme (FPU/g Dry residue substrate)									
(hr)	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
0	31.03 ± 1.17	34.05 ± 0.74	34.37 ± 0.91	34.32 ± 0.90	33.95± 0.10	35.78± 0.53	33.45± 0.72	33.32± 0.71	35.93± 0.43	36.46± 1.02
12	39.99±1.93	45.13 ± 0.38	48.08 ± 0.28	52.10 ± 0.09	53.21± 1.05	53.40± 2.03	56.01± 1.20	56.22± 0.22	57.12± 0.87	57.25± 1.34
24	46.67 ± 0.64	52.18 ± 0.26	53.45 ± 1.52	55.74 ± 1.17	55.29± 0.25	56.74± 0.84	58.38± 3.61	62.63± 3.55	63.28± 0.25	62.74± 0.74
48	46.54 ± 4.80	54.47 ± 0.78	57.38 ± 2.56	56.45 ± 1.07	59.06± 0.10	59.64± 2.39	63.88± 0.74	62.93± 0.68	65.36± 2.31	65.98± 0.66
72	52.98 ± 0.73	57.09 ± 0.30	58.99 ± 0.65	58.44 ± 0.73	60.57± 0.05	60.24± 1.67	66.18± 0.06	64.61± 0.53	67.43± 0.47	67.23± 2.01

ตารางที่ ง11. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Enzyme (FPU/g Dry residue substrate)	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
10	52.98 ± 0.73	293.44 ± 5.12	40.20 ± 0.70	28.20 ± 0.46	48.98 ± 1.71	78.3 ± 0.4
15	57.09 ± 0.30	341.17 ± 4.66	46.74 ± 0.64	31.93 ± 0.33	45.11 ± 1.39	84.5 ± 0.7
20	58.99 ± 0.65	344.12 ± 4.85	47.14 ± 0.66	33.29 ± 1.27	46.53 ± 3.23	82.5 ± 2.1
25	58.44 ± 0.65	344.12 ± 4.85	47.14 ± 0.66	33.29 ± 1.27	46.80 ± 0.52	83.8 ± 0.4
30	60.57 ± 0.05	360.25 ± 6.50	49.35 ± 0.89	36.72 ± 0.56	49.35 ± 9.12	84.0 ± 1.4
35	60.24 ± 1.67	361.91 ± 9.98	49.58 ± 1.37	34.09 ± 1.59	46.64 ± 1.07	85.0 ± 0.0
40	66.18 ± 0.06	400.71 ± 2.97	54.89 ± 0.41	45.96 ± 0.71	45.76 ± 0.55	85.5 ± 0.7
45	64.61 ± 0.53	414.16 ± 0.19	56.73 ± 0.03	46.52 ± 1.48	41.23 ± 0.58	90.5 ± 0.7
50	67.43 ± 0.47	427.32 ± 6.24	58.54 ± 0.85	46.30 ± 0.42	42.19 ± 1.70	89.5 ± 0.7
55	67.23 ± 2.01	419.11 ± 25.99	57.41 ± 3.56	44.50 ± 2.86	41.93 ± 2.70	88.0 ± 2.8

2.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ตารางที่ ง12. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Temperature (^{0}C)				
	40	45	50	55	60
0	27.27 ± 0.17	29.41 ± 1.96	32.70 ± 1.56	26.73 ± 0.66	30.30 ± 2.12
12	46.58 ± 0.99	47.29 ± 1.72	49.18 ± 1.54	48.49 ± 0.31	48.39 ± 2.16
24	51.95 ± 0.63	55.97 ± 1.00	55.60 ± 2.53	52.14 ± 1.48	50.80 ± 2.33
48	54.20 ± 1.04	57.87 ± 0.53	59.72 ± 3.80	51.74 ± 0.55	52.08 ± 1.87
72	53.87 ± 0.94	58.31 ± 0.99	60.49 ± 0.90	56.39 ± 0.54	52.93 ± 0.90

ตารางที่ ง13. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Temperature (^{0}C)	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
40	53.87 ± 0.94	325.92 ± 2.97	44.65 ± 0.41	37.33 ± 0.78	47.62 ± 4.37	84.5 ± 0.7
45	58.31 ± 0.99	379.92 ± 0.52	52.04 ± 0.07	43.66 ± 3.78	41.48 ± 0.17	91.0 ± 1.4
50	60.49 ± 0.90	391.95 ± 8.82	53.69 ± 1.21	41.76 ± 0.68	42.46 ± 1.46	90.5 ± 0.7
55	56.39 ± 0.54	343.21 ± 3.31	47.02 ± 0.45	41.87 ± 0.16	48.61 ± 0.00	85.0 ± 0.0
60	52.93 ± 0.90	305.10 ± 2.48	41.79 ± 0.34	30.24 ± 3.77	48.94 ± 1.26	80.5 ± 0.7

2.5 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสม

ตารางที่ ง14. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	pH				
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
0	29.66 ± 0.83	31.10 ± 0.32	30.81 ± 0.09	30.38 ± 0.76	29.73 ± 0.03
12	48.73 ± 1.32	50.65 ± 0.66	52.46 ± 2.18	51.73 ± 3.30	48.46 ± 1.32
24	51.92 ± 0.75	54.64 ± 0.02	55.56 ± 0.44	54.67 ± 0.76	52.63 ± 1.19
48	54.56 ± 2.54	56.93 ± 1.92	56.28 ± 0.98	58.40 ± 2.13	56.08 ± 0.43
72	56.50 ± 0.36	59.57 ± 0.21	59.12 ± 2.91	58.46 ± 0.05	57.38 ± 0.46

ตารางที่ ง15. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

pH	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
4.0	56.50 ± 0.36	335.80 ± 3.56	46.00 ± 0.49	36.99 ± 1.02	52.29 ± 4.04	83.0 ± 1.4
4.5	59.57 ± 0.21	379.63 ± 1.33	52.00 ± 0.18	42.09 ± 0.17	45.47 ± 0.54	89.0 ± 0.0
5.0	59.12 ± 2.91	376.91 ± 24.49	51.63 ± 3.35	41.89 ± 5.09	45.58 ± 3.17	89.0 ± 1.4
5.5	58.46 ± 0.05	374.63 ± 3.30	51.32 ± 0.45	41.74 ± 0.72	48.79 ± 4.53	89.5 ± 0.7
6.0	57.38 ± 0.46	371.86 ± 0.07	50.94 ± 0.01	41.57 ± 0.41	43.18 ± 1.01	90.5 ± 0.7

2.6 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม

ตารางที่ ง16. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
0	29.55 ± 0.80	174.39 ± 6.28	23.89 ± 0.86	0.00 ± 0.00	74.23 ± 0.41	82.5 ± 0.7
12	46.23 ± 1.88	299.48 ± 19.09	41.03 ± 2.62	29.00 ± 3.00	54.37 ± 0.90	90.5 ± 2.1
24	51.70 ± 0.23	342.03 ± 1.27	46.85 ± 0.17	38.88 ± 1.72	50.07 ± 0.94	92.5 ± 0.7
48	53.83 ± 0.00	352.43 ± 8.00	48.28 ± 1.10	41.28 ± 3.31	46.78 ± 1.24	91.5 ± 2.1
72	53.50 ± 0.09	338.82 ±14.18	46.41 ± 1.94	38.12 ± 1.84	51.21 ± 0.64	88.5 ± 3.5
96	54.24 ± 1.01	358.78 ± 4.39	49.15 ± 0.60	42.76 ± 0.47	45.12 ± 0.53	92.5 ± 0.7

3. ผลการไฮโดรไลซิสฟางข้าวด้วยเอนไซม์ (ฟางข้าวเตรียมด้วยสภาวะที่รุนแรงขึ้น)

3.1 ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม

ตารางที่ ง17. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Enzyme		
	Acellerase 1000	Celluclast 1.5L	Acellerase 1000 + Celluclast 1.5L
0	47.08 ± 1.18	46.50 ± 0.80	44.79 ± 1.20
12	58.38 ± 1.28	55.29 ± 0.12	56.85 ± 0.89
24	61.54 ± 0.65	58.04 ± 0.84	59.95 ± 0.29
48	67.65 ± 1.49	60.57 ± 0.45	66.13 ± 0.29
72	67.86 ± 0.10	62.54 ± 0.44	67.04 ± 0.07

ตารางที่ ง18. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 10 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 20 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Enzyme	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
Acellerase 1000	67.86 ± 0.10	432.30 ± 0.93	59.22 ± 0.13	30.71 ± 1.92	40.53 ± 2.31	90.0 ± 0.0
Celluclast 1.5L	62.54 ± 0.44	404.98 ± 6.51	55.48 ± 0.89	24.08 ± 1.32	36.95 ± 1.11	91.5 ± 2.1
Acellerase 1000 + Celluclast 1.5L	67.04 ± 0.07	436.03 ± 1.14	59.73 ± 0.16	33.56 ± 1.65	38.43 ± 0.93	92.0 ± 0.0

3.2 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ตารางที่ ง19. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time	Enzyme (FPU/g Dry residue substrate)									
(hr)	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
0	47.23 ± 0.25	49.18 ± 0.91	48.34 ± 1.15	49.09 ± 0.07	49.49 ± 1.28	45.77 ± 0.07	48.45 ± 0.15	47.13 ± 1.52	45.66 ± 0.87	46.40 ± 0.65
12	47.45 ± 0.54	56.24 ± 0.33	57.25 ± 2.88	58.36 ± 0.25	60.52 ± 0.26	64.39 ± 0.48	67.28 ± 0.12	63.10 ± 1.23	62.30 ± 0.05	66.94 ± 1.59
24	51.60 ± 0.97	59.86 ± 0.27	59.56 ± 1.65	64.36 ± 0.10	66.49 ± 0.83	67.91 ± 2.21	69.90 ± 0.87	71.34 ± 2.00	72.08 ± 1.91	75.14 ± 0.84
48	57.22 ± 1.10	61.83 ± 1.50	64.75 ± 2.62	66.41 ± 1.55	68.33 ± 0.75	71.87 ± 0.28	73.94 ± 0.18	75.40 ± 3.02	77.59 ± 0.50	79.82 ± 0.88
72	58.84 ± 0.47	64.92 ± 0.09	67.58 ± 0.96	69.69 ± 0.53	73.51 ± 0.06	75.01 ± 0.08	77.07 ± 0.24	78.67 ± 0.95	78.41 ± 1.61	80.20 ± 1.57

ตารางที่ ง20. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 10-50 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Enzyme (FPU/g Dry residue substrate)	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
10	58.84 ± 0.47	339.43 ± 0.08	46.50 ± 0.01	15.53 ± 0.18	47.38 ± 1.36	81.5 ± 0.7
15	64.92 ± 0.09	413.59 ± 9.21	56.66 ± 1.26	23.24 ± 0.94	40.09 ± 0.90	90.0 ± 2.1
20	67.58 ± 0.96	406.29 ± 5.54	55.66 ± 0.76	26.84 ± 0.28	37.46 ± 11.89	85.0 ± 0.0
25	69.69 ± 0.53	457.12 ± 5.26	62.62 ± 0.72	31.35 ± 0.81	37.26 ± 2.28	92.8 ± 0.4
30	73.51 ± 0.06	491.27 ± 4.30	67.30 ± 0.59	37.24 ± 2.37	34.14 ± 0.15	94.5 ± 0.7
35	75.01 ± 0.08	504.68 ± 7.08	69.13 ± 0.97	45.63 ± 0.67	34.67 ± 1.93	95.0 ± 1.4
40	77.07 ± 0.24	513.03 ± 1.50	70.28 ± 1.50	44.19 ± 0.59	38.02 ± 7.47	94.0 ± 0.0
45	78.67 ± 0.95	529.08	72.08 ± 0.90	49.20 ± 0.87	33.32 ± 0.48	95.0 ± 0.0
50	78.41 ± 1.61	532.92 ± 18.56	73.0 ± 2.54	51.63 ± 1.91	32.56 ± 0.17	96.0 ± 1.4
55	80.20 ± 1.57	539.62 ± 10.58	73.92 ± 1.45	52.74 ± 3.47	32.46 ± 2.25	95.0 ± 0.0

3.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ตารางที่ ง21. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Temperature (^{0}C)				
	40	45	50	55	60
0	41.41 ± 1.63	42.62 ± 0.58	42.21 ± 0.40	41.94 ± 2.23	43.40 ± 0.59
12	56.65 ± 2.14	56.78 ± 2.75	61.33 ± 0.27	64.50 ± 0.82	65.61 ± 0.84
24	64.75 ± 2.43	64.55 ± 1.62	66.59 ± 0.60	68.66 ± 3.84	67.74 ± 0.61
48	64.55 ± 0.57	69.53 ± 0.54	70.10 ± 3.42	68.38 ± 0.59	68.51 ± 0.48
72	70.01 ± 0.97	71.97 ± 0.02	71.52 ± 0.43	68.33 ± 1.00	67.58 ± 0.96

ตารางที่ ง22. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40-60°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Temperature (^{0}C)	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
40	70.01 ± 0.97	488.72 ± 3.28	66.95 ± 0.45	46.29 ± 3.89	34.57 ± 1.23	97.5 ± 0.7
45	71.97 ± 0.02	489.41 ± 0.21	67.04 ± 0.03	46.21 ± 0.88	34.15 ± 1.49	95.0 ± 0.0
50	71.52 ± 0.43	488.89 ± 6.62	66.97 ± 0.91	46.48 ± 1.67	33.95 ± 0.35	95.5 ± 0.7
55	68.33 ± 1.00	457.45 ± 3.23	62.66 ± 0.44	40.97 ± 0.70	38.04 ± 0.31	93.5 ± 0.7
60	67.58 ± 0.96	445.00 ± 6.27	60.96 ± 0.86	36.93 ± 2.37	38.68 ± 0.53	92.0 ± 0.0

3.4 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสม

ตารางที่ ง23. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	pH				
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
0	44.23 ± 1.24	44.68 ± 0.31	45.44 ±1.01	44.18 ± 1.04	42.51 ± 1.12
12	58.38 ± 3.01	60.55 ± 0.03	61.76 ± 0.16	61.34 ± 1.03	54.08 ± 0.77
24	62.71 ± 1.13	63.74 ± 0.15	64.41 ± 1.95	64.87 ± 1.08	58.03 ± 0.11
48	63.81 ± 2.01	65.86 ± 0.54	66.55 ± 0.49	67.02 ± 2.02	62.84 ± 0.72
72	66.66 ± 0.79	68.01 ± 0.21	67.83 ± 0.27	65.94 ± 3.57	65.97 ± 0.16

ตารางที่ ง24. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 4.0-6.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

pH	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
4.0	66.66 ± 0.79	446.26 ± 1.89	61.13 ± 0.26	34.83 ± 0.97	38.10 ± 0.84	93.5 ± 0.7
4.5	68.01 ± 0.21	462.56 ± 5.51	63.36 ± 0.75	36.81 ± 0.71	38.44 ± 0.27	95.0 ± 1.4
5.0	67.83 ± 0.27	456.54 ± 11.93	62.54 ± 1.63	34.98 ± 2.21	38.39 ± 0.86	94.0 ± 2.8
5.5	65.94 ± 3.57	446.05 ± 20.79	61.10 ± 2.85	34.13 ± 3.71	38.66 ± 1.67	94.5 ± 0.7
6.0	65.97 ± 0.16	453.43 ± 5.60	62.11 ± 0.77	37.39 ± 1.48	36.98 ± 1.58	96.0 ± 1.4

3.5 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม

ตารางที่ ง25. ปริมาณต่างๆ จากการไฮโดรไลซิสฟางข้าวปริมาณ 15.0 กรัม ต่อสารละลายกรด 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ปริมาณ 45 FPU/g Dry residue substrate พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ. อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Time (hr)	Reducing sugar (g/l)	Reducing sugar (mg/ml)	Holocellulose conversion	Cellulose conversion	Solid residue (%,w/w)	Hydrolysate volume (ml)
0	40.28 ± 0.16	256.52 ± 1.06	35.14 ± 0.15	0.00 ± 0.00	68.43 ± 0.28	89.0 ± 0.0
12	55.70 ± 1.31	392.76 ± 11.95	53.80 ± 1.64	31.58 ± 2.55	43.73 ± 2.52	98.5 ± 0.7
24	58.97 ± 0.21	428.25 ± 1.45	58.66 ± 0.20	39.84 ± 0.11	40.37 ± 0.54	101.5 ± 0.7
48	63.16 ± 1.47	456.15 ± 10.45	62.49 ± 1.43	46.35 ± 2.68	37.44 ± 1.07	101.0 ± 0.7
72	65.68 ± 0.83	472.13 ± 9.72	64.67 ± 1.33	50.04 ± 1.97	36.18 ± 1.51	100.5 ± 0.7
96	65.22 ± 0.00	473.33 ± 3.64	64.84 ± 0.50	50.34 ± 0.57	34.47 ± 0.13	101.5 ± 0.7

3.6 ผลการไฮโดรไลซิสในถังหมัก 5 ลิตร

ตารางที่ ง26. การเปลี่ยนแปลงระหว่างการไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่เตรียมด้วย 1.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที และฟางข้าวที่เตรียมด้วย 3.00%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ., 15 นาที

Time	1.00%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 15 min				3.00%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}C, 15 min			
(hr)	RS (g/L)	RC (%,w/w)	HC (%,w/w)	CC (%,w/w)	RS (g/L)	RC (%,w/w)	HC (%,w/w)	CC (%,w/w)
0	32.69 ± 3.03	196.50 ± 16.04	26.92 ± 2.20	0.00 ± 0.00	45.81 ± 2.24	301.06 ± 7.77	41.24 ± 1.06	0.00 ± 0.00
3	44.45 ± 2.08	267.28 ± 9.52	36.61 ± 1.30	16.42 ± 1.51	53.77 ± 2.63	353.42 ± 9.09	48.41 ± 1.25	12.15 ± 0.31
6	53.08 ± 2.54	319.20 ± 11.67	43.73 ±1.60	28.46 ± 1.01	60.07 ± 3.40	394.79 ± 13.25	54.08 ± 1.82	21.74 ± 1.27
9	55.80 ± 0.00	335.63 ± 3.77	45.98 ± 0.52	32.27 ± 4.59	62.56 ± 1.40	411.31 ± 0.32	56.34 ± 0.04	25.57 ± 1.88
12	56.37 ± 0.04	339.09 ± 3.56	46.45 ± 0.49	33.07 ± 4.54	66.35 ± 0.68	436.35 ±14.56	59.77 ± 1.99	31.38 ± 5.18
24	63.89 ± 0.83	384.34 ± 9.3.1	52.65 ± 1.28	43.57 ± 5.88	72.04 ± 3.40	473.45 ± 11.44	64.86 ± 1.57	39.99 ± 0.85
48	66.34 ± 0.17	399.01 ± 3.48	54.66 ± 0.48	46.97 ± 4.53	77.01 ± 4.68	506.06 ± 19.06	69.32 ± 2.61	47.55 ± 2.62
72	68.04 ± 1.77	409.34 ± 15.26	56.07 ± 2.09	49.37 ± 7.26	77.12 ± 4.38	506.82 ± 17.09	69.43 ± 2.34	47.73 ± 2.16

4. ผลการหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์

4.1 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ 3 สายพันธุ์

4.1.1 ฟางข้าวเตรียมด้วย 1.0%(w/v)H_2SO_4, 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไล-ซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000 ปริมาณ 45 FPU/g substrate

ตารางที่ ง27. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *S.cerevisiae* TISTR 5596 จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้ว เอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	80.78 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.86×10^7
12	44.36 ± 0.93	19.54 ± 0.40	10.25×10^7
24	43.19 ± 0.53	19.23 ± 0.06	12.00×10^7
48	33.95 ± 0.17	18.38 ± 0.07	11.92×10^7
72	32.66 ± 0.19	18.41 ± 0.09	13.15×10^7
96	30.87 ± 0.38	17.49 ± 0.40	13.60×10^7

ตารางที่ ง28. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P.stipitis* จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	66.50 ± 1.07	0.00 ± 0.00	0.89×10^7
12	64.05 ± 0.58	0.52 ± 0.02	3.50×10^7
24	60.81 ± 1.48	0.78 ± 0.02	18.63×10^7
48	29.19 ± 0.55	14.10 ± 0.48	45.33×10^7
72	17.07 ± 1.58	23.71 ± 0.15	85.85×10^7
96	10.02 ± 0.28	26.15 ± 0.12	150.17×10^7

ตารางที่ ง29. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *C.shehatae* จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	66.51 ± 0.90	0.00 ± 0.00	0.88×10^7
12	63.41 ± 0.77	0.51 ± 0.02	1.63×10^7
24	56.91 ± 1.19	0.97 ± 0.04	5.37×10^7
48	29.66 ± 0.94	14.92 ± 0.30	14.70×10^7
72	19.46 ± 0.23	22.49 ± 0.38	16.32×10^7
96	16.46 ± 0.72	24.44 ± 0.16	15.97×10^7

4.1.2 ฟางข้าวเตรียมด้วย 3.0%(w/v)H_2SO_4, 121^{0}ซ. เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000 ปริมาณ 45 FPU/g substrate

ตารางที่ ง30. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *S.cerevisiae* TISTR 5596 จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	89.64 ± 0.86	0.00 ± 0.00	0.83×10^7
12	69.95 ± 0.77	14.00 ± 0.77	4.80×10^7
24	50.93 ± 1.97	23.28 ± 0.26	8.98×10^7
48	39.15 ± 0.58	22.52 ± 0.26	10.48×10^7
72	37.31 ± 0.71	22.38 ± 0.51	10.75×10^7
96	36.19 ± 0.16	20.67 ± 0.10	9.87×10^7

ตารางที่ ง31. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P.stipitis* จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	81.47 ± 0.84	0.00 ± 0.00	0.87×10^{7}
12	70.66 ± 0.28	0.52 ± 0.02	1.85×10^{7}
24	70.40 ± 0.10	0.50 ± 0.05	1.93×10^{7}
48	71.37 ± 0.76	0.48 ± 0.03	1.70×10^{7}
72	74.27 ± 1.03	0.47 ± 0.02	1.58×10^{7}
96	75.16 ± 0.79	0.35 ± 0.04	1.53×10^{7}

ตารางที่ ง32. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *C.shehatae* จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	81.95 ± 1.07	0.00 ± 0.00	0.81×10^{7}
12	67.76 ± 0.26	0.84 ± 0.02	2.13×10^{7}
24	66.77 ± 2.59	0.83 ± 0.06	1.90×10^{7}
48	67.74 ± 0.17	0.73 ± 0.02	1.82×10^{7}
72	66.47 ± 0.27	0.78 ± 0.02	1.78×10^{7}
96	67.80 ± 0.33	0.77 ± 0.02	1.77×10^{7}

4.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม ในการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อยฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0% (w/v) โดย *P. stipitis*

ตารางที่ ง33. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 x 10^6 เซลล์ต่อลิตร จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	70.86 ± 0.26	0.00 ± 0.00	0.53 x 10^7
12	70.31 ± 0.16	0.27 ± 0.02	0.53 x 10^7
24	70.19 ± 0.02	0.42 ± 0.32	0.55 x 10^7
48	53.83 ± 0.86	7.44 ± 0.04	49.83 x 10^7
72	27.87 ± 0.21	20.62 ± 0.15	53.83 x 10^7
96	12.84 ± 0.40	27.20 ± 0.17	97.67 x 10^7

ตารางที่ ง34. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^7 เซลล์ต่อลิตร จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	71.49 ± 0.92	0.00 ± 0.00	1.30 x 10^7
12	71.88 ± 0.50	0.33 ± 0.03	2.87 x 10^7
24	70.36 ± 0.22	0.49 ± 0.22	10.13 x 10^7
48	39.42 ± 0.30	12.07 ± 1.01	52.17 x 10^7
72	24.81 ± 0.47	22.44 ± 0.86	86.00 x 10^7
96	10.09 ± 0.96	27.09 ± 0.61	131.00 x 10^7

ตารางที่ ง35. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 x 10^7 เซลล์ต่อลิตร จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	71.72 ± 1.48	0.00 ± 0.00	5.93 x 10^7
12	71.71 ± 0.62	0.85 ± 0.01	7.12 x 10^7
24	70.91 ± 0.99	2.81 ± 0.33	19.67 x 10^7
48	34.84 ± 1.01	14.45 ± 0.30	57.67 x 10^7
72	22.95 ± 0.87	23.52 ± 1.42	79.0 x 10^7
96	8.76 ± 0.26	27.41 ± 0.19	160.00 x 10^7

ตารางที่ ง36. การผลิตเอทานอลระดับฟลาสก์โดย *P. stipitis* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^8 เซลล์ต่อลิตร จาก hydrolysate จากฟางข้าวที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก 1%(w/v) ให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

Time (hr)	RS (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	70.91 ± 1.52	0.00 ± 0.00	11.92 x 10^7
12	69.12 ± 0.05	1.48 ± 0.04	17.08 x 10^7
24	60.29 ± 0.79	5.24 ± 0.44	24.68 x 10^7
48	32.56 ± 1.51	14.76 ± 1.32	57.50 x 10^7
72	21.04 ± 0.14	24.05 ± 0.34	11.50 x 10^7
96	8.36 ± 0.16	26.31 ± 0.19	156.00 x 10^7

4.3 ผลการศึกษาการปรับปรุงสายพันธ์ยีสต์เพื่อการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ง37. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์

Time (hr)	Natrual *P. stipitis*			Natrual *C.shehatae*		
	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	72.05 ± 0.91	0.24 ± 0.02	1.00×10^{7}	68.78 ± 1.57	0.27 ± 0.01	1.00×10^{7}
24	63.57 ± 1.42	4.82 ± 0.30	3.15×10^{8}	68.46 ± 2.36	1.57 ± 0.23	1.48×10^{7}
48	32.42 ± 0.91	16.72 ± 0.42	6.15×10^{8}	65.66 ± 1.52	2.56 ± 0.89	0.63×10^{7}
72	17.74 ± 2.40	19.78 ± 0.36	1.11×10^{9}	63.70 ± 1.58	2.85 ± 0.63	1.28×10^{7}

ตารางที่ ง38. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 1 (Inducing yeast step I)

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step I)			Induced *C.shehatae* (step I)		
	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	73.03 ± 1.68	0.27 ± 0.02	1.00×10^{7}	71.06 ± 1.83	0.91 ± 0.02	1.00×10^{7}
24	62.66 ± 0.55	5.05 ± 0.17	2.82×10^{8}	68.26 ± 3.12	3.06 ± 0.19	1.60×10^{7}
48	36.50 ± 1.01	15.79 ± 0.30	5.18×10^{8}	62.15 ± 0.36	4.52 ± 0.43	1.97×10^{7}
72	24.33 ± 0.30	19.48 ± 1.26	8.22×10^{8}	60.73 ± 2.95	4.59 ± 0.52	1.37×10^{7}

ตารางที่ ง39. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II)

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step II)			Induced *C.shehatae* (step II)		
	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	71.19 ± 0.49	0.31 ± 0.02	1.00×10^{7}	70.84 ± 2.51	1.14 ± 0.05	1.00×10^{7}
24	61.49 ± 0.40	6.10 ± 0.26	3.70×10^{8}	68.02 ± 5.06	6.38 ± 0.62	2.57×10^{7}
48	30.12 ± 0.62	18.07 ± 1.16	6.73×10^{8}	36.24 ± 2.17	16.15 ± 1.47	1.35×10^{8}
72	14.92 ± 0.39	22.23 ± 0.60	1.37×10^{9}	27.93 ± 0.75	17.12 ± 2.52	1.26×10^{8}

ตารางที่ ง40. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II)

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step II)			Induced *C.shehatae* (step II)		
	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	76.82 ± 2.59	0.33 ± 0.01	1.00×10^{7}	77.25 ± 0.34	0.33 ± 0.04	1.00×10^{7}
24	80.94 ± 2.23	0.41 ± 0.01	1.48×10^{7}	79.31 ± 1.73	0.74 ± 0.14	1.48×10^{7}
48	80.59 ± 0.34	0.35 ± 0.03	0.63×10^{7}	78.96 ± 2.01	0.74 ± 0.19	0.63×10^{7}
72	75.62 ± 1.31	0.33 ± 0.03	1.28×10^{7}	79.86 ± 0.27	0.67 ± 0.19	1.28×10^{7}

4.4 การหมักเอทานอลโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ และไม่นึ่งฆ่าเชื้อ สารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

ตารางที่ ง41. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 1.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step II)			Induced *C.shehatae* (step II)		
	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	65.60 ± 2.24	0.77 ± 0.04	1.00×10^7	61.13 ± 2.99	1.42 ± 0.07	1.00×10^7
24	28.62 ± 0.49	28.90 ± 0.35	3.28×10^8	27.45 ± 0.71	29.02 ± 0.32	2.90×10^8
48	26.57 ± 0.53	26.24 ± 0.13	2.85×10^8	25.25 ± 0.61	26.18 ± 0.92	2.85×10^8
72	23.72 ± 0.45	22.87 ± 0.79	3.25×10^8	23.98 ± 0.12	22.36 ± 0.67	2.78×10^8

ตารางที่ ง42. การหมักเอทานอลในสารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยกรด 3.0%(w/v) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000™ ด้วยเชื้อยีสต์ที่มีการปรับสภาพในขั้นที่ 2 (Inducing yeast step II) โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายก่อนการหมัก

Time (hr)	Induced *P. stipitis* (step II)			Induced *C.shehatae* (step II)		
	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)	Reducing sugar (g/l)	EtOH (g/l)	Yeast (cell/ml)
0	73.97 ± 0.80	0.57 ± 0.03	1.00×10^7	72.69 ± 0.66	1.29 ± 0.03	1.00×10^7
24	78.11 ± 0.85	0.63 ± 0.03	1.53×10^7	76.76 ± 0.42	1.353 ± 0.05	6.25×10^7
48	41.59 ± 1.16	27.14 ± 0.71	2.73×10^8	37.44 ± 0.52	30.24 ± 0.54	2.48×10^8
72	36.08 ± 0.78	28.91 ± 0.13	3.20×10^8	34.60 ± 0.05	28.46 ± 0.66	2.82×10^8

ภาคผนวก จ

การคำนวณ

Reducing (g) = Reducing sugar (g/l) x Volume (ml)

Reducing sugar (mg/g Ds) = $\frac{\text{Reducing sugar (mg)}}{\text{Initrial substrate (g)}}$

Holocellulose conversion = $\frac{\text{Reducing sugar (g)} \times 0.9 \times 100}{\text{Holocellulose (g)}}$

Cellulose conversion = $\frac{(\text{Reducing sugar (g) 72 hr} - \text{Reducing sugar (g) 0 hr}) \times 0.9 \times 100}{\text{Cellulose (g)}}$

Ethanol conversion = $\frac{\text{Ethanol (g/l)}}{\text{Initial reducing sugar (g/l)}}$

Ethanol efficiency = $\frac{\text{ผลได้จริง (กรัม)} \times 100}{\text{ผลได้ตามทฤษฎี (กรัม)}}$

ผลได้จริง (กรัม) = ปริมาณเอทานอลที่ได้จริง (g/l) x ปริมาตรที่ได้ (ml)

ผลได้ตามทฤษฎี (กรัม) = ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัม) x 0.51