แนวโน้มของการใช้เส้นใยมันสำปะหลังเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเอทานอลเป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักเอทานอล

นางสาวภณิดา นิ่มศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

TREND OF USING CASSAVA FIBER WASTE FROM ETHANOL INDUSTRY AS RAW MATERIAL FOR ETHANOL FERMENTATION

Miss Panida Nimsuksa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	แนวโน้มของการใช้เส้นใยมันสำปะหลังเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเอทานอล เป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักเอทานอล
โดย	นางสาวภณิดา นิ่มศึกษา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

ภณิดา นิ่มศึกษา : แนวโน้มของการใช้เส้นใยมันสำปะหลังเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเอทานอลเป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักเอทานอล (TREND OF USING CASSAVA ROOT FIBER WASTE FROM ETHANOL INDUSTRY AS RAW MATERIAL FOR ETHANOL FERMENTATION)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, 65 หน้า

การศึกษาศักยภาพของเส้นใยมันสำปะหลัง หลังกระบวนการผลิตเอทานอล จากหัวมันสำปะหลังในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล ทั้งนี้เพราะมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสูงถึง 39.8%(w/w) น้ำหนักแห้งและมีขนาดอนุภาคเหมาะสม (20-40 เมส) พบว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางถูกย่อยด้วยเซลลูเลสเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดีกว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางคือ แขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯ 10%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 4%(w/v)ให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 45 นาที เมื่อนำมาย่อยด้วยเซลลูเลส (Accellerase^{TM}1500)1.17หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ที่ 50 °ซ นาน 6 ชั่วโมง ได้น้ำตาลกลูโคส 0.10 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง การเพิ่มเซลลูเลสที่ใช้เป็น11.68 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น 0.13 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จะสูงสุด (0.15 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) เมื่อย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางขณะแขวนลอยในพรีทรีตเมนต์ไฮโดรไลเซต (pretreatment hydrolysate) และเพิ่มเซลลูเลสที่ใช้เป็น 16.35 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ผลศึกษาปัจจัยคือเวลาการปลูกเชื้อ(inoculate)หลังการเติมเซลลูเลส ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิการบ่ม แบบหลายปัจจัยร่วมใช้ (Factorial Design)ต่อการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางแบบSimultaneous Saccharification and Fermentation โดยย่อยด้วยเซลลูเลส 2,800 ไมโครลิตร/กรัมน้ำหนักแห้ง และหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ระยะการเจริญ mid log phase ปริมาณ 10%(v/v) พบว่าได้เอทานอลสูงสุด (2.72 กรัม/ลิตร หรือ 0.027 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) เมื่อปลูกเชื้อทันทีหลังการเติมเซลลูเลส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิการหมัก 40°ซ หลังการบ่ม 96 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่ายิ่งเวลาการปลูกเชื้อห่างจากเวลาการเติมเซลลูเลสก็จะยิ่งทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลง

สาขาวิชา…….....……เทคโนโลยีชีวภาพ…….....ลายมือชื่อนิสิต…….....……..….....

ปีการศึกษา……..….....2554…….....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก…….....…….....

##5272467923: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: CASSAVA ROOT FIBER, PRETREATMENT, DILUTE SULFURIC ACID, LIME, SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION

PANIDA NIMSUKSA: TREND OF USING CASSAVA FIBER WASTE FROM ETHANOL INDUSTRY AS RAW MATERIAL FOR ETHANOL FERMENTATION. ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHARIDA AKKARAJARANYA, 65 pp.

Due to high cellulose content (39.8%w/w, dry weight basis,) and suitable particle size (20-40 mesh), cassava root fiber waste obtained from cassava root ethanol production process was studied for potential to be raw materials for ethanol production. The cassava root fiber waste was more susceptible to cellulase hydrolysis after pretreatment with dilute sulfuric acid than with calcium hydroxide. Optimal sulfuric acid pretreated cassava root fiber (10%w/v cassava root fiber waste suspended in 4%(w/v) sulfuric acid and steam heated by autoclave at 121°C, 15psi for 45 min) saccharified with 1.17 CMC units/g dry weight of Accellerase^{TM}1500 while suspended in 100 mM sodium citrate buffer pH 5.0 at 50°C for 6 h yielded glucose 0.1g/g dry weight. Increase of the Accellerase^{TM}1500 to 11.68 CMC units /g dry weight resulted in an increase of glucose yield to 0.13g/g dry weight. Highest glucose yield (0.15 g/g dry weight) was obtained when the cassava root fiber waste was saccharified while suspended in pretreatment hydrolysate and the Accellerase^{TM}1500 was increased to 16.35 CMC units /g dry weight. Central Composite Design was used to determine factors (time of inoculation after cellulase addition, fermentation pH and temperature) effected on ethanol produced from Simultaneous Saccharification and Fermentation of dilute acid pretreated cassava root fiber waste using mid log phase cell of *Saccharomyces cerevisiae* G 5-7(2) at 10%(v/v) inoculums size. Maximum ethanol yield (2.72 g/l or 0.027 g/g dry weight) was obtained when *S. cerevisiae* G 5-7 (2) was inoculated immediately after cellulase addition and fermented at 40°C, pH 5.0 for 96 h. Statistical analysis indicated that the longer the period after cellulase addition before *S. cerevisiae* G 5-7 (2) inoculation, the lower an ethanol yield was.

Field of Study..... Biotechnology.....Student's Signature.....

Academic Year.....2011.....Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา ที่ได้ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ โครงการไทยเข้มแข็ง, ทุนรัชดาภิเษกสมโภชน์, และ ศูนย์บริการวิชาการแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* TISR 5596

ขอขอบพระคุณ โรงงานทรัพย์ทิพย์ จังหวัดสระบุรี ที่ให้ตัวอย่างเส้นใยมันสำปะหลัง เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับพื้นที่ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างก่อนนำมาใช้งาน รวมถึงเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์คือ เครื่องวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา พี่ๆเพื่อนๆน้องๆ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการ 405 รวมทั้งเพื่อนๆในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คอยให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจ และความช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงขอขอบพระคุณคุณปู่คุณย่า ที่คอยดูแลเอาใจใส่ และให้ทุนการศึกษา จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....		จ
กิตติกรรมประกาศ.....		ฉ
สารบัญ.....		ช
สารบัญตาราง.....		ฐ
สารบัญภาพ.....		ฑ
1.	บทนำ……..	1
1.1	ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย…….	1
1.2	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย……	2
1.3	ขอบเขตงานวิจัย……..	2
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…….	3
2.	เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……	4
2.1	มันสำปะหลัง…….	4

2.2 เส้นใยมันสำปะหลัง…… 7

2.2.1 เซลลูโลส……... 7

หน้า

2.2.2 เฮมิเซลลูโลส…….. 8

2.2.3 ลิกนิน……. 9

2.3 การปรับสภาพ……. 10

2.3.1. การปรับสภาพโดยใช้สิ่งมีชีวิต (biological pretreatment)……. 10

2.3.2. การปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)…… 11

2.3.3. การปรับสภาพโดยใช้สัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลาย (solvent fractionation)…… 11

2.3.4. การปรับสภาพโดยใช้สารเคมี (chemical pretreatment)…… 11

2.3.4.1. การปรับสภาพโดยใช้สารเคมีที่เป็นด่าง (alkaline pretreatment)…… 11

2.3.4.2. การปรับสภาพโดยใช้สารเคมีจำพวกออกซิเดชัน (oxidative pretreatment)……. 11

2.3.4.3. การปรับสภาพโดยใช้สารเคมีที่เป็นกรด (acid pretreatment)…….. 12

2.4 การย่อยสลายพันธะพอลิเมอร์ของเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้กลูโคส

(enzymatic hydrolysis หรือ saccharification)……. 12

2.4.1 เอ็นไซม์เซลลูเลส…… 13

2.5 การหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลด้วยยีสต์ (fermentation)…….. 15

หน้า

2.5.1 ยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* G 5-7(2)…….. 17

2.6 รูปแบบการหมักเอทานอลชีวภาพ…… 18

2.6.1. กระบวนการผลิตเอทานอล ที่แยกขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ ออกจากขั้นตอนการหมัก

(Separate Hydrolysis and subsequent by Fermentation หรือSHF)…… 18

2.6.2. กระบวนการผลิตเอทานอล ที่รวมขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ เข้ากับขั้นตอนการหมัก

(Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF)…… 19

3. วิธีดำเนินการวิจัย…… 20

3.1 วัตถุดิบ…….. 20

3.2 เคมีภัณฑ์…… 20

3.3 เอนไซม์…… 21

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง…… 22

3.5 จุลินทรีย์…… 23

3.6 องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ…… 23

3.7 วิธีการทดลอง…… 24

3.7.1 เส้นใยมันสำปะหลังหลังกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง…… 24

3.7.2 วิธีการปรับสภาพ (Pretreatment) เส้นใยมันสำปะหลังหลังกระบวนการผลิตเอทานอล
จากหัวมันสำปะหลัง..... 24

3.7.3 วิธีการหาความไวของเส้นใยมันสำปะหลังซึ่งผ่านการปรับสภาพต่อการถูกย่อยด้วยเซลลูเลส.... 25

3.7.4 วิธีการหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพและปริมาณ
เซลลูเลสเพื่อให้ผลการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด…… 25

3.7.5 วิธีการเตรียม *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ระยะการเจริญ mid log phase……. 25

3.7.6 วิธีหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ของ
S. cerevisiae G 5-7(2) แบบแยกคราวละ 1 ปัจจัย (one factor at-a-time)……. 26

3.7.7 วิธีหาเวลาที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ในกระบวนการหมัก
เส้นใยมันสำปะหลังฯแบบSimultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)……. 26

3.7.8 วิธีการหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลแบบ Simultaneous
Saccharification and Fermentation จากเส้นใยมันสำปะหลังฯโดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2)…… 27

3.7.9 วิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากเส้นใยมันสำปะหลังฯ
แบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation ด้วย
S. cerevisiae G 5-7 (2) โดยศึกษาผลกระทบหลายปัจจัยร่วม (factors combination)…….. 27

4. ผลการทดลอง…… 30

หน้า

4.1 ลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยมันสำปะหลัง หลังกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง…… 30

4.2 ผลการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ เพื่อให้เซลลูเลสย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดี…… 30

4.2.1 ผลการปรับสภาพมันสำปะหลังฯด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์…… 30

4.2.2 ผลการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วย กรดซัลฟูริก…… 34

4.3 ผลการหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างเส้นใยมันสำปะหลังฯ ที่ผ่านการปรับสภาพและปริมาณเซลลูเลสเพื่อให้ผลการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด…… 37

4.4 ผลการสร้างเส้นโค้งการเจริญ (growth curve) ของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2)…… 39

4.5 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2)แบบแยกปัจจัย (one factor at-a-time)…….. 40

4.6 ผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ในกระบวนการหมักเส้นใยมันสำปะหลังแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation……..... 42

4.7 ผลการหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) จากเส้นใยมันสำปะหลังฯโดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2)…… 43

4.8 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลแบบ Simultaneous Saccharification and

Fermentation จากเส้นใยมันสำปะหลังฯ โดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยการศึกษาผลกระทบของหลายปัจจัยร่วม (factor combination)…….. 44

หน้า

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง…….. 46

เอกสารอ้างอิง……. 50

ภาคผนวก…….. 54

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…….. 65

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 แสดงค่าปัจจัย แปรผันที่กำหนดในกระบวนการการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯแบบSSF…….28

3.2 การออกแบบการทดลองแบบศึกษาผลกระทบของหลายปัจจัยร่วม……29

4.1 ผลของเวลาการปลูกเชื้อหลังการเติมเซลลูเลส ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิการบ่ม ต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) แบบ SSF…….44

4.2 แสดงค่าCo-efficient และP-valueของปัจจัยที่ต้องการศึกษา คือ ที่ส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) แบบ SSF โดยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Factorial Design…… 45

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ต้นมันสำปะหลัง……. 6

2.2 หัวมันสำปะหลัง…….. 6

2.3 มันเส้น……..6

2.4 เส้นใยมันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัยนี้……..7

2.5 โมโนเมอร์ของกลูโคสประกอบเป็นเซลลูโลส…….....8

2.6 น้ำตาลหน่วยย่อยในเอมิเซลลูโลส……9

2.7: แสดงโครงสร้างของลิกนิน……...…10

2.8 : การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอ็นไซม์เซลลูเลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส……... 13

2.9 : กลไกการทำงานของเอ็นไซม์หน่วยย่อยในเซลลูเลส……..…….14

2.10: ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*……... 15

2.11: วิถีไกลโคซิดิสในเซลล์ยีสต์…….. 16

2.12: ลักษณะการตกตะกอนของสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* G 5-7 (2)…….……...17

2.13: ลำดับกระบวนการในการหมักเอทานอลชีวภาพด้วยวิธี Separate Hydrolysis and subsequent by Fermentation หรือSHF……. 18

2.14: ลำดับกระบวนการในการหมักเอทานอลชีวภาพด้วยวิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF…….. 19

ภาพที่ **หน้า**

4. 1 : ผลของความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งใช้แขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯต่อความไวของเส้นใยมันสำปะหลังฯต่อการถูกย่อยด้วยเซลลูเลส……..... 31

4.2 : ผลของปริมาณเส้นใยมันสำปะหลังฯที่แขวนลอยในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อความไวของเส้นใยมันสำปะหลังฯต่อการถูกย่อยด้วยเซลลูเลส……..……..... 32

4.3 : ผลของเวลาในการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯเมื่อแขวนลอย(9%(w/v) ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อความไวของเส้นใยมันสำปะหลังฯ ต่อการถูกย่อยด้วยเซลลูเลส……... 33

4.4 : ผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริกซึ่งใช้ปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ ต่อความไวของเส้นใยมันสำปะหลังฯ ต่อการถูกย่อยด้วยเซลลูเลส…….……..... 34

4.5 : ผลของปริมาณเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งแขวนลอยในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 4%(w/v)ในขั้นตอนการปรับสภาพต่อความไวของเส้นใยมันสำปะหลังฯต่อการถูกย่อยด้วยเซลลูเลส…….……..... 35

4.6 : ผลของระยะเวลาการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯเมื่อแขวนลอยปริมาณ 10%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 4%(w/v) ต่อความไวของเส้นใยมันสำปะหลังฯต่อการถูกย่อยด้วยเซลลูเลส……..... 36

4.7 : ผลของปริมาณเซลลูเลสที่ใช้ย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพที่สภาวะ
เหมาะสม เมื่อแขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯในสารละลายบัฟเฟอร์……...…37

ภาพที่ **หน้า**

4.8 : ผลของปริมาณเซลลูเลสที่ใช้ย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพที่
สภาวะเหมาะสมขณะเส้นใยมันสำปะหลังฯแขวนลอยในพรีทรีตเมนท์
ไฮโดรไลเซต ต่อปริมาณน้ำตาลที่ได้……...… 38

4.9 : เส้นโค้งการเจริญแของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) และของ*S. cerevisiae* TISTR 5596
ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่ 40°ซ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0……...….. 39

4.10 : แสดงผลของอุณหภูมิการบ่มต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* TISTR 5596
และ *S. cerevisiae* G 5-7 (2)…… ……...……. 40

4.11: ผลของค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวYPD ต่อการผลิต
เอทานอลของ *S. cerevisiae* TISTR 5596และ, *S. cerevisiae* G 5-7 (2)…… ……...…. 41

4.12 : ผลของเวลาการปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5596 และ *S. cerevisiae* G 5-7 (2)
หลังการย่อยเติม Accellerase™1500 ในกระบวนการหมักเอทานอลจากเส้นใย
มันสำปะหลังแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)…… ……...……. 42

4.13: ผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากจากการหมักเส้นใยมัน
สำปะหลังฯด้วย*S. cerevisiae* TISTR 5596 และ *S. cerevisiae* G 5-7 (2)
โดยการกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

ที่ 40°ซ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0……...…….. 43

บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญ

การใช้พลังงานจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากการเผาผลาญถูกปล่อยออกสู่บรรยากาศจำนวนมาก ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจกสร้างผลเสียอย่างมากต่อสภาวะแวดล้อม จึงได้มีความพยายามที่จะเปลี่ยนไปใช้แหล่งพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ คือเอทานอลชีวภาพซึ่งได้จากการนำพืชหรือผลิตผลทางการเกษตรที่อุดมไปด้วยแป้งและน้ำตาล เช่น มันสำปะหลัง และ อ้อย เป็นต้น มาหมักเป็นเอทานอลด้วยจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพราะเอทานอลชีวภาพเป็นพลังงานประเภทหมุนเวียน และพืชยังทำหน้าที่ดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ แต่วิธีนี้ส่งผลเสียต่ออุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นพืชหรือชิ้นส่วนของพืชที่ไม่มีผลซับซ้อนกับอุตสาหกรรมอาหาร จึงได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาแนวทางการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตเอทานอล

มันสำปะหลัง (***Manihol esculenta Cranz***) เป็นพืชที่จัดเป็นแหล่งที่สำคัญของการผลิตเอทานอลรองจากกากน้ำตาล ประเทศไทย ถือว่ามีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง เป็นอันดับ 3 ของโลก รองจาก ไนจีเรีย และบราซิล ประเทศไทยมีโรงงานผลิตเอทานอลซึ่งใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ 25 โรงงาน ผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง 5.7 ล้านตันต่อปี (เครือข่ายเกษตรกรรมทางเลือกภาคอีสาน, 2551) การผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังมีเส้นใยมันสำปะหลังเกิดขึ้นเป็นของเสียจำนวนมาก

เส้นใยมันสำปะหลัง หลังกระบวนการผลิตเอทานอล เป็นวัสดุเศษเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง ความชื้นประมาณ 79.93 เปอร์เซ็นต์ และมีการใช้เส้นใยมันสำปะหลังฯเปียกนี้ไปถมที่ดิน เส้นใยมันสำปะหลังฯนี้มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสูงถึง 39.8 % (w/w) ซึ่งสามารถถูกนำไปย่อยด้วยเอ็นไซม์เซลลูเลส เพื่อทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของกลูโคส ดังนั้นก่อนที่ใช้เอ็นไซม์ย่อย ต้องผ่านขั้นตอนการปรับสภาพทั้งทางกายภาพแล้วทางเคมีเสียก่อน แล้วนำน้ำตาลกลูโคสที่ได้ ไปหมักด้วยจุลินทรีย์เพื่อให้ได้เอทานอล

การนำเส้นใยมันสำปะหลังฯกลับมาใช้ใหม่ เป็นเรื่องที่ให้ความสนใจเนื่องจาก เป็นการเพิ่มมูลค่าของหัวมันสำปะหลัง และเป็นการเพิ่มแหล่งผลิตเอทานอลทางเลือกใหม่ ลดพื้นที่การเพาะปลูก ลดต้นทุนการผลิตเอทานอล เพิ่มปริมาณเอทานอลให้เพียงพอกับอุตสาหกรรมการขนส่ง

การปรับสภาพในการศึกษานี้ อาศัยความดันไอน้ำโดยเครื่องหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ 121°ซ 15ปอนด์/ตร.นิ้วในเวลาที่เหมาะสมการใช้ร่วมกับการใช้สารเคมีคือแคลเซียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟูริกเจือจางในการปรับสภาพกากใยมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแคลเซียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟูริคเจือจางในการทำให้กากใยมันสำปะหลังถูกย่อยด้วยเซลลูเลสได้ดีขึ้น และนำไปหมักต่อด้วยเชื้อทนร้อน *S. cerevisiae* G 5-7 (2) แยกได้จากโรงงานอุตสาหกรรมโคราช อุณหภูมิ 40°ซ ในกระบวนการหมักแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาประสิทธิผลการผลิตเอทานอลจากกากใยมันสำปะหลังที่ได้หลังกระบวนการการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง โดยกระบวนการหมักรวมขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์เข้ากับขั้นตอนการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation; SSF)

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการปรับสภาพกากใยมันสำปะหลัง
   หลังการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง ด้วยแคลเซียม ไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟูริกเจือจาง
   ต่อการส่งเสริมให้กากใยมันสำปะหลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีขึ้น
2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G 5-7(2)
3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการหมักเอทานอลจากกากใยมันสำปะหลังด้วย *S. cerevisiae* G 5-7(2)
   โดยวิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเส้นใยมันสำปะหลัง หลังการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากหัวมันสำปะหลัง จึงเป็นการลดต้นทุนการผลิต เอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง เป็นพืชหัวชนิดหนึ่ง ชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ ***Manihot esculenta*** **(L.) Crantz** มีชื่อเรียกสามัญอื่นๆหลายชื่อ คือ Cassava , Tropica Yuca, Mandioa เป็นต้น ต้นกำเนิดอยู่บริเวณที่ลุ่มเขตร้อน(Lowland tropics) ริเริ่มปลูกมันสำปะหลังมานานกว่า 3,000-7,000 ปีมาแล้ว หัวมันสำปะหลังนั้น(**รูปที่ 2.1**) อุดมไปด้วยแป้ง เป็นไม้ล้มลุก ลำต้น (**รูปที่ 2.2**)สูงประมาณ 1.5-2.0 เมตร

แหล่งกำเนิดมันสำปะหลังมี 4 แห่งด้วยกันคือ

1. แถบประเทศกัวเตมาลา และเม็กซิโก
2. ทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปอเมริกาใต้
3. ทางทิศตะวันออกของประเทศโบลิเวียและทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอาร์เจนตินา
4. ทางทิศตะวันออกของประเทศบราซิล

มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง เป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศในเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศต่างๆ ในทวีปอัฟริกาและทวีปอเมริกาใต้ ในทวีปเอเชียประเทศอินโดนีเซียและอินเดียมีการบริโภคมันสำปะหลังกันเป็นจำนวนมาก ปริมาณผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีร้อยละ 60 ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ ร้อยละ 27.5 ใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ และร้อยละ 12.5 ใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ มันสำปะหลังเป็นพืชที่ทำรายได้ให้เกษตรกรมากเป็นอันดับที่ 4 รองจากยางพารา อ้อย และข้าว ผลผลิตมันสำปะหลัง ภายในประเทศนำไปใช้ทำมันเส้นและมันอัดเม็ดร้อยละ 45-50 ใช้แปรรูปเป็นแป้งร้อยละ 50-55 ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกมากที่สุดในโลก ประเทศที่ไทยส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในรูปของมันอัดเม็ดไปขายมากที่สุดคือ ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส) เกาหลีใต้และญี่ปุ่น ส่วนในรูปของแป้งมันสำปะหลัง ประเทศญี่ปุ่นสั่งซื้อ มากที่สุด รองลงมาคือฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน การผลิตมันเส้น **(รูปที่ 2.3)**ทำได้โดยการแปรรูปหัวมันสดโดยใช้เครื่องตีหัวมันเป็นเส้นเล็ก แล้วนำไปตากบนลานซีเมนต์ประมาณ 2-3 วัน แต่ถ้าเป็นฤดูฝนจะใช้เวลาในการตากมันมากกว่าปกติ ซึ่งตามปกติแล้วการผลิตมันเส้น 1 กิโลกรัมต้องใช้หัวมันสด (มีปริมาณแป้งร้อยละ 25) 2-2.5 กิโลกรัม เมื่อแห้งดีแล้วจะต้องได้มาตรฐานความชื้นที่มีในมันเส้นประมาณร้อยละ 14 แล้วจึงทำการเก็บเพื่อส่งขายเป็นวัตถุดิบให้กับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมมันอัดเม็ดต่อไปสำหรับประเทศไทยยังไม่มีหลักฐานที่แน่นอนว่ามีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกเมื่อใด คาดว่าคงจะเข้ามาในระยะเดียวกันกับการเข้าสู่ศรีลังกา และฟิลิปปินส์ คือ ประมาณ พ.ศ. 2329-2383 ประเทศไทยมีการปลูกมันสำปะหลังในภาคใต้โดยปลูกระหว่างแถวของต้นยางพารากันมากว่า 70 ปีแล้ว โดยเฉพาะที่จังหวัดสงขลา แต่การปลูกมันสำปะหลังทางภาคใต้ค่อยๆ ลดลงเมื่อมีการขยายการปลูกยางพารา ต่อมาได้มีการปลูกมันสำปะหลังในภาคตะวันออก คือจังหวัดชลบุรี ระยองและจังหวัดใกล้เคียง และเมื่อความต้องการของตลาดเพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์และอุตสาหกรรมมีเพิ่มมากขึ้น จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกไปยังจังหวัดอื่นๆโดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือจนในปัจจุบันภาคตะวันออกเฉียงเหนือพื้นที่ปลูกมากที่สุดของประเทศไทย (กรมวิชาการเกษตร, 2009)

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีปริมาณการผลิตโดยประมาณ 16 ถึง 18 ล้านตันหัวมันสำปะหลังต่อปี ในหัวมันสำปะหลังจะมีแป้งเป็น องค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง (ประมาณร้อยละ 70 ถึง 85 โดยน้ำหนักแห้ง) ดังนั้น มันสำปะหลังจึงเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่สามารถ

นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้โดยการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังเมื่อมีการพัฒนาที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตได้ โดยการรวมขั้นตอนการย่อยครั้งสุดท้าย (saccharification) เข้าไว้ในขั้นตอนเดียวกับการหมัก (fermentation) ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ผลิตน้ำตาลกลูโคสจะมีกิจกรรมการย่อยแป้งในสภาวะเดียวกับการหมัก ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการย่อยแป้ง รวมทั้งยังช่วยประหยัดพลังงาน ดังนั้น ในกระบวนการผลิตขั้นตอนที่สำคัญคือการปรับสภาพ

ปัจจุบัน มีงานวิจัยหลายชิ้น นำมันสำปะหลังเป็นแหล่งผลิตเอทานอลชีวภาพ โดยนำเอาส่วนที่ไม่มีแป้งหรือเรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส มาใช้เป็นแหล่งผลิตเอทานอลชีวภาพ โดยการนำไปปรับสภาพด้วยคลื่นความถี่ตามด้วยการใช้เอ็นไซม์(Sriroth, และคณะ, 2000) หรือปรับสภาพด้วยกรดที่ร้อนตามด้วยการใช้เอ็นไซม์(Aqu, และคณะ, 1997) จากงานวิจัยที่ยกตัวอย่างมานั้นแสดงให้เห็นว่าส่วนที่ไม่มีแป้งจากมันสำปะหลังนั้นสามารถเป็นแหล่งผลิตเอทานอลชีวภาพทางเลือกใหม่อีกทางหนึ่งทั้งปัจจุบันและอนาคต

รูปที่2.1: ต้นมันสำปะหลัง

ที่มา http://www.farmkaset.org

รูปที่ 2.2: หัวมันสำปะหลัง

ที่มา http://www.pandintong.com

รูปที่ 2.3: มันเส้น

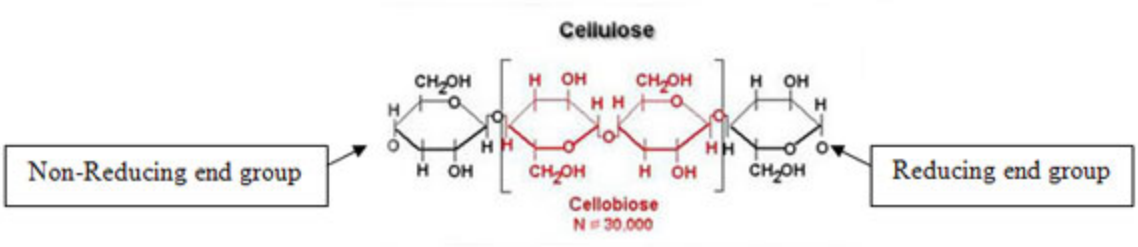
2.2 เส้นใยมันสำปะหลัง

เส้นใยมันสำปะหลัง หรือ Cassava fiber waste หรือ CRF เป็นวัตถุดิบทางชีวมวลที่ได้จากหัวมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการผลิตเอทานอล มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นองค์ประกอบ(**รูปที่ 2.4**)

รูปที่ 2.4 : เส้นใยมันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัยนี้

2.2.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส ($C_6H_{10}O_5$)$_n$ เกิดจากกลูโคสประมาณ 50,000 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้าไกลโคสิดิก (β-glycosidic bond) เป็นสายยาวและมีโครงสร้างแข็งแรง แต่ละสายของสายของเซลลูโลสเรียงขนานกันไป มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสายมีพันธะไฮโดรเจนจำนวนมากในสายของเซลลูโลสซึ่งเชื่อมต่อระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ใน วงแหวนของโมเลกุลถัดไปทำให้มีลักษณะเป็นเส้นใย **(รูปที่ 2.5)**สะสม เซลลูโลสเมื่อถูกย่อยจะแตกตัวออก ให้น้ำตาลกลูโคสจำนวนมาก



รูปที่ 2.5 : โมโนเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้าไกลโคสิดิกประกอบเป็นเซลลูโลส

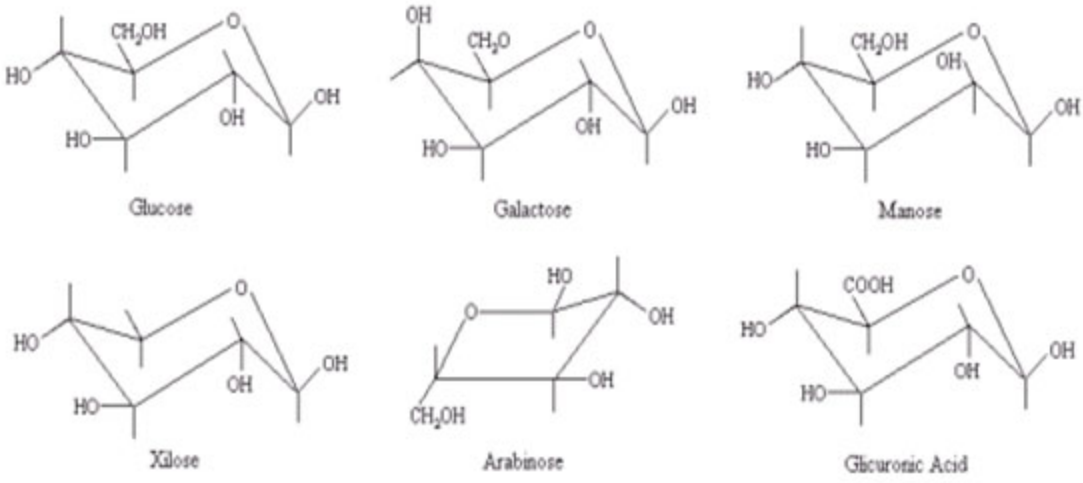
ที่มา: http://buranapagroup.com/knowledge_chemical.php

โครงสร้างของเซลลูโลสแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ คริสตัลไลน์ (crystalline) เป็นบริเวณที่มีการวางตัวอย่างเป็นระเบียบ และ อะมอฟัส (amorphous) จะมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ การย่อยสลายจะเกิดขึ้นที่บริเวณอะมอฟัสได้เร็วกว่าบริเวณคริสตัลไลน์

เนื่องจากบริเวณอะมอฟัสยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายง่ายกว่าบริเวณคริสตัลไลน์ (McMillan, 1994)

2.2.2 เฮมิเซลลูโลส

ประกอบด้วยสายโพลิเมอร์ของน้ำตาลที่เป็นทั้งสายโซ่ตรงและสายกิ่ง ประกอบด้วย น้ำตาล 5 ชนิด เกิดจากน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม หรือน้ำตาลเพนโตส (pentose) ได้แก่ ไซโลส (xylose) และอะราบิโนส (arabinose)และน้ำตาล หกอะตอม หรือ น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ได้แก่ กาแลคโตส (galactose) กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose)และกรดบางชนิด คือ กรดยูโรนิค (uronic acid) องค์ประกอบหลักคือ น้ำตาลไซแลน ซึ่งมีความแตกต่างกันไปในแต่ละ แหล่งที่มา แต่โมโนเมอร์ที่มีมากที่สุดคือ ไซโลส (Saha และคณะ., 2003)**(รูปที่ 2.6)**

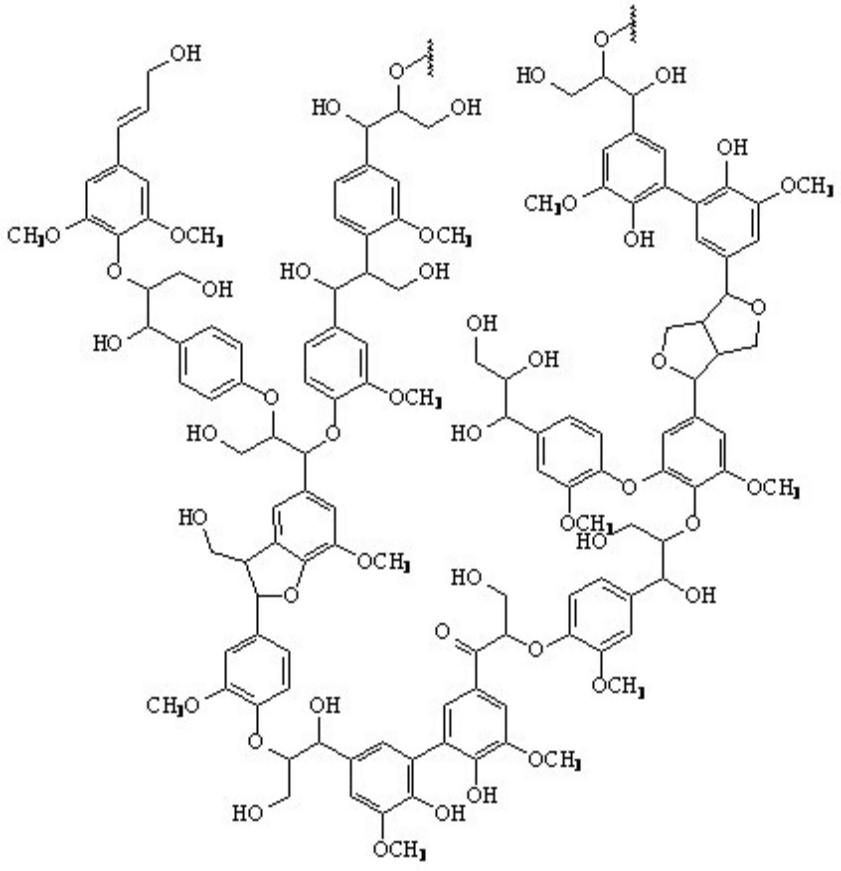


รูปที่ 2.6: น้ำตาลหน่วยย่อยในเอมิเซลลูโลส

ที่มา : http://buranapagroup.com/knowledge_chemical.php

2.2.3 ลิกนิน

ลิกนิน เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช ทำให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรง เป็นไบโอโพลิเมอร์ที่มีสารประกอบฟีโนลิก (phenolic components) โดยมีหน่วยฟีนิลโพรเพน (phenylpropane unit) เป็นจำนวนมาก ดัง**รูปที่ 2.7** การที่ลิกนิน อยู่ร่วมกับเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ทำให้การย่อยของเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลสด้วยเอ็นไซม์ลดลงด้วย ทำให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง ลิกนินไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอล หรือ เมทานอล เป็นต้น



รูปที่ 2.7: แสดงโครงสร้างของลิกนิน

ที่มา:http:// www.wikipedia.org

2.3 การปรับสภาพ

การปรับสภาพ (Pretreatment) เพื่อให้พันธะของลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส แยกออกจากกัน กระบวนการปรับสภาพ แบ่งได้เป็น 4 วิธี ดังนี้

2.3.1. การปรับสภาพโดยใช้สิ่งมีชีวิต (biological pretreatment) การปรับสภาพวิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ใช้พลังงานมาก แต่ใช้สิ่งมีชีวิตในกลุ่มรา เช่นพวกราขาวในกลุ่มของบาซิดิโอไมซิเตส (white rot bacidiomycetes) (ภาพที่ 2.3.1A) (Lee และคณะ, 2007) ที่ผลิตเอนไซม์ของลิกนิน เปอร์ออกไซด์ (lignin peroxide) และแลคเคส (laccases) เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถกำจัดลิกนินได้จำนวนมาก การปรับสภาพด้วยวิธีนี้ใช้เวลานาน มีต้นทุนเรื่องค่าอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงการขยายขนาดให้ไปสู่ระดับอุตสาหกรรมเป็นไปได้ยาก

2.3.2. การปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) อาศัยการลดขนาดของชิ้นส่วนพืชโดยแรงกล เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิว ประสิทธิภาพในการเข้าจับกันระหว่างเอนไซม์กับเซลลูโลสจึงเพิ่มขึ้น เช่น การใช้เครื่องมือในการบดชิ้นส่วนพืช (ball milling procedures) (Sidiras และ Koukios, 1989) (ภาพที่ 2.3.2A)การใช้คลื่นความถี่ต่ำ (ultrasound) (Nitayavardhana และคณะ, 2009) และการฉายรังสี (radiation) (Kumakura และ Kaetsu, 1982) วิธีนี้ให้น้ำตาลไม่สูง เพราะผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง ต้องอาศัยการใช้สารเคมีหรือเทคนิคอื่น แต่การลดขนาดจัดเป็นการปรับสภาพจำเป็นเบื้องต้น ก่อนนำมาปรับสภาพด้วยวิธีอื่น

2.3.3. การปรับสภาพโดยใช้สัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลาย (solvent fractionation) วิธีนี้อาศัยความสามารถกระจายตัวในตัวทำละลายของแต่ละองค์ประกอบในผนังเซลล์พืชซึ่งแตกต่างกัน รวมถึงความสามารถในการละลายของเซลลูโลสในทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์ (Pan และคณะ, 2006) กรดฟอสฟอริค (phosphoric acid fractionation) (Zhang และคณะ, 2007) และของเหลวที่มีไอออน (ionic liquids) (Swatloski และคณะ, 2002) ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ (organosolv

process) การที่องค์ประกอบต่างๆ ในผนังเซลล์พืชถูกแยกออกจากกัน ทำให้เซลลูโลสสามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดีขึ้น

2.3.4. การปรับสภาพโดยใช้สารเคมี (chemical pretreatment) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามประเภทของสารเคมีที่ใช้ ดังนี้

2.3.4.1. การปรับสภาพโดยใช้สารเคมีที่เป็นด่าง (alkaline pretreatment) เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Rai และ Mudgal, 1988) แคลเซียม ไฮดรอกไซด์ (Kaar และ Holtzapple, 2000) และแอมโมเนีย (Lau และคณะ, 2008) สารเคมีกลุ่มนี้มีความจำเพาะกับหมู่อะซีติล (acetyl group) ของน้ำตาลจำพวกเฮมิเซลลูโลสและคาร์โบไฮเดรตที่ทำพันธะกับลิกนิน จึงสามารถละลายลิกนิน และลดการจับตัวกันระหว่างเอนไซม์กับลิกนิน เป็นการเพิ่มความจำเพาะในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับเซลลูโลส

2.3.4.2. การปรับสภาพโดยใช้สารเคมีจำพวกออกซิเดชัน (oxidative pretreatment) เช่น วิธีอัลคาไลน์ออกซิเดชั่น (alkaline oxidation) เป็นการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นตัวออกซิแดนท์ ปรับสภาพภายใต้ภาวะที่เป็นเบสร่วมกับความดัน (Mishima และคณะ, 2006) ซึ่งมีความจำเพาะกับลิกนิน และน้ำตาลจำพวกเฮมิเซลลูโลสเฉพาะลิกนินและน้ำตาลจำพวกเฮมิเซลลูโลส จึงถูกกำจัดออกจากชิ้นส่วนของพืช ทำให้เซลลูโลสถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดีขึ้น

2.3.4.3. การปรับสภาพโดยใช้สารเคมีที่เป็นกรด (acid pretreatment) เช่น การใช้กรดซัลฟูริคเจือจางที่อุณหภูมิสูง(80-200องศาเซลเซียส) (Lavarack และคณะ, 2002) การใช้เครื่องกำเนิดไอน้ำภายใต้ความดันสูง (stream explosion) ร่วมกับกรดเจือจาง (Cara และคณะ, 2008) เครื่องมือดังกล่าวนี้ สามารถทำงานที่อุณหภูมิสูง (160-290 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาสั้นในการเพิ่มอุณหภูมิ แต่ข้อเสียคือ ราคาแพงมาก การใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงเพราะ น้ำจะแสดงความเป็นกรด จึงสามารถทดแทนการใช้กรดเจือจางได้ (Sousa และคณะ, 2009) และยังไม่มีเครื่องมือขนาดที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรมจริงได้ ปัจจุบัน มีเพียงขนาดที่ใช้ในงานวิจัยเท่านั้น วิธีข้างต้นนี้สามารถละลายน้ำตาลเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกมาได้ แต่ภายหลังการปรับสภาพ ส่วนของของเหลว เรียกว่า ไฮโดรไลเซต (hydrolyzate) จะมีสารบางกลุ่มที่ไม่ต้องการ เช่น เฟอร์ฟูรอล

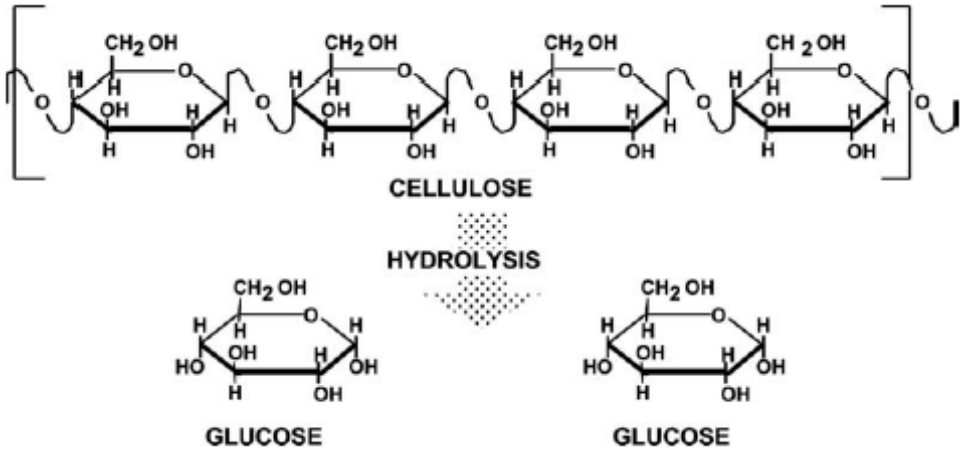
(furfural) 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (5-hydrozymethyl furfural) กรดลีวูลินิก(levulinic acid) และกรดสายตรงชนิดอื่นๆ (aliphatic acids) (ภาพที่2.3.4.3A)ซึ่งส่งผลเสียต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และหมักต่อของยีสต์ (Sousa และคณะ, 2009) ดังนั้นต้องกำจัดสารเหล่านี้ออกจากไฮโดรไลเซตที่ได้ก่อนการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป เรียกกระบวนการนี้ว่า ดีทอกซิฟิเคชัน (Detoxification) (Mussatto และ Roberto, 2004)

2.4 การย่อยสลายพันธะพอลิเมอร์ของเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้กลูโคส (enzymatic hydrolysis หรือ saccharification)

หลังการปรับสภาพชิ้นส่วนของพืช จะพบเซลลูโลสและน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสละลายอยู่ในไฮโดรไลเซส ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ย่อยเซลลูโลส หรืออาจใช้กับเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลเฮมิเซลลูโลส เช่นเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulases) (Berlin และคณะ, 2005)และเอนไซม์ที่สามารถย่อยลิกนิน หรือ ลิกนินเอส (ligninases) (Palonen และ Viikari, 2004) ร่วมด้วย

2.4.1 เอ็นไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลส เป็นเอ็นไซม์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวดังได้ภาพที่ 2.4.1A ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งรา และแบคทีเรีย และสัตว์จำพวกแมลง แต่ที่นิยมนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม คือ เซลลูเลสจากรา เช่น *Trichoderma reesei*, และ *Aspergillus niger* กลไกการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส ดังแสดงใน**รูปที่ 2.8**

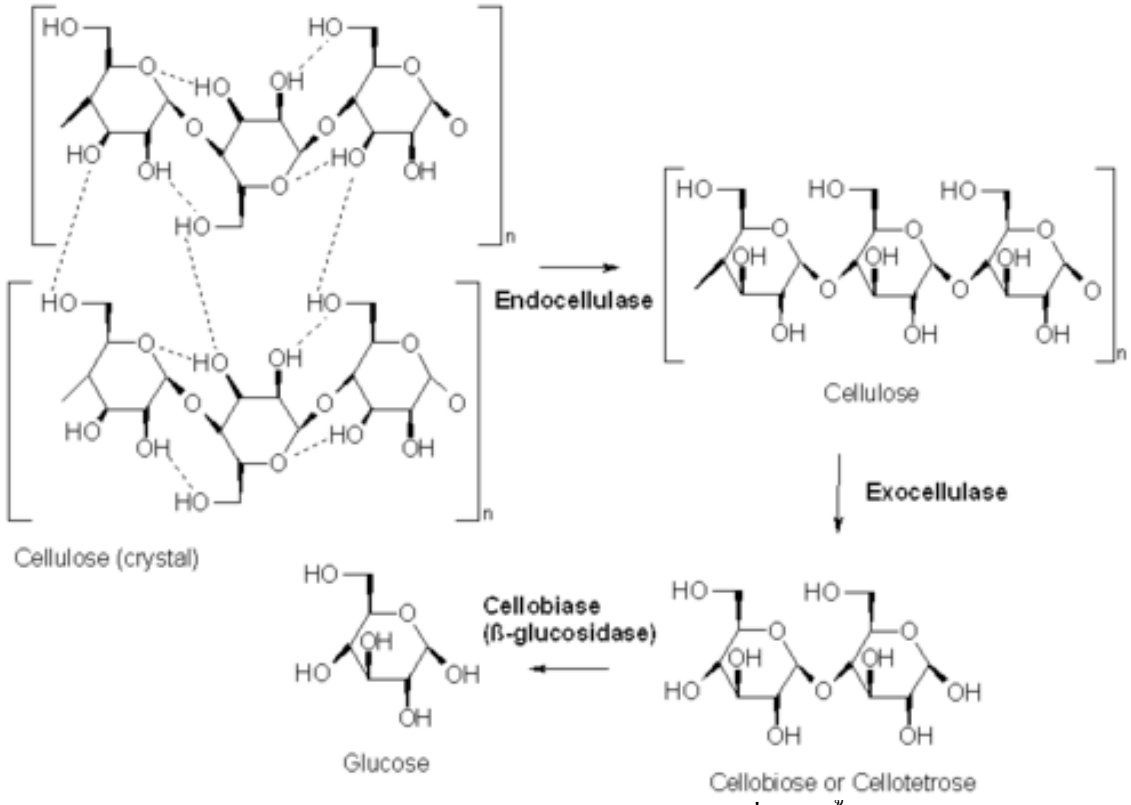


รูปที่ 2.8 : การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอ็นไซม์เซลลูเลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส

ที่มา: Murphy และ McCarthy (2005)

เอ็นไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ 3 ชนิด (multicomponent enzymes) ที่ทำงานร่วมกัน

ดังนี้ (ก)เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ endo-beta-1,4-glucanase ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1,4 glucosidic ภายในสายเซลลูโลส แบบสุ่มจากด้านปลายรีดิวซ์ ทำให้เกิด เซลโลไบโอส (cellobiose) และโอลิโกเซลลูโลส (oligocellulose) (ข)เอ็กโซกลูคาเนส หรือเซลโลไบโอไฮโดรเลส (exoglucanase or cellobiohydrolase) ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1,4 glucosidic จากปลายอิสระของเซลลูโลส และโอลิโกเซลลูโลส ทำให้ได้เซลโลไบโอส (ค) เบต้ากลูโคซิเดส หรือเซลโลไบเอส (β-glucosidase or cellobiase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส ส่งผลให้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น**(รูปที่ 2.9)** และจากการที่น้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น กลูโคสจะไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์หน่วยย่อยคือ เบต้ากลูโคซิเดส ทำให้เซลโลไบโอสสะสมเพิ่มขึ้น และเซลโลไบดอสที่เพิ่มขึ้นนี้ จะไปยับยั้งการทำงานของ



เอนโดกลูคาเนส และเอ็กโซกลูคาเนส ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้าลงและหยุดในที่สุด ส่วนการแก้ปัญหาในปัจจุบันคือ การเติมบีต้ากลูโคซิเดสเพิ่มลงไป ระหว่างการย่อยสลายและกระบวนการหมักแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ ไปใช้ในการหมักด้วยยีสต์ทันที เป็นต้น (Sun และ Cheng, 2002)

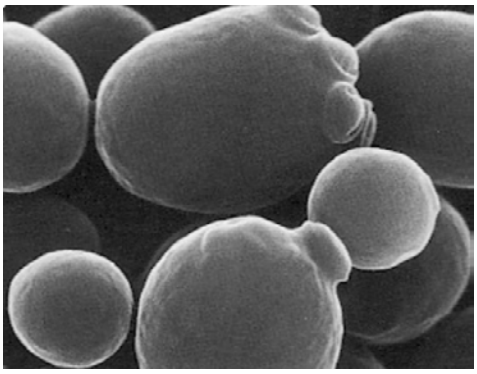
กลไกของเซลลูเลส และตำแหน่งที่เข้าทำปฏิกิริยา

รูปที่ 2.9 : กลไกการทำงานของเอ็นไซม์หน่วยย่อยในเซลลูเลส

ที่มา http://www.wikipedia.org

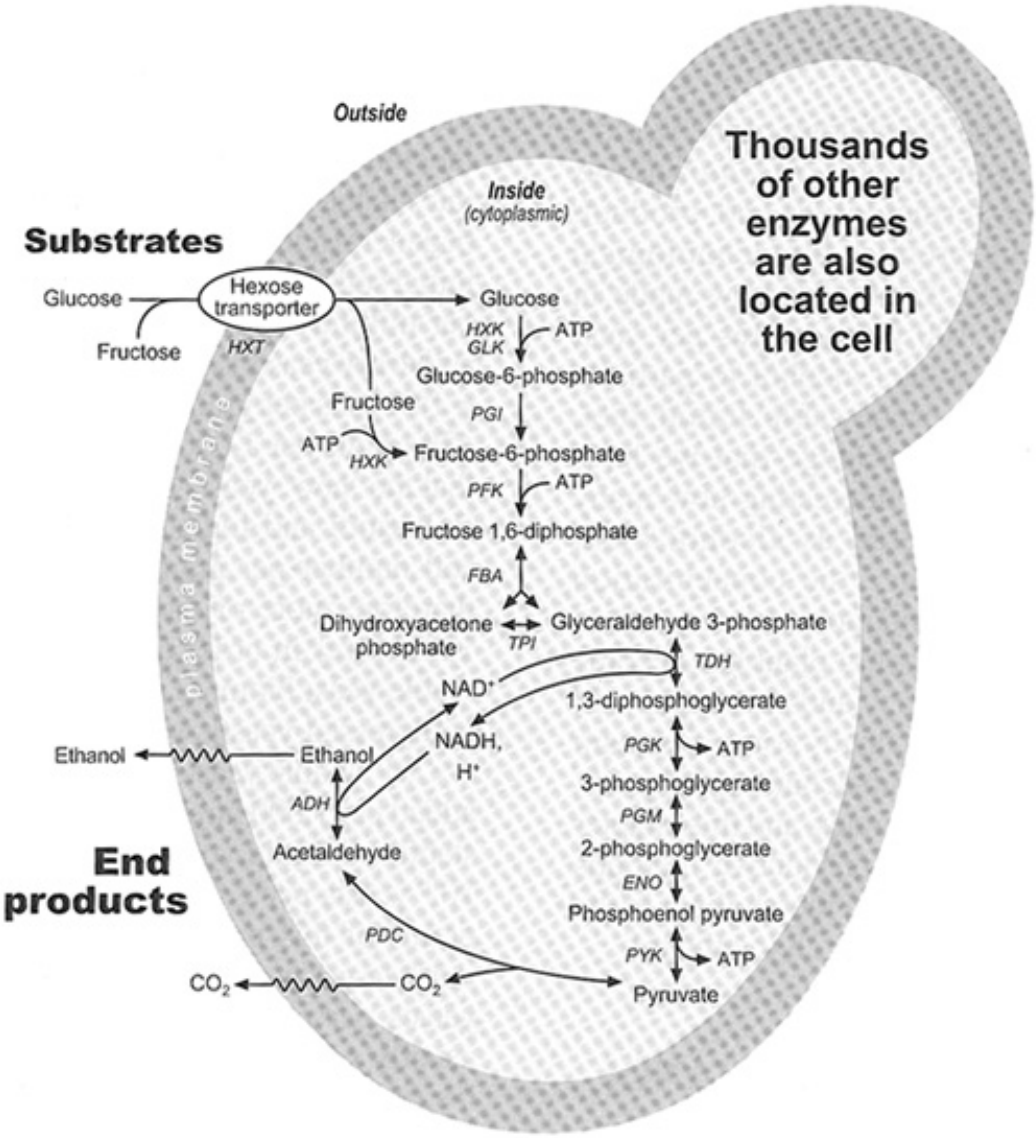
2.5 การหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลด้วยยีสต์ (fermentation)

ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* **ดังรูปที่ 2.10** ถูกนำมาใช้หมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลอย่างแพร่หลาย แต่ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวนี้ไม่สามารถหมักน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม (pentose sugar) เช่น ไซโลส (xylose) และ อราบิโนส (arabinose) ซึ่งมีจำนวนมากในไฮโดรไลเซต จึงมีงานวิจัยที่ใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อให้สามารถหมักน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมได้ด้วย (Öhgren และคณะ, 2006) การผลิตเอทานอลโดยยีสต์อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic) โดยยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุกโตส 1,6-ฟอสเฟต (fructose 1,6-phosphate) และเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) **ดังรูปที่ 2.11** และไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นอะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) คาร์บอนไดออกไซด์ และ เอทานอล โดยเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอล 51.1 % และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 %



รูปที่ 2.10: ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา http://www.mycor.nancy.inra.fr



รูปที่ 2.11: วิถีไกลโคซิดิสในเซลล์ยีสต์

(ที่มา http://www.wiki.lamk.fi)

2.5.1 ยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* G 5-7(2)

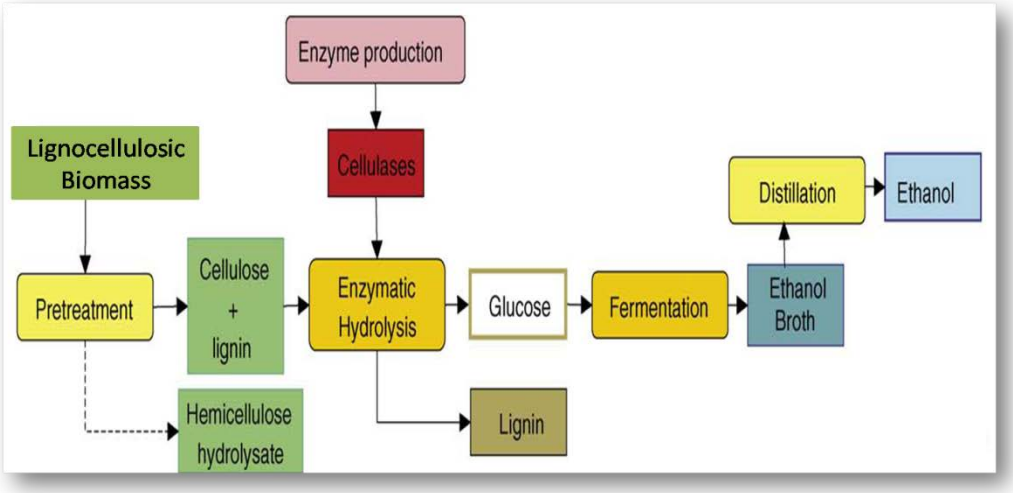
ยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* G 5-7(2) เป็นเชื้อที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีลักษณะโคโลนีด้าน สีเหลืองอ่อน เมื่อผลิตเอทานอลแล้ว จะตกตะกอนลงมาด้านล่าง **(รูปที่ 2.12)** เรียกว่า ฟลอคคูเลต ยีสต์(Flocculated yeast) มีข้อดีในการแยกเชื้อออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย

รูปที่ 2.12: ลักษณะการตกตะกอนของสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* G 5-7 (2)

2.6 รูปแบบการหมักเอทานอลชีวภาพ

โดยทั่วไปที่ใช้ในปัจจุบัน แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

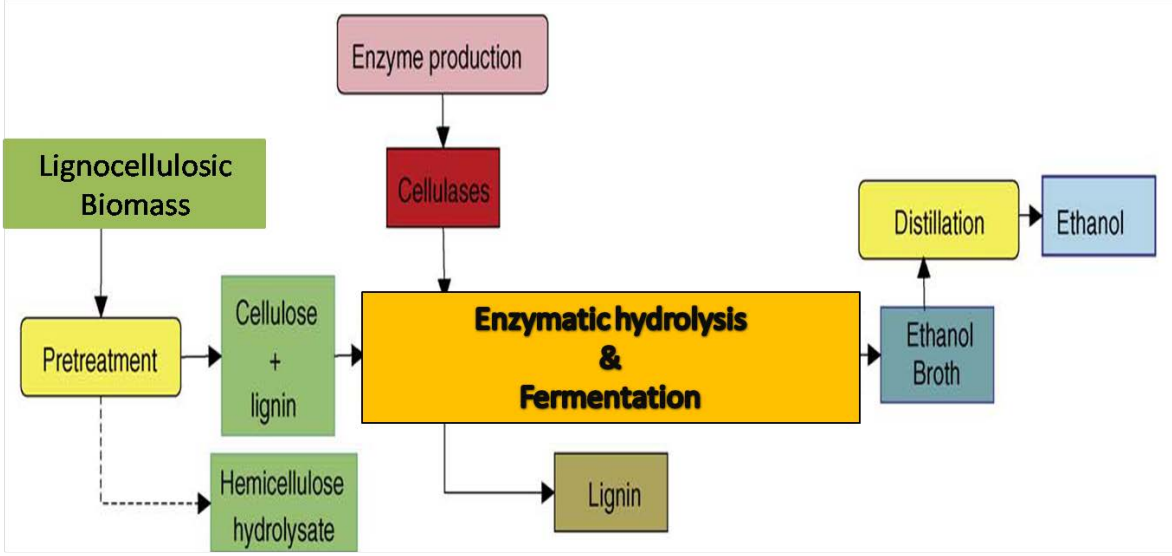
2.6.1. กระบวนการผลิตเอทานอล ที่แยกขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ ออกจากขั้นตอนการหมัก (Separate Hydrolysis and subsequent by Fermentation หรือSHF) **(รูปที่ 2.13)**กระบวนการนี้เอนไซม์และยีสต์สามารถทำงานได้เต็มที่ในภาวะที่เหมาะสมที่สุดของตัวเอง (Balat และคณะ, 2008) แต่กระบวนการนี้การทำงานของเอนไซม์ถูกจำกัดด้วยปัญหาการยับยั้งการย่อยของเอนไซม์เมื่อมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคส (product inhibition) (Margeot และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.13: ลำดับกระบวนการในการหมักเอทานอลชีวภาพด้วยวิธี Separate Hydrolysis and subsequent by Fermentation หรือSHF

ที่มา : Margeot *et al*.,2009

2.6.2. กระบวนการผลิตเอทานอล ที่รวมขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ เข้ากับขั้นตอนการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF) **(รูปที่ 2.14)** กระบวนการนี้เกิดขึ้นเพราะต้องการแก้ปัญหาการยับยั้งการย่อยของเอนไซม์เมื่อมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคส แต่เอนไซม์และยีสต์ไม่ทำงานได้เต็มที่ในภาวะที่เหมาะสมที่สุดของตัวเอง (South และคณะ, 1995)



รูปที่ 2.14: ลำดับกระบวนการในการหมักเอทานอลชีวภาพด้วยวิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF

ที่มา : Margeot *et al*.,2009

สำหรับงานวิจัยนี้จึงนำเส้นใยมันสำปะหลังการเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการหมักเอทานอล เนื่องจากกากใยมันสำปะหลังนี้มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสูงถึง 30-40% (w/w) และมีขนาดเล็กคือ 20-40 เมส โดยจะศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดซัลฟูริคเจือจางและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในการทำให้กากใยมันสำปะหลังถูกย่อยด้วยเซลลูเลสได้ดีขึ้น นำกากใยมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพมาแล้วมาย่อยด้วยเซลลูเลสทางการค้าไปพร้อมกับการหมักน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นเป็นเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุมเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับ*Saccharomyces cerevisiae* G 5-7(2) โดยกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยภายในโรงงานอุตสาหกรรมโคราชที่ 40 °ซ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 เส้นใยมันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นของเหลือทิ้ง (agroindustrial waste) จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง(มันเส้น)จากโรงงานผลิต เอทานอล โรงงานทรัพย์ทิพย์ อำเภอชัยบาดาล จังหวัด ลพบุรี โรงงานผลิตเอทานอลจากมันเส้นแห่งนี้ จะนำมันเส้นมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล หมักน้ำตาลที่ได้เป็นเอทานอล แล้วเข้าสู่กระบวนการกลั่นเอาเอทานอลโดยไปแยกเอาเส้นใยของหัวมันสำปะหลังออกก่อน (เส้นใยมันสำปะหลังที่นำมาศึกษานี้เป็นของเหลือทิ้งที่เกิดขึ้นหลังการกลั่นเอาเอทานอลออกจากน้ำหมักแล้ว)ลักษณะเป็นเศษชิ้นเล็กๆ(particle) ความชื้นสูง จับกันเป็นก้อน

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] ของบริษัท Merck, Germany

3.2.3 กรดซัลฟูริก [H_2SO_4] ของบริษัท Merck, Germany

3.2.4 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] ของบริษัท Merck, Germany

3.2.5 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส [$Na_2HPO_4.12H_2O$]ของบริษัท Merck, Germany

3.2.6 โพแทสเซียม โซเดียมทาร์เทรต (Rocelle salt) [$KNaC_4H_4O_6.5H_2O$] ของบริษัท Fisher Scientific, England

3.2.7 โซเดียมซัลเฟต [Na_2SO_4]ของบริษัท Merck, Germany

3.2.8 ไตรโซเดียมซิเตรต [$C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$] ของบริษัท Merck, Germany.

3.2.9 กรดไฮโดรคลอริก [HCl] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

3.2.10 แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$]ของบริษัท Merck, Germany.

3.2.11 โซเดียมอาร์ซิเนต [$Na_2HAsO_4.7H_2O$] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

3.2.12 กรดซิตริค [$C_6H_8O_7.\ 2H_2O$] ของบริษัท Ajex Finechem, Australia

3.2.13 คอปเปอร์ซัลเฟต [$CuSO_4.5H_2O$] ของบริษัท Merck, Germany.

3.2.14 กลูโคส [$C_6H_{12}O_6$] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

3.2.15 เอทานอล 99 % (v/v) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

3.2.16 แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ของบริษัท Merck, Germany.

3.3 เอนไซม์

3.3.1 เอ็นไซม์เซลลูเลส ชื่อทางการค้าคือ แอคเซลเลอเรส 1500 (Accellerase^{TM}1500) ของ บริษัท Denisco , USA. (Endoglucanase activity = 5.84 หน่วยเอ็นไซม์/มิลลิลิตร, β-glucosidase activity 4.66 หน่วยเอ็นไซม์/มิลลิลิตร)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

3.4.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Gyromax™ 939XL ของบริษัท Amerex Instruments, Inc., USA.

3.4.2 เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็กปรับอุณหภูมิได้ (magnetic stirrer/hot plate) รุ่น 502P-2 ของบริษัท Mettler Toledo., USA.

3.4.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) รุ่นD-37520 Osterode ของบริษัท SORVELL Biofuge Stratos หัวปั่นเหวี่ยง (Roter) รุ่น 3334

3.4.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS spectrophotometer) รุ่น Spectronic20 Genesis ของบริษัท Spectronic Instruments, USA

3.4.5 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) ของบริษัท Lab service., Thailand.

3.4.6 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325, ของบริษัท Tomy, USA

3.4.7 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S-20K ของบริษัท Radiometer Analitical S.A., France

3.4.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digital balance) รุ่น AG204 ของบริษัท Mettler Toledo., USA.

3.4.9 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (2-digital balance) รุ่น PG 2002-5 ของบริษัท Mettler Toledo., USA.

3.4.10 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (glucose analyser) ของบริษัท YSI Co. Ltd., England

3.4.10 ตะแกรงร่อนอนุภาค (sieving) ขนาดรูพรุน 20 และ 40 เมสของ บริษัท Retesch, Germany

3.5 จุลินทรีย์

3.5.1 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.5.2 *Saccharomyces cerevisiae* G 5-7(2) เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°ซ คัดแยกได้จากตะกอนจากระบบการผลิตน้ำตาล ของโรงงานอุตสาหกรรมโคราช ที่อุณหภูมิ 40°ซ โดยนักวิจัยห้องปฏิบัติการ 405 อาคารแถบ นีละนิธิ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้เท่ากับ 42°ซ

3.6 องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6.1 สารสกัดยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Becton, Dickinson and Company., France

3.6.2 แบคโต-เปปโตน (Bacto-peptone) ของบริษัท Becton, Dickinson and Company., USA.

3.6.3 กลูโคส ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.6.4 เอการ์ (agar) ของบริษัท Becton, Dickinson and Company., France

3.7 การทดลอง

3.7.1 เส้นใยมันสำปะหลังหลังกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง

วัตถุดิบที่นำมาผลิตเอทานอล ในงานวิจัยนี้คือ เส้นใยมันสำปะหลังที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังเป็นของเหลือทิ้งหลังจากการกลั่นแยกเอาเอทานอลขณะที่เป็นเส้นใยฯแขวนลอย อยู่ในน้ำหมัก เก็บรักษาเส้นใยมันสำปะหลังฯนี้ที่อุณหภูมิ-20°ซ อบแห้งที่อุณหภูมิ 80±2°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

ทำการวัดความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ร่อนหาขนาดชิ้น (particle size) และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นต้น โดยวิธี Technical Association of the Pulp Industry (TAPPI method, 1988) ที่ กรมวิทยาศาสตร์บริการ (วศ.) (The Department of Science Service ; DSS)

3.7.2 การปรับสภาพ (Pretreatment) เส้นใยมันสำปะหลังหลังกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง

แขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯ ปริมาณ6% (w/v)ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดซัลฟูริคจำนวน 50 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121°ซ, ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 30 นาที โดยผันแปรความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์หรือสารกรดซัลฟูริก ปริมาณเส้นใยมันสำปะหลังฯที่แขวนลอยในสารละลายและระยะเวลาการให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำ หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพเพื่อให้เส้นใยมันสำปะหลังฯถูกย่อยด้วยเซลลูเลสเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดีที่สุด

3.7.3 การตรวจสอบประสิทธิผลการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยเซลลูเลส

แยกเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพแล้วตามวิธีข้อ 3.7.2 ออกจากส่วนน้ำหลังขั้นตอนการปรับสภาพ (pretreatment hydrolysate) ด้วยการกรองด้วยตะแกรงสเตนเลสขนาดรูพรุน 20เมส นำเส้นใยมันสำปะหลังฯที่แยกได้ไปแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 เติมเซลลูเลส Acellerase ™1500 (ซึ่งมี endoglucanase activity เท่ากับ 0.14 หน่วยเอ็นไซม์/ไมโครลิตร, และมี β-glucosidase activity เท่ากับ 0.056 หน่วยเอ็นไซม์/ไมโครลิตร) ปริมาตร 200ไมโครลิตร/กรัม ของเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ปรับสภาพแล้ว บ่มที่ 50°ซ เขย่าผสมที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ ความเร็วรอบ 10,500รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เอาส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส (Glucose analyser) เส้นใยมันสำปะหลังฯที่ถูกย่อยด้วยเซลลูเลส

3.7.4 การตรวจสอบแอคทิวิตีของเอ็นไซม์เซลลูเลส

3.7.4.1 ตรวจสอบแอคทิวิตีของ เอ็นไซม์เอ็นโดกลูคาเนส(Ghose, 1987)

เติมสารละลายเจือจางของเอ็นไซม์เซลลูเลส Accellerase™1500 ใน โซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงใน 2%(w/v) โดยน้ำหนักของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose; CMC) ในโซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.8ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ นาน 30 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้น ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำแข็ง และนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

3.7.4.2 ตรวจสอบแอคทิวิตีของ เอ็นไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส(Stenberg, 1977)

เติมสารละลายเจือจางของเอ็นไซม์เซลลูโลส Accellerase™1500 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในโซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.8 ลงใน 0.4%(w/v) โดยน้ำหนักของซาลิซิน (Salicin)ในโซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.8ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ นาน 30 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำแข็ง และนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

3.7.5

การหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพและปริมาณเซลลูเลสเพื่อให้ผลการย่อยได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด

ย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพที่สภาวะที่เหมาะสม ด้วยAccellerase ™1500 ตามวิธีข้อ 3.7.3 แต่แปรผันสัดส่วนระหว่างเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ปรับสภาพแล้ว และปริมาณเซลลูเลสที่ใช้ สัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดระหว่างเส้นใยมันสำปะหลังฯ และปริมาณเซลลูเลสที่ใช้ คือสัดส่วนที่ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสสูงที่สุด

3.7.6 การเตรียม *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ระยะการเจริญ mid log phase

ถ่าย 1 โคโลนีของ *S. cerevisiae* G 5-7(2) ซึ่งเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 บ่มที่ 40°ซ นาน 72 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD จำนวน 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 40°ซ เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1%(v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม แล้วบ่มที่สภาวะเดิม ถ่ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD กำหนดค่าความขุ่นเริ่มต้นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ0.05±0.002 บ่มที่สภาวะเดิม วัดค่าความขุ่นของเซลล์ทุก 30 นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์และระยะเวลาการบ่ม หาระยะเวลาการบ่มซึ่งเซลล์อยู่ในระยะ mid log phase จากกราฟที่ได้

3.7.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ของ *S. cerevisiae* G 5-7(2) แบบแยกปัจจัย (one factor at-a-time)

ถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ระยะการเจริญ mid log phase ปริมาณ 10%(v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 จำนวน 42.5 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาส์กขนาด 50 มิลลิลิตร ปิด ฟลาส์กด้วยจุกสำลี หุ้มทับสำลีด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) บ่มที่ 40°ซ ไม่เขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ ความเร็ว 13,000รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography) หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวYPD อุณหภูมิการหมัก ทีละ 1 ปัจจัย ใช้ปัจจัยที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดในการทดลองแรกในการทดลองถัดไป

3.7.8 การหาเวลาที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ในกระบวนการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯแบบSimultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

หมักเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสม โดยแขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯปริมาณ 10% (w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6.67 % (w/v) จำนวน 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วฝาเกลียวปิดสนิทขนาด 250 มิลลิลิตร (ของบริษัท Duran Co. Ltd, Germany) หลังการให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำ ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว นาน 45 นาที ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.0 ด้วยสารละลายปราศจากเชื้อ 10 N NaOH แล้วจึงเติม Accellerase™1500 จำนวน 0.392 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ปลูกเชื้อ(inoculate) *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ระยะการเจริญ mid log phase จำนวน10%(v/v) โดยแปรผันเวลาการปลูกเชื้อเป็น 0, 3 และ 6 ชั่วโมง หลังการเติมAccellerase ™1500 บ่มที่ 40° ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

3.7.9 การหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation จากเส้นใยมันสำปะหลังฯโดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2)

หมักเอทานอลจากเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกโดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) แบบกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation ตามวิธีเดียวกับข้อ **3.7.8** และปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ทันทีหลังการเติมAccellerase ™1500 (ผลจากข้อ **3.7.8**) บ่มที่ 40°ซ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง หลังการบ่ม 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

3.7.10 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากเส้นใยมันสำปะหลังฯ แบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation ด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยศึกษาแบบผลกระทบหลายปัจจัยร่วม (factors combination)

หมักเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสมด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation ตามวิธีเดียวกับข้อ **3.7.8** เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แปรผันเวลาการปลูกเชื้อหลังการเติมAccellerase ™1500 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต้องการปรับหลังการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ และอุณหภูมิในการหมัก แสดงค่าปัจจัยต่างๆที่แปรผันแสดงในตารางที่ **3.1** และ **3.2**

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าปัจจัย แปรผันที่กำหนดในกระบวนการการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯแบบSSF

ปัจจัย	ค่าต่ำ	ค่าสูง
เวลาการปลูกเชื้อหลังการเติม Accellerase ™ 1500 (นาที)	0	10
ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ปรับ	4.5	5.0
อุณหภูมิในการบ่ม (°ซ)	37	40

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองแบบศึกษาผลกระทบของหลายปัจจัยร่วม (Factorial Design)

ชุดการทดลองที่	เวลาการปลูกเชื้อหลังการเติม Accellerase TM1500 (นาที)	ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ปรับ	อุณหภูมิในการบ่ม (°ซ)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1

หมายเหตุ: แต่ละปัจจัย ค่าต่ำแทนด้วย -1 ค่าสูงแทนด้วย 1

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยมันสำปะหลัง หลังกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง

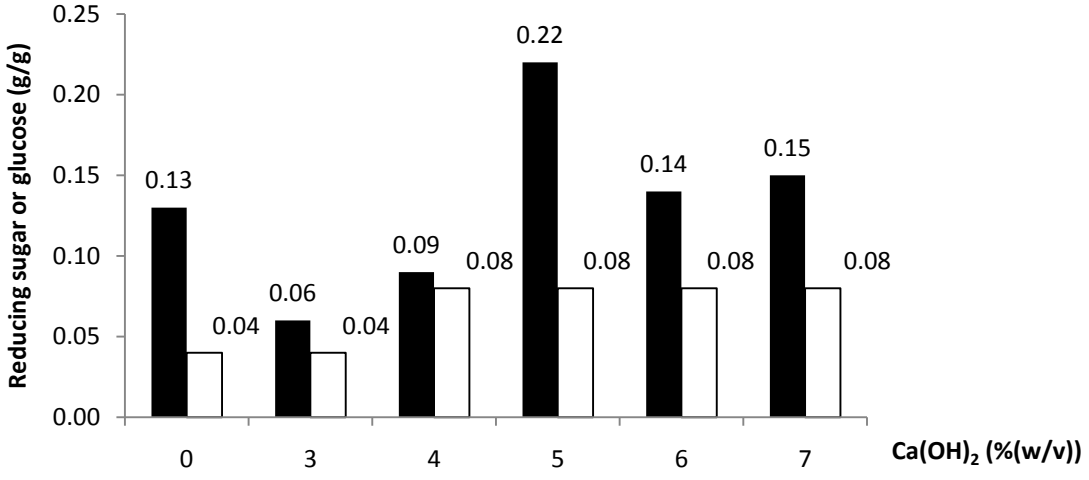
เส้นใยมันสำปะหลัง หลังกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบของการวิจัยนี้ มีความชื้นโดยเฉลี่ย 73.9% (w/w) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 ขนาดชิ้น (particle size) เท่ากับ 20-40 เมส

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ ด้วยวิธี Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI method, 1988) พบว่าประกอบสำคัญด้วย โฮโลเซลลูโลส (51.6% (w/w)) อัลฟ่าเซลลูโลส (39.8% (w/w)) เบต้าเซลลูโลส (3.8% (w/w)) แกมม่าเซลลูโลส (8.1% (w/w)) และลิกนิน (12.5% (w/w)) ของน้ำหนักแห้ง

4.2 ผลการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ เพื่อให้เซลลูเลสย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดี

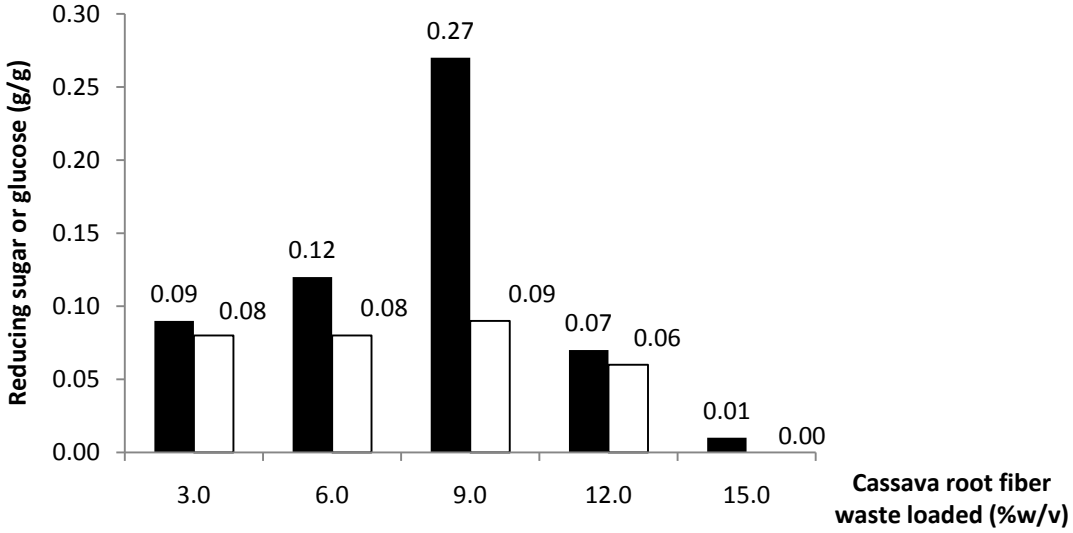
4.2.1 ผลการปรับสภาพมันสำปะหลังฯด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์

ผลการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ โดยการแขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯปริมาณ 6%(w/v) ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3%-7%(w/v) และให้ความร้อน ภายใต้ความดันไอน้ำที่ 121°ซ 15ปอนด์/ตร.นิ้ว 30 นาที แล้วนำเส้นใยมันสำปะหลังที่ปรับสภาพแล้วไปย่อยด้วย Accellerase™1500 จำนวน 1.17 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง บ่มที่ 40°ซ นาน 6 ชั่วโมง พบว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5%(w/v) ให้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 0.22 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่เส้นใยมันสำปะหลังฯที่ปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4%(w/v) จะให้น้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเท่ากับ 0.08 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ดังแสดงใน**ภาพที่ 4.1** เส้นใยมันสำปะหลังฯถูกย่อยด้วยเซลลูเลสเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดีที่สุดเมื่อแขวนลอยในปริมาณ 6%(w/v) ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น4%(w/v) หรือเมื่อใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัมปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ 1.5 กรัม



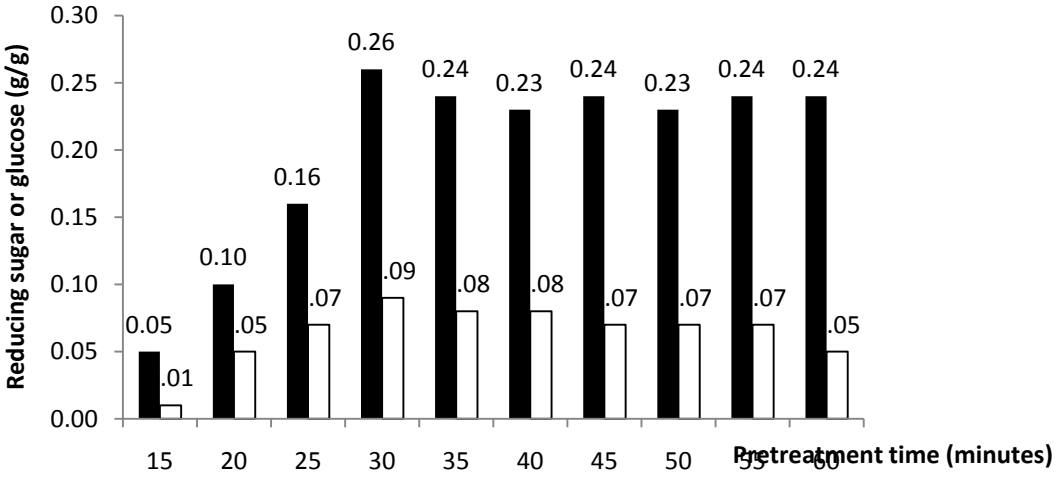
ภาพที่ 4. 1 : ผลของความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์
ซึ่งใช้แขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯต่อประสิทธิผลการย่อยของเซลลูเลส(Reducing sugar (■),Glucose(□))

ผลการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้แคลเวียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัมต่อ 1.5 กรัมของเส้นใยมันสำปะหลังฯ แต่แปรผันปริมาณเส้นใยมันสำปะหลังฯที่แขวนลอยในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็น 3, 6, 9, 12และ 15%(w/v) เมื่อนำเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเซลลูเลส 1.17 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ที่ 50°ซ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 นาน 6 ชั่วโมง พบว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งแขวนลอยในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 9%(w/v) ให้น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเท่ากับ 0.27 และ 0.09 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงใน**ภาพที่ 4.2**



ภาพที่4.2 : ผลของปริมาณเส้นใยมันสำปะหลังฯที่แขวนลอยในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม ปรับสภาพ 1.5 กรัมของเส้นใยมันสำปะหลังฯต่อประสิทธิผลการย่อยของเซลลูเลส(Reducing sugar (■),Glucose(□))

ผลการแปรผันระยะเวลาการให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำที่121 °ซ ความดัน 15ปอนด์/ตร.นิ้ว ในขั้นตอนการปรับสภาพโดยแขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ปรับสภาพโดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม ต่อเส้นใยมันสำปะหลังฯ 1.5 กรัม หรือแขวนลอย 9%(w/v)เส้นใยมันสำปะหลังฯในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6%(w/v) จาก**ภาพที่ 4.3** พบว่าเส้นใยมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพเป็นเวลา 30 นาทีเมื่อนำมาย่อยด้วยเซลูเลส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะให้น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลน้ำตาลสูงที่สุดเท่ากับ 0.26 และ 0.09 กรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ



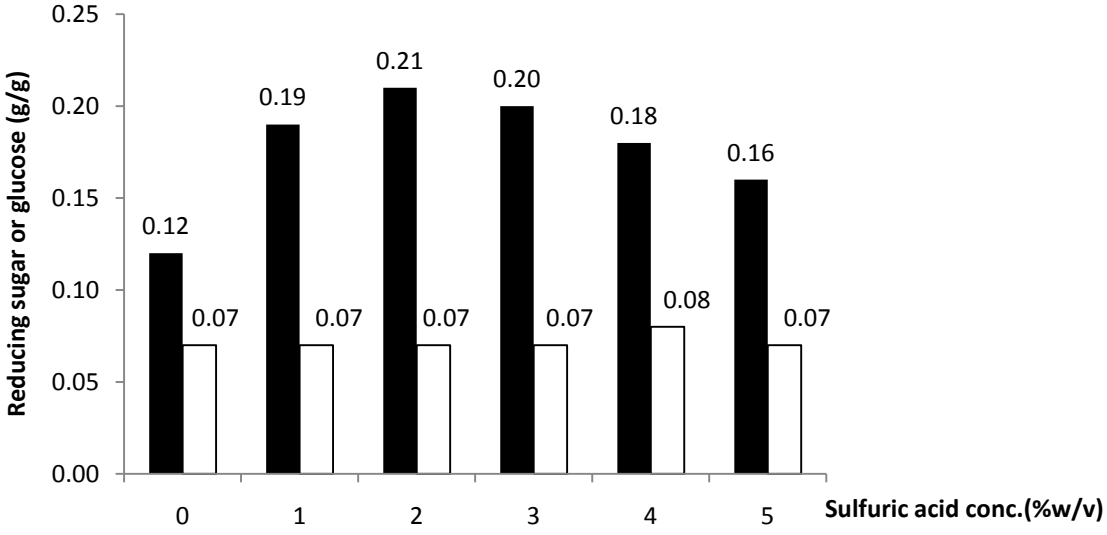
ภาพที่ 4.3 : ผลของเวลาในการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯเมื่อแขวนลอย(9%(w/v) ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6%(w/v) ต่อประสิทธิผลการย่อยของการย่อยของเซลลูเลส(Reducing sugar (■),Glucose(□))

โดยสรุปคือ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพ เส้นใยมันสำปะหลังฯด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ คือ แขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯ ปริมาณ 9% (w/v) ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6%(w/v) และให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำด้วย เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว นาน 30 นาที เส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพที่สภาวะนี้ เมื่อนำมาย่อยด้วย Accellerase™1500 จำนวน 1.17 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ที่ 50°ซ นาน 6 ชั่วโมง จะได้น้ำตาลกลูโคส 0.09 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

4.2.2 ผลการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วย กรดซัลฟูริก

แขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯ ปริมาณ 6%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1-6%(w/v)แล้วนำไปให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ ความเร็ว10,500 รอบ/นาที นาน 20 นาที เพื่อแยกเอาเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มาย่อยด้วย Accellerase™1500 จำนวน 1.17 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง โดยแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทเข้มข้น 100

มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 บ่มที่ 50°ซ นาน 6 ชั่วโมง พบว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งผ่านการปรับสภาพโดยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2%(w/v) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เท่ากับ 0.21 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่เส้นใยมันสำปะหลังฯ ซึ่งปรับสภาพด้วยสารละลายซัลฟูริก 4%(w/v) ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 0.08 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ดังแสดงใน**ภาพที่ 4.4** เส้นใยมันสำปะหลังฯถูกย่อยด้วยเซลลูเลสเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดีที่สุด เมื่อแขวนลอยปริมาณ 6%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 4%(w/v) หรือเมื่อใช้กรดซัลฟูริก 1 กรัม ปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ 1.5 กรัม

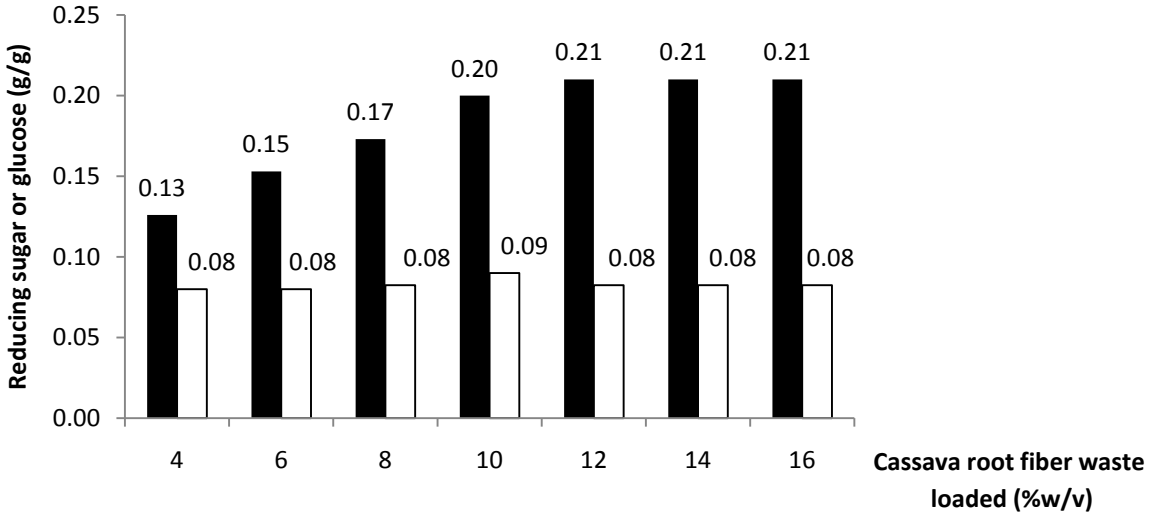


ภาพที่ 4.4 : ผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริกซึ่งใช้ปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ ต่อความไวของเส้นใยมันสำปะหลังฯ ต่อการถูกย่อยด้วยเซลลูเลส(Reducing sugar (■),Glucose(□))

เมื่อแปรผันปริมาณของเส้นใยมันสำปะหลังฯ ซึ่งแขวนลอยในสารละลายกรดซัลฟูริกเป็น 4, 6, 8, 10, 12, 14, และ16%(w/v) ใช้ 1 กรัมของกรดซัลฟูริกปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลัง 1.5 กรัม ตามวิธีข้างต้น พบว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งผ่านการปรับสภาพโดยแขวนลอยในปริมาณ 12%(w/v) ในสารละลายซัลฟูริก เมื่อนำมาย่อยด้วยเซลลูเลสตามวิธีข้างต้น จะให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 0.21 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

แต่จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 0.09 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง หากแขวนลอยในสารละลายกรดซัลฟูริกที่ปริมาณ 10%(w/v) ดังแสดง**ภาพที่ 4.5**

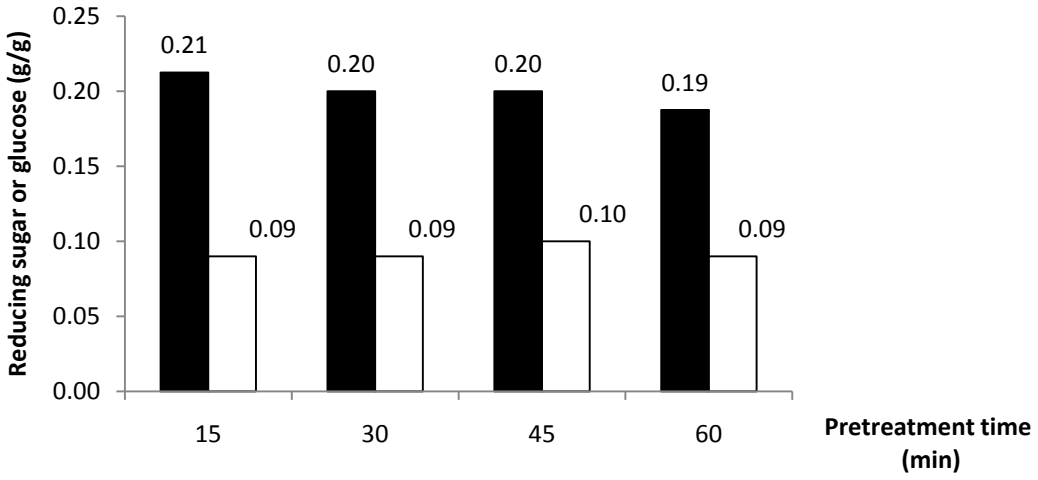
ปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯโดยแขวนลอยที่ปริมาณ 10%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริก ให้ 1 กรัมของกรดซัลฟูริก ปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ 1.5 กรัม (หรือแขวนลอย 10%(w/v) เส้นใยมันสำปะหลังฯ ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6.67%(w/v)) ในการทดลองถัดไป



ภาพที่ 4.5 : ผลของปริมาณเส้นใยมันสำปะหลังฯ ซึ่งแขวนลอยในสารละลายกรดซัลฟูริกในขั้นตอนการปรับสภาพ ใช้ 1 กรัมของกรดซัลฟูริกปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลัง 1.5 กรัม ต่อประสิทธิผลการย่อยของเซลลูเลส(Reducing sugar (■),Glucose(□))

ผลการแปรผันระยะเวลาการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพโดยแขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯ 10%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6.67%(w/v) เป็น 15, 30, 45, และ 60 นาที พบว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ปรับสภาพเป็นเวลา 15 นาที ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.21

กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่ให้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 0.10 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อปรับสภาพเป็นเวลา 45 นาที ดังแสดงใน**ภาพที่ 4.6**



ภาพที่ 4.6 : ผลของระยะเวลาการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯเมื่อแขวนลอยปริมาณ 10%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริก (เส้นใยมันสำปะหลังฯ 1.5 กรัม/กรัมของกรดซัลฟูริก)ต่อประสิทธิผลการย่อยของเซลลูเลส(Reducing sugar (■),Glucose(□))

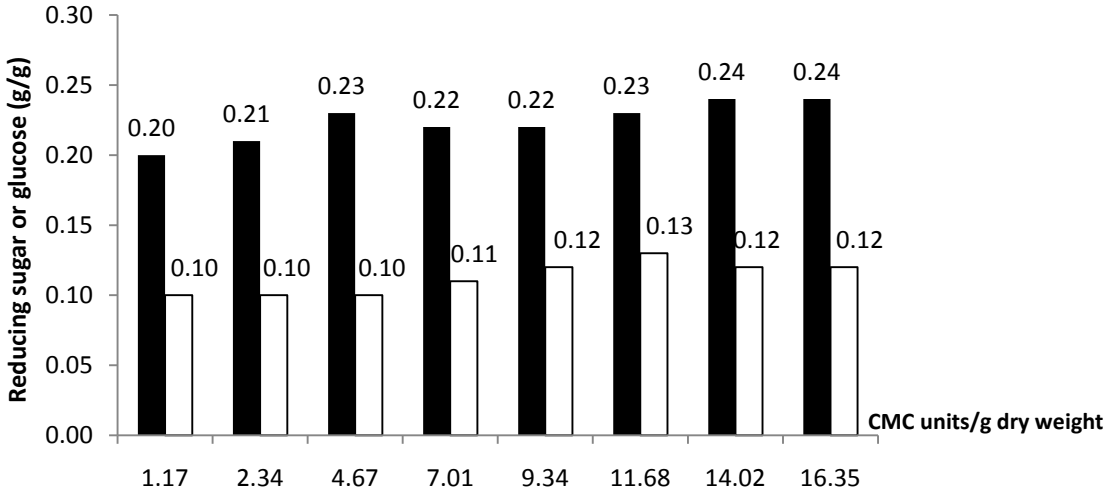
โดยสรุปคือ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพ เส้นใยมันสำปะหลังฯด้วยกรดซัลฟูริก คือแขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯ ปริมาณ 10%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6.67%(w/v) และให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121°ซ ความดัน 15ปอนด์/ตร. นิ้ว นาน 45 นาที เส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพที่สภาวะนี้ เมื่อนำมาย่อยด้วย Accellerase™1500 จำนวน 1.17หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ที่ 50°ซ นาน 6 ชั่วโมง จะได้น้ำตาลกลูโคส 0.10 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

4.3 ผลการหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างเส้นใยมันสำปะหลังฯ

ที่ผ่านการปรับสภาพและปริมาณเซลลูเลสเพื่อให้ผลการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด

เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดจากการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสม ด้วย Accellerase™1500

ทำโดยแขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาณ 10%(w/v) แล้วแปรผันปริมาณAccellerase™1500 ที่ใช้เป็น 1.17, 2.34, 4.67, 7.01, 9.34, 11.68, 14.02 และ 16.35 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง บ่มที่ 50°ซ เขย่าผสมที่ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อปั่นเหวี่ยงแยกส่วนน้ำที่ได้จากการย่อยออกจากเส้นใยมันสำปะหลังฯ ที่เหลืออยู่ ที่ 10,500 รอบ/นาที 4°ซ 20นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น พบว่าได้น้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเท่ากับ 0.13 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อย่อยด้วย Accellerase™1500 จำนวน 11.68 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ดังแสดงใน**ภาพที่ 4.7**

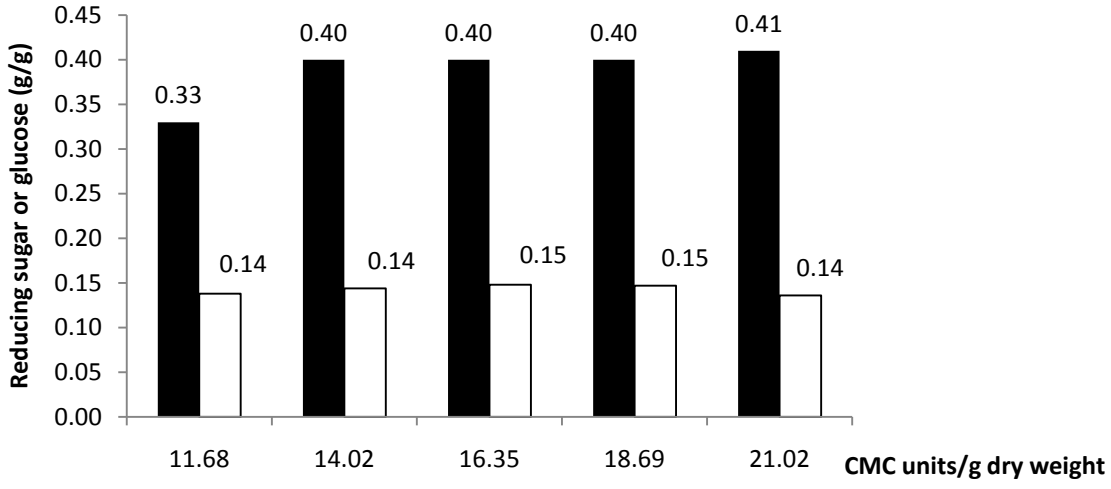


ภาพที่ 4.7 :

ผลของปริมาณเซลลูเลสที่ใช้ย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสม

เมื่อแขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯในสารละลายบัฟเฟอร์ต่อปริมาณน้ำตาลที่ได้ (Reducing sugar (■),Glucose(□))

แต่เมื่อย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯ ซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสม โดยไม่ปั่นเหวี่ยงแยกเส้นใยมันสำปะหลังฯออกจากพรีทรีตเมนต์ไฮโดรไลเซต(pretreatment hydrolysate)แล้วนำไปแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์ แต่ทำการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งผ่านการปรับสภาพ ขณะแขวนลอยในพรีทรีตเมนต์ไฮโดรไลเซต โดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารแขวนลอยหลังกระบวนการปรับสภาพเป็น 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10โมลาร์ แล้วจึงเติม Accellerase™1500 โดยแปรผันปริมาณเอ็นไซม์ที่ใช้เป็น 11.68, 14.02, 16.35, 18.69 และ 21.02 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อปั่นเหวี่ยงแยกเส้นใยมันสำปะหลังฯออกแล้วนำส่วนน้ำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น 0.15 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเพิ่มปริมาณAccellerase™1500 ที่ใช้จาก 11.68 เป็น 16.35 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง **(ภาพที่ 4.8)**



ภ า พ ที่ 4.8 :
ผลของปริมาณเซลลูเลสที่ใช้ย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสม ขณะเส้นใยมันสำปะหลังฯแขวนลอยในพรีทรีตเมนท์ไฮโดรไลเซต ต่อปริมาณน้ำตาลที่ได้(Reducing sugar (■),Glucose(□))

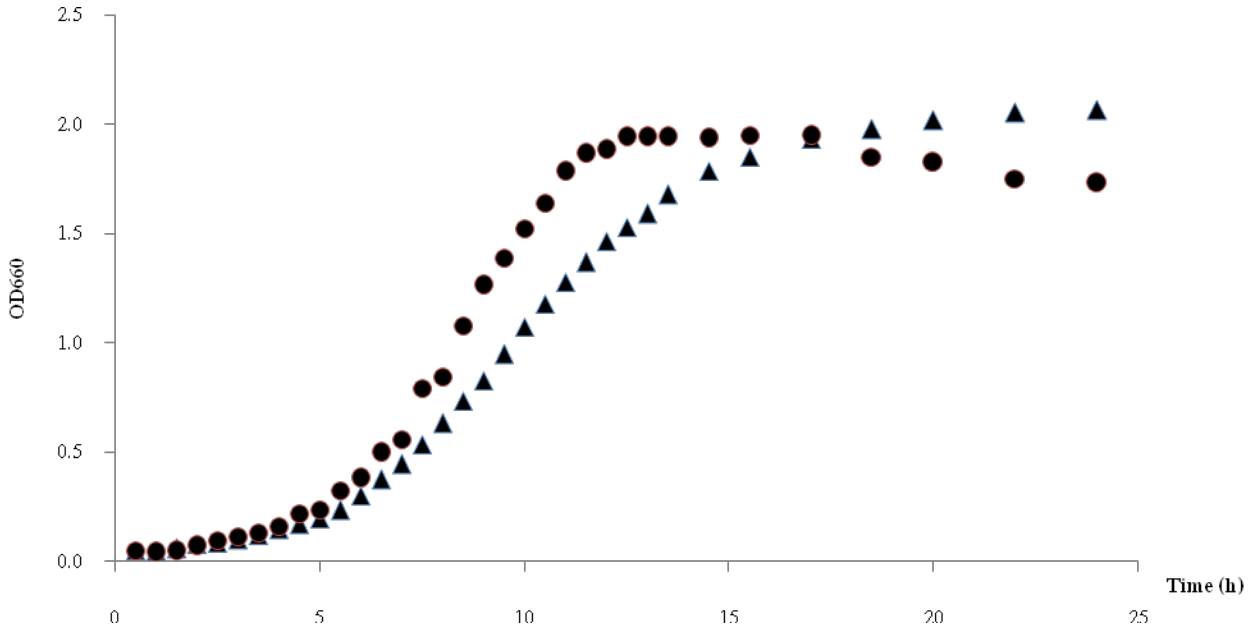
โดยสรุปคือการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับด้วยกรดวัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสมจะได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด (1.5 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) เมื่อย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯ ขณะแขวนลอยในพรีทรีตไฮโดรไลเซตด้วย Accellerase™1500 ปริมาณ 16.35 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ที่ 50°ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

4.4 ผลการสร้างเส้นโค้งการเจริญ (growth curve) ของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2)

S. cerevisiae G 5-7 (2) เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่ 40°ซ ประสิทธิผลการหมักเอทานอลจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15%(w/v) ที่ 40° ซ เป็นเวลา 48ชั่วโมง ให้เอทานอล 54.49 กรัม/ลิตร

สร้างเส้นโค้งการเจริญ(growth curve)ของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยการปลูก(inoculate) โคโลนีของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) จำนวน 1โคโลนี ซึ่งเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่ 40°ซ นาน 72 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 จำนวน 50มิลลิลิตร บรรจุในฟาล์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 40°ซ เขย่าให้อากาศ 200รอบ/นาที 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม ปริมาณ 1%(v/v) บ่มในสภาวะเดิม 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมอีกครั้ง แต่กำหนดค่าความขุ่นเริ่มต้นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร หลังการปลูกเชื้อเท่ากับ 0.05 บ่มที่สภาวะเดิม ติดตามการเจริญของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) จากค่าความขุ่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ตามระยะเวลาการบ่ม นำค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรและระยะเวลาการบ่มมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์จะได้เส้นโค้งการเจริญ พบว่า *S. cerevisiae* G

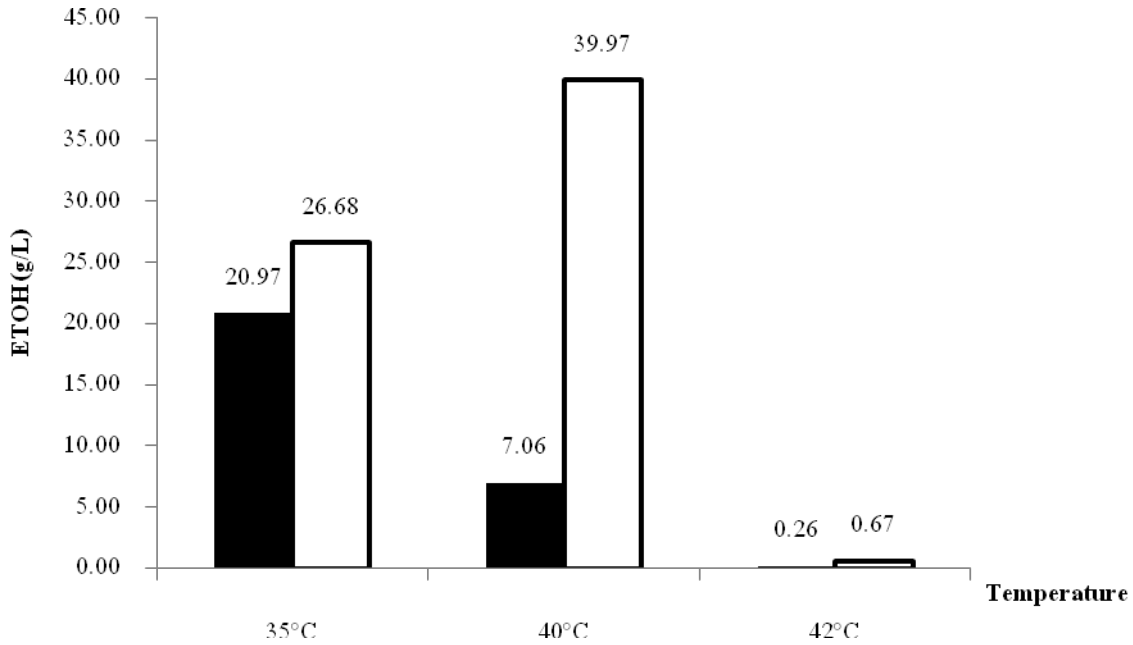
5-7 (2)อยู่ในระยะการเจริญ mid log phase หลังการบ่ม 8 ชั่วโมง ดังแสดงใน**ภาพที่ 4.9** เลือกใช้เซลล์ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ในระยะmid log phase เป็นเชื้อเริ่มต้นเพื่อการหมักเอทานอลในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.9 : เส้นโค้งการเจริญแของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) (●) และของ*S. cerevisiae* TISTR 5596 (▲),ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่ 40°ซ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ที่ 40°ซ

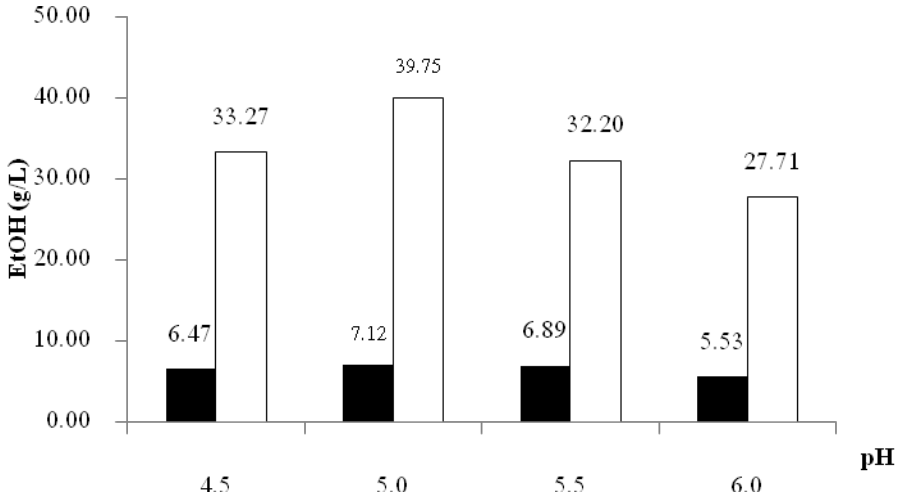
4.5 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2)แบบแยกปัจจัย (one factor at-a-time)

เตรียมสารแขวนลอยเซลล์(cell suspension) ของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ระยะmid log phase ตามวิธีข้างต้น ถ่ายโอน *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ระยะการเจริญ mid log phase ปริมาณ 10%(v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.0 บ่มที่ 35, 40, 42 °ซ ในสภาวะจำกัดออกซิเจนโดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD 42.5 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดฟาล์กด้วยจุกสำลี ปิดทับจุกสำลีด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ไม่เขย่าฟลาส์ก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกที่ 13,000 รอบนาที 4°ซ นาน 20 นาที เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธี Gas Chromatography พบว่า *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ผลิต เอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 39.97 กรัม/ลิตร เมื่อบ่มที่ 40°ซ **(ภาพที่ 4.10)**



ภาพที่ 4.10 : แสดงผลของอุณหภูมิการหมักต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* TISTR 5596 (■) และ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) (□)

ผลการหมัก อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ซึ่งแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ 40°ซ ตามวิธีข้างต้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าได้เอทานอลสูงสุด 39.75 กรัม/ลิตร เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 **(ภาพที่4.11)**



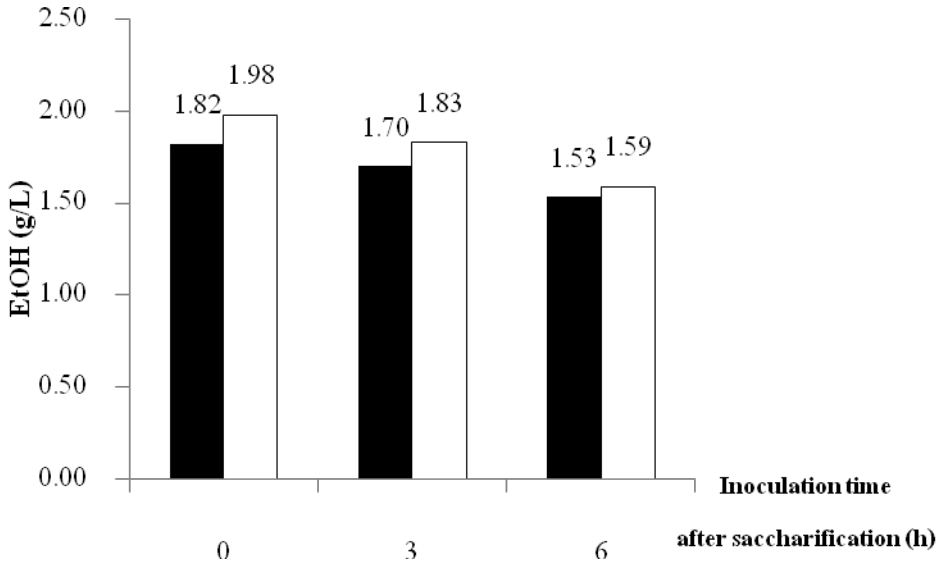
รูปที่4.11: ผลของค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวYPD ต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* TISTR 5596 (■) และ, *S. cerevisiae* G 5-7 (2) (□)

โดยสรุปสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) คือที่ 40°ซ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0

4.6 ผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2)

ในกระบวนการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation

ผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสมโดยกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) ด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ระยะการเจริญ mid log phase ปริมาณเชื้อเริ่มต้น10%(v/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ที่ 40°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแปรผันเวลาการปลูกเชื้อหลังการเติมAccellerase™1500 เป็น 0, 3, และ6 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์เอทานอลที่เกิดขึ้น พบว่าการปลูกเชื้อพร้อมกับการเติม Accellerase™1500 จะให้เอทานอลสูงที่สุดคือ 1.98 กรัม/ลิตร (**ภาพที่ 4.12**)

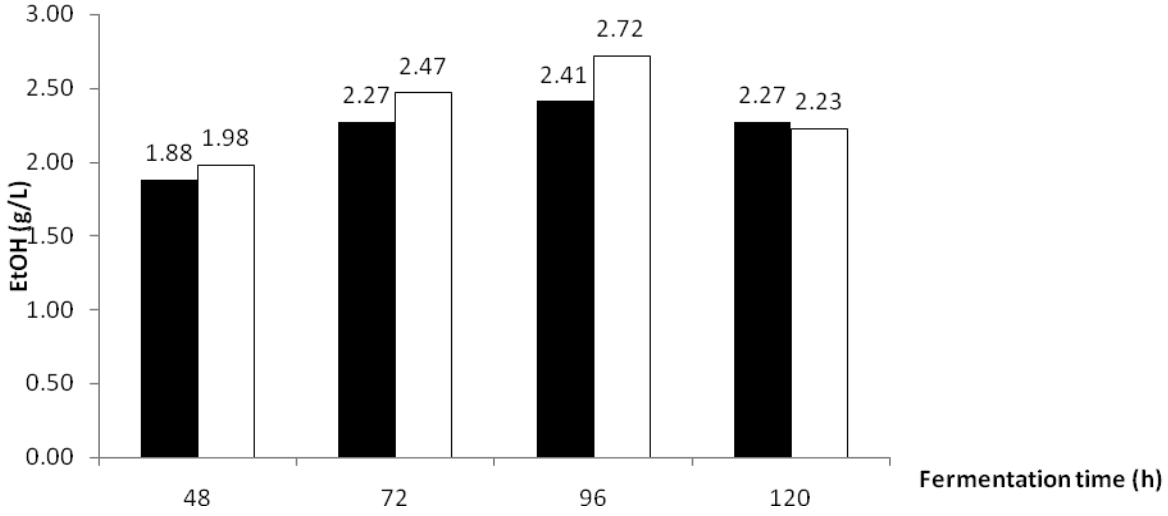


ภาพที่4.12 : ผลของเวลาการปลูกเชื้อหลังการเติม Accellerase™1500

ในกระบวนการหมักเอทานอลจากเส้นใยมันสำปะหลังฯแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) ต่อปริมาณเอทานอล (*S. cerevisiae* TISTR 5596 (■) และ, *S. cerevisiae* G 5-7 (2) (□))

4.7 ผลการหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) จากเส้นใยมันสำปะหลังฯโดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2)

ผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสมแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) ตามวิธีเดียวกับข้อ **4.6** แต่ปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) พร้อมกับการเติม Accellerase™1500 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง หลังการบ่ม48, 72, 96, และ 120 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์เอทานอล พบว่าได้เอทานอลสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 2.72 กรัม/ลิตร **(ภาพที่ 4.13)**



ภาพที่4.13: ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณเอทานอลที่ได้เมื่อหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วย*S. cerevisiae* TISTR 5596 (■)และ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) (□)โดยการกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) ที่ 40°ซ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0

4.8 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation จากเส้นใยมันสำปะหลังฯ โดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยการศึกษาผลกระทบของหลายปัจจัยร่วม (factor combination)

ผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยมันสำปะหลังฯ ซึ่งปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่สภาวะเหมาะสมด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation เป็นเวลา 96ชั่วโมง โดยแปรผันเวลาการปลูกเชื้อหลังการเติม Accellerase™1500 ค่าความเป็นกรดด่างที่ปรับหลังการปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ อุณหภูมิการหมัก ตามชุดการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 2.72 กรัม/ลิตร เมื่อปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ทันทีหลังการเติมเซลลูเลส ค่าความเป็นกรดด่างที่ปรับเท่ากับ5.0 และบ่มที่ 40°ซ ดังแสดงในตารางที่ **4.1**

ตาราง 4.1 ผลของเวลาการปลูกเชื้อหลังการเติมเซลลูเลส ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิการหมัก ต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) แบบ SSF

Run No.	**เวลาการปลูกเชื้อหลังการเติมAccellerase™1500 (นาที)**	**ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ปรับ**	**อุณหภูมิการหมัก (°ซ)**	**เอทานอล (กรัม/ลิตร)**
1	0	4.5	37	2.33
2	0	4.5	40	2.09
3	0	5.0	37	1.96
4	0	5.0	40	2.72
5	10	4.5	37	1.55

6	10	4.5	40	1.55
7	10	5.0	37	1.92
8	10	5.0	40	1.57

เมื่อนำผลของปริมาณเอทานอลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Statistix 9.0 เพื่อหาปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการหมักแบบSimultaneous Saccharification and Fermentation โดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) (ตารางที่ **4.2**)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน(Co-efficient) และP-valueของปัจจัยที่ศึกษา

ปัจจัยที่ศึกษา	**สัมประสิทธิ์ของการแปรผัน**	**P-value**
เวลาการปลูกเชื้อหลังการเติม Accellerase™ 1500	-0.31375	0.0446
ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ปรับ	0.08125	0.4959
อุณหภูมิ	0.02125	0.8544

เมื่อกำหนดให้ปัจจัยมีผลต่อการผลิตเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่า P-value ต่ำกว่า 0.01 จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ทั้ง 3 ปัจจัยที่ระดับที่ทดสอบไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากเส้นใยมันสำปะหลังฯโดย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่ายิ่งเวลาการปลูกเชื้อห่างจากเวลาการเติมเซลลูเลสก็จะยิ่งทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลง การลดอุณหภูมิการหมักจาก 40°ซ เป็น 37°ซ มีผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตลดลงมากกว่าการลดค่าความเป็นกรด-ด่างจาก 5.0 เป็น 4.5

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลัง หลังกระบวนการผลิตเอทานอล ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าสภาวะที่ทำให้เส้นใยมันสำปะหลังฯถูกย่อยด้วยเซลลูเลส (Accellerase™1500) ไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดีที่สุดคือ แขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลัง 9%(w/v) ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 6%(w/v) ให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำที่ 121°ซ ความดัน 15ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 30 นาที เมื่อย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งปรับสภาพที่สภาวะนี้ด้วย Accellerase™1500 ปริมาณ 1.17 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ที่ 50°ซ นาน 6 ชั่วโมง จะได้น้ำตาลกลูโคส 0.09 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

การปรับสภาพเส้นใยมันสำปะหลังฯ ด้วยกรดซัลฟูริก พบว่าสภาวะที่ทำให้เส้นใยมันสำปะหลังฯถูกย่อยด้วยเซลลูเลสได้ดีที่สุดคือ แขวนลอยเส้นใยมันสำปะหลังฯ ปริมาณ 10%(w/v) ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6.67%(w/v) แล้วให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 45 นาที เมื่อนำเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ปรับสภาพแล้วนี้มาย่อยด้วย Accellerase™1500 ปริมาณ 1.17 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ที่ 50°ซ นาน 6 ชั่วโมง จะได้น้ำตาลกลูโคส 0.10 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส(lignocellulose) ด้วยด่างหรือกรด ทำให้เซลลูเลสสามารถย่อยเซลลูโลสในโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดีขึ้น เพราะด่างละลายลิกนินออกมาจากลิกโนเซลลูโลสและทำให้โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสบวมพองขึ้น เซลลูเลสจึงสามารถแทรกซึมเข้าไปย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้มากขึ้น ในขณะที่กรดสามารถละลายเฮมิเซลลูโลสออกมาจากลิกโนเซลลูโลส ทำให้เซลลูเลสสามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสได้ นอกจากนี้กรดยังย่อยพันธะไกลโคซิดิกของเซลลูโลส ทำให้โครงสร้างเซลลูโลส แบบ Crystalline กลายเป็นแบบ Amorphous ซึ่งถูกย่อยโดยเซลลูเลสได้ง่ายขึ้น(Taherzadeh และ Karimi, 2007)การที่เส้นใยมันสำปะหลังฯ ซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดถูกย่อยด้วยเซลลูเลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้มากกว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ปรับสภาพด้วยด่าง น่าจะเกิดจากการที่กรดเปลี่ยนโครงสร้างของเซลลูโลสไปเป็นชนิด Amorphous ไม่มีปัญหาของลิกนินที่ถูกละลายออกมาไปจับกับเซลลูเลส ทำให้ปริมาณเซลลูเลสที่สามารถย่อยเซลลูเลสที่สามารถย่อยเซลลูโลสลดลงได้นอกจากนั้นกรดยังสามารถย่อยพันธะไกลโคซิดิกในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้ได้ผลลัพธ์เป็นน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่สูงกว่า (Morjanoff และ Gray, 1987)

จากการวิเคราะห์แอคทิวิตีของเอ็นไซม์เซลลูเลสพบว่า แอคทิวิตีของเอ็นโดกลูคาเนสและเบต้ากลูโคซิเดส มีค่าหน่วยเอ็นไซม์(5.84 และ 4.66 หน่วยเอ็นไซม์/กรัมเส้นใยมันสำปะหลังฯ ตามลำดับ) ใกล้เคียงกัน หรือ มีสัดส่วนเท่ากับ 1: 1 ซึ่งส่งผลต่อต่อระบบการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส เมื่อหน่วยเอ็นไซม์กลุ่มย่อยทั้ง 2 ชนิดนี้ มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ส่งผลให้การยับยั้งอันเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น(Product inhibition) ลดลง เพราะปริมาณของเซลโลไบโอสที่เป็น ตัวยับยั้งทุติยภูมิ (Secondary inhibition) และ ตัวยับยั้งปฐมภูมิ (Primary inhibition)คือกลูโคสมีปริมาณใกล้เคียงกัน และทำให้ระบบการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังด้วยเอ็นไซม์เซลลูเลสที่มีสัดส่วนของเอ็นไซม์กลุ่มย่อย 2 ชนิดเท่ากับ 1 : 1 ดำเนินไปอย่างสมดุลมากกว่าการใช้เอ็นไซม์เซลลูเลส ที่มีสัดส่วนของเอ็นไซม์กลุ่มย่อย 2 ชนิดที่แตกต่างกัน(Duff และคณะ, 1986) เพราะอาจทำให้ ปริมาณของตัวยับยั้งทุติยภูมิอย่างเซลโลไบโอส

มีปริมาณสูงกว่ากลูโคส และไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์เอ็นโดกลูคาเนส ส่งผลให้การย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วยเอ็นไซม์เซลลูเลสหยุดลงได้ ดังนั้น แม้สัดส่วนของเอ็นไซม์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เหมาะสม แต่ได้ปริมาณของกลูโคสต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ใช้เส้นใยมันสำปะหลังเป็นแหล่งผลิตเอทานอล เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้(Kesornsit, 2007) อาจเป็นเพราะเส้นใยมันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นวัตถุดิบที่ได้รับภายหลังกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง ทำให้พรีทรีตท์เมนท์ไฮโดรไลเซตที่ได้ภายหลังการปรับสภาพ เป็นไปได้ว่า มีเอทานอล หรือตัวยับยั้ง ปะปนอยู่ เพราะมีงานวิจัยที่พบว่า แม้กระทั่งน้ำตาลบางชนิดอย่าง แมนโนส ไซโลส และกาแลคโทส สามารถต่อเอ็นไซม์เซลลูเลส โดยลดอัตราการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ได้อีกด้วย (Xiao และคณะ, 2004)

เมื่อเพิ่มปริมาณ Accellerase™1500 ที่ใช้ย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก พบว่าการเพิ่มปริมาณ Accellerase™1500 ในกระบวนการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯเป็น 11.68 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัม จะทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นเป็น 0.13 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ต้องเพิ่มDigestion เรื่องสัดส่วนβ-glucosidase นอกจากนี้หากทำการย่อยเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกในสภาพที่เส้นใยมันสำปะหลังฯยังคงแขวนลอยอยู่ในพรีทรีตเมนท์ไฮโดรไลเซต (pretreatment hydrolysate) และเพิ่มปริมาณ Accelllerase™1500 ที่ใช้ย่อยเป็น 16.35 หน่วยเอ็นไซม์ซีเอ็มซี/กรัมน้ำหนักแห้งด้วย พบว่าทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อย เพิ่มขึ้นเป็น 0.15 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นนี้น่าจะมาจากการที่ Accellerase™1500 สามารถย่อยน้ำตาลสายยาวที่ละลายอยู่ในพรีทรีตเมนท์ไฮโดรไลเซตที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก เป็นน้ำตาลกลูโคส

เมื่อเทียบกับความเป็นจริง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยมันสำปะหลังฯ พบว่ามีเซลลูโลสปริมาณ 40%(w/w) (หรือ 0.4กรัม/กรัม เส้นใยมันสำปะหลังฯ) หรือกลูโคสที่ได้สูงสุดจากเส้นใยมันสำปะหลัง พบว่าได้ 15%(w/w) หรือ(0.15 กรัม/กรัมเส้นใยมันสำปะหลัง) แสดงว่าเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ใช้ในการวิจัยนี้ให้กลูโคสเทียบจากตามค่าที่ควรได้ความจริง(%conversion)เท่ากับ 37.5%(w/w) ของเซลลูโลสในเส้นใยมันสำปะหลังฯ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูญเสียไป

อาจจะเกิดจากปัญหาตัวยับยั้ง (Inhibitors) ที่ติดมากับเส้นใยมันสำปะหลังฯ เพราะโรงงานผลิตเอทานอลดังกล่าวใช้กระบวนการผลิตเอทานอลที่ต่างจาก โรงงานผลิตเอทานอลอื่นๆ คือ นำมันเส้น เข้าไปกลั่นเอทานอลด้วย และสุดท้ายของกระบวนการผลิต จะได้เส้นใยมันสำปะหลังออกมาภายหลัง ในขณะที่โรงงานผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโรงงานอื่น มีการแยก เส้นใยมันสำปะหลังออกก่อนนำส่วนน้ำแป้งมันสำปะหลังไปผลิตเอทานอล จากปัญหาตัวยับยั้งที่เกิดขึ้น อาจส่งผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส เนื่องจากไปลดความจำเพาะระหว่างเอ็นไซม์กับสารตั้งต้นได้ (McMillan, 1994)

การเลี้ยง*S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ 40°ซ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 พบว่า จะเข้าสู่ระยะ mid log phase ภายใน 8 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาเส้นโค้งของการเจริญเทียบกับสายพันธุ์ควบคุมพบว่า สายพันธุ์ทนร้อน S. cerevisiae G 5-7(2) เจริญเติบโตเร็วกว่าสายพันธุ์ควบคุม ผลการหมักเอทานอลจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ระยะการเจริญ mid log phase จำนวน 10%(v/v) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ 40°ซ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0

ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง ด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยกระบวนการSimultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) ที่ 40°ซ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 โดยแปรผัน เวลาการปลูกเชื้อ (inoculate) หลังการเติมเซลลูเลสและระยะเวลาการหมักแบบที่ละปัจจัย พบว่าการปลูกเชื้อทันทีหลัง การเติมเซลลูเลส หมักนาน 96 ชั่วโมง จะได้เอทานอลสูงสุด 2.72 กรัม/ลิตรหรือ 2.72%(w/w) โดยน้ำหนักของเส้นใยมันสำปะหลัง เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยที่เอามันสำปะหลังมีแป้ง มาย่อยแป้งออก แล้วนำส่วนกากมันสำปะหลังที่ได้มาย่อยด้วยเอ็นไซม์เอ็นโดกลูคาเนส 15.98 หน่วยเอนไซม์ มีค่าเอทานอลมากกว่า เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีปริมาณมากกว่า และสายพันธุ์ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ใช้ในการหมักเอทานอล สามารถทนต่อความร้อนได้มากกว่าสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่ใช้รวมถึงใช้เวลาการหมักมากกว่า (Kesornsit, 2007)

เมื่อศึกษาผลของการแปรผัน เวลาการปลูกเชื้อหลังการเติมเซลลูเลส ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิการหมักที่มีต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักเส้นใยมันสำปะหลังฯด้วย *S. cerevisiae* G 5-7 (2) โดยกระบวนการหมักแบบ SSF แบบหลายปัจจัยร่วม (factor combination) ทั้งนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของการทำงานของAccellerase™1500 และการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) คือ 5.0 อุณหภูมิสูงสุดที่ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) สามารถเจริญได้คือ 42°ซ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของ S. *cerevisiae* G 5-7(2) คือ 40°ซ และประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ที่ 42°ซ ลดต่ำกว่าที่ 40°ซ ถึง 98.3%(w/w) (ภาพที่ 4.10)

เมื่อพิจารณาจากปริมาณเอทานอลที่ได้จาก 2 สายพันธุ์ พบว่า เมื่อหมักเอทานอลด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ให้ผลเอทานอลที่ต่างกันระหว่าง 2 สายพันธุ์อย่างชัดเจน คือ สายพันธุ์ทนร้อน *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ให้ผลเอทานอลดีกว่า (ภาพที่4.10 และ 4.11) แต่เมื่อหมักเอทานอลด้วยพรีทรีตเมนท์ไฮโดรไลเซต พบว่า ผลเอทานอลจาก 2 สายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน(ภาพที่4.12 และ 4.13)เมื่อเทียบจากการหมักเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แม้ความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากสายพันธุ์ทนร้อน *S. cerevisiae* G 5-7 (2) สูงกว่าสายพันธุ์ควบคุมก็ตาม เนื่องจาก อาจเป็นเพราะสภาวะที่หมักเอทานอลโดยใช้พรีทรีตเมนท์ไฮโดรไลเซตส่งผลดีต่อการผลิตเอทานอลของสายพันธุ์ควบคุม แต่ผลเสียต่อการผลิตเอทานอลของสายพันธุ์ทนร้อน *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ซึ่งองค์ประกอบใน พรีทรีตเมนท์ไฮโดรไลเซตเป็นปัจจัยที่ควรศึกษาต่อไป เพราะเป็นไปได้ที่มีสารยับยั้งละลายอยู่ในพรีทรีทต์เมนท์ไฮโดรไลเซตและส่งผลต่อการหมักด้วยเชื้อสายพันธุ์ทนร้อน *S. cerevisiae* G 5-7 (2) เพราะอาจส่งผลต่อแรงดันออสโมซิสของเชื้อ รวมถึงยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Maiorella และคณะ, 1983)

การศึกษาถึงผลของการแปรผันเวลาการปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) หลังการเติมเซลลูเลส เนื่องจาก กระบวนการ SSF โดยทั่วไปจะปลูกเชื้อลงไปทันทีพร้อมกับเอ็นไซม์เซลลูเลส แต่ในช่วงเริ่มต้นการหมักเอทานอล อาจจะมีน้ำตาลกลูโคสน้อยเกินไปที่จะเพียงพอต่อการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) ได้ จึงต้องการให้เอ็นไซม์ทำงานระยะหนึ่งเพื่อให้ได้กลูโคสออกมา ก่อนการปลูกเชื้อ และจากค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันที่ได้พบว่าลำดับความสำคัญของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิผลการผลิต

เป็นดังนี้ คือเวลาการปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) หลังการเติมเซลลูเลส>อุณหภูมิการหมัก>ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การแปรผัน แสดงให้เห็นว่า การปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) หลังการเติมเซลลูเลส จะส่งผลทางลบต่อเอทานอลที่ได้ ดังนั้น ควรศึกษาถึงการลดระยะการปลูกเชื้อ *S. cerevisiae* G 5-7 (2) หลังการเติมเซลลูเลสน้อยกว่า 10 นาที

การแปรผันเวลาการปลูกเชื้อหลังการเติมเซลลูเลส(0, 10 นาที) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (4.5, 5.0) และอุณหภูมิการหมัก (37-40°ซ) ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตเอทานอล เมื่อกำหนดให้ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อค่า P-value กำหนดให้มีค่าน้อยกว่า 0.01

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

เครือข่ายเกษตรกรรมทางเลือกภาคอีสาน, 2008. ปรากฏการณ์**มันสำปะหลังในภาคอีสานกับสถานการณ์ด้านอาหาร และพลังงาน**, 1-7. Available online at: sathai.org/images/Story_thai/022-pic/Annex2.pdf

คณะกรรมมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. **พลังงานทดแทนเอทานอล และไบโอดีเซล.** 175 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Agu, R. C., Amadife, A. E., Ude, C. M., Onyia, A., Ogu, E. O., and Okafor, M. 1997. **Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production**. *Waste Management*. 17, 91-96

Balat, M., Balat, H, and Öz, C. 2008. **Progress in bioethanol processing**. *Progress in energy and combustion science*. 34, 551-573

Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., and Castro, E. 2008. **Production of fuel ethanol from stream-explosion pretreated olive tree pruning**. *Fuel*. 87, 692-700

Duff, J. B., Cooper, D. G., and Fuller, O. M. 1986. **Conditions on production of cellulose and β-glucosidase by mixed fungal fermentation.** *Enzyme Microbial Technology*. 7, 47-52

Ghose, T.K. 1987. **Measurement of cellulose activities (Recommendations of Commission on Biotechnology IUPAC).** *Pure Applied Chemistry*. 59: 257-268.

Kaar, W.E., and Holtzapple, M.T. 2000. **Using lime pretreatmenrt to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover.** *Biomass and Bioenergy.* 18, 189-199

Kesornsit, J. 2007. **Saccharification of cassava waste by *Trichoderma reesei* for ethanol production.** Master's Thesis, Department of Microbiology Chulalongkorn University.

Kumakura, M., and Kaetsu, I. 1983. **Effect of radiation pretreatment of bagasses on enzymatic and acid hydrolysis.** *Biomass*. 3, 199-208

Lau, M.W., Dale, B.E., and Balan, V. 2008. **Ethanolic fermentation of hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external nutrient supplementation.** *Biotechnology Bioengineering*. 99, 529-539

Lavarack, B. P., Griffin, G. J., and Rodman, D. 2002. **The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products.** *Biomass and Bioenegy*. 23, 367-380

Lee, J.W., Koo, B.W., Choi, J.W., Choi, D.H., and Choi, I.G. 2007. **Evaluation of waste mushroom logs as a potential biomass resource for the production of bioethanol.** Bioresource Technology. 99, 2736-2741

Maiorella, B., Blanch, H. W., and Wilke C. R. 1983. **By-Product Inhibition Effects on Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology and Bioengineering*. 25, 103-121

Margeot, A., Hagerdal, B.H., Edlund, M., Slade, R., and Monot, F. 2009. **New improvements for lignocellulosic ethanol.** *Current Opinion in Biotechnology*. 20, 372–380

McMillan, J.D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. **Enzymatic conversion of biomass for fuels production.** *American Chemical Society*. 292-324.

Mishima, D., Tateda, M., Ike, M., and Fujita, M. 2006. **Comparative study on chemical pretreatment to accelerate enzymatic hydrolysis of aguatic macrophyte biomass used in water purification processes.** *Bioresource Technology*. 97, 2166-2172

Morjanoff, P. J., and Gray, P. P. 1987. Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. *Biotechnology Bioengineering*. 29, 733–741.

Mussatto, S.I., and Roberto, I.C. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. 93, 1-10

Nitayavardhana, S., Shrestha, P., Rasmussen, M. L., Lamsal, B. P., Leeuwen, J. V., and Khanal, S. K. 2010. Ultrasound improved ethanol fermentation from cassava chips in cassava-based ethanol plants. *Bioresource Technology*. 101, 2741-2747

Öhgren, K., Bengtsson, O., Grauslund, M.F., Galbe, M., Hägerdal, B.H., and Zacchi, G. 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*. 126, 488-498

Olofsson, K., Wiman, M., and Lidén, G. 2010. Controlled feeding of cellulases improves conversion of xylose in simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production. *Journal of Biotechnology*. 145, 168-175

Palonen, H., and Viikari, L. 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. Biotechnology Bioengineering. 86, 550-557

Pan, X., Gikes, N., Kadla, J., Pye, K., Saka, S., Gregg, D., Ehara, K., Xie, D., Lam, D., and Saddler, J. 2006. Bioconversion of hybrid polar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. *Biotechnology and Bioengineering*. 94, 851-861

Rai, S.N., and Mudgal, V.D. 1988. **Synergistic effect of sodium hydroxide and stream pressure treatment on composition changes and fibre utilization of wheat straw**. *Biological Wastes*. 24, 105-113

Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., and Victor, Y. 2005. **Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol**. *Proc Biochem*. 40: 3693-3700.

Sidiras, D., and Koukios, E. 1989. **Acid saccharification of ball milled straw**. *Biomass*. 19, 289-306

Somogyi, M. G., 1952. **Notes on Sugar Determination**. *Biological Chemistry*. 195: 375.

Sousa, L.C., Chundawat, S.P., Balan, V., and Dale, B.E. 2009. **'Cradle to the grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies**. *Current Opinion in Biotechnology*. 20, 1-9

South, C.R., Hogsett, A.L., and Lynd, L.R. 1995. **Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors**. *Enzyme and Microbial Technology*. 17, 797-803.

Sriroth, K., Chollakup, R., Chotineeranet. S., Piyachomkwan, and Oates, C. G. 2000. **Processing of cassava waste for improved biomass utilization**. *Bioresource Technology*. 71, 63-69

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

Sternberg, D., Vijaykumar, P., and Reese, E.T. 1977. **β-Glucosidase : microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose**. *Canadian Journal Microbiology*. 23, 139-147.

Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D., and Rogers, R.D. 2002. **Dissolution of cellulose with ionic liquids**. *Journal Amplied Chemical Society*. 124, 4974-4975

Taherzadeh, M. J., and Karimi, K. 2007. **Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulose material : a review**. *Bioresource*. 2, 707-738

Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI). 1988. **Test method for determination of alpha- beta and gamma- cellulose in pulp**. TAPPI 203 om-88.

Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., and Saddler, J. N. 2004. **Effects of sugar inhibition on cellulose and β-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 115, 1115-1126

Zhang, Y. HP., Ding, S. Y., Mielenz, J. Z., Cui, J. B., Elander, RT., Laser, M., Himmel, ME., McMillan, JR., and Lynd, LR. 2007. **Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions**. *Biotechnology Bioengineering*. 97, 214-223

ภาคผนวก

1. การเตรียมNelson-Alkaline Reagent (Somogyi, 1952)

1.Alkaline Copper Reagent 1ลิตร ประกอบด้วย

$Na_2HPO_4.12H_2O$	71	กรัม

Potassium sodium tartate	40	กรัม
1N NaOH	100	มิลลิลิตร
10%(w/v)$CuSO_4.5H_2O$	80	มิลลิลิตร
Na_2SO_4	180	กรัม

1.1 เตรียม 1N NaOH 100มิลลิลิตร

NaOH	4	กรัม
น้ำ	100	มิลลิลิตร

1.2 เตรียม10%(w/v)$CuSO_4.5H_2O$ 80มิลลิลิตร

$CuSO_4.5H_2O$	8	กรัม
H_2O	80	มิลลิลิตร

2. การเตรียมNelson’s reagent 1ลิตร ประกอบด้วย

12%(w/v)$Na_2HAsO_4.7H_2O$	50	มิลลิลิตร
H_2SO_4	21	มิลลิลิตร
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	53.2	กรัม

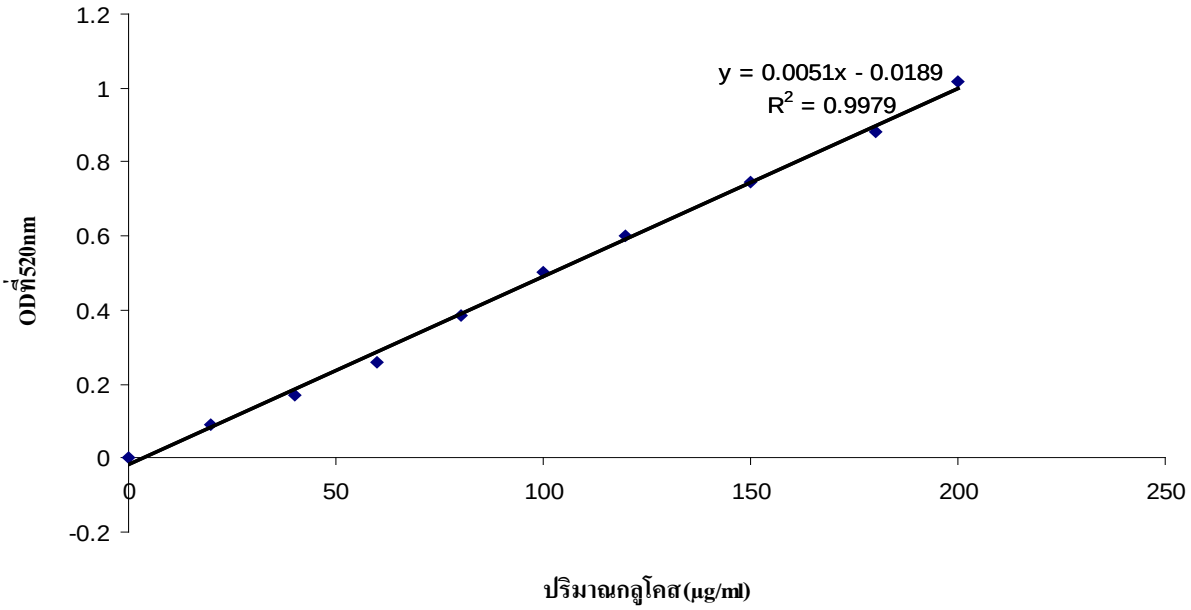
2.1 เตรียม12%(w/v)$Na_2HAsO_4.7H_2O$ 50mL

$Na_2HAsO_4.7H_2O$	6	กรัม
น้ำ	50	มิลลิลิตร

<u>การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส</u>

เตรียมสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอนเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นนาน 5 นาที เติมเนลสันรีเอเจ้นต์ 1 มิลลิลิตร

ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้น เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ ก : กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

<u>การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง</u>

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในสารละลายกลูโคสมาตรฐาน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 520 นาโนเมตร

คำนวณค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ทำการเจือจางตัวอย่างในกรณีที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 1 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ค่า O.D.}_{520} \times \text{dilution}}{\text{slope}}$$

2.การเตรียมสารละลายของซิเตรท บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง ต่างๆ ตั้งแต่ 3.0-6.2(Dawson และคณะ 1986)

กรดซิตริค โมโนไฮเดรต(Citric acid monohydrate,$C_6H_8O_7.H_2O$) น้ำหนักโมเลกุล 210.14;

บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ประกอบด้วยกรดซิตริค โมโนไฮเดรต 21.01 g ใน 1 ลิตร

ไตรโซเดียม ซิเตรท ดีไฮเดรต (Trisodium citrate dehydrate,$C_6H_5O_7Na_3.2H_20$) น้ำหนักโมเลกุล 294.12;

.บัฟเฟอร์เข้มข้น 1 โมลาร์ ประกอบด้วยไตรโซเดียม ซิเตรท ดีไฮเดรต 29.41 g ใน 1 ลิตร

เมื่อให้ X มล. 0.1โมลาร์ กรดซิตริค และ y มล. 0.1โมลาร์ ไตรโซเดียม ซิเตรท

pH	x ml 0.1 M citric acid	y ml 0.1 M trisodium citrate
3.0	82.0	18.0
3.2	77.5	22.5
3.4	73.5	27.0
3.6	68.5	31.5
3.8	63.5	36.5
4.0	59.0	41.0
4.2	54.0	46.0
4.4	49.5	50.5
4.6	44.5	55.5
4.8	40.0	60.0
5.0	35.0	65.0
5.2	30.5	69.5
5.4	25.5	74.5
5.6	21.0	79.0
5.8	16.0	84.0
6.0	11.5	88.5
6.2	8.0	92.0

3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสใช้วิธีใน TAPPI 203 om-88 (พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545**)**

<u>การเตรียมสารเคมี</u>

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) ความเข้มข้น 17.5 %
   โซเดียมไฮดรอกไซด์ 175 กรัม

   น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

2. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล
   โพแทสเซียมไดโครเมต 24.52 กรัม

   น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

3. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต มาตรฐานเข้มข้น 0.100 นอร์มัล
   โพแทสเซียมไดโครเมต 4.904 กรัมในน้ำกลั่น

   ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

4. สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต($Fe(NH_4)(SO_4).6H_2O$) เข้มข้น 0.100 นอร์มัล
   ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต 40.5 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น การหาค่าเข้มข้นที่แน่นอนก่อนใช้ทุกครั้ง โดยการนำไปไตเตรทกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน

<u>การหาความเข้มข้นที่แน่นอน</u> ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร

ลงในขวด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หยดอินดิเคเตอร์ 2 ถึง 4 หยด นำไปไตไตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต ที่ต้องการทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

<u>การคำนวน</u>

$$N_2V_2 = N_1V_1$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต, นอร์มัล

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, นอร์มัล

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต, มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, มิลลิลิตร

5. สารละลายอินดิเคเตอร์ (indicator)

ละลาย 1,10-ฟีนานโธรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) 1.5 กรัม กับเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.H_2O$) 0.7 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ในการไตเตรท

6. กรดซัลฟูริก [H_2SO_4] เข้มข้น 98 % (ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.84)
7. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 นอร์มัล

ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 83.5 มิลลิลิตรลงบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

<u>การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส</u>

1. ใส่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 1.5 กรัมน้ำหนักแห้ง ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร บันทึกน้ำหนักไว้ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % 100 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา จับเวลาทันทีที่เติมสารละลาย นำไปกวนบนเครื่องกวนสารเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลังครบเวลากวนให้เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
2. กรองสารละลายเพื่อแยกตะกอนออกโดยทิ้งสารละลายใส 10 มิลลิลิตรแรกของการกรอง เก็บสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ 100 มิลลิลิตร
3. การวิเคราะห์ปริมาณ แอลฟา-เซลลูโลส (เซลลูโลส)
   3.1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.5 นอร์มัล 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
   3.2. ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตรลงไป โดยเอียงขวดทำมุม 30 องศากับพื้น เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
   3.3. หยดอินดิเคเตอร์ 2–4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนกระทั่งสารละลาย เปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้มเป็นสีน้ำตาลอมม่วง บันทึกปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต
   3.4. เตรียมสารละลายแบลงค์ (blank) โดยปิเปตโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % 5 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำวิธีเดียวกับสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.1-3.3
   3.5. <u>การคำนวน</u>

$$\text{แอลฟา-เซลลูโลส (\%)} = 100 - [6.85\ (V_2 - V_1) \times N \times 20 / (A \times W)]$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง, มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายแบลงค์, มิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, นอร์มัล

A = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้, มิลลิลิตร

W = น้ำหนักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแห้ง, กรัม

6.85 = มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

4. การวิเคราะห์ปริมาณ แกมม่า-เซลลูโลส

4.1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระบอกตวงที่มีจุกปิด เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 นอร์มัล 50 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70–90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ กรองสารละลายโดยเก็บส่วนใสไว้วิเคราะห์

4.2. นำสารละลายใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์วิธีการเดียวกันกับข้อ 3.1 ถึง 3.3

4.3. <u>การคำนวน</u>

แกมม่า-เซลลูโลส = $[6.85 (V_4 – V_3) \times N \times 20 / (A \times W)]$

เมื่อ V_3 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง, มิลลิลิตร

V_4 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายแบลงค์, มิลลิลิตร

5. การวิเคราะห์ปริมาณ บีต้า-เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

<u>การคำนวน</u>

บีต้า-เซลลูโลส = 100 – (แอลฟา-เซลลูโลส + แกมม่า-เซลลูโลส)

3.อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast Peptone Dextrose (YPD) Agar

สารสกัดจากยีสต์		10	กรัม	เปปโตน		20	กรัม
กลูโคส		150	กรัม	วุ้น	18	กรัม	
น้ำกลั่น	1000		มิลลิลิตร				

ปรับพีเอช 5.0 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Isolation medium

กลูโคส	100	กรัม	สารสกัดจากยีสต์		3	กรัม	
เปปโตน	3	กรัม					
วุ้น	20	กรัม	น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร		

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวภณิดา นิ่มศึกษา เกิดวันที่ 4 กันยายน พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปี พ.ศ. 2550 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เมื่อปี พ.ศ. 2552