

การปรับสภาพเส้นใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลัง โดยการระเบิดด้วยไอน้ำ  
เพื่อการผลิตเอทานอล

นางสาวณัฐธิดา เกิดแล้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Pretreatment of lignocellulosic cassava fiber by Steam explosion for  
ethanol production

Miss Natthida Kerdlaew



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University



ณัฐธิดา เกิดแล้ว : การปรับสภาพเส้นใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลัง โดยการระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อการผลิตเอทานอล (Pretreatment of lignocellulosic cassava fiber by Steam explosion for ethanol production) อ.ที่ปริกษานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, 67 หน้า.

การปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยเอาแป้งที่เหลือในกากมันสำปะหลังออกด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ แขนวลอยกากใยลิกโนเซลลูโลส ปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในน้ำกลั่นให้ความร้อนด้วยไอน้ำอิ่มตัวที่ 180°ซ นาน 5 นาที เมื่อนำกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพที่สภาวะเหมาะสมที่สุดมาหมักเป็นเอทานอลโดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 495.25 CMC ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง และ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1 ระยะการเจริญ late log phase จำนวน  $1 \times 10^9$  cells/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง ที่ 40°ซ มีสภาวะจำกัดออกซิเจน จะได้เอทานอลสูงสุด 0.022 กรัมเอทานอล/กรัมกากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง ที่ 24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557

# # 5571971923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: CASSAVA PULP / LIGNOCELLULOSIC BIOMASS / STEAM EXPLOSION / ENZYMATIC HYDROLYSIS / SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION

NATTHIDA KERDLAEW: Pretreatment of lignocellulosic cassava fiber by Steam explosion for ethanol production. ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D., 67 pp.

Optimal condition for steam explosion pretreatment of lignocellulosic fiber of cassava fiber of cassava tuber obtained after residual starch removal from cassava waste pulp was 6 % (w/v) substrate loading, 180°C for 5 min. Ethanol production from the lignocellulosic fiber of cassava tuber pretreated at the optimized condition by simultaneous saccharification and fermentation process using cellulase 495.25 CMC units/g lignocellulosic fiber (dry weight) and *Kluyveromyces marxianus* G2-16-1 (late log phase) at  $1 \times 10^9$  cells/g lignocellulosic fiber (dry weight) at 40°C , oxygen limit condition yield maximum ethanol 0.022 g/g lignocellulosic fiber (dry weight) at 24 h.



Department: Microbiology

Student's Signature .....

Field of Study: Industrial Microbiology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2014

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความช่วยเหลือและการสนับสนุนเป็นอย่างดีจาก รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดการทำวิจัย รวมถึงการช่วยแก้ปัญหาในเรื่องต่างๆ รวมถึงดูแลและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตลอดมา ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำปรึกษาและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บริษัท สงวนวงษ์อุตสาหกรรม จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์กากมันสำปะหลังมาเพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนสมาชิกในห้องวิจัย 1804/15 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกให้ตลอดในการทำวิจัย

และสุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่คอยสนับสนุน ให้คำปรึกษา ให้กำลังใจ รวมทั้งความรักและความห่วงใย ที่มีให้ตลอดมาจนถึงความสำเร็จการศึกษาของข้าพเจ้าในวันนี้

## สารบัญ

หน้า

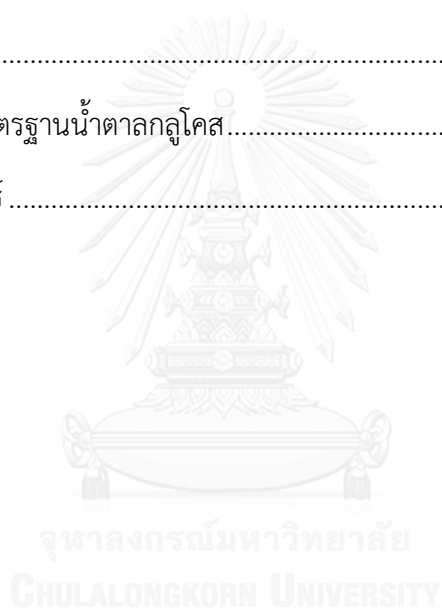
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ .....	1
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	5
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	6
1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย .....	6
บทที่ 2 ปรีทรีตเมนต์.....	7
2.1 มั่นสำปะหลัง.....	7
2.2 กากมันสำปะหลัง.....	9
2.3 ลิกโนเซลลูโลส .....	9
2.3.1 เซลลูโลส (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ).....	11
2.3.2 เฮมิเซลลูโลส (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ).....	11
2.3.3 ลิกนิน [C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> (OCH <sub>3</sub> ) <sub>0.9-1.7</sub> ].....	12
2.4 การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส .....	13
2.4.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment).....	14
2.4.1.1 การปรับสภาพโดยใช้เครื่องกล (Mechanical pretreatment) .....	14
2.4.2 การปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment).....	16

2.4.2.1 การปรับสภาพด้วยกรด (Acid pretreatment).....	17
2.4.2.2 การปรับสภาพด้วยด่าง (Alkaline pretreatment).....	19
2.4.3 การปรับสภาพทางเคมีเชิงกายภาพ (physico-chemical pretreatment).....	21
2.4.3.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam Explosion).....	21
2.4.3.2 การระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fiber explosion).....	26
2.4.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment).....	26
2.5 การย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase).....	26
2.6 ผลิตเอทานอลโดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF).....	28
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	30
3.1 กากมันสำปะหลัง.....	30
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.2.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) รุ่น JSM -5410LV บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น.....	30
3.3 สารเคมี Analytical grade.....	32
3.4 จุลินทรีย์.....	32
3.5 เอนไซม์.....	33
3.5.1 เอนไซม์เซลลูเลส (Accellerase™1500 บริษัท Genecor ประเทศสหรัฐอเมริกา) มีค่า Endoglucanase activity 2500 CMCs ยูนิต/กรัม และ $\beta$ -glucosidase activity 650 pNPG ยูนิต/กรัม.....	33
3.5.2 เอนไซม์แอลฟา อะไมเลส (Spezyme®-ethyl บริษัท Genecor ประเทศ.....	33
3.6 ศึกษาลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง.....	33



3.7	หาสภาวะเหมาะสมของการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ด้วย กรดร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ .....	36
3.7.1	ปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่เหมาะสม .....	36
3.7.2	อุณหภูมิที่เหมาะสม .....	37
3.7.3	ระยะเวลาการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่เหมาะสม.....	37
3.8	หาสภาวะเหมาะสมของการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับ สภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	38
3.8.1	ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม.....	38
3.8.2	พีเอชที่เหมาะสม.....	39
3.9	การทดสอบเบื้องต้นสำหรับการหมักเอทานอลจากกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมัน สำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยวิธีการย่อยและการหมัก พร้อมกัน .....	39
3.10	วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี(Gas Chromatography) ...	39
บทที่ 4	ผลและการอภิปรายผลการทดลอง.....	41
4.1	ลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง .	41
4.2	สภาวะเหมาะสมสำหรับการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังด้วยกรด ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ .....	42
4.2.1	ปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่เหมาะสม .....	42
4.2.2	อุณหภูมิที่เหมาะสม .....	43
4.2.3	ระยะเวลาการปรับสภาพโดยวิธีระเบิดด้วยไอน้ำที่เหมาะสม .....	44
4.3	สภาวะเหมาะสมของการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับ สภาพแล้ว.....	45
4.3.1	ปริมาณเซลลูเลสที่เหมาะสม .....	45
4.3.2	ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม.....	47

4.4 ผลการทดสอบเบื้องต้น ในการผลิตเอทานอลจากกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมัน สำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยวิธีการย่อยและการหมัก พร้อมกัน .....	48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	51
รายการอ้างอิง .....	52
ภาคผนวก.....	58
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	59
ภาคผนวก ข สารเคมี.....	61
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส.....	66
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	67



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบหลักทางเคมีของกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลัง .....	41
ตารางที่ 4.2 สรุปผลเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล จากกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังกับงานวิจัยอื่น.....	50



## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1	ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง .....	8
ภาพที่ 2.2	กากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง.....	9
ภาพที่ 2.3	องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส .....	10
ภาพที่ 2.4	ขั้นตอนกระบวนการทางชีวภาพสำหรับการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุลิกโนเซลลูโลส.....	10
ภาพที่ 2.5	โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส.....	11
ภาพที่ 2.6	องค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส .....	12
ภาพที่ 2.7	โครงสร้างของลิกนิน .....	13
ภาพที่ 2.8	การปรับสภาพของวัสดุลิกโนเซลลูโลส .....	14
ภาพที่ 2.9	กลไกของการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	27
ภาพที่ 2.10	การย่อยสลายเซลลูโลสในตำแหน่งต่างๆ ด้วยเอนไซม์ Exoglucanase, Endoglucanase และ $\beta$ -glucosidase .....	28
ภาพที่ 2.11	กระบวนการหมักและการย่อยพร้อมกัน (SSF) .....	29
ภาพที่ 3.1	กากมันสำปะหลัง หลังจากละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง .....	34
ภาพที่ 3.2	เขว่นลอยกากมันสำปะหลังในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก.....	34
ภาพที่ 3.3	กากมันสำปะหลัง หลังจากให้ความร้อน.....	35
ภาพที่ 3.4	กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังก่อนและหลังอบแห้ง .....	35
ภาพที่ 3.5	การปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง โดยวิธีการระเปิดด้วยไอน้ำ.....	37
ภาพที่ 3.6	ย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส .....	38

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในระบบการขนส่ง เป็นวิธีทางหนึ่งในการลดการใช้พลังงาน ฟอสซิล ลดปริมาณก๊าซเรือนกระจกในบรรยากาศซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดปัญหาภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน (Limayen และคณะ, 2012) โดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อพืชอาหาร ประเทศไทยปลูกมันสำปะหลังปีละประมาณ 25 ล้านตัน มากเป็นอันดับที่ 3 ของโลก (United Nations Conference on Trade and Development, 2012) โดย 55 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ปลูกได้ ส่งออกขายต่างประเทศในรูปแบบเส้นและมันอัดเม็ด 40 เปอร์เซ็นต์ แปรรูปเป็นแป้งมันสำปะหลัง และอีก 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือนำไปผลิตเป็นเอทานอลเชื้อเพลิง (Thai Tapioca Starch Association (TTSA), 2005) อุตสาหกรรมการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง ก่อให้เกิดของทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร หรือกากมันสำปะหลังมากถึง 1.7 ล้านตัน/ปี กากมันสำปะหลังเหล่านี้ มีแป้งเหลืออยู่ 60-70 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น เช่น พลาสติกชีวภาพ เอทานอล กรดแลคติก เป็นต้น ของทิ้งหลังกระบวนการผลิตสารเหล่านี้จะได้เป็นกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลังมีกากใยลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ 11.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส 40 และ 18 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ (Akaracharanya และคณะ, 2011) จึงมีแนวคิดที่จะนำกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่เหลือหลังการนำแป้งไปใช้ประโยชน์แล้วมาเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตเอทานอล เพราะกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง มีอนุภาคขนาดเล็ก (20-40 ไมครอน) จึงไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสับ ตัด หรือบด ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ใช้พลังงานมาก แต่เนื่องจากเซลลูโลสที่อยู่ภายในโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส มีเฮมิเซลลูโลสและลิกนินปกคลุม การที่จะให้เอนไซม์เซลลูเลส สามารถย่อยเซลลูโลสในลิกโนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ง่าย จำเป็นต้องปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสก่อน การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส จะทำให้เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งปก

คลุมเซลลูโลสในโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสหลุดออก และทำให้เซลลูโลสซึ่งมีโครงสร้างแบบผลึก เปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบไม่เป็นผลึก ซึ่งง่ายต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

การปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสแบ่งออกเป็น 4 วิธี คือวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) วิธีทางเคมีเชิงกายภาพ (physico-chemical pretreatment) ) วิธีทางเคมี (chemical pretreatment) และวิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment)

การระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีการปรับสภาพทางเคมีเชิงกายภาพ โดยการใช้ไอน้ำอุณหภูมิสูง (160-240°C) ความดันสูง (0.69-4.83 MPa) ภายในระยะเวลาสั้นๆ แล้วลดความดันลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เกิด depolymerization แล้วแยกออกจากโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า explosive decompression นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูง ค่าความเป็นกรดของน้ำยังทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายแยกออกจากเซลลูโลสและลิกนินด้วย การปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำนี้ มีข้อดีกว่าวิธีการปรับสภาพวิธีอื่นๆ คือสามารถขยายส่วนได้ง่าย ต้นทุนเฉลี่ยต่ำ เพราะผลผลิตพลอยได้ของกระบวนการสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อเนื้อได้จัดเป็นวิธีการปรับสภาพที่คุ้มทุนที่สุดสำหรับชีวมวลประเภทไม้เนื้อแข็ง และของเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม (Kumar และคณะ, 2009)

มีรายงานเกี่ยวกับการใช้วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอลดังนี้

Chu และคณะ (2013) ปรับสภาพซังข้าวโพดขนาดยาว 5-10 ซม. โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 205°C ภายใต้ความดัน 1.6 MPa นาน 6 นาที หลังจากนั้นล้างซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยน้ำ (solid : liquid = 1 : 10) แขนกลอย 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ (pH 4.8) แล้วย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (No.C2730) และ  $\beta$ -glucosidases (No.NZ188) จำนวน 20 FPU/กรัม เซลลูโลส และ 3 ยูนิต/กรัม เซลลูโลส ตามลำดับ ที่ 50°C นาน 48 ชม. ได้กลูโคส 36.67 กรัม/ลิตร

Wang และคณะ (2012) เปรียบเทียบการปรับสภาพฟางข้าวโดยวิธีการฉายรังสีแกมมาตามด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำกับการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเพียงอย่างเดียว พบว่าเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของฟางข้าว ซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมาก่อนการทำการระเบิดด้วยไอน้ำ ถูกย่อยได้ง่ายกว่าได้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าฟางข้าวซึ่งปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเพียงอย่างเดียวซึ่งให้น้ำตาลกลูโคส 6.58% ในขณะที่ฟางข้าวซึ่งฉายรังสีแกมมา แล้วจึงนำมาทำการระเบิดด้วยไอน้ำ ให้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มเป็น 47.44% นอกจากนี้ยังพบว่า การฉายรังสีแกมมาก่อนการทำการระเบิดด้วยไอน้ำ จะทำให้ glucuronide acid ซึ่งพบใน pretreatment hydrolysate ของฟางข้าว ซึ่งถูกปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเพียงอย่างเดียวหายไป และเมื่อนำเอาฟางข้าวที่ปรับสภาพโดยวิธีการฉายรังสีแกมมาตามด้วยระเบิดด้วยไอน้ำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (CTA-TEX Chemical, China) เป็นเวลา 48 ชม. ได้น้ำตาลกลูโคส 90.4 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งสูงกว่าน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยฟางข้าวซึ่งไม่ผ่านการปรับสภาพหรือฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพโดยวิธีระเบิดด้วยไอน้ำเพียงอย่างเดียวถึง 2.4 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ

Chen และคณะ (2011) ปรับสภาพฟางข้าวโดยกรดเจือจางตามด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำแบบ 2 ขั้นตอน (dilute-acid/steam explosion) ขั้นตอนแรกปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง โดยแขวนลอยฟางข้าว (ขนาดความยาว 2 ซม. จำนวน 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ให้ความร้อนที่ 165°C นาน 2 นาที กรองแยกกากออกจากส่วนน้ำ ขั้นตอนที่ 2 นำกากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางมาปรับสภาพซ้ำโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 180°C นาน 20 นาที แล้วย่อยกากที่ผ่านการปรับสภาพแบบ 2 ขั้นตอนนี้ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Spezyme CP, Genencor, USA) จำนวน 20 FPU/กรัม เซลลูโลส ที่ 50°C 100 rpm นาน 72 ชม. พบว่า hydrolysate ที่ได้มีปริมาณไซโลสสูงและมีสารยับยั้งต่ำ น้ำตาลทั้งหมดที่ได้มากกว่าน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยฟางข้าวซึ่งผ่านการปรับสภาพโดยวิธีการใช้กรดเจือจางร่วมกับวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำแบบขั้นตอนเดียว (acid – catalyzed steam explosion) ถึง 1.5 เท่า

Cara และคณะ (2008) เปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพกิ่งต้นมะกอก ความยาวประมาณ 5 ซม. โดยการแช่กิ่งต้นมะกอกในน้ำ กับวิธีการแช่กิ่งต้นมะกอกในสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง แล้วปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 190 – 240°C นาน 5 นาที หลังการปรับสภาพล้างกาก

(water-insoluble solid fraction, WIS) ด้วยน้ำ ผลการหมักเอทานอลจากกึ่งต้นมะกอกซึ่งผ่านการปรับสภาพและล้างด้วยน้ำแล้ว โดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน (simultaneous saccharification and fermentation) ใช้ *Saccharomyces cerevisiae* (DER-CIEMAT Culture Collection No. 1701) และเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 15 FPU/กรัม กึ่งต้นมะกอก (Novozymes A/S, Denmark) และ  $\beta$ -glucosidases 15 IU/กรัม กึ่งต้นมะกอก (Novozym 188) ในสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (sodium citrate buffer) pH 4.8 ที่ 35°C นาน 72 ชม. พบว่ากึ่งต้นมะกอกซึ่งแช่ในน้ำ แล้วปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 240°C ให้เอทานอล 7.2 กรัม/100 กรัม แต่เนื่องจากกึ่งต้นมะกอก ซึ่งแช่ในสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง แล้วปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 230°C ให้น้ำตาลทั้งหมด (น้ำตาลใน pretreatment hydrolysate รวมกับน้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วย) สูงกว่า เมื่อนำน้ำตาลที่ได้ทั้งหมดมาหมักเป็นเอทานอล ปริมาณเอทานอลที่ได้จากน้ำตาลทั้งหมดจึงสูงถึง 15.9 กรัม/100 กรัม กึ่งต้นมะกอก

Zimbardi และคณะ (2007) รายงานผลการปรับสภาพซังข้าวโพด ขนาด 2-3 ซม. โดยการแช่ในสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0, 1.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 180, 190 และ 200°C พบว่าการแช่ในสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วทำการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 190°C เป็นเวลา 5 นาที เป็นสภาวะการปรับสภาพที่ให้น้ำตาลสูงที่สุด นอกจากนี้ยังรายงานว่าการแช่ซังข้าวโพด ในสารละลายกรดแล้วจึงทำการระเบิดด้วยไอน้ำ ให้น้ำตาลละลายได้มากขึ้น จึงได้น้ำตาลสูงขึ้น และทำให้ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ ถูกย่อยไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้มากขึ้นด้วย

Ballesteros และคณะ (2006) ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวสาลี โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน โดยแช่ฟางข้าวสาลีในสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (อัตราส่วน solid : liquid = 1 : 10) ที่ 45°C เป็นเวลา 18 ชม. หลังจากนั้นนำฟางข้าวสาลีที่ได้มาทำการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 160-200°C เป็นเวลา 5, 10 และ 20 นาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพฟางข้าวสาลี เมื่อคำนึงถึง conversion yield ของเอทานอลที่จะได้ โดยกระบวนการย่อยและการหมักพร้อมกัน คือแช่ในกรดซัลฟิวริกเจือจางตามด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ ที่ 190°C นาน 10 นาที หรือ 200°C นาน 5 นาที จะได้ปริมาณเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ของค่าทางทฤษฎี แต่สภาวะที่จะได้ผลผลิตเอทานอล และน้ำตาลใน



ของเหลวที่ผ่านการกรองแล้วสูงที่สุดคือ นำฟางข้าวสาเลที่แชในสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางแล้ว มาทำการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 180°ซ นาน 10 นาที

สำหรับวิธีการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลัง Akaracharanya และคณะ (2011) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลังคือ การแขวนลอย 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ผลการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางแล้วนี้ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส GC 220 (Genencor, USA) จำนวน 62 U/กรัม (น้ำหนักแห้ง) ของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ 40°ซ pH 6 นาน 9 ชั่วโมง ได้กลูโคส 26.6 กรัม/ลิตร

เนื่องจากข้อดีของการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ และผลการวิจัยเรื่องวิธีการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลังข้างต้น งานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะทำการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลังด้วยวิธีการใช้กรดเจือจางร่วมกับวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำแบบขั้นตอนเดียว กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพและล้างด้วยน้ำแล้ว จะถูกนำไปหมักเป็นเอทานอลด้วยวิธีการหมักและการย่อยพร้อมกันซึ่งเป็นวิธีการหมักเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสที่มีข้อดีคือ ลดปัญหา product inhibition ของเอนไซม์เซลลูเลส ลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เนื่องจากในระบบมีการสร้างเอทานอลควบคู่กับการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส ใช้เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* G2-16-1 (Krisomdee, 2011) ซึ่งสามารถหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิ 40°ซ จึงช่วยให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถได้ทำงานที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด นอกจากนี้ *K. marxianus* G2-16-1 ยังมี  $\beta$ -glucosidases (Krisomdee, 2011) ช่วยในการย่อยเซลโลไบโอส ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส หากเกิดการสะสมในระบบ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

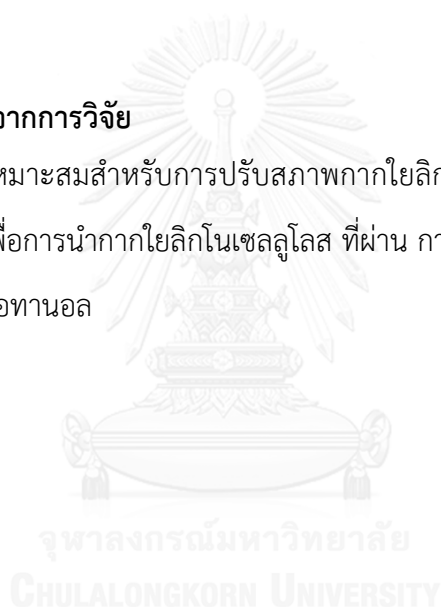
หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลังโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อที่จะนำกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วไปย่อยเป็นน้ำตาล แล้วหมักน้ำตาลที่ได้เป็นเอทานอลโดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง
- 1.3.2 หาสภาวะเหมาะสมสำหรับการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมัน-สำปะหลัง โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ
- 1.3.3 หาปริมาณเหมาะสมของเซลลูเลส เพื่อการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว
- 1.3.4 ผลิตเอทานอลโดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน

### 1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลังโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อการนำกากใยลิกโนเซลลูโลส ที่ผ่าน การปรับสภาพแล้วไปย่อยเป็นน้ำตาลแล้วหมักน้ำตาลที่ได้เป็นเอทานอล



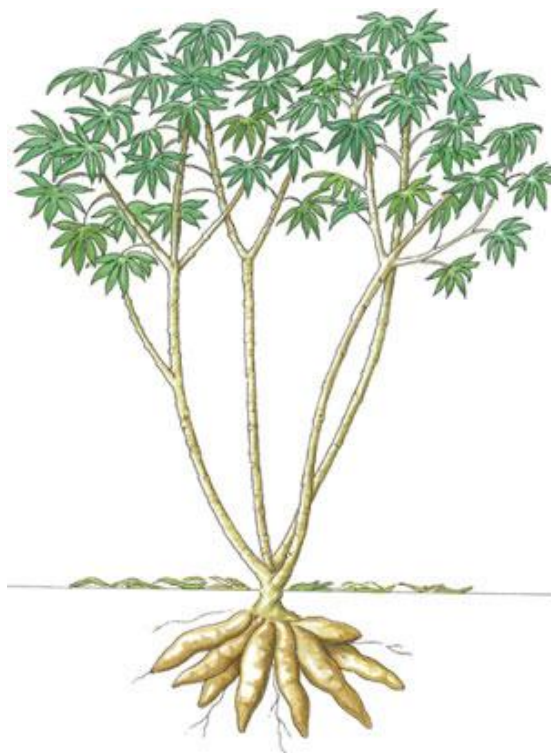
## บทที่ 2

### ปรีทรรคน์วรรณกรรม

#### 2.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้น ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Manihot esculenta* Crantz จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อสามัญเรียกว่า แคสซาวา (Cassava) หรือ ทาปิโอก้า (Tapioca) มีแหล่งกำเนิดจากทางตอนใต้ของทวีปอเมริกาใต้ เช่น ประเทศกัวเตมาลา ประเทศเม็กซิโก ประเทศเปรู และประเทศฮอนดูรัส แพร่ไปยังทวีปในเขตร้อน เช่น ทวีปแอฟริกา รวมถึงทวีปเอเชีย มันสำปะหลังจึงเป็นที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย และยังเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ (Blagbrough และคณะ, 2010) มันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงานอาหารที่มีความสำคัญในทวีปเขตร้อน (Cock และคณะ, 1982) เป็นลำดับที่ 3 รองจากข้าวและข้าวโพด (FAO, 2008) ลักษณะของต้นมันสำปะหลังจะมีความสูงของลำต้น 1-5 เมตร มีรากสะสมอาหารอยู่ใต้ดิน 5-10 รากต่อลำต้น ลักษณะใบจะเป็นรูปโล่ รูปใบมีแฉกประมาณ 3-9 แฉก ก้านมีสีแดงเข้ม (ภาพที่ 2.1) ในปี 2557-2558 ประเทศไทยปลูกมันสำปะหลังมากถึง 8.83 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ 3.53 ตัน และผลผลิตรวมประมาณ 31.24 ล้านตัน ใน 50 จังหวัด และมีผลผลิตมากขึ้น ซึ่งร้อยละ 50 ของมันสำปะหลังนี้จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตแป้งมันสำปะหลังเพื่อการส่งออก (TTSA, 2014) และยังจัดเป็นประเทศที่มีการส่งออกเป็นอันดับ 1 ในเอเชีย (UNCTAD, 2012) มันสำปะหลังปลูกมากที่สุดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมา) รองลงมาคือภาคตะวันออก (จังหวัดชลบุรี และระยอง) และภาคใต้ (สงขลา) การเพาะปลูก ในประเทศไทยสามารถเพาะปลูกได้ทุกภาค และปลูกได้ตลอดทั้งปี เหมาะกับการปลูกในดินร่วนปนดินทราย เป็นพืชทนแล้งได้ดี ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวประมาณ 10-12 เดือน (ศุภชัยวัฒน์ สำปะหลังและผลิตภัณฑ์, 2551) ชนิดของมันสำปะหลังที่ปลูกมี 2 ชนิดคือ มันสำปะหลังชนิดหวาน จะมีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกต่ำ ไม่มีรสขม จึงเหมาะแก่การนำประกอบอาหารและปลูกเพื่อการบริโภคในครัวเรือนมากกว่า ส่วนมันสำปะหลังชนิดขมจะมีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกสูง เป็นพิษต่อระบบไหลเวียนของเลือด ซึ่งไม่เหมาะแก่การนำมาบริโภคโดยตรงสำหรับคนและสัตว์ จำเป็นต้องนำไปผ่านการแปรรูปและนิยมนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม (Oluwole และคณะ, 2007) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตมันสำปะหลังเช่น ผงชูรส, สารให้ความหวานเช่น ฟรุคโตส ไซรัป

(Vuilleumier และคณะ, 1993) กระดาษ พลาสติก กรดซिटริก รวมถึงแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฯ สามารถย่อยและเปลี่ยนเป็นน้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลอื่นๆ และกรดอินทรีย์ (Tan และคณะ, 1984) อีกทั้งยังใช้เป็นกาวที่ให้ความแข็งแรง และเป็นวัตถุดิบใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางค์ (Tonukari และคณะ, 2004) ส่วนที่เหลือไปเป็นอาหารให้สัตว์และปุ๋ย หรือที่เราเรียกกันว่า กากมันสำปะหลัง นอกจากนี้ยังใช้เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง ซึ่งมีราคาต้นทุนต่ำ (Akaracharanya และคณะ, 2011)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง

(<http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/en/1/index.html>)

## 2.2 กากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ส่วนมากนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ หรือนำไปตากแห้งทำเป็นมันเส้น มันอัดเม็ด หรือมันบด ในกากแป้งมันสำปะหลังนี้จะมีระดับกากใยสูง แต่ยังคงมีปริมาณแป้งเหลืออยู่ องค์ประกอบหลักของกากมันสำปะหลังประกอบไปด้วย แป้ง 67.8 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (น้ำหนักแห้ง) มีส่วนของกากใยลิกโนเซลลูโลส 11.2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (น้ำหนักแห้ง) มีความชื้นถึง 80 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (น้ำหนักเปียก) และกากใยลิกโนเซลลูโลสยังเหมาะสำหรับการใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง เพราะมีราคาถูก มีขนาดอนุภาค 20-40 ไมครอน ซึ่งทำให้ลดพลังงานในกระบวนการผลิตเอทานอล (ภาพที่ 2.2) (Akaracharanya และคณะ, 2011)

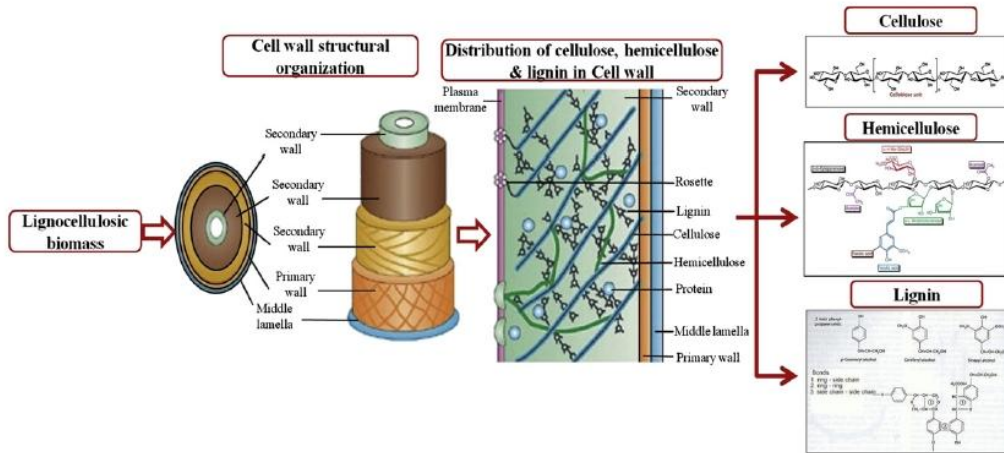


ภาพที่ 2.2 กากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง

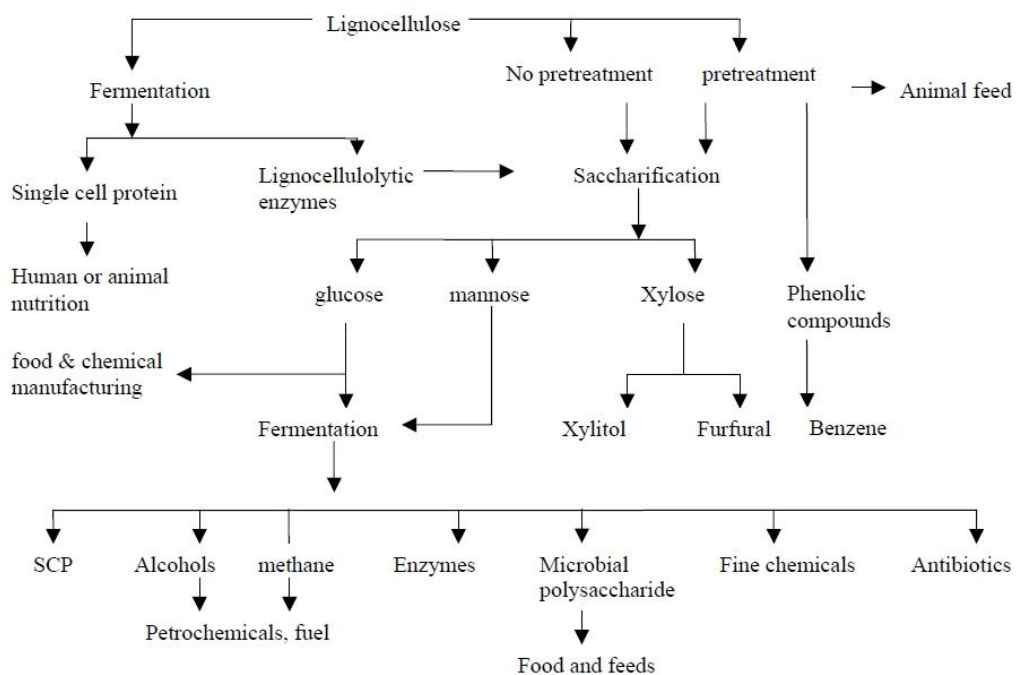
## 2.3 ลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบหลักสำคัญประกอบไปด้วย เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก 35-50 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 20-35 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 15-20 เปอร์เซ็นต์ แล้วยังมีอื่นๆ 15-20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในลักษณะโครงสร้างที่ซับซ้อน (Mood และคณะ, 2013) (ภาพที่ 2.3) พบมากในผนังเซลล์ของพืช เปลือกไม้เนื้อแข็ง ไม้เนื้ออ่อน เศษวัสดุทางการเกษตรเช่น เช่น ชังข้าวโพด ชานอ้อย

ฟางข้าว และกากมันสำปะหลังเป็นต้น ซึ่งเศษวัสดุของลิกโนเซลลูโลสที่เหลือใช้นี้ สามารถทำให้มีมูลค่าเพิ่มได้ โดยผ่านขั้นตอนต่างๆ หลายขั้นตอน เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์จากชีวภาพและเกิดประโยชน์สูงสุดดังภาพที่ 2.4 (Howard และคณะ, 2003)



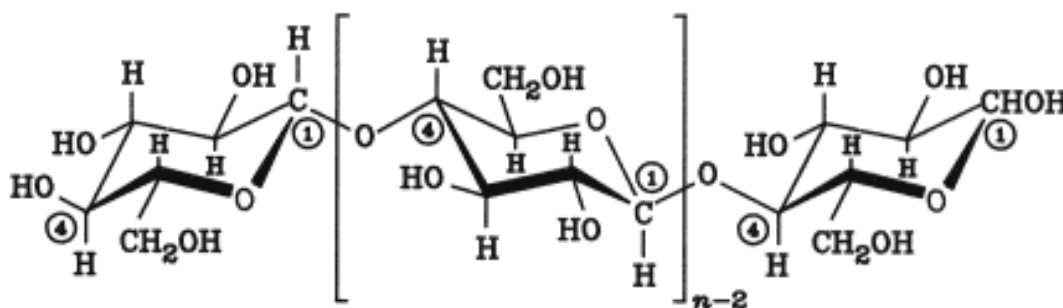
ภาพที่ 2.3 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส (Menon และ Rao, 2012)



ภาพที่ 2.4 ขั้นตอนกระบวนการทางชีวภาพสำหรับการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Howard และคณะ, 2003)

### 2.3.1 เซลลูโลส ( $C_6H_{10}O_5$ )

เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้างผนังเซลล์และช่วยให้ความแข็งแรงแก่พืช พลังงานแสงอาทิตย์จะผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงและเก็บไว้ในรูปแบบของเซลลูโลส (Raven และคณะ, 1992) เป็นองค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลส เป็นสายพอลิเมอร์ของกลูโคส เกิดจาก ดี-กลูโคสต่อกันเป็นสายด้วยพันธะพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้า ( $\beta$ -1,4 – glycosidic bones) ซึ่งโครงสร้างของเซลลูโลสนั้นพบว่าอยู่ในรูปแบบผลึกและไม่เป็นผลึก เซลลูโลสไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในกรดเจือจางที่อุณหภูมิต่ำจะละลายได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และในกรดที่มีความเข้มข้นสูง เนื่องจากเกิดพลังงานไปทำลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึดโครงสร้างเป็นผลึกให้แตกออก (Krassig และคณะ, 2002) (ภาพที่ 2.5)

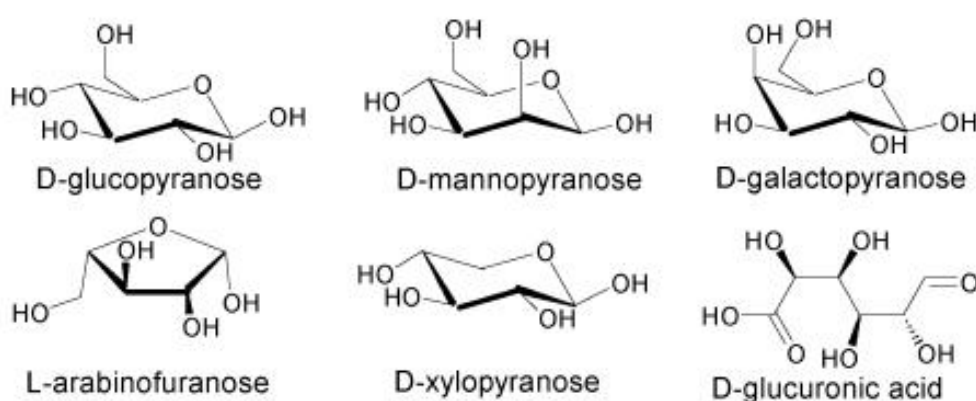


ภาพที่ 2.5 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส (Harmsen และคณะ, 2010)

### 2.3.2 เฮมิเซลลูโลส ( $C_5H_8O_4$ )

เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของผนังเซลล์พืช เป็นสารโพลีเมอร์ของกลุ่มดี-ไซโลส ซึ่งมีแขนงข้างที่แตกต่างกันซึ่งประกอบไปด้วย น้ำตาลเพนโตส, น้ำตาลเฮกโซส และกลุ่มของสารอินทรีย์ (Girio และคณะ, 2010) ซึ่งจะมีสายสั้นกว่าเซลลูโลส โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (ภาพที่ 2.6) จะย่อยสลายง่ายเพราะรูปร่างเป็นกิ่งก้าน สายสั้นๆ เพื่อการย่อยสลายเซลลูโลสจึงจำเป็นต้องย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสให้พร้อมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ก่อน (Agbor และคณะ, 2011) เพราะเซลลูโลสจะถูกห่อหุ้มด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน นอกจากนี้เฮมิเซลลูโลสจะไม่ละลายในน้ำที่อุณหภูมิต่ำ แต่การย่อยสลายจะเริ่มต้นที่

อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิของเซลลูโลส ซึ่งจะละลายได้ดีในอุณหภูมิสูง (Thermo wood handbook, 2003) การใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของเฮมิเซลลูโลสได้ในน้ำ อย่างไรก็ตามการเพิ่มความรุนแรงในวิธีการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจำเป็นต้องระมัดระวัง การเกิดผลิตภัณฑ์จากย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสนั้นคือ Furfural และ Hydroxyl Methyl Furfural (HMF) ที่มีรายงานว่าเป็นตัวบ่งชี้ในกระบวนการหมัก (Palmqvist และ Hahn-Hägerdal, 2000a; b)



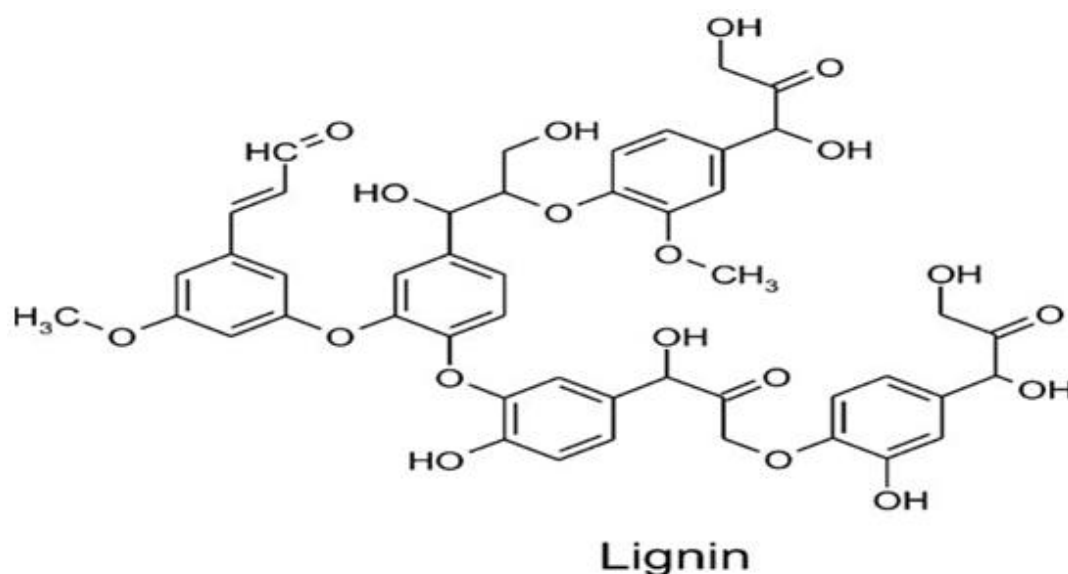
ภาพที่ 2.6 องค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส (Hansen และ Plackett, 2008)

### 2.3.3 ลิกนิน [ $C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9-1.7}$ ]

ลิกนินมีหน้าที่ช่วยขนส่งน้ำและสารอาหารไปสู่เซลล์พืช มีหน้าที่ช่วยยึดเชื่อมเส้นใยให้คงรูป สร้างความแข็งแรงระหว่างเซลล์พืช ลิกนินเป็น polyaromatic ที่มีโครงสร้างซับซ้อน และมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ไม่ละลายน้ำ ไม่มีรูปผลึกแต่จะเกาะกันในระหว่างเส้นใยทำหน้าที่ยึดเส้นใยเข้าด้วยกัน ซึ่งมีองค์ประกอบหลักประกอบไปด้วย phenylpropanoid alcohols หรือเรียกว่า monolignols ได้แก่ coniferyl alcohol (guaiacyl propanol), p-coumaryl alcohol (p-hydroxyphenyl propanol) และ sinapyl alcohol (syringyl alcohol) เชื่อมโยงกันในรูปแบบของพันธะที่แตกต่างกัน (Harmsen และคณะ, 2010; Kumar และคณะ, 2009) เนื่องจากลิกนินเป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรง (ภาพที่ 2.7) ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพก่อน เพื่อเพิ่มการย่อยสลายของชีวมวล (Agbor และคณะ, 2011) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของโครงสร้างลิกนิน ซึ่งมีสารหลากหลายชนิด เช่น aromatic, polyaromatic, phenolic และ aldehydic ในสารประกอบ phenolic จะมีผลการยับยั้งมากการย่อยสลาย และมีความเป็นพิษมากกว่า Furfural และ HMF (แม้ใน



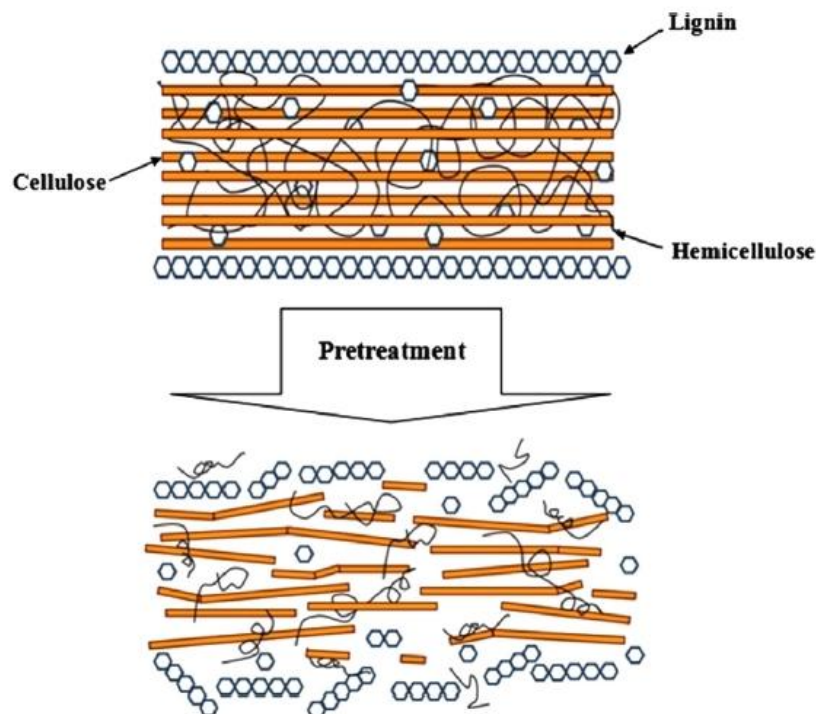
ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า) ซึ่ง phenolic ที่มีโมเลกุลต่ำจะมีความเป็นพิษมากที่สุด และสารประกอบ phenolic นี้เป็นสาเหตุของการสูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก โดยจะไปลดการเจริญของเซลล์และการย่อยน้ำตาล ปัจจัยหลักที่มีผลคือ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายลิกนิน (Harmsen และคณะ, 2010)



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของลิกนิน (<http://www.namrata.co/dietary-fiber-and-its-significance/>)

## 2.4 การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส

การปรับสภาพมีจุดประสงค์หลักในการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมีของชีวมวลลิกโนเซลลูโลส เป็นการลดขนาดของวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยมีเป้าหมายในการกำจัดลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสให้แยกออกจากกัน (Harmsen และคณะ, 2010) (ภาพที่ 2.8) เพื่อเพิ่มการเข้าถึงการทำงานของเอนไซม์ เพิ่มอัตราการย่อยน้ำตาล โดยเปลี่ยนโพลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรต ไปเป็นน้ำตาลจำพวก fermentable sugars (Mood และคณะ, 2013; Mosier และคณะ, 2005) โดยทั่วไปการปรับสภาพจะมีวิธีที่แตกต่างกัน ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment) การปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment) การปรับสภาพทางเคมีเชิงกายภาพ (physico-chemical pretreatment) และการปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment) (Kumar และคณะ, 2009)



ภาพที่ 2.8 การปรับสภาพของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Mood และคณะ, 2013)

#### 2.4.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment)

การปรับสภาพทางกายภาพ เป็นการลดขนาดของวัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เครื่องจักรกลสำหรับการลดขนาด ทำได้หลากหลายวิธี เช่น การม่ การบด การฉายรังสี (รังสีแกมมา ลำแสงอิเล็กตรอน รังสีไมโครเวฟ ฯลฯ) เป็นผลทำให้การย่อยดีขึ้น ขนาดผลึกของชีวมวลมีอนุภาคเล็กลง พลังงานที่ใช้จะขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคของวัสดุ (Menon และ Rao, 2012)

##### 2.4.1.1 การปรับสภาพโดยใช้เครื่องกล (Mechanical pretreatment)

ในการปรับสภาพโดยวิธีการใช้เครื่องกลนี้จะเป็นขั้นตอนแรก ใน

การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้มีขนาดอนุภาคลดลง โดยเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิว ซึ่งจะทำให้ได้โดยการหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ การบดหรือโม่ ซึ่งการโม่นี้ทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคของวัสดุเช่น Ball milling, two-



roll milling, hammer milling, colloid milling และ disk milling (Harmsen และคณะ, 2010; Mood และคณะ, 2013) โดยหลังจากนั้นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดอนุภาคจะลดลงเป็น 10-30 มิลลิเมตร และการบดหรือโม่ลดลงเป็น 0.2-2 มม. จะช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น เพื่อการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้มากขึ้น แต่เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายราคาสูง แต่จะเหมาะสมสำหรับกระบวนการปรับสภาพระดับที่ทำเต็มรูปแบบ (Kumar และคณะ, 2009)

#### 2.4.1.2 การปรับสภาพโดยใช้รังสีไมโครเวฟ (Microwave irradiation)

การใช้รังสีไมโครเวฟในการปรับสภาพนั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ในการให้ความร้อนเพื่อที่จะทำให้โครงสร้างผลึกของเซลลูโลสมีการเปลี่ยนแปลง ช่วยกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ช่วยทำลายพื้นผิวหน้าของวัสดุ และยังช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ได้ดีขึ้น (Kitchaiya และคณะ, 2003; Ma และคณะ, 2009) รังสีไมโครเวฟ เป็นความร้อนที่เกิดจากการปฏิสัมพันธ์โดยตรงของวัตถุ และสนามแม่เหล็กไฟฟ้า (Hu และ Wen, 2008) การฉายรังสีไมโครเวฟกับวัสดุเซลลูโลสจะเป็นการทำลายโครงสร้าง โดยผ่านการชนกันของโมเลกุลจากข้อวอเล็กทริก (Gabhane และคณะ, 2011) ข้อดีของการใช้รังสีไมโครเวฟคือ ใช้ระยะเวลาสั้น มีความสม่ำเสมอ และใช้พลังงานน้อยกว่าการใช้ความร้อนแบบธรรมดา (Cheng และคณะ, 2011)

#### 2.4.2 การปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment)

เป้าหมายหลักของการปรับสภาพทางเคมีคือ การปรับปรุงการย่อยสลายทางชีวภาพของเซลลูโลส โดยการกำจัดลิกนิน หรือเฮมิเซลลูโลสให้มีระดับน้อยลง รวมถึงผลึกของโครงสร้างเซลลูโลส วิธีนี้นิยมใช้กันมากในระบบอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ และในการปรับสภาพทางเคมีนี้มีหลายวิธีเช่น การปรับสภาพด้วยกรด การปรับสภาพด้วยด่าง เป็นต้น (Menon และ Rao, 2012)

#### 2.4.2.1 การปรับสภาพด้วยกรด (Acid pretreatment)

การปรับสภาพด้วยกรด นิยมการใช้กรดเข้มข้น และกรดเจือจาง โดยกรดจะเข้าทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของวัสดุลิกโนเซลลูโลส การใช้กรดสำหรับการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส กรดที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการเชิงพาณิชย์คือ กรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) นอกจากนี้ยังมีกรดอื่นๆ อีกเช่น กรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ ) กรดไนตริก ( $HNO_3$ ) (Menon และ Rao, 2012) การใช้กรดสำหรับการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพมาก และเป็นที่ยอมรับกันดีที่เหมาะสมสำหรับการแปลงโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสไปสู่กระบวนการหมัก (Chiaromonti และคณะ, 2012)

Wang และคณะ (2015) รายงานการปรับสภาพแก่นชานอ้อยด้วยสารละลายกรด ปรับสภาพครั้งแรกโดยใช้ 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM]Cl) ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0-1.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยในการปรับสภาพจะใช้แก่นชานอ้อยใส่ไปพร้อมกับสารละลายกรด [BMIM]Cl และมีการกวนสารพร้อมให้ความร้อนที่ 80–130 °ซ เป็นเวลา 10-90 นาที ควบคุมอุณหภูมิด้วยอ่างน้ำมัน จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 20 FPU/กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซีเตต ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.8 อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 24-72 ชม. พบว่าหลังจากทำการปรับสภาพแก่นชานอ้อยและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้ว การปรับสภาพที่เหมาะสมคือ ใช้สารละลายกรด [BMIM]Cl ซึ่งประกอบด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ 120 °ซ นาน 30 นาที ให้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 92.3 กรัม/ลิตร

Zu และคณะ (2014) ศึกษาการปรับสภาพซังข้าวโพดแบบ 2 ขั้นตอน เพื่อต้องการเพิ่ม sugar recovery โดยในขั้นตอนแรกใช้ซังข้าวโพดจำนวน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง) โดยน้ำหนัก เจือจางด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกปริมาณ 100

มล. (ในอัตราส่วน solid : liquid = 1:10) ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 100, 110, 120 และ 130 °ซ ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา 20 และ 40 นาที ชั้นตอนที่สอง



หลังจากการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับสภาพต่อด้วยน้ำมะนาวปริมาณ 50 มล. (ในอัตราส่วน solid : liquid = 1:10) และมีการกวน โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดแรกใช้อุณหภูมิ 60 °ซ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ชุดที่สองทำในอ่างน้ำมัน นาน 1, 3, 6, 12, 24 ชม. และ 1, 2, 3, 4, 6 ชม. ตามลำดับ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพคือ การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ 120 °ซ นาน 40 นาที แล้วปรับสภาพต่อด้วยน้ำมะนาวที่ 60 °ซ เป็นเวลา 12 ชม. จะได้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส เป็น 78 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Yang และคณะ (2013) ศึกษาผลกระทบของการปรับสภาพ การใช้ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง และเวลาการปรับสภาพของฟางข้าวบาร์เลย์ผสมเมล็ดข้าวที่แตกต่างกัน เพื่อเปลี่ยนแป้งและลิกโนเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาล fermentable sugars ขั้นตอนการปรับสภาพฟางข้าวผสมกับเมล็ดข้าว ใช้ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ความร้อนที่ 121 °ซ ความดัน 1.1 บาร์ นาน 60 นาที พบว่าการปรับสภาพด้วยความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที จะได้น้ำตาล 96 เปอร์เซ็นต์ และไซโลส 57 เปอร์เซ็นต์

Avcı และคณะ (2013) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพซังข้าวโพด คือ ซังข้าวโพด 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.75 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 160 °ซ นาน 0-5 นาที เป็นสภาวะที่ให้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ  $63.2 \pm 2.2$  และ  $63.7 \pm 2.3$  กรัม น้ำตาลกลูโคส/ลิตร ที่เวลา 0 และ 5 นาทีตามลำดับ

#### 2.4.2.2 การปรับสภาพด้วยด่าง (Alkaline pretreatment)

ในพื้นที่ฐานของการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยการใช้ด่างในการปรับสภาพ จะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่อยู่ในชีวมวล การปรับสภาพด้วยด่างเป็นการเพิ่มการย่อยเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สำหรับการละลายของ

ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส จะน้อยกว่าในสารละลายกรด หรือ  
กระบวนการ





hydrothermal (Carvalho และคณะ, 2008) ต่างที่ส่วนใหญ่นิยมนำมาใช้ ในการปรับสภาพได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH), แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (CaOH<sub>2</sub>) และ แอมโมเนีย (ammonia) Wan และ คณะ (2011) รายงานปรับสภาพเปลือกถั่วเหลืองด้วยการแช่ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (4-40 กรัม/100 กรัมแห้งของเปลือกถั่วเหลือง) ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการย่อยเซลลูโลส พบว่าการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้น้ำตาลกลูโคส 64.55 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกำจัดไซแลนได้ถึง 46.37 เปอร์เซ็นต์

### 2.4.3 การปรับสภาพทางเคมีเชิงกายภาพ (physico-chemical pretreatment)

การปรับสภาพทางเคมีเชิงกายภาพจะประกอบด้วยวิธีการที่ผสมผสานระหว่าง วิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมี เช่น การปรับสภาพแบบใช้ไอน้ำ โดยการเพิ่มตัวเร่งปฏิกิริยา (กรดหรือด่าง), hydrothermolysis , wet oxidation และ การระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fiber explosion, AFEX) (Galbe และ Zacchi, 2012) อย่างไรก็ตามจุดประสงค์หลักในการปรับสภาพด้วยวิธีการนี้ ชี้ให้เห็นว่าเป็นการปรับสภาพที่สามารถรวมการทำงานของวิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมี เข้าด้วยกันได้ ยกตัวอย่างหนึ่งในวิธีที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัย เช่น การปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ไอน้ำ หรือเรียกกันว่า การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam Explosion)

#### 2.4.3.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam Explosion)

การระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีการปรับสภาพทางเคมีเชิงกายภาพ ที่นิยมใช้กับการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยการใช้ไอน้ำอุณหภูมิสูง (160-240°C) ความดันสูง (0.69-4.83 MPa) ภายในระยะเวลาสั้นๆ แล้วลดความดันลงอย่างรวดเร็ว (Kumar และคณะ, 2009) การปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำจะทำให้เอมิเซลลูโลสถูกย่อย มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิกนิน เนื่องจากมีอุณหภูมิสูง (Mood และคณะ, 2013) เป็นผลทำให้เอมิเซลลูโลส และลิกนินลดลง เพิ่มพื้นที่ผิว

ให้กับเซลลูโลส ทำให้เพิ่มการเข้าทำงานของเอนไซม์ (Harmsen และคณะ, 2010) การย่อยสลายของเฮมิเซลลูโลสในระหว่างการปรับสภาพระเบิดด้วยไอน้ำสามารถเกิดกรดอินทรีย์ได้ เช่น กรดอะซิติก ที่เกิดจากการย่อยสลายของกลุ่ม acetyl ในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส กรดฟอร์มิก และกรด levulinic ทำให้น้ำที่เกิดในระบบมีคุณสมบัติเป็นกรดที่อุณหภูมิสูง (Mood และคณะ, 2013) แต่เนื่องจากสภาพความเป็นกรดที่มีอยู่ในการย่อยสลายของน้ำตาล ทำให้เกิดเฟอร์ฟูรัล (furfural) และ HMF ในระหว่างกระบวนการปรับสภาพ (Galbe และ Zacchi, 2012) ดังนั้นวัสดุลิกโนเซลลูโลสจำเป็นที่ต้องล้างด้วยน้ำหลังจากการปรับสภาพเพื่อที่จะเอาสารยับยั้งเหล่านี้ออก

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ ได้แก่ ขนาดอนุภาคของวัสดุ อุณหภูมิ ความดัน และเวลาที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำ ข้อดีของวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำคือ ไม่มีการใช้สารเคมีในขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำ เกิด byproducts ต่ำ มีความสามารถในการทำลายโครงสร้างของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ดี และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

มีรายงานเกี่ยวกับการใช้วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำในการปรับสภาพดังนี้

Scholl และคณะ (2015) รายงานการปรับสภาพหญ้าช้าง (elephant grass, *Pennisetum purpureum*) ด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเพื่อแปลงเซลลูโลสไปเป็นเอทานอล ใช้หญ้าช้างปริมาณ 600 กรัม พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดจากขั้นตอนการล้างน้ำก่อนทำการปรับสภาพด้วยการระเบิดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 190 °ซ นาน 10 นาที ( $248.34 \pm 6.27$  มก./กรัม) และได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่อุณหภูมิ 200 °ซ นาน 10 นาที ( $246.00 \pm 9.60$  มก./กรัม) หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 10 FPU/กรัม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หมักด้วยการใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 และจากการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ได้ผลเอทานอลได้สูงสุดโดยใช้อุณหภูมิ 200 °ซ นาน 6 นาที ( $4.27 \pm 0.15$  มก./มล.) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของขั้นตอนการล้างน้ำในการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ

ซึ่งสามารถช่วยขจัดสารยับยั้งที่ละลายอยู่ในน้ำให้หมดไปก่อนการนำไปผลิตเป็นเอทานอลเชื้อเพลิง



López-Linares และคณะ (2015) ศึกษาการปรับสภาพ rapeseed straw ด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ ผลกระทบจากอุณหภูมิ และเวลาในกระบวนการปรับสภาพที่ตอบสนองพื้นผิว ซึ่งในงานวิจัยนี้จะไม่มีการเร่งปฏิกิริยาในการระเบิดด้วยไอน้ำ ในขณะที่การปรับสภาพ rapeseed straw จะเพิ่มการย่อยของเอนไซม์ การออกแบบการทดลองเชิงสถิติ และวิธีการตอบสนองต่อพื้นผิวถูกนำมาใช้ในการประเมินอุณหภูมิที่ 185-215 °ซ และระยะเวลาในกระบวนการ 2.5-7.5 นาที พบว่าภายใต้สภาวะในการระเบิดด้วยไอน้ำอุณหภูมิที่ 215 °ซ ใช้เวลา 7.5 นาที เป็นผลที่ดีสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลที่มีความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูง ในสภาวะนี้จะให้ผลตอบแทนสูงสุดที่ 72.3 เปอร์เซ็นต์ เทียบเท่า 81 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำตาลกลูโคสต่อวัสดุของแข็ง ส่งผลให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงถึง 43.6 กรัม/ลิตร (5.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ใช้วัสดุของแข็งเป็นสารตั้งต้นที่ 20 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก/ปริมาตร) เทียบเท่ากับ 12.4 กรัมเอทานอล/100 กรัมชีวมวล

Wang และคณะ (2015) ปรับสภาพของเปลือกส้ม ด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (SE) และการแช่ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก (SAS) เพื่อเพิ่มผลผลิตและปรับปรุงการทำงานของเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ (SDF) พบว่าการปรับสภาพแบบ SE ร่วมกับ SAS เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิต SDF ภายใต้และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพภายใต้เงื่อนไขที่ดีที่สุด ( $H_2SO_4$  0.8 เปอร์เซ็นต์ 0.8 MPa ระยะเวลา 7 นาที) ทำให้ SDF เพิ่มขึ้นจาก 8.04 เปอร์เซ็นต์ เป็น 33.74 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้เซลลูโลส และลิกนินถูกย่อยสลาย และเปลี่ยนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กลง

Moreno และคณะ (2013) ศึกษาเงื่อนไขที่ใช้ในขั้นตอนการปรับสภาพของฟางข้าว และขั้นตอนการดำเนินงาน รวมถึงปริมาณสารตั้งต้น โดยมีจุดประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้ *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 และเอนไซม์แลคเคส สำหรับการผลิตเอทานอลในขั้นที่สอง (second generation ethanol) โดยใช้สภาวะที่แตกต่างกันในการระเบิดด้วยไอน้ำคือ 200 °ซ นาน

2-5 นาที และที่อุณหภูมิ 220 °ซ นาน 2.5 นาที แปรผันปริมาณฟางข้าวที่ 5-14 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด 2 กระบวนการคือ SSF (simultaneous saccharification and fermentation) และ PSSF (presaccharification and simultaneous saccharification and fermentation) ผลจากการวิจัยพบว่า *K. marxianus* CECT 10875 สามารถหมักสารละลายทั้งหมดที่ได้จากฟางข้าว จากการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ อุณหภูมิที่ 220 °ซ นาน 2.5 นาที โดยกระบวนการหมักแบบ SSF โดยใช้ปริมาณฟางข้าวที่ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ปริมาณเอทานอลถึง 9.6 กรัม/ลิตร นอกจากการกำจัดฟีนอล โดยเอนไซม์แลคเคสแล้วจะเป็นการลดสารยับยั้งในสารละลายจากฟางข้าว จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก และการเพิ่มปริมาณฟางข้าวเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในระหว่างกระบวนการ SSF และ PSSF จะส่งผลให้การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 16.7 กรัม/ลิตร

Oliveira และคณะ (2013) ศึกษาผลของการปรับสภาพฟางอ้อยด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำในระดับอุตสาหกรรมร่วมกับการใช้ต่างในการย่อยเอาลิคินินออก (delignification) ทำให้เอนไซม์เข้าย่อยฟางอ้อย เพื่อการผลิตเอทานอล โดยทำการระเบิดด้วยไอน้ำอุณหภูมิที่ 180, 190 และ 200 °ซ นาน 15 นาที ในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2.5 ลูกบาศก์เมตร ฟางอ้อยจะถูกเอาลิคินินออกโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 200 °ซ ได้สารละลายจากเอมิเซลลูโลสสูงสุด 92.7 เปอร์เซ็นต์ และการปรับสภาพด้วยต่าง เกิดการละลายของลิกนินถึง 86.7 เปอร์เซ็นต์ ที่ 180 °ซ และจะละลายออกมาเพียง 81.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 200 °ซ จากสถานะทั้งหมดในการปรับสภาพจะทำให้เซลลูโลสมีการย่อยสลายสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ 200 °ซ การเพิ่มการย่อยสลายของลิกนิน โดยการใช้เอนไซม์เปลี่ยนจาก cellulignin 58.8 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็น delignificated pulp ที่ 85.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 180 °ซ

#### 2.4.3.2 การระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fiber explosion)

ในกระบวนการระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fiber explosion : AFEX) เป็นกระบวนการที่ใช้แอมโมเนียในสถานะของเหลวที่อุณหภูมิและความดันสูง คงไว้ระยะเวลาหนึ่งและลดความดันลงอย่างรวดเร็ว (Tey-Mouri และคณะ, 2005) โดยทั่วไปกระบวนการระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย จะใช้แอมโมเนียปริมาณ 1-2 กิโลกรัม/กิโลกรัมของชีวมวลแห้ง ที่อุณหภูมิ 90 °ซ ในช่วงระยะเวลา 30 นาที ซึ่งพบว่าทำให้องค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลง อีกทั้งยังมีผลทำให้ความเป็นผลึกของเซลลูโลสลดลง โดย Bals และคณะ (2011) ได้อภิปรายเพิ่มเติมว่าตัวแปรต่างๆ ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณของน้ำ รวมไปถึงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในกระบวนการระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนียเป็นส่วนสำคัญที่ต้องศึกษาในการปรับสภาพในวัตถุดิบแต่ละชนิด

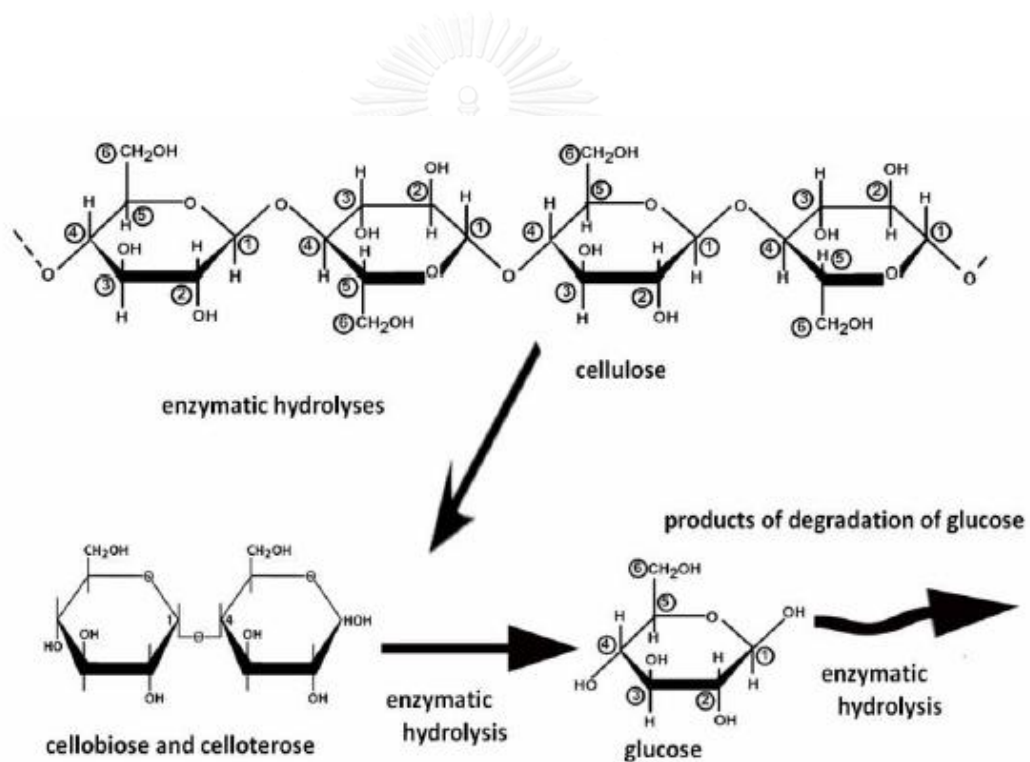
#### 2.4.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment)

ในการปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment) เป็นกระบวนการปรับสภาพโดยใช้กลุ่มของจุลินทรีย์ (microbial pretreatment) โดยเฉพาะเชื้อราซึ่งจะเปลี่ยนองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสไปเป็นสารประกอบที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายและการผลิตเอทานอล (Mood และคณะ, 2013) กลุ่มของจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ เช่น white, brown และ soft rot-fungi (ช่วยย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการนี้มีข้อดีคือคือใช้พลังงานต่ำและไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมี จึงช่วยลดค่าใช้จ่ายด้านสารเคมีและการบำบัดของเสีย อีกทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่มีข้อเสียคือต้องใช้ระยะเวลานาน (Cardona และ Sanchez, 2007; Sun และ Cheng, 2002; Tengerdy และ Szakacs, 2003)

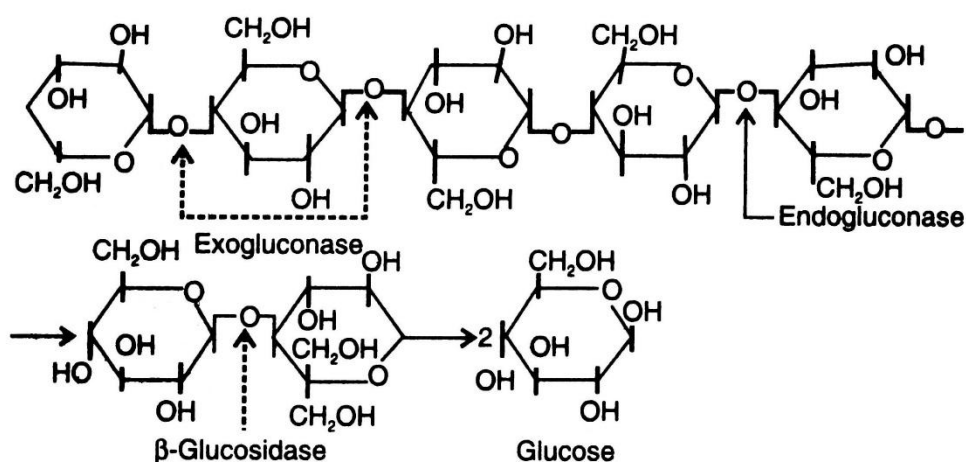
#### 2.5 การย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

เอนไซม์เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสที่พันธะ  $\beta$ -1, 4-Glycoside ได้เป็น cellobiose และย่อย cellobiose ด้วยเอนไซม์  $\beta$ -glucosidases ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส (ภาพที่ 2.9) ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกิดจากผลิตโดย

เชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โพรโตซัว พืช และสัตว์ เป็นต้น (Henrissat, 1991) เอนไซม์เซลลูเลสถูกใช้เพิ่มขึ้นในอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษอุตสาหกรรมอาหาร ประเภทการผลิตสารปรุงแต่ง และการปรับปรุงการย่อยอาหารสัตว์ (Zhang และ Zhang, 2013) โดยในธรรมชาติเอนไซม์เซลลูเลสแบ่งออกเป็น 3 ประเภทได้แก่ Endoglucanase (Endo-1,4- $\beta$ -glucanases, EC 3.2.1.4) โดยจะสุมตัดสายพันธะ  $\beta$ -1, 4-glycosidic ของเซลลูโลส, Exo glucanase (Exo-1,4- $\beta$ -glucanases, EC 3.2.1.91) หรือ Cellobiohydrolase และ  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) หรือเรียกอีกอย่างว่า Cellobiase จะทำหน้าที่ย่อย Cellobiose ไปเป็นกลูโคส (Horn และคณะ, 2012) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสในตำแหน่งที่ต่างกันดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.9 กลไกของการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Mackulak, 2010)



ภาพที่ 2.10 การย่อยสลายเซลลูโลสในตำแหน่งต่างๆ ด้วยเอนไซม์ Exoglucanase, Endoglucanase และ  $\beta$ -glucosidase

## 2.6 ผลิตเอทานอลโดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

การย่อยและการหมักพร้อมกัน (SSF) (ภาพที่ 2.10) เป็นวิธีการที่รวมการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ พร้อมกับการหมักน้ำตาลที่ได้ไปเป็นเอทานอล โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักพร้อมกันวิธี SSF จะใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ทนความร้อน และแบคทีเรีย ที่มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิในการย่อย (Sun และคณะ, 2002)

Zhang และคณะ 2013 กล่าวถึงปัจจัยหลักที่มีผลต่อการย่อยและการหมักพร้อมกัน เช่น อุณหภูมิในขณะที่มีการเติมเอนไซม์ ปริมาณเอนไซม์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของยีสต์ ปริมาณของวัสดุที่ใช้ และสายพันธุ์ของยีสต์ อุณหภูมิที่เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการย่อยและการหมักพร้อมกัน เพราะความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยของเอนไซม์ (45-50°C) และการหมัก (30-35 °C) การใช้งานของยีสต์ที่ทนร้อนที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะดีกว่า อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง มีบทบาทสำคัญในการส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์และการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับข้อกำหนดค่าความเป็นกรด-ด่าง สำหรับกระบวนการหมักที่ใช้เพื่อการผลิตเอทานอลแบบไม่ใช้ออกซิเจน และควรระวังในส่วนของคุณภาพยีสต์ที่ใช้มีมากเกินไปจะทำให้ไปขัดขวางการดูดซึมสารอาหาร ส่งผลให้ปริมาณเอทานอลลดลงได้ โดยในงานวิจัยได้ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายต่างชนิดไฮดรอกไซด์สำหรับการหมักและการย่อยพร้อมกัน มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับอุณหภูมิที่ 37.5°C ปริมาณเอนไซม์

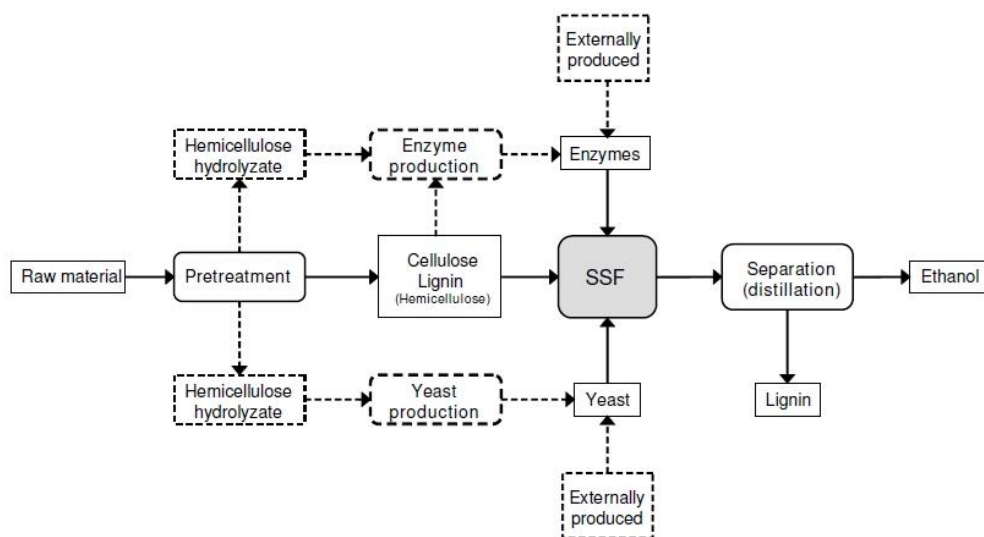


35 FPU/กรัม ตัวอย่าง ปริมาณความเข้มข้นของ *Saccharomyces cerevisiae* 10 กรัม/ลิตร และมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.6 พบว่าได้ปริมาณเอทานอล 37.84 กรัม/ลิตร

Gao และคณะ 2014 กล่าวว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์ (ประมาณ 50 °ซ) หากสูงกว่าการหมักยีสต์ จะเป็นการลดประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยสลายและการหมักพร้อมกัน

ข้อดีของกระบวนการนี้คือ เป็นการหมักแบบถังเดียวซึ่งจะช่วยในการลดค่าใช้จ่าย (Ballesteros และคณะ 2004) ลดปัญหาการเกิดสารยับยั้ง (product inhibition) ของเอนไซม์เซลลูเลส ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ เนื่องจากในระบบมีการผลิตเอทานอลควบคู่กับการย่อยเซลลูโลส

*Kluyveromyces marxianus* เป็นยีสต์สายพันธุ์หนึ่งที่ถูกนำมาใช้มากที่สุด เนื่องจากมีความหลากหลายในการนำมาใช้งานทางเทคโนโลยีชีวภาพ และยังสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°ซ ซึ่งจัดว่าเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ร้อน และยังมีอัตราการเจริญสูง สามารถหมักน้ำตาลได้หลากหลาย เช่น กลูโคส ไชโลส แมนโนส และกาแลคโตส แต่สำหรับในบางสายพันธุ์ก็ยังไม่สามารถหมักน้ำตาลไชโลสได้ (Wilkins และคณะ, 2008) นอกจากนี้ *K. marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1 ยังมี  $\beta$ -glucosidases ที่ช่วยย่อยเซลโลไบโอส ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส หากมีการสะสมอยู่ในระบบ (Krisomdee, 2011)



ภาพที่ 2.11 กระบวนการหมักและการย่อยพร้อมกัน (SSF) (Olofsson และคณะ, 2008)

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 กากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลัง (cassava waste pulp) ของโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง บริษัท สงวนวงษ์อุตสาหกรรม จำกัด นครราชสีมา เก็บตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) รุ่น JSM -5410LV บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น

3.2.2 เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็กแบบให้ความร้อน (Hotplate-Magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.3 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG6002-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.2.4 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.2.5 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น G560 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.6 เครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ (high pressure reactor) รุ่น 4523 บริษัท Parr Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.7 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น S20 SevenEasy™ บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.2.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys™ 10S-Uv-VIS บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 3.2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น AllegraTM 25R และ รุ่น AvantiTM J-30I บริษัท Beckman Coulter ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง (Micro-centrifuge) รุ่น MIKRO 200R บริษัท Hettich ประเทศอังกฤษ
- 3.2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น Biofuge Stratos (Rotor #3334) บริษัท Sorvall ประเทศเยอรมนี
- 3.2.12 เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ หลายพารามิเตอร์ (Biochemistry analyzer) รุ่น YSI 7100 บริษัท Harikul Science ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.13 เครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 7AG บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.14 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) รุ่น InnovaTM 4330 บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศอังกฤษ
- 3.2.15 ลามินาร์ (Laminar Flow) รุ่น H2 บริษัท LAB service ประเทศไทย
- 3.2.16 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) บริษัท Contherm Scientific ประเทศนิวซีแลนด์
- 3.2.17 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ และขนาด 1, 0.2 มิลลิลิตร บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
- 3.2.18 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น ES-215 และ รุ่น SS-325 บริษัท TOMY Digital Biology ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.19 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น SS40-D บริษัท Grant Instrument ประเทศอังกฤษ
- 3.2.20 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath shaker) รุ่น GyromaxTM 939XL บริษัท Amerex Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 3.3 สารเคมี Analytical grade

- 3.3.1 กรดซิตริก โมโนไฮเดรต ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.2 กรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCL) บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.4 กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.5 คอปเปอร์ซัลเฟต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.6 ฐันผง (Agar) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.7 ไดโซเดียมไฮโดรเจนอาร์เซเนต ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ) บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.8 โพแทสเซียมโซเดียมทาทาเทต ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 5H_2O$ ) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.10 โซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ ) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.11 ไตรโซเดียมซีเตรต ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.12 เพปโตน (Polypeptone) บริษัท Becton Dickinson and Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.13 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Becton Dickinson and Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.14 แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.3.15 เอทานอล (Ethanol) บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 3.4 จุลินทรีย์

*Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1 (Krisomdee และคณะ, 2015) แยกมาจากการโรงงานน้ำตาล บริษัท ไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม จำกัด ที่ 40°ซ สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส กลูโคส และเซลโลไบโอสได้

### 3.5 เอนไซม์

3.5.1 เอนไซม์เซลลูเลส (Accellerase™1500 บริษัท Genecor ประเทศสหรัฐอเมริกา) มีค่า Endoglucanase activity 2500 CMCs ยูนิต/กรัม และ  $\beta$ -glucosidase activity 650 pNPG ยูนิต/กรัม

3.5.2 เอนไซม์แอลฟา อะไมเลส (Spezyme®-ethyl บริษัท Genecor ประเทศสหรัฐอเมริกา) มีค่าเอนไซม์ แอคติวิตี้ 7000 AA ยูนิต/กรัม

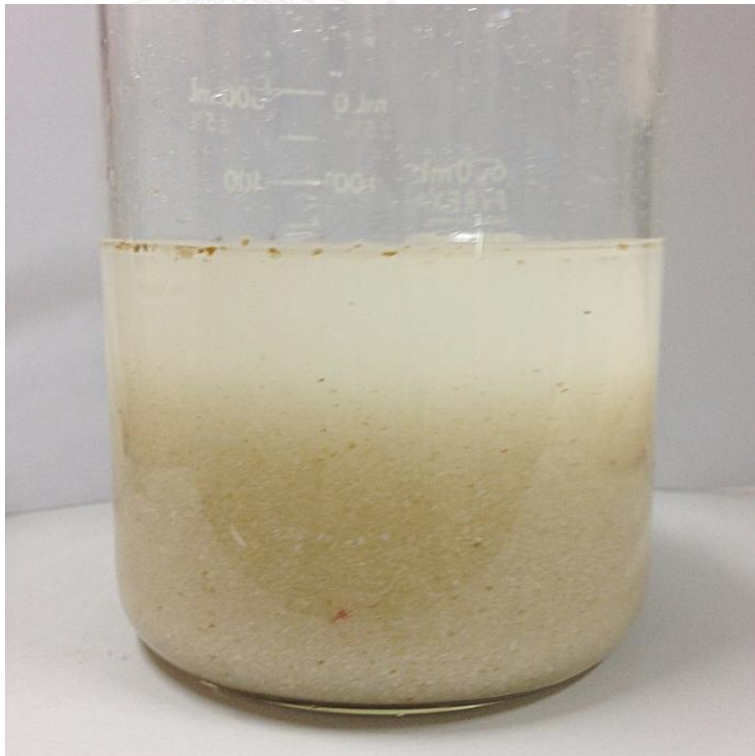
### 3.6 ศึกษาลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง

เตรียมกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง โดยนำกากมันสำปะหลังซึ่งเก็บไว้ที่ 20°ซ (จากข้อ 3.1) มาละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 3.1) แขนวลอยกากมันสำปะหลัง 30 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล 300 มล. ซึ่งบรรจุในขวดดูแรน (Duran bottle) ขนาด 500 มล. (ภาพที่ 3.2) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ภาพที่ 3.3) กรองแยกเอากากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังมาอบแห้งที่ 70°ซ จนน้ำหนักคงที่ (ภาพที่ 3.4)

หาค่าความชื้นของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง จากค่าความแตกต่างของน้ำหนักกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังก่อนและหลังการอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี(เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตามมาตรฐาน The Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI) วิเคราะห์ลิกนินตามมาตรฐาน TAPPI T 222 om-02 วิเคราะห์ไฮโดรเซลลูโลสตามมาตรฐาน TAPPI Section



ภาพที่ 3.1 กากมันสำปะหลัง หลังจากละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 3.2 แขนวลอยกากมันสำปะหลังในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก



ภาพที่ 3.3 กากมันสำปะหลัง หลังจากให้ความร้อน



ภาพที่ 3.4 กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังก่อนและหลังอบแห้ง

### 3.7 ทาสภาวะเหมาะสมของการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ด้วยกรด ร่วมกับกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ

#### 3.7.1 ปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่เหมาะสม

แขวนลอยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง 30 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 300 มล. ในขวดดูแรนขนาด 500 มล. จากนั้นกรองแยกกรดไฮโดรคลอริกออก ล้างด้วยน้ำจนน้ำล้างมีค่าความเป็นกรด-ต่างเป็นกลาง ปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ล้างน้ำแล้ว โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยแขวนลอยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่เตรียมได้ในน้ำ 500 มล. แปรผันปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังเป็น 2, 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก/ปริมาตร (น้ำหนักแห้ง) ให้ความร้อนด้วยไอน้ำอิ่มตัวที่ 180°C นาน 5 นาที (ภาพที่ 3.5) ล้างกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังอีกครั้ง ด้วยน้ำจนน้ำล้างมีค่าความเป็นกรด-ต่างเป็นกลาง แขวนลอยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพและล้างด้วยน้ำแล้ว ในปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทที่มีค่าความเป็นกรด-ต่างเป็น 5.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Accellerase™ 1500) 459.25 CMCs ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง และ 119.4 pPNG/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง ที่ 50°C เป็นเวลา 6 ชม. ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 4°C 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสมา วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952)





ภาพที่ 3.5 การปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

### 3.7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.7.1 โดยปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ได้หลังการย่อยแบ่งที่เหลือในกากมันสำปะหลังออกแล้ว โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ ปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่แขวนลอยในน้ำ 500 มล. ในขั้นตอนการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แปรผันอุณหภูมิของการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเป็น 160, 180 และ 200°ซ นาน 5 นาที

### 3.7.3 ระยะเวลาการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.7.2 โดยปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 180°ซ แปรผันระยะเวลาเป็น 2, 5 และ 10 นาที

### 3.8 ทาสภาวะเหมาะสมของการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

#### 3.8.1 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม

ย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ ที่สภาวะเหมาะสม (ผลจากข้อ 3.7) ซึ่งถูกล้างด้วยน้ำจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง จนน้ำล้างเป็นกลาง ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่ 50°C เป็นเวลา 6 ชม. แปรผัน ปริมาณเซลลูเลสที่ใช้เป็น 229.17, 459.25, 918.5, 1377.5 และ 1837 CMCs ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง (ภาพที่ 3.6) ปั่นหยาบที่ 8,000 รอบต่อนาที 4°C 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเซลลูเลสที่เหมาะสม คือปริมาณเซลลูเลสที่น้อยที่สุดซึ่งทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด



ภาพที่ 3.6 ย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

### 3.8.2 พีเอชที่เหมาะสม

ย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสฯ ที่ผ่านการปรับสภาพ ที่สภาวะเหมาะสมแล้ว (ผลจากข้อ 3.7) ตามวิธีข้อ 3.8.1 ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 459.25 CMCs ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง และ 119.4 pPNG/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง แต่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทที่ใช้เป็น 4.5, 5.0 และ 5.5 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างซึ่งทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

### 3.9 การทดสอบเบื้องต้นสำหรับการหมักเอทานอลจากกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน

ใส่กากใยลิกโนเซลลูโลสฯ ที่ผ่านการปรับสภาพที่สภาวะที่เหมาะสมและล้างด้วยน้ำจืดมีค่าความเป็นกรด-ด่างจนน้ำล้างเป็นกลางแล้ว (ผลจากข้อ 3.7) 30 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ บรรจุ 300 มล. ในขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์เซลลูเลส 459.25 CMCs ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง และ 119.4 pPNG/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง (ผลจากข้อ 3.8) และใช้ยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1 (Krisomdee, 2011) ระยะการเจริญ late log phase จำนวน  $1 \times 10^8$  cells/กรัมกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง (น้ำหนักแห้ง) พร้อมกัน บ่มที่ 40°C สภาวะจำกัดออกซิเจน ปิดฝาเกลียวให้แน่น เขย่าผสมที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชม. ทุก 24 ชม. ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที 4°C นาน 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีก๊าซโครมามาโทกราฟี (Gas Chromatography) (Jutakanoke และคณะ, 2012) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีข้างต้น

### 3.10 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีก๊าซโครมามาโทกราฟี(Gas Chromatography)

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีก๊าซโครมามาโทกราฟี ภายใต้สภาวะดังนี้ ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้คอลัมน์ PQ ใช้อุณหภูมิของ Injection ที่ 170°C และใช้อุณหภูมิของ FID detector ที่

220°ซ ปริมาตรที่ฉีด (Volumn injection) 1 ไมโครลิตร ใช้ไนโตรเจนเป็นก๊าซตัวพา (mobile phase) อัตราไหล 50 มล./นาทึ



## บทที่ 4

### ผลและการอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 ลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง

กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังมีความชื้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในกากมันสำปะหลัง 30 กรัม (น้ำหนักแห้ง) มีองค์ประกอบหลักทางเคมี ซึ่งประกอบไปด้วย เซลลูโลส 59.9, เฮมิเซลลูโลส 20 และลิกนิน 10.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เมื่อนำไปย่อยด้วยกรดเพื่อเอาแป้งออก จะได้กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังจำนวน 2.76 กรัม (น้ำหนักแห้ง) จะเห็นได้ว่าปริมาณของกากใยลิกโนเซลลูโลสเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย เนื่องจากกากใยลิกโนเซลลูโลสมีอนุภาคขนาดเล็ก 20-40 เมส ข้อดีคือ นำเอามาใช้ได้โดยไม่ต้องนำมาลดขนาด ข้อเสียคือ กากใยลิกโนเซลลูโลสจะย่อยง่ายทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณน้ำหนักรหว่างขั้นตอนการล้างด้วยน้ำ Akaracharanya และคณะ (2011) ย่อยกากมันสำปะหลัง 3 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ได้กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังจำนวน 1.5 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งประกอบไปด้วย เซลลูโลส 40, เฮมิเซลลูโลส 18 และลิกนิน 9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ทั้งนี้อาจเนื่องจากนอกจากแป้งแล้ว กรดไฮโดรคลอริกยังสามารถละลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนินบางส่วน ทำให้โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสแยกออกจากกัน และมีขนาดเล็กกว่าเดิม จึงเกิดการสูญเสียในขั้นตอนของการล้างน้ำมากกว่า

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบหลักทางเคมีของกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง
ลิกนิน	10.7
เฮมิเซลลูโลส	20
เซลลูโลส	59.9

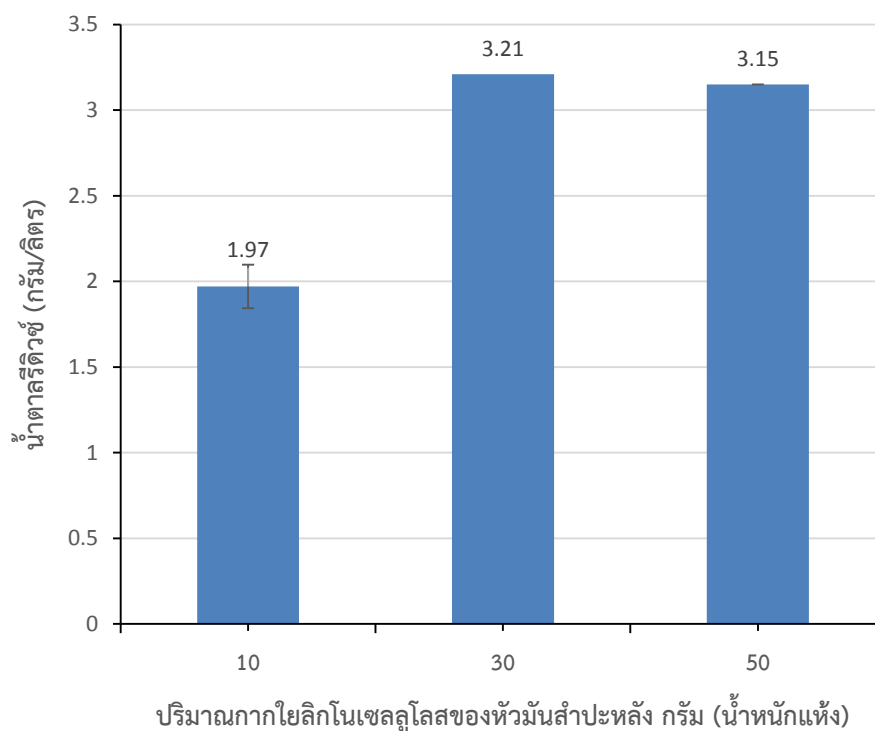
## 4.2 สภาวะเหมาะสมสำหรับการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังด้วยกรด ร่วมกับกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ

### 4.2.1 ปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่เหมาะสม

ผลการแปรผันปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่แขวนลอยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง 30 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 300 มล. ในขวดตูแรนขนาด 500 มล. ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที จากนั้นกรองแยกกรดไฮโดรคลอริกออก ล้างด้วยน้ำจืด น้ำล้างมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง ในการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 180°ซ นาน 5 นาที พบว่ากากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยแขวนลอยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังปริมาณ 2, 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก/ปริมาตร (น้ำหนักแห้ง) ในน้ำเมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 459.25 CMCs ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง และ 119.4 pPNG/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3.21 กรัม/ลิตร หรือ 34.9 กรัม/100 กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง (ภาพที่ 4.1) และในการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ล้างน้ำ แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการเปรียบเทียบกับกรณีไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดไอน้ำ พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.17 กรัม/ลิตร

จากการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังในกรดไฮโดรคลอริก พบว่าการปรับสภาพในกรดไฮโดรคลอริกที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาทีนั้น เมื่อนำไประเบิดด้วยไอน้ำและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ภาวะเหมาะสมจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 34.9 กรัม/100 กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thongchul และคณะ (2010) ซึ่งได้ปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสจากกากมันสำปะหลังด้วยกรดสามชนิด ได้แก่ กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริกและกรดฟอสฟอริก โดยบ่มที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที พบว่ากากใยลิกโนเซลลูโลส ที่ผ่านการแช่กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้ปริมาณน้ำตาล

กลูโคสมากที่สุด (0.85 กรัม/กรัมกากใยลิกโนเซลลูโลส) ซึ่งได้อธิบายไว้ว่าในกรดไฮโดรคลอริกซึ่งมีประจุโปรตอน ( $H^+$ ) มากที่สุดในกรดสามชนิดนั้น มีส่วนสำคัญในการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส แต่อย่างไรก็ตามในประจุโปรตอนที่มีปริมาณมากเกินไปในสารละลายกรดที่มีความเข้มข้นสูงนั้น สามารถทำปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำตาลและก่อเกิดสารยับยั้งบางชนิดขึ้น เช่นการก่อตัวของฟูแลน อนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ และสารประกอบฟีนอลที่จะไปยับยั้งการหมักของจุลินทรีย์

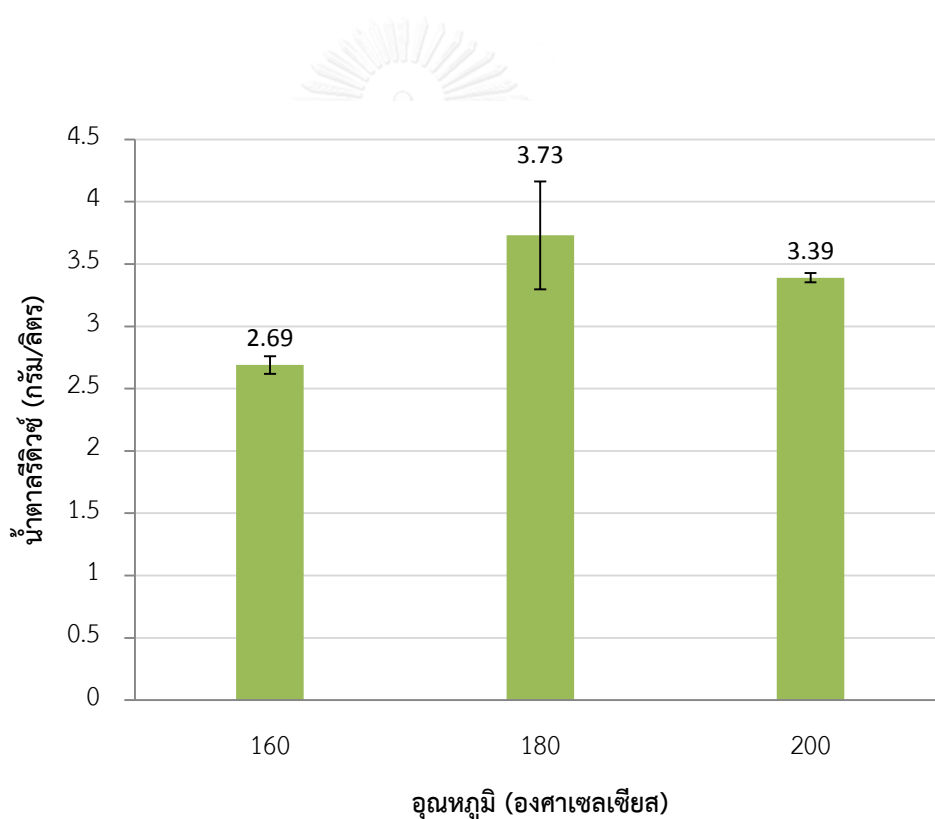


**ภาพที่ 4.1** ผลของปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ในการปรับสภาพด้วยกรดร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

#### 4.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ผลการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (ตามวิธีข้อ 4.2.1) ที่อุณหภูมิ 160, 180

และ 200°ซ เป็นเวลา 5 นาที หลังการล้างด้วยน้ำจืด น้ำล้างมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูโลสเป็นเวลา 6 ชม. พบว่าการระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 180°ซ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3.73 กรัม/ลิตร หรือ 40.6 กรัม/100 กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง (ภาพที่ 4.2) การใช้อุณหภูมิในการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 180°ซ ส่วนใหญ่จะทำให้เซลลูโลสถูกย่อยได้ง่าย ทั้งนี้ยังสามารถละลายลิกนินได้สูงสุด ซึ่งในขณะที่ใช้อุณหภูมิในการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 190-200°ซ จะละลายลิกนินได้ลดลง (Oliveira และคณะ, 2014) และเมื่อใช้อุณหภูมิสูงกว่า 180°ซ จะทำให้เกิดการไหม้ของน้ำตาล ทำให้น้ำตาลที่ควรจะได้ลดลง



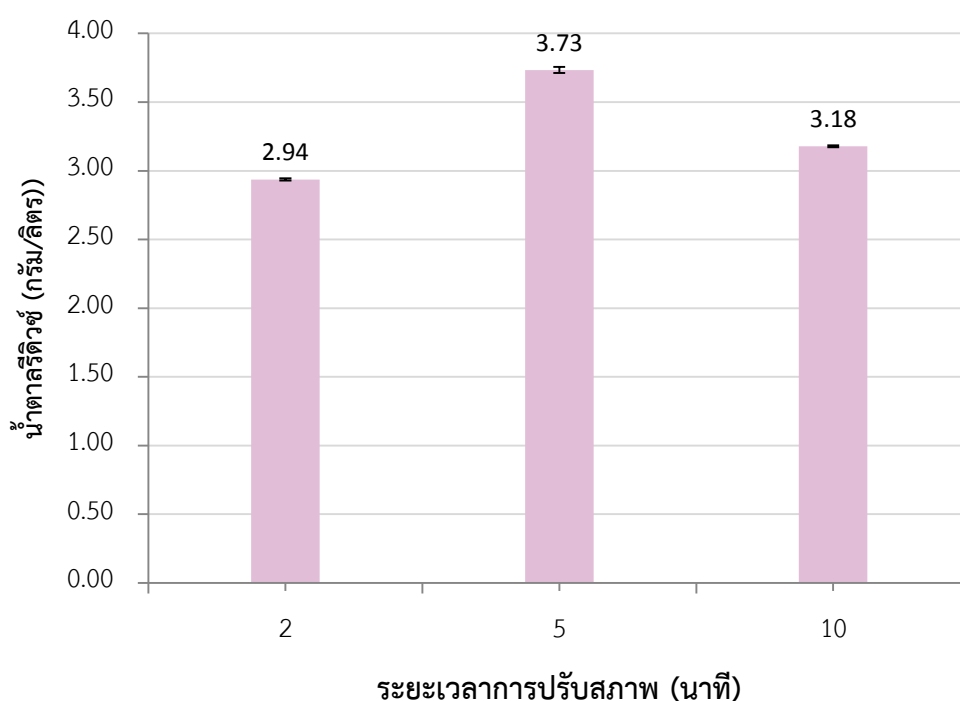
ภาพที่ 4.2 ผลของอุณหภูมิในการระเบิดด้วยไอน้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

#### 4.2.3 ระยะเวลาการปรับสภาพโดยวิธีระเบิดด้วยไอน้ำที่เหมาะสม

ผลการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยวิธีระเบิดด้วยไอน้ำ ที่ 180°ซ (ตามวิธีข้อ 4.2.1) แต่แปรผันระยะเวลาของการระเบิดด้วยไอน้ำเป็น 2, 5 และ 10 นาที พบว่าการปรับสภาพนาน 5



นาที่ ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 3.73 กรัม/ลิตร หรือ 40.6 กรัม/100 กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง (ภาพที่ 4.3) เมื่อใช้เวลาดลลง ในส่วนของลิกนินของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังยังไม่เพียงพอที่จะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และเมื่อใช้เวลานานเกินไปจะทำให้ส่วนของน้ำตาลกลูโคสที่ได้เกิดการไหม้เป็นสีน้ำตาล ให้น้ำตาลกลูโคสลดลง ระยะเวลาที่ดีที่สุดคือ 3-5 นาที ที่จะทำให้ส่วนของของแข็งลดปริมาณลงได้ (Chiaromonti และคณะ, 2012)



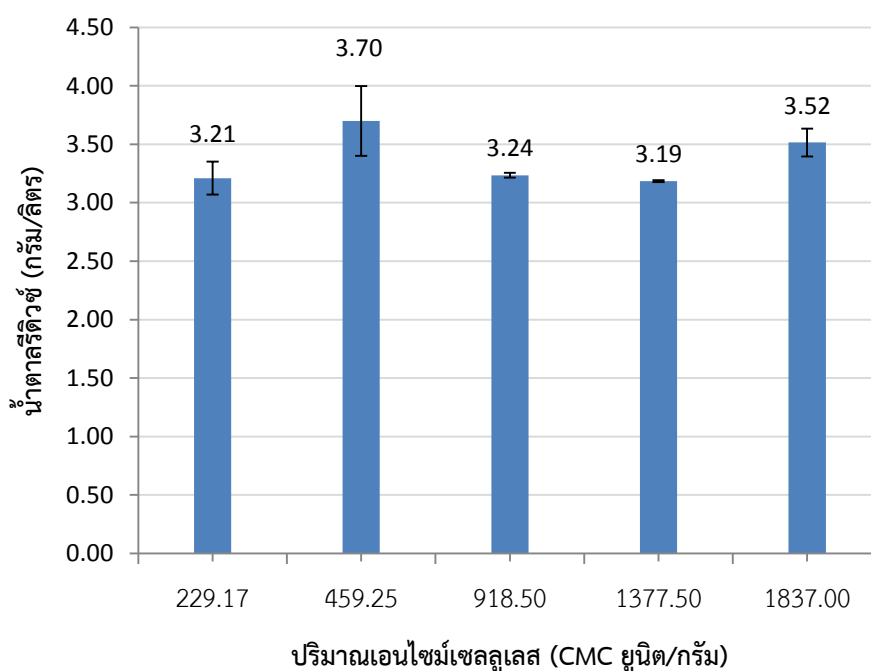
ภาพที่ 4.3 ผลของระยะเวลาในการระเบิดด้วยไอน้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

#### 4.3 สภาวะเหมาะสมของการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

##### 4.3.1 ปริมาณเซลลูเลสที่เหมาะสม

ผลการแปรผันปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพโดยวิธีการใช้กรดไฮโดรคลอริกร่วมกับการระเบิด

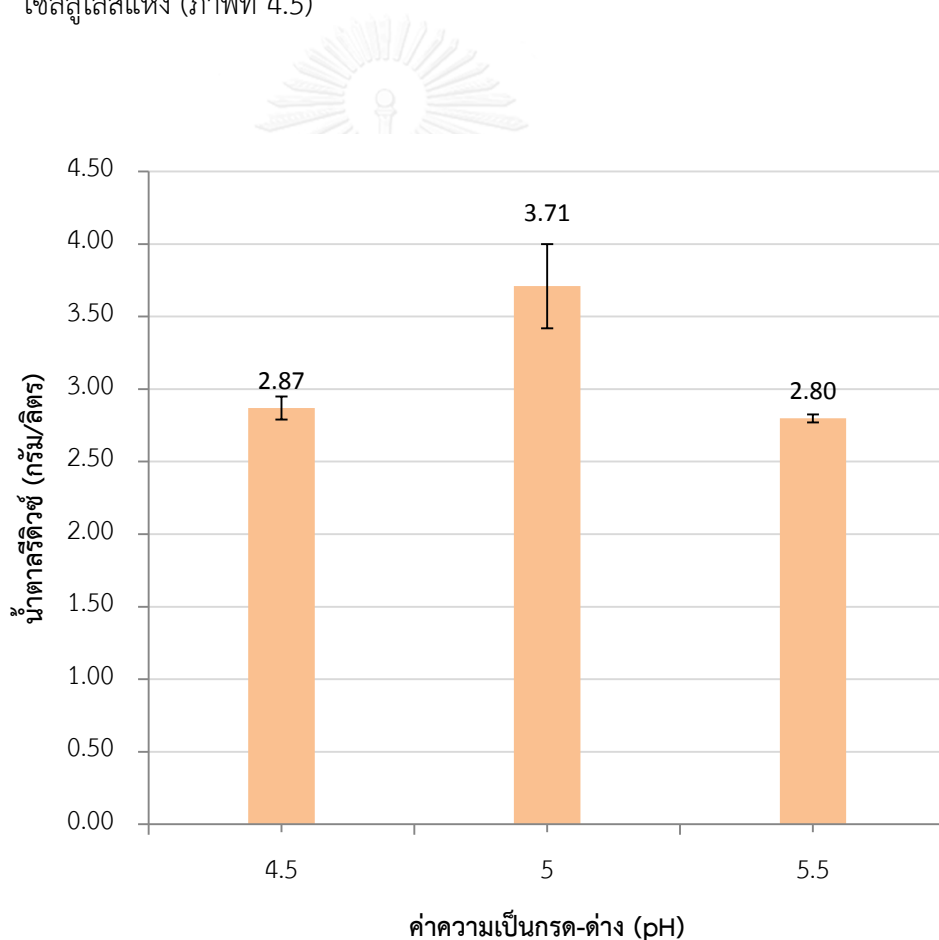
ไอน้ำที่สภาวะเหมาะสม (ผลจากข้อ 4.2) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลส 459.25 CMCs ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง และ 119.4 pPNG/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด 3.70 กรัม/ลิตร หรือ 40.2 กรัม/100 กรัมกากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง (ภาพที่ 4.4) ในผลการทดลองการปรับสภาพกากใยลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการระเปิดด้วยไอน้ำ พบว่าเมื่อนำกากใยลิกโนเซลลูโลส ที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้อุณหภูมิ 180°C นาน 5 นาที มาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด (0.40 กรัม/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง) ซึ่งพบว่าในภาวะดังกล่าวนี้ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสในงานวิจัยของ Ballesteros และคณะ (2006) เมื่อปรับสภาพฟางข้าวสาทิในกรดซัลฟิวริกเจือจางโดยการระเปิดด้วยไอน้ำที่ภาวะเดียวกัน (0.20 กรัมกลูโคส/กรัมฟางข้าว) Badiei และคณะ (2014) กล่าวว่า การย่อยสลายโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายกรดจะทำให้โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสแตกตัว ซึ่งสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสและทำให้มีความพรุนมากขึ้น เอนไซม์จึงสามารถเข้าย่อยโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสได้ดีขึ้น



ภาพที่ 4.4 ผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

#### 4.3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

ผลการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งใช้ในการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลส ที่ผ่านการปรับสภาพโดยวิธีระเบิดไอน้ำที่สภาวะเหมาะสม ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 459.25 CMCs ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง และ 119.4 pPNG/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3.71 กรัม/ลิตร หรือ 40.2 กรัม/100 กรัมกากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง (ภาพที่ 4.5)

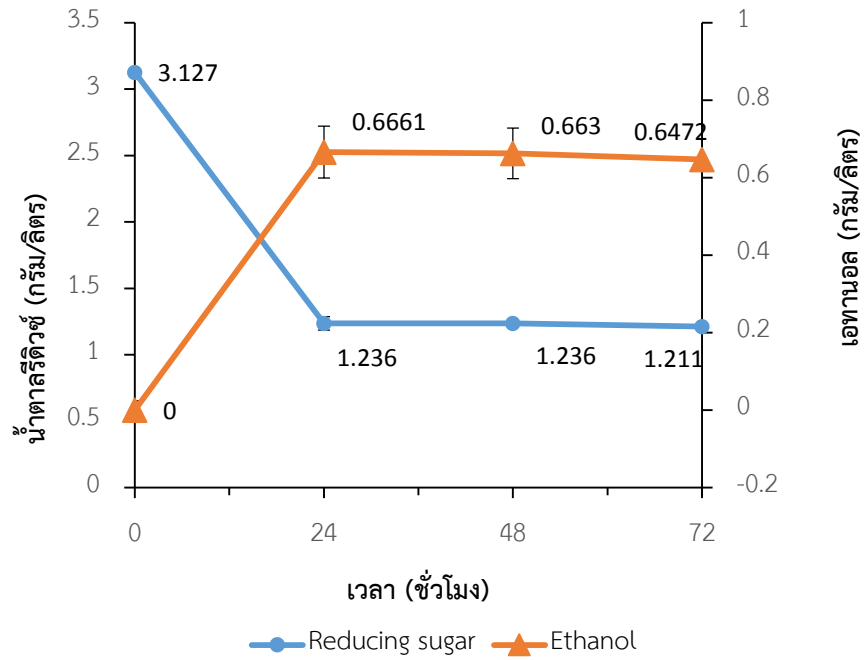


ภาพที่ 4.5 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการย่อยกากใยลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ต่อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

#### 4.4 ผลการทดสอบเบื้องต้น ในการผลิตเอทานอลจากกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน

ผลการนำกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพที่สภาวะเหมาะสม (ผลจากข้อ 4.2) แล้วล้างด้วยน้ำจนน้ำล้างมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง ปริมาณ 30 กรัม (น้ำหนักแห้ง) แขนวลอยในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรท 300 มล. มาหมักเป็นเอทานอล โดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 459.25 CMCs ยูนิต/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง และ 119.4 pPNG/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง (ผลจากข้อ 4.3.1) ซึ่งเป็นปริมาณที่มากเกินไป เนื่องจากการหมักโดยวิธีการนี้ น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นการยับยั้งที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ของการย่อยเซลลูโลส ถูกกำจัดโดยยีสต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ซึ่งเหมาะสมทั้งสำหรับการทำงานของเอนไซม์ และการหมักของยีสต์ และ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1 ระยะการเจริญ late log phase จำนวน  $1 \times 10^8$  cells/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง ที่ 40°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้ พบว่า ที่ 24 ชม. ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.666 กรัม/ลิตร หรือ 1.21 กรัมเอทานอล/100 กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง (น้ำหนักแห้ง) (ภาพที่ 4.6) ซึ่งทั้งนี้ปริมาณของเอทานอลอาจสูงมากกว่านี้ได้ หากมีการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีการนี้ เช่น ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้

ในการศึกษาการหมักเอทานอลเบื้องต้น โดยวิธีการหมักและย่อยพร้อมกัน โดยเมื่อนำกากใยลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำแล้ว มาหมักเป็นเอทานอลโดยยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1 พบว่าได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 1.21 กรัมเอทานอล/100 กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง หรือ 0.012 กรัมเอทานอล/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้ว่ากากใยลิกโนเซลลูโลสที่ได้จากการเอาเปลือกออกแล้ว สามารถเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้ แต่ปริมาณเอทานอลที่ได้นั้นมีปริมาณน้อยกว่า เนื่องจากเป็นส่วนของเส้นใยที่เหลือทิ้งที่ไม่ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ เมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น เช่น Asada และคณะ (2014) ได้นำต้นซีตาร์ที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำมาหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักและย่อยพร้อมกัน พบว่าได้เอทานอลสูงสุด 0.155 กรัมเอทานอล/กรัมต้นซีตาร์ที่แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Akaracharanya และคณะ (2011) พบว่าจะได้ปริมาณเอทานอลน้อยกว่า เนื่องจากวัสดุที่ใช้ไม่มีแป้ง และเป็นในส่วนของกากใยลิกโนเซลลูโลสที่เหลือ จึงทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่ต่ำกว่าตามตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.6 ผลการหมักเอทานอลจากกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง  
ด้วยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกันโดย *K. marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1

ตารางที่ 4.2 สรุปผลเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล จากกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังกับงานวิจัยอื่น

ปริมาณต่างๆ	กากใยลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และการระเบิดด้วยไอน้ำ (งานวิจัยนี้)	กากใยลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Akaracharanya และคณะ, 2011)
ปริมาณกากใยลิกโนเซลลูโลสหลังการปรับสภาพ	0.091 กรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง)	0.5 กรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง)
น้ำตาลที่ได้ในไฮโดรไลเซทในขั้นตอนก่อนการปรับสภาพ	0.345 กรัม/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง (น้ำตาลรีดิวซ์)	0.753 กรัม/กรัม (น้ำตาลกลูโคส)
น้ำตาลที่ได้ในไฮโดรไลเซทในขั้นตอนหลังการปรับสภาพ	0.406 กรัม/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง (น้ำตาลรีดิวซ์)	0.367 กรัม/กรัม และ 0.443 กรัม/กรัม (น้ำตาลกลูโคส)
เอทานอล	0.012 กรัมเอทานอล/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง หลังผ่านขั้นตอนการปรับสภาพ (น้ำตาลรีดิวซ์)	0.199 กรัม (น้ำตาลกลูโคส)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังซึ่งมีความชื้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ต่อน้ำหนัก) ประกอบด้วยเซลลูโลส 59.9 เฮมิเซลลูโลส 20 และลิกนิน 10.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่ได้หลังการย่อยเอาแป้งออกด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล จากกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง 30 กรัม (น้ำหนักแห้ง) จะได้ส่วนของกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังจำนวน 2.76 กรัม (น้ำหนักแห้ง) เมื่อนำมาปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 180°C ระยะเวลาเป็น 5 นาที ผลการหมักกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะเหมาะสมที่สุดเป็นเอทานอลทดสอบการหมักเอทานอลเบื้องต้นโดยวิธีการย่อยและการหมักพร้อมกัน ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 459.25 CMCs ยูนิต/กรัมกากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง และ 119.4 pPNG/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสแห้งของหัวมันสำปะหลัง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 และ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1 ระยะการเจริญ late log phase จำนวน  $1 \times 10^8$  cells/กรัมกากใยลิกโนเซลลูโลสแห้ง ที่ 40°C สภาวะจำกัดออกซิเจน ก่อนการปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำจะได้เอทานอล 0.11 กรัมเอทานอล/กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังหลังการปรับสภาพ (น้ำหนักแห้ง) และหลังการปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำจะได้เอทานอลสูงสุด 0.666 กรัม/ลิตร หรือ 1.21 กรัมเอทานอล/100 กรัม กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังก่อนการปรับสภาพ (น้ำหนักแห้ง) ที่ 24 ชั่วโมง

## รายการอ้างอิง

- ศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์. (2551). การเพาะปลูกมันสำปะหลัง. วิธีการเพาะปลูกมันสำปะหลังที่เหมาะสม from [http://web.sut.ac.th/cassava/index.php?name=14cas\\_plant&file=readknowledge&id=62](http://web.sut.ac.th/cassava/index.php?name=14cas_plant&file=readknowledge&id=62)
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675-685. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N., Srinorakutara, T., Kitpreechavanich, V., & Tolieng, V. (2011). Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 61, 431-436.
- Anuradha, R., Sumesh, A. K., & Venkatesh, K. V. (1999). Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochemistry*, 35, 367-375.
- Asada, C., Sasaki, C., Takamatsu, T., & Nakamura, Y. (2015). Conversion of steam-exploded cedar into ethanol using simultaneous saccharification, fermentation and detoxification process. *Bioresource Technology*, 176(0), 203-209. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.039>
- Association, T. T. S. (2005). The Process of Tapioca Starch Production. from <http://www.thaitapiocastarch.org/products.asp>
- Association, T. T. S. (2014). Report from the survey conducted from 30 August - 5 September 2014
- Avci, A., Saha, B. C., Kennedy, G. J., & Cotta, M. A. (2013). Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. *Bioresource Technology*, 142(0), 312-319. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.002>
- Badie, M., Asim, N., Jahim, J. M., & Sopian, K. (2014). Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass. *APCBEE Procedia*, 9(0), 170-174. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.030>



- Ballesteros, I., Negro, M. J., Oliva, M. J., Cabanas, A., Manzanares, P., & Ballesteros, M. (2006). Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132.
- Ballesteros, M., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P., & Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39(12), 1843-1848. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.011>
- Bals, B., Wedding, C., Balan, V., Sendich, E., & Dale, B. (2011). Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource Technology*, 102(2), 1277-1283. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.058>
- Blagbrough, I. S., Bayoumi, S. A. L., Rowan, M. G., & Beeching, J. R. (2010). Cassava: An appraisal of its phytochemistry and its biotechnological prospects. *Phytochemistry*, 71, 1940-1951.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., & Castro, E. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87, 692-700.
- Cardona, C. A., & Sánchez, Ó. J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98(12), 2415-2457. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>
- Carta, F. S., Soccol, C. R., Ramos, L. P., & Fontana, J. D. (1999). Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. *Bioresource Technology*, 68, 23-28.
- Carvalho, F., Duarte, L. C., & Giro, F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67(0022-4456), 849-864.
- Chen, W. H., Pen, B. L., Yu, C. T., & Hwang, W. S. (2011). Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102, 2916-2924.

- Cheng, J., Su, H., Zhou, J., Song, W., & Cen, K. (2011). Microwave-assisted alkali pretreatment of rice straw to promote enzymatic hydrolysis and hydrogen production in dark- and photo-fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(3), 2093-2101. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.021>
- Chiaromonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P., & Cherchi, F. (2012). Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*, 46(0), 25-35. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.020>
- Chu, Q., Yang, D., Li, X., Ma, B., Yu, S., & Yong, Q. (2013). An integrated process to enhance ethanol production from steam-exploded corn stover. *Fuel*, 823-827.
- COCK, J. H. (1982). *Cassava: a basic energy source in the tropics* (Vol. 218). Development, U. N. C. o. T. a. (2012, 4/27/2012). Cassava. from <http://www.unctad.info/en/Infocomm/AACP-Products/COMMODIRY-PROFILE---Cassava/>
- Gabhane, J., Prince William, S. P. M., Vaidya, A. N., Mahapatra, K., & Chakrabarti, T. (2011). Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment – A cellulosic ethanol perspective. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), 96-102. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.026>
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2012). Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 46(0), 70-78. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.026>
- Gao, Y., Xu, J., Yuan, Z., Liang, C., & Liu, Y. (2014). Ethanol Production from High Solids Loading of Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse with an SSF Process. *Bioresource Technology*, 9(2), 3466-3479.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775-4800. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- handbook, T. w. (2003). *Finnish Thermowood Association*. Helsinki, Finland.
- Harmsen, P. F. H., Huijgen, W. J. J., & Bermúdez, L. L. M. (2010). *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*.

- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., & Eijsink, V. G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5:45. doi: 10.1186/1754-6834-5-45
- Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E. L., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 602-619.
- Hu, Z., & Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38(3), 369-378. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.08.001>
- Jutakanoke, R., Leepipatpiboon, N., Tolieng, V., Kitpreecavanich, V., Srinorakutara, T., & Akaracharanya, A. (2012). Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 39, 283-289.
- Kitchaiya, P., Intanakul, P., & Krairis, M. (2003). Enhancement of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Wastes by Microwave Pretreatment Under Atmospheric Pressure. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 23(2), 217-225.
- Krassig, H., & Schurz, J. (2002). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Sixth edition*. Germany: Wiley-VCH.
- Krisomdee, K. (2011). *Ethanol production from starch and fiber of Cassava Waste Pulp by yeast*. (Master), Chulalongkorn University.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, 3713-3729.
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 449-467.
- López-Linares, J. C., Ballesteros, I., Tourán, J., Cara, C., Castro, E., Ballesteros, M., & Romero, I. (2015). Optimization of uncatalyzed steam explosion pretreatment of rapeseed straw for biofuel production. *Bioresource Technology*, 190(0), 97-105. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.066>

- Ma, H., Liu, W.-W., Chen, X., Wu, Y.-J., & Yu, Z.-L. (2009). Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresource Technology*, 100(3), 1279-1284. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.045>
- Menon, V., & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522-550. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Ballesteros, I., Fernández, J. L., & Ballesteros, M. (2013). Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*—Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. *Biochemical Engineering Journal*, 79(0), 94-103. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.006>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673-686. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Nations, F. a. A. O. o. t. U. (2008). Cassava. from [http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/index\\_en.html](http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/index_en.html)
- Oliveira, F. M. V., Pinheiro, I. O., Souto-Maior, A. M., Martin, C., Gonçalves, A. R., & Rocha, G. J. M. (2013). Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. *Bioresource Technology*, 130(0), 168-173. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.030>
- Oluwole, O. S. A., Onabolu, A. O., Mtunda, K., & Mlingi, N. (2007). Characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties in Nigeria and Tanzania, and farmers' perception of toxicity of cassava. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 559-567. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2007.04.004>
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I : Inhibition and detoxification *Bioresource Technology*, 74, 17–24.

- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II : Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74, 25–33.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., Vandenberghe, L. P. S., & Mohan, R. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, 74, 81-87.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Susan, E. E. (1992). *Biology of plants (6th edition)*: Worth.
- Scholl, A. L., Menegol, D., Pitarelo, A. P., Fontana, R. C., Filho, A. Z., Ramos, L. P., . . . Camassola, M. (2015). Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. *Bioresource Technology*, 192(0), 228-237. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.065>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Suryawati, L., Wilkins, M. R., Bellmer, D. D., Huhnke, R. L., Maness, N. O., & Banat, I. M. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 894-902.
- Tan, K. H., Ferguson, L. B., & Carlton, C. (1984). Conversion of cassava starch to biomass, carbohydrates, and acids by *Aspergillus niger*. *The Journal of Applied Biochemistry*, 6(1-2), 80-90.
- Tengerdy, R. P., & Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 169-179. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00129-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00129-8)
- Tonukari, N. J. (2004). Cassava and the future of starch. 7, 0717-3458.
- Vuilleumier, S. (1993). Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructose. *The American journal for clinical nutrition*, 58, 733S-736S.



**ภาคผนวก ก**  
**อาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1. Isolation medium**

Cellulose/Glucose	100	g
Bacto-peptone	3	g
Yeast extract	3	g
Distilled water	1000	ml

ปรับพีเอชให้เป็น 5.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง อุณหภูมิที่ 110°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที

**2. Enrichment medium**

Cellulose/Glucose	20	g
Bacto-peptone	3	g
Yeast extract	3	g
Distilled water	1000	ml

ปรับพีเอชให้เป็น 5.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง อุณหภูมิที่ 110°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที

**3. Yeast Peptone Dextrose (YPD) Agar**

Glucose	10	g
Bacto-peptone	5	g
Yeast extract	3	g
Malt extract	3	g
Agar	20	g
Distilled water	1000	ml

ปรับพีเอชให้เป็น 5.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง อุณหภูมิที่ 110°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที

#### 4. Fermentation medium

Glucose	150	g
Polypeptone	90	g
Yeast extract	60	g
Distilled water	1000	ml

ปรับพีเอชให้เป็น 5.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง อุณหภูมิที่ 110°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที





## ภาคผนวก ข

### สารเคมี

#### 1. Somogyi-Nelson Reagent (Somogyi, 1952)

##### 1.1 Alkaline Copper Reagent:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71 g

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  40 g

(นำ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร)

1N NaOH 100 ml

(นำ NaOH 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)

10% (w/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  80 ml

(นำ  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร)

$\text{Na}_2\text{SO}_4$  180 g

นำสารละลายทั้งหมดมาผสมกัน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา

ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน และนำมากรองก่อนนำไปใช้งาน

CHULALONGKORN UNIVERSITY

##### 1.2 Nelson's reagent:

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  53.2 g

$\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc.) 21 ml

12% (w/v)  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 ml

(นำ  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร)

นำสารละลายทั้งหมดมาผสมกัน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา

ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน และนำมากรองก่อนนำไปใช้งาน



### 1.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์

นำตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม Alkaline copper 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง 3-5 นาที แล้วจึงนำมาเติม Nelson's reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ตรวจวัดได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ

### 1.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

เตรียมน้ำตาลกลูโคส 10 มิลลิกรัม เทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าขวดให้น้ำตาลกลูโคสละลายจนหมด เตรียม standard จากสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นนำไปเขียนเป็นกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

### 1.5 การคำนวณค่าน้ำตาลรีดิวซ์

$$\text{Formula Reducing sugar (g/l)} = \frac{A_{520\text{nm}} \times \text{dilution}}{\text{Slope}}$$

## 2. Citrate buffer (Dawson,1986)

### 2.1 100 mM Citrate buffer pH 4.0

Citric acid monohydrate 21.01 g/l

Trisodium citrate dehydrate 29.41 g/l

ใช้ 100 mM Citric acid monohydrate ปริมาณ 590 มิลลิลิตร ผสมกับ Trisodium citrate dehydrate ปริมาณ 410 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 4.0

**2.2 100 mM Citrate buffer pH 4.5**

Citric acid monohydrate 21.01 g/l

Trisodium citrate dehydrate 29.41 g/l

ใช้ 100 mM Citric acid monohydrate ปริมาณ 495 มิลลิลิตร ผสมกับ  
Trisodium citrate dehydrate ปริมาณ 505 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 4.5

**2.3 100 mM Citrate buffer pH 5.0**

Citric acid monohydrate 21.01 g/l

Trisodium citrate dehydrate 29.41 g/l

ใช้ 100 mM Citric acid monohydrate ปริมาณ 350 มิลลิลิตร ผสมกับ  
Trisodium citrate dehydrate ปริมาณ 650 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.0

**2.4 100 mM Citrate buffer pH 5.5**

Citric acid monohydrate 21.01 g/l

Trisodium citrate dehydrate 29.41 g/l

ใช้ 100 mM Citric acid monohydrate ปริมาณ 255 มิลลิลิตร ผสมกับ  
Trisodium citrate dehydrate ปริมาณ 745 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.5

### 3. เตรียมสารละลายกรด

#### 3.1 2% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.5L)

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc.)	16.95	ml
--	-------	----

Distilled water	1483.05	ml
-----------------	---------	----

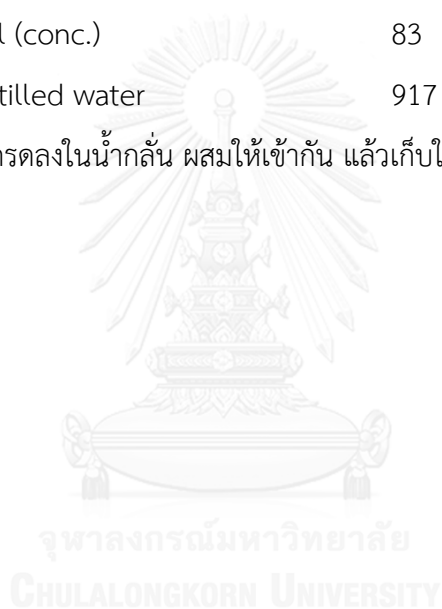
เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 3.2 1N HCl (1L)

HCl (conc.)	83	ml
-------------	----	----

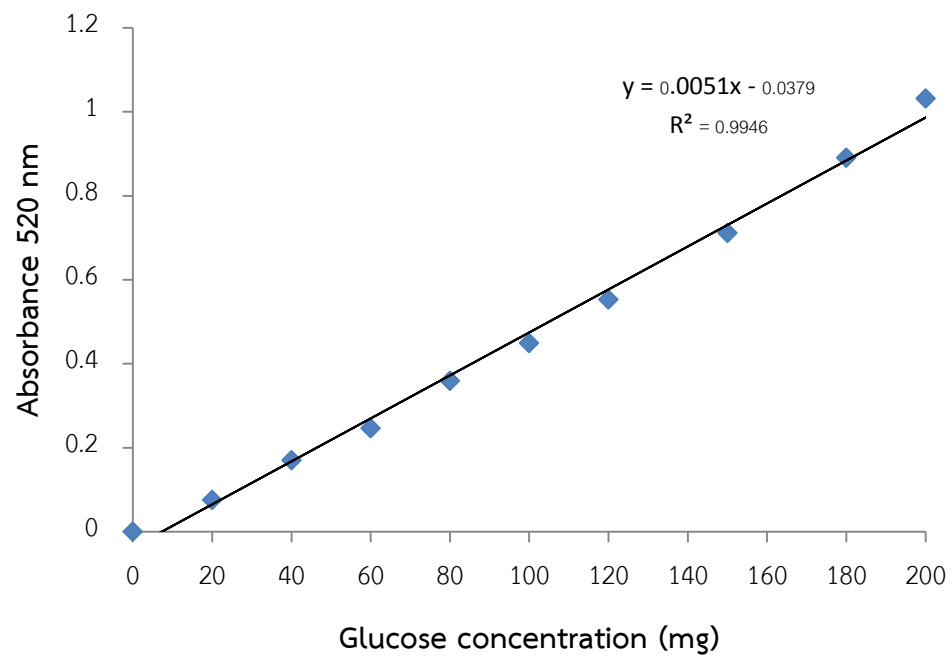
Distilled water	917	ml
-----------------	-----	----

เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง



ภาคผนวก ค  
กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ข้าพเจ้า นางสาวณัฐธิดา เกิดแล้ว เกิดเมื่อวันที่ 25 มิถุนายน พ.ศ. 2532 ที่จังหวัดแพร่ ประเทศไทย ข้าพเจ้าจบการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี พ.ศ. 2555 และศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2555

ผลงานการนำเสนอทางวิชาการ :

Natthida Kerdlaw, Ancharida Akaracharanya. 2014. Optimization condition for steam explosion pretreatment of lignocellulosic cassava root fiber. The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference by the Thai Society for Biotechnology (TSB) and Mae Fah Lunag University (School of Science). November 26th - 29th, 2014 at Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.