การศึกษาความเป็นไปได้ของการหมักเอทานอลจากหญ้าขจรจบและวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้

อภิญญา จันทรวัฒนะ
อาจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตรและการจัดการ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตปราจีน
ปิยะรัชช์ กุลเมธี*
อาจารย์ ภาควิชานวัตกรรมและเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตปราจีน

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0-3721-7311 ต่อ 7913 อีเมล: piyarachk@kmutnb.ac.th
รับเมื่อ 20 มีนาคม 2558 ตอบรับเมื่อ 29 มิถุนายน 2558 เผยแพร่ออนไลน์ 22 ธันวาคม 2558
© 2016 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

การศึกษาการหมักเอทานอลจากชีวมวลที่มีมากในจังหวัดปราจีนบุรี ได้แก่ หญ้าขจรจบ และวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้ ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลสเท่ากับ 24.8 ± 1.1% และ 2.5 ± 0.5% กรัม/กรัม ตามลำดับ และมีปริมาณลิกนินเท่ากับ 22.0 ± 1.8% และ 15.9 ± 1.5% กรัม/กรัม ตามลำดับ กระบวนการย่อยสลายโครงสร้างของชีวมวลให้กลายเป็นเอทานอลนั้นประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ 1) กระบวนการแยกลิกนินด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เป็นเซลลูโลส 2) กระบวนการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (GC220) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำเร็จรูปจากเชื้อ *Trichoderma reesei* 3) กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049 ด้วยการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (Batch Fermentation) จากการทดลองพบว่า หญ้าขจรจบและวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้เมื่อผ่านกระบวนการแยกลิกนินและไฮโดรไลซ์เซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสนั้นจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 34.1 ± 0.9 และ 34.7 ± 1.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อนำมาผ่านกระบวนการหมักด้วยยีสต์โดยใช้ระยะเวลา 7 วัน พบว่าหญ้าขจรจบและวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้ผลิตเอทานอลได้ 0.3% และ 0.5% โดยปริมาตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: การหมักเอทานอล หญ้าขจรจบ วัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้

การอ้างอิงบทความ: อภิญญา จันทรวัฒนะ และ ปิยะรัชช์ กุลเมธี, "การศึกษาความเป็นไปได้ของการหมักเอทานอลจากหญ้าขจรจบและวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 26, ฉบับที่ 1, หน้า 95–103, ม.ค.–เม.ย. 2559.
DOI: 10.14416/j.kmutnb.2015.06.008

The Feasibility Study of Ethanol Fermentation from Biomass: Feather Pennisetum Grass (*Pennisetum pedicellatum* Trin.) and Residual Bamboo Shoot

Apinya Jantarawattana
Lecturer, Department of Agro-Industry Technology and Management, Faculty of Agro-industry, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Prachinburi Campus, Prachin Buri, Thailand

Piyarach Kullamethee*
Lecturer, Innovation and Technology of Product Development, Faculty of Agro-industry, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Prachinburi Campus, Prachin Buri, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 0-3721-7311 Ext. 7913, E-mail: piyarachk@kmutnb.ac.th
Received 20 March 2015; Accepted 29 June 2015; Published online: 22 December 2015
© 2016 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

The aim of this research was to study ethanol fermentation from biomasses: Feather pennisetum grass (*Pennisetum pedicellatum* Trin.) and residual bamboo shoot in Prachinburi province. Feather pennisetum grass and residual bamboo shoot contained 24.8 ± 1.3% and 2.5 ± 0.5% g/g cellulose, and 22.0 ± 1.8% and 15.9 ± 1.5% g/g lignin, respectively. The ethanol fermentation consisted of three stages. Firstly, biomass was pretreated with hydrogen peroxide to remove lignin (delignification). Secondly, cellulose was hydrolysed to obtain glucose using cellulase enzyme (GC220: instant enzyme from *Trichoderma reesei*). Lastly, glucose was converted into ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049 using batch fermentation. The delignification and cellulose hydrolysis processes of Feather pennisetum grass and residual bamboo shoot could provide 34.1 ± 0.9 and 34.7 ± 1.1 g/l initial reducing sugar, respectively. After seven days of the batch fermentation, Feather pennisetum grass and residual bamboo shoot gave 0.3% and 0.5% ethanol, respectively by volume.

Keywords: Ethanol Fermentation, Feather Pennisetum Grass (*Pennisetum pedicellatum* Trin.), Residual Bamboo Shoot

Please cite this article as: A. Jantarawattana and P. Kullamethee, "The Feasibility Study of Ethanol Fermentation from Biomass: Feather Pennisetum Grass (*Pennisetum pedicellatum* Trin.) and Residual Bamboo Shoot," *The Journal of KMUTNB.*, Vol. 26, No. 1, pp. 95–103, Jan.–Apr. 2016 (in Thai). DOI: 10.14416/j.kmutnb.2015.06.008

1. บทนำ

ปัจจุบันนี้ปัญหาการขาดแคลนพลังงานนับว่าเป็นปัญหาสำคัญที่จำเป็นต้องตระหนักถึงเป็นอันดับต้นๆ จึงเป็นเหตุผลที่กระตุ้นให้มีการศึกษาวิจัยด้านพลังงานและพลังงานทดแทนเพื่อรองรับปริมาณการใช้พลังงานที่นับวันยิ่งทวีคูณความต้องการขึ้นอย่างรวดเร็ว เอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ไขปัญหาวิกฤตขาดแคลนพลังงานด้านเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี สามารถนำมาผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนเครื่องยนต์ หรือนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เพื่อเป็นเชื้อเพลิงทดแทนได้อีกทางหนึ่ง [1], [2] เอทานอลสามารถผลิตได้จากการหมักน้ำตาลหรือชีว-วัสดุ (Biomass) ใดๆ ที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบโดยเฉพาะจากพืชซึ่งมีน้ำตาลจำพวกเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งจัดเป็นวัสดุ Cellulosic Biomass [3], [4]

มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลโดยนำพืชหลากหลายชนิดมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้น เช่น Swain และคณะ [5] ศึกษาการหมักเอทานอลจากดอกไม้ *Madhuca latifolia* L. ซึ่งเป็นพืชที่พบในแถบอินเดีย โดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) พบว่าการหมักแบบเซลล์อิสระ (Free Cell) จากดอกสดมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 193 กรัม/กิโลกรัม และสำหรับวัตถุดิบที่เก็บไว้ 12 เดือน เมื่อนำมาผลิตเอทานอลจะให้ปริมาณเท่ากับ 148 กรัม/กิโลกรัม นอกจากนี้ Benchawattananon [6] ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากหยวกกล้วยโดยยีสต์ด้วยวิธีการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (Batch Fermentation) พบว่าการหมักหยวกกล้วยโดยใช้กรดเกลือย่อยเซลลูโลสก่อนเป็นเวลา 15–30 นาที ที่ pH 4.5–5 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 20 บริกซ์ ใช้ระยะเวลาหมัก 5–7 วัน ได้เอทานอล 80.7% (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นจึงมีวัชพืชงอกงามเป็นพื้นที่กว้าง ซึ่งวัชพืชเหล่านี้เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และทำลายได้ยาก ก่อให้เกิดปัญหาในพื้นที่เกษตรกรรมทั่วประเทศ หญ้าขจรจบเป็นหนึ่งในวัชพืชชนิดที่มักก่อให้เกิดปัญหาในพื้นที่เกษตรกรรม และพบได้ทั่วไปในประเทศไทย เนื่องจากไม่มีศัตรูตามธรรมชาติ [7] การปราบวัชพืชประเภทนี้โดยทั่วไปมักใช้สารเคมีซึ่งทำให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างและสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้วัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งผลิตผลทางการเกษตรก่อนนำออกจำหน่ายหรือแปรรูปนั้นยังเป็นหนึ่งในกระบวนการที่ก่อให้เกิดขยะจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตัดแต่งหน่อไม้ในเขตพื้นที่จังหวัดปราจีนบุรี และเนื่องด้วยองค์ประกอบของพืชเหล่านี้ส่วนมากเป็นน้ำตาลเซลลูโลส [8], [9] ดังนั้นวัตถุดิบเหล่านี้จึงอาจมีความเป็นไปได้ในการนำมาศึกษาทดลองเพื่อใช้ผลิตเป็นเอทานอล

การผลิตเอทานอลจากหญ้าขจรจบหรือเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้อาจจะช่วยให้เกิดการจัดการทรัพยากรแบบ Win-Win โดยได้ประโยชน์ทั้งในด้านการผลิตพลังงานทางเลือกเพื่อแก้ไขและส่งเสริมการผลิตเอทานอลซึ่งเป็นเชื้อเพลิงที่ประเทศไทยมีศักยภาพสูงด้านวัตถุดิบในการผลิต และยังได้ประโยชน์ในด้านการลดการนำเข้าสารเคมี การใช้สารเคมีเพื่อปราบวัชพืช หรือการกำจัดขยะ ซึ่งจะสามารถลดต้นทุนในการดำเนินงานได้เป็นอย่างมากหากท้ายที่สุดมีการส่งเสริมการผลิตพลังงานทดแทนโดยใช้ชีววัสดุเหล่านี้เป็นวัตถุดิบในการผลิต

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดลองผลิตเอทานอลจากหญ้าขจรจบและเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากหญ้าขจรจบกับเศษวัสดุที่เหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้ และกำหนดขอบเขตการวิจัยคือ ผลิตเอทานอลจากหญ้าขจรจบทั้งต้นแบบแห้ง โดยใช้วิธีการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. Cerevisiae* TISTR5049 ในระบบการหมักแบบ Batch Fermentation เลี้ยงเชื้อแบบอิสระ (Free Cell) และวิเคราะห์หาปริมาณ (Yield) ของการผลิตเอทานอลจากต้นหญ้าขจรจบเปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดอื่นๆ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้คือเศษวัสดุที่เหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้

2. วัสดุ อุปกรณ์

2.1 วัสดุ

1) หญ้าขจรจบทั้งต้นแบบแห้งที่เก็บเกี่ยวในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตปราจีนบุรี

2) วัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้ จากตลาดวงเวียนนเรศวร ต.เนินหอม อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี

3) *S. cerevisiae* TISTR5049 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

4) 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

5) Yeast extract-Malt extract (YM) broth

6) เอนไซม์เซลลูเลสสำเร็จรูปจากเชื้อ *Trichoderma reesei* (GC220) (Genencor International Inc., อเมริกา)

2.2 อุปกรณ์

1) เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (Ohaus รุ่น Explorero EP 2140, สวิตเซอร์แลนด์)

2) เครื่องดูดสุญญากาศ (EYELA รุ่น A-35, ญี่ปุ่น)

3) Ebulliometer (Dujardin-salleron รุ่น Seul Veritable, ฝรั่งเศส)

4) Hand Refractometer (Alago รุ่น N-1E, ญี่ปุ่น)

5) pH Meter (Inolab รุ่น pH lavel1, เยอรมัน)

6) Spectrophotometer (Optima รุ่นSp-3000 plus, ญี่ปุ่น)

7) อุปกรณ์เครื่องแก้ว

3. วิธีการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและลิกนิน (ดัดแปลงจาก Van Soest and Wine [10])

1) ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลาย Acid Detergent 100 มิลลิลิตร และ Decahydronapthalene 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นลดความร้อนลงให้เดือดเบาๆ เป็นเวลา 60 นาที

3) กรองผ่านครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว (W_1) โดยใช้แรงดูดสุญญากาศเบาๆ ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในบีกเกอร์ให้หมดด้วยน้ำร้อน 3–5 ครั้ง ขณะล้างให้เขี่ยก้อนเยื่อใยที่อยู่ในครูซิเบิลให้กระจายออกโดยใช้แท่งแก้ว หลังจากนั้นจึงดูดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ และล้างต่อด้วยอะซิโตนปริมาณเล็กน้อย 2–3 ครั้ง แล้วใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูดให้แห้ง

4) นำครูซิเบิลไปอบที่ 100°C นาน 12 ชั่วโมง หรืออบจนกระทั่งชั่งน้ำหนักได้คงที่ (W_2)

5) นำครูซิเบิลวางในถาดก้นตื้น เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (ก่อนใช้ให้แช่เย็นอุณหภูมิประมาณ 15°C) ใส่ลงในครูซิเบิลประมาณครึ่งหนึ่ง คนด้วยแท่งแก้ว เพื่อให้เยื่อใยเปียกอย่างทั่วถึง เติมกรดลงไปทุกๆ 1 ชั่วโมง พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6) นำมากรองเอากรดออกโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ แล้วล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด

7) อบครูซิเบิลที่ได้ที่อุณหภูมิ 100°C ข้ามคืน ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น และนำไปชั่งน้ำหนัก (W_3)

8) นำครูซิเบิลไปเผาที่อุณหภูมิ 500°C นาน 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าไม่มีคาร์บอน ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_4) การคำนวณมีดังนี้

$$ADF = [(W_2 - W_1) \times 100] / S$$

$$L = [(W_3 - W_4) \times 100] / S$$

$$C = ADF - L$$

โดยที่

ADF = Acid Detergent Fiber (%)

C = ปริมาณเซลลูโลส (%)

L = ปริมาณลิกนิน (%)

W_1 = น้ำหนักครูซิเบิลเปล่า (กรัม)

W_2 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังผ่านสารละลาย Acid Detergent (กรัม)

W_3 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังผ่านกรด

ซัลฟิวริก (กรัม)

W_4 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังเผา(กรัม)

S = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

3.2 การหมักหญ้าขจรจบ และวัสดุเศษเหลือจากจากการตัดแต่งหน่อไม้เพื่อผลิตเอทานอล และการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล *S. cerevisiae* TISTR5049 การเตรียมเชื้อตั้งต้นสำหรับใช้ในการหมักเอทานอลจะถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract-Malt Extract (YM) Broth บ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นำมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น

3.2.2 การเตรียมวัสดุชีวมวลเพื่อหมักเอทานอล

1) ในการเตรียมวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลนั้นจะมีกระบวนการกำจัดสารในกลุ่มลิกนินออกก่อน โดยใช้วิธี Alkaline Pretreatment [11] เริ่มโดยการแช่วัตถุดิบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2% pH 13 นาน 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วล้างด้วยการให้น้ำผ่านโดยใช้น้ำกลั่น นานประมาณ 30 นาที อบกากที่ 100°C ประมาณ 12 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งหลังจากการสกัดลิกนิน

2) การผลิตเอทานอล โดยใช้วิธีการหมักวัตถุดิบด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบ Batch Fermentation เลี้ยงเชื้อแบบ Free Cell โดยใช้กากแห้ง 5.0% (กาก: 0.037 M Acetate Buffer pH 4.8) ใส่ในขวดฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที เติมเอนไซม์เซลลูเลส (GC220) เพื่อย่อยโครงสร้างเซลลูโลสของชีววัสดุที่ศึกษาให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กลงบางส่วน ในอัตราส่วนตัวอย่าง 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่อเอนไซม์ 0.0003 กรัม ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ 5.0% ต่อ batch หมักเป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแอลกอฮอล์ ทุกๆ 2 วัน

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอลกอฮอล์

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS Colorimetric [12] ในระหว่างการหมักทุกๆ 2 วัน คือ วันที่ 1, 3, 5 และ 7

1) เติมสารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดฝาเกลียวที่มีตัวอย่างอยู่ 3 มิลลิลิตร ปิดหลอดเพื่อป้องกันการระเหยในระหว่างการวิเคราะห์ ผสมให้สารเข้ากันดีแล้วให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 90°C เป็นเวลา 5–15 นาที จนได้สารสีน้ำตาลแดง

2) เติมสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรท 40% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อทำให้สีเสถียร

3) ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็นจนเป็นอุณหภูมิห้อง นำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักทุกๆ 2 วัน คือ วันที่ 1, 3, 5 และ 7 โดยใช้ Ebulliometer

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS15 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างหญ้าขจรจบและวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างแต่ละช่วงเวลาของการหมักทดสอบด้วย Duncan's New Multiple Range Test

4. ผลการทดลองและอภิปรายผล

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากการหมักชีว-วัสดุหญ้าขจรจบ และเศษวัสดุจากการตัดแต่งหน่อไม้ ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR5049 ในระบบการหมักแบบ Batch Fermentation เลี้ยงเชื้อแบบ Free Cell ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

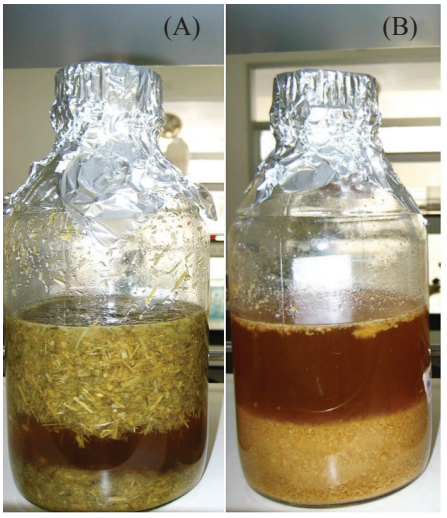
4.1 ปริมาณเซลลูโลส และลิกนินในหญ้าขจรจบและเศษวัสดุจากการตัดแต่งหน่อไม้

ในการศึกษานี้มีการศึกษาองค์ประกอบของชีว-วัสดุที่สำคัญในการเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลสำหรับเป็นสารอาหารในการผลิตเอทานอลของยีสต์คือ เซลลูโลส และศึกษาปริมาณลิกนินซึ่งเป็นสารที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต (Non-carbohydrate) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาในครั้งต่อไป

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและลิกนินในหญ้าขจรจบพบว่า มีปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 24.8 ± 1.3% กรัม/กรัม และมีปริมาณลิกนินเท่ากับ 22.0 ± 1.8% กรัม/กรัม สำหรับวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้พบว่า มีปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 2.5 ± 0.50% กรัม/กรัม และปริมาณลิกนินเท่ากับ 15.9 ± 1.5% กรัม/กรัม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Han [13] ในการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของชีววัสดุที่ไม่ใช่ไม้ (Non-wood) โดยเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลส และลิกนินในพืชดังนี้ พืชตระกูลหญ้า Esparto (เซลลูโลส; 33–38%, ลิกนิน; 17–19%) และฟางข้าว (Rice Stalk) (เซลลูโลส; 28–48%, ลิกนิน; 12–16%) นอกจากนี้ Han ยังพบว่าพืชตระกูลหญ้า Bluestem มีกลูโคสประมาณ 34.2–35.1% ของปริมาณองค์ประกอบทั้งหมด โดยปกติแล้วการที่พืชมีองค์ประกอบของเซลลูโลสในระดับสูงนั้นแสดงถึงการมีปริมาณกลูโคสในระดับที่สูงเช่นเดียวกันด้วย ในขณะที่การพบปริมาณลิกนินสูงนั้นมักจะพบปริมาณเซลลูโลสน้อย [13] ดังนั้นปริมาณเซลลูโลสที่พบในหญ้าขจรจบในระดับสูง จึงสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานโดยมีความเป็นไปได้ในการนำมาเป็นชีววัสดุเพื่อผลิตเอทานอลต่อไป

4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอล

หลังจากการเตรียมวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักโดยการกำจัดสารในกลุ่มลิกนินออกก่อน ด้วยวิธี Alkaline Pretreatment และใช้เอนไซม์เซลลูเลส (GC220) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำเร็จรูปจากเชื้อ *Trichoderma reesei*



รูปที่ 1 การหมักชีววัสดุ (A) หญ้าขจรจบ และ (B) วัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้

เพื่อย่อยโครงสร้างเซลลูโลสของชีววัสดุที่ศึกษาให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กลง ใช้เวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ 24 ชั่วโมง แล้วจึงเติมเชื้อจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* ที่เตรียมไว้ 5.0% ต่อ Batch หมักเป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 1) ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ได้ผลดังต่อไปนี้

4.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการผลิตเอทานอลจากหญ้าขจรจบและวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้

เมื่อเก็บตัวอย่างน้ำหมักหลังจากย่อยชีววัสดุ ณ วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าการหมักหญ้าขจรจบมีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเท่ากับ 34.073 ± 0.924 กรัม/ลิตร ในส่วนการหมักวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้นั้นมีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเท่ากับ 34.739 ± 1.054 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 1) และเมื่อผ่านการหมักเป็นระยะเวลาหนึ่งวันหลังจากนั้นพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงในกระบวนการหมักของหญ้าขจรจบ แต่วัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้นั้นยังคงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นและสูงกว่าหญ้าขจรจบ อาจเนื่องมา

จากวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งมีส่วนผสมของหน่อไม้ส่วนที่กินได้ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรตอยู่ด้วย [14] อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์นั้นจะเริ่มเกือบคงที่ในวันที่ 3 และ 5 ของการหมักในทั้งสองตัวอย่างเนื่องจากเชื้อยีสต์มีการใช้น้ำตาลในระหว่างการเจริญเติบโตและเปลี่ยนน้ำตาลนั้นให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ [4] ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทางเลือกได้ในอนาคตและเป็นจุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้

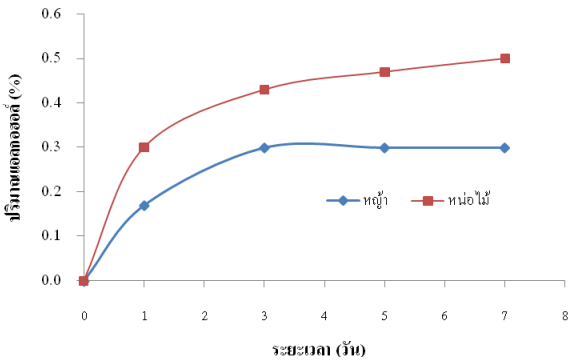
ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในหญ้าขจรจบและวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 24 ชั่วโมง จนถึงสิ้นสุดการหมัก

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	
	หญ้าขจรจบ	หน่อไม้
เริ่มต้นการหมัก^{ns}	34.073+0.924^{B}	34.739+1.054^{C}
วันที่ 1	27.390+3.769^{bC}	38.947+2.346^{aB}
วันที่ 3	34.851+1.709^{bB}	42.194+2.242^{aB}
วันที่ 5	34.943+2.133^{bB}	42.334+2.594^{aB}
วันที่ 7	45.146+1.720^{bA}	57.298+0.703^{aA}

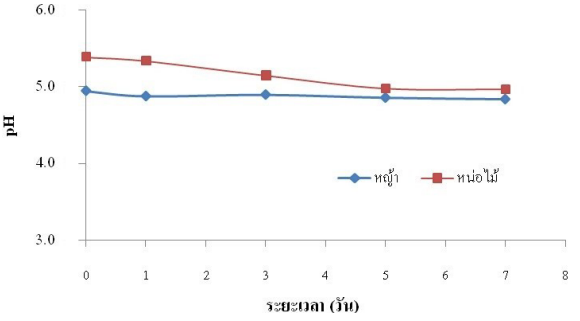
หมายเหตุ :
- ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a และ b ที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ A, B และ C ที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.2.2 ปริมาณเอทานอลจากหญ้าขจรจบและวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้

ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลระหว่างการหมักโดยใช้ Ebulliometer ในการวัด ซึ่งจะให้ค่าเป็นเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ ณ วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ผลที่ได้ดังรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่าการหมักชีววัสดุทั้งสองด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถให้ผลผลิตเป็นเอทานอลได้ โดย



รูปที่ 2 ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักชีววัสดุ



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างการหมักชีววัสดุ

การหมักวัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้จะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าหญ้าขจรจบ คือ ในวันสิ้นสุดการหมักที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน วัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้ให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.5% โดยปริมาตร ส่วนหญ้าขจรจบให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.3% โดยปริมาตร นอกจากนี้ได้ทำการวัดค่า pH เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสในระหว่างการหมัก พบว่ามีค่าคงที่ที่ประมาณ pH 5 ดังรูปที่ 3

5. สรุป

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากหญ้าขจรจบและเศษวัสดุจากการตัดแต่งหน่อไม้ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Alkaline Pretreatment ด้วยการแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร่วมด้วยการย่อยโครงสร้างเซลลูโลสของตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อให้

ได้น้ำตาลโมเลกุลเล็กที่เชื้อยีสต์สามารถใช้แล้วสร้างเอทานอลได้ ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. หญ้าขจรจบ มีปริมาณเซลลูโลส เท่ากับ 24.8 ± 1.3% กรัม/กรัม มีปริมาณลิกนิน เท่ากับ 22.0.0 ± 1.8% กรัม/กรัม และเมื่อใช้หญ้าขจรจบเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลตามวิธีข้างต้นในวันที่ 7 ของการหมักได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.3% โดยปริมาตร

2. วัสดุเศษเหลือจากการตัดแต่งหน่อไม้ มีปริมาณเซลลูโลส เท่ากับ 2.5 ± 0.5% กรัม/กรัม มีปริมาณลิกนินเท่ากับ 15.9 ± 1.5% กรัม/กรัม และเมื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลตามวิธีข้างต้นในวันที่ 7 ของการหมักได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.5% โดยปริมาตร

ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะคือ 1) การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งหากมีการศึกษาในครั้งต่อไปควรมีการขยายขนาดให้สูงขึ้น และควรมีการศึกษาถึงงบประมาณและความเป็นไปได้ในอนาคต และ 2) การจะได้มาซึ่งเอทานอลที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้นั้น หลังจากการหมักชีววัสดุด้วยเชื้อยีสต์แล้ว จะต้องนำของเหลวที่ได้มาผ่านขั้นตอนการทำให้เป็นเอทานอลบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนหนึ่ง จึงควรมีการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการทำเอทานอลให้บริสุทธิ์อย่างต่อเนื่องต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ สำหรับทุนสนับสนุนนักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2550 และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตปราจีนบุรี ในการสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

[1] Department of Alternative Energy Development and Efficiency. (2015, March 1). *Ethanol's alternative energy development plan for 15 years (2008–2022)* [Online]. Available: http://www.enconfund.go.th/pdf/index/REDP_15_yrs.pdf (in Thai).

[2] S. Yokoyama, T. Ogi, and A. Nalampoon, "Biomass energy potential in Thailand," *Biomass Bioenerg*, vol. 18, pp. 405–410, 2000.

[3] W. Krusong, *Biotechnology*, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok: Odeon Store, 1986 (in Thai).

[4] L. R. Lynd, J. H. Cushman, R. J. Nichols, and C. E. Wyman, "Fuel ethanol from cellulosic biomass," *Science*, vol. 251, pp. 1318–1323, 1991.

[5] M. R. Swain, S. Kar, A. K Sahoo, and R. C. Ray, "Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Microbiological Research*, vol. 162, no. 2, pp. 93–98, 2007.

[6] R. Benchawattananon, "Study of ethanol production from pseudostem of banana by *Saccharomyces cerevisiae* batch fermentation," *Research and Development Journal Loei Rajabhat University*, vol. 3, no. 6, pp. 29–36. 2009 (in Thai).

[7] V. Jamsawat and S. Srisawat, "Study on possibility of using Feather pennisetum as roughage for cattle in day season," M.S. thesis, Rajamangala University of Technology Tawan-ok., Chonburi, Thailand, 1995 (in Thai).

[8] P.C. Badger, "Ethanol from cellulose: a general review," in *Trends in new crops and new uses*, J. Janick and A. Whipkey, Eds. ASHS Press, Alexandria, VA, 2002, pp. 17–21.

[9] Y. Lin and S. Tanaka, "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 69, pp. 627–642, 2006.

[10] P. J. Van Soest and R. H. Wine, "Use of detergents in analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell walls constituents," *Journal of AOAC International*, vol. 50, no. 1, pp. 50–55, 1967.

[11] L. Dawson and R. Boopathy, "Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production," *Bioresource Technol*, vol. 98, no. 9, pp. 1695–1699, 2007.

[12] G. L. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.

[13] J. S. Han, "Properties of Non-wood fiber," in *The Korean society of wood science and technology annual meeting*, Atanata, GA, 1998, pp. 3–12.

[14] N. Chongtham, M. S. Bisht, and S. Haorongbam, "Nutritional properties of bamboo shoots: potential and prospects for utilization as a health food," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 10, pp. 153–169, 2011.