



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอทานอลโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด

Ethanol production using wastes from mushroom production

โดย

ผู้วิจัย 1

ดร.พัฒนา คำกำยาน

ผู้วิจัย 2

ดร. อีรพันธ์ มาจันทร์

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลืออย่างดีจากหลายฝ่าย โดยเฉพาะนักศึกษาภายใต้ที่ปรึกษา เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยเครื่องมือและเทคโนโลยีในการอำนวยความสะดวกการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่างๆ รวมถึงมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงในด้านสถานที่ทำงานวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินที่ช่วยอนุเคราะห์ทั้งสนับสนุนในการทำงานวิจัย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้รับการช่วยเหลือจากเพื่อนร่วมงาน ตลอดจนบุคคลต่างๆ ที่ผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวถึงได้หมด ผู้วิจัยรู้สึกทราบบ้างในความกรุณาของทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงกราบขอบคุณไว้ในโอกาสนี้

ดร. พัฒนา คำกำยาน
หัวหน้าโครงการวิจัย



บทสรุปผู้บริหาร

เงินอุดหนุนโครงการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2554 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2555

1. ชื่อโครงการ การผลิตเอทานอลโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด

Ethanol production using wastes from mushroom production

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.พัฒนา คำกายาน สัดส่วนที่ทำการวิจัย 80%
 สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
 รายชื่อผู้ร่วมวิจัย ดร. อีร์พันธ์ มาจันทร์ สัดส่วนที่ทำการวิจัย 20%
 สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทราบส่วนประกอบต่างๆที่มีอยู่ในวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด
2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสับสเตรทสำหรับการผลิตเอทานอล
3. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล
4. เพื่อแนะแนวทางการใช้ประโยชน์ของเหลือทิ้งแก่กลุ่มเกษตรกรผู้เพาะเห็ด

4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการทำวิจัยครั้งนี้กลุ่มผู้ทำการวิจัยได้กำหนดขอบเขตของโครงการวิจัย (Scope of research) ดังนี้

- 4.1 ขอบเขตด้านเนื้อหา ตัวแปรที่วิจัย
 เป็นการวิจัยเฉพาะการหาค่าองค์ประกอบและการผลิตเอทานอลจากของเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่เพาะในถุงพลาสติก
- 4.2 ขอบเขตด้านประชากรที่วิจัย
 ตัวอย่างที่นำมาทดลองเป็นของเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดในถุงพลาสติก
- 4.3 ขอบเขตด้านสถานที่วิจัย
 ก้อนเห็ดในจังหวัดเชียงราย

5. ระเบียบวิธีวิจัยและผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มผู้วิจัยได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมาผลิตเอทานอล กลุ่มผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าก้อนเห็ดเหลือทิ้งหลังจากเก็บเกี่ยวสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลได้ เนื่องจากวัสดุหลักที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการเพาะเห็ดที่มีปริมาณมากคือขี้เลื่อยซึ่งเป็นวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วย ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โดยเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เกิดจากน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นหลังจากที่เซลลูโลสถูกย่อยอย่างสมบูรณ์แล้วก็จะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้ เหตุผลที่เลือกใช้ก้อนเห็ดเหลือทิ้งหลังการเก็บเกี่ยวเพราะมีรายงานว่าเชื้อราหรือเห็ดสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสไลติกที่สามารถย่อยลิกนิน เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสได้ ดังนั้นในช่วงการเจริญของเห็ดวัสดุที่ใช้อาจจะถูกย่อยบางส่วนโดยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากเห็ด

เมื่อทดลองปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับวิธีทางชีววิทยาเปรียบเทียบกับวิธีทางชีววิทยาเพียงอย่างเดียว วิธีการย่อยที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ การย่อยวัสดุด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) หรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) และวิธีทางชีววิทยาที่ใช้ในการทดลองนี้คือ การใช้เชื้อเห็ด *Laetiporus* sp. ทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อย่อยเป็นเวลา 20 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วันเพื่อตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellobiase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเซลลูโลส จากการทดลองพบว่าการสร้างน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ 2 ระยะในทุกชุดการทดลองที่ศึกษา ได้แก่ 1) วัสดุก้อนเห็ดเหลือทิ้งย่อยด้วยกรดร่วมกับเชื้อเห็ด *Laetiporus* sp. 2) วัสดุก้อนเห็ดเหลือทิ้งย่อยด้วยด่างร่วมกับเชื้อเห็ด *Laetiporus* sp. 3) วัสดุก้อนเห็ดเหลือทิ้งไม่ปรับสภาพย่อยด้วยเชื้อเห็ด *Laetiporus* sp. 4) วัสดุขี้เลื่อยย่อยด้วยเชื้อเห็ด *Laetiporus* sp. โดยปริมาณน้ำตาลสูงสุดอยู่ที่ 1.85 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุเหลือทิ้งไม่ปรับสภาพในวันที่ 4 ของการย่อยด้วยเชื้อเห็ด และ 1.4 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุที่ปรับสภาพด้วยด่าง ในวันที่ 14 ของการย่อยด้วยเชื้อเห็ด จากผลการทดลองดังกล่าวสนับสนุนว่าเชื้อเห็ดที่นำมาศึกษานี้มีแนวโน้มว่าสามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดเนื่องจากมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในการย่อย ในช่วง 0.25 - 0.45 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท แต่อย่างไรก็ตามยังให้ปริมาณน้ำตาลที่ต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลตั้งต้นที่ควรจะเป็นต่อการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปซึ่งอยู่ในหน่วยของกรัมต่อลิตร

เมื่อทดสอบผลของอัตราส่วนของวัสดุเหลือทิ้งต่อน้ำที่ใช้สกัดพบว่าอัตราส่วน 1:100 มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์มากกว่าอัตราส่วน 1:500 การใช้อัตราส่วนของวัสดุก้อนเห็ดเหลือทิ้งที่สูงทำให้มีความเข้มข้นของสารยังยั้งในการเจริญเชื้อยีสต์สูง และเมื่อทดสอบการผลิตเอทานอลพบว่าอยู่ในช่วง 10 - 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่แตกต่างจากการผลิตเอทานอลจากอาหาร YPD ที่ใช้เลี้ยงยีสต์โดยทั่วไป

การทดลองผลิตเอทานอลจากอาหารเลี้ยงที่สกัดได้จากก้อนเห็ดเหลือทิ้งโดยใช้เชื้อยีสต์นั้น ยีสต์ไม่สามารถนำสารอาหารมาผลิตได้โดยตรงเนื่องจากไม่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสไลติกได้ จึงจำเป็นจะต้องมีกระบวนการปรับสภาพเพื่อให้ได้น้ำตาลที่จะนำไปใช้เป็นสาร

ตั้งต้นก่อน ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงต้นทุนและความสะดวกของขั้นตอนการผลิตจึงได้ทดลองใช้เชื้อรา *Rhizopus microsporus* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสและผลิตเอทานอลได้มาทดลองใช้ในการผลิตจากอาหารที่สกัดจากก้อนเห็ดเหลือทิ้งที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบมาก่อน จากการทดลองพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบผลการผลิตกับยีสต์ในอาหารชนิดเดียวกันพบว่าเชื้อ *R. microsporus* มีความเหมาะสมมากกว่าการใช้ยีสต์ อย่างไรก็ตามปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองนี้ยังมีผลผลิตในระดับต่ำและไม่สามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมในสภาวะการทดลองที่ศึกษาได้

6. ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย ผลกระทบทางวิชาการหรือเทคโนโลยี

ทราบแนวทางในการนำวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอลได้หรือไม่มากนักเพียงใด กลุ่มผู้วิจัยได้นำผลการทดลองไปเสนอในที่ประชุมวิชาการแบบโปสเตอร์จำนวน 1 ครั้ง คือ 1) The 38th congress on science and technology of Thailand (STT38) การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38) เมื่อวันที่ 17-19 ตุลาคม 2555 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่ โดยได้แนบบทคัดย่อในส่วนท้ายของรายงานฉบับนี้

ลงชื่อ

(ดร. พัฒนา คำกำยาน)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 10 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทดลองการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับวิธีทางชีววิทยา เปรียบเทียบกับวิธีทางชีววิทยาเพียงอย่างเดียว โดยได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองได้แก่ 1) วัสดุก้อนเห็ดเหลือทิ้งย่อยด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ร่วมกับเชื้อเห็ด 2) วัสดุย่อยด้วยด่าง (NaOH) ร่วมกับเชื้อเห็ด 3) วัสดุก้อนเห็ดเหลือทิ้งไม่ปรับสภาพย่อยด้วยเชื้อเห็ด 4) วัสดุที่เหลือย่อยด้วยเชื้อเห็ด โดยเห็ดที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Laetiporus* sp. ทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อย่อยเป็นเวลา 20 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellobiase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเซลลูโลส จากการทดลองพบว่าการสร้างน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ 2 ระยะในทุกชุดการทดลองที่ศึกษา โดยปริมาณน้ำตาลสูงสุดอยู่ที่ 1.85 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุเหลือทิ้งไม่ปรับสภาพในวันที่ 4 ของการย่อยด้วยเชื้อเห็ด และ 1.4 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุที่ปรับสภาพด้วยด่าง ในวันที่ 14 ของการย่อยด้วยเชื้อเห็ด และเชื้อมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellobiase ในการย่อย ในช่วง 0.25 – 0.45 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท เมื่อทดสอบผลของอัตราส่วนของวัสดุเหลือทิ้งต่อน้ำที่ใช้สกัดพบว่าอัตราส่วน 1:100 มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์มากกว่าอัตราส่วน 1:500 การใช้อัตราส่วนของวัสดุก้อนเห็ดเหลือทิ้งที่สูงทำให้มีความเข้มข้นของสารยั้งยั้งในการเจริญเชื้อยีสต์สูง และเมื่อทดสอบการผลิตเอทานอลพบว่าอยู่ในช่วง 10 – 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่แตกต่างจากการผลิตเอทานอลจากอาหาร YPD ที่ใช้เลี้ยงยีสต์โดยทั่วไป เมื่อทดลองใช้เชื้อรา *Rhizopus microsporus* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสและผลิตเอทานอลได้มาผลิตเอทานอลจากอาหารที่สกัดจากก้อนเห็ดเหลือทิ้งที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบมาก่อน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองนี้ยังมีผลผลิตในระดับต่ำและไม่สามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้

ABSTRACT

In this search, the biomass pretreatment methods were investigated by combining between chemical and biological methods. The four treatments including 1) Mushroom waste materials digested with sulfuric acid (H_2SO_4) and mushroom *Laetiporus* sp. 2) Mushroom waste materials digested with alkali (NaOH) and mushroom *Laetiporus* sp. 3) Non-treated mushroom waste materials digested with *Laetiporus* sp. 4) Raw sawdust digested with *Laetiporus* sp. All treatments were cultured for 20 days and the sample was taken every 2 days for measuring reducing sugar content and enzyme activity, cellobiase, which is an enzyme involved in the digestion of cellulose. The results showed that reducing sugar was produced in two phases in all treatments studied. The reducing sugar content was up to 1.85 mg/g of non-treated mushroom waste material at day 4 of incubation time. While the alkaline treated mushroom waste showed the content up to 1.40 mg/g of the material at day 14 of incubation. The mushroom strain has ability to create enzymes to digest cellulose with 0.25 to 0.45 U/g of substrate. The effect of the ratio of mushroom waste material water used for extraction was studied and the result showed that the ratio of 1:100 was more suitable for yeast growth than a ratio of 1:500. The high content of growth inhibitor in the high ratio of water and mushroom waste could inhibit the growth of yeasts cell. However, the production of ethanol was not different between mushroom waste media and YPD which is the general media for yeast cell and it was in the range of 10 mg to 60 mg/L. The fungus, *Rhizopus microsporus* which are capable to degrade lignocellulose materials and produce ethanol was additional used for the production of ethanol from mushroom waste material and the result showed that this fungus can produce ethanol at 220 mg/L. However, the amount of ethanol produced from this research was not high enough to apply for the industrial level.

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหาวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 สภาพปัญหาปัจจุบันเกี่ยวกับพลังงานทดแทน	4
2.2 การผลิตเอทานอล	4
2.3 การเพาะเห็ดและแนวทางการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้ง	10
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 จุลินทรีย์	12
3.2 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด	12
3.3 ศึกษาขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ	13
3.4 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด	14
3.5 ศึกษาแบบแผนการเจริญของยีสต์ในน้ำสกัดจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด	14
3.6 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS	14
3.7 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล	15
3.8 วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลส	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 คุณสมบัติเบื้องต้นของวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด	16
4.2 ศึกษาขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิงหรือบรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	32
ประวัตินักวิจัย	34



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของแปง	5
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสในพืช	5
ภาพที่ 2-3 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบกลุ่มต่างๆ	6
ภาพที่ 2-4 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง	6
ภาพที่ 2-5 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล	7
ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสก่อนและหลังขั้นตอนการปรับสภาพ	8
ภาพที่ 2-7 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบกลุ่มลิกโนเซลลูโลส	9
ภาพที่ 2-8 ขั้นตอนโดยทั่วไปของการเพาะเห็ด	10
ภาพที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์ความชื้นในก้อนเห็ดขอนเห็ดทั้งและซีเลื่อยธรรมชาติ	16
ภาพที่ 4-2 ปริมาณ soluble โปรตีนในวัสดุเห็ดทั้งแต่ละชนิด	16
ภาพที่ 4-3 ปริมาณซีเลื่อยในวัสดุเห็ดทั้ง	17
ภาพที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเซลลูโลสในก้อนเห็ดเห็ดทั้งและซีเลื่อย	18
ภาพที่ 4-5 น้ำหนักแห้งของเชื้อ <i>Laetiporus</i> sp. ในระหว่างทำการทดลอง	20
ภาพที่ 4-6 รายละเอียดการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงเวลาของการย่อย	21
ภาพที่ 4-7 รายละเอียดการสร้างเอนไซม์ cellobiase ในช่วงเวลาของการย่อย	22
ภาพที่ 4-8 อัตราส่วนของน้ำต่อวัสดุเห็ดทั้งการเจริญของยีสต์หลังการเพาะเลี้ยง 6 วัน	23
ภาพที่ 4-9 อัตราส่วนของน้ำต่อวัสดุเห็ดทั้งการเจริญของยีสต์หลังการเพาะเลี้ยง 6 วัน	24
ภาพที่ 4-10 อัตราการเจริญของยีสต์เซลล์ในอาหารที่เตรียมจากน้ำสกัดวัสดุปรับสภาพโดยการวัด OD 600	24
ภาพที่ 4-11 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่ใช้วัสดุเห็ดทั้งจากการเพาะเห็ด	25
ภาพที่ 4-12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าเพื่อปรับสภาพวัสดุ	25

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหาวิจัย

การใช้ทรัพยากรธรรมชาติให้เกิดประโยชน์สูงสุดโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมาผลิตเอทานอล เป็นโครงการวิจัยที่ยังไม่มีการวิจัยทดลองมาก่อนและสอดคล้องกับนโยบายระยะการบริหารราชการ 3 ปี ของรัฐบาล ที่ดำเนินการให้นโยบายด้านพลังงานทดแทนเป็นวาระแห่งชาติโดยสนับสนุนให้มีการเร่งสำรวจและพัฒนาแหล่งพลังงานประเภทต่าง ๆ สนับสนุนการผลิตและการใช้พลังงานทดแทน โดยเฉพาะการพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพและชีวมวล เช่น แก๊สโซฮอลล์ และไบโอดีเซล เพื่อเสริมสร้างความมั่นคงด้านพลังงาน ลดภาวะมลพิษ และเพื่อสนับสนุนให้มีการผลิตและใช้พลังงานหมุนเวียนในระดับชุมชน หมู่บ้าน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยของจังหวัดเชียงรายในการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีที่สนับสนุนการประหยัดพลังงานและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

การผลิตเอทานอลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทดแทนเป็นงานวิจัยที่มีนักวิจัยหลายกลุ่มทำการวิจัยไม่ว่าจะเป็นการผลิตเอทานอลจากแป้ง น้ำตาล หรือสารตั้งต้นอีกหลายชนิดรวมทั้งการผลิตเอทานอลจากวัสดุพวกเซลลูโลสเช่น กากชานอ้อย ฟางข้าว เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมีคุณสมบัติที่น่าจะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้เนื่องจากมีเซลลูโลสที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบและจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลในระหว่างการหมักได้

การเพาะเห็ดเป็นอาชีพเสริมเพื่อเพิ่มรายได้เป็นอีกอาชีพหนึ่งที่มีความสนใจจากกลุ่มเกษตรกรในจังหวัดเชียงราย ปริมาณวัสดุเหลือทิ้งในการผลิตแต่ละครั้งของกลุ่มเกษตรกรจึงมีปริมาณมากเนื่องจากในการผลิตแต่ละครั้งเกษตรกร 1 คน ใช้วัสดุหลักคือขี้เลื่อย ในปริมาณมากกว่า 1000 กิโลกรัม การกำจัดวัสดุเหลือทิ้งอย่างผิดวิธีด้วยการเผาจะส่งผลเสียก่อให้เกิดควันและเพิ่มมลภาวะให้กับสิ่งแวดล้อม การวิจัยเพื่อนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์จึงเป็นเรื่องจำเป็นเร่งด่วนที่ควรทำ

การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งของพลังงานทดแทนอีกทั้งยังเป็นการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่แล้วให้เกิดประโยชน์สูงสุด กลุ่มผู้วิจัยจึงคิดโครงการวิจัยนี้เพื่อให้เกิดความครบถ้วนและสมบูรณ์เพื่อที่จะได้แนวทางหรือรูปแบบที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำไปประยุกต์ใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อทราบส่วนประกอบต่างๆที่มีอยู่ในวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด
- 1.2.2 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสับสเตรทสำหรับการผลิตเอทานอล
- 1.2.3 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

1.2.4 เพื่อแนะแนวทางการใช้ประโยชน์ของเหลือทิ้งแก่กลุ่มเกษตรกรผู้เพาะเห็ด

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดหรือก้อนเห็ดเก่าเหลือทิ้งในการศึกษานี้ มีทั้งเส้นใยของเห็ด เศษขี้เลื่อยและส่วนประกอบเสริมอื่นๆที่เหลืออยู่ รวมทั้งสารที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายระหว่างการผลิตเป็นส่วนประกอบ มีรายงานการวิจัยพบส่วนประกอบหลักของไม้ ขี้เลื่อยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยองค์ประกอบเหล่านี้เป็นแหล่งน้ำตาลที่มีศักยภาพ ดังนั้นการเพาะเห็ดจึงเป็นวิธีการย่อยสลายสารในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสเบื้องต้นด้วยวิธีทางชีวภาพมาแล้วในเบื้องต้นเนื่องจากมีรายงานการวิจัยว่าเห็ดมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารในกลุ่มลิกโนเซลลูโลส เช่น เอนไซม์เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส ไซแลนเนส และเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนไลติก ดังนั้นวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดจึงอาจเป็นวัสดุตั้งต้นที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตเนื่องจากสามารถลดขั้นตอนการจัดการวัสดุเหลือทิ้งก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล

ในก้อนเห็ดมีการเติมสารอาหารชนิดอื่นลงไปด้วยเป็นไปได้ว่าวัสดุอาจจะไม่ถูกย่อยอย่างเต็มที่กลุ่มผู้วิจัยจึงได้ออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาถึงขั้นตอนการปรับสภาพต่อการผลิตน้ำตาลที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลเนื่องจากโดยทั่วไปมีการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่สามารถย่อยวัสดุกลุ่มนี้และผลิตเอทานอลได้โดยตรง ดังนั้นจึงต้องหาสภาวะการผลิตที่เหมาะสมในกรณีที่ใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อในการผลิต

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ในการทำวิจัยครั้งนี้กลุ่มผู้ทำการวิจัยได้กำหนดขอบเขตของโครงการวิจัย (Scope of research) ดังนี้

1. ขอบเขตด้านเนื้อหา ตัวแปรที่วิจัย

เป็นการวิจัยเฉพาะการหาองค์ประกอบและการผลิตเอทานอลจากของเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดถั่ง

2. ขอบเขตด้านประชากรที่วิจัย

ตัวอย่างที่นำมาทดลองเป็นของเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดถั่ง

3. ขอบเขตด้านสถานที่วิจัย

เห็ดในจังหวัดเชียงราย

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด ในงานวิจัยนี้หมายถึง ก้อนเห็ดที่ผ่านการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดและ
เกษตรกรเตรียมนำไปทิ้งหรือทำเป็นปุ๋ย



บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สภาพปัญหาปัจจุบันเกี่ยวกับพลังงานทดแทน

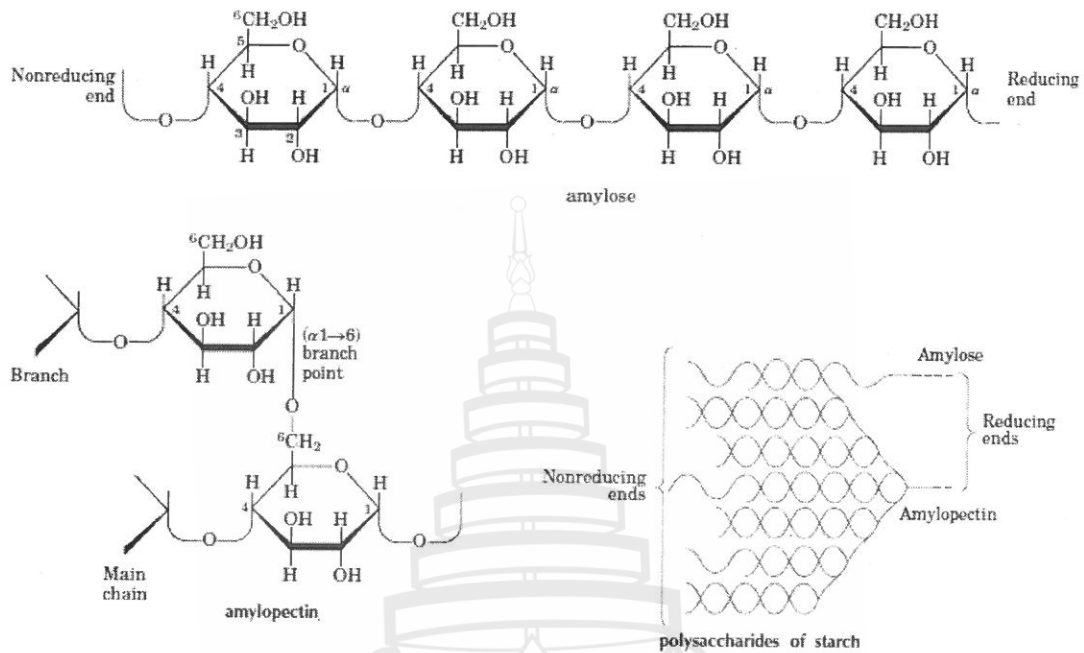
ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกมีการใช้น้ำมันปิโตรเลียมเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับในอดีต อย่างไรก็ตามด้วยปริมาณน้ำมันดิบในธรรมชาติที่มีอยู่อย่างจำกัดและมีปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อปริมาณที่ต้องการใช้ในอนาคต ทำให้ทุกประเทศที่นำเข้าน้ำมันตระหนักถึงความเสี่ยงจากการใช้น้ำมันเป็นพลังงานหลักเพียงอย่างเดียวและเริ่มหาพลังงานทดแทน เช่น พลังงานจากแสงอาทิตย์ และน้ำ ไบโอดีเซล แก๊สโซฮอลล์ เป็นต้น เพื่อช่วยลดมูลค่าการนำเข้าน้ำมัน อีกทั้งยังเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะโลกร้อนซึ่งโดยปรกติจะถูกปลดปล่อยออกมาในปริมาณที่สูงเมื่อใช้น้ำมันปิโตรเลียมทั่วไปส่งผลให้เกิดมลภาวะทางอากาศ เกิดภาวะเรือนกระจก (Greenhouse effect) ในชั้นบรรยากาศ ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อน (global warming)

ในประเทศไทยมีรายงานการใช้น้ำมันเบนซินไร้สารตะกั่วออกเทน 95 (รวมน้ำมันแก๊สโซฮอลล์ 10 ออกเทน 95 แก๊สโซฮอลล์ 20 และ อี 85) ในปี 2552 เพิ่มขึ้นจากปี 2551 ในอัตราร้อยละ 15.1 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน) จากปริมาณการใช้น้ำมันที่มีส่วนผสมของเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ทำให้ต้องมีการผลิตเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นเพื่อรองรับปริมาณความต้องการใช้ในอนาคต

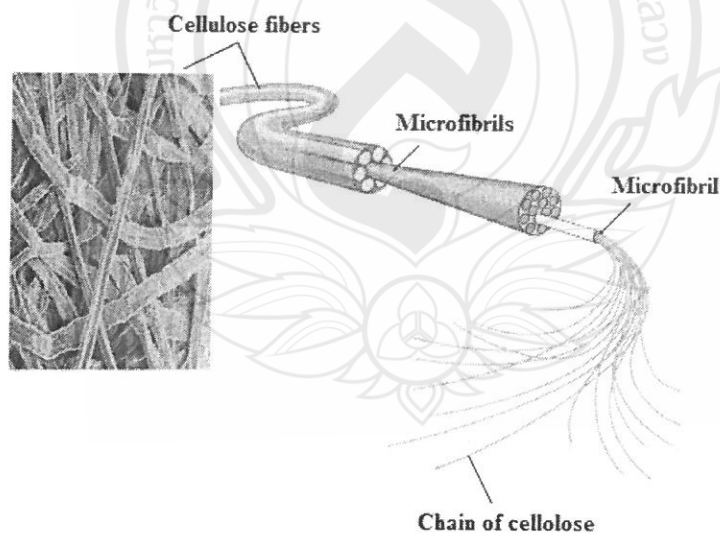
แก๊สโซฮอลล์ (gasohol) เกิดจากส่วนผสมระหว่างเอทานอลกับแก๊สโซลีน การใช้เชื้อเพลิงที่ใช้เอทานอลเป็นส่วนผสมในน้ำมันปิโตรเลียมจะส่งผลช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในสิ่งแวดล้อม

2.2 การผลิตเอทานอล

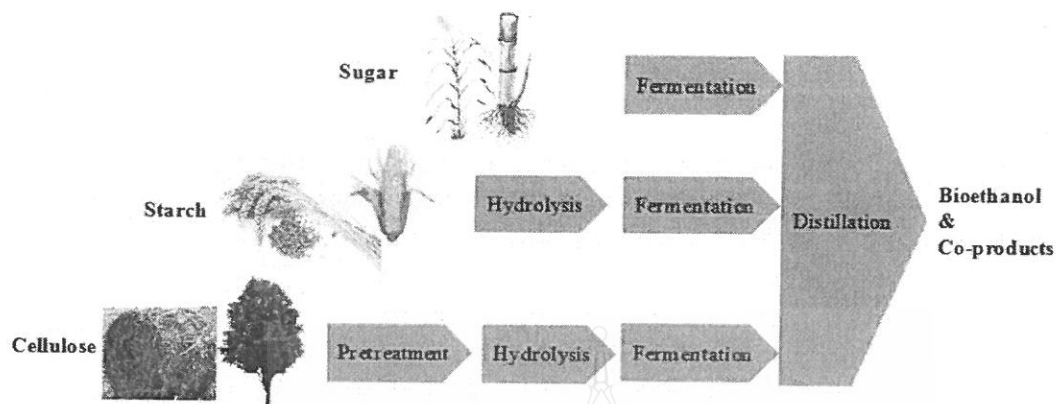
วัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตเอทานอล แบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลัก คือ (1) วัตถุดิบที่มีองค์ประกอบจำพวกแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น องค์ประกอบหลักของวัตถุดิบกลุ่มแป้งเป็นน้ำตาลแสดงดังภาพที่ 2-1 (2) วัตถุดิบกลุ่มน้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น (3) วัตถุดิบประเภทเส้นใย ผลผลิตพลอยได้ทางการเกษตร แสดงตัวอย่างโครงสร้างดังภาพที่ 2-2 วัตถุดิบกลุ่มนี้ได้แก่ ฟางอ้อย ชานอ้อย ชังข้าวโพด ชีเลื่อย เศษใบไม้ วัชพืช รวมถึงของเสียจากโรงการผลิตรถยนต์ เป็นต้น วัตถุดิบทั้งสามกลุ่มสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักของยีสต์ได้แต่จะมีความแตกต่างเล็กน้อยในรายละเอียดของกระบวนการผลิตและปริมาณการผลิตเอทานอลที่ได้ขึ้นอยู่กับประเภทของวัตถุดิบ ตัวอย่างแสดงความแตกต่างของกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลและแป้ง มันสำปะหลังและกากน้ำตาล ดังภาพที่ 2-3, 2-4 และ 2-5 ตามลำดับ



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของแป้ง (David and Michael, 2004)

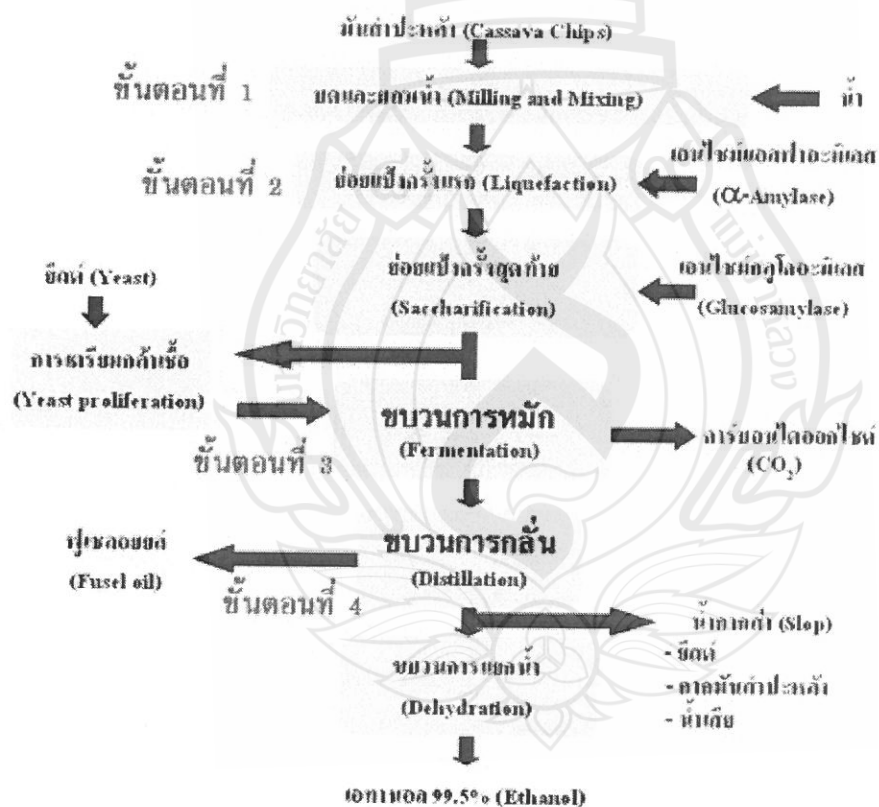


ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสในพืช (Ainsworth, 1994).



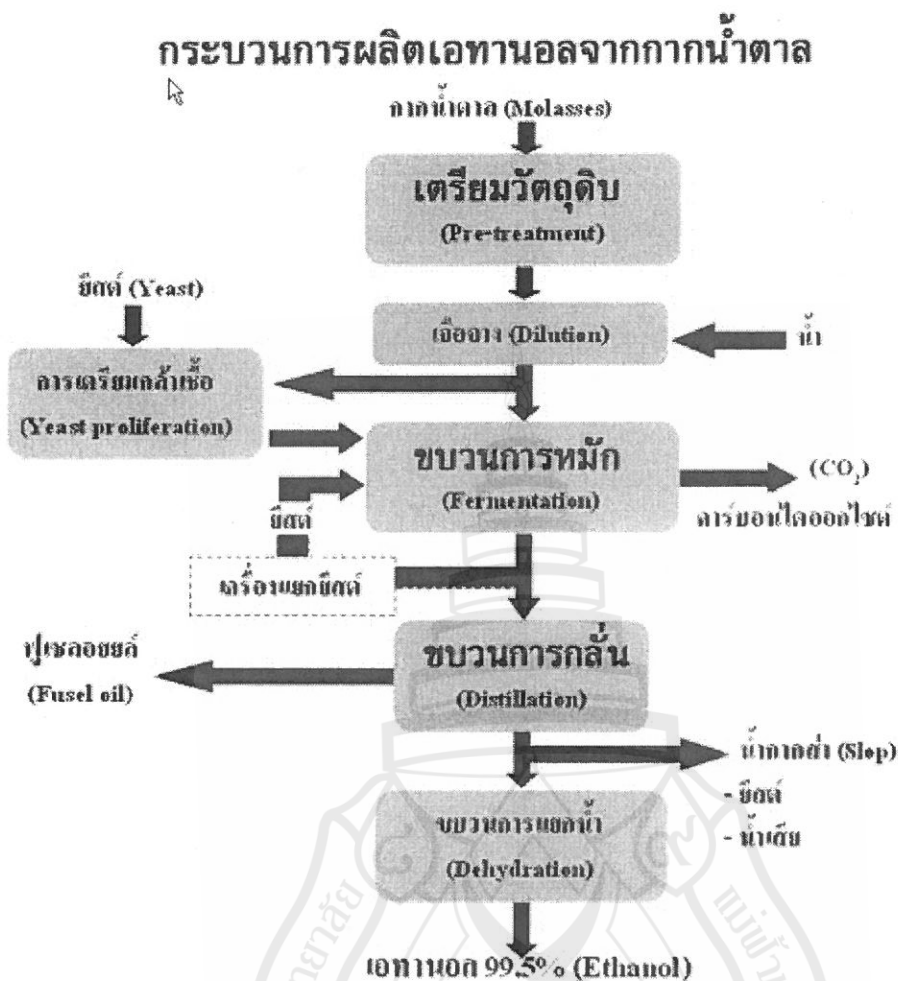
ภาพที่ 2-3 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบกลุ่มต่างๆ
(<http://aseancassava.info/bioethanol.asp>)

กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง



ภาพที่ 2-4 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

ที่มา: <https://sites.google.com/site/rigidfluid/home/fgcdbre> “นวัตกรรมพลังงานทดแทนไทย” เอทานอลจากอ้อยและมันสำปะหลัง โดยสิริวัชรีย์ เสียมภักดี สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย

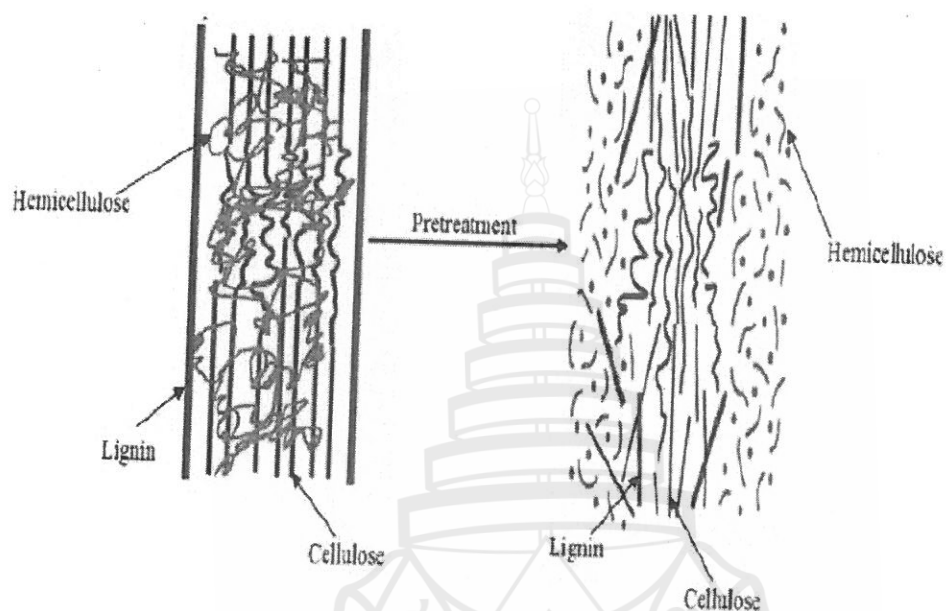


ภาพที่ 2-5 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

ที่มา: <https://sites.google.com/site/rigidfluid/home/fgcdbre> “นวัตกรรมพลังงานทดแทนไทย” เอทานอลจากอ้อยและมันสำปะหลัง โดยสิริวัฑณี เสียมภักดี สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย

อย่างไรก็ตามการใช้วัตถุดิบในกลุ่มแป้งและน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งอาหารมาผลิตเอทานอลอาจทำให้เกิดการแข่งขันการใช้วัตถุดิบกลุ่มดังกล่าวทั้งทางด้านการผลิตอาหารและเอทานอล ส่งผลให้ราคาวัตถุดิบและสินค้าอาหารสูงขึ้น วัตถุดิบทางเลือกกลุ่มลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นที่สนใจที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยเนื่องจากเป็นแหล่งของน้ำตาลที่มีศักยภาพไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลคาร์บอน 5 โมเลกุล เช่น ไซโลส และน้ำตาลที่มีโมเลกุลคาร์บอน 6 โมเลกุล เช่น กลูโคส และ แมนโนส (Taherzadeh and Karimi, 2008) ปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลในหลายประเทศจึงมุ่งเน้นไปที่วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากพืชเนื่องจากพืชสะสมพลังงานจากดวงอาทิตย์ในรูปสารประกอบอินทรีย์ประเภท

คาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์พืชเรียกว่า ไบโอมแอส (Biomass) ประกอบด้วย ส่วนสำคัญหลัก 3 ส่วน คือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (ภาพที่ 2-6)



ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสก่อนและหลังขั้นตอนการปรับสภาพ

การผลิตเอทานอลจากชีวมวลกลุ่มลิกโนเซลลูโลสจำเป็นต้องมีการกำจัดสารในกลุ่มลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นตัวรบกวนการผลิตออกไปก่อน โดยขั้นตอนหลักของการผลิตเอทานอล จากวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสโดยทั่วไปแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลัก คือ

2.2.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

วัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลนั้นอยู่ในรูปที่เป็นสารผลึกของ สารประกอบเชิงซ้อน (complex) ของเซลลูโลสกับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส โดยส่วนที่จะถูก นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นจริง ๆ ในการผลิตเอทานอลคือ ส่วนของเซลลูโลส ขั้นตอนการปรับสภาพ วัตถุดิบจึงเป็นขั้นตอนที่ต้องการแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างเชิงซ้อนกับ เซลลูโลสก่อนเพื่อเพิ่มพื้นที่ที่เอนไซม์จะไปจับและทำปฏิกิริยาส่งผลให้ประสิทธิภาพในขั้นตอน การย่อยเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 2-6) ตัวอย่างวิธีการปรับสภาพได้แก่

1.1 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment) เป็นการลดขนาดของ วัตถุดิบ เช่น การบด การใช้ความร้อน เป็นต้น เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น

1.2 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical pretreatment) เป็นการแยกเอาสารเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากเซลลูโลส โดยการใช้กรดหรือด่างเนื่องจาก เฮมิเซลลูโลสและลิกนินสามารถละลายและถูกย่อยในกรดและด่างได้ดีกว่าเซลลูโลส

1.3 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment) เป็นการย่อยโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงมากขึ้นโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์

1.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physical-chemical pretreatment) เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สามเคมี

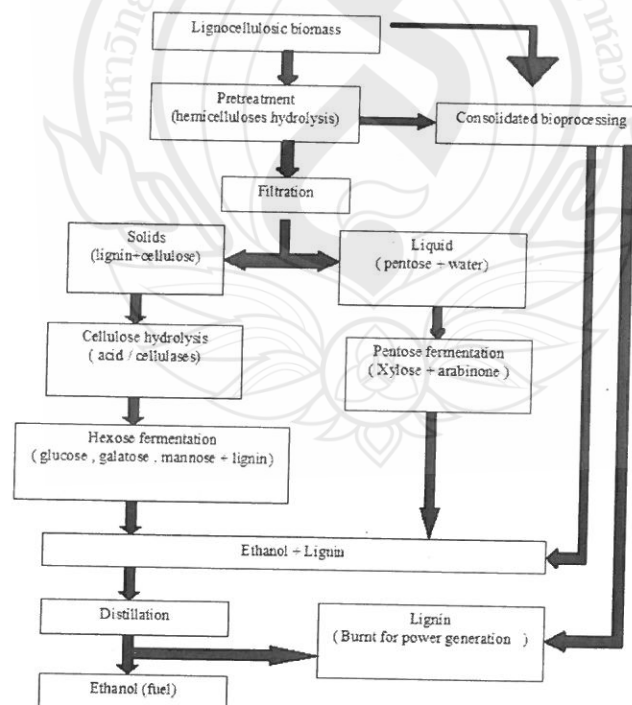
2.2.2 การย่อย (Hydrolysis)

เซลลูโลสส่วนใหญ่ถูกย่อยสลายได้โดยการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งพบในจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากในเชื้อรา แอคติโนไมซีต และแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสคือน้ำตาลกลูโคสที่จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลต่อไป

2.2.3 การผลิตเอทานอล (Ethanol production)

น้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสจะถูกนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตคือยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

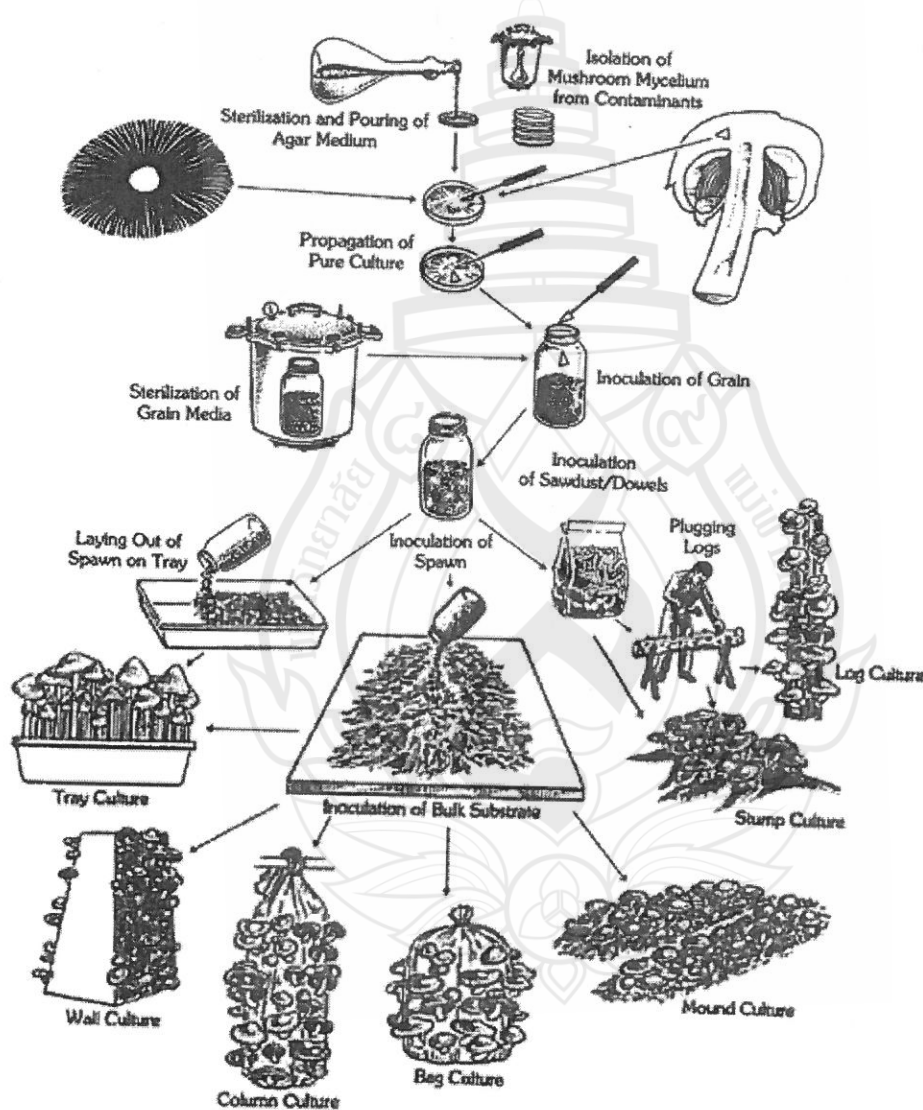
หลังจากได้ผลิตภัณฑ์เอทานอลจากการหมักแล้วจึงผ่านกระบวนการกลั่นให้บริสุทธิ์ก่อนจะนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ รวมถึงไบโอดีเซลต่อไป แสดงรายละเอียดการผลิตเอทานอลจากวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสดังภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-7 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบกลุ่มลิกโนเซลลูโลส (Joshi et al., 2011)

2.3 การเพาะเห็ดและแนวทางการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้ง

วิธีการเพาะเห็ดนั้นเป็นการนำวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตรและวัสดุจากธรรมชาติที่หาได้ในท้องถิ่น เช่น ฟางข้าว ขี้เลื่อย เปลือกถั่วเขียว หรือหญ้าชนิดต่างๆ แล้วแต่ความเหมาะสมกับท้องถิ่นนั้นๆ การเพาะเห็ดสามารถเพาะได้ทั้งในถุงพลาสติกโดยบรรจุวัสดุเพาะแล้วผสมอาหารเสริมลงไป นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใส่เชื้อเห็ดที่จะผลิต เช่น การเพาะเห็ดนางฟ้า เห็ดขอน เห็ดหอม เป็นต้น หรือการเพาะเห็ดกลางแจ้ง ได้แก่การเพาะเห็ดฟางบนกองฟางแบบกองเตี้ย การเพาะเห็ดทั้งสองวิธีสามารถทำได้ตลอดปีโดยต้องมีการควบคุมสภาวะให้เหมาะสม ขั้นตอนทั่วไปของการเพาะเห็ดแสดงดังภาพที่ 2-8



รูปที่ 2-8 ขั้นตอนโดยทั่วไปของการเพาะเห็ด

ที่มา: http://mushroombd.files.wordpress.com/2010/12/mush_culture_diagram.gif

วัสดุเหลือทิ้งหลังจากฤดูกาลเก็บเกี่ยวมีทั้งส่วนประกอบที่เป็นเส้นใยของเห็ด ขี้เลื่อยและอาหารเสริมที่เหลืออยู่ รวมทั้งสารที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอาหารตั้งต้นในระหว่างการผลิตหรือการเจริญของเชื้อเห็ด มีรายงานการวิจัยพบส่วนประกอบหลักของไม้ขี้เลื่อยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยองค์ประกอบเหล่านี้เป็นแหล่งน้ำตาลที่มีศักยภาพ ดังนั้นการเพาะเห็ดจัดเป็นวิธีการย่อยสลายสารในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสเบื้องต้นด้วยวิธีทางชีวภาพมาแล้วในเบื้องต้นเนื่องจากมีรายการการวิจัยว่าเห็ดมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารในกลุ่มลิกโนเซลลูโลส เช่น เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส ไซแลนเนส และเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนไลติก

การหาแหล่งวัตถุดิบใหม่สำหรับผลิตเอทานอลจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะสนับสนุนกำลังการผลิตในอนาคต วัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นอีกแหล่งพลังงานทดแทนที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ อีกทั้งการสะสมและการกำจัดอย่างผิดวิธีของวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมป่าไม้ส่งผลให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดจึงมีความน่าสนใจ เนื่องจากในประเทศไทยมีการเพาะเห็ดเพื่อเป็นพืชเศรษฐกิจและสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรเนื่องจากเห็ดเป็นผลิตผลทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภคกันทั่วไป (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2552) เมื่อคำนวณกลับจากปริมาณเห็ดที่ผลิตได้โดยเฉลี่ยต่อปีพบว่ามีของเหลือทิ้งที่เกิดจากการเพาะเห็ด 320,000 ตันต่อปี

กลุ่มผู้วิจัยจึงคิดโครงการวิจัยนี้ขึ้นเพื่อใช้เป็นอีกแนวทางในการกำจัดของเสียจากการเพาะเห็ดและเป็นอีกแหล่งของพลังงานทางเลือก

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 จุลินทรีย์

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* กลุ่มผู้วิจัยได้ค้นคว้าภายหลังพบว่าเชื้อ *Zymomonas mobilis* สายพันธุ์ธรรมชาติเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ แต่มีบางสายพันธุ์ที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมแล้วสามารถผลิตเอทานอลได้ ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงไม่นำเชื้อตัวนี้มาทดลอง เชื้อรา *Rhizopus microspores* ที่ได้จากการคัดเลือกจะสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสและเอทานอลได้

3.2 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด

3.2.1 ปริมาณความชื้น

อบด้วยอุณหภูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ซึ่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้ง และเพื่อชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนอีกครั้ง นำถ้วยอลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำเอามาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปชั่งน้ำ หนักซ้ำจนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น (\%moisture)} = \left(\frac{\text{น้ำหนักที่หายไป(กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \right) \times 100$$

3.2.2 ปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างมาละลายในน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:5 คนทิ้งไว้ 30 นาที นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปวัดปริมาณ soluble protein ด้วย DC protein assay (BIO-RAD).

3.2.3 ปริมาณซีเถ้า

ทำเครื่องหมายในถ้วยกระเบื้องด้วยดินสอเขียนแก้วแล้วเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator ซึ่งและบันทึกน้ำหนัก crucible ตักตัวอย่างประมาณ 2 กรัมใส่ในถ้วยกระเบื้อง ซึ่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอน นำ crucible พร้อมตัวอย่างเข้าเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550°C จนเถ้าเป็นสีขาวหรือเทาอ่อน ปกติจะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง (นับเวลาเมื่ออุณหภูมิในเตาเผาลงถึงค่าที่กำหนด) ใช้คีมคีบถ้วยกระเบื้องจากเตาเผาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด นำถ้วยกระเบื้องพร้อมด้วยเถ้าไปเผาต่ออีก 30 นาที แล้วนำมาดำเนินการจนได้น้ำหนักคงที่ (เถ้าไหม้สมบูรณ์แล้ว)

การคำนวณ

$$\% \text{ เถ้าทั้งหมด (Total Ash)} = (\text{น้ำหนักเถ้าทั้งหมด/น้ำหนักตัวอย่าง}) \times 100$$

3.2.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีไฮโดรเซลลูโลส(เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส)

กำจัดสารแทรกโดยสกัดไม้แห้ง 10 กรัม (ขนาด 40 mesh) ด้วยสารละลายผสมของเอทานอล:เบนซีน (1:2 โดยปริมาตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปกรองตัวอย่างผ่าน Buchner funnel และกำจัดตัวทำละลายที่มากเกินไปด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดเอทานอล เเทตัวอย่างไม้ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1 ลิตร และเติม 500 มิลลิลิตรของน้ำกลั่น ต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปกรองผ่าน เพื่อให้ไม้ Buchner funnel และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือด ปล่อยให้แห้ง

หาปริมาณไฮโดรเซลลูโลสโดยชั่งน้ำหนักแห้งของตัวอย่างไม้ที่ปราศจากสารแทรก 3 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 160 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 0.5 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 กรัม ตามลำดับในตู้ดูดควัน นำขวดก้นกลมไปตั้งใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยเขย่าขวดอย่างสม่ำเสมอ หลังจากครบ 1 ชั่วโมง เติมกรดอะซิติก 0.5 มิลลิลิตร ตามด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1.5 กรัม ลงในสารละลายที่ยังร้อนอยู่แล้วเขย่าขวด หลังจากครบ 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง นำขวดก้นกลมมาวางในอ่างน้ำแข็งจนกระทั่งสารละลายในขวดมีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายมากรองล้างด้วยน้ำเย็นและอะซิโตน หลังจากนั้นนำไปอบแห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส หลังจากอบแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก เก็บตัวอย่างไว้วิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสโดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างจากการวิเคราะห์ไฮโดรเซลลูโลส 1.5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ปรับอุณหภูมิของสารละลายให้อยู่ที่ 3-4 องศาเซลเซียส คนสารละลายด้วยเครื่องกวนจนกระทั่งเยื่อกระจายอย่างสมบูรณ์ ล้างเครื่องกวนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร คนสารละลายด้วยแท่งแก้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 3-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้ว ทั้งไว้ 30 นาที กรองสารละลาย ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งเป็นกลางเติม 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส คำนวณหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

3.3 ศึกษาขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ

3.3.1 การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดด้วยกรดและด่าง

ฆ่าเชื้อวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการทดลองนี้ได้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือ 1) วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่ปรับสภาพด้วยกรดความเข้มข้น 1% (1% H_2SO_4) 2) วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่ปรับสภาพด้วยด่างความเข้มข้น 1% (1% NaOH) 3) วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่ไม่ผ่านขั้นตอน

การปรับสภาพด้วยกรดและด่างโดยแช่ในน้ำธรรมดา 4) ขี้เลื่อยที่ใช้เป็นวัสดุตั้งต้นในการเพาะเห็ด ไม่ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดหรือด่าง ทำการแช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงก่อนนำมากรองและปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 5.5 ล้างด้วยน้ำกลั่นและทำให้แห้งในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส เมื่อวัสดุแห้งดีแล้วเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไปที่อุณหภูมิห้องในภาชนะที่ปิดสนิท

3.3.2 การปรับสภาพวัสดุโดยใช้เชื้อรา *Laetiporus* sp.

ในขั้นตอนการศึกษาศึกษาการเตรียมน้ำตาลเพื่อนำไปผลิตเอทานอล ผู้วิจัยได้ใช้เชื้อรา *Laetiporus* sp. ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเจริญในวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสและสร้างเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยลิกโนเซลลูโลสได้ โดยทำการเลี้ยง *Laetiporus* sp. ในอาหารที่ประกอบด้วยวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน นำตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:2 นำไปปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของแข็งที่ได้ไปหั่นน้ำหนักแห้งเพื่อดูการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ในส่วนของเหลวนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และการผลิตเอนไซม์ cellobiase

3.4 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด

สกัดวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:100 และ 5:100 นำไปกรองและเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของแข็งออก นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบผลของอัตราส่วนต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 6 วัน เทียบการเจริญของยีสต์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.5 ศึกษาแบบแผนการเจริญของยีสต์ในน้ำสกัดจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด

สกัดวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:100 นำไปกรองและเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของแข็งออก นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบผลของอัตราส่วนต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน วัดการเจริญของยีสต์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และหาคำนวณน้ำหนักแห้ง

3.6 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS

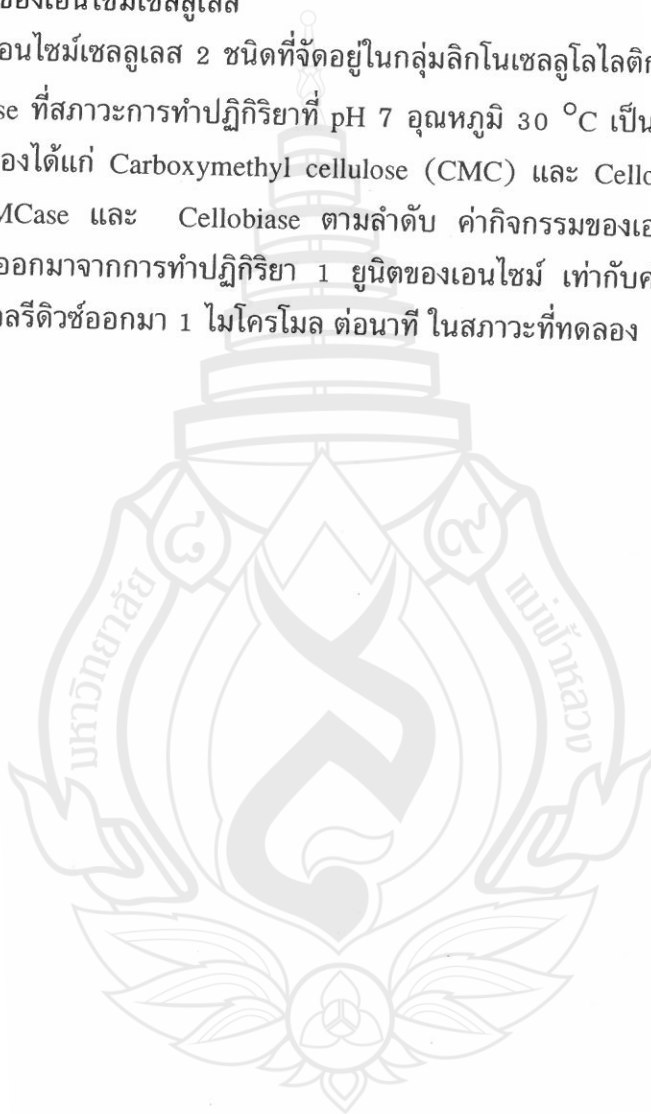
นำตัวอย่างที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.7 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้ Gas chromatography (GC) ที่มี SHP innowax คอลัมน์ และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาที่ความเร็ว 1 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิ oven เริ่มต้นที่ 50 °C ถึง 250 °C โดยใช้ FID Detector (Flame Ionization Detector)

3.8 วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

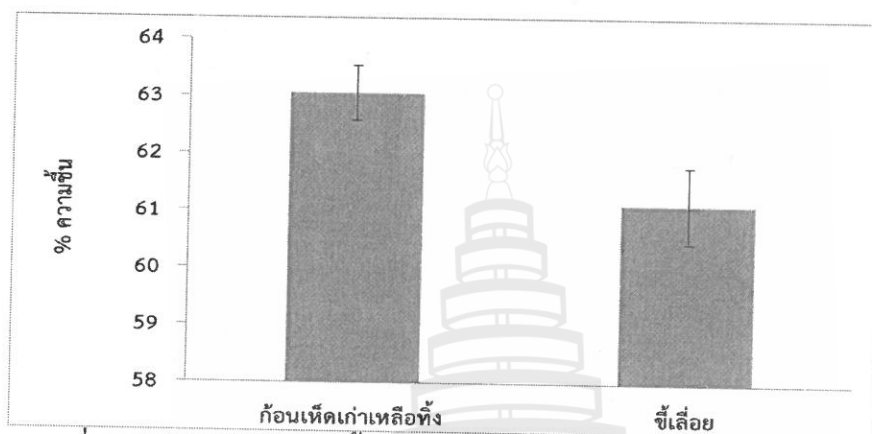
ทำการวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส 2 ชนิดที่จัดอยู่ในกลุ่มลิกโนเซลลูโลไลติกเอนไซม์ได้แก่ CMCase และ Cellobiase ที่สภาวะการทำปฏิกิริยาที่ pH 7 อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที สับสเตรทที่ใช้ในการทดลองได้แก่ Carboxymethyl cellulose (CMC) และ Cellobiose สำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์ CMCase และ Cellobiase ตามลำดับ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์วัดจากค่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมาจากการทำปฏิกิริยา 1 ยูนิตของเอนไซม์ เท่ากับค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ที่ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมา 1 ไมโครโมล ต่อนาที ในสภาวะที่ทดลอง



บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 คุณสมบัติเบื้องต้นของวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด

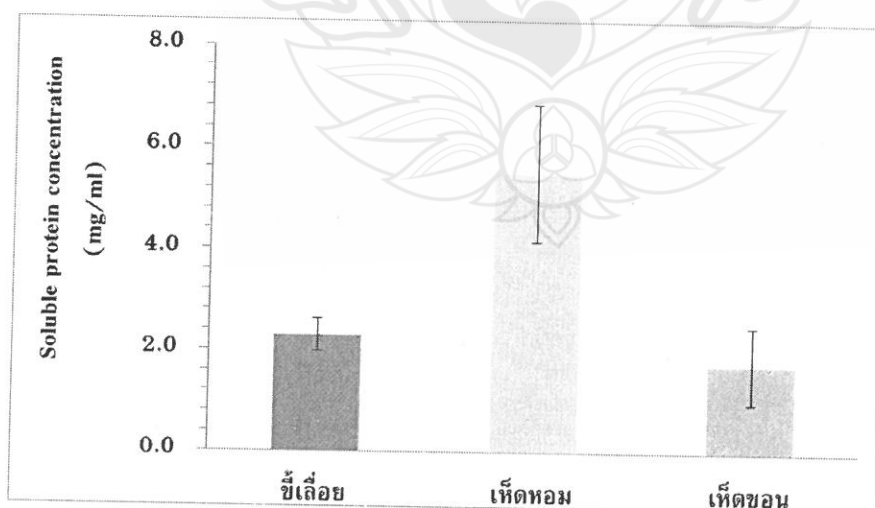
4.1.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Moisture content)



ภาพที่ 4-1 เปอร์เซนต์ความชื้นในก้อนเห็ดขอนเหลือทิ้งและซีเลื่อยธรรมชาติ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดและซีเลื่อยธรรมชาติพบว่าวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมีเปอร์เซนต์ความชื้นสูงกว่าซีเลื่อยธรรมชาติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโดยทั่วไปในขั้นตอนของการเตรียมก้อนเห็ดก่อนกระบวนการเพาะเห็ดนั้นส่วนใหญ่เกษตรกรจะปรับความชื้นของก้อนเห็ดให้อยู่ที่ 55-60 เปอร์เซนต์ และในช่วงการการเพาะเลี้ยงเห็ดเกษตรกรจะควบคุมความชื้นโดยการสเปรย์น้ำเพื่อควบคุมความชื้น ดังนั้นก้อนเห็ดที่เหลือหลังจากเก็บเกี่ยวเสร็จแล้วจึงยังมีความชื้นสูง และสูงกว่าซีเลื่อยธรรมชาติ แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 4-1

4.1.2 ปริมาณโปรตีน

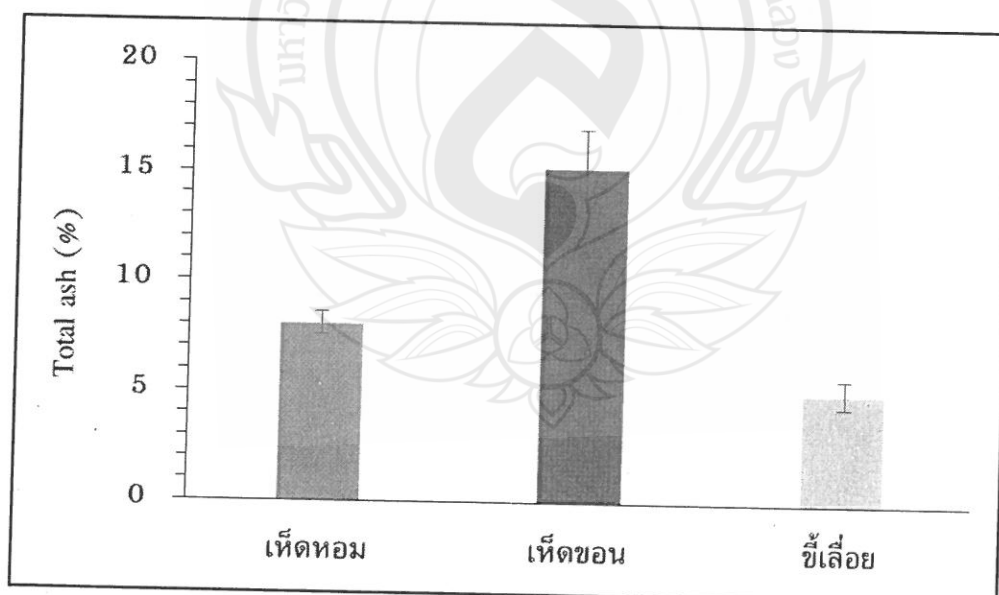


ภาพที่ 4-2 ปริมาณ soluble โปรตีนในวัสดุเหลือทิ้งแต่ละชนิด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ soluble protein พบว่าปริมาณโปรตีนของน้ำสกัดวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดหอม มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าโปรตีนของน้ำสกัดวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดขอนที่มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 1.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางภาพที่ 4-2 ผลการทดลองขัดแย้งกับทองเลียน บัวจุมและบัวเรียม มณีวรรณ (2551) ซึ่งพบปริมาณโปรตีนในก้อนเชื้อเห็ดเก่าของเห็ดหอมร้อยละ 4.13 ของน้ำหนักแห้ง ในก้อนเชื้อเห็ดขอนร้อยละ 5.13 ของน้ำหนักแห้ง จากการทดลองจะเห็นว่าในก้อนเห็ดต่างชนิดกันจะมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ต่างกัน นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันอาจขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงด้วย ดังนั้นในการนำวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมาใช้จะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติเบื้องต้นว่าก้อนเห็ดแต่ละชนิดมีคุณสมบัติต่างกันเล็กน้อย

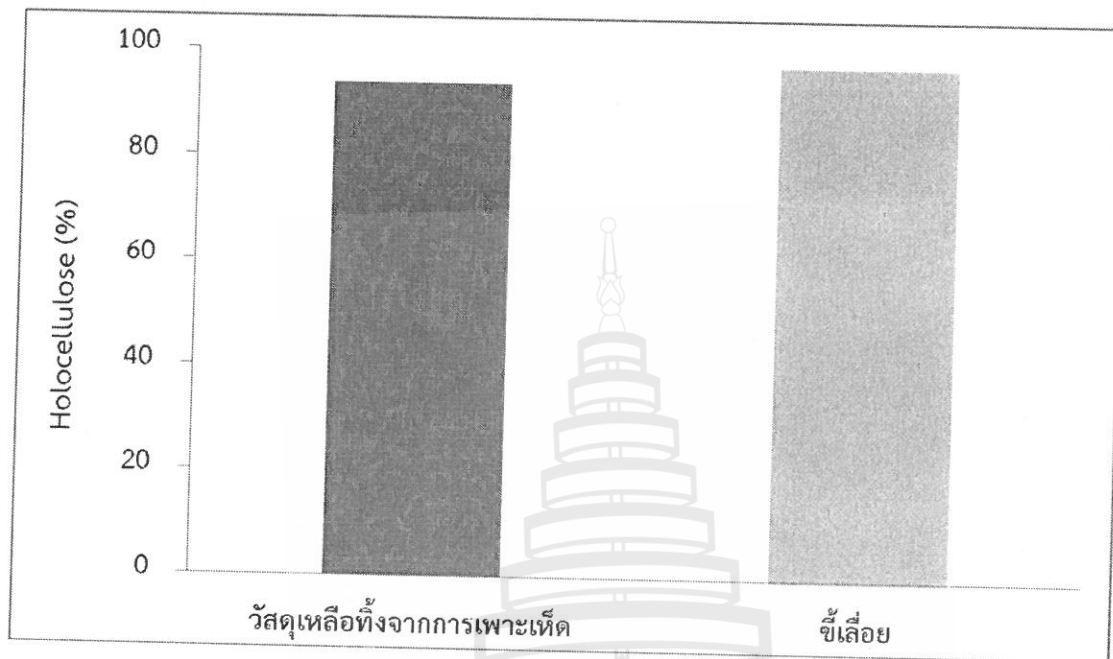
4.1.3 ปริมาณขี้เถ้าทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณขี้เถ้าทั้งหมด พบว่าปริมาณขี้เถ้าของก้อนเห็ดหอมเก่า มีร้อยละ 8.05 ของก้อนเห็ดขอนเก่ามีร้อยละ 15.17 และขี้เลื่อยมีร้อยละ 5.05 ดังภาพที่ 4-3 ทองเลียน บัวจุมและบัวเรียม มณีวรรณ (2551) พบปริมาณขี้เถ้าในก้อนเชื้อเห็ดหอมเก่าร้อยละ 33.20 ของน้ำหนักแห้ง ในก้อนเชื้อเห็ดขอนร้อยละ 26.27 ของน้ำหนักแห้ง จากการทดลองนี้ก้อนเห็ดเปล่าที่ไม่มีเชื้อหรือขี้เลื่อยเปล่าพบขี้เถ้าร้อยละ 8.84 ของน้ำหนักแห้ง ปริมาณเถ้าบ่งบอกถึงปริมาณส่วนของสารอินทรีย์ที่เหลือหลังจากส่วนของสารอินทรีย์ถูกเผาไหม้หมดไป ดังนั้นปริมาณขี้เถ้าที่ต่ำกว่าหมายถึงวัสดุนั้น ๆ มีปริมาณสารอินทรีย์ที่มากกว่า



ภาพที่ 4-3 ปริมาณขี้เถ้าในวัสดุเหลือทิ้ง

4.1.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีไฮโดรเซลลูโลส(เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส)



ภาพที่ 4-4 เปอร์เซนต์ไฮโดรเซลลูโลสในก้อนเห็ดเหลือทิ้งและขี้เลื่อย

จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเซลลูโลสในก้อนเห็ดเหลือทิ้งและขี้เลื่อยพบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อยแสดงดังภาพที่ 4-4 เป็นไปได้ว่าเชื้ออาจมีการใช้สารอาหารที่เกิดจากส่วนผสมที่เติมเข้าไปในสูตรอาหารในการเจริญก่อนและหลังจากที่อาหารที่เติมลงไปหมดเชื้อจึงจะมีการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อย่อยขี้เลื่อย จึงทำให้ปริมาณไฮโดรเซลลูโลสของวัสดุทั้งสองชนิดจึงแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการนำก้อนเห็ดเหลือทิ้งมาใช้ อาจจำเป็นต้องมีการเพิ่มขั้นตอนของการปรับสภาพอีกครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ผลิตเอทานอล

4.2 ศึกษาขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ

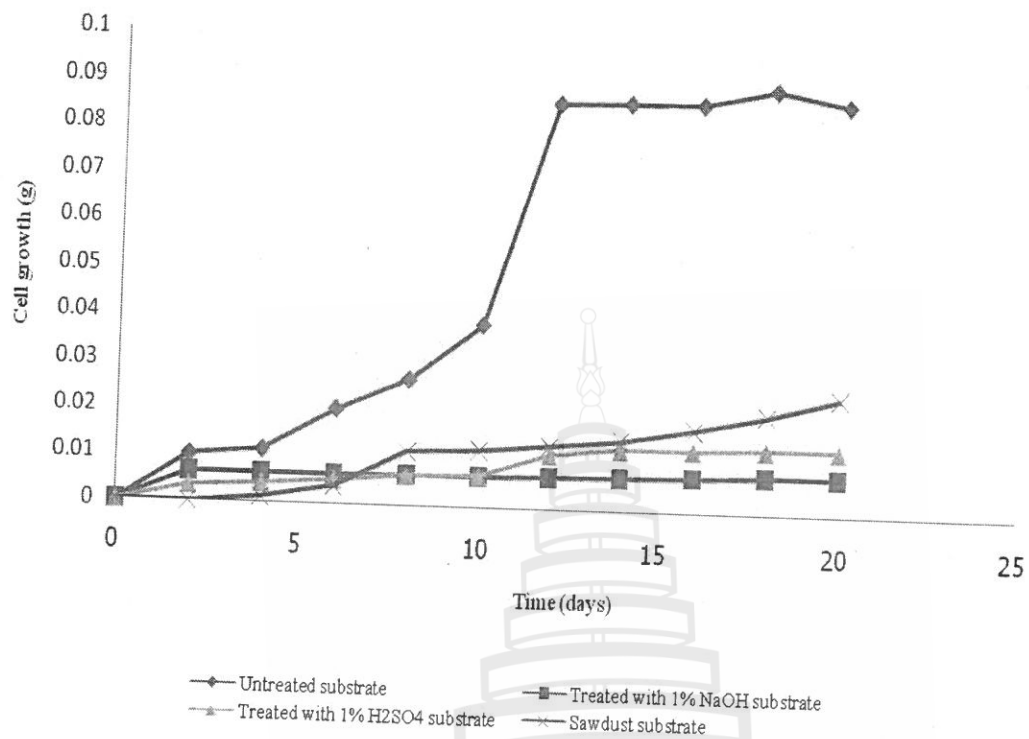
ชีวมวลในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสมีส่วนประกอบหลักทางเคมีที่สำคัญคือ ลิกนิน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และสารแทรก โดยสารประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเรียกว่า ไฮโดรเซลลูโลส จากการทดลองพบปริมาณของไฮโดรเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดและขี้เลื่อยมีค่าใกล้เคียงกันโดยปริมาตรไฮโดรเซลลูโลสในขี้เลื่อยสูงกว่าวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดเล็กน้อย จากข้อมูลเบื้องต้นนี้แสดงว่าวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลในการผลิตเอทานอลได้แต่อย่างไรก็ตามต้องเพิ่มขั้นตอนของการปรับสภาพวัสดุก่อนเข้ากระบวนการผลิต ปริมาณไฮโดรเซลลูโลสที่พบในงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปริมาณไฮโดรเซลลูโลสในพืชปรกติอยู่ในช่วง 60-75 เปอร์เซนต์

ในขั้นตอนการเตรียมสับสเตรทเพื่อย่อยน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้ง ในการทดลองเบื้องต้น ได้ทดสอบวิธีการย่อยเบื้องต้นด้วยวิธีทางเคมีจากนั้นนำไปย่อยด้วยวิธีทางชีววิทยา โดยแบ่งการทดลองย่อยออกเป็น 4 การทดลองตามวิธีของขั้นตอนการเตรียมวัสดุเหลือทิ้ง โดยในดังนี้คือ

1. วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่ผ่านขั้นตอนการย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 1% (1% H_2SO_4)
2. วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่ผ่านขั้นตอนการย่อยด้วยด่างความเข้มข้น 1% (1% $NaOH$)
3. วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่ไม่ผ่านขั้นตอนการย่อยด้วยกรดและด่าง
4. ขี้เลื่อยที่ไม่ผ่านขั้นตอนการย่อย (เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุเหลือทิ้ง)

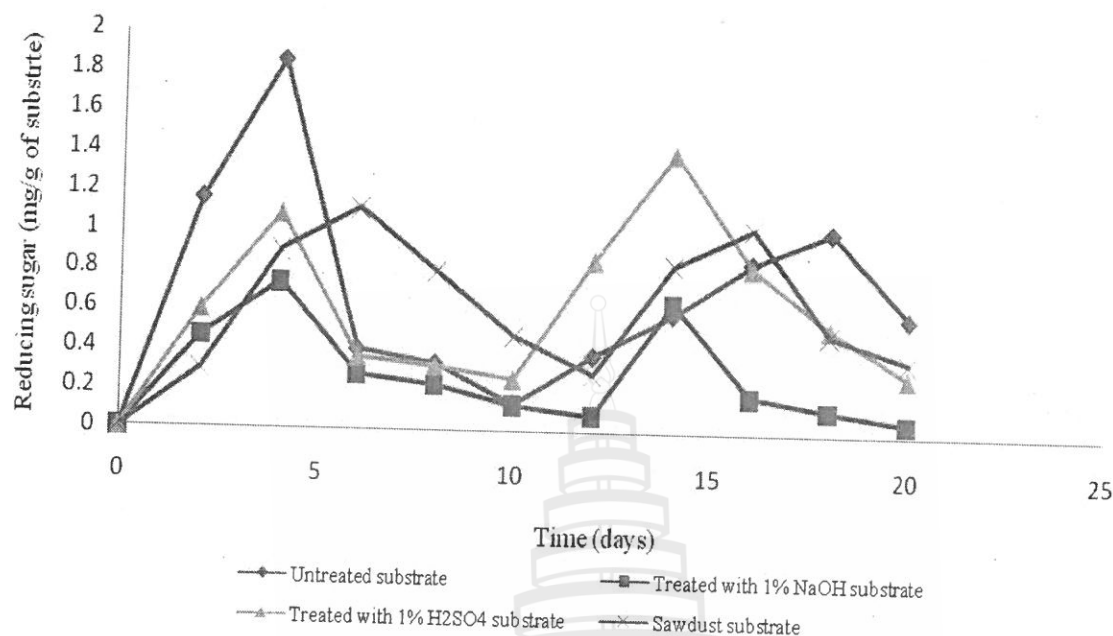
ทำการย่อยวัสดุเหลือทิ้งด้วยวิธีการทางเคมีดังอธิบายข้างต้นโดยวัสดุที่ผ่านการย่อยจะถูกนำมาทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำวัสดุดังกล่าวมาทำการย่อยร่วมกับวิธีการทางชีววิทยาและตรวจสอบปริมาณน้ำตาลที่ได้ โดยในการทดลองเบื้องต้นทางคณะผู้วิจัยได้ใช้ *Laetiporus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราในกลุ่มเห็ดมาใช้ในการทดลอง ทั้งนี้มีการเติมสารอาหารบางอย่างลงไปเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยสับสเตรทได้ในภายหลัง สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย รำข้าว 3%(w/v) น้ำตาลกลูโคส 1%(w/v) ปูนขาว 1%(w/v) โซเดียมซัลเฟต 0.2%(w/v) และปรับความชื้นของอาหารให้ได้ 65.5%(w/v) ทำการเลี้ยงเชื้อที่มีอายุ 7 วันลงในอาหารที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วัน และทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 วันเพื่อตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสับสเตรทที่ถูกย่อยไป โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 2 กรัม ทำการสกัดน้ำตาลโดยการละลายด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักตัวอย่าง:น้ำกลั่น) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellobiase ซึ่งเป็นตัวแทนเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสับสเตรท นอกจากนี้ได้ติดตามการเจริญของเชื้อเห็ดโดยการหาน้ำหนักแห้ง

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ทำโดยใช้ 10 mM cellobiose จำนวน 200 ไมโครลิตรและ 50 mM อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 จำนวน 100 ไมโครลิตรของ และ 200 ไมโครลิตรของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (ส่วนใสหลังการปั่นเหวี่ยง) ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทดสอบค่ากิจกรรมโดยการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS



ภาพที่ 4-5 น้ำหนักแห้งของเชื้อ *Laetiporus* sp. ในระหว่างทำการทดลอง

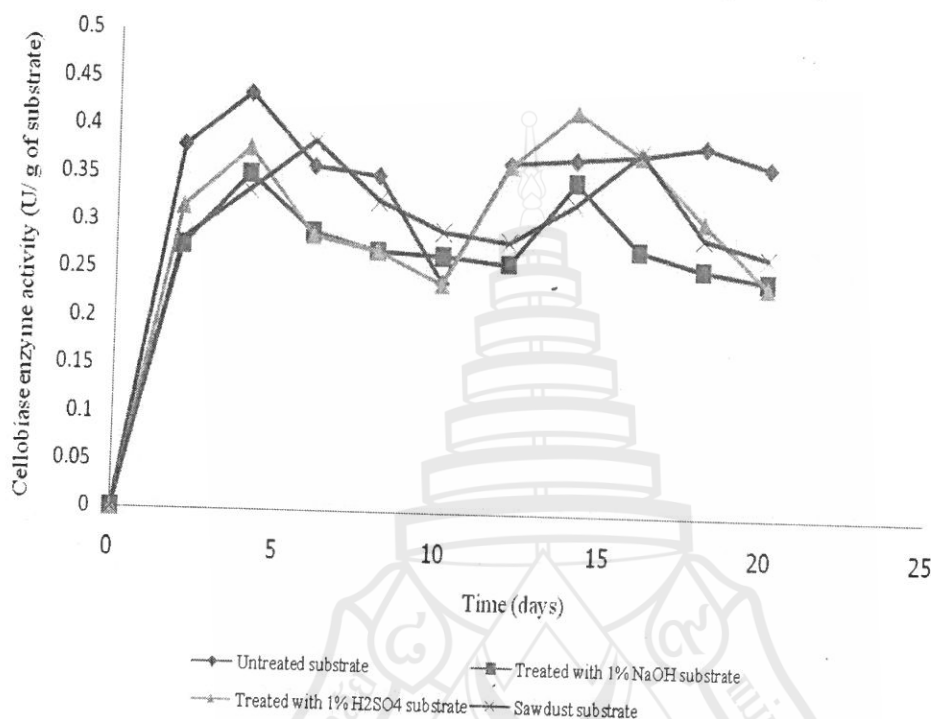
จากการทดลองพบว่าเชื้อมีการเจริญในวัสดุเหลือทิ้งที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยวิธีทางเคมี (Untreated substrate) เร็วกว่าวัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (Treated with 1% H₂SO₄) หรือด่าง (Treated with 1% NaOH) และขี้เลื่อยธรรมชาติ (Sawdust) อย่างชัดเจน โดยอัตราการเจริญในช่วงแรกเพิ่มขึ้นอย่างช้าและมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 12 ของการเลี้ยงและหลังจากนั้นมีการเจริญคงที่ แสดงดังภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4-6 รายละเอียดการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงเวลาของการย่อย

จากกราฟพบว่าการสร้างน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ 2 ระยะ วัสดุทั้ง 4 ชนิดที่นำมาทดลองมีแบบแผนการสร้างน้ำตาลที่คล้ายกันแต่แตกต่างกันที่ปริมาณ โดยระยะแรกมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 1.85, 0.74, 1.08, และ 0.90 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุเหลือทิ้งในวันที่ 4 จากวัสดุเหลือทิ้งที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยวิธีทางเคมี (Untreated substrate) วัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยด่าง (Treated with 1%NaOH) วัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (Treated with 1%H₂SO₄) และขี้เลื่อยธรรมชาติ (Sawdust) ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงและมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อีกครั้งในระยะที่ 2 หลังจากวันที่ 14 โดยมีปริมาณสูงสุด 1.40, 0.60, 0.65, 0.81 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุเหลือทิ้งในวัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยด่าง (Treated with 1%NaOH) วัสดุเหลือทิ้งที่ไม่ผ่านการย่อย (Untreated substrate) วัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (Treated with 1%H₂SO₄) และขี้เลื่อยธรรมชาติ (Sawdust) แสดงดังภาพที่ 4-6 จากผลการทดลองสนับสนุนว่าเชื้อ *Laetiporus* sp. มีความสามารถในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยวิธีการทางเคมีมาก่อน นอกจากนี้พบว่าวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมีความเหมาะสมในการนำมาผลิตมากกว่าขี้เลื่อยธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากขี้เลื่อยธรรมชาติที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยวิธีการเคมีมาก่อนมีโครงสร้างที่ซับซ้อนทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยในหลายๆงานวิจัยซึ่งรายงานว่า การบำบัด (pretreatment) ด้วยกรดและด่างช่วยทำให้เกิดรูพรุนมากขึ้นและทำให้เซลลูโลสในรูปของผลึกถูกทำลายความแข็งแรงลง ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสได้เพิ่มขึ้น (Mosier et al., 2005) โดย Hahn และคณะ (2006) ได้กล่าวว่าการบำบัดด้วยด่างจะช่วยทำให้

โครงสร้างของลิกนินซึ่งเชื่อมอยู่กับเซลลูโลสถูกทำลายลงทำให้เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสสามารถเข้าถึงและทำงานได้ดีมากขึ้น นอกจากนี้มีรายงานในการย่อยต้นข้าวโพดโดยใช้เชื้อ *Trichoderma reesei* ZU-02 และ *Aspergillus niger* ZU-07 หลังจากที่ยำบัตต้นข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริกพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 89.5 กรัมต่อลิตร (Chen *et al.*, 2007)

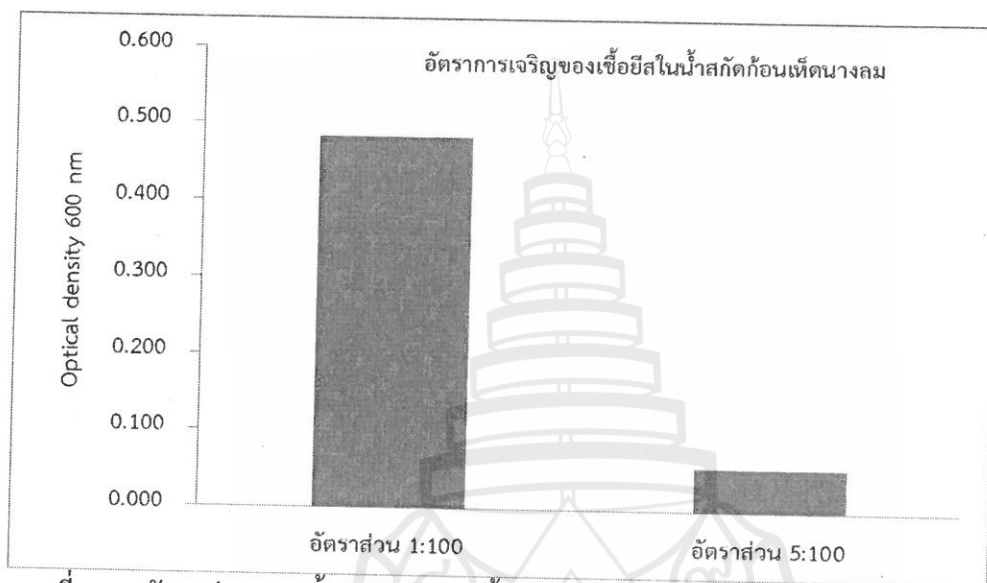


ภาพที่ 4-7 รายละเอียดการสร้างเอนไซม์ cellobiase ในช่วงเวลาของการย่อย

เมื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์ cellobiase พบว่ามีแบบแผนการสร้างที่สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แสดงดังภาพที่ 4-7 กล่าวคือมีการสร้างเอนไซม์เป็น 2 ระยะ โดยวัสดุเหลือทิ้งที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยวิธีทางเคมี (Untreated substrate) มีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์ cellobiase ที่สูงกว่าวัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยต่าง (Treated with 1% NaOH) วัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (Treated with 1% H₂SO₄) และขี้เลื่อยธรรมชาติ (Sawdust) โดยขี้เลื่อยธรรมชาติมีการสร้างเอนไซม์ต่ำสุดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแข็งแรงของโครงสร้างทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปย่อยได้ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตจากวัสดุที่ผ่านการบำบัดด้วยกรด (Treated with 1% H₂SO₄) จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกับวัสดุเหลือทิ้งที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยวิธีทางเคมี (Untreated substrate) และมีค่าสูงกว่าขี้เลื่อยธรรมชาติ (Sawdust) สามารถคาดเดาได้ว่าการบำบัดด้วยกรดก่อนการย่อยวิธีการชีวภาพจะช่วยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมาย่อยด้วยเชื้อ *Laetiporus* sp. นั้นสามารถทำได้โดยตรงโดยไม่ต้องนำวัสดุนี้ไปผ่านการบำบัดด้วย

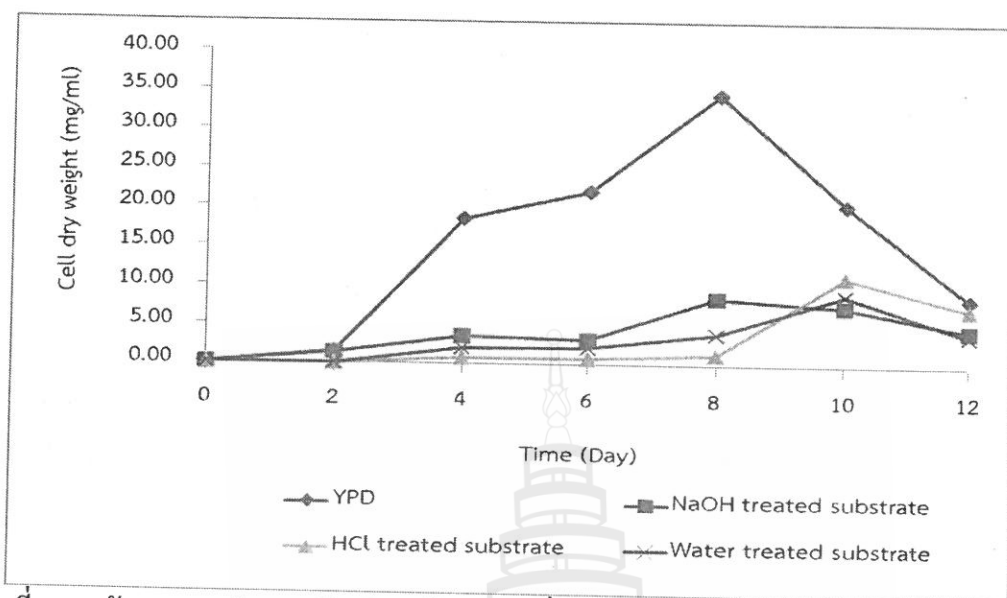
ต่างหรือกรดก่อน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างบางส่วนถูกย่อยมาแล้วในเบื้องต้นในช่วงระยะเวลาการผลิตเห็ด อย่างไรก็ตามผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ยังมีปริมาณที่ต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลตั้งต้นในการใช้ผลิตเอทานอล ทำให้ต้องมีการหาวิธีการผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสมมากกว่านี้เพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์ได้สูงสุด



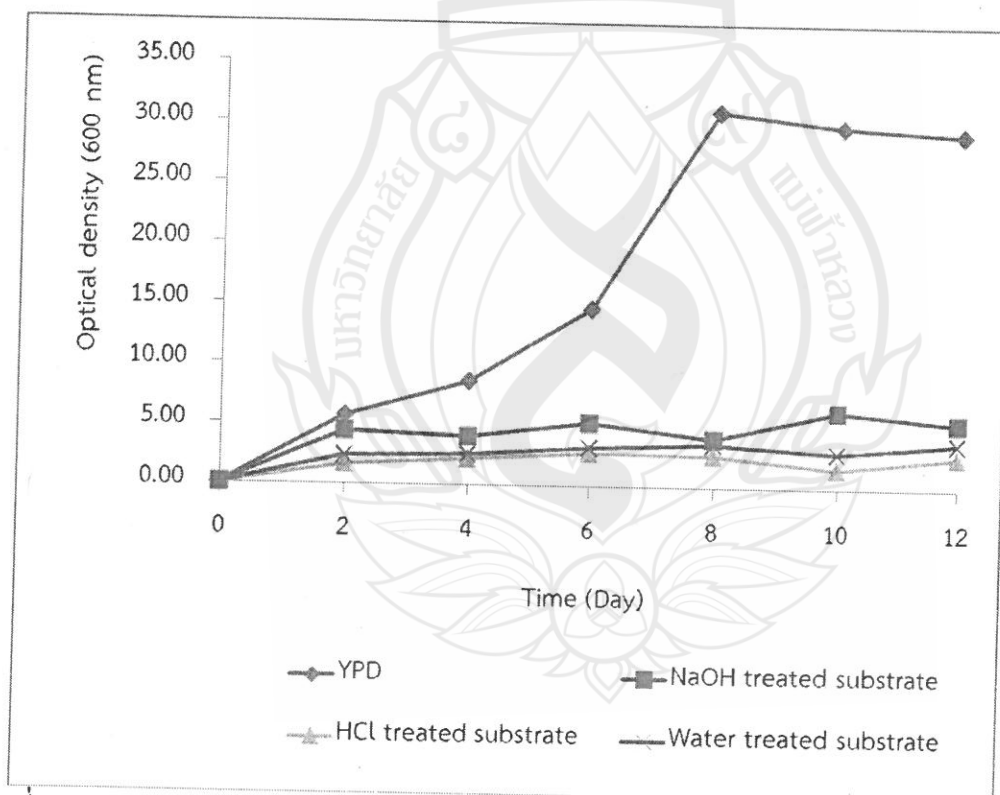
ภาพที่ 4-8 อัตราส่วนของน้ำต่อวัสดุเหลือทิ้งการเจริญของยีสต์หลังการเพาะเลี้ยง 6 วัน

หลังจากศึกษาผลของการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งด้วยวิธีผสมระหว่างวิธีการทางเคมีและชีววิทยา กลุ่มผู้วิจัยได้ลองศึกษาผลของอัตราส่วนของน้ำที่ใช้ในการสกัดวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดโดยเลือกใช้อัตราส่วนน้ำต่อวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่ 1:100 และ 5:100 และนำสารสกัดที่ได้ไปเลี้ยงยีสต์และทำการวัดการเจริญโดยเปรียบเทียบจากค่าความขุ่น (OD_{600}) พบว่าอัตราส่วน 1:100 เหมาะสมต่อการนำไปใช้เนื่องจากยีสต์มีการเจริญที่สูงกว่าแสดงดังภาพที่ 4-8 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้อัตราส่วนที่สูงอาจทำให้มีความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญ เช่น สารกลุ่มฟีนอล และ ลิควิน เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์รวมถึงการเจริญของเชื้อยีสต์ด้วย (Xu et al., 2010, Hasunuma and Kondo, 2012) ผู้วิจัยจึงได้เลือกอัตราส่วน 1:100 เพื่อทำการทดลองต่อไป

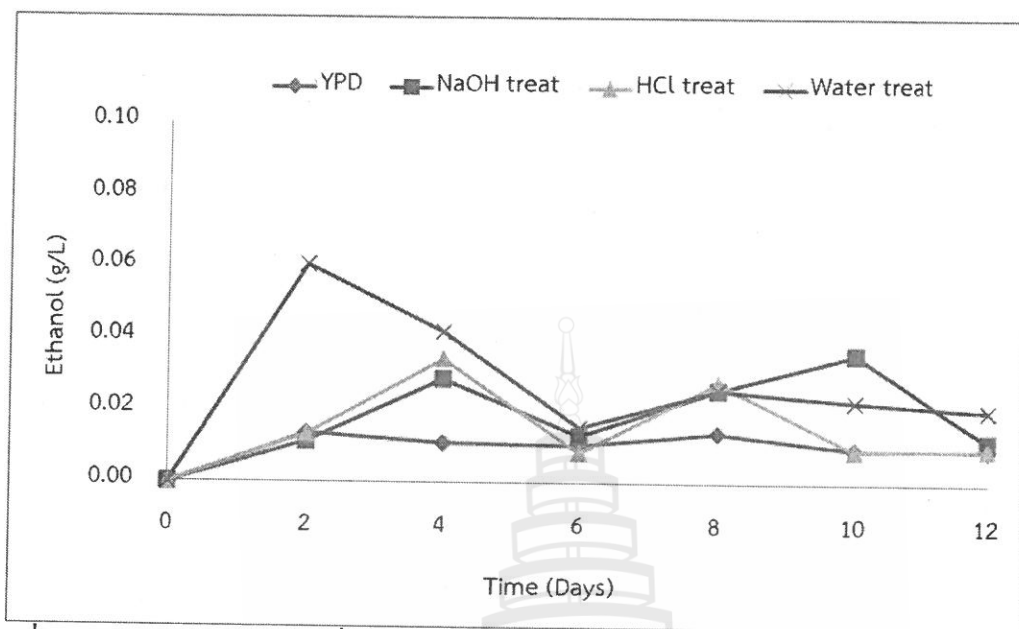
เมื่อผู้วิจัยได้ศึกษาสารสกัดที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดที่ปรับสภาพและไม่ปรับสภาพ เทียบกับอาหาร YPD ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์และใช้โดยทั่วไป โดยทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 12 วันโดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน พบว่ายีสต์มีการเจริญสูงสุดในอาหาร YPD และแตกต่างจากอาหารที่ใช้น้ำสกัดจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดแสดงดังภาพที่ 4-9 และ 4-10 เมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลพบว่าปริมาณการผลิตที่ใกล้เคียงกันในอาหารแต่ละชนิด แสดงดังภาพที่ 4-11



ภาพที่ 4-9 อัตราการเจริญของยีสต์เซลล์ในอาหารที่เตรียมจากน้ำสกัดวัสดุปรับสภาพโดยการวัดน้ำหนักแห้ง

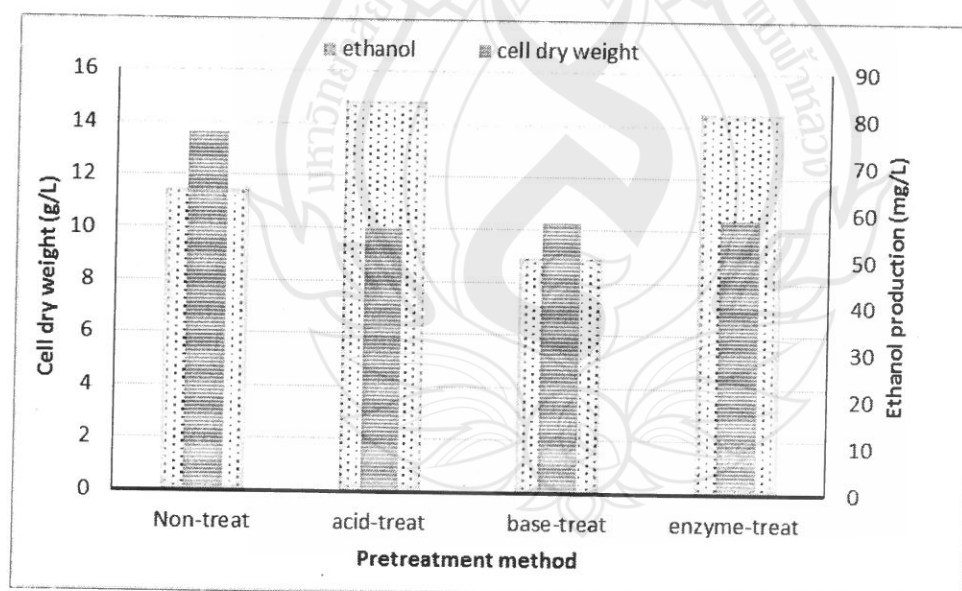


ภาพที่ 4-10 อัตราการเจริญของยีสต์เซลล์ในอาหารที่เตรียมจากน้ำสกัดวัสดุปรับสภาพโดยการวัด OD 600



ภาพที่ 4-11 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด

และเมื่อทำการทดลองย่อยวัสดุเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการผลิตทางการค้า เปรียบเทียบกับการปรับสภาพเบื้องต้นพบว่ายีสต์มีการเจริญและผลิตเอทานอลในแนวโน้มที่ไม่แตกต่างกันแสดงดังภาพที่ 4-12



ภาพที่ 4-12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าเพื่อปรับสภาพวัสดุ

การทดลองผลิตเอทานอลจากอาหารเลี้ยงที่สกัดได้จากก้อนเห็ดเหลือทิ้งโดยใช้เชื้อยีสต์นั้นไม่สามารถนำเชื้อยีสต์ที่นำมาผลิตได้โดยตรงเนื่องจากเชื้อยีสต์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสได้ จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการปรับสภาพเพื่อให้ได้น้ำตาลที่จะนำไปใช้เป็นสาร

ตั้งต้นก่อน ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงต้นทุนและความสะดวกของขั้นตอนการผลิตจึงได้ทดลองใช้เชื้อรา *Rhizopus microspores* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสและผลิตเอทานอลได้มาทดลองใช้ในการผลิตจากอาหารที่สกัดจากก้อนเห็ดเหลือทิ้งที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบมาก่อน จากการทดลองพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ 0.22 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบผลการผลิตกับยีสต์ในอาหารชนิดเดียวกันพบว่าเชื้อ *R. Microspores* มีความเหมาะสมมากกว่าการใช้ยีสต์ อย่างไรก็ตามปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองนี้ยังมีผลผลิตในระดับต่ำและไม่สามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้



บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดลองพบว่าอัตราส่วนของน้ำและวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดในอัตราที่สูงจะทำให้เกิดความเข้มข้นของสารยับยั้งในปริมาณที่สูงและไปยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ วัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดมีแนวโน้มในการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลโดยไม่ต้องมีการปรับสภาพหลายขั้นตอน เนื่องจากในระยะที่เห็ดมีการเจริญเป็นระยะที่เป็นการปรับสภาพวัสดุมาบ้างแล้วซึ่งมีรายงานว่าเห็ดสามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มลิกโนเซลลูโลสในการย่อยลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ทำให้ไม่ต้องทำการปรับสภาพด้วยกรดหรือด่างที่สภาวะรุนแรงแต่จำเป็นต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม กล่าวคือมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายและผลิตเอทานอลได้จากผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายสเตรท อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในระดับการผลิตที่ใหญ่ขึ้นพบว่ายังมีประสิทธิภาพการผลิตที่ต่ำ



เอกสารอ้างอิงหรือบรรณานุกรม

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.2552. “รายงานน้ำมันเชื้อเพลิงของประเทศไทย”. Online.

กรมส่งเสริมการเกษตร. สารกองส่งเสริมพืชสวน. “วิเคราะห์ข้อมูลการผลิตเห็ดในประเทศไทย”. Online.

กรมส่งเสริมการเกษตร. ข้าวส่งเสริมการเกษตร. “เกษตรชาวนาหันมาเพาะเห็ด”. Online.

มัลลิกา บุญมี. 2548. การผลิตเอทานอลในอาหารกลูโคสและไซโลสโดยวิธีการหมักร่วมของจุลินทรีย์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). “พลังงานทดแทน: ไบโอดีเซล (biodiesel)”. ออนไลน์.

Saowapha Surawut, Prasan Sangpaiboon, Winyou Puckdee1, Dueantem Tongphueak, Kanjana Rachsuwan and Wira Srimala. Isolation of Cellulase production fungi in plant genetics conservation project under The Royal Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn Rambhal Barni Rajabhat University. *Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000*: 48-58. (in Thai)

Aminoh Ayae and Suvit Suwanno. Utilization of Lignocellulosic Waste from Paper Cone for Oyster Mushroom Cultivation. School of Environmental Management, Faculty of Environmental Management, Prince of Songkla University.

Chatchanun Niwassawong and Chalerm Ruangwiriya. (2012) Production of Cellulosic Ethanol in Thailand. *KKU Sci. J.* 40(4):1073-1088.

Hasunumaa T., Kondo A. (2012) Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochemistry.* 47:1287-1294.

- Joshi B., Bhatt MR. , Sharma D. , Joshi J. , Malla R. , Sreerama L. (2011) Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. *Biotechnology and Molecular Biology*. 6(8): 172-182.
- Jadhav A.R.*, Girde A.V., More S.M., More S.B. and Saiqua Khan (2013) Cellulase Production by Utilizing Agricultural Wastes. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*. 1(7): 6-9.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M. J., and Strove, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 3713-3729.
- Kamei I., Hirota Y., Mori T., Hirai H., Meguro S., Kondo R. (2012) Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresource Technology*. 112: 137-142.
- Kulanthaivel S., George TS. , Vasanthi NS. , Kannan KP. (2011) Ethanol production from lignocellulosic waste. *World Journal of Science and Technology*. 1(11): 12-16.
- Kaneko S., Mizuno R., Maehara T., Ichinose H. (2012) Consolidated Bioprocessing Ethanol Production by Using a Mushroom. *National Food Research Institute Japan*.1: 191-208.
- Kamei I., Hirota Y., Mori T., Hirai H., Meguro S., Kondo R. (2012) Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresource Technology*. 112:137-142.
- Kumar P., Barrett DM., Delwiche MJ. , Stroeve P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 3713-3729.

- Lee R Lynd., Willem H van Zyl, John E McBride, Laser M. (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 16:577–583.
- Limayema A., Steven C. Ricke. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*. 38: 449 – 467.
- Mabee WE., McFarlane PN , Saddler JN. (2011) Biomass availability for lignocellulosic ethanol production. *Biomass and bioenergy*. 35: 4519 – 4529.
- Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N. and Yanase, H. (2011) Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enz. Microb. Tech.* 48: 273–277.
- Olofsson, K., Palmqvist, B., and Liden, G. Department of Chemical Engineering, Lund University, Sweden. “Improving Simultaneous Sacchrification and Co-fermentation of Pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. Online.
- Oscar JS., Carlos A., Cardona. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99: 5270–5295.
- Ria M., Lars, E., Mohammaud, J.T. (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 294–300.
- Sanchez, C. (2010) Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and Other Edible Mushrooms. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 85:1321–1337.
- Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1–11.
- Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. (2008) Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci*. 9:1621–1651.

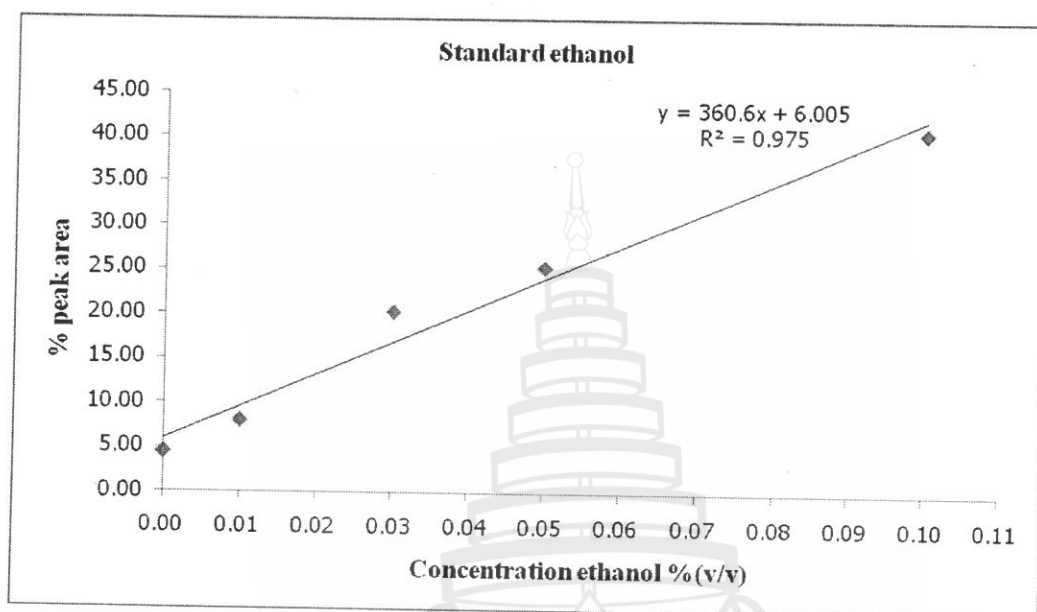
Zu, J. Y., Pan, X., Ronald, S., and Zalesny, Jr. (2010) Pretreatment of Woody Biomass for Biofuel Production: Energy efficiency, Technologies, and Recalcitrance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:847–857.

Xu, Q., Singh, A., and Himmel, M. (2009) Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocelluloses. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:364–371.

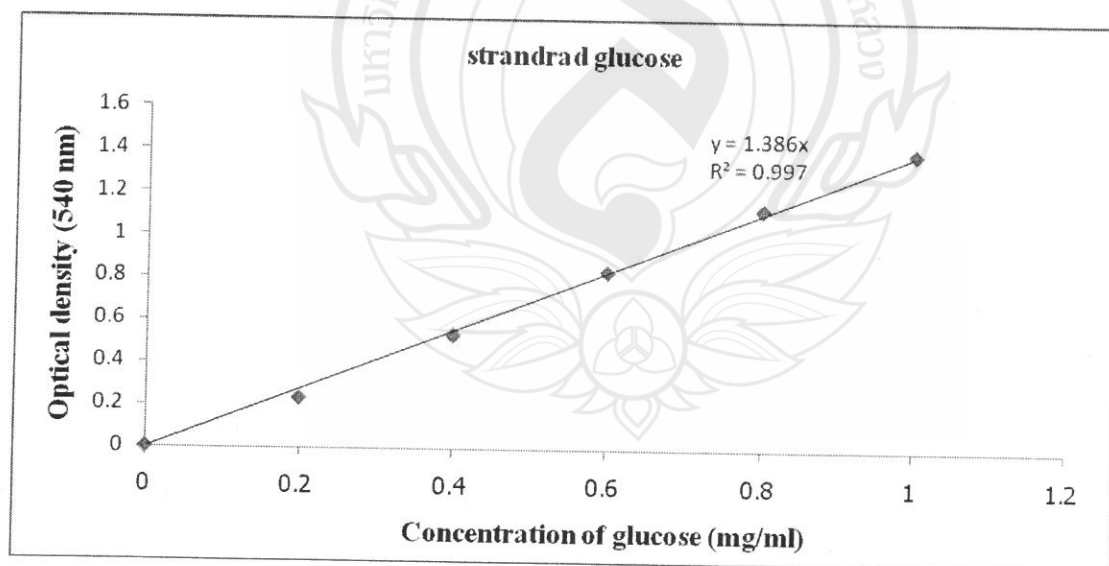
<http://aseancassava.info/bioethanol.asp>



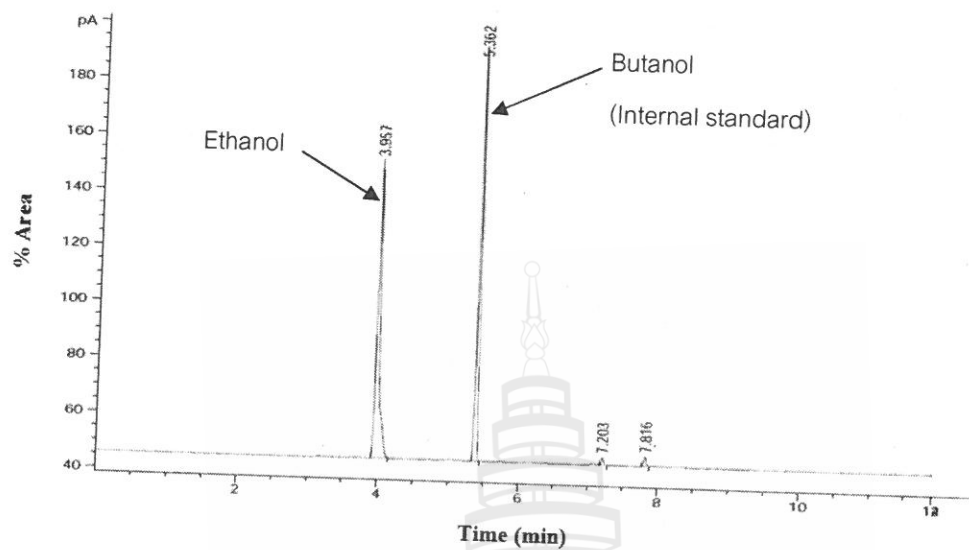
ภาคผนวก



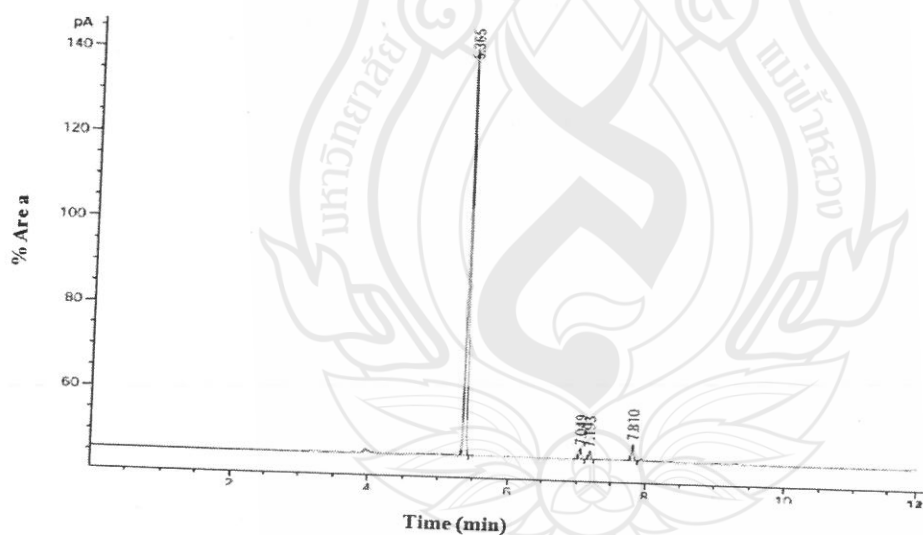
ภาพที่ A-1 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นเอทานอลและพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ GC



ภาพที่ A-2 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



ภาพที่ A-3 GC chromatogram ของสารละลายตัวอย่างที่มีเอทานอล



ภาพที่ A-4 GC chromatogram ของสารละลายตัวอย่างที่ไม่มีเอทานอล

ประวัตินักวิจัย

ผู้วิจัย 1

1. ชื่อ - นามสกุล นางสาวพัฒนา คำกำยาน (Miss Pattana Kakumyan)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

5 5704 90017 xx x

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

333 หมู่ 1 ต. ท่าสุต อ. เมือง จ. เชียงราย 57100

โทรศัพท์ 053-916791 โทรสาร 053-916776

E-mail: pattana.kak@mfu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

	สาขา	ชื่อสถาบัน
ระดับปริญญาตรี	เทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรม	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ระดับปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ระดับปริญญาเอก	Applied Molecular Bioscience	มหาวิทยาลัยยามากุจิ (ญี่ปุ่น)

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา และสาขาวิทยาศาสตร์เคมี

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

List of Publications

- 1). Pattana Kakumyan, Saisamorn Lumyong, and Chartchai Khanongnuch. (2006) Laccase production by *Coriolus versicolor* RC3 using experimental design to evaluate and optimize nutritional requirement. Thai J. Biotechnology. 7(2): 44-47.
- 2). Pattana Kakumyan, Marie Kato, Matika Hajika, and Kenji Matsui (2009) Development of a screening system for the evaluation of soybean volatiles, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 73(8): 1844-1848.

- 3). Pattana Kakumyan and Kenji Matsui (2009) Characterization of volatile compounds in *Astraeus* spp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **73(12)**: 2742–2745.
- 4). Kenji Matsui, Koichi Sugimoto, Pattana Kakumyan, Sergey A. Khorobrykh, and Jun'ichi Mano (2009) Volatile oxylipins and related compounds formed under stress in plants. In *Lipidomics: Volume 2: Methods and Protocols*. Edited by Donald Armstrong, Humana Press, NJ, USA, pp. 17–28.
- 5) Kana Miyamoto, Tomoko Murakami, Pattana Kakumyan, Nancy P. Keller, and Kenji Matsui. 2014. Formation of 1-Octen-3-ol from *Aspergillus flavus* conidia is accelerated after disruption of cells independently of Ppo oxygenase, and is not a main cause of inhibition of germination. *PeerJ*. DOI 10.7717/peerj.395.
- 6) Anan Thawthong, Samantha C. Karunarathana, Naritsada Thongklang, Ekachai Chukeatirote, Pattana Kakumyan, Sunita Chamyuang, Leela Maya Rizal, Peter E. Mortimer, Jianchu Xu, Philippe Callac and Kevin D. Hyde. 2014. Discovering and domesticating wild tropical cultivatable mushrooms. *Chiang Mai J. Sci.*: 41(4)731–764.
- 7) Bandara, A.R., Rapior, S., Bhat, D.J., Kakumyan, P., Chamyuang, S., Xu, J., Hyde, K.D. (2015) *Polyporus umbellatus*, an Edible-Medicinal Cultivated Mushroom with Multiple Developed Health-Care Products as Food, Medicine and Cosmetics: A Review. *Cryptogamie, Mycologie*: **36(1)**: 3–42.
- 8) Asanka R. Bandara, Jie Chen, Samantha Karunarathana, Kevin D. Hyde, Pattana Kakumyan. (2015) *Auricularia thailandica* sp. nov. (*Auriculariaceae*, *Auriculariales*) a widely distributed species from Southeastern Asia. *Phytotaxa*: **208 (2)**: 147–156.

List of presentations (posters)

- 1). Navarat Tongkerd, Thippayapas Sornchai, Amorn Owatworakit, Pattana Kakumyan (2012) Utilization of mushroom waste for sugar production: Poster presentation, The 38th congress on science and technology of Thailand (STT38), pp. 243. October 17–19th, 2012. Empress Convention Centre Chiang Mai, Thailand
- 2). Pattana Kakumyan, Kevin D Hyde, Jean Michel Sivoie. Lignocellulosic enzymes production during the development stages of *Agaricus subrufescens*: Poster presentation, the

- 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, pp. 113. November 29–30th, 2012. Sunee Grand Hotel and Convention Centre Ubon Ratchathani, Thailand
- 3) Pattana Kakumyan, Kanokwan Theerawut, Khuansuda Lahib, Amorn Owatworakit and Kevin D. Hyde. Screening of direct ethanol producing fungi for consolidated bioprocessing. Poster presentation, International Conference on Fungal Biodiversity and Biotechnology, pp 29. January 10–12th, 2014. Mae Fah Luang University, Thailand.
- 4). Pattana Kakumyan, Putarak Chomnunti, Nakarin Suwannarach, Saisamorn Lumyong, Nyambura Cynthia Mugo, and Kenji Matsui. Diversity and bioactive compounds of fungal endophytes in tropical local herbs of Northern Thailand. Poster presentation, The 1st Joint Seminar New Core to Core program A. Advanced Research Networks on “Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas (world-class research hub of tropical microbial resources and their utilization)” pp 82. August 10–11th, 2014. Centara Grand and Bangkok Convention Center, Central World, Bangkok Thailand.
- 5) Pattana Kakumyan, Anuphon Kaewmaneeewat, Amorn Owatworakit. Optimization of ethanol production from glucose and mushroom waste sub-strate by *Rhizopus microspores*. Poster presentation, The 26th annual meeting of the Thai society for biotechnology and international conference. Pp 228. 26–29th November, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.
- 6) Anan Thawthong, Samantha Chandranath Karunarathna, Sunita Chamyuang, Pattana Kakumyan, Ekachai Chukeatirote, Kevin D. Hyde. Biodiversity of macrofungi at Doi Mae Salong Chiang Rai, Thailand. The 26th annual meeting of the Thai society for biotechnology and international conference. Pp 176. 26–29th November, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

List of presentations (proceeding)

- 1) Kritsana Jatuwong, Pattana Kakumyan, Sunita Chamyuang, Ekachai Chukeatirote, Kevin D. Hyde. Optimization condition for cultivation of *Agaricus subrufescens* hybrid strains. Poster presentation (**proceeding**), The 26th annual meeting of the Thai society for

biotechnology and international conference. pp182. 26-29th November, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

2) Leela Maya Rizal, Kevin D. Hyde, Ekachai Chukeatirote, Pattana Kakumyan, Sunita Chamyuang. Optimization mycelial conditions and spawn production for the domestication of *Macrolepiota deters*. Poster presentation (*proceeding*), The 26th annual meeting of the Thai society for biotechnology and international conference. pp182. 26-29th November, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.



ABSTRACTS

38th



CONGRESS ON SCIENCE
AND TECHNOLOGY
OF THAILAND



**The 38th CONGRESS ON SCIENCE
AND TECHNOLOGY OF THAILAND (STT 38)**

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38)

**SCIENCE for the FUTURE
of MANKIND**

วิทยาศาสตร์เพื่ออนาคตของมวลมนุษยชาติ

October 17-19, 2012

Empress Convention Centre
Chiang Mai, Thailand

17-19 ตุลาคม 2555

ณ ศูนย์ประชุมอเนกชาติเอ็มเพรส
จังหวัดเชียงใหม่

Organized by:

The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King in association with
the Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

www.scisoc.or.th/stt38

สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

THE SCIENCE SOCIETY OF THAILAND UNDER THE PATRONAGE OF HIS MAJESTY THE KING

สำนักงาน : คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ ๑๐๒๒๐ โทร. ๐-๒๒๑๘๔๕๒๕๕, ๐-๒๒๕๒-๗๙๘๗ แฟกซ์ ๐-๒๒๕๒-๗๙๘๗
Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Tel. 0-2218-5245, 0-2252-7987 Fax : 0-2252-7987
E-mail : scisoc.thailand@gmail.com Homepage : <http://www.scisoc.or.th>

ประกาศสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

ครั้งที่ 11 / 2555

เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการดำเนินงานของการประชุมวิชาการ

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38)

เพื่อให้การดำเนินงานตามคณะกรรมการดำเนินงานของการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38) เป็นไปด้วยความเรียบร้อย และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น สมาคมวิทยาศาสตร์ฯ จึงขอแต่งตั้งคณะกรรมการดำเนินงานของการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38) ดังนี้

กรรมการดำเนินงาน

1. อธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่	สวัสดีวัฒน์	ที่ปรึกษา
2. ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชัยอนุสร	हारहणगव	ที่ปรึกษา
3. ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์	लललललललललललल	ที่ปรึกษา
4. รองศาสตราจารย์ ดร. สัมพันธ์	लललललललललललल	ที่ปรึกษา
5. รองศาสตราจารย์ ดร. ธารารัตน์	लललललललललललल	ประธานกรรมการ
6. รองศาสตราจารย์ ดร. ชีรยุทธ	लललललललललललल	รองประธานกรรมการ
7. รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร	लललललललललललल	กรรมการ
8. รองศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา	लललललललललललल	กรรมการ
9. รองศาสตราจารย์ ดร. เลอลักษณ์	लललललललललललल	กรรมการ
10. คณบดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี / หรือผู้แทน	लललललललललललल	กรรมการ
11. นางฤดีมล	लललललललललललल	กรรมการและเลขานุการ
12. นางสาวศิริรัตน์	लललललललललललल	กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ
13. นายวิสุทธิ์	लललललललललललल	กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ
14. นางสาวรัชดา	लललललललललललल	กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ

ทั้งนี้ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 24 เมษายน 2555

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

นายกสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ในพระบรมราชูปถัมภ์



สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

THE SCIENCE SOCIETY OF THAILAND UNDER THE PATRONAGE OF HIS MAJESTY THE KING

สำนักงาน : คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ ๑๐๒๒๐ โทร. ๐-๒๒๑๘๕๒๕๕, ๐-๒๒๕๒-๗๙๘๗ แฟกซ์ ๐-๒๒๕๒-๗๙๘๗
Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Tel. 0-2218-5245, 0-2252-7987 Fax : 0-2252-7987
E-mail : scisoc.thailand@gmail.com Homepage : <http://www.scisoc.or.th>

ประกาศสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

ครั้งที่ 13 / 2555

เรื่อง แต่งตั้งรายชื่อคณะกรรมการฝ่ายวิชาการของการประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38)

เพื่อให้การดำเนินงานตามคณะกรรมการฝ่ายวิชาการของการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38) เป็นไปด้วยความเรียบร้อย และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น สมาคมวิทยาศาสตร์ฯ จึงขอแต่งตั้ง
คณะกรรมการฝ่ายวิชาการของการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38) ดังนี้

1. รศ.ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ

ประธานกรรมการ

2. รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

รองประธานฝ่ายวิชาการ

สาขา A: MATH, IT & STATISTICS

1. ศ.ดร.สุเทพ สอนไค้

ประธานสาขา

2. ศ.ดร.เบญจวรรณ วิวัฒน์ปฐพี

ประธานร่วมสาขา

สาขา B: PHYSICS & APPLIED PHYSICS

1. ศ.ดร.สุทัศน์ ยกส้าน

ประธานสาขา

2. ผศ.ดร.บุญโชติ เผ่าสวัสดิ์ชัยรียง

ประธานร่วมสาขา

3. รศ.ดร.สมศรี ถึงขรัตน์

ประธานร่วมสาขา

สาขา C1: ANALYTICAL CHEMISTRY

1. รศ.ดร.อรรพณ ชัยกลางกุล

ประธานสาขา

2. รศ.ดร.จรรยา จักรมณี

ประธานร่วมสาขา

สาขา C2: INORGANIC CHEMISTRY

1. ศ.ดร.ธวัชชัย คันทุลานี

ประธานสาขา

2. อ.ดร.ประพุทธิ์ ถาวรยุคการต์

ประธานร่วมสาขา

สาขา C3: ORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY

1. ศ.ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล

ประธานสาขา

2. อ.ดร.พูนพันธ์ มีเผ่าพันธ์

ประธานร่วมสาขา

3. อ.ดร.ขวัญฤทัย ธาตุเพชร

ประธานร่วมสาขา

สาขา C4: PHYSICAL & THEORETICAL CHEMISTRY

1. ศ.ดร.กฤษณะ สาคกริก

ประธานสาขา

2. ผศ.ดร.ปิยรัตน์ นิยมานพิภักดิ์

ประธานร่วมสาขา

สาขา D: Materials Science

1. ผศ.ดร.รัตติกกร อัมมรินทร์

ประธานสาขา

2. รศ.ดร.สุพล อนันดา

ประธานร่วมสาขา

สาขา E: Polymers

1. ผศ.ดร.ทวีชัย อมรศักดิ์ชัย

ประธานสาขา

2. ผศ.ดร.วินิตา บุญ ไชยม

ประธานร่วมสาขา

สาขา F: NANOSCIENCE & NANOTECHNOLOGY

1. รศ.ดร.พิสิษฐ์ สิงห์ใจ

ประธานสาขา

2. ผศ.ดร.สุภาพ ชูพันธ์

ประธานร่วมสาขา

สาขา G: BIOMEDICAL SCIENCE

1. ศ.ดร.วัชร กสิณฤกษ์

ประธานสาขา

2. ผศ.ดร.ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว

ประธานร่วมสาขา

สาขา H: BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

1. รศ.ดร.ฤดี สุราฤทธิ์

ประธานสาขา

2. ผศ.ดร.หทัยชนก เนียมทรัพย์

ประธานร่วมสาขา

สาขา I: BIOLOGY & BIODIVERSITY

1. รศ.ดร.นริทธิ์ สิตะสุวรรณ

ประธานสาขา

2. รศ.ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

ประธานร่วมสาขา

สาขา J: BOTANY & PLANT SCIENCE

1. ผศ.ดร.จันทน์ อุทัยบุตร

ประธานสาขา

2. ผศ.ดร.ประสิทธิ์ วัฒนพัฒน์วงศ์

ประธานร่วมสาขา

สาขา K: AGRICULTURAL & FOOD SCIENCES

1. รศ.ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ

ประธานสาขา

2. ศ.ดร.สัญญาชัย จตุรสีธา

ประธานร่วมสาขา

3. ผศ.ดร.นพพล เล็กสวัสดิ์

ประธานร่วมสาขา

สาขา L: ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY

- | | |
|---------------------------------|----------------|
| 1. ผศ.ดร.สมพร จันทระ | ประธานสาขา |
| 2. รศ.ดร.ประศักดิ์ ถาวรยติการต์ | ประธานร่วมสาขา |
| 3. อ.ดร.พิษญา มังกรอัสกุล | ประธานร่วมสาขา |

สาขา M: EARTH SCIENCE

- | | |
|--------------------------|----------------|
| 1. รศ.ดร.ปัญญา จารุศิริ | ประธานสาขา |
| 2. รศ.ดร.พิษณุ วงศ์พรชัย | ประธานร่วมสาขา |

สาขา N: SCIENCE EDUCATION & COMMUNICATION

- | | |
|-----------------------------------|----------------|
| 1. ผศ.ดร.บุญโชติ เผ่าสวัสดิ์ขรรค์ | ประธานสาขา |
| 2. อ.ดร.พรรัตน์ วัฒนกลีวิช | ประธานร่วมสาขา |

สาขา O: FORENSIC SCIENCE

- | | |
|-------------------------|----------------|
| 1. พตอ.นพคุณ กิรีการกุล | ประธานสาขา |
| 2. ศ.นพ.ธำนิษฐ์ ภูพัฒน์ | ประธานร่วมสาขา |

ให้กรรมการชุดนี้มีหน้าที่ดำเนินงานด้านวิชาการของการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38) การเชิญวิทยากรพิเศษในการปาฐกถาเปิดงานและปาฐกถาพิเศษ การจัดการบรรยาย การอภิปราย การพิจารณาและตรวจแก้ผลงานที่นำเสนอ การวิเคราะห์ผลงาน การจัดทำเอกสารและข้อมูลทางวิชาการ และการร่วมกับเจ้าภาพร่วมในการจัดทำวีดิทัศน์ในพิธีเปิด ตลอดจนการวิเคราะห์ผลการดำเนินงานเมื่อเสร็จสิ้น วทท 38

ทั้งนี้ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 15 พฤษภาคม 2555


(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)
นายกสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
ในพระบรมราชูปถัมภ์



เพื่อ
ไทย ครั้งที่ 38 (ว
วิชาการของการ

สาขา

สาขา

³Center of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

*e-mail: sirawut@biotec.or.th

Abstract: Identification and characterization of proteins functionally involved in reproductive development and maturation is necessary for understanding molecular mechanisms of ovarian development in the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In this study, proteins in different ages (10, 14 and 18 months old) of domesticated shrimp and wild broodstock ($N = 3$ for each group) were characterized by proteomic analysis. Total ovarian proteins of each shrimp were extracted and size-fractionated in 12.5% SDS-PAGE. The electrophoresed proteins were excised from the gel, digested with trypsin and sequenced with nanoESI-LC-MS/MS. Several thousands of examined proteins matched proteins in the database and several reproduction-related proteins, for example, protein kinase C (PKC), 14-3-3 like protein, nuclear pore protein and Ran GTPase-activating protein 1, were found. RACE-PCR was further carried out for isolation of the full-length cDNA of PKC in *P. monodon*. *PmPKC* was 3404 bp in length containing an open reading frame (ORF) of 2235 bp corresponding to a polypeptide of 744 amino acid. The deduced *PmPKC* protein contained a protein kinase C conserved region (C1) and C2 (cysteine-rich) domain, and Serine/Threonine protein kinase catalytic domain at positions XXX, XXX and XXX, respectively. Quantitative real-time PCR indicated that the *PmPKC* mRNA were down-regulated at stage II (vitellogenic) ovaries in both intact and eyestalk-ablated broodstock of wild *P. monodon* ($P < 0.05$). The information suggests the possible important role of *PmPKC* gene/protein during vitellogenesis in *P. monodon*.

H_H0053: CLONING AND EXPRESSION OF A LIPASE GENE (*LIP12*) FROM *Staphylococcus pasteurii*

Supatra Areekit,¹ Arda Pakpitcharoen,² Paisarn Khawsak,² Sirirat Wachiralurpan,² Hathaitip Suksodsai,² Kosum Chansiri^{2,*}

¹Innovative Learning Center, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Thailand.

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Thailand.

*e-mail: kosum@swu.ac.th

Abstract: *Staphylococcus pasteurii* containing a novel extracellular lipase gene (*Lip12*) was isolated from palm oil-contaminated soil. Upon DNA sequence analysis, *Lip12* comprised an open reading frame of 2,136 nucleotides encoding for a pre-proenzyme of 712 amino acids (approximately 330 amino acids of signaling sequences and 390 amino acids of mature enzyme). According to the nucleotide comparison, *Lip12* showed 99 % similarity to *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri*. Referring to the nucleotide sequence data, 966 bp of signaling sequences and the 1170 bp of complete mature part of the *Lip12* (named *mLip12*) was expressed by cloning into pET 100/D TOPO encompassing the N-terminal His-tag. The recombinant DNAs were transformed in *E. coli* BL21 competent cells. The white colonies were selected, and their DNAs were purified prior to DNA sequencing. The data revealed that the inserted *mLip12* gene contained 1,173 nucleotides corresponding to 390 deduced amino acids. Regarding to gene expression, the *mLip12* generated the enzyme with the molecular weight of approximately 43.59 kDa. The characterization of *mLip12* enzyme was under investigation.

H_H0054: UTILIZATION OF MUSHROOM WASTE FOR SUGAR PRODUCTION

Navarat Tongkerd, Thippayapas Sornchai, Amorn Owatworakit, Pattana Kakumyan*

School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, 57100, Thailand

*e-mail: p. kakumyan@sci.mfu.ac.th

Abstract: Mushroom waste is an alternative lignocellulosic biomass which is been considered as a fermentable substrate in bioethanol production. In this work, waste Khon mushroom (*Lentinus squarrosulus*) medium was studied to evaluate in reducing sugars profile, cell growth and cellulose hydrolyzing enzyme activity cultured with white rot fungi (*Laetiporus* sp.) under solid condition for 2 weeks. Here, the sugar yield of the waste mushroom medium was higher than 2-fold that of raw mushroom medium (control) and the culture of pretreatment with alkaline and acid condition at day 4th. Consistently, the level of glucose (1.85 mg/g substrate), cellobiase activity (0.434 Unit/g of substrate) and cell dry weight (0.08 g/g substrate) were also highly produced. This indicated that the waste Khon mushroom medium can be used as substrate for fermentation. Next, the hydrolyzing sugars will be used to study on bioethanol production.

H_H0055: OPTIMIZATION FOR POLYHYDROXYALKANOATE PRODUCTION FROM SUGAR CANE INDUSTRY PRODUCTS BY *Azohydromonas lata*

Nicharee Wisuthiphaet,¹ Suchada Chanprateep-Napathorn^{1,2,*}

¹Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

*e-mail: suchada.cha@chula.ac.th

Abstract: The aim of this study was to enhance polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Azohydromonas lata* from sugar cane industry products. In this study, the carbon sources were refine sugar, raw sugar, sugar cane juice, syrup and molasses. The optimal concentration of carbon source and the optimal ratio between carbon and nitrogen (mol/mol) were investigated in details. Preliminary studies were performed using raw sugar or refined sugar as a sole carbon source. The results showed that when the concentration of refine sugar was 30 g/L and C/N was 200, the highest PHA productivity (0.066 g-PHA/L/h) was obtained. Next, in order to reduce the cost of production, sugar cane juice, syrup, and molasses were studied as alternative carbon source. In this case, the total amount of sucrose presented in sugar cane juice, syrup, or molasses was set at 30 g/L and C/N was set at 200. It was found that the highest PHAs productivity was obtained with syrup (0.0177 g-PHA/L/h), followed by sugar cane juice (0.016 g-PHA/L/h) and molasses (0.009 g-PHA/L/h), respectively. Therefore syrup and refine sugar were chosen for optimization of PHAs production in 5L bioreactor. The results indicated that productivity of PHAs in bioreactor can be increased up to 60-70% of dry cell weight.

H_H0056: CHEMICAL COMPOSITIONS OF *Michelia champaca* FRESH PETAL AND ANTHR EXTRACTS

Sirinthip Kedsana, Siam Popluechai, Patcharee Pripdeevech*

School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand

*e-mail: p.pripdeevech@sci.mfu.ac.th

Abstract: The objective of this work was to study of chemical compositions of the fresh petal and anther of *Michelia champaca* flowers extracted by using dichloromethane solvent. The obtained extracts were analyzed their volatile constituents by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Sixty-five components were detected in the petal extract. Germacrene D, β -elemene, agarospirol, β -pinene, 1,8-cineole and germacrene A were found to be the major components. Forty-eight volatiles were identified in the extract of *M. champaca* anther which was dominated by methyl linoleate, E-coniferyl alcohol, trans-linalool oxide (pyranoid), cis-linalool oxide (pyranoid), linalool and indole, respectively. The different contents of components detected affected on the individual scent of both extracts.

H_H0057: SCREENING OF ETHANOL-SENSITIVE MUTANTS IN THE YEAST

Kluyveromyces marxianus

Patcharaporn Summat, Treerawat Pimpakun, Sanom Nonklang*



UTILIZATION OF MUSHROOM WASTE FOR SUGAR PRODUCTION

Navarat Tongkerd¹, Thippayapas Sornchai¹, Amorn Owatworakit¹ and Pattana Kakumyan^{1,*}

¹ School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, 57100, Thailand

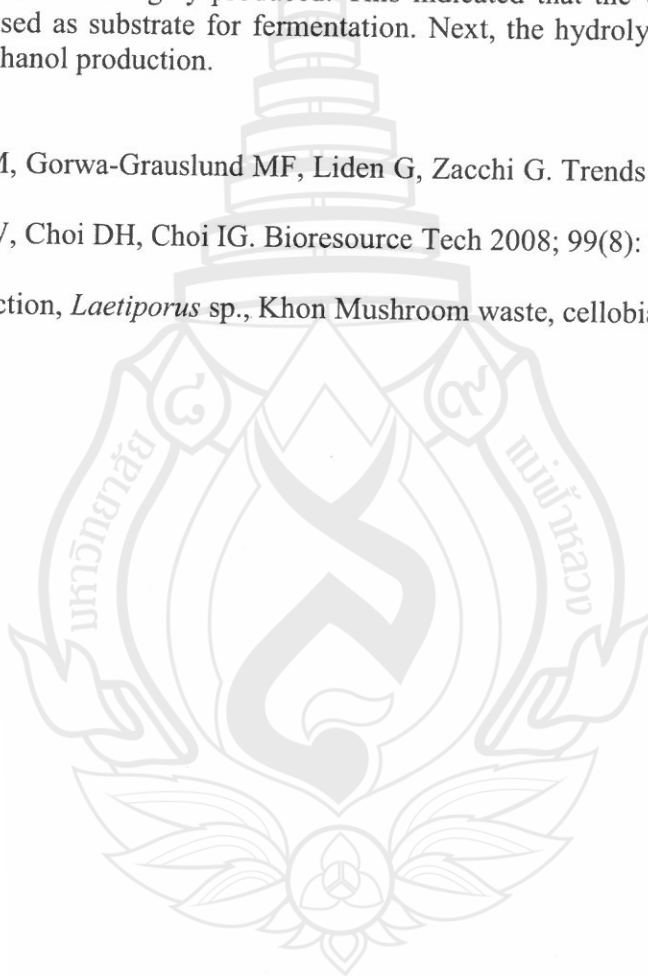
*e-mail: p. kakumyan@sci.mfu.ac.th

Abstract: Mushroom waste is an alternative lignocellulosic biomass which is been considered as a fermentable substrate in bioethanol production. In this work, waste Khon mushroom (*Lentinus squarrosulus*) medium was studied to evaluate in reducing sugars profile, cell growth and cellulose hydrolyzing enzyme activity cultured with white rot fungi (*Laetiporus* sp.) under solid condition for 2 weeks. Here, the sugar yield of the waste mushroom medium was higher than 2-fold that of raw mushroom medium (control) and the culture of pretreatment with alkaline and acid condition at day 4th. Consistently, the level of glucose (1.85 mg/g substrate), cellobiase activity (0.434 Unit/g of substrate) and cell dry weight (0.08 g/g substrate) were also highly produced. This indicated that the waste Khon mushroom medium can be used as substrate for fermentation. Next, the hydrolyzing sugars will be used to study on bioethanol production.

References:

1. Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Liden G, Zacchi G. Trends Biotechnol 2006;24: 549-56.
2. Lee JW, Koo BW, Choi JW, Choi DH, Choi IG. Bioresource Tech 2008; 99(8): 2736-41.

Keywords: bioethanol production, *Laetiporus* sp., Khon Mushroom waste, cellobiase





UTILIZATION OF MUSHROOM WASTE FOR SUGAR PRODUCTION

Navarat Tongkerd¹, Thippayapas Sornchai¹, Amorn Owatworakit¹ and Pattana Kakumyan^{1*}

¹ School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, 57100, Thailand

*E-mail; p. kakumyan@sci.mfu.ac.th

ABSTRACT

Mushroom waste is an alternative lignocellulosic biomass which is been considered as a fermentable substrate in bioethanol production. In this work, waste Khon mushroom (*Lentinus squarrosulus*) medium was studied to evaluate in reducing sugars profile, cell growth and cellulose hydrolyzing enzyme activity cultured with white rot fungi (*Laetiporus* sp.) under solid condition for 2 weeks. Here, the sugar yield of the waste mushroom medium was higher than 2-fold that of raw mushroom medium (control) and the culture of pretreatment with alkaline and acid condition at day 4th. Consistently, the level of glucose (1.85 mg/g substrate), cellobiase activity (0.434 Unit/g of substrate) and cell dry weight (0.08 g/g substrate) were also highly produced. This indicated that the waste Khon mushroom medium can be used as substrate for fermentation. Next, the hydrolyzing sugars will be used to study on bioethanol production.

Keywords: bioethanol production, *Laetiporus* sp., Khon Mushroom waste, cellobiase.

INTRODUCTION

Lignocellulose is the major component of biomass which derived from agricultural waste. The most component of lignocellulose is cellulose and it can be converted into glucose. This studying is the analysis of sugar profile, cell growth and cellobiase enzyme cultured white rot fungi in waste Khon mushroom medium.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

The *Laetiporus* sp. was obtained from Prof. Dr. Hyde at Mae Fah Laung University. Fungal stain was kept at 4 °C as stock, freshly subcultured on PDA and incubated at 30 °C for a week before being used in the experiments.

Preparation of Mushroom wastes

Mushroom wastes were sterilized at 121°C for 15 minute. Wastes were separated in to three groups including non-treated, acid treated (1% H_2SO_4) and alkali treated (1% NaOH) for 24 hr. It was filtrated, adjusted pH at 5.5 and dried 60°C for 48 hr.

Culture Condition

The cultures were incubated at 30°C for 28 days. The sample were collected every 2 days.

Determination of Reducing Sugar by DNS method

Culture supernatant was pipetted 0.5 ml, added 1.5 ml of DNS reagent, well mixed and boiled for 5 min then cooled on ice. Solutions were added 2 ml of distilled water and mixed before measured the optical density at 540 nm using spectrophotometer.

Determination of Cellobiase Activity

The enzyme activity was assayed at 30°C in reaction mixtures containing in 500 μ l: 200 μ l of 10 mM cellobiase, 100 μ l of 50mM acetate buffer pH 5.0 and 200 μ l enzyme solution. Then the reaction was measured by DNS method.

RESULTS AND DISCUSSION

The results showed that untreated mushroom waste is likely to be used as substrate because day 4th it gave higher level of glucose at (1.85mg/gram of substrate) in Figure1. and cellulose activity (0.434 Unit/g of substrate) showed in Figure2. Cell dry weight 0.08 g/g substrate (data not show.)

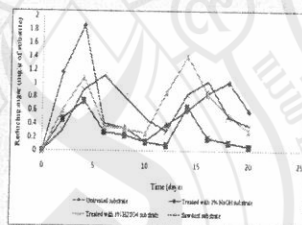


Figure1. Total reducing sugars from Khon mushroom waste substrates.

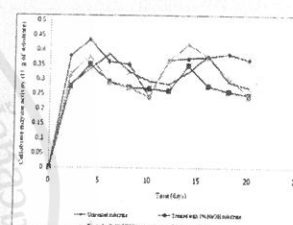


Figure2. Cellobiase enzyme activity profile after inoculated with fungal

The performance of enzymatic reaction of *Laetiporus* sp. to hydrolyze and reach the cellulose. This suggesting that fungus *Laetiporus* sp. works well on untreated waste.

CONCLUSION

Khon mushroom waste can be used as substrate for bioethanol production. After inoculation with white rot fungi *Laetiporus* sp., the results showed that Khon mushroom waste is good substrate for this fungal strain due to high reducing sugar, cellulose hydrolyzing enzyme and high yield of dry weight.

REFERENCES

- 1.Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Liden G, Zacchi G. Trends Biotechnol 2006;24: 549-56.
2. Lee JW, Koo BW, Choi JW, Choi DH, Choi IG. Bioresource Tech 2008; 99(8): 2736-41