

การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลจากขานอ้อย

ด้วยกระบวนการเซลลูโลสิกเอทานอล

The Study of Efficiency of Bioethanol Production from Sugarcane Bagasse by Cellulosic Ethanol Process.

อาทิตย์ หูเต็ม^{1*} ธนาวรรณ สุขเกษม² กานต์ แยมพงษ์² สมเพียร พักทอง² และ แสงจันทร์ สอนสว่าง²Artit Hutem¹ Tanawan Sukkasem^{2*} Karn Yampong² Sompian Fagtong²and Sangjan Sonsawang²¹สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 67000²สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 67000

*Corresponding author E-mail: tan_awan@hotmail.com

บทคัดย่อ

การผลิตไบโอเอทานอลจากขานอ้อยจัดเป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่สามารถถูกย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล งานวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อการศึกษาวิธีการปรับสภาพขานอ้อยที่สามารถประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอล โดยทำการหมักขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 วัน พบว่าการปรับสภาพขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1% สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากขานอ้อยเป็นน้ำตาลกลูโคส และไซโลสได้สูงที่สุด 789.6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 3,779 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาหมักด้วยเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* TISTR5177 ที่มีค่า pH เท่ากับ 5.0 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 28 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพของกระบวนการหมักดีที่สุด 21.39 เปอร์เซ็นต์ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ขานอ้อยจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลด้วยวิธีเซลลูโลสิกเอทานอลได้ เนื่องจากเป็นของเหลือทิ้งปริมาณมากจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปราคาถูก และที่สำคัญสามารถนำมาย่อยสลายแล้วให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง ดังนั้นขานอ้อยจึงเป็นของเหลือทิ้งที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอล

คำสำคัญ : ขานอ้อย, ไบโอเอทานอล, กระบวนการเซลลูโลสิกเอทานอล

Abstract

The production of bioethanol from bagasse is one of agricultural residues which are as lignocellulose material, it can be converted from reducing sugar to bioethanol feedstock. The purpose of this research was to study methods of pre-treatment sugarcane bagasse for fermentation of bioethanol production. The condition of fermentation bioethanol from sugarcane bagasse by static that incubated at room temperature and the fermentation time 18 days. The results showed that the pre-treatment sugarcane bagasse with HCl 1% could hydrolysis cellulose of sugarcane bagasse, which gave the highest glucose and xylose yield of 789.6 $\mu\text{g/L}$ and 3,779 $\mu\text{g/L}$, respectively. Therefore, ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus* TISTR5177 and initial pH of 5.0 gave maximum alcohol content 28 g/L that have the best efficiency of fermentation 21.39 % by g dried raw material. In addition, sugarcane

bagasse was the optimum to use as raw material for produce bioethanol by cellulosic ethanol product because its abundance of agriculture residues from processing industry and high reducing sugar. Sugarcane bagasse residue is a suitable feedstock for bioethanol production.

Keywords : Sugarcane bagasse, Bioethanol, Cellulosic ethanol process

บทนำ

จากภาวะวิกฤติในโลกปัจจุบันที่ทำให้เกิดความขาดแคลนพลังงานเชื้อเพลิงธรรมชาติ อาทิ ปิโตรเลียม น้ำมันดิบซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป และปริมาณของพลังงานนั้นเป็นความต้องการของประชากรเป็นอย่างมากทำให้มีการใช้เป็นจำนวนมากจากความต้องการของมนุษย์ที่มีอย่างไม่จำกัดจึงส่งผลทำให้เกิดภาวะขาดแคลนพลังงานเชื้อเพลิงในอนาคตอันใกล้ ในทางเดียวกันพลังงานเชื้อเพลิงบางรูปจะส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมในภาพรวมทำให้เกิดมลภาวะต่าง ๆ มากมาย ประกอบกับราคาน้ำมันเชื้อเพลิงก็มีราคาที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจากภาวะวิกฤติดังกล่าวจึงทำให้หลาย ๆ ประเทศตระหนักถึงความสำคัญของพลังงานทางเลือกในรูปแบบอื่น โดยเฉพาะพลังงานชีวมวลเพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตพลังงานทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับแผนบูรณาการพลังงานแห่งชาติของกระทรวงพลังงาน ได้มีการผลักดันให้มีแผนพัฒนาพลังงานทดแทน และพลังงานทางเลือก (Alternative Energy Development Plan: AEDP2015) ที่ส่งเสริมการผลิตพลังงานจากวัตถุดิบที่มีอยู่ภายในประเทศให้ได้เต็มตามศักยภาพโดยใช้เทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และชุมชน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2558)

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่มีมูลค่าสูงและสำคัญเป็นอันดับต้น ๆ มีการเพาะปลูกเป็นจำนวนมากในพื้นที่อำเภอวิเชียรบุรี บึงสามพัน และศรีเทพ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยจะมีการเพาะปลูกอ้อย 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ทำน้ำตาลเพื่อป้อนผลผลิตให้กับโรงงานผลิตน้ำตาลในท้องถิ่น อีกพันธุ์หนึ่งจะนำมาจำหน่ายในรูปแบบของการหีบอ้อยทำเป็นน้ำอ้อยสดจึงทำให้เหลือขานอ้อยซึ่งเป็นของเหลือทิ้งที่มีปริมาณมาก อ้อยเป็นพืชเขตร้อนที่มีชีวมวลสูง มีน้ำตาล 12 – 17% เป็นน้ำตาลซูโครสถึง 90% ความเข้มข้นของน้ำตาลในอ้อยจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ ระยะการเก็บเกี่ยวผลผลิต (กุสุมาวดี ฐานเจริญ, 2559) อ้อยเป็นวัสดุที่เหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่มาก และมีน้ำตาลที่มีปริมาณสูงจึงสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทดแทนที่มีต้นทุนต่ำเพื่อนำมาผลิตเป็นพลังงานทดแทนในรูปของไบโอเอทานอลได้ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งพลังงานชีวภาพที่สำคัญในปัจจุบันประเทศไทยมีการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยนำมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลโดยการย่อยเซลลูโลสจากพืช (ชัชพันธ์ นิวาสวงษ์ และเฉลิม เรืองวิริยะชัย, 2555) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญต่อการผลิตไบโอเอทานอลจากของเหลือทิ้งจากผลิตผลทางการเกษตรในท้องถิ่นที่มีปริมาณมากเพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตพลังงานทดแทนโดยศึกษาถึงสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักเซลลูโลสเป็นไบโอเอทานอลที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการลดปัญหาขยะจากขานอ้อยที่เหลือทิ้งเป็นจำนวนมากอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างขานอ้อย

นำขานอ้อยทำน้ำตาลสายพันธุ์ขอนแก่น 2 ที่เป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมาล้างทำความสะอาด ตัดให้มีขนาด 0.5 – 1 นิ้ว แล้วนำมาอบแห้งด้วยเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วารินทร์ พิมพา จักกฤษณ์ และเพ็ญศิริ นริรงค์, 2555) หลังจากขานอ้อยอบแห้งที่มีปริมาณความชื้นอยู่ที่ $10 \pm 0.2\%$ (ความชื้นมาตรฐานแห้ง) แล้วนำมาบดหรือปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 18 ขนาดอนุภาค 2 มิลลิเมตร แล้วเก็บตัวอย่างขานอ้อยที่บดละเอียดแล้วไว้ในถุงที่ปิดสนิทเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปศึกษากระบวนการปรับสภาพในขั้นตอนต่อไป (Daniel Jose Bernier-Oviedo J. *et al.*, 2018)

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธีการปรับสภาพ

ขานอ้อยที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างข้างต้นมาทำ pre-treatment 2 แบบ คือ

การปรับสภาพด้วยกรด (Acid pre-treatment, AP) นำขานอ้อยแห้งที่ผ่านการลดให้ละเอียด มาเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1% อัตราส่วนขานอ้อยแห้งต่อสารละลายกรดในอัตราส่วน 1 ต่อ 30 (ขานอ้อย 100 กรัม ต่อ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 3000 มิลลิลิตร) โดยให้สารละลายกรดท่วมขานอ้อยตลอดเวลา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (Jackson de Moraes Rocha *et al.*, 2011)

การปรับสภาพด้วยวิธีการนึ่งอัดความดันไอน้ำ (Steam pre-treatment, SP) นำขานอ้อยแห้งที่ผ่านการบดให้ละเอียดมาแช่ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 30 (ขานอ้อย 100 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 3000 มิลลิลิตร) แล้วจึงนำไปปรับสภาพด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

โดยเปรียบเทียบกับขานอ้อยแห้งที่แช่ในน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 ต่อ 30 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ (Without pre-treatment, WP)

การเตรียมหัวเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* TISTR5177

นำเชื้อ *K. marxianus* ในรูปของเชื้อแห้งแข็งที่ผ่านการ freeze dry จากศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน หลังจากนั้นเชื้อเชื้อ *K. marxianus* ลงในอาหาร YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อภิญา ไช้ใจ และคณะ, 2556) หลังจากนั้นนำไปทำการหมักเอทานอลต่อไปโดยใช้เชื้อเริ่มต้น 10% ของปริมาตรอาหารหมัก

การหมักเอทานอล

นำน้ำหมักจากขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบแล้ว มาปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายกรดซิตริก แล้วนำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทิ้งไว้ให้เย็นใส่หัวเชื้อยีสต์ *K. marxianus* ปริมาตร 10% ลงไปในน้ำหมักจากขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 18 วัน

การวิเคราะห์คุณสมบัติของไบโอเอทานอล

ทำการเก็บตัวอย่างไบโอเอทานอลจากขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพเปรียบเทียบกับขานอ้อยที่ไม่ปรับสภาพ มาทำการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การสังเกตลักษณะทั่วไปของไบโอเอทานอล และ

การวัดค่าสี (Colour) ด้วย Hunter LAB และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ปริมาณแอลกอฮอล์ (Alcohol content) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Total soluble solid) โดยเก็บตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ผลการทดลองทุกๆ 3 วัน จำนวน 3 ซ้ำ จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก

การหาประสิทธิภาพของการหมักไบโอเอทานอล

นำผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีมาคำนวณหาประสิทธิภาพการหมัก (fermentation efficiency) และเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (% Alcohol) อ้างอิงวิธีของบุญช่วย ปานอินทร์ (2560)

$$\text{ประสิทธิภาพการหมัก (fermentation efficiency)} = \left\{ \frac{\% \text{ แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักจริง}}{\% \text{ แอลกอฮอล์ตามทฤษฎี}} \right\} \times 100 \%$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (\% Alcohol)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด} \times \% \text{ fermentable sugar} \times 0.6544}{\text{ปริมาตรน้ำหมักทั้งหมด}}$$

ผลผลิตเอทานอลจากการหมักในการทดลองนำมาเทียบกับค่าในทางทฤษฎีของสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่าง นำมาคำนวณจากร้อยละของปริมาณการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอล ซึ่งสามารถนำมาคำนวณได้ตามสมการข้างล่าง (เสรี มหาวีชัย และเฉลิม เรืองวิริยะชัย, 2012)

ร้อยละผลผลิตเอทานอลเทียบกับค่าในทางทฤษฎี

$$= \left[\frac{\text{ปริมาณเอทานอล (กรัม)}}{0.511 \times \text{ปริมาณกลูโคส (กรัม)} / \text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \right] \times 100$$

โดยที่ 0.511 คือ ปริมาณเอทานอลในทางทฤษฎีที่ได้จากการเปลี่ยนกลูโคส 1 กรัมเป็นเอทานอล 0.511 กรัม

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมี มาวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้สถิติทดสอบเปรียบเทียบความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$)

ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

จากการศึกษากระบวนการกระบวนการปรับสภาพขานอ้อยเพื่อนำมาเพิ่มประสิทธิภาพ การผลิตไบโอเอทานอล ทั้ง 2 วิธี ได้แก่ การปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก (AP) และการปรับสภาพด้วยวิธีการนึ่งอัดความดันไอน้ำ (SP) เปรียบเทียบกับขานอ้อยที่ไม่มีการปรับสภาพ (WP) เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลโดยการหมักด้วยยีสต์ *K. marxianus* TISTR5177 เป็นเวลา 18 วัน จากนั้นวิเคราะห์

คุณสมบัติทางกายภาพ คือ การวิเคราะห์ลักษณะทั่วไปของชาอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว และการวัดค่าสีของไบโอเอทานอลที่หมักจากชาอ้อย

จากการตรวจลักษณะทางกายภาพโดยทั่วไปของชาอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วทั้ง 2 วิธีโดยการสังเกตลักษณะภายนอกด้วยสายตา ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทั่วไปทางกายภาพของชาอ้อยหลังจากการปรับสภาพ

ทรีทเมนต์	ลักษณะทางกายภาพ	
	สี	ลักษณะทั่วไป
Steam pre-treatment (SP)	สีเหลือง	น้ำหมักมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย ตะกอนนอนก้น ชาอ้อยมีลักษณะอ่อนนุ่ม
Acid pre-treatment (AP)	สีเหลืองเข้ม ออกแดง	น้ำหมักมีลักษณะขุ่นมาก ตะกอนกระจายทั่วไปในน้ำหมัก ชาอ้อยมีลักษณะยุ่ย
Without pre-treatment (WP)	สีเหลืองอ่อน	น้ำหมักมีลักษณะใสไม่ขุ่น ตะกอนนอนก้น ชาอ้อยมีลักษณะอ่อนคงรูปเดิมก่อนมีการปรับสภาพ

จากผลการวิเคราะห์ลักษณะทั่วไปของชาอ้อยหลังจากการปรับสภาพวัตถุดิบทั้ง 3 วิธี พบว่าการปรับสภาพด้วยกรดมีผลทำให้เซลลูโลสมีลักษณะอ่อนนุ่ม และยุ่ยมากกว่าวิธีอื่นเนื่องจากกรดมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้ (สุภาวดี ผลประเสริฐ, 2557) ส่วนการปรับสภาพด้วยไอน้ำร้อนโดยการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที พบว่าชาอ้อยจะมีลักษณะอ่อนนุ่ม แต่ไม่ยุ่ย และตะกอนนอนก้นซึ่งทำให้ชาอ้อยมีขนาดเล็กลงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบให้มากขึ้น เซลลูโลสมีลักษณะเป็นรูพรุน และลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบง่ายขึ้น (Sun and Cheng, 2002) หลังจากปรับสภาพชาอ้อยทั้ง 2 วิธี แล้วนำไปหมักด้วยเชื้อยีสต์ *K. marxianus* TISTR5177 โดยทำการหมักแบบตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากชาอ้อยเป็นเวลา 18 วัน แล้วนำไปวัดค่าสีของไบโอเอทานอลด้วยระบบ Lab แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่าสี L^* a^* และ b^* ของไบโอเอทานอลจากชาอ้อยด้วยเชื้อ *K. marxianus*

Parameter	Pretreatment method		
	SP	AP	WP
L	11.26±0.00 ^b	28.34±0.00 ^a	3.45±0.00 ^c
a^*	7.65±0.00 ^b	12.43±0.00 ^a	1.43±0.00 ^c
b^*	9.35±0.00 ^b	13.00±0.00 ^a	1.54±0.00 ^c

^{a-c} ตัวอักษรที่กำกับที่แตกต่างกันตามแนวนอนเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

SP = Steam pretreatment AP = Acid pretreatment WP = Without pretreatment

จากตารางที่ 2 พบว่าค่าสี L^* a^* และ b^* ของชานอ้อยที่ไม่มีการปรับสภาพจะมีค่า L^* มากกว่าวิธีการปรับสภาพด้วยความไอน้ำ และการปรับสภาพด้วยกรด ซึ่งการปรับสภาพด้วยกรดจะมีค่า L^* ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับทั้ง 2 วิธี ซึ่งค่า L^* a^* และ b^* จะถูกนำมาใช้ในการประเมินลักษณะสีของตัวอย่างที่ทำการศึกษา โดยค่า L^* ที่เข้าใกล้ 100 หมายถึง ผลิตภัณฑ์มีความสว่าง ส่วนค่า a^* ที่เป็นบวก หมายถึง ผลิตภัณฑ์นั้นเป็นสีแดง สำหรับค่า b^* ที่เป็นบวก หมายถึง ผลิตภัณฑ์มีสีเหลือง (อรุณทิพย์ และคณะ, 2555) จากการเปรียบเทียบการหมักไบโอเอทานอลจากชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพทั้ง 2 วิธี พบว่าชานอ้อยที่ไม่มีการปรับสภาพจะให้ไบโอเอทานอลที่มีสีเหลืองอมส้มอ่อน ๆ สว่าง ๆ ส่วนไบโอเอทานอลจากชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความไอน้ำจะมีสีเหลืองเข้มปานกลาง และการปรับสภาพชานอ้อยด้วยกรดจะได้ไบโอเอทานอลที่มีสีเหลืองเข้มออกแดง ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ค่าสีมีความสอดคล้องกับลักษณะทั่วไปทางกายภาพที่สังเกตด้วยตาโดยการปรับสภาพชานอ้อยด้วยกรดจะมีสีเหลืองเข้มที่สุด

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

จากการศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากชานอ้อย โดยเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีของไบโอเอทานอลที่ได้จากชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพทั้ง 2 วิธี ด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ *K. marxianus* TISTR5177 เป็นระยะเวลา 18 วัน จากนั้นนำไบโอเอทานอลมาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีต่าง ๆ ดังนี้ ปริมาณเอทานอล (g/L) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส ($\mu\text{g/ml}$) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ($^{\circ}\text{Brix}$) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเอทานอลจากชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพทั้ง 2 วิธี ด้วยเชื้อ *K. marxianus* TISTR5177 หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก (18 วัน)

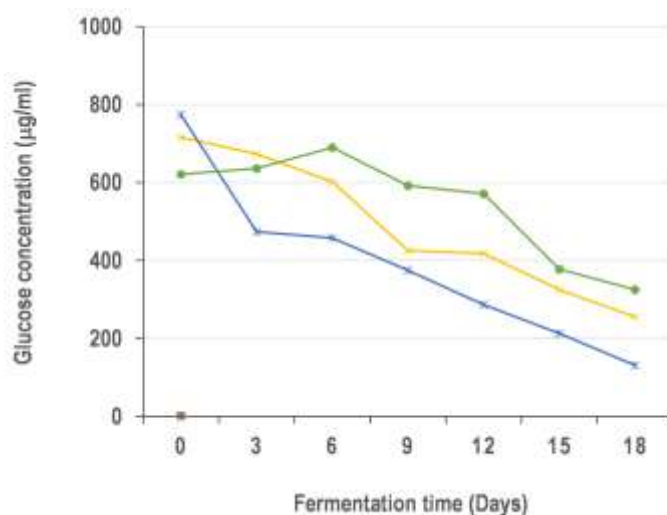
Parameter	Pretreatment method		
	SP	AP	WP
pH	3.83 $\pm$ 0.02 ^b	3.02 $\pm$ 0.01 ^a	3.86 $\pm$ 0.02 ^b
TSS ($^{\circ}\text{Brix}$)	10.4 $\pm$ 0.12	10.4 $\pm$ 0.04	10.4 $\pm$ 0.02
Alcohol (g/L)	24.0 $\pm$ 0.06 ^b	28.0 $\pm$ 0.02 ^a	20.0 $\pm$ 0.02 ^c
Glucose ($\mu\text{g/ml}$)	254.9 $\pm$ 0.02 ^b	131.1 $\pm$ 0.02 ^c	325.1 $\pm$ 0.04 ^a
Xylose ($\mu\text{g/ml}$)	143.2 $\pm$ 0.10 ^b	118.6 $\pm$ 0.10 ^c	335.4 $\pm$ 0.01 ^a

^{a-c}ตัวอักษรที่กำกับที่แตกต่างกันตามแนวนอนเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

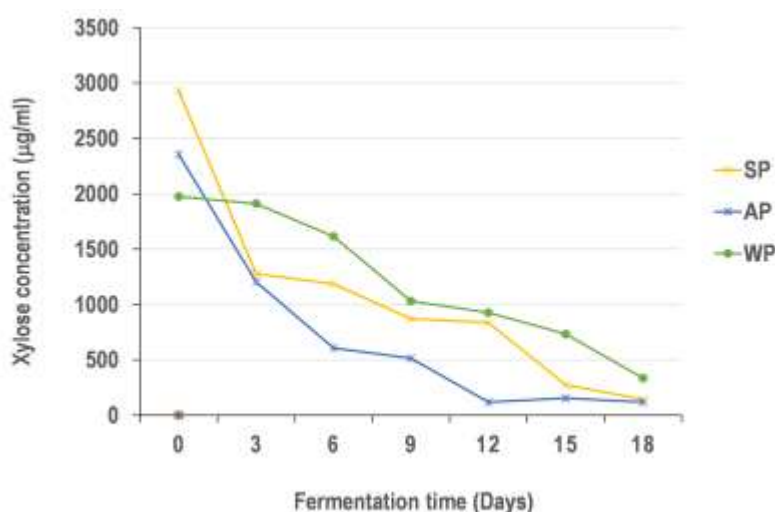
จากตารางที่ 3 พบว่าการปรับสภาพชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่หมักด้วยเชื้อ *K. marxianus* TISTR5177 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะสามารถผลิตไบโอเอทานอลได้สูงสุด 28 กรัมต่อลิตร ค่า pH มีค่า 3.02 ซึ่งชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าวิธีอื่น และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (TSS) มีค่าไม่แตกต่างกันทั้งแบบปรับสภาพทั้ง 2 วิธี และที่ไม่มีการปรับสภาพ

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคส และปริมาณน้ำตาลไซโลสหลังจากสิ้นกระบวนการหมัก (ภาพที่ 1) พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในขานอ้อยที่มีการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1% จะมีน้ำตาลหลงเหลือจากกระบวนการหมักไปเอทานอลต่ำที่สุด โดยการหมักไปเอทานอลด้วยยีสต์ *K. marxianus* TISTR5177 จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และไซโลสต่ำที่สุด 131.1 และ 118.6 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธีการไม่ปรับสภาพจะมีปริมาณน้ำตาลหลงเหลือสูงที่สุด

ก.



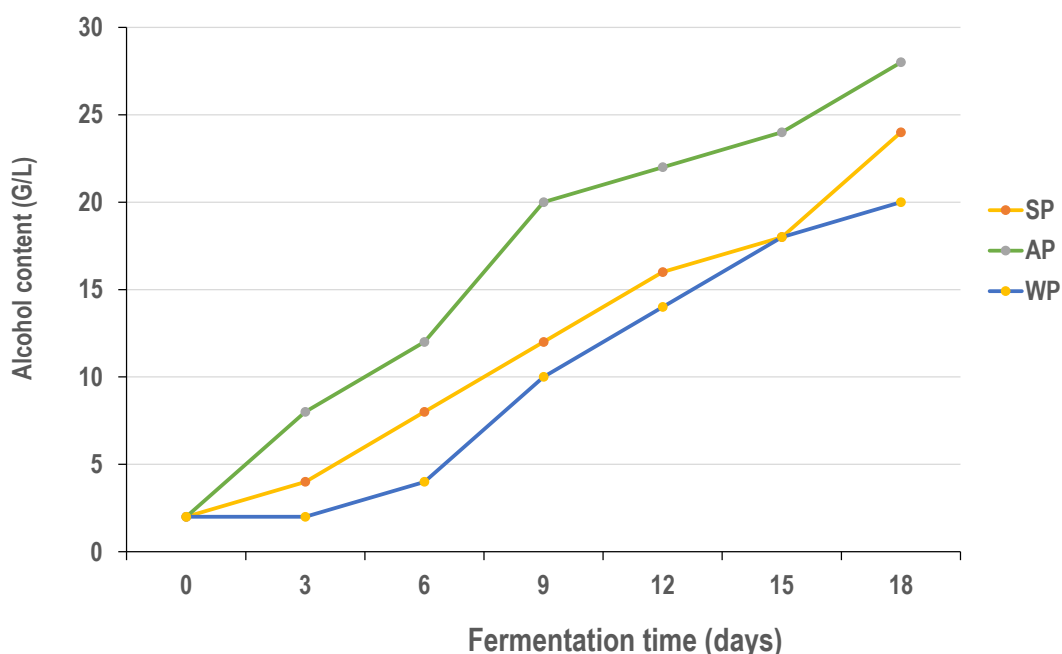
ข.



ภาพที่ 1 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ก.) และน้ำตาลไซโลส (ข.) จากกระบวนการหมักเอทานอลจากขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพทั้ง 2 วิธี ด้วยเชื้อ *K. marxianus* TISTR5177 เป็นระยะเวลา 18 วัน

จากภาพที่ 1 (ก.) และ 1 (ข.) พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดจะมีค่าลดลง หลังจากนำขานอ้อยไปปรับสภาพพบว่าการปรับสภาพขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1% จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุด 789.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Knappert, *et al.* (1980) ที่ศึกษาการใช้กรดอ่อนในการปรับสภาพฟางข้าวโอ๊ต พบว่าการใช้กรด 1% ที่อุณหภูมิ 189

องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้กลูโคสถึง 90.4% ในขณะที่ฟางข้าวโอ๊ตที่ไม่ผ่านการปรับสภาพจะให้กลูโคสเพียง 21.3% เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสคงเหลือต่ำที่สุดในไบโอเอทานอลจากชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่หมักด้วยเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* TISTR5177 ซึ่งมีปริมาณกลูโคส และน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 131.1 และ 118.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าชานอ้อยที่ปรับสภาพจะมีปริมาณน้ำตาลไซโลสในปริมาณที่สูงกว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุจิตรา รวดหมวน และคณะ (2556) พบว่าองค์ประกอบของเส้นใยของพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญสามารถเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และไซโลสได้ คือ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส น้ำตาลรีดิคัลสามารถสร้างขึ้นจากการย่อยสลายชานอ้อยด้วยสารละลายกรดได้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรด ความเข้มข้นของกรด เวลาในการย่อยสลาย และอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อสารละลายที่ใช้จะเป็นผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิคัลที่ถูกย่อยสลายได้ (Nukrob *et. al.*, 2013)



ภาพที่ 2 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพทั้ง 2 วิธี ด้วยเชื้อ *K. marxianus* TISTR5177 เป็นระยะเวลา 18 วัน

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักเอทานอลเป็นระยะเวลา 18 วัน พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพทั้ง 2 วิธี ด้วยเชื้อยีสต์ *K. marxianus* TISTR5177 (ภาพที่ 2) จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมักอยู่ระหว่าง 2 – 28 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีปริมาณลดลงตามระยะเวลาการหมักโดยที่เชื้อยีสต์จะใช้แหล่งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์เอทานอลออกมาภายนอกเซลล์ ชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1% ที่หมักด้วยเชื้อ *K. marxianus* TISTR5177 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 28 กรัมต่อลิตร และ

ว่ามีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่หลงเหลือต่ำที่สุดเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Peizhou, *et al.* (2016) ที่เชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตเอทานอล และในระหว่างที่มีการผลิตเอทานอลจะทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ค่อย ๆ มีค่าลดลงจาก 0.7 กรัมต่อลิตรเหลือเพียง 0.1 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า การไม่ปรับสภาพขานอ้อยจะให้ปริมาณเอทานอลต่ำที่สุด เนื่องจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมีค่าน้อยกว่าทรีทเมนต์อื่นซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรัชพล พะวงศรีรัตน์ (2558) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นมีผลต่อค่าจลพลศาสตร์ของการหมักส่งผลให้มีปริมาณเอทานอลสูงขึ้น ดังนั้นที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรจึงเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล (สุจิตรา รวดหมวน และคณะ, 2556)

ผลการหาประสิทธิภาพของการหมักไบโอเอทานอล (Efficiency of Bioethanol fermentation)

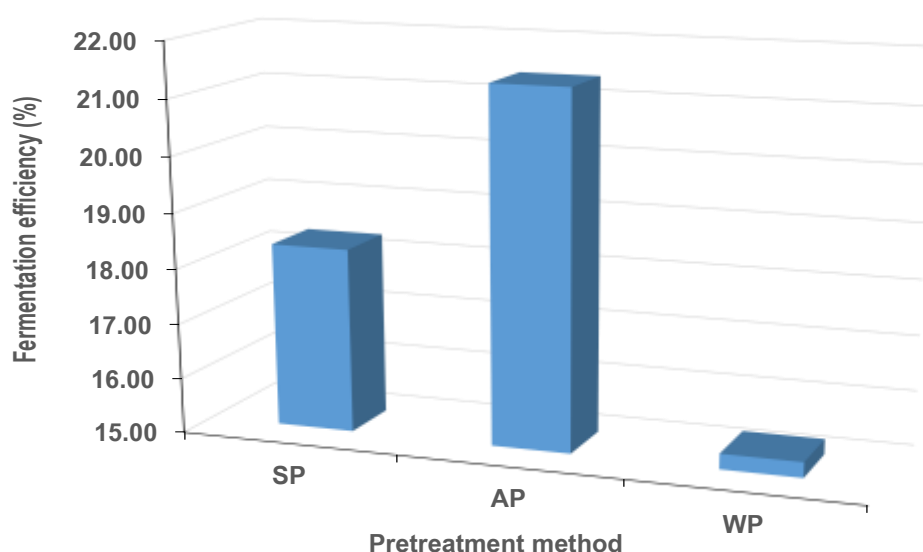
จากการนำปริมาณไบโอเอทานอลที่ได้จากการหมักกลีโคเซลลูโลสเอทานอลแบบกะจากขานอ้อยด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ *K. marxianus* TISTR517 ที่ได้จากการย่อยตัวอย่างขานอ้อยเริ่มต้น 1,000 กรัมของน้ำหนักแห้ง ด้วยการปรับสภาพขานอ้อยทั้ง 2 วิธี ทำการหมักโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 วัน และวิเคราะห์หาปริมาณกลีโคเซลลูโลสเอทานอลด้วยเครื่องอิมัลโซมิเตอร์ ซึ่งไบโอเอทานอลที่หมักได้จะมีร้อยละของผลผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักเอทานอลที่มีคุณภาพแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบร้อยละผลผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักไบโอเอทานอลจากขานอ้อย

Parameter	Pretreatment method		
	SP	AP	WP
Yield of ethanol (%)	18.43 ^b	41.8 ^a	12.04 ^c
Fermentation efficiency (%)	18.34 ^b	21.39 ^a	15.28 ^b

^{a-b} ตัวอักษรที่กำกับที่แตกต่างกันตามแนวตั้งเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4 แสดงร้อยละของผลผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักไบโอเอทานอลจากขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ 3 วิธี และหมักด้วยเชื้อ 3 สายพันธุ์ พบว่าการปรับสภาพขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1% แล้วหมักด้วยเชื้อ *K. marxianus* TISTR5177 จะให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลสูงสุด 41.8 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 1 กิโลกรัม รองลงมา ได้แก่ การหมักขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการนึ่งอัดความดันไอน้ำจะมีปริมาณผลผลิตเอทานอล 18.43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการหมักไบโอเอทานอลจากขานอ้อยที่ไม่ปรับสภาพจะมีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ต่ำที่สุด จากนั้นนำมาพิจารณาหาประสิทธิภาพการหมักไบโอเอทานอลด้วยวิธีต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพการหมักไบโอเอทานอล (Efficiency of Bioethanol fermentation)จากขาน้อยวิธีการปรับสภาพต่าง ๆ กัน ด้วยเชื้อ *K. marxianus* TISTR5177 เป็นระยะเวลา 18 วัน
SP = Steam pretreatment AP = Acid pretreatment WP = Without pretreatment

จากภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการหมักไบโอเอทานอลมีค่าอยู่ระหว่าง 15.29-21.39 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการปรับสภาพขาน้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่หมักด้วยเชื้อ *K. marxianus* TISTR5177 จะมีประสิทธิภาพของกระบวนการหมักดีที่สุดที่ 21.39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการหมักไบโอเอทานอลจากขาน้อยที่ไม่ผ่านการปรับสภาพจะมีประสิทธิภาพการหมักไบโอเอทานอลต่ำที่สุด ดังนั้นจะเห็นว่าเซลล์จากขาน้อยที่เหลือทิ้งทางการเกษตรสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของสุจิตรา รวดหมวนและคณะ (2556) ที่ผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำโดยเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843 จะมีประสิทธิภาพการหมักได้ถึง 94.82 เปอร์เซ็นต์ และการผลิตลิกโนเซลลูโลสเอทานอลจากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ให้ผลผลิตเป็นเอทานอลเท่ากับ 0.070 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง คิดเป็นผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎีเท่ากับ 74.3 เปอร์เซ็นต์ (เสรี มหวิชัย, 2555)

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษากระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลด้วยยีสต์ *K. marxianus* TISTR5177 โดยการปรับสภาพขาน้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกมีผลทำให้เซลล์มีลักษณะอ่อนนุ่ม และอยู่เนื่องจากกรดมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลล์ได้ (สุภาวดี ผลประเสริฐ, 2557) ส่งผลให้ค่าสีของไบโอเอทานอลมีค่า L^* a^* และ b^* สูง บ่งบอกว่าไบโอเอทานอลมีสีเหลืองออกแดงเข้ม วิธีการปรับสภาพขาน้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก จะมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 789.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Knappert, et al. (1980) นอกจากนี้

พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงสุด 28 กรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก 21.39 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เชื้อยีสต์จะใช้แหล่งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์เอทานอลออกมาภายนอกเซลล์ (Peizhou, *et al.*, 2016) ขานอ้อยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมากถึง 33-41% (Paturua, 1989) ซึ่งเป็นผลดีในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตสารที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอะซิติก และกรดอินทรีย์ อื่น ๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้จัดสรรทุนอุดหนุนงานวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 โครงการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานของประเทศ และขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัย และอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือมาโดยตลอดจนทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2558). แผนพัฒนาพลังงานทดแทน และพลังงานทางเลือก พ.ศ. 2558 – 2579. กระทรวงพลังงาน. 22 หน้า.
- กุสุมาวดี ฐานเจริญ. (2559). การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ทนอุณหภูมิสูง รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. 75 หน้า.
- ชัชพันธ์ นินาสวงษ์ และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2555). การผลิตเซลลูโลสจากเอทานอลในประเทศไทย. ว.วิทย.มข. 40(4). 1073 – 1088.
- บุญช่วย ปานอินทร์ วรณี แผงจันทิก และจิตติ มังคละศิริ. (2560). การศึกษาความเหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลทรายดิบ และกากน้ำตาล. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 25 ฉบับที่ 1. 148 – 157.
- รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2558). กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. Veridian E-Journal SU, 2(1), 143-157.
- วารินทร์ พิมพา จักกฤษณ์ พิมพา และเพ็ญศิริ นีร์รงค์. (2555). การพัฒนากระบวนการหมักขานอ้อยด้วยจุลินทรีย์ผสมเพื่อใช้เสริมในอาหารไก่. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- เสรี มหาวีชัย และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2012). การผลิตลิกโนเซลลูโลสจากเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048. Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University. 5(3): 429-445.
- สุจิตรา รวดหมวน ประภา โഴ๊ะสลาม และรัชพล พะวงศ์รัตน์. (2556). การผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำโดยเชื้อ *Candida shehatae* TISTR 5843 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะและกึ่งกะ. Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University. 6(3): 935-948.
- สุภาวดี ผลประเสริฐ. (2557). การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(5): 641-649.

- อภิญา แซ่โจ้ว ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา วรภา คงเป็นสุข และสุเมธ ตันตระเจียร. (2556). *ผลของสติกมาสเตอรอลต่อการทนอุณหภูมิต่ำของยีสต์ทนร้อน*. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51, 89-95.
- อรุณทิพย์ เหมะจุลิน สกุลกานต์ สิมลา สุรศักดิ์ บุญแต่ง และสุดาทิพย์ อินทร์ชื่น. (2555). *ความสัมพันธ์ระหว่างค่า L^* , a^* และ b^* กับปริมาณแอนโทไซยานินในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง*. แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ 4, 59-64.
- Daniel, J.B., J.A. Rincon-Moreno, J.F. Solanilla-Duque, J.A. Munoz-Hernandez and H.A. Vaquiro-Herrera. (2018). *Comparison of two pretreatments methods to produce second-generation bioethanol resulting from sugarcane bagasse*. Industrial Crops & Products, 122, 414-421.
- Jackson de Moraes Rocha, G., Martin, C., Soares, I.B., Souto Maior, A.M., Baudel, H.M., Moraes de Abreu, C.A., (2011). *Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production*. Biomass Bioenergy 35, 663–670.
- Knappert, D., H. Grethlein and A. Converse. (1980). *Partial acid hydrolysis of cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis*. Biotechnology and Bioengineering. 22(7): 1449-1463.
- Nukrob, N., R. Assavarachan and P. Wongputtisin. (2013). *Optimization of Reducing Sugar Production from Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse by Box Behnken Design*. Journal of Medical and Bioengineering. 2(4): 238-241.
- Paturua, J.M. (1989). *By products of the cane sugar industry*. An introduction to their industrial utilization. 435 pp.
- Peizhou, Y., H. Zhang and S. Jiang. (2016). *Construction of recombinant sesc Saccharomyces cerevisiae for consolidated bioprocessing, cellulase characterization, and ethanol production by in situ fermentation*. 3 Biotech. 6(192): 1-11.
- Sun, Y. and J. Cheng. (2002). *Hydroloysis of lignocellulosic materials for bioethanol production review*. Bioresour. Technol. 83: 1-11.