

การคัดเลือกวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลโดย
Saccharomyces cerevisiae

นางสาว จารุวรรณ สัมพันธ์วิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2103-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SELECTION OF AGRICULTURAL WASTES AS SUBSTRATE FOR ETHANOL
FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae*

Miss Jaruwan Sumphanwanich

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-2103-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลโดย <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
โดย	นางสาวจากรุวรรณ สัมพันธ์วณิช
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ชีรภัทร ศรีนรคุตร .
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัน ธิพิพัฒน์ไพบูลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีชัยวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ชีรภัทร ศรีนรคุตร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัน ธิพิพัฒน์ไพบูลย์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวณิชย์)

จากรูวรรณ สัมพันธ์วณิช : การคัดเลือกวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับเป็นสารตั้งต้นในการหมัก
เอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* (SELECTION OF AGRICULTURAL WASTES AS
SUBSTRATE FOR ETHANOL FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae*)
อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร. อัญชรีดา อัครจรัลญา, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ดร. ชีรภัทร ศรีนรคุตร และ
ผศ.ดร. ณัฐชนัน ธิพิพัฒน์ไพบูลย์, 107 หน้า, ISBN 974-14-2103-6

ศึกษาการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร คือ ชานอ้อย ชังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว
ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส 73.99, 81.74, 78.36 และ 83.61 %โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ไปใช้เป็นสารตั้งต้น
ของการผลิตเอทานอล โดยวิธีการปรับสภาพด้วยกรดพบว่าความเข้มข้นของกรด (0-1.5 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร)
อุณหภูมิ (121, 140, 160 องศาเซลเซียส) เวลา (15, 60 นาที) ที่เพิ่มขึ้นและการใช้ความดันร่วมด้วยมีผลทำให้
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เพิ่มขึ้น แต่การใช้ความเข้มข้นของกรดสูงพบว่าทำให้เกิดเฟอร์ฟูรัล ไฮดรอกซีเมทิล
เฟอร์ฟูรัล และกรดอะซีติก ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ในขั้นตอนการหมักเจือปนออกมาในปริมาณที่
สูงด้วย ผลการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่ง
ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที ลำไยอบแห้งให้ปริมาณกลูโคสสูงสุด คือ 159.38 มิลลิกรัม/กรัม
รองลงมาคือ ชานอ้อย ชังข้าวโพด ฟางข้าว คือ 133.56, 75.29 และ 8.41 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ และ
ชังข้าวโพดให้ปริมาณไซโลสสูงสุดคือ 184.06 มิลลิกรัม/กรัม รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว ลำไยอบแห้ง คือ
110.46, 77.90 และ 3.50 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ พบเฟอร์ฟูรัลในชังข้าวโพดมากที่สุดคือ 0.121 กรัม/ลิตร
รองลงมาคือ ชานอ้อย ลำไยอบแห้ง ฟางข้าว คือ 0.107, 0.088 และ 0.072 กรัม/ลิตร ตามลำดับ
พบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลในชานอ้อยมากที่สุดคือ 1.522 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ ลำไยอบแห้ง ชังข้าวโพด
ฟางข้าว คือ 1.157, 0.812 และ 0.107 กรัม/ลิตร ตามลำดับ พบกรดอะซีติกในชังข้าวโพดมากที่สุดคือ
2.288 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว ลำไยอบแห้งคือ 1.823, 0.803 และ 0.286 กรัม/ลิตร
ตามลำดับ และเมื่อนำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสทางการค้ายี่ห้อ Cyto[®] CL ผสมกับยี่ห้อ GC 220 จำนวน 81
หน่วยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (อัตราส่วนเอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดส=3:1) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-
เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชังข้าวโพด และลำไยอบแห้ง จะให้กลูโคสสูงสุด คือ 13.39 และ 13.36 กรัม/ลิตร
รองลงมาคือ ชานอ้อย 11.68 กรัม/ลิตร และฟางข้าว 10.71 กรัม/ลิตร สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้นี้เมื่อ
เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร และกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปรับค่ากรด-เบสเป็น 4.5 แล้วหมัก
โดย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง พบว่า
ลำไยอบแห้งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 24.43 %โดยน้ำหนัก รองลงมาคือ ชังข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าว
ผลิตเอทานอลได้ 20.78, 20.76 และ 16.58 %โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ศักยภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการ
เกษตรที่ทดสอบซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดสำหรับเป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae*
เรียงตามลำดับดังนี้ ลำไยอบแห้ง > ชังข้าวโพด = ชานอ้อย > ฟางข้าว

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิติ.....
ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4772236423: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: LIGNOCELLULOSE/PRETREATMENT/CELLULASE/ETHANOL

JARUWAN SUMPHANWANICH: SELECTION OF AGRICULTURAL WASTES AS
SUBSTRATE FOR ETHANOL FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae*. THESIS
ADVISOR: ASSOC.PROF. ANCHARIDA UAKKARAJARANYA, THESIS CO-ADVISOR:
DR. TEERAPAT SRINORAKUTARA AND ASST.PROF. NATCHANAN LEEPIPATPIBOON,
107 pp. ISBN: 974-14-2103-6

Agricultural wastes namely; corn cob, bagasse, dried longan and rice straw comprise of 73.99, 81.74, 78.36 and 83.61 %(w/w) cellulose, respectively was employed as starting material through an acid pretreatment for ethanol production. Even though the use of high sulfuric acid concentration (0-1.5 %,w/v), temperature (120, 140 and 160°C), time (15 and 60 min) and a combination with high pressure gave high yield of reducing sugars, but higher concentration of fermentation inhibitors e.g. furfural, hydroxymethylfurfural, acetic acid were also produced. Pretreatment by using 0.75 %(w/v) sulfuric acid and autoclaved at 121°C, 15 lbs/inc² for 60 min. gave rise of maximum glucose at 159.38 mg/g when using dried longan as starting material followed by bagasse, corn cob, and rice straw at 133.56, 75.29 and 8.41 mg/g, respectively. In term of xylose, a maximum yield of 184.06 mg/g was obtained from corn cob while those by bagasse, rice straw and dried longan gave yield at 110.46, 77.90, 3.50 mg/g, respectively. Corn cob produced the highest level of furfural at 0.121 g/l followed by bagasse, dried longan and rice straw at 0.107, 0.088 and 0.072 g/l, respectively. Hydroxymethylfurfural was found maximum from bagasse at 1.522 g/l followed by dried longan, corn cob and rice straw at 1.157, 0.812 and 0.107 g/l, respectively. The highest acetic acid concentration at 2.288 g/l was produced from corn cob followed from bagasse, rice straw and dried longan at 1.823, 0.83 and 0.286 g/l, respectively. Enzymatic hydrolysis of acid pretreated agricultural wastes by the cellulase mixture; Cyto[®]CL and GC 220 at 81 (endoglucanase) units, endoglucanase: β -glucosidase activity at 3:1, 50°C, pH 4.5 for 48 hrs. gave maximum glucose yield from corn cob at 13.39 g/l and dried longan 13.36 g/l, followed by bagasse 11.68 g/l and rice straw 10.71 g/l. Fermentation of the reducing sugar from agricultural waste hydrolysate after the addition of 0.4 %(w/v) ammonium sulfate, 10 g/l glucose and pH adjusted to 4.5 by *Sacchoromyces cerevisiae* TISTR 5596 in static culture, room temperature for 72 hrs. produced maximum amount of ethanol at 24.43 %(w/w) from dried longan followed by corn cob (20.78%,w/w), bagasse (20.76%,w/w) and rice straw (16.58%,w/w), respectively. Based on the above results we proposed that the potential ranking of acid pretreated agricultural wastes tested for using as starting materials for ethanol fermentation by *Sacchoromyces cerevisiae* was dried longan > corn cob = bagasse > rice straw.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature.....

Academic year.....2005.....Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความช่วยเหลือจากหลายทุกท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชรีดา อัครจรัสญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. ธีรภัทร ศรีนรคุตร ที่ได้ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนันท์ ลิขิตพัฒน์ไพบุณย์ ที่ช่วยวิเคราะห์สารตัวอย่าง สอนการใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ตลอดจนคำแนะนำต่างๆในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* TISR 5596

ขอขอบพระคุณ บริษัท อีสเอเซียติก ประเทศไทย จำกัด (มหาชน) และบริษัท สยามวิคตอรี เคมิคอล จำกัด ที่ให้การสนับสนุนเอนไซม์ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยพลังงาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนบางส่วน

ขอขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่ และน้องสาว ที่คอยดูแลเอาใจใส่ และให้ทุนการศึกษาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา พี่ๆเพื่อนๆน้องๆ โดยเฉพาะ ห้องปฏิบัติการ 405 รวมทั้งเพื่อนๆในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คอยให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจ และความช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ(ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ).....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เอทานอล.....	3
2.2 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส.....	7
2.3 กระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวล.....	12
2.3.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ.....	12
2.3.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์.....	15
2.3.3 กระบวนการหมักเอทานอล.....	19
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
3.1 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัย 4 ชนิด.....	28
3.2 เคมีภัณฑ์.....	28
3.3 เอนไซม์.....	29
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง.....	29
3.5 จุลินทรีย์.....	30
3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	30
3.7 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์.....	31

3.8 วิธีการทดลอง.....	32
4. ผลการทดลอง.....	35
5. วิจัยรณัผลการทดลอง.....	75
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	79
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	87
ภาคผนวก ก.....	88
ภาคผนวก ข.....	99
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	107

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	คุณสมบัติของเชื้อเพลิงเอทานอล..... 3
2.2	เปรียบเทียบคุณสมบัติเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ..... 5
2.3	โรงงานผลิตไบโอเอทานอลในเชิงพาณิชย์..... 6
2.4	โรงงานผลิตและจำหน่ายเอทานอลในประเทศไทยที่ยังอยู่ในระหว่างก่อสร้างโรงงาน...6
2.5	น้ำตาล และเอทานอลที่เป็นองค์ประกอบอื่น พบในพืชโดยทั่วไป.....11
2.6	การเจริญและการหมักเอทานอลของ <i>S. cerevisiae</i> ในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ ที่มีสารยับยั้งชนิดต่างๆ..... 14
4.1	องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร..... 35
4.2	ปริมาณน้ำตาลและสารยับยั้งจากการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 และ 1.0 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 60 นาที.....42
4.3	ความเสถียรของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดสของเซลล์ยีสี่ห่อ CYTO [®] CL และ GC 220 ค่ากรด-เบส 4.5 ที่ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง..... 58
4.4	แสดงแอกทิวิตีและความเสถียรของเอนไซม์..... 59
4.5	อัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดสใน 1 มิลลิกรัมโปรตีน ของเซลล์ยีสี่จาก <i>T. reesei</i> , เซลล์ยีสี่ผสม ที่ 55 องศาเซลเซียส และ <i>A. niger</i> ที่ 60 องศาเซลเซียส..... 61
4.6	น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดจากการย่อยสลายขานอ้อย ที่ 55 องศาเซลเซียสด้วย เซลล์ยีสี่ผสมจำนวน 64 หน่วยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ที่ระยะเวลาต่างๆ..... 64
4.7	การเปรียบเทียบผลการทดลองน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส กับงานวิจัยอื่น.....69
4.8	การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลกับงานวิจัยอื่น..... 73

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช.....	7
2.2	สายโซ่ตรงของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้าไกลโคสิติก ประกอบเป็นเซลลูโลส.....	8
2.3	โครงสร้างลิกนินแสดง 3 หน่วยย่อยของฟีนิลโพรเพน และพันธะ 3 ชนิด.....	10
2.4	สัดส่วนปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่พบในพืชโดยทั่วไป.....	10
2.5	กระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวล.....	12
2.6	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายของวัสดุลิกโนเซลลูโลส.....	13
2.7	แผนผังของ Dilute acid pretreatment และ Hot wash.....	15
2.8	การย่อยสลายเซลลูโลส.....	16
2.9	โครงสร้างของเซลลูโลส และตำแหน่งที่เอนไซม์ชนิดต่างๆเข้าทำปฏิกิริยา.....	17
2.10	กระบวนการหมักเอทานอลแบบ separate hydrolysis and fermentation.....	19
2.11	กระบวนการหมักเอทานอลแบบ simultaneous saccharification and cofermentation	20
2.12	แอดคทีฟีสต์.....	21
2.13	กระบวนการไกลโคไลซิส.....	21
3.1	เครื่องบดเยื่อ.....	31
3.2	ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆก่อนและหลัง การตัดและ/หรือการบด.....	34
4.1	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121, 140 และ 160 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมัน ควบคุมอุณหภูมิ 15 นาที.....	37
4.2	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ในอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ และหม้อนึ่งความดันไอน้ำ.....	38
4.3	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 นาที และ 60 นาที.....	39

รูปที่	หน้า
4.4	น้ำตาลรีดิวิซท์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที.....40
4.5	น้ำตาลรีดิวิซท์ที่ได้หลังการปรับสภาพขานอ้อย และฟางข้าว ปริมาณต่างๆ ที่ 121 องศาเซลเซียส ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที..... 43
4.6	ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ขานอ้อย และฟางข้าวปริมาณต่างๆ หลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียสในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที..... 44
4.7	ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ก่อนการปรับสภาพ และหลังการปรับสภาพที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที..... 45
4.8	ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ หลังการปรับสภาพด้วย การบด และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0 และ 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที..... 46
4.9	การเปรียบเทียบเฮมิเซลลูโลสที่เหลือ เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที.....47
4.10	แอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดส จาก <i>T. reesei</i> ATCC 26921 ค่ากรด-เบส 5.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ..... 48
4.11	แอกทิวิตีที่ค่ากรด-เบสต่างๆ ของเอนโดกลูคาเนส จาก <i>T. reesei</i> ATCC 26921 ที่ 55 องศาเซลเซียส..... 49
4.12	ความเสถียรของเอนโดกลูคาเนส จาก <i>T. reesei</i> ATCC 26921 ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0..... 49
4.13	แอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดส จาก <i>A. niger</i> ค่ากรด-เบส 5.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ..... .50
4.14	แอกทิวิตีที่ค่ากรด-เบสต่างๆของเอนโดกลูคาเนส จาก <i>A. niger</i> ที่ 55 และ 60 องศาเซลเซียส..... 51
4.15	ความเสถียรของเอนโดกลูคาเนส จาก <i>A. niger</i> ที่ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0..... 51

รูปที่	หน้า
4.16	แอคทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดส จาก <i>T. longibrachiatum</i> ยี่ห้อ CYTO [®] CL ค่ากรด-เบส 4.8 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....52
4.17	แอคทิวิตีที่ค่ากรด-เบสต่างๆ ของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดสจาก <i>T. longibrachiatum</i> ยี่ห้อ CYTO [®] CL ที่ 55 องศาเซลเซียส.....53
4.18	ความเสถียรของเอนโดกลูคาเนส จาก <i>T. longibrachiatum</i> ยี่ห้อ CYTO [®] CL ที่ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5..... 53
4.19	แอคทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดส จาก <i>T. reesei</i> ยี่ห้อ GC 220 ค่ากรด-เบส 4.8 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....54
4.20	ความเสถียรของบีต้ากลูโคซิเดส จาก <i>T. reesei</i> ยี่ห้อ GC 220 ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5.....55
4.21	แอคทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดส จาก <i>T. reesei</i> ยี่ห้อ Celluclast [®] 1.5 L FG ค่ากรด-เบส 4.8 ที่อุณหภูมิต่างๆ..... 56
4.22	แอคทิวิตีที่ค่ากรด-เบสต่างๆของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดส จาก <i>T. reesei</i> ยี่ห้อ Celluclast [®] 1.5 L FG ที่ 55 องศาเซลเซียส.....56
4.23	แอคทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดส ของเซลลูเลสผสมจาก <i>T. reesei</i> และ <i>A. niger</i> ยี่ห้อ Cellubrix ค่ากรด-เบส 4.8 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....57
4.24	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยขาน้อยผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก เข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่ง ความดันไอน้ำ 60 นาที่ ด้วยเซลลูเลส ที่ 55 และ60 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 62
4.25	น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นจากการย่อยด้วยเซลลูเลสผสมจำนวน 64 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....63
4.26	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ไม่ปรับสภาพด้วยกรด และปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ด้วยเซลลูเลสผสมจำนวน 64 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 55 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง.....65
4.27	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่ปรับสภาพด้วย กรดซัลฟูริก ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที่ ด้วยเซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO [®] CL และGC 220 จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ.....67

รูปที่	หน้า
4.28	น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นจากการย่อยด้วยเซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO [®] CL และ GC 220 จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์(เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....68
4.29	ชนิดและปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO [®] CL และ GC 220 จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์(เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....68
4.30	ลักษณะสีของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเซลลูเลส..... 71
4.31	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีการเติมกลูโคส หมักโดย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596 ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง..... 72
ก.1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโบวีซีรัมอัลบูมิน (ไมโครกรัม) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....95
ก.2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร.....97
ข.1	โครมาโตแกรมน้ำตาลของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยกรดซัลฟูริก ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที่.....99
ข.2	โครมาโตแกรมสารยับยั้งต่างๆของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยกรดซัลฟูริกที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที่..... 101
ข.3	โครมาโตแกรมของน้ำตาลของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 60 นาที่ และย่อยด้วยเซลลูเลสผสมระหว่างCYTO [®] CL และ GC 220 จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....101
ข.4	โครมาโตแกรมของเอทานอล ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีการเติมกลูโคส หมักโดย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596 ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง.....105

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ประเทศไทยมีแหล่งทรัพยากรธรรมชาติด้านพลังงานอยู่น้อย ไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ จึงจำเป็นต้องพึ่งพาการนำเข้าพลังงานโดยเฉพาะน้ำมันดิบจากต่างประเทศทุกปีทำให้ต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศจำนวนมาก ขณะเดียวกันประเทศไทยยังได้รับผลกระทบจากความผันผวนของราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และปัญหาของแหล่งพลังงานสำรองจากธรรมชาติที่กำลังจะหมดไป ดังนั้นรัฐบาลได้ให้ความสำคัญในการวิจัยและพัฒนาการใช้พลังงานทดแทน โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงานจากชีวมวล (biomass) เช่น เอทานอล ไบโอดีเซล เป็นต้น ซึ่งเอทานอลเป็นผลผลิตที่ได้จากผลผลิตทางการเกษตร สามารถนำมาทดแทนสาร MTBE (methyl tertiary butyl ether) ในน้ำมันเบนซิน 95 เรียกน้ำมันแก๊สโซฮอล์ (gasohol) ในปัจจุบันถ้าต้องการผลิตเอทานอล 1 ลิตร จะต้องใช้ข้าวโพดประมาณ 2.5 กิโลกรัม ต้นอ้อยประมาณ 11 กิโลกรัม ข้าวประมาณ 2.5 กิโลกรัม หรือหัวมันสำปะหลังสดประมาณ 5-6 กิโลกรัม (คณะกรรมการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545)

เอทานอล (ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl Alcohol) มีสูตรทางเคมี คือ C_2H_5OH นอกจากสามารถผลิตได้จากพืช เช่น อ้อย ข้าวโพด มันสำปะหลัง แล้วยังสามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด กระบวนการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนิยมใช้ 2 วิธี คือวิธีทางเคมีโดยการใช้น้ำเค็ม (chemical hydrolysis) และวิธีทางชีวเคมีโดยการใช้น้ำเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) วิธีการใช้น้ำเค็มก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม และการปนเปื้อนของสารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการหมักเอทานอล เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural) ในวิธีการใช้น้ำเอนไซม์ลิกโนเซลลูโลสจะถูกนำมาผ่านการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อกำจัดลิกนิน (lignin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลดบริเวณโครงสร้างที่มีการจัดเรียงตัวโมเลกุลเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูง (cellulose crystalline) เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ดีขึ้น (McMillan, 1994) หลังจากนั้นจึงย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อปลดปล่อยน้ำตาลออกแล้วจึงหมักให้ได้เป็นเอทานอลต่อไป แต่วิธีการใช้น้ำเอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพงจึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูง

องค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลส คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดเมื่อนำมาย่อยสลายด้วยกรด ต่าง หรือ เอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคส ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อนำมาย่อยสลายจะได้น้ำตาลไซโลส และอะราบิโนสเป็นส่วนใหญ่

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อเปรียบเทียบศักยภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรบางชนิด ในการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิต เอทานอล
- 1.2.2 การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร
- 1.3.2 ศึกษาวิธีการปรับสภาพด้วยกรดที่เหมาะสมในการเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับการย่อยด้วยเซลลูเลส
- 1.3.3 ศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลสทางการค้า
- 1.3.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (ผลจากข้อ 1.3.3) ด้วยเซลลูเลส
- 1.3.5 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจาก enzymatic hydrolysate (ผลจากข้อ 1.3.4) โดยใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5596

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถประเมินศักยภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรบางชนิดที่มีอยู่ในประเทศไทย เพื่อการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นของการผลิตเอทานอล และได้ภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การย่อยสลายด้วยเซลลูเลส การหมักด้วยยีสต์ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (ethanol)

เอทานอล หรือที่รู้จักกันดีคือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) มีสูตรโมเลกุล คือ C_2H_5OH จุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใสไม่มีสี ติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงินไม่มีควัน สามารถผลิตได้จากผลผลิตทางการเกษตร และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ (คณะกรรมการการพลังงานผู้แทนราษฎร, 2545) ดังนี้

- 1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น
- 2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีทรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น
- 3) วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของเชื้อเพลิงเอทานอล (U.S. department of energy, 2002)

Property	Comment
Vapor density	Ethanol vapor, like gasoline vapor, is denser than air and tends to settle in low areas. However, ethanol vapor disperses rapidly.
Solubility In Water	Fuel ethanol will mix with water, but at high enough concentrations of water, the ethanol will separate from the water.
Energy Content	For identical volumes, ethanol contains less energy than gasoline. On an energy basis, 1.0 gallon of E85 is equivalent to 0.72 gallons of gasoline.
Flame visibility	A fuel ethanol flame is less bright than a gasoline flame but is easily visible in daylight.
Specific gravity	Pure ethanol and ethanol blends are heavier than gasoline.
Conductivity	Ethanol and ethanol blends conduct electricity. Gasoline, by contrast, is an electrical insulator.
Stoichiometric Fuel-to-air ratio	E85 needs more fuel per pound of air than gasoline; therefore, E85 cannot be used in a conventional vehicle.

Property	Comment
Toxicity	Ethanol is less toxic than gasoline or methanol. Carcinogenic compounds are not present in pure ethanol; however, because gasoline is used in the blend, E 85 is considered to be potentially carcinogenic.
Flammability	At low temperature (32°F), E85 vapor is more flammable than gasoline vapor. However at normal temperatures, E85 vapor is less flammable than gasoline, because of the higher auto ignition temperature of E85.

ข้อดีของการใช้เอทานอลจากวัสดุเกษตรเป็นพลังงานทดแทน (คณะกรรมการมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

1. เกษตรกรมีแหล่งหรือทางเลือกในการขายวัตถุดิบเพิ่มขึ้น
2. เกษตรกรสามารถสร้างโรงงานผลิตในแหล่งวัตถุดิบกระจายออกไปทั่วประเทศ
3. สามารถผลิตใช้เองโดยไม่มีวันหมด
4. สร้างงานให้เกษตรกรเพิ่มขึ้น ลดปัญหาการว่างงาน และกระจายแหล่งงานสู่ชนบท
5. ช่วยประหยัดเงินตราต่างประเทศ
6. ช่วยให้ประเทศชาติมีแหล่งพลังงานเพิ่มขึ้น
7. เพิ่มอำนาจต่อรองให้กับเกษตรกร
8. ยกระดับราคาพืชไร่และสร้างเสถียรภาพด้านราคา
9. ลดมลพิษในอากาศจากสารเพิ่มค่าออกเทน MTBE โดยใช้เอทานอลผสมแทน
10. ตัดค่าขนส่งและค่าประกันทั้งในการส่งออกผลผลิตจากพืชไร่ไปยังตลาดต่างประเทศ และการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง
11. ด้านเศรษฐกิจ ทำให้มีเงินทุนหมุนเวียนเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบคุณสมบัติเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ (U.S. department of energy, 2002)

Property	Methanol	Ethanol	Gasoline (87 octane)	E85
Chemical Formula	CH ₃ OH	C ₂ H ₅ OH	C ₄ to C ₁₂ chains	*
Main constituents (% by weight))	38 C, 12 H, 50 O	52 C, 13 H, 35 O	85-88 C, 12-15 H	57 C, 13 H, 30 O
Octane (R+M)/2	100	98-100	86-94	96
Lower heating value (Btu/lb)	8,570	11,500	18,000-19,000	12,500
Gallon equivalent	1.8	1.5	1	1.4
Miles per gallon compared to gasoline	55%	70%	-	72%
Relative tank size to yield (driving range equivalent to gasoline)	Tank is 1.8 times larger	Tank is 1.5 times larger	1	Tank is 1.4 times larger
Reid vapor pressure (psi)	4.6	2.3	8-15	6-12
Ignition point				
Fuel in air (%)	7-36	3-19	1-8	*
Temperature (approx.)(°F)	800	850	495	*
Specific gravity (60/65°F)	0.796	0.794	0.72-0.78	0.78
Cold whether starting	Poor	Poor	Good	Good
Vehicle power	4% power increase	5% power increase	Standard	3%-5% power increase
Stoichiometric air/fuel ratio (by weight)	6.45	9	14.7	10

จากความร่วมมือของหลายฝ่ายในการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต การผลิตเอทานอลในโรงงานขนาดทดลองได้เริ่มดำเนินการมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1994 จนกระทั่งปัจจุบันได้มีการผลิตเอทานอลในเชิงพาณิชย์ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และ 2.4

ตารางที่ 2.3 โรงงานผลิตไบโอเอทานอลในเชิงพาณิชย์ (National Renewable Energy Laboratory, 2000)

Collaborations Using the PDU						
Industrial Partner	Feedstock	Product	Key Processes	Organism	Scale	Business Mechanism
Amoco	corn fiber	ethanol, animal feed	pretreatment systems (2), glucose/xylose cofermentation	yeast (including recombinant)	PDU (9000 liter)	CRADA
BC International	bagasse, rice straw, wood	ethanol	pretreatment, fermentation	recombinant <i>E. coli</i> bacteria	20-L, 160-L	CRADA
Arkenol	rice straw	ethanol	glucose/xylose cofermentation	recombinant <i>Zymomonas</i> bacteria**	160-L	CRADA
Sustainable Technology Energy Partnership*	mix of a variety of solid wastes	ethanol	dilute acid and enzymatic hydrolysis with enzyme recycle	yeast	4-L steam gun, 30-L fermenter	collaboration
Sealaska Corp.	softwood	ethanol	hydrolysis, fermentation	Nx7 yeast**	4-L steam gun, bench scale	memorandum of understanding
Quincy Library Group	softwood forest thinnings	ethanol	hydrolysis, fermentation	Nx7 yeast**	4-L steam gun, bench scale	collaboration
Collins Pine, California Energy Commission	softwood	ethanol	hydrolysis	none	4-L steam gun	collaboration and subcontract
Swan Biomass	rice straw	ethanol	pretreatment, glucose/xylose fermentation	recombinant <i>Saccharomyces</i> yeast	PDU pretreatment, bench-scale fermentation	collaboration

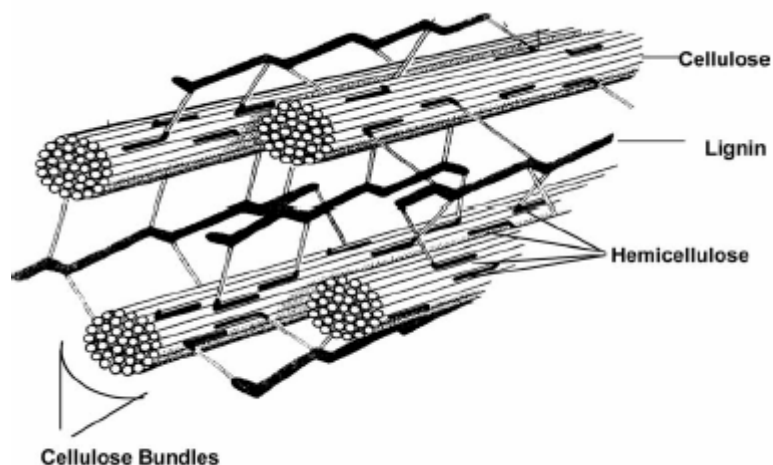
*DOE, NREL, California Energy Commission, California Institute of Food and Agricultural Research at UC Davis, Waste Energy Integrated Systems
**Proprietary NREL organisms available for license

ตารางที่ 2.4 โรงงานผลิตและจำหน่ายเอทานอลในประเทศไทยที่ยังอยู่ในระหว่างก่อสร้าง โรงงาน (คณะกรรมการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545)

ชื่อผู้ประกอบการ	สถานที่ตั้ง	กำลังการผลิต (ลิตร/วัน)	วัตถุดิบ
บริษัท พรวิไล อินเทอร์เน็ตเซ็นแนล กรุ๊ป เทคอดิง จำกัด	พระนครศรีอยุธยา	25,000	กากน้ำตาล มันสำปะหลัง
บริษัทไทยอะโกร เอนเนอร์ยี จำกัด	นครสวรรค์	150,000	กากน้ำตาล
บริษัทอินเทอร์เน็ตเซ็นแนล แก๊สโซฮอลล์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด	ระยอง	500,000	มันสำปะหลัง
บริษัท แสงโสม จำกัด	นครปฐม	100,000	กากน้ำตาล
บริษัท ไทยง้วนเอทานอล จำกัด	ชัยภูมิ	130,000	มันสำปะหลัง
บริษัท น้ำตาลขอนแก่น จำกัด	ขอนแก่น	85,000	กากน้ำตาล มันสำปะหลัง
บริษัท อัลฟา เอนเนอร์ยี จำกัด	นครสวรรค์	212,000	มันสำปะหลัง
บริษัท ไทย เนชั่นแนล พาวเวอร์ จำกัด	ระยอง	300,000	มันสำปะหลัง

2.2 วัสดุชีวประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic material)

ลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช ประกอบด้วย เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ดังรูปที่ 2.1

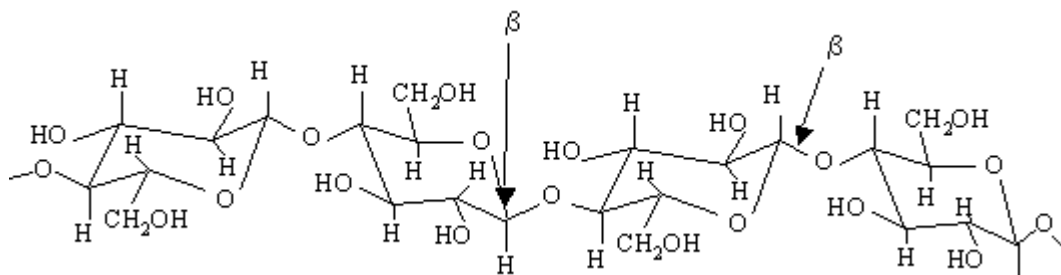


รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช

ที่มา: Murphy และ McCarthy (2005)

2.2.1 เซลลูโลส (~40-50%)

พบมากที่สุดในพื้นที่ และเป็นไบโอโพลิเมอร์ (biopolymer) ของกลูโคสซึ่งแต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะบีต้าไกลโคซิดิก (β -glycosidic bond) เป็นสายยาวและมีโครงสร้างแข็งแรง ทนต่อสารเคมีที่เข้าไปทำปฏิกิริยาเนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนจำนวนมากในสายของเซลลูโลสซึ่งเชื่อมต่อกันระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวนของโมเลกุลถัดไป ดังรูปที่ 2.2 พันธะไฮโดรเจนระหว่างเซลลูโลสทำให้โพลิเมอร์มีความทนทานมากขึ้น แต่มีความยืดหยุ่นลดลงจึงเกิดการแตกหักบริเวณที่เชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิก



รูปที่ 2.2 สายโซ่ตรงของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้าไกลโคสิติกประกอบเป็นเซลลูโลส
ที่มา: U.S. Department of energy (2004)

โครงสร้างของเซลลูโลสบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูงเรียกบริเวณนี้ว่า คริสตัลไลน์ (crystalline) ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่าเรียกบริเวณนี้ว่า อะมอร์ฟัส (amorphous) โดยแต่ละบริเวณจะแสดงคุณสมบัติการยอมรับต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างกัน โดยที่บริเวณอะมอร์ฟัสยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายง่ายกว่าบริเวณคริสตัลไลน์ ดังนั้นการย่อยสลายจะเกิดขึ้นที่บริเวณอะมอร์ฟัสได้เร็วกว่าบริเวณคริสตัลไลน์ (McMillan, 1994)

เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ สารอินทรีย์ใดๆ และในสารละลายกรดหรือด่างอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในสารละลายกรดหรือด่างแก่ ดังนั้นสามารถแบ่งชนิดเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรดหรือด่างได้เป็น 3 ชนิด (TAPPI, 2000-2001 อ้างถึงใน พรพนวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545)

- 1) แอลฟา-เซลลูโลส (α -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % ที่อุณหภูมิห้อง
- 2) บีต้า-เซลลูโลส (β -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด
- 3) แกมมา-เซลลูโลส (γ -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % ที่อุณหภูมิห้อง และละลายได้ในสารละลายกรดแต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

2.2.2 เฮมิเซลลูโลส (~25-35%)

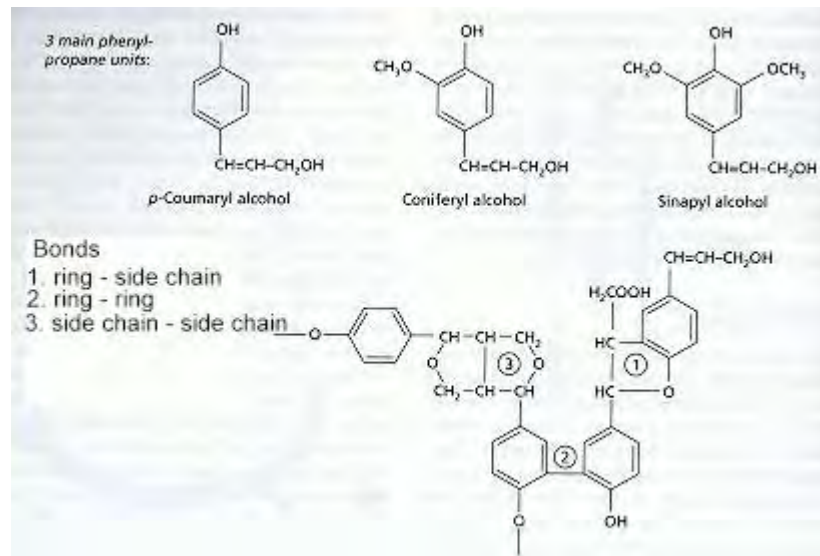
ประกอบด้วยสายโพลีเมอร์ของน้ำตาลที่เป็นทั้งสายโซ่ตรงและสายกิ่ง ซึ่งมีทั้งชนิดน้ำตาลเพนโตส (pentose, C5) ได้แก่ ไซโลส (xylose) และอะราบินอส (arabinose) และน้ำตาลเฮกโซส (hexose, C6) ได้แก่ กาแลคโตส (galactose) กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) และกรดยูโรนิก (uronic acid) เมื่อผ่านการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้อแข็ง (hardwoods) จะปลดปล่อยไซโลสเป็นจำนวนมาก ส่วนเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้ออ่อน (softwoods) จะปลดปล่อยน้ำตาลเฮกโซส

ข้อแตกต่างระหว่างเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส คือ เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจาง และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % นอกจากนี้สายโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่า และมีความยาวของสายโพลีเมอร์สั้นกว่า (TAPPI, 2000-2001 อ้างถึงใน พรพนวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545)

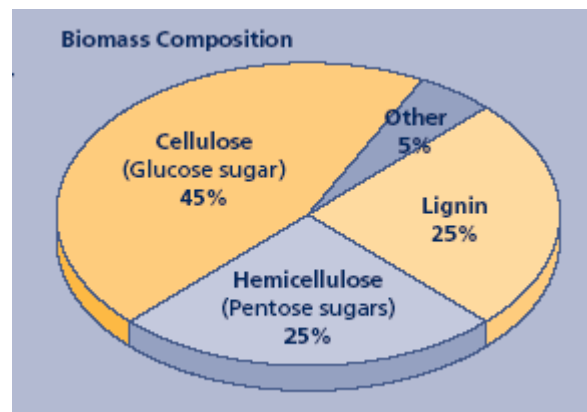
2.2.3 ลิกนิน (~15-20%)

เป็นไบโอโพลีเมอร์ที่มีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic components) โดยมีหน่วยฟีนิลโพรเพน (phenylpropane unit) เป็นจำนวนมาก ดังรูปที่ 2.3 ซึ่งทำให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง ลิกนินไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอล หรือ เมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

สัดส่วนปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่พบในพืช ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และสัดส่วนปริมาณของน้ำตาลเพนโตส และเฮกโซส ที่พบในพืชไม้เนื้อแข็ง ไม้เนื้ออ่อน และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ดังแสดงในตารางที่ 2.5



รูปที่ 2.3 โครงสร้างลิกนินแสดง 3 หน่วยย่อยของฟีนิลโพรเพน และพันธะ 3 ชนิด
ที่มา: Deacon (1997)



รูปที่ 2.4 สัดส่วนปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่พบในพืชโดยทั่วไป
ที่มา: National Renewable Energy Laboratory (2000)

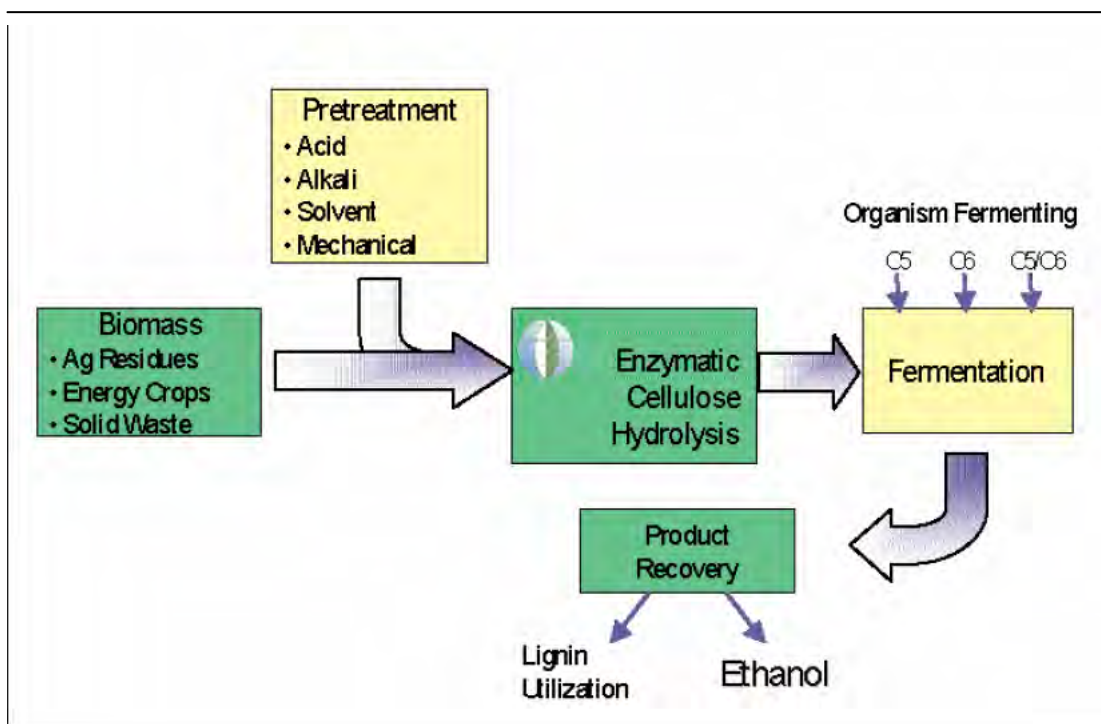
ตารางที่ 2.5 น้ำตาล และแป้งที่เป็นองค์ประกอบอื่น พบในพืชโดยทั่วไป (U.S. Department of energy, 2004)

วัตถุดิบ	น้ำตาล เฮกไซส	น้ำตาล เพนโตส	ลิกนิน	แป้ง
ไม้เนื้อแข็ง	39-50 %	18-28 %	15-28 %	0.3-1.0 %
ไม้เนื้ออ่อน	41-57 %	8-12 %	24-27 %	0.1-0.4 %
วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	30-42 %	12-39 %	11-29 %	2-18 %

% คือ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวล

- 1) การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)
- 2) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)
- 3) การหมักเอทานอล (ethanol fermentation)



รูปที่ 2.5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวล

ที่มา: Michael และ Mohammed (2004)

2.3.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ

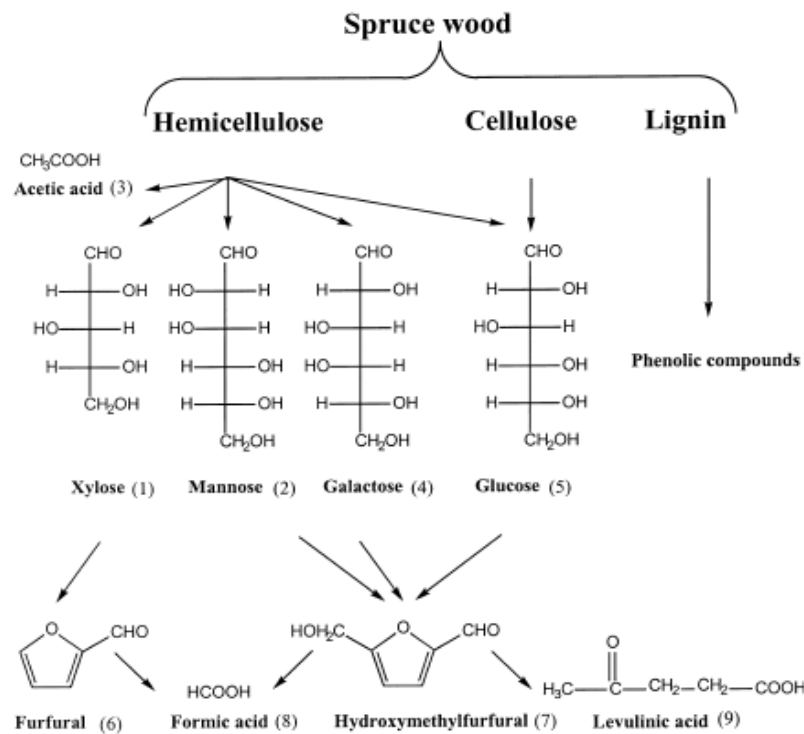
กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เช่น เซลลูเลส มีประสิทธิภาพมากขึ้นเนื่องจากการกำจัดเฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่อยู่บริเวณรอบๆ เซลลูโลส ลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลส และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (McMillan, 1994) ตัวอย่างวิธีการปรับสภาพ เช่น mechanical pretreatment, dilute acid pretreatment และ steam/pressurized hot water based method ซึ่งสามารถละลายเฮมิเซลลูโลส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือคู่ออกมา ส่วน alkaline based method สามารถละลายลิกนินออกมา ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสไม่ละลาย (U.S. Department of energy, 2004)

2.3.1.1 Mechanical pretreatment (U.S. Department of energy, 2004)

การลดขนาดของวัตถุดิบโดยวิธีการบด ตัด สับ ยกตัวอย่างเครื่องมือ เช่น knife mill hammer mill หรือ ball mill เพื่อลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลส และเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น

2.3.1.2 Dilute acid pretreatment (U.S. Department of energy, 2004)

จุดประสงค์หลักของวิธีนี้ คือ ปรับปรุงการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลสให้ได้ปริมาณน้ำตาล (arabinose, galactose, glucose, mannose และ xylose) ที่ละลายออกมาค่อนข้างสูง จากเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสสามารถสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส แต่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการหมักเอทานอล และปริมาณน้ำตาลที่ได้ลดลงด้วย เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural), ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ฟูแรน (furan derivative) โดยเฟอร์ฟูรัลเกิดจากน้ำตาลเพนโตสทำปฏิกิริยากับกรด ส่วนไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลเกิดจากน้ำตาลเฮกโซสทำปฏิกิริยากับกรด ดังรูปที่ 2.6 และตารางที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายของวัสดุ lignin ในเซลลูโลส ที่มา: Palmqvist และ Hahn-Hägerdal (2000)

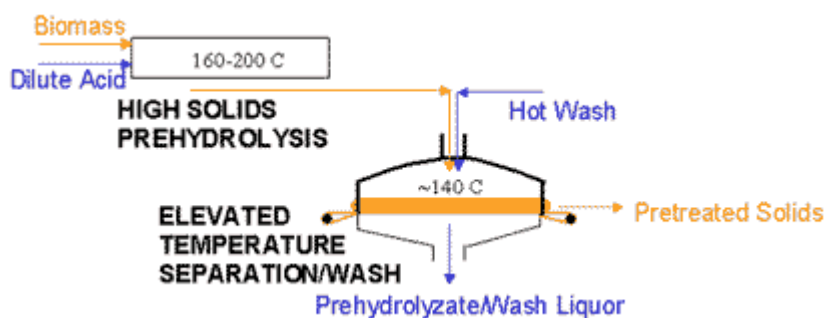
ตารางที่ 2.6 การเจริญและการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* ในสารละลายน้ำตาลรีดิวิธที่มีสารยับยั้งชนิดต่างๆ (Delneges, 1996)

Compounds	Concentration (g/l)	<i>S. cerevisiae</i> growth	Ethanol (% of control)
Furfuraldehyde	0.5	53	57
	1	19	20
	2	10	11
Acetate	5	79	99
	10	52	73
	15	56	62
Hydroxymethylfurfuraldehyde	1	35	29
	3	17	17
	5	11	5
Vanillin	0.5	9	70
	1	14	17
	2	9	11
Hydroxybenzaldehyde	0.5	75	97
	0.75	47	63
	1.5	13	25
Syringaldehyde	0.2	100	74
	0.75	39	46
	1.5	19	33

แต่เฟอร์ฟูรัลมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตยาฆ่าแมลง, ยาฆ่าวัชพืช, ยาฆ่าเชื้อรา, พลาสติก และไนลอนซึ่งใช้ tetrahydrofuran เป็นสารตั้งต้นของการผลิต (The Columbia Electronic Encyclopedia, 2006)

2.3.1.3 Hot wash process (U.S. Department of energy, 2004)

เป็นการใช้อุณหภูมิสูง วิธีการนี้เชื่อว่าจะป้องกันการกลับมาตกตะกอนอีกครั้งของลิกนินและ/หรือไซแลนซึ่งถูกละลายออกมาในการปรับสภาพ เนื่องจากการกลับมาตกตะกอนอีกครั้งของลิกนินมีผลกระทบต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ดังรูปที่ 2.7



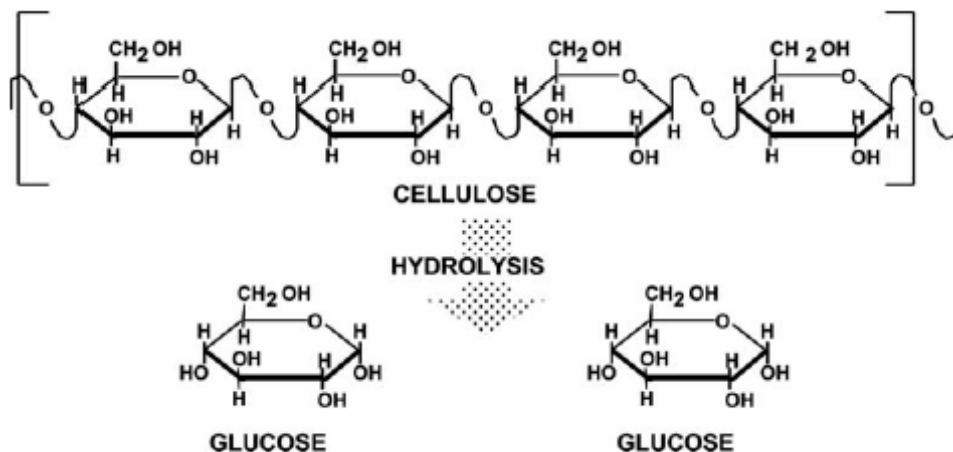
รูปที่ 2.7 แผนผังของ dilute acid pretreatment และ hot wash
ที่มา: U.S. Department of energy (2004)

2.3.1.4 Alkaline pretreatment (Weil และคณะ, 1994)

การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง มีผลทำให้วัสดุลิกโนเซลลูโลสเกิดการพองตัว (swelling) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และทำลายโครงสร้างลิกนิน

2.3.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวดังรูปที่ 2.8 ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งรา และแบคทีเรีย แต่ที่นิยมนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม คือ เซลลูเลสจากรา เช่น *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger*



รูปที่ 2.8 การย่อยสลายเซลลูโลส

ที่มา: Murphy และ McCarthy (2005)

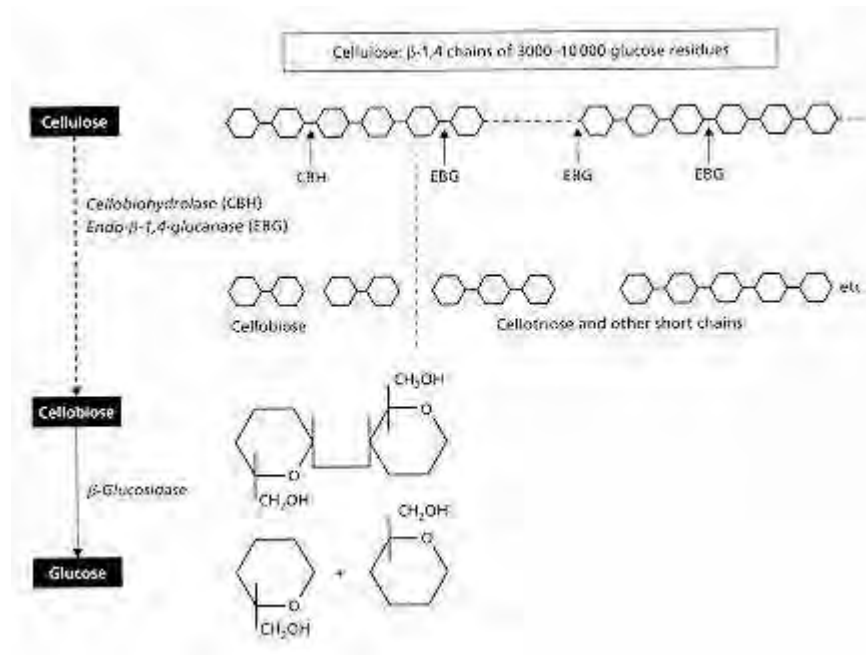
เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ 3 ชนิด (multicomponent enzymes) ที่ทำงานร่วมกันแบบ synergistic action คือ ต้องทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ (Lee, 1997)

1) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ endo-beta-1,4-glucanase ทำหน้าที่ตัดพันธะ β -1,4 glucosidic ภายในสายเซลลูโลสบริเวณอะมอर्फัส แบบสุ่มจากด้านปลายรีดิวซ์ ทำให้เกิดปลายอิสระ (free chain-ends) เซลโลไบโอส (cellobiose) โอลิโกเซลลูโลส (oligocellulose) และกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก

2) เอ็กโซกลูคาเนส หรือเซลโลไบโอไฮโดรเลส (exoglucanase or cellobiohydrolase) ทำหน้าที่ตัดพันธะ β -1,4 glucosidic จากปลายอิสระของเซลลูโลส และโอลิโกเซลลูโลส ทำให้ได้เซลโลไบโอส

3) เบต้ากลูโคซิเดส หรือเซลโลไบเอส (β -glucosidase or cellobiase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคส

กลไกของเซลลูเลส และตำแหน่งที่เอนไซม์ชนิดต่างๆเข้าทำปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเซลลูโลส และตำแหน่งที่เอนไซม์ชนิดต่างๆเข้าทำปฏิกิริยา
ที่มา: Deacon (1997)

การทำงานของเซลลูเลสสามารถถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (end-product inhibition) คือ บีต้ากลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลยับยั้งต่อเนื่องทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ เอนโดกลูคาเนส และเอ็กโซกลูคาเนส ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้าลงและหยุดในที่สุด ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการที่จะลดปัญหานี้ เช่น การใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูง การเติมบีต้ากลูโคซิเดส ระหว่างการย่อยสลาย และกระบวนการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) เป็นต้น (Sun และ Cheng, 2002)

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (วิชัย ลีลาวัชรมาศ, 2530)

1) อุณหภูมิ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น 2 เท่า ทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส เมื่อสร้างกราฟระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับอุณหภูมิพบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะสูงที่สุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกอุณหภูมินี้ว่า “optimum temperature” เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าที่จุดนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะต่ำลง เนื่องจากเอนไซม์จะเกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส

2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างค่าหนึ่ง เรียกว่า “optimum pH” ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่านี้ แอคทิวิตีของเอนไซม์จะลดลง เซลลูเลสมี optimum pH อยู่ในช่วง 4.8-5.5

3) ความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และจะช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้น และในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก

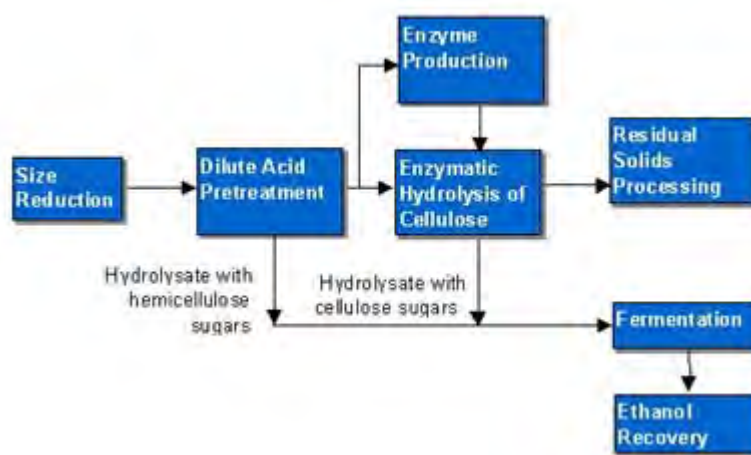
4) ปริมาณเอนไซม์ เมื่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงจุดสูงสุด พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์

5) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) การศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ มีประโยชน์ในการอธิบายกระบวนการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท และลักษณะของ “functional group” ที่บริเวณ “active site”

2.3.3 กระบวนการหมักเอทานอล

2.3.3.1 Separate hydrolysis and fermentation (SHF) (SHF)

เป็นกระบวนการที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงเพื่อเพิ่มแอกติวิตีที่ขึ้น และ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ดังรูปที่ 2.10



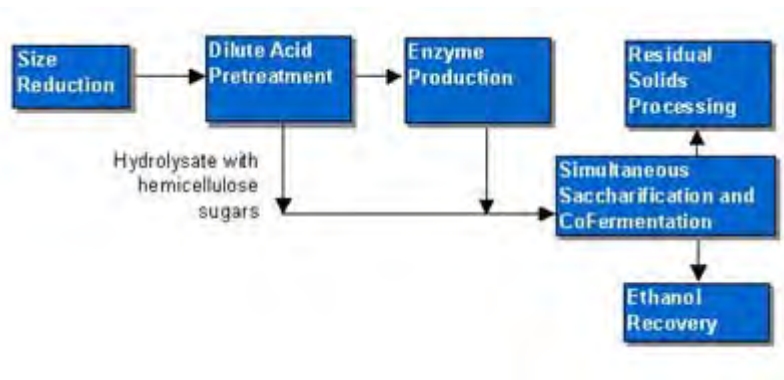
รูปที่ 2.10 กระบวนการหมักเอทานอลแบบ separate hydrolysis and fermentation
ที่มา: U.S. Department of energy (2004)

2.3.3.2 Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) (SSF)

เป็นกระบวนการเปลี่ยนวัตถุดิบเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส และหมักกลูโคสให้เป็นเอทานอล ในขั้นตอนเดียวกัน ซึ่งลดเวลาและจำนวนถังหมักโดยลดขั้นตอน separate hydrolysis reactor ทำให้ลดต้นทุนในการผลิต (Wyman, 1999) และเป็นการลดปัญหาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เซลลูเลส เนื่องจากกลูโคสที่เป็นตัวยับยั้งถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยจุลินทรีย์จึงไม่มีการสะสม (Phillipidid และคณะ, 1993) นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก เช่น ยีสต์ หรือ แบคทีเรีย ควรเป็นสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant strains) ได้เนื่องจากอุณหภูมิการหมักจะได้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

2.3.3.3 Simultaneous saccharification and cofermentation (SSCF)

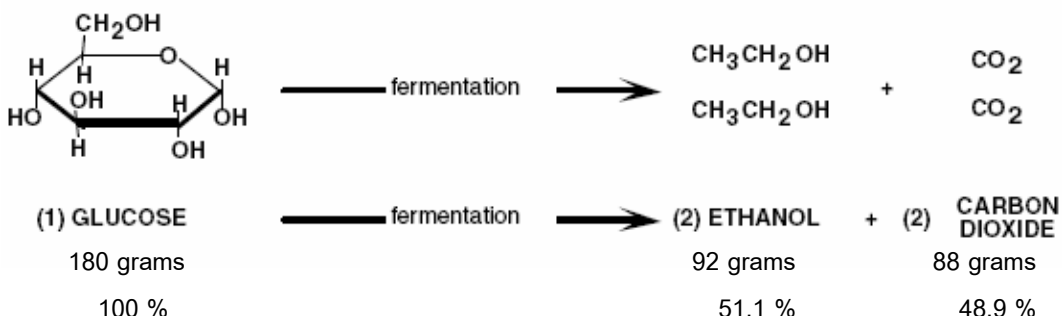
เป็นกระบวนการหมักเอทานอลที่ปรับปรุงมาจาก SSF โดยสามารถใช้น้ำตาลหลายชนิดเป็นสับสเตรทได้ ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 กระบวนการหมักเอทานอลแบบ simultaneous saccharification and cofermentation

ที่มา: U.S. Department of energy (2004)

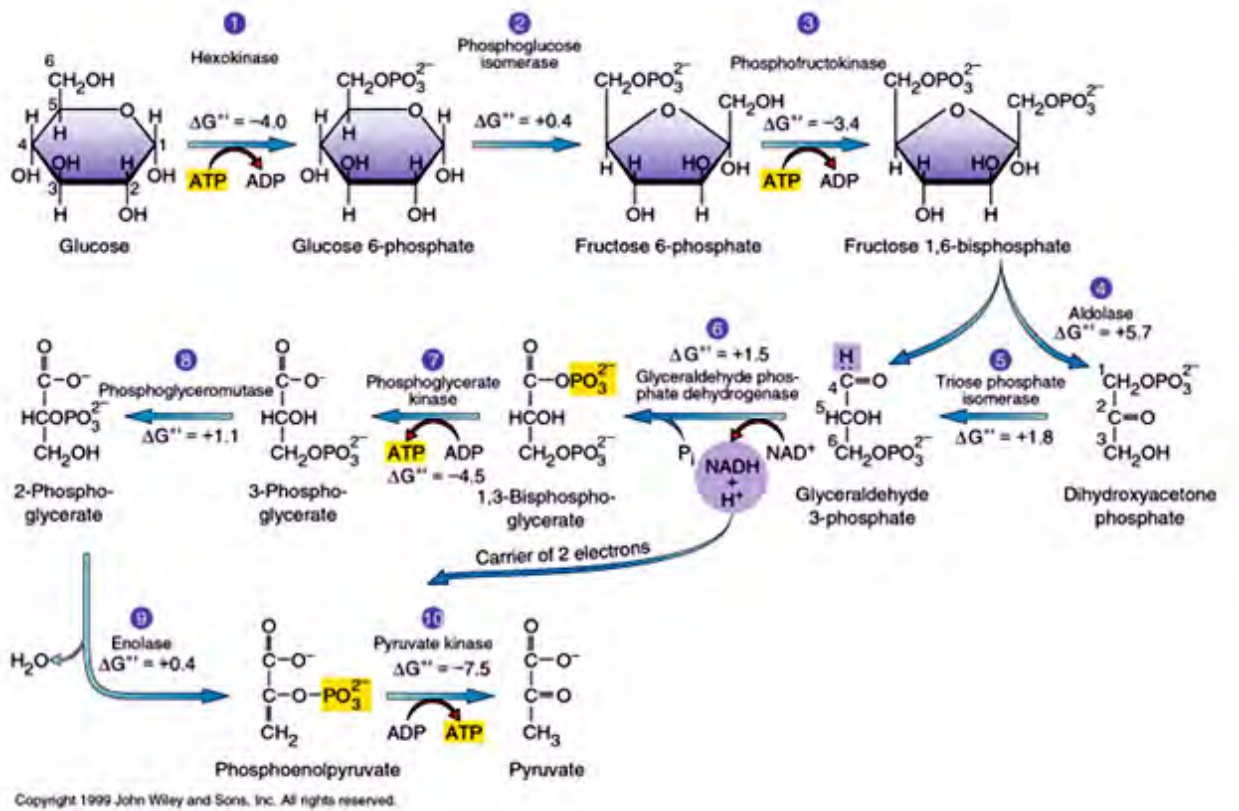
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเอทานอลระดับอุตสาหกรรม คือ ยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* sp. ดังรูปที่ 2.12 การผลิตเอทานอลโดยยีสต์เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic) โดยยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุกโตส 1,6-ฟอสเฟต (fructose 1,6-phosphate) และเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) ดังรูปที่ 2.13 และไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล โดยเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอล 51.1 % และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 % ดังสมการ





รูปที่ 2.12 แอคทีฟยีสต์ (active yeast culture)

ที่มา: Novozymes and BBI international (2005)



รูปที่ 2.13 กระบวนการไกลโคไลซิส

ที่มา: Donald, Judith and Charlotte (2002)

ปัจจัยที่สำคัญต่อยีสต์ในการหมักเอทานอล (วราวุฒิ ครูสง, 2529)

1) ธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่อการหมัก

1.1 ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 10 %ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น ในอุตสาหกรรมนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

1.2 ฟอสฟอรัส มีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ เพราะควบคุมการสังเคราะห์ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และรักษาสภาพของผนังเซลล์ ดังนั้นฟอสเฟตจึงเป็น ionic factor ที่สำคัญที่สุดในการหาอัตราการหมัก (rate of fermentation) ส่วนใหญ่ใช้ในรูปเกลือฟอสเฟต $(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$

1.3 ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.4 %ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของเมไธโอนีน (methionine) แต่เนื่องจากเมไธโอนีนมีราคาแพงมาก ในอุตสาหกรรมจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน ซึ่งจะถูกละลายเป็นเมไธโอนีนภายในเซลล์ของยีสต์

1.4 แร่ธาตุต่างๆ (Trace elements)

1.4.1 macroelements ได้แก่ K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn และ Cl ยีสต์ต้องการ 0.1-1 mM

1.4.2 microelements ได้แก่ Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni และ Va ยีสต์ต้องการในระดับ 0.1-100 μM

1.4.3 inhibitors ได้แก่ Ag, As, Bd, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se และ Te ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10-100 μM จะมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์

1.5 วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ โดยจะควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากวิตามินเป็นโคเอนไซม์ (coenzymes) หรือสารเริ่มต้น (precursors) ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินส่วนใหญ่ที่ยีสต์ต้องการ คือ ไบโอติน (biotin) และแพนโทธีเนต (pantothenate)

1.6 Growth factors ได้แก่ กรดอะมิโน (amino acid) กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) กรดไขมัน (fatty acid) และสเตอรอยด์ (steroid) ซึ่งสารเหล่านี้ถูกใช้ในขบวนการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณเอทานอล (ethanol yield)

2) อุณหภูมิ ในระดับอุตสาหกรรมใช้อุณหภูมิช่วง 30-37 องศาเซลเซียส ถ้ามากกว่า 40 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่จะชะงักการเจริญถึงแม้ว่าการหมักจะดำเนินไปได้ถ้ามีปริมาณยีสต์มากพอแล้ว สาเหตุที่อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมตาบอลิซึมของยีสต์ในการหมักเอทานอลจากกลูโคสจะเกิดความร้อน 140.2 แคลอรี/กรัมกลูโคส ถ่ายเทลงสู่น้ำหมัก

3) ค่ากรด-เบส ยีสต์ชอบเจริญในสภาพที่เป็นกรดพอสมควร คือ 3.8-5.5 ถ้าค่ากรด-เบสต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้อยู่ในช่วง 4.0-4.5 และยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ด้วย

4) ความเข้มข้นของน้ำตาล ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์จะอยู่ในช่วง 10-18 % และการหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูง ช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่หากมีความเข้มข้นมากกว่า 10 % จะเริ่มมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์

5) ความเข้มข้นของเอทานอล เอทานอลที่ได้จากการหมักเองกลับมีผลมายับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ ถ้าเอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น อัตราการเจริญของยีสต์จะลดลง ทำให้อัตราการหมักลดลงไปด้วย เนื่องจากเอทานอลไปมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และเฮกโซไคเนส (hexokinase) และมีผลต่อผนังเซลล์ยีสต์

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cadoche และGerardo (1989) พบว่าเมื่อนำวัตถุดิบ เช่น ไม้เนื้อแข็ง ฟาง หรือ ซังข้าวโพด มาบดด้วยเครื่อง “knife mill” หรือ “hammer mill” จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว และลดความเป็นผลึก (crystalline) ของเซลลูโลสลง เมื่อนำไปย่อยจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น

Mcmillan (1994) รายงานว่า การกำจัดลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และลดบริเวณโครงสร้างที่มีการจัดเรียงตัวโมเลกุลเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูง (crystalline) จะช่วยทำให้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยได้ดีขึ้น

Yáñez และคณะ (2004) ศึกษาการกำจัดเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจาก corrugated cardboard เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่า หลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 %โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก ที่ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที ปริมาณเฮมิเซลลูโลสลดลงจากเดิม 13.8 เหลือเพียง 4.7 %โดยน้ำหนัก แต่ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจากเดิม 59.7 เป็น 75.1 %โดยน้ำหนัก ในสารละลายจึงประกอบด้วยน้ำตาลที่ได้จากเฮมิเซลลูโลส และกลูโคส

Saha และคณะ (2005) พบว่าการย่อยสลาย wheat straw ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 0.75 %โดยปริมาตร/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด และไม่พบสารเฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล

Vlasenko และคณะ (1996) พบว่าการทำ dilute-acid pretreatment สามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกจากฟางข้าว (rice straw) ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ammonia fiber explosion pretreatment (AFEX) และacidified steam explosion pretreatment

Davis และคณะ (2005) พบว่าการย่อยสลาย wheat stillage ด้วยกรดซัลฟูริกมากกว่า 1 %โดยปริมาตร/ปริมาตร จะพบเฟอร์ฟูรัลเกิดขึ้น แต่เมื่อทำ detoxification ปรับค่ากรด-เบสของ acid hydrolysate ให้อยู่ในช่วง 1.5-5.0 โดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าจะช่วยลดปริมาณสารเฟอร์ฟูรัลได้ถึง 55 % เมื่อครบเวลา 5.5 ชั่วโมง

Nigam (2001) พบว่าในน้ำหมักที่มีเฟอร์ฟูรัลความเข้มข้น 0.25 กรัม/ลิตร ไม่มีผลต่อการลดลงของปริมาณและการผลิตเอทานอล แต่เมื่อความเข้มข้นของเฟอร์ฟูรัลมากกว่า 1.5 กรัม/ลิตร ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ลดลง ปริมาณและการผลิตเอทานอลลดลง 90.4 และ 85.1 % ตามลำดับ และ Alves และคณะ (1998) พบว่า ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร มีผลในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์และการหมักของ *S. cerevisiae*

Sun และ Cheng (2005) ทำการปรับสภาพ rye straw และ bermudagrass โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.5 % ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 90 นาที หลังจากนั้นนำไปย่อยต่อด้วยเซลลูเลส และบีต้ากลูโคซิเดส ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 197.1 และ 229.3 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Sternberg และคณะ (1977) รายงานว่า เซลลูเลสที่ผลิตได้จากราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด เช่น *Trichoderma reesei* (เดิมเรียกว่า *T. viride*), *Aspergillus niger*

Drazic และ Nozinic (1984) รายงานว่า เชื้อราในกลุ่ม *T. reesei* ผลิตเซลลูเลสที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ แต่มีปริมาณบีต้ากลูโคซิเดสค่อนข้างต่ำ ในขณะที่เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. ผลิตบีต้ากลูโคซิเดสสูง ซึ่ง Drazic และ Nozinic (1984) รายงานว่าการย่อยสลายซึ่งช้าวโหดโดยใช้เซลลูเลสจาก *T. reesei* ร่วมกับเซลลูเลสจาก *Aspergillus* sp. ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสสูงกว่าการใช้เซลลูเลสจากเชื้อราแต่ละชนิดแยกกัน

Wen และคณะ (2005) ศึกษาการใช้เซลลูเลสผสมของเชื้อรา *T. reesei* และ *A. phoenicis* พบว่าสามารถผลิตเซลลูเลสที่ประกอบด้วยบีต้ากลูโคซิเดสค่อนข้างสูง ทำให้การย่อยเซลลูโลสมีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลลูเลสทางการค้า (Celluclast®) และเซลลูเลสจาก *T. reesei* เพียงตัวชนิดเดียว

Mandels (1985) รายงานว่า เซลลูเลสที่ผลิตจาก *T. reesei* ถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ง่ายโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลส คือ กลูโคส และเซลโลไบโอสเป็นหลัก

Xiao และคณะ (2004) ศึกษาผลกระทบของการยับยั้งของกลูโคสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นๆที่มีต่อเซลลูเลสและบีต้ากลูโคซิเดส พบว่า เมื่อปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้นมีผลทำให้การยับยั้งแอกทิวิตีของเซลลูเลสและบีต้ากลูโคซิเดสเพิ่มตาม ในขณะที่แมนโนส ไสโลส และกาแลคโตส ไม่มีผลยับยั้งแอกทิวิตีของบีต้ากลูโคซิเดส แต่มีผลต่อแอกทิวิตีของเซลลูเลส

Philippidis และคณะ (1993) ศึกษากระบวนการ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) พบว่า การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเกิดจากการสะสมของกลูโคสและเซลโลไบโอสลดลง เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสถูกนำไปหมักให้กลายเป็นเอทานอลทันที

Philippidis (1996) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักแบบ SSF คือ 38 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่อยู่ในช่วงระหว่างอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลาย (45-50 องศาเซลเซียส) และการหมัก (30 องศาเซลเซียส)

Ciftci และคณะ (1983) รายงานว่า สภาพการหมักเอทานอลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูงช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่หากความเข้มข้นมากกว่า 10 % จะเริ่มมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์

Converti และคณะ (1985) รายงานว่าความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์จะอยู่ในช่วง 10-18 %

Luong (1985) รายงานว่า เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนเอทานอลมากที่สุด ถึงแม้ปัจจุบันความเข้าใจผลการยับยั้งของเอทานอลในระดับโมเลกุลยังมีน้อยมาก นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดสามารถใช้น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ได้ เช่น *Candida utilis*, *Pichia stipitis* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสผลิตเอทานอล

Saita และSlaughter (1984) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแอมโมเนียที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ กับความสามารถในการหมักของยีสต์ พบว่า แอมโมเนียที่เติมลงไป ไม่ได้มีส่วนช่วยกระตุ้นการหมัก หรือการผลิตเอทานอลโดยตรง แต่มีผลด้านการเจริญของยีสต์ ซึ่งยีสต์ใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการสังเคราะห์โพรตีน ทำให้ได้จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น กระบวนการหมักจึงเพิ่มขึ้น

สาวิตรี (2536) พบว่าการเติบโตและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล กล่าวคือ เอทานอล 2 % โดยน้ำหนัก มีผลทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง และจะหยุดการเจริญที่ระดับเอทานอล 7.8 % โดยน้ำหนัก แต่ยังคงสามารถหมักต่อไปได้จนถึง 14 % โดยน้ำหนัก การที่ยีสต์ไม่สามารถเติบโตได้ ส่งผลให้อัตราการหมักเอทานอลลดลงด้วย

เทพปัญญา (2544) รายงานว่า ค่ากรด-เบส ที่ *S. cerevisiae* สามารถเติบโตได้ดีอยู่ในช่วง 2.4-8.6 ซึ่งค่าที่เหมาะสมคือ 4.5 สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาล ประสิทธิภาพจะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 3.5-6.0 นอกจากนี้การหมักเอทานอลค่ากรด-เบสประมาณ 4.5 จะช่วยส่งเสริมการหมักแล้วยังช่วยลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมากับสารอาหาร

ระวีวรรณ (2537) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว พบว่า การแช่ฟางข้าวในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ได้ตะกอนฟางที่มีเซลลูโลส 94.46 % นำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.0 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 557.07 มิลลิกรัม/กรัมเซลลูโลส และนำไปหมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 4 วัน ได้ปริมาณเอทานอลเข้มข้น 1.3 % โดยปริมาตร

พรณวิไล (2545) ผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง พบว่า วิธีปรับสภาพวิธีที่ดีที่สุดคือ แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที นำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.8 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 8.30 กรัม/ลิตร และนำไปหมักด้วย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ได้ปริมาณเอทานอลเข้มข้น 10.60 กรัม/ลิตร

Varga และคณะ (2004) ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพโดยใช้ความดันของเปลือกข้าวโพด (corn stover) เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยของเซลลูเลส พบว่าการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดโดยใช้อุณหภูมิสูงร่วมกับการใช้กรดจะสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าการใช้อุณหภูมิสูงเพียงอย่างเดียว โดยการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 % ที่ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นย่อยด้วยเซลลูเลสที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 56.1 กรัม/100 กรัมสับสเตรท หลังจากนั้นนำไปหมักด้วย *S. cerevisiae* ได้ปริมาณเอทานอล 78.4 %

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัย 4 ชนิด คือ

- 3.1.1 ชานอ้อย (bagasse)
- 3.1.2 ชั่งข้าวโพด (corn cob)
- 3.1.3 ลำไยอบแห้ง (dried longan)
- 3.1.4 ฟางข้าว (rice straw)

3.2 เคมีภัณฑ์

- 3.2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] ของบริษัท Merck, Germany.
- 3.2.2 โพแทสเซียมไดโครเมต [$K_2Cr_2O_7$] ของบริษัท Univar, Australia.
- 3.2.3 เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต [$Fe(NH_4)(SO_4) \cdot 6H_2O$] ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., USA.
- 3.2.4 กรดซัลฟูริก [H_2SO_4] ของบริษัท Merck, Germany.
- 3.2.5 ฟีนานโทรอลีนโมโนไฮเดรต [$C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$] ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., USA.
- 3.2.6 กรดไดไนโตรซาลิไซลิก [$C_7H_4N_2O_7$] ของบริษัท Fluka Chemika, Switzerland.
- 3.2.7 โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตต [$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$] ของบริษัท Merck, Germany.
- 3.2.8 ไตรโซเดียมซีเตรตไดไฮเดรต [$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$] ของบริษัท Merck, Germany.
- 3.2.9 กรดไฮโดรคลอริก [HCl] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.2.10 คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., USA.
- 3.2.11 ซาลิซิน [$C_{13}H_{18}O_7$] ของบริษัท Sigma Chemical Co., Hong Kong.
- 3.2.12 โซเดียมคาร์บอเนต [Na_2CO_3] ของบริษัท Merck, Germany.
- 3.2.13 คอปเปอร์ซัลเฟต [$CuSO_4 \cdot 5H_2O$] ของบริษัท Merck, Germany.
- 3.2.14 โฟลีน-ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin-phenol reagent) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.2.15 โบวีนอัลบูมิน (Bovine Albumin) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.2.16 กลูโคส [$C_6H_{12}O_6$] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

- 3.2.17 กาแลคโตส [C₆H₁₂O₆] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.2.18 ไฮโลส [C₆H₁₀O₅] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.2.19 อะราบิโนส [C₅H₁₀O₅] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.2.20 แมนโนส [C₆H₁₂O₆] ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.2.21 เฟอรัฟูรัล (furfural) ของบริษัท Merck, Germany.
- 3.2.22 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟูรัล (hydroxymethylfurfural) ของบริษัท Merck, Germany.
- 3.2.23 กรดแลคติก (L(+)) lactic acid ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., USA.
- 3.2.24 กรดอะซิติก (acetic acid) ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., USA.
- 3.2.25 เอทานอล (absolute ethanol) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.2.26 ซิลิโคน (silicone liquid) ของบริษัท Scharlau Chemie, Spain.
- 3.2.27 แอมโมเนียมซัลเฟต [(NH₄)₂SO₄] ของบริษัท Merck, Germany.

3.3 เอนไซม์

- 3.3.1 เซลลูเลส (cellulase) จาก *Trichoderma reesei* ATCC 26921 ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.3.2 เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.
- 3.3.3 เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* ของบริษัท Novozymes, Denmark ยี่ห้อ Celluclast[®] 1.5L FG
- 3.3.4 เซลลูเลสจาก *Trichoderma longibrachiatum* ของบริษัท Genecor, Finland ยี่ห้อ CYTO[®] CL
- 3.3.5 เซลลูเลสผสมจาก *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger* ของบริษัท Novozymes, Denmark ยี่ห้อ Cellubrix
- 3.3.6 เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* ของบริษัท Genecor, Finland ยี่ห้อ GC 220

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง

- 3.4.1 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Gyromax[™] 939XL ของบริษัท Amerex Instruments, Inc., USA.

- 3.4.2 เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer/hot plate) รุ่น 502P-2 ของบริษัท Mettler Toledo., USA.
- 3.4.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota., Japan. หัวปั่นเหวี่ยง (roter) ขนาดเล็ก รุ่น RA 50J
- 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 เครื่องคัดอนุภาค (sieving)
- 3.4.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Ioncheck 10 ของบริษัท Radiometer Analytical S.A., France
- 3.4.9 อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ (oil bath) รุ่น O-270 ของบริษัท Memmert GmbH+Co.KG, Germany.
- 3.4.10 เครื่องบดเชื้อ
- 3.4.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digital balance) รุ่น AG204 ของบริษัท Mettler Toledo., USA.
- 3.4.12 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Agilent Technology Ltd., USA รุ่น Agilent®1100 Series

3.5 จุลินทรีย์

- 3.5.1 เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.6.1 สารสกัดยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Becton, Dickinson and Company., France
- 3.6.2 แบคโต-เปปโตเน (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 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

3.7.1 วิธีเก็บรักษาระยะแบบยาว

เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งที่ -70 องศาเซลเซียส โดยมีกาเดียมกลีเซอรอล 30 % โดยปริมาตร/ปริมาตร เพื่อป้องกันเซลล์แตก เมื่อต้องการนำออกมาใช้จึงนำออกมาถ่ายเชื้อในอาหารเหลว เพื่อเพิ่มปริมาณและบำรุงเซลล์ให้แข็งแรง ระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้ เชื้อจะไม่มีภาวะเจริญเติบโต ดังนั้นจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์

3.7.2 วิธีเก็บรักษาระยะแบบสั้น

เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็งแบบเอียง (agar slant) โดยนำเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งแบบเอียงที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บเชื้อได้นานประมาณ 2 สัปดาห์



รูปที่ 3.1 เครื่องบดเยื่อ

3.8 วิธีการทดลอง

3.8.1. วิเคราะห์องค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง เป็นต้น อบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาตัดและ/หรือบดด้วยเครื่องปั่น หรือ Hammer mill หลังจากนั้นร่อนด้วยตะแกรง ขนาดวัตถุที่ที่ต้องการ คือ ขนาดประมาณ 20 mesh เก็บรักษาไว้ในที่แห้ง และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบดังต่อไปนี้ ไนโตรเจน (nitrogen) ไขมัน (fat) เส้นใย (fiber) และเถ้า (ash) ที่กองเกษตรเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และวิเคราะห์ปริมาณ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสตามวิธีของ TAPPI 203 om-88

3.8.2. ศึกษาวิธีการปรับสภาพด้วยกรดที่เหมาะสมในการเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับการย่อยด้วยเซลล์ูลูเลส

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0-1.5 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ในปริมาณ 10 กรัม%โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิต่างๆ (121, 140 และ 160 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 และ 60 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นปรับค่ากรด-เบส เป็น 5.0 กรองแยกส่วนกากและส่วนน้ำออกจากกัน ส่วนน้ำที่กรองได้นำมาวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) และน้ำตาลกลูโคส, อะราบิโนส, ไซโลส, กาแลคโตส, แมนโนส, กรดอะซีติก, กรดแลคติก, เฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล ด้วยเครื่อง HPLC ของบริษัท Agilent Technology Ltd., USA รุ่น Agilent®1100 Series ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8.3. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เซลล์ูลูเลสทางการค้า

นำเอนไซม์เซลล์ูลูเลสทางการค้า มาวัดแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสตามวิธีของ Ghose (1987) วัดแอกทิวิตีของบีต้ากลูโคซิเดสตามวิธีของ Sternberg และคณะ(1977) หาอุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสมที่สุดต่อแอกทิวิตีเอนไซม์ ค่าความเสถียรของเอนไซม์ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

3.8.4. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วย เซลลูเลส

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการเตรียม (ผลจากข้อ 3.8.2) มาปรับค่ากรด-เบสให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ (ผลจากข้อ 3.8.3) ย่อยสลายด้วยเซลลูเลสที่อุณหภูมิเหมาะสม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปั่นแยกตะกอน วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใส ภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เซลลูเลส เช่น แปรผันอัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนสต่อบีต้ากลูโคซิเดส ปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เหมาะสม ระยะเวลาการย่อยสลาย

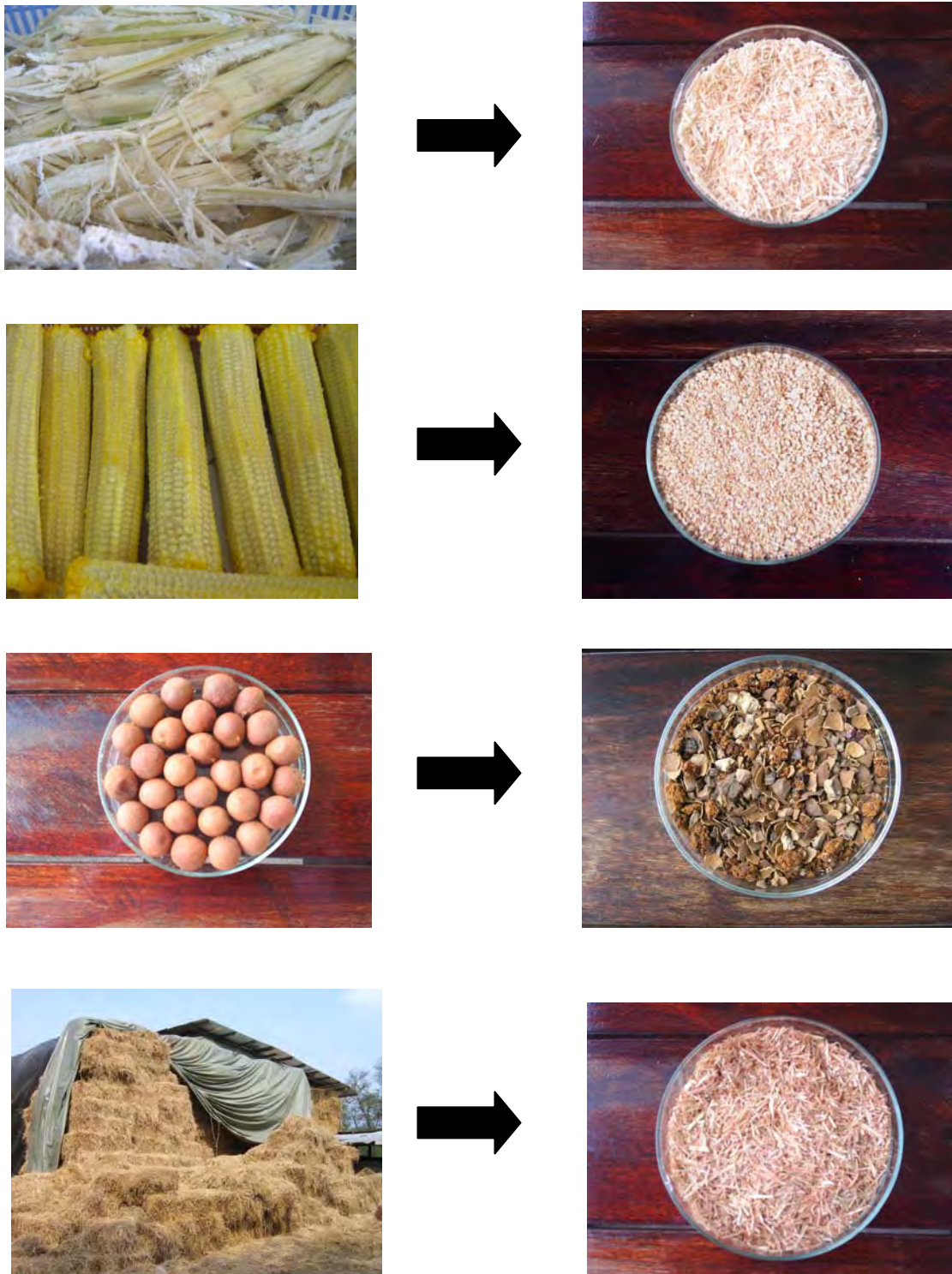
3.8.5. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจาก enzymatic hydrolysates (ผลจากข้อ 3.8.4) โดยใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5596

3.8.5.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ที่เจริญบนอาหารรุ้นผิวยีสต์ YPD slant (yeast potato dextrose agar) ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว YPD broth นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.8.5.2 การหมักเอทานอลระดับฟลาสก์และการวิเคราะห์ผล

นำวัตถุดิบที่ย่อยได้จากข้อ 3.8.4 มาแยกกากออก นำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่กรองได้ ปรับค่ากรด-เบส 4.5 และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร และกลูโคส 10 กรัม/ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 110 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 10 นาที ทิ้งให้เย็น หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 (ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย บางเขน กรุงเทพฯ) ลงในอาหารเหลวเท่ากับ 10 % โดยปริมาตรของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ ทำการหมักที่ อุณหภูมิห้อง ในสภาวะการหมักแบบไร้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ ปริมาณเอทานอลด้วยวิธี HPLC ของบริษัท Agilent Technology Ltd., USA รุ่น Agilent®1100 Series ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆก่อนและหลังการตัดและ/หรือการบด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด สามารถย่อยสลายด้วยเซลลูเลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส และนำไปหมักเป็นเอทานอลได้ แต่เนื่องจากในองค์ประกอบมีเฮมิเซลลูโลส และลิกนินอยู่ด้วยซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ จึงต้องปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อให้การย่อยสลายด้วยเซลลูเลสมีประสิทธิภาพมากขึ้นเพราะเป็นการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่อยู่บริเวณรอบๆเซลลูโลส ลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลส และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

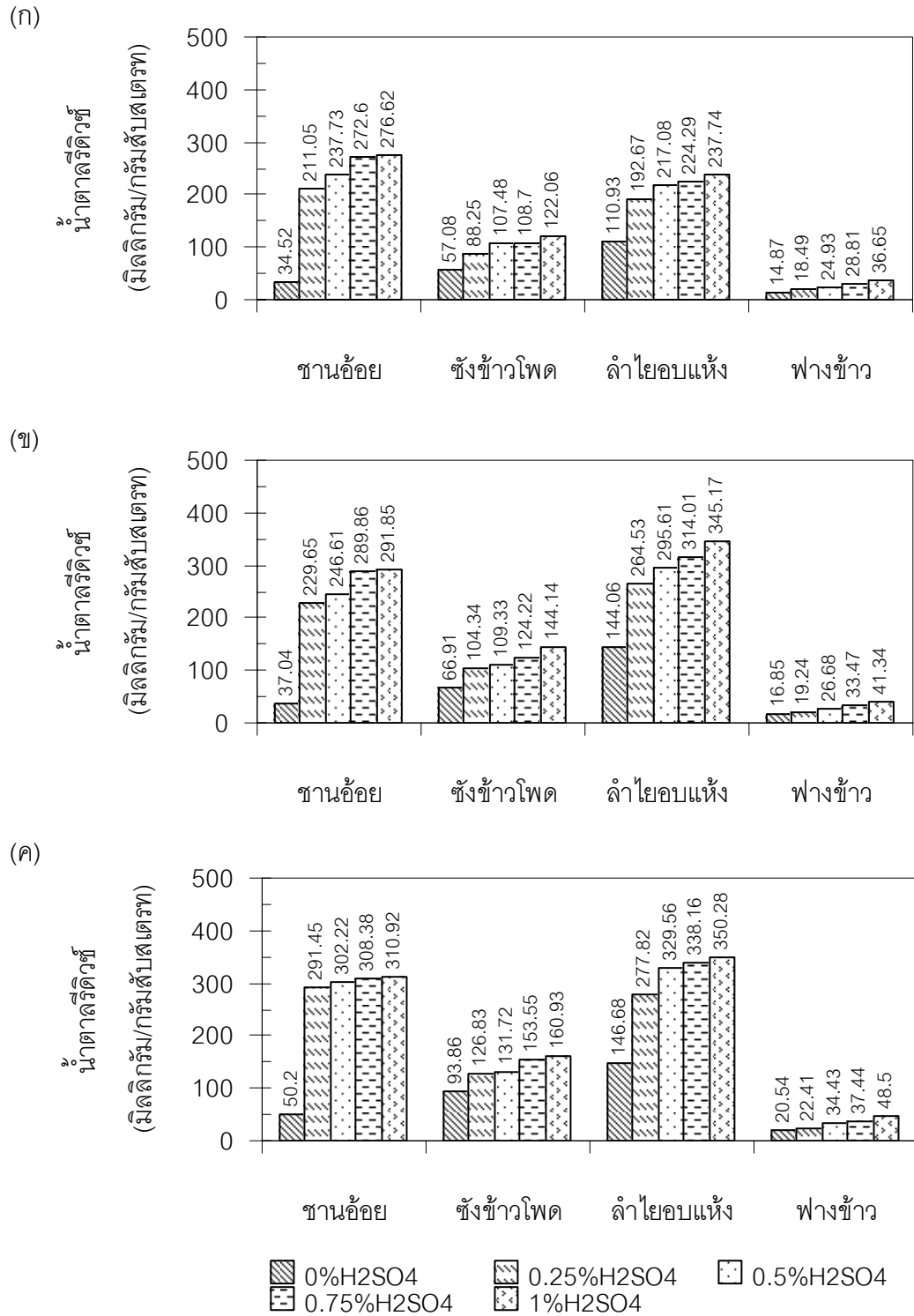
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (%โดยน้ำหนักแห้ง)			
	ชานอ้อย	ซังข้าวโพด	ลำไยอบแห้ง	ฟางข้าว
เซลลูโลส	73.99	81.74	78.36	83.61
เฮมิเซลลูโลส	11.93	11.40	10.50	9.71
ไนโตรเจน	0.59	1.37	1.13	0.87
ไขมัน	1.57	4.84	1.36	3.00
เส้นใย	30.80	15.70	12.90	31.80
เถ้า	2.10	2.85	2.27	14.15

4.2 ผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (10 กรัม%โดยปริมาตร) ด้วยกรดซัลฟูริก

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก และอุณหภูมิต่อการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

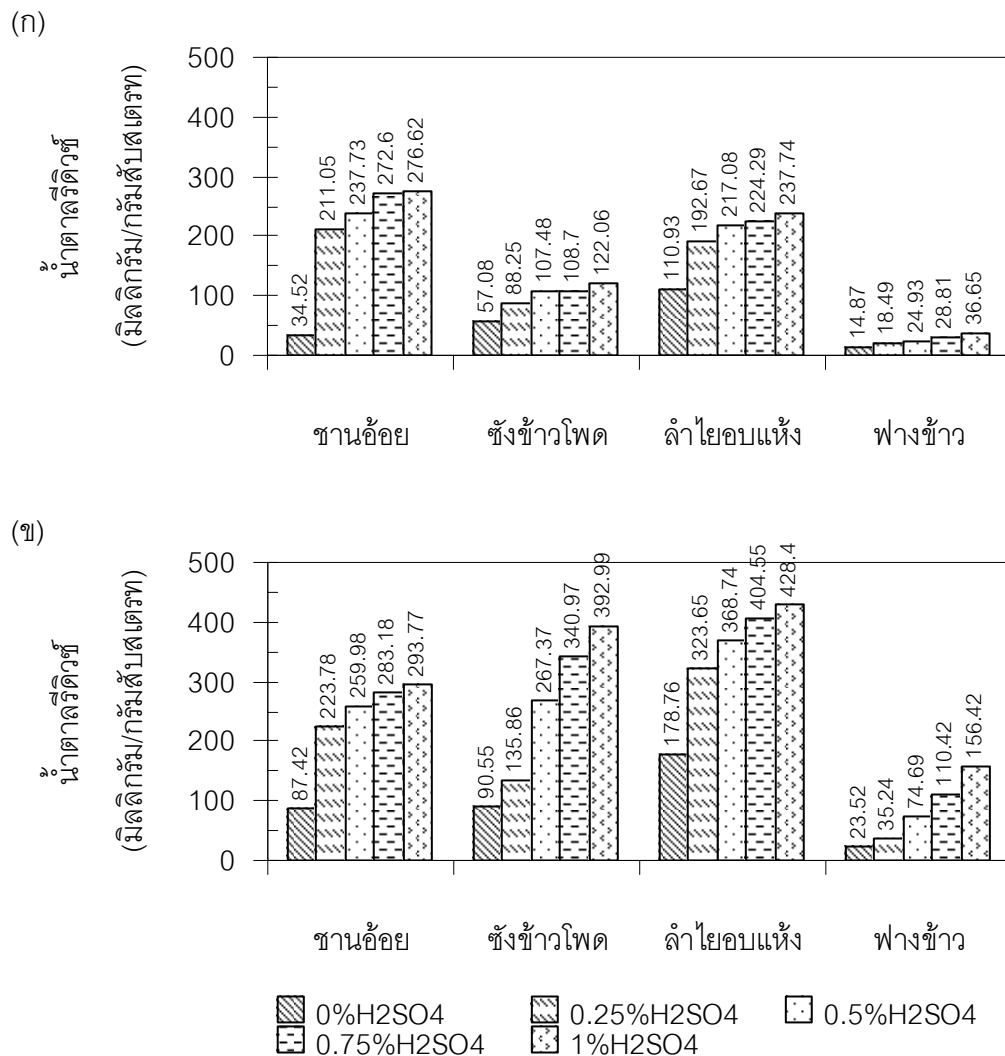
ผลการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121, 140 และ 160 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ (oil bath) 15 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทุกชนิดที่ทดสอบ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกและ/หรืออุณหภูมิที่ใช้สูงขึ้น ถึงแม้ว่าที่ 140 และ 160 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าที่ 121 องศาเซลเซียส แต่เนื่องจากการใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีลักษณะแห้งมาก และมีข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง จึงได้เลือกอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



รูปที่ 4.1 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างๆ (ก) 121 องศาเซลเซียส (ข) 140 องศาเซลเซียส และ (ค) 160 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ 15 นาที

4.2.2 ผลของความดันต่อการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

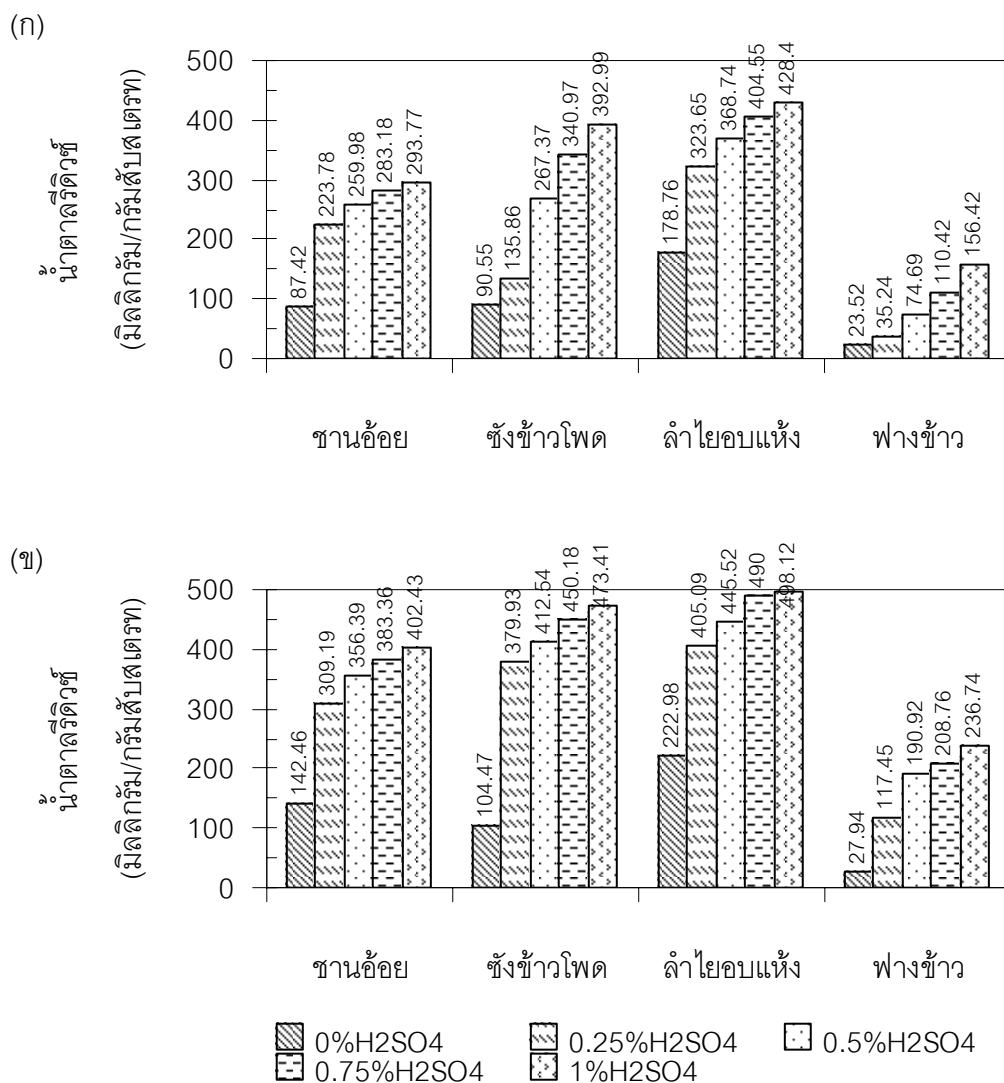
ผลการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมัน ควบคุมอุณหภูมิ (oil bath) และในหม้อไอน้ำความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที แสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทุกชนิดด้วยกรดซัลฟูริกทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงขึ้น เมื่อใช้ความดันร่วมด้วย



รูปที่ 4.2 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ใน (ก) อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ และ (ข) หม้อไอน้ำความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

4.2.3 ผลของระยะเวลาต่อการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

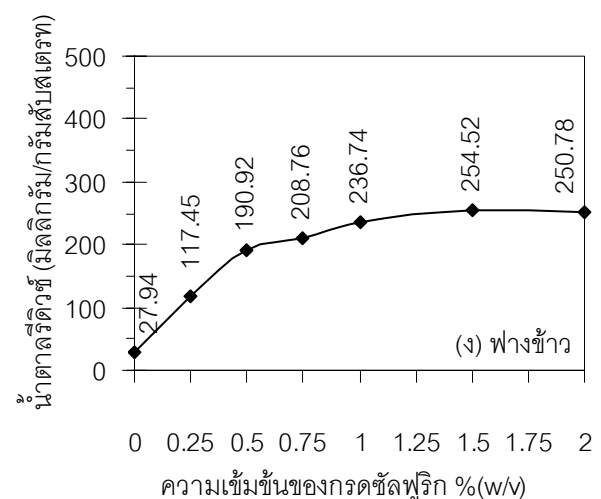
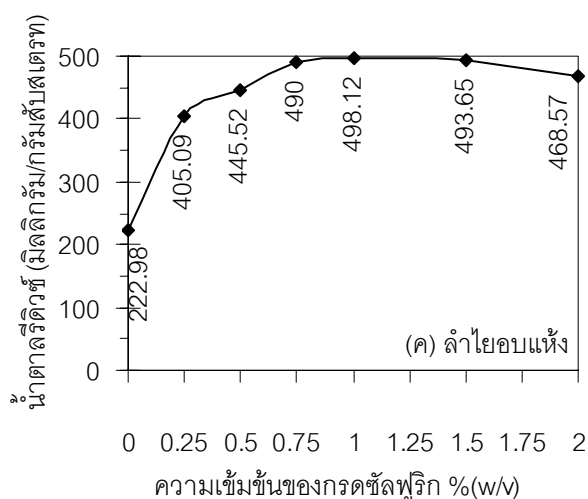
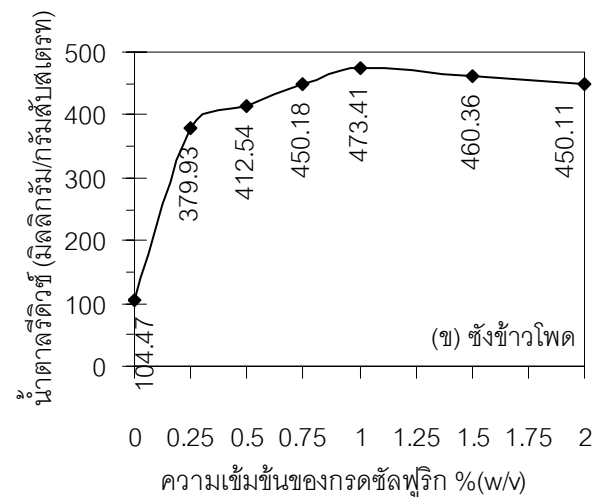
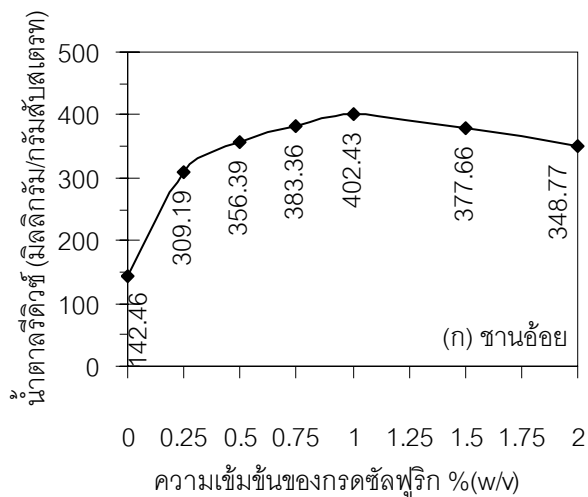
ผลการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 และ 60 นาที แสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทุกชนิดด้วยกรดซัลฟูริกทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการปรับสภาพจาก 15 นาที เป็น 60 นาที ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆก่อนและหลังการปรับสภาพ ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.3 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นต่างๆที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (ก) 15 นาที และ (ข) 60 นาที

4.2.4 ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกต่อการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ผลการแปรผันความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ต่อการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบ ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที แสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงสุด เมื่อปรับสภาพ ชานอ้อย ชังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.0 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร และฟางข้าวด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.5 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ดังนั้นจึงได้เลือก acid hydrolysate ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 และ 1.0 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารยับยั้งบางชนิด



รูปที่ 4.4 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที

ผลการวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้หลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.0 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ด้วยวิธี HPLC พบกลูโคสในลำไยอบแห้งสูงที่สุด คือ 218.59 มิลลิกรัม/กรัม รองลงมาคือ ชานอ้อย ชั่งข้าวโพด ฟางข้าว เท่ากับ 144.72, 85.93 และ 11.60 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ พบไซโลสในชั่งข้าวโพดสูงที่สุดคือ 206.09 มิลลิกรัม/กรัม รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว ลำไยอบแห้ง เท่ากับ 119.93, 118.69 และ 6.13 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 2

เมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการปรับสภาพเพิ่มมากขึ้น พบว่าปริมาณเพอร์ฟูรัล ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล และกรดอะซีติก ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้น แสดงในตารางที่ 4.2 Nigam (2001) รายงานว่าในน้ำหมักที่มีเพอร์ฟูรัลเข้มข้น 0.25 กรัม/ลิตร ไม่มีผลต่อการลดลงของปริมาณและการผลิตเอทานอล แต่เมื่อความเข้มข้นของเพอร์ฟูรัลมากกว่า 1.5 กรัม/ลิตร ทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง ปริมาณและการผลิตเอทานอลลดลง 90.4 % และ 85.1 % ตามลำดับ Alves และคณะ (1998) รายงานว่าไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัลเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร มีผลในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์และการหมักของ *S. cerevisiae* จากตารางที่ 4.2 การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.0 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ปริมาณเพอร์ฟูรัลที่พบไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ แต่เพื่อหลีกเลี่ยงปริมาณของสารยับยั้งคือ ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัลในระดับที่มีผลยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์จึงได้เลือกใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ผลการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร พบเพอร์ฟูรัลสูงสุด คือ 0.121 กรัม/ลิตร ในชั่งข้าวโพด รองลงมาคือ ชานอ้อย ลำไยอบแห้ง ฟางข้าว เท่ากับ 0.107, 0.088 และ 0.072 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัลพบในชานอ้อยมากที่สุด คือ 1.522 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ ลำไยอบแห้ง ชั่งข้าวโพด ฟางข้าว เท่ากับ 1.157, 0.812 และ 0.107 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

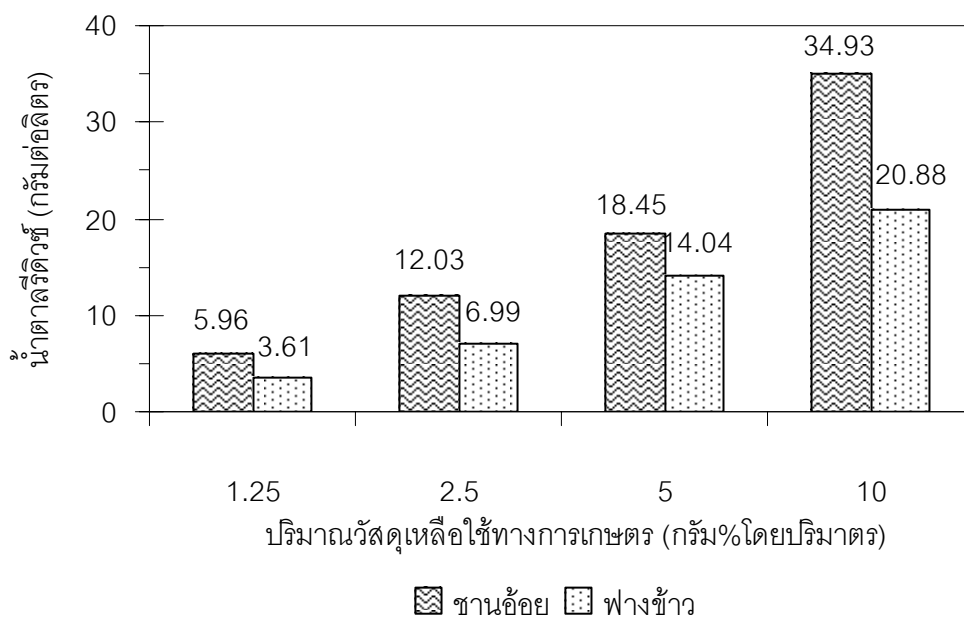
ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลและสารยับยั้งบางชนิดที่ได้จากการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 และ 1.0 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที

ความเข้มข้น ของกรด ซัลฟูริก (%w/v)	วัสดุเหลือใช้ทาง การเกษตร	ชนิดของน้ำตาล (มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท)					ชนิดของสารยับยั้ง (กรัม/ลิตร)			
		กลูโคส	ไซโลส	กาแลคโตส	อะราบิโนส	แมนโนส	เฟอร์ฟูรัล	ไฮดรอกซีเมทิล เฟอร์ฟูรัล	กรดอะซีติก	กรดแลคติก
0.75	ชานอ้อย	133.56	110.46	2.12	10.94	-	0.107	1.522	1.823	0.034
	ซังข้าวโพด	75.29	184.06	3.89	15.84	-	0.121	0.812	2.288	0.749
	ลำไยอบแห้ง	159.38	3.50	3.63	39.16	-	0.088	1.157	0.286	0.111
	ฟางข้าว	8.41	77.90	5.96	19.17	-	0.072	0.107	0.803	0.019
1.0	ชานอ้อย	144.72	119.93	2.06	11.04	-	0.134	1.831	1.782	0.032
	ซังข้าวโพด	85.93	206.09	2.90	15.90	-	0.164	1.012	2.517	0.721
	ลำไยอบแห้ง	218.59	6.13	4.20	36.65	-	0.074	1.951	0.457	0.105
	ฟางข้าว	11.60	118.69	7.57	20.81	-	0.092	0.120	1.030	0.019

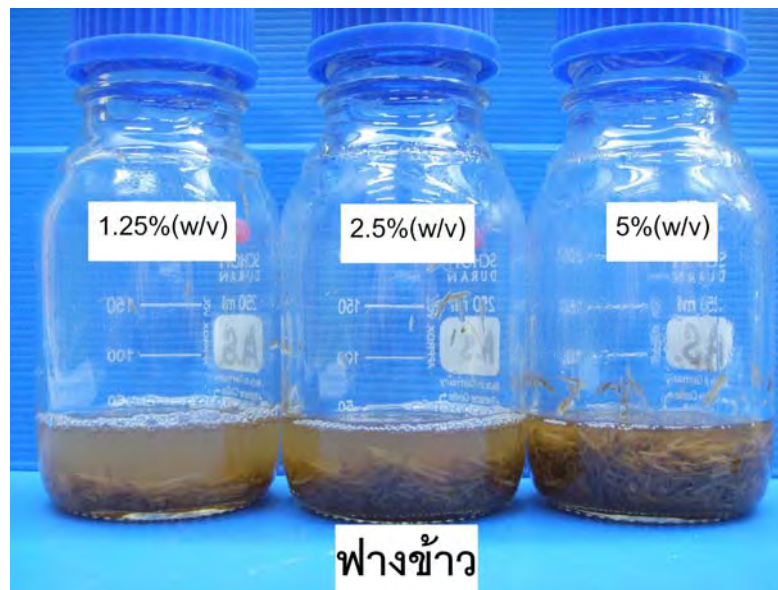
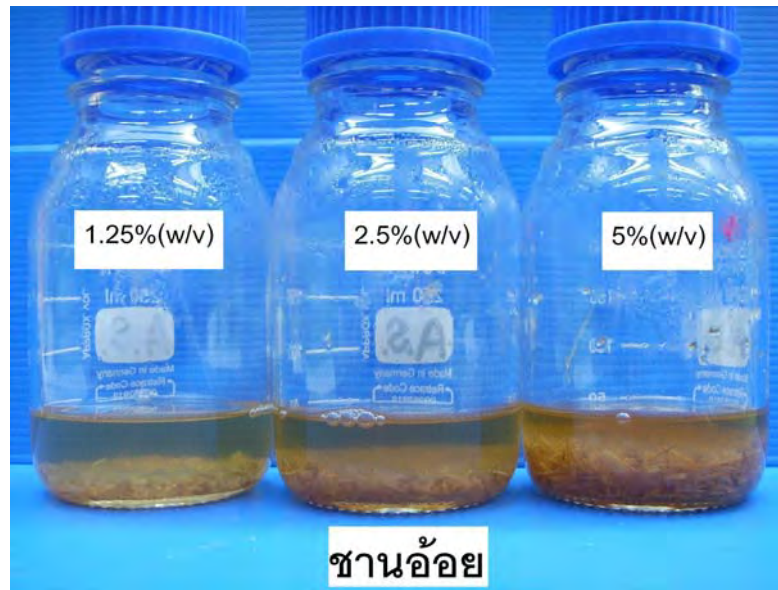
4.2.5 ผลของปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในการปรับสภาพ

จากผลการทดลองข้อ 4.2.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบด้วยกรดซัลฟูริกที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ของชานอ้อยและฟางข้าวน้อยกว่าของซังข้าวโพดและลำไยอบแห้ง และจากลักษณะที่ปรากฏดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าชานอ้อยและฟางข้าวมีลักษณะแห้งจึงแปรผันโดยลดปริมาณชานอ้อยและฟางข้าวในขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรด

ผลการแปรผันปริมาณชานอ้อย และฟางข้าว 1.25, 2.5, 5 และ 10 กรัม% โดยปริมาตร ในการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที แม้ว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณชานอ้อย และฟางข้าวเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.5 แต่เพื่อให้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรถูกย่อยสลายได้ดีในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์จึงลดปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรลงเป็น 5 กรัม% โดยปริมาตร ลักษณะของชานอ้อย และฟางข้าวที่ปริมาณน้อยกว่า 10 กรัม% โดยปริมาตร หลังการปรับสภาพ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

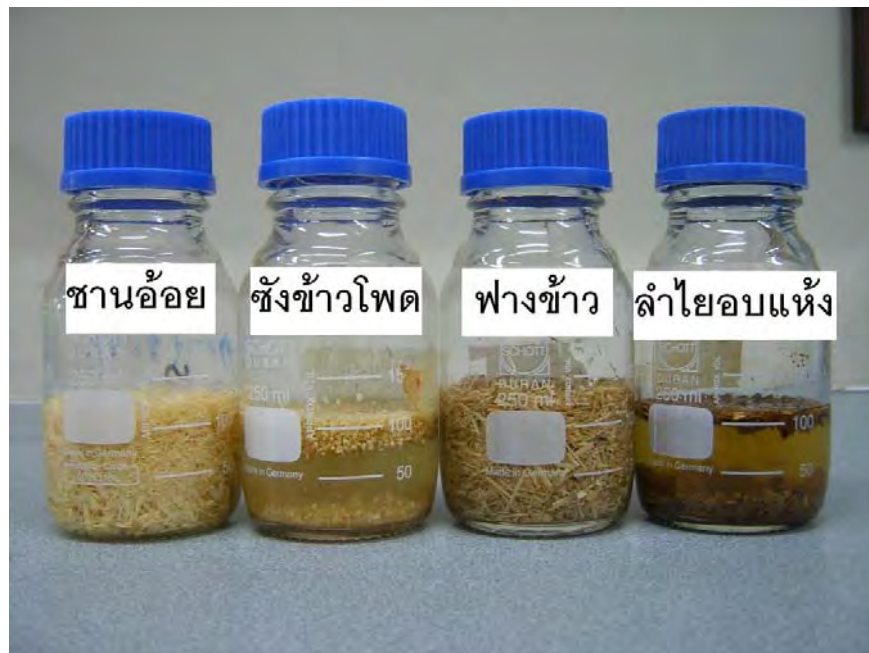


รูปที่ 4.5 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพชานอ้อย และฟางข้าว ปริมาณต่างๆ ที่ 121 องศาเซลเซียส ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที



รูปที่ 4.6 ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ปริมาณ 1.25, 2.5 และ 5 กรัม%โดยปริมาตร หลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที

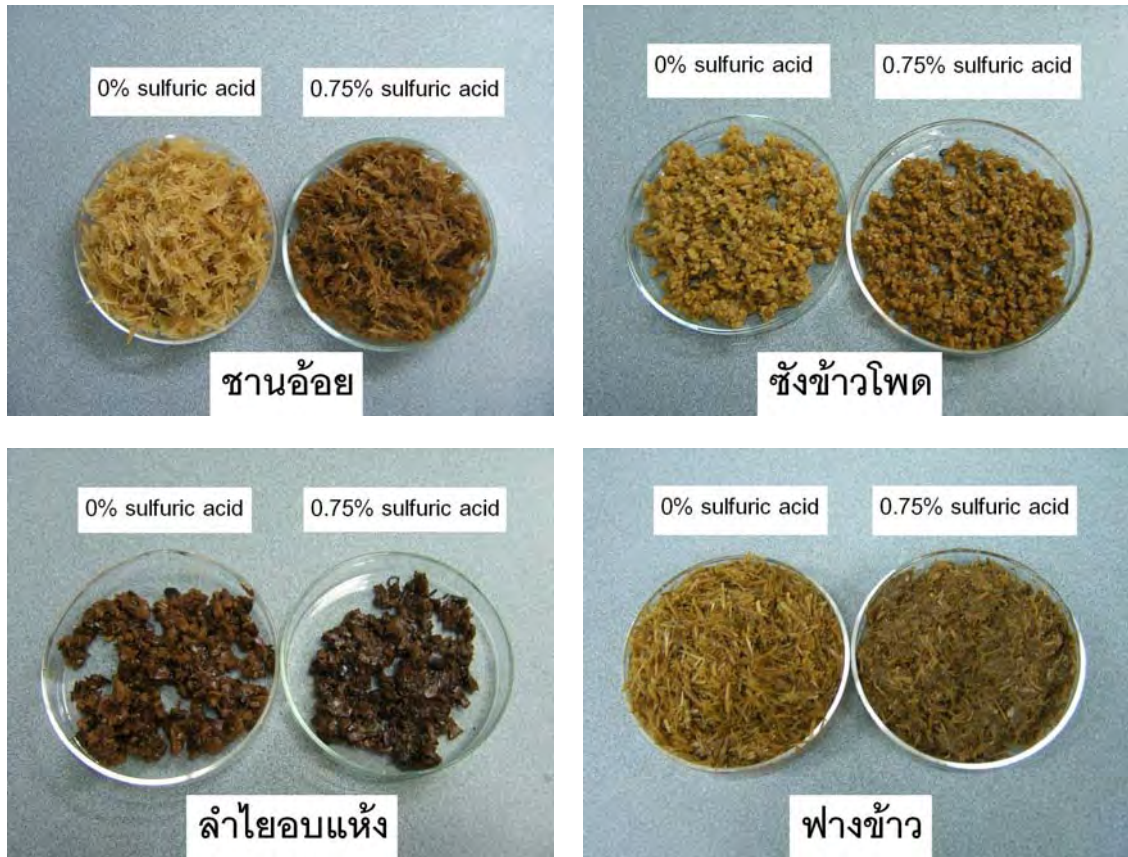
(ก)



(ข)

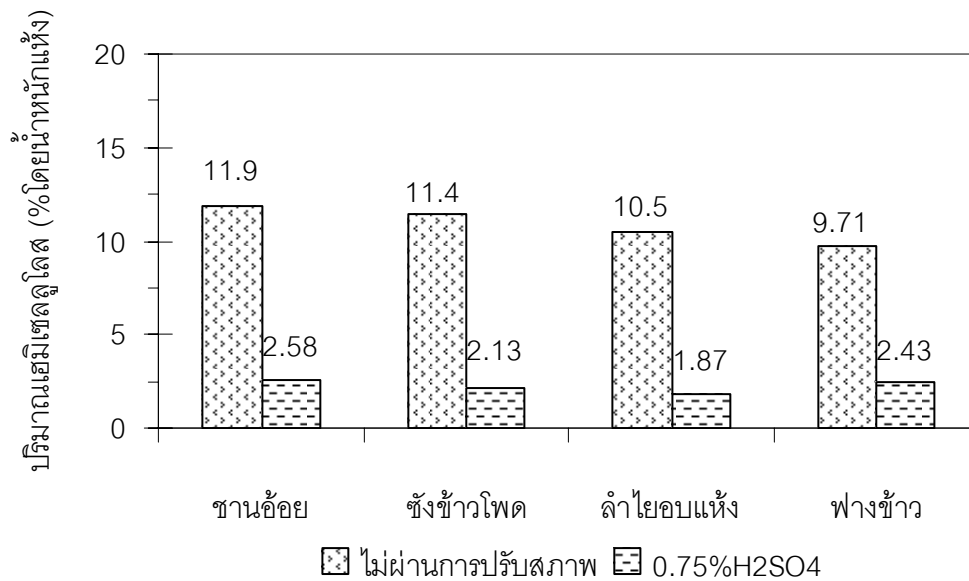


รูปที่ 4.7 ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ (10 กรัม%โดยปริมาตร) ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร (ก) ก่อนการปรับสภาพ และ (ข) หลังการปรับสภาพ ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที



รูปที่ 4.8 ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ (10 กรัม%โดยปริมาตร) หลังการปรับสภาพด้วยการบดและกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0 และ 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ตามลำดับที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที

เมื่อทำการวิเคราะห์วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งผ่านการปรับสภาพข้างต้น พบว่า น้ำตาลรีดิวิตซ์ที่ได้จากการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร มาจากการสลายของเฮมิเซลลูโลส ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ทั้งนี้เพราะ กรดเข้าไปทำลาย พันธะโครงสร้างระหว่างโมเลกุลของลิกนิน และเซลลูโลสทำให้โครงสร้างโมเลกุลเกิดการแตกเฮมิเซลลูโลสจึงละลายออกมา (Yáñez และคณะ, 2004) โดยกรดจะเข้าไป ละลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีที่สุดในชานอ้อย รองลงมาคือ ชังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว

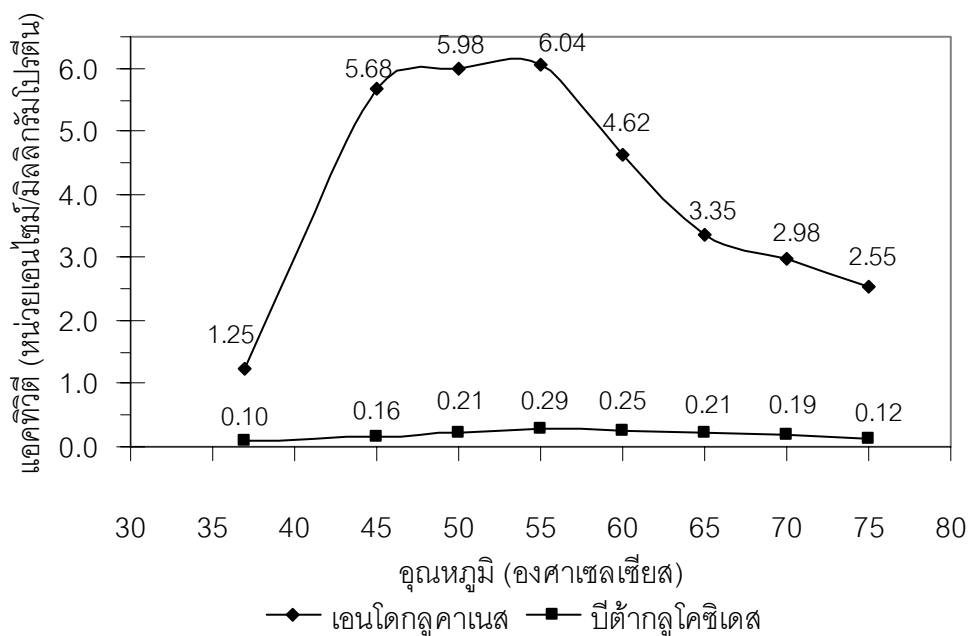


รูปที่ 4.9 การเปรียบเทียบปริมาณเฮมิเซลลูโลสในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที

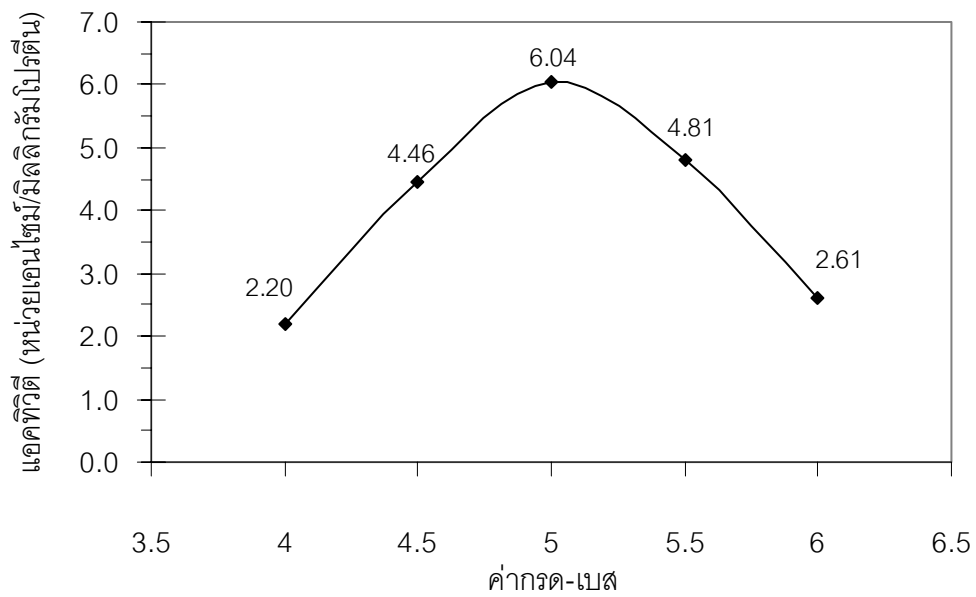
4.3 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเซลล์เลสทางการค้า

4.3.1 อุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และ ปีต้ากลูโคซิเดส ของเซลล์เลสจาก *T. reesei* ATCC 26921 (Sigma, USA) และค่าความเสถียรของเอนไซม์

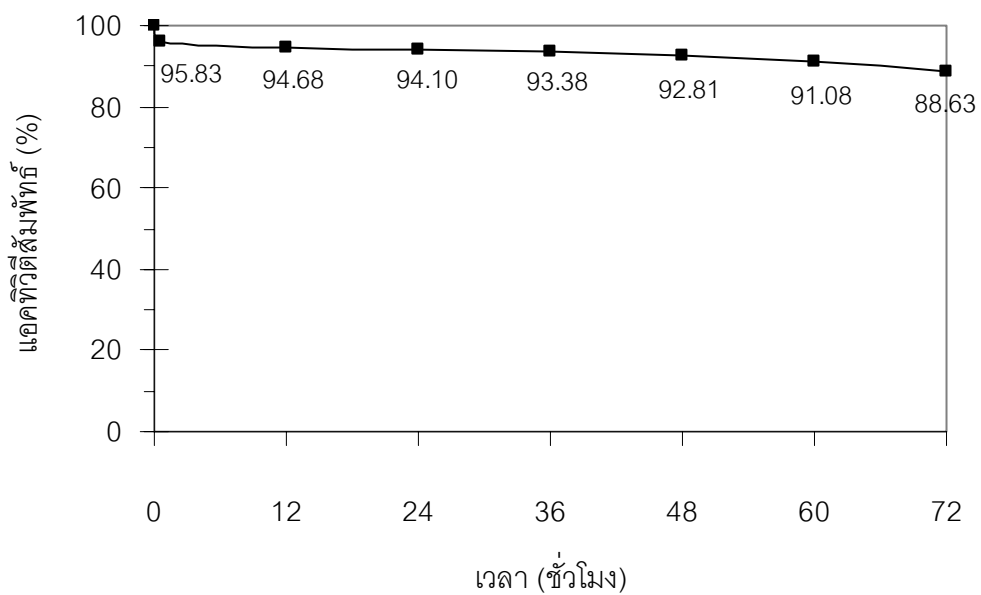
จากรูปที่ 4.10, 4.11 และ 4.12 อุณหภูมิ และค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของ เอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดส คือ 55 องศาเซลเซียส และ 5.0 เมื่อป่มเอนโดกลูคาเนส และ ปีต้ากลูโคซิเดส ไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงยังคงมีแอกทิวิตี เหลืออยู่ 92.81 % และ 46.69 % ตามลำดับ



รูปที่ 4.10 แอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดส จาก *T. reesei* ATCC 26921 ค่ากรด-เบส 5.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 4.11 แอดทิวิตีที่ค่ากรด-เบสต่างๆ ของเอนโดกลูคาเนส จาก *T. reesei* ATCC 26921 ที่ 55 องศาเซลเซียส

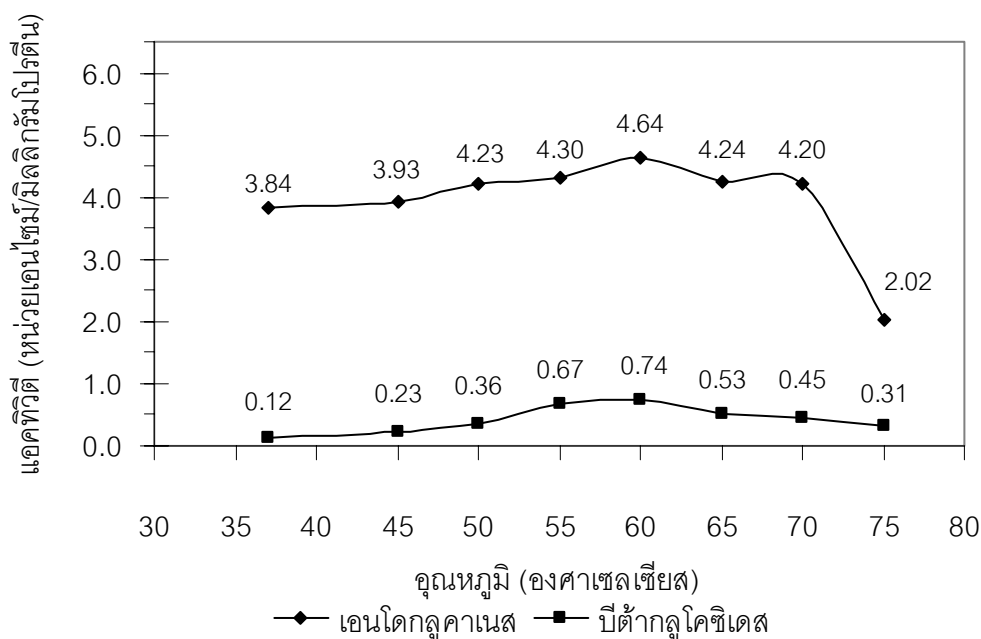


รูปที่ 4.12 ความเสถียรของเอนโดกลูคาเนส จาก *T. reesei* ATCC 26921 ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 (กำหนดแอดทิวิตีของเอนไซม์ซึ่งไม่ถูกบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ มีค่าเป็น 100)

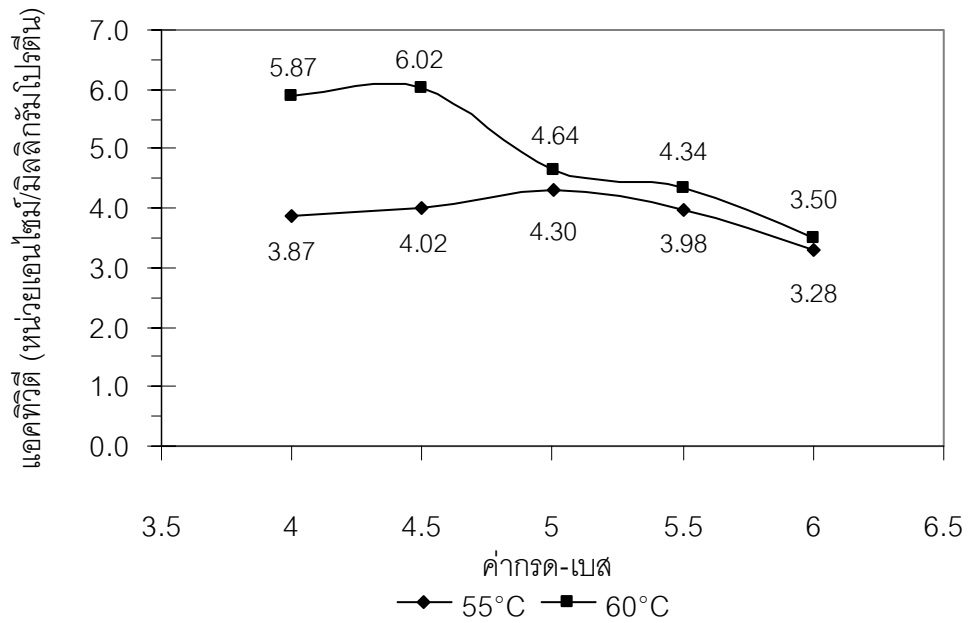
4.3.2 อุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และ บีต้ากลูโคซิเดส ของเซลลูเลสจาก *A. niger* (Sigma, USA) และค่าความเสถียรของ เอนไซม์

จากรูปที่ 4.13 และ 4.14 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสและ บีต้ากลูโคซิเดส คือ 60 องศาเซลเซียส และค่ากรด-เบสที่เหมาะสม คือ 4.5

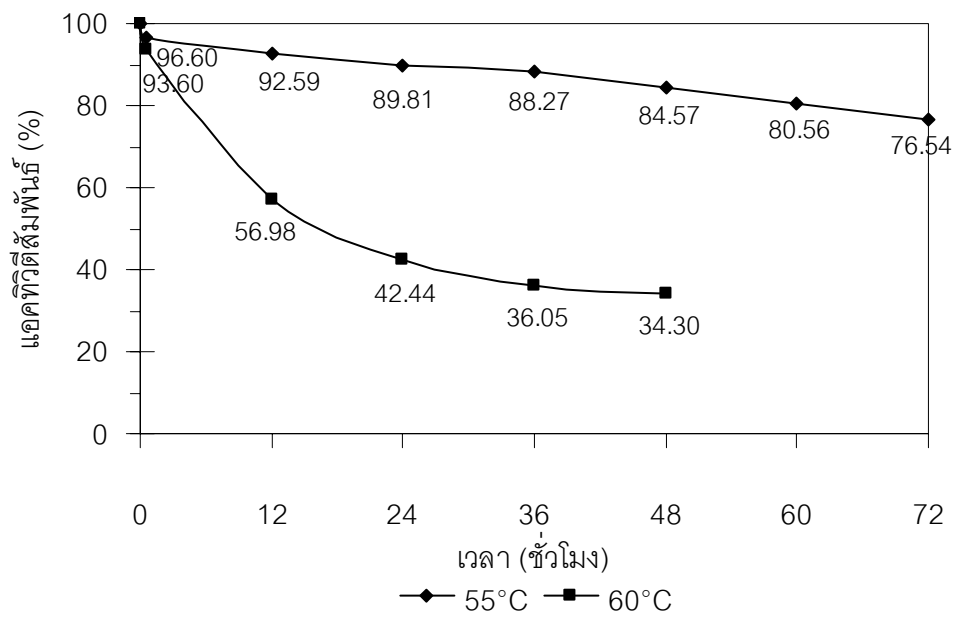
จากรูปที่ 4.15 เมื่อป้อนเอนโดกลูคาเนสไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ค่ากรด-เบส 5.0 แอกทิวิตีลดลงเหลือเพียง 34.30 % ในขณะที่ป้อนเอนโดกลูคาเนสและบีต้ากลูโคซิเดสไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ค่ากรด-เบส 5.0 แอกทิวิตีลดลงเหลือ 84.57 % และ 64.02 % ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ที่ 60 องศาเซลเซียส แอกทิวิตีของเอนไซม์ลดลงมากกว่าที่ 55 องศาเซลเซียส ดังนั้นในงานวิจัยจึงเลือกใช้ที่ 55 องศาเซลเซียส (เนื่องจากจะผสมกับเซลลูเลสของ *T. reesei* ATCC 26921) ค่ากรด-เบส 5.0 ในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร



รูปที่ 4.13 แอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดส จาก *A. niger* ค่ากรด-เบส 5.0 ที่ อุณหภูมิต่างๆ



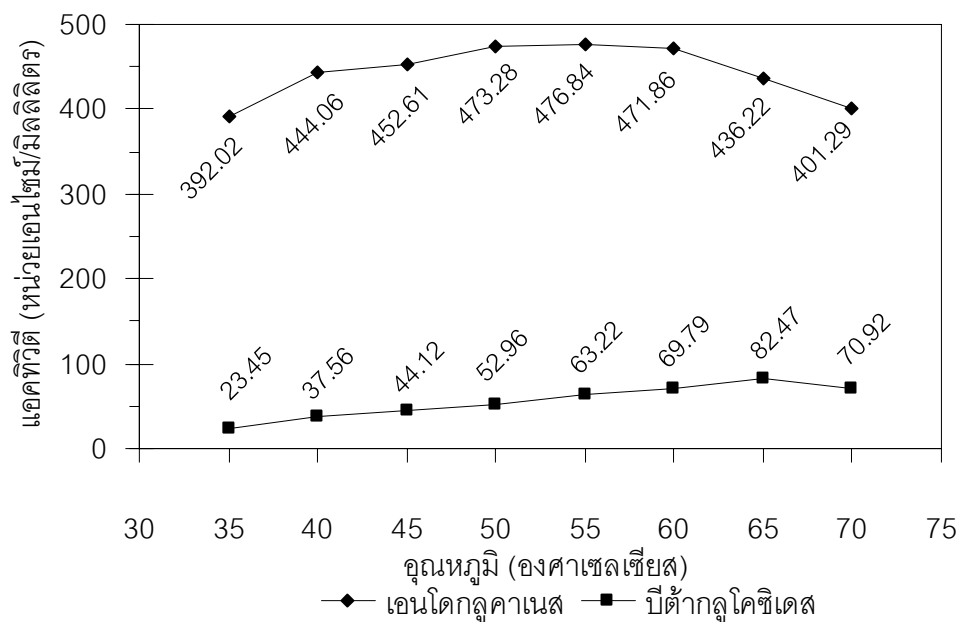
รูปที่ 4.14 แอคติวิตีที่ค่ากรด-เบสต่างๆของเอนโดกลูคาเนส จาก *A. niger* ที่ 55 และ 60 องศาเซลเซียส



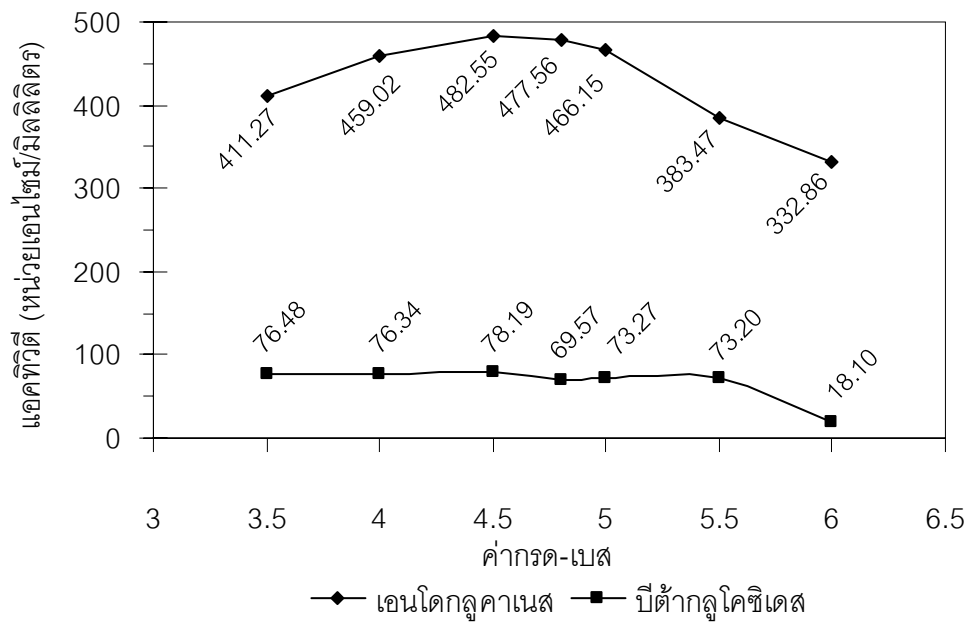
รูปที่ 4.15 ความเสถียรของเอนโดกลูคาเนส จาก *A. niger* ที่ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 (กำหนดแอคติวิตีของเอนไซม์ซึ่งไม่ถูกบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆมีค่าเป็น 100)

4.3.3 อุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแอกทีวิตีของเอนโดกลูคาเนส และ
 ปีต้ากลูโคซิเดสของเซลล์จาก *T. longibrachiatum* (เดิม *T. reesei*) ยี่ห้อ
 CYTO[®] CL (Genecor, Finland) และค่าความเสถียรของเอนไซม์

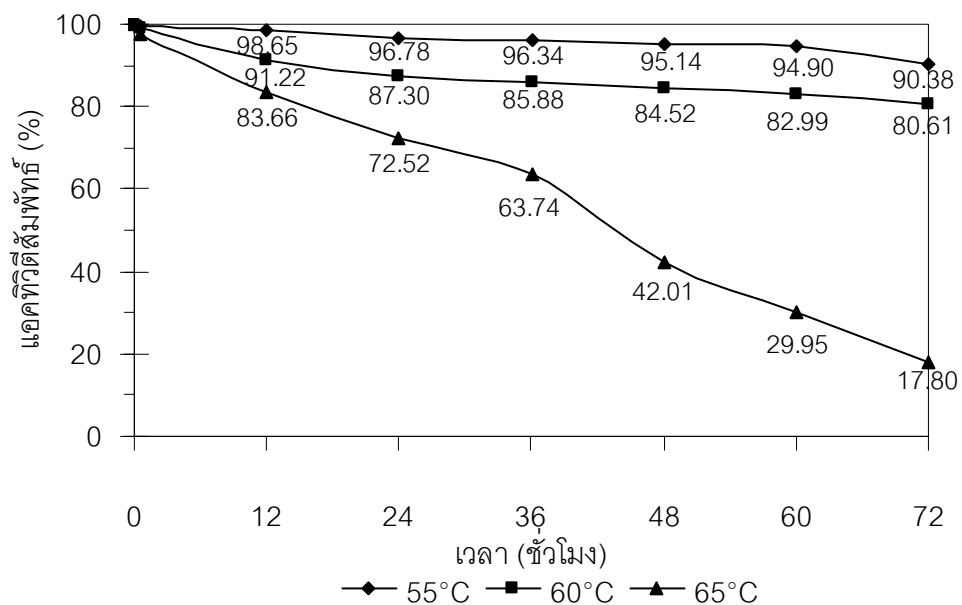
จากรูปที่ 4.16, 4.17 และ 4.18 อุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแอกทีวิตีของ
 เอนโดกลูคาเนส คือ 55 องศาเซลเซียส และ 4.5 ตามลำดับ อุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสม
 ต่อแอกทีวิตีของปีต้ากลูโคซิเดส คือ 65 องศาเซลเซียส และ 4.5 ตามลำดับ เมื่อบ่มเอนโดกลูคาเนส
 ไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงยังคงมีแอกทีวิตีเหลืออยู่ 90.38 %



รูปที่ 4.16 แอกทีวิตีของเอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดส จาก *T. longibrachiatum* ยี่ห้อ
 CYTO[®] CL ค่ากรด-เบส 4.8 ที่อุณหภูมิต่างๆ



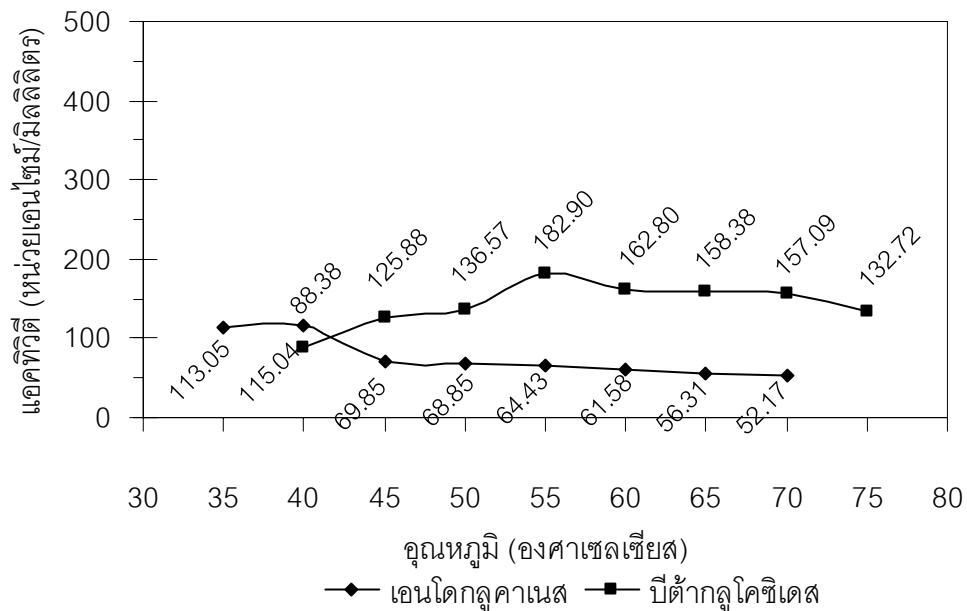
รูปที่ 4.17 แอกทิวิตีที่ค่ากรด-เบสต่างๆ ของเอนโดกลูคาเนส และเป็ปติคอกซ์ไคเดสจาก *T. longibrachiatum* ยี่ห้อ CYTO[®] CL ที่ 55 องศาเซลเซียส



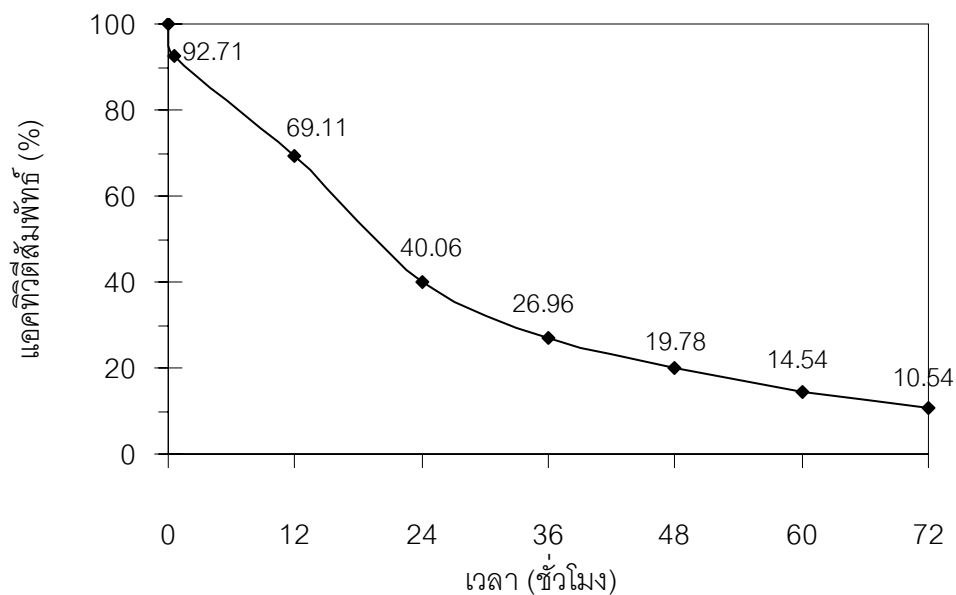
รูปที่ 4.18 ความเสถียรของเอนโดกลูคาเนส จาก *T. longibrachiatum* ยี่ห้อ CYTO[®] CL ที่ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 (กำหนดแอกทิวิตีของเอนไซม์ซึ่งไม่ถูกบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆมีค่าเป็น 100)

4.3.4 อุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และ ปีต้ากลูโคซิเดสของเซลล์จาก *T. reesei* ยี่ห้อ GC 220 (Genecor, Finland) และค่าความเสถียรของเอนไซม์

จากรูปที่ 4.19 และ 4.20 ค่ากรด-เบส 4.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของ
เอนโดกลูคาเนส คือ 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของปีต้ากลูโคซิเดส
คือ 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มปีต้ากลูโคซิเดสไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 (เนื่องจากใช้
ผสมกับเซลล์ยี่ห้อ CYTO[®] CL) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีแอกทิวิตีเหลืออยู่เพียง 10.54 %



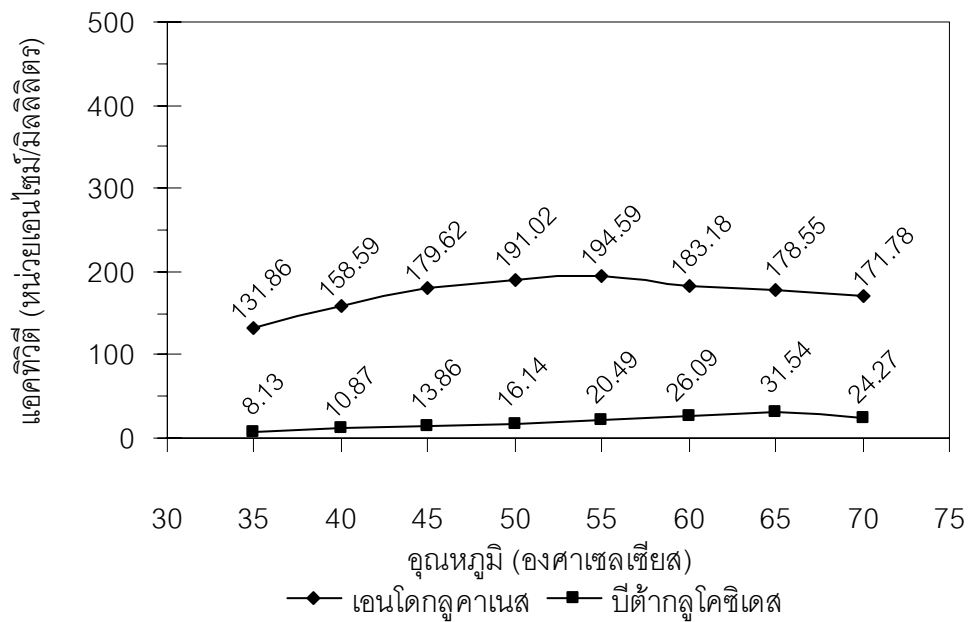
รูปที่ 4.19 แอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดส จาก *T. reesei* ยี่ห้อ GC 220
ค่ากรด-เบส 4.8 ที่อุณหภูมิต่างๆ



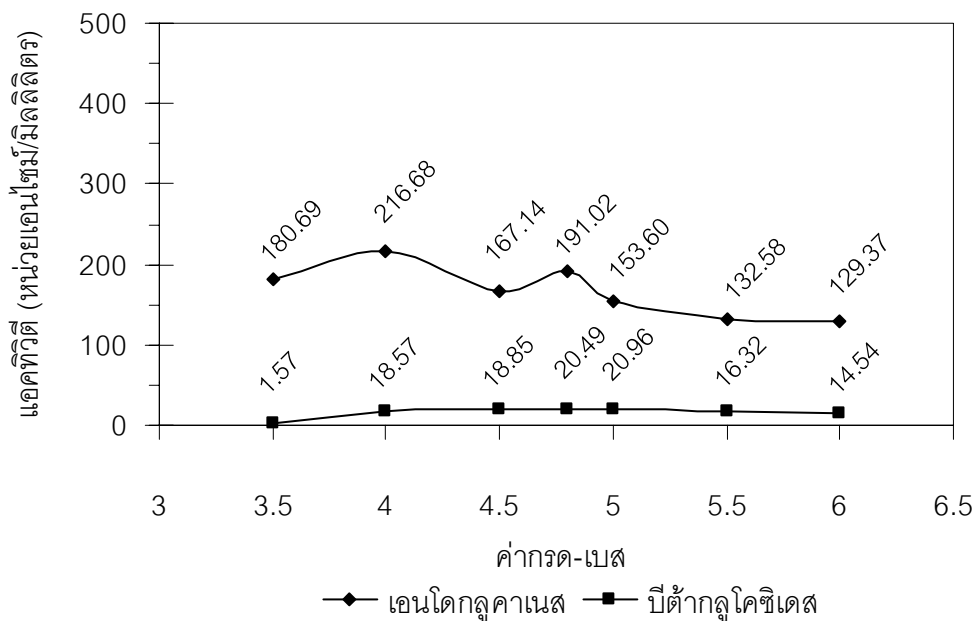
รูปที่ 4.20 ความเสถียรของบีต้ากลูโคซิเดสจาก *T. reesei* ยี่ห้อ GC 220 ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 (กำหนดแฉะทิวตี้ของเอนไซม์ซึ่งไม่ถูกบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆมีค่าเป็น 100)

4.3.5 อุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแฉะทิวตี้ของเอนโดกลูคาเนส และ บีต้ากลูโคซิเดสของเซลลูเลสจาก *T. reesei* ยี่ห้อ Celluclast[®] 1.5 L FG (Novozymes, Denmark)

จากรูปที่ 4.21 และ 4.22 อุณหภูมิ และค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแฉะทิวตี้ของ เอนโดกลูคาเนส คือ 55 องศาเซลเซียส และ 4.0 ตามลำดับ อุณหภูมิ และค่ากรด-เบสที่เหมาะสม ต่อแฉะทิวตี้ของบีต้ากลูโคซิเดส คือ 65 องศาเซลเซียส และ 5.0 ตามลำดับ



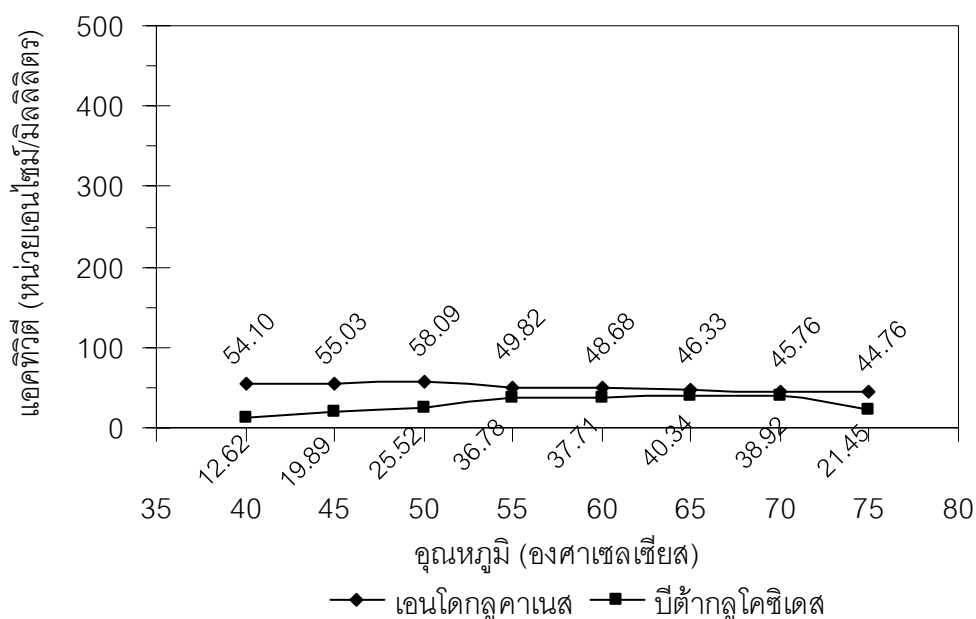
รูปที่ 4.21 แอคทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดส จาก *T. reesei* ยี่ห้อ Celluclast[®] 1.5 L FG ค่ากรด-เบส 4.8 ที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 4.22 แอคทิวิตีที่ค่ากรด-เบสต่างๆของเอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดส จาก *T. reesei* ยี่ห้อ Celluclast[®] 1.5 L FG ที่ 55 องศาเซลเซียส

4.3.6 อุณหภูมิและค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และ บีต้ากลูโคซิเดสของเซลล์ผสมจาก *T. reesei* และ *A. niger* ยี่ห้อ Cellubrix (Novozymes, Denmark)

จากรูปที่ 4.23 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส คือ 50 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของบีต้ากลูโคซิเดส คือ 65 องศาเซลเซียส พบว่ามีแอกทิวิตีต่ำกว่าเอนไซม์ทางการค้ายี่ห้ออื่นๆ จึงไม่มีการหาค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อ



รูปที่ 4.23 แอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดส ของเซลล์ผสมจาก *T. reesei* และ *A. niger* ยี่ห้อ Cellubrix ค่ากรด-เบส 4.8 ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากรูปที่ 4.16, 4.19, 4.21 และ 4.23 วิเคราะห์แอกทิวิตีของเซลล์ผสมทางการค้า 4 ยี่ห้อ (CYTO[®] CL , GC220, Celluclast[®] 1.5 L FG และ Cellubrix) พบว่า ยี่ห้อ CYTO[®] CL มีแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสสูงสุด 476.84 หน่วยเอนไซม์/มิลลิลิตร และมีแอกทิวิตีของบีต้ากลูโคซิเดส 82.47 หน่วยเอนไซม์/มิลลิลิตร ในขณะที่ยี่ห้อ GC 220 มีแอกทิวิตีของบีต้ากลูโคซิเดสสูงสุด 182.90 หน่วยเอนไซม์/มิลลิลิตร และมีแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส 115.04 หน่วยเอนไซม์/มิลลิลิตร จึงเลือกใช้เซลล์ผสม 2 ยี่ห้อนี้ผสมกัน

จากรูปที่ 4.18 พบว่าการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้เอนโดกลูคาเนสของเซลล์เชื้อหัด CYTO[®] CL มีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 90.38 % ในขณะที่รูปที่ 4.20 พบว่าทำให้บีต้ากลูโคซิเดสของเซลล์เชื้อหัด GC 220 มีแอกทิวิตีเหลืออยู่เพียง 10.54 % จึงได้ลดอุณหภูมิเพื่อหาค่าความเสถียรที่เหมาะสมใหม่ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความเสถียรของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดสของเซลล์เชื้อหัด CYTO[®] CL และ GC 220 ค่ากรด-เบส 4.5 ที่ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	ชนิดเอนไซม์	เวลา (ชั่วโมง)	แอกทิวิตีสัมพัทธ์ของเซลล์เชื้อหัด CYTO [®] CL (%)*	แอกทิวิตีสัมพัทธ์ของเซลล์เชื้อหัด GC 220 (%)*
45	เอนโดกลูคาเนส	0	100	100
		48	97.53	99.28
		72	95.85	99.09
	บีต้ากลูโคซิเดส	0	100	100
		48	99.28	98.24
		72	99.28	95.20
50	เอนโดกลูคาเนส	0	100	100
		48	96.92	98.52
		72	92.85	98.15
	บีต้ากลูโคซิเดส	0	100	100
		48	66.67	97.33
		72	58.33	87.41
55	เอนโดกลูคาเนส	0	100	100
		48	95.14	19.78
		72	90.38	10.54

*กำหนด แอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส ที่ไม่บ่มที่ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 มีค่าเท่ากับ 100

จากตารางที่ 4.3 พบว่าที่ 45 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จะมีแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดสเหลืออยู่มากที่สุด แต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ที่ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ใกล้กับอุณหภูมิที่มีแอกทิวิตีของเซลล์เชื้อสูงสุด คือ 55 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.4 สรุปแอกทิวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ทางการค้า

เอนไซม์	แอกทิวิตีของเอนไซม์		ความเสถียรของเอนไซม์	
	เอนโดกลูคาเนส	บีต้ากลูโคซิเดส	เอนโดกลูคาเนส	บีต้ากลูโคซิเดส
<i>T. reesei</i> ATCC 26921 (Sigma)	55°C pH 5.0 6.04 U/mg pro.	55°C pH 5.0 0.29 U/mg pro.	55°C, pH 5.0, 48 ชม. 92.81%	55°C, pH 5.0, 48 ชม. 46.69%
<i>A. niger</i> (Sigma)	60°C pH 4.5 4.64 U/mg pro.	60°C pH 4.5 0.74 U/mg pro.	55°C, pH 5.0, 48 ชม. 84.57% 60°C, pH 5.0, 48 ชม. 34.30%	55°C, pH 5.0, 48 ชม. 64.02%
CYTO [®] CL (Genecor)	55°C pH 4.5 476.84 U/ml. or 3.13 U/mg pro. 50°C pH 4.5 473.28 U/ml. or 3.10 U/mg pro.	65°C pH 4.5 82.47 U/ml. or 0.36 U/mg pro. 50°C pH 4.5 52.96 U/ml. or 0.35 U/mg pro.	45°C, pH 4.5, 72 ชม. 95.85% 50°C, pH 4.5, 72 ชม. 92.85% 55°C, pH 4.5, 72 ชม. 90.38% 60°C, pH 4.5, 72 ชม. 80.61% 65°C, pH 4.5, 72 ชม. 17.80%	45°C, pH 4.5, 72 ชม. 99.28% 50°C, pH 4.5, 72 ชม. 58.33%
GC 220 (Genecor)	40°C pH 4.5 115.04 U/ml. or 0.50 U/mg pro. 50°C pH 4.5 68.85 U/ml. or 0.3 U/mg pro.	55°C pH 4.5 182.90 U/ml. or 0.80 U/mg pro. 50°C pH 4.5 136.57 U/ml. or 0.60 U/mg pro.	45°C, pH 4.5, 72 ชม. 99.09% 50°C, pH 4.5, 72 ชม. 98.15%	45°C, pH 4.5, 72 ชม. 95.20% 50°C, pH 4.5, 72 ชม. 87.41% 55°C, pH 4.5, 72 ชม. 10.54%
Celluclast [®] 1.5L FG (Novozymes)	55°C pH 4.0 194.59 U/ml.	65°C pH 5.0 31.54 U/ml.	-	-
Cellubrix (Novozymes)	50°C pH 4.8 58.09 U/ml.	65°C pH 4.8 40.34 U/ml.	-	-

4.4 ผลการศึกษาภาวะบางประการที่มีผลต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วย เซลลูเลส

งานวิจัยข้อ 4.4.1 และ 4.4.2 ได้เลือกศึกษาการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส เนื่องจากเป็น วัสดุที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในโรงงานน้ำตาลจึงเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีศักยภาพที่จะ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตเอทานอลเพราะไม่มีปัญหาต้นทุนของการขนส่ง โดยนำ ชานอ้อย 5 กรัม%โดยปริมาตร ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที มาปรับค่า กรด-เบสเป็น 5.0 แล้วศึกษาการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสจาก *T. reesei* ATCC 26921 ที่ 55 องศาเซลเซียส, เซลลูเลสผสมระหว่างเซลลูเลสของ *T. reesei* ATCC 26921 และ *A. niger* ที่ 55 องศาเซลเซียส และเซลลูเลสจาก *A. niger* ที่ 60 องศาเซลเซียส เขย่า 110 รอบ/นาที 48 ชั่วโมง หยุดปฏิบัติการโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที กรองแยกตะกอน วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

4.4.1 ผลของอัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนสและบีต้ากลูโคซิเดส ที่เหมาะสมต่อการย่อย ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ

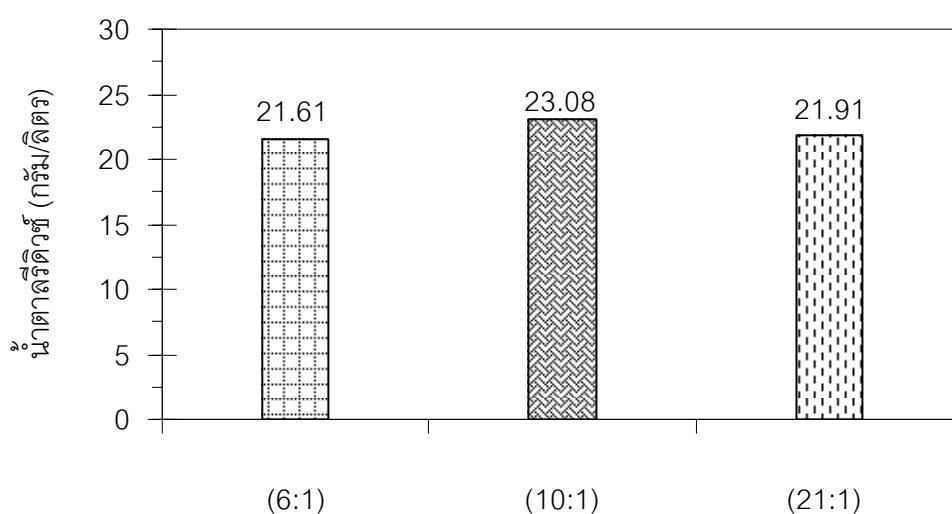
เนื่องจากที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 เซลลูเลสจาก *T. reesei* ATCC 26921 มี แอคทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส 6.04 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน แต่มีแอคทิวิตีของบีต้า กลูโคซิเดสค่อนข้างต่ำเท่ากับ 0.29 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน จึงผสมเซลลูเลสจาก *A. niger* ซึ่งมีแอคทิวิตีบีต้ากลูโคซิเดสสูงกว่าเท่ากับ 0.67 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน เพื่อให้อัตราส่วน ของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดสลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 อัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนส และปีต้ากลูโคซิเดสใน 1 มิลลิกรัมโปรตีนของ
เซลล์จาก *T. reesei*, เซลล์ผสม ที่ 55 องศาเซลเซียส และ *A. niger*
ที่ 60 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0

เซลล์	เอนโดกลูคาเนส (หน่วยเอนไซม์)	ปีต้ากลูโคซิเดส (หน่วยเอนไซม์)	อัตราส่วนเอนโดกลูคาเนส: ปีต้ากลูโคซิเดส
ก่อนการบ่ม:			
<i>T. reesei</i>	72.48	3.48	21:1
<i>A. niger</i>	55.68	8.88	6:1
<i>T. reesei</i> + <i>A. niger</i>	64.08	6.18	10:1
หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง:			
<i>T. reesei</i>	67.27	1.62	41:1
<i>A. niger</i>	19.10	2.32	8:1
<i>T. reesei</i> + <i>A. niger</i>	57.17	3.65	16:1

จากตารางที่ 4.5 แอคทิวิตีของเอนไซม์ลดลง แต่อัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนสและ
ปีต้ากลูโคซิเดส ในเซลล์จาก *T. reesei* ATCC 26921, เซลล์ผสม และเซลล์จาก
A. niger หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้น

ผลการย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลล์เลสจาก *T. reesei*, เซลล์เลสผสม ที่ 55 องศาเซลเซียส และเซลล์เลสจาก *A. niger* ที่ 60 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 พบว่าน้ำตาลรีดิวิซซ์ที่ได้สูงขึ้น เมื่ออัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนสต่อบีต้ากลูโคซิเดสลดลงจาก 21:1 เป็น 10:1 ดังแสดงในรูปที่ 4.24 ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซซ์ที่ได้แปรผันกับหน่วยเอนไซม์ของเอนโดกลูคาเนสที่ใช้, อัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนสต่อบีต้ากลูโคซิเดส และความเสถียรของเอนไซม์ ผลการทดลองสอดคล้องกับ Drazic และ Nozinic (1984) ซึ่งใช้เซลล์เลสจาก *T. reesei* ร่วมกับเซลล์เลสจาก *Aspergillus* sp. ย่อยฟางข้าวสาลี (wheat straw) พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงกว่าการใช้เซลล์เลสจากเชื้อราแต่ละชนิดแยกกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลล์เลสผสมในการทดลองต่อไป

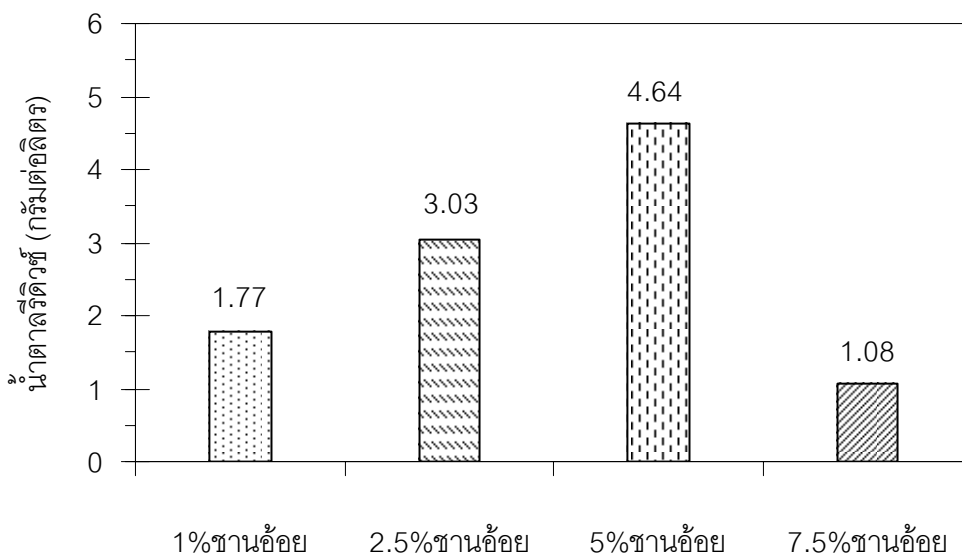


อัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดส

รูปที่ 4.24 น้ำตาลรีดิวิซซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที ด้วยเซลล์เลส ที่ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.4.2 ผลของปริมาณขานอ้อยต่อการย่อยด้วยเซลลูเลส

ผลการแปรผันปริมาณขานอ้อยหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร 1, 2.5, 5.0 และ 7.5 กรัม% โดยปริมาตร ด้วยเซลลูเลสผสม (เอนโดกลูคาเนส: ปีต้ากลูโคซิเดส=10:1) จำนวน 64 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงสุดเมื่อปริมาณขานอ้อยเท่ากับ 5 กรัม% โดยปริมาตร คือ ขวานลอยขานอ้อย 5 กรัมใน 100 มิลลิลิตรของเซลลูเลสผสม ดังแสดงในรูปที่ 4.25 ปริมาณขานอ้อยมากกว่า 5 กรัม% โดยปริมาตร มีลักษณะแห้งจึงทำให้ความสามารถของเซลลูเลสในการย่อยสลายลดลง



รูปที่ 4.25 น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นจากการย่อยด้วยเซลลูเลสผสม (เอนโดกลูคาเนส: ปีต้ากลูโคซิเดส=10:1) จำนวน 64 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลระยะเวลาในการย่อยด้วยเซลลูเลส เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ทุก 3 ชั่วโมง การย่อยชานอ้อย 5 กรัม%โดยปริมาตร ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดย น้ำหนัก/ปริมาตร ด้วยเซลลูเลสผสม (เอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดส=10:1) จำนวน 64 หน่วย เอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง 12 ชั่วโมงแรก น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 18.4 % ชั่วโมงที่ 24 และ 48 น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 12 และ 24 เพียง 5.16 และ 0.57 % ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดจากการย่อยชานอ้อย 5 กรัม%โดยปริมาตร ที่ 55

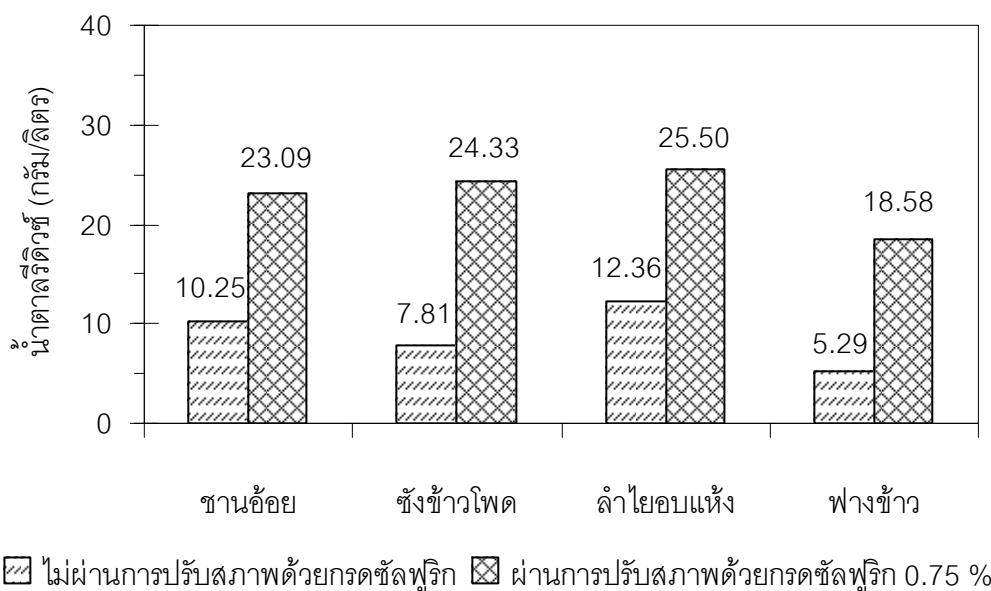
องศาเซลเซียส ด้วยเซลลูเลสผสม (เอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดส=10:1)

จำนวน 64 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ระยะเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	18.45
1	18.83
3	20.34
6	20.53
9	20.92
12	21.84
16	22.24
20	22.64
24	22.96
30	23.04
48	23.09

4.4.3 การเปรียบเทียบผลของการปรับสภาพด้วยกรดต่อประสิทธิภาพของเซลล์เลสในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ

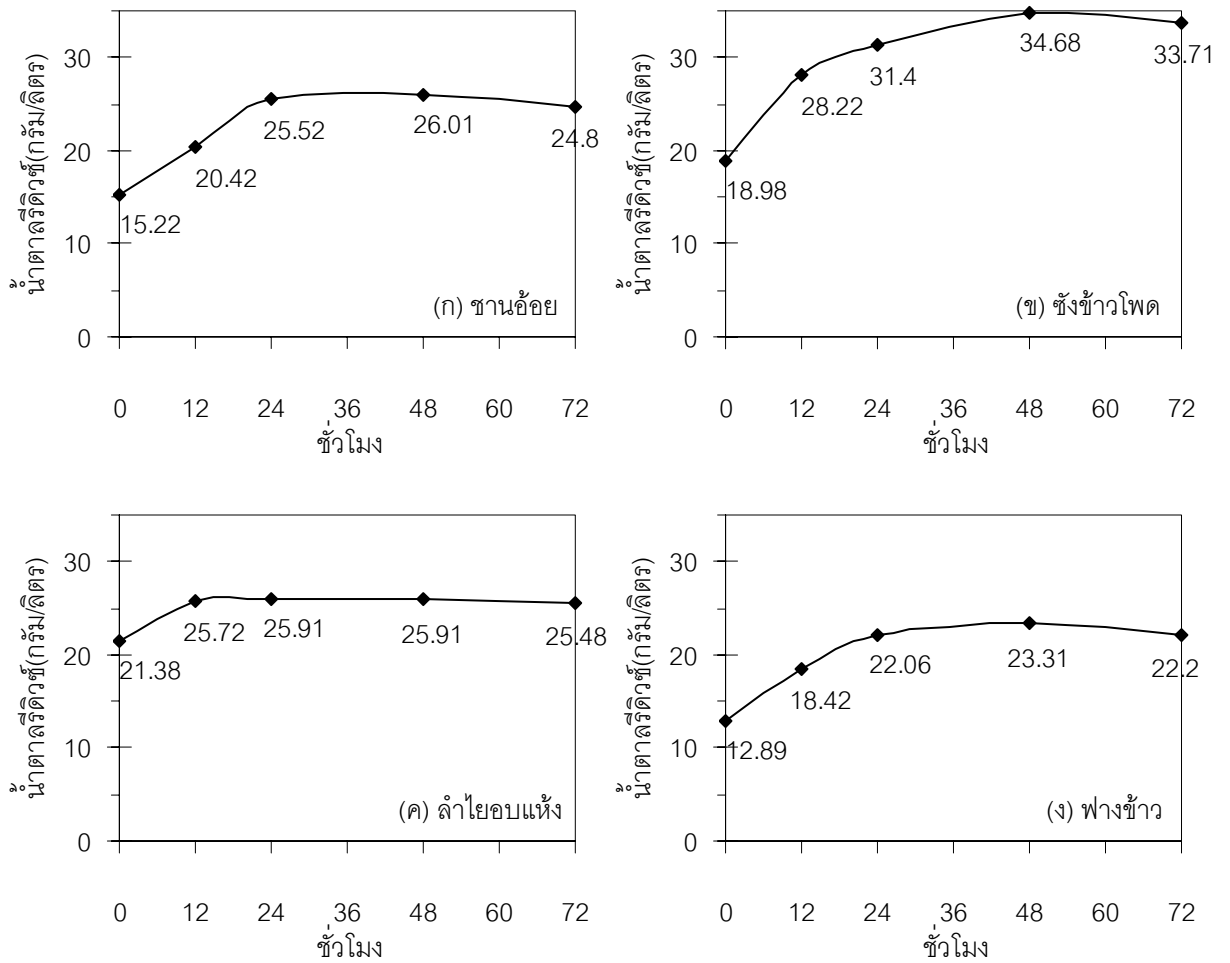
ผลการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5 กรัม%โดยปริมาตร ที่ไม่ปรับสภาพด้วยกรดและปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที ด้วยเซลล์เลสผสม (เอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดส=10:1) จำนวน 64 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 55 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง พบว่าการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ช่วยทำให้เอนไซม์สามารถย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ดีขึ้น เรียงตามลำดับดังนี้ คือ ชังข้าวโพด ฟางข้าว ลำไยอบแห้ง ชานอ้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.26 ทั้งนี้เพราะวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก เอนไซม์จะเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ยากจึงได้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณต่ำกว่า



รูปที่ 4.26 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ไม่ปรับสภาพด้วยกรดและปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที ด้วยเซลล์เลสผสม (เอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดส=10:1) จำนวน 64 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 55 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

4.5 ผลการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5 กรัม%โดยปริมาตร ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที ด้วยเซลล์เลสผสมระหว่าง CYTO[®] CL และ GC 220

ผลการใช้เซลล์เลสผสมระหว่าง CYTO[®] CL และ GC 220 จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างเอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดสเท่ากับ 3:1 ย่อยสลายที่ 50 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.27 พบว่า ใน 24 ชั่วโมงแรกของการย่อยชานอ้อย ชั่งข้าวโพด และฟางข้าว ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นไม่มาก ลำไยอบแห้งน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าคงที่ในชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 48 ชั่วโมงที่ 72 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลดลงอาจเนื่องมาจากในระหว่างการย่อยด้วยเซลล์เลส น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เพอร์ฟูรัล เป็นต้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นหลังการปรับสภาพด้วยกรดจากการย่อยด้วยเซลล์เลสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.28 พบว่าจะได้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดจากชั่งข้าวโพด เท่ากับ 15.7 กรัม/ลิตร รองลงมา คือ ชานอ้อย ฟางข้าว และลำไยอบแห้ง เท่ากับ 10.79, 9.31 และ 4.53 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลโมลกุลเดี่ยวที่ได้ด้วยวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.29 พบว่า ได้กลูโคสสูงสุดจากชั่งข้าวโพดคือ 13.39 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ ลำไยอบแห้ง ชานอ้อย ฟางข้าว เท่ากับ 13.36, 11.68 และ 10.71 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ได้ไซโลสสูงสุดจากชั่งข้าวโพด คือ 11.62 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ ฟางข้าว ชานอ้อย เท่ากับ 7.59 และ 6.21 กรัม/ลิตร ตามลำดับ



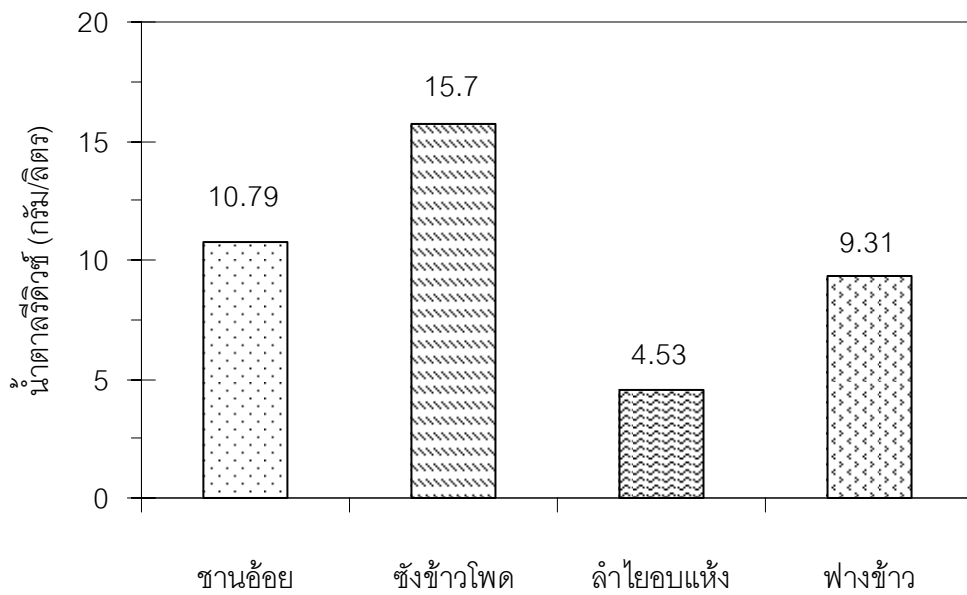
รูปที่ 4.27 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5 กรัม%โดยปริมาตร

ที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121

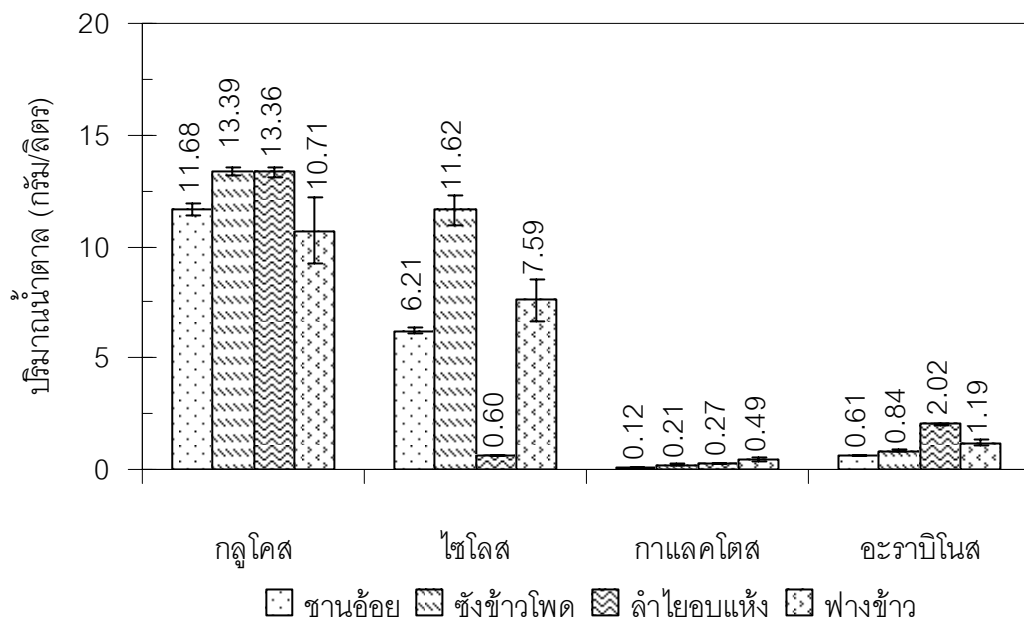
องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที ด้วยเซลล์เลส

ผสมระหว่าง CYTO[®] CL และ GC 220 (เอนโดกลูคาเนส:ปีต้ากลูโคซิเดส=3:1)

จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 ที่
เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.28 น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นจากการย่อยด้วยเซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO[®] CL และ GC 220 (เอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดส=3:1) จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.29 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวบางชนิดที่ได้จากการย่อยด้วยเซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO[®] CL และ GC 220 (เอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดส=3:1) จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบผลการทดลองน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสกับงานวิจัยอื่น

วัตถุดิบ	วิธีการปรับสภาพ	ชนิดเอนไซม์	ภาวะที่ใช้ในการทดลอง				ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
			ค่ากรด-เบส	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)	ความเร็ว รอบ/นาที		
ฟางข้าว, ซังข้าวโพด และ ชานอ้อย	แช่ 10%NaOH 24 ชั่วโมง ต้มที่ 80°C 2 ชั่วโมง	Celluclast และ Novozyme	-	50	168	200	ฟางข้าว, ซังข้าวโพด และชานอ้อยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 720, 693 และ 525 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท ตามลำดับ	อำนาจ ขวัญเมือง, 2537
ฟางข้าว	แช่ NaOH 2M 24 ชั่วโมง ต้มที่ 70°C 90 นาที	เซลลูเลส	4.0	55	16	350	น้ำตาลรีดิวซ์ 557.07 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท	ระวีวรรณ แก้วกล้า, 2538
เหง้ามัน ลำปะหลัง	แช่ NaOH 2M 24 ชั่วโมง ต้มที่ 50°C 90 นาที	Cellubrix	4.8	50	24	-	น้ำตาลรีดิวซ์ 8.3 กรัม/ลิตร	พรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545
wheat straw	0.75% H ₂ SO ₄ 121°C 60 นาที	Celluclast และ Novozyme	5.0	45	72	100	น้ำตาลรีดิวซ์ 485±22 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท	Saha B.C. และคณะ, 2005
corn stover	2% H ₂ SO ₄ ด้วย steam 190°C 5 นาที	Celluclast และ Novozyme	4.8	50	72	300	น้ำตาลรีดิวซ์ 561 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท	Varga E. และคณะ, 2004
rye straw และ bermudagrass	0.6% H ₂ SO ₄ autoclave 121°C 60 นาที	เซลลูเลสจาก <i>T. reesei</i> และ Novozyme	4.8	50	48	100	rye straw และ bermudagrass ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 133.7 และ 195.7 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท ตามลำดับ	Sun Y. และคณะ, 2005

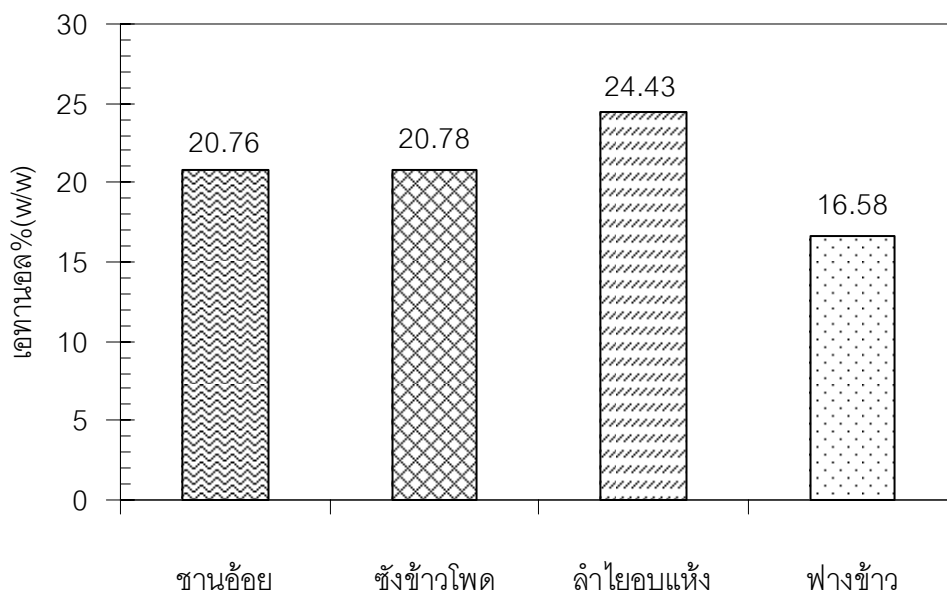
วัตถุประสงค์	วิธีการปรับสภาพ	ชนิดเอนไซม์	ภาวะที่ใช้ในการทดลอง				ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
			ค่ากรด-เบส	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)	ความเร็ว รอบ/นาที		
ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว	0.75% H ₂ SO ₄ autoclave 121°C 60 นาที	Cyto [®] CL และ GC 220	4.5	50	48	110	ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 520.13, 693.51, 518.20 และ 466.19 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท ตามลำดับ	งานวิจัยนี้
ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว	0.75% H ₂ SO ₄ autoclave 121°C 60 นาที	เซลล์จาก <i>T. reesei</i> และ <i>A. niger</i>	5.0	55	48	110	ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 572.14, 602.97, 631.86 และ 460.41 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท ตามลำดับ	งานวิจัยนี้

4.6 ผลการหมักเอทานอลจาก enzymatic hydrolysates (ผลจากข้อ 4.5) โดยใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5596

ผลการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งปรับสภาพด้วยกรดแล้วย่อยด้วยเซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO[®] CL และ GC 220 (เอนโดกลูคาเนส:ปีต้ากลูโคซิเดส=3:1) จำนวน 81 หน่วย เอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ผลจากข้อ 4.5) จะได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ ดังรูปที่ 4.30 นำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้เป็นสับสเตรทในการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ปรับค่ากรด-เบสเป็น 4.5 โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร เพื่อให้ยีสต์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญ และกระบวนการหมัก (Saita และ Slaughter, 1984) และเติมกลูโคส 10 กรัม/ลิตร เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น หมักที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะการหมักแบบไร้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.30 ลักษณะสีของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเซลลูเลส



รูปที่ 4.31 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีการเติมกลูโคสหมักโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.31 การเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ทำให้กลูโคสเริ่มต้นของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ของชานอ้อย ชังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว คือ 36.01, 44.68, 35.91 และ 33.31 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าได้เอทานอลสูงสุดจากลำไยอบแห้งคือ 24.43 % โดยน้ำหนัก รองลงมา คือ ชานอ้อย และชังข้าวโพด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันมาก คือ 20.7 % โดยน้ำหนัก ส่วนฟางข้าวให้เอทานอลต่ำสุดคือ 16.58 % โดยน้ำหนัก

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอล กับงานวิจัยอื่น

วัตถุดิบ	น้ำตาลเริ่มต้น	ชนิดจุลินทรีย์	ภาวะที่ใช้ในการหมัก			ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
			ค่ากรด-เบส	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)		
ฟางข้าว, ซังข้าวโพด และชานอ้อย	ฟางข้าว, ซังข้าวโพด, และชานอ้อยได้กลูโคส 17.03, 27.36 และ 33.9 กรัม/ลิตร	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	30	24	ฟางข้าว, ซังข้าวโพด, และชานอ้อยได้เอทานอล 13.3, 14.5 และ 17.3% (w/w)	อำนาจ ขวัญเมือง, 2537
ฟางข้าว	น้ำตาลรีดิวซ์ 557.07 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5013	5.0	30	96	เอทานอล 1.3 % โดยปริมาตร	ระวีวรรณ แก้วกล้า, 2538
เหง้ามันสำปะหลัง	น้ำตาลรีดิวซ์ 25 กรัม/ลิตร	<i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405	5.0	30	60	เอทานอล 10.60 กรัม/ลิตร	พรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545
wheat straw	น้ำตาลรีดิวซ์ 485 ± 22 มิลลิกรัม/กรัมสับสเตรท	<i>Escherichia coli</i> strain FBR5	6.5	35	118	เอทานอล 19 ± 1 กรัม/ลิตร	Saha B.C. และคณะ, 2005

วัตถุดิบ	น้ำตาลเริ่มต้น	ชนิดจุลินทรีย์	ภาวะที่ใช้ในการหมัก			ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
			ค่ากรด-เบส	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)		
corn stover	กลูโคส 30 กรัม/ลิตร	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5.5	30	24	เอทานอล 12.1 กรัม/ลิตร	Varga E. และคณะ, 2004
ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว	ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว น้ำตาลรีดิวซ์ 36.01, 44.68, 35.91 และ 33.31 กรัม/ลิตร	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5596	4.5	30	72	ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ลำไยอบแห้ง และ ฟางข้าวได้เอทานอล 20.76, 20.78, 24.43 และ 16.58 % (w/w) ตามลำดับ	งานวิจัยนี้

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การปรับสภาพด้วยกรด (dilute acid pretreatment)

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเป็นการกำจัดเฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่อยู่บริเวณรอบๆเซลลูโลส ลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลส และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ เฮมิเซลลูโลสซึ่งละลายออกมาจากการปรับสภาพของ ชานอ้อย ชังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง และฟางข้าวด้วยกรดซัลฟูริกประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) คือ ไสโลส กลูโคส อะราบิโนส และกาแลคโตส แต่ไม่พบแมนโนส บัจจัยซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพของการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบ คือ ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ ระยะเวลา และการใช้ความดันร่วมด้วย การปรับสภาพด้วยกรดที่ภาวะที่รุนแรงกว่าจะก่อให้เกิดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในระหว่างการหมัก เช่น เฟอร์ฟูรัล, ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล และกรดอะซีติก เป็นต้น ในปริมาณที่มากขึ้นตามไปด้วย Davis และคณะ (2005) รายงานว่า เมื่อใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร จะเกิดเฟอร์ฟูรัลสูงกว่าเมื่อใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.5 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร โดยเมื่อปรับสภาพ wheat stillage ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.0 %โดยปริมาตร ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5.5 ชั่วโมง ได้ปริมาณ กลูโคส, ไสโลส และอะราบิโนส สูงสุด เท่ากับ 7.4, 19.5 และ 11.8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยพบเฟอร์ฟูรัล 3.3 กรัม/ลิตร, กรดแลคติก 5.2 กรัม/ลิตร และกรดอะซีติก 2.5 กรัม/ลิตร ในงานวิจัยนี้ทำการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบ (10 กรัม%โดยปริมาตร) ด้วยการแช่ในสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์จากลำไยอบแห้งสูงสุดคือ 498.12 มิลลิกรัม/กรัม รองลงมา คือ ชังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว เท่ากับ 473.41, 402.43 และ 254.52 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เกิดขึ้นพบว่าลำไยอบแห้งให้กลูโคสสูงสุดคือ 159.38 มิลลิกรัม/กรัม รองลงมาคือ ชานอ้อย ชังข้าวโพด ฟางข้าว เท่ากับ 133.56, 75.29 และ 8.41 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ พบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลสูงสุดในสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ได้จากชานอ้อย ลำไยอบแห้ง ชังข้าวโพด และฟางข้าว เท่ากับ 1.522, 1.157, 0.812 และ 0.107 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลที่พบในชานอ้อยและชังข้าวโพดเป็นปริมาณที่มีผลยับยั้งกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ พบเฟอร์ฟูรัลสูงสุดในชังข้าวโพด รองลงมาคือ ชานอ้อย ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว ตามลำดับ แต่ในปริมาณที่ไม่มีผลยับยั้งกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ Saha และคณะ (2005) รายงานว่าการใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ย่อย

wheat straw (7.8 กรัม%โดยปริมาตร) ที่ 121 องศาเซลเซียส 60 นาที ไม่พบเฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล ในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้

ในรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการปรับสภาพขานอ้อย ชังข้าวโพดหรือลำไยอบแห้ง มากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยาต่อกับกรดเกิดเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เฟอร์ฟูรัล ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล เป็นต้น

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดก่อให้เกิดเฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล โดยเฟอร์ฟูรัลเกิดจากน้ำตาลเพนโตส (pentose) ทำปฏิกิริยากับกรด ส่วนไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลเกิดจากน้ำตาลเฮกโซส (hexose) ทำปฏิกิริยากับกรด ซึ่งสอดคล้องกับผลที่แสดงในตารางที่ 4.2 คือเมื่อปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.0 %โดยน้ำหนัก/ปริมาตร พบกลูโคสสูงสุดในลำไยอบแห้ง ขานอ้อย ชังข้าวโพด ฟางข้าว ตามลำดับ และพบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล สูงสุดจากลำไยอบแห้งด้วย รองลงมา คือ ขานอ้อย, ชังข้าวโพด และฟางข้าว พบไซโลสสูงสุดในชังข้าวโพด ขานอ้อย ฟางข้าว ลำไยอบแห้ง ตามลำดับ และพบเฟอร์ฟูรัลสูงสุดในชังข้าวโพด รองลงมาคือ ขานอ้อย, ฟางข้าว และลำไยอบแห้ง ตามลำดับ

2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

เนื่องจากเชื้อราในกลุ่ม *T. reesei* ผลิตเซลลูเลสที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ แต่มีปริมาณปีต้ากลูโคซิเดสค่อนข้างต่ำ ในขณะที่เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. ผลิตปีต้ากลูโคซิเดสสูง และการใช้เซลลูเลส จาก *T. reesei* ร่วมกับเซลลูเลสจาก *Aspergillus* sp. จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสสูงกว่าการใช้เซลลูเลสจากเชื้อราแต่ละชนิดแยกกัน (Drazic และ Nozinic, 1984) งานวิจัยใช้เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* ATCC 26921 ผสมกับเซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ของบริษัท Sigma chemical co., USA. ย่อยขานอ้อย 5 กรัม%โดยปริมาตร ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 5.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้แปรผันโดยตรงกับหน่วยเอนไซม์ของเอนโดกลูคาเนสที่เพิ่มขึ้น อัตราส่วนของเอนโดกลูคาเนสและปีต้ากลูโคซิเดสที่ลดลง และความเสถียรของเอนไซม์ เนื่องจากเซลลูเลสถูกยับยั้งโดยปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้น ปฏิกิริยาการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรก และปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นจะมีผลยับยั้งการทำงานของเซลลูเลส ระวีวรรณ แก้วกล้า (2538) รายงานว่าการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าวด้วยเซลลูเลส ที่ 55 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน 6 ชั่วโมงแรกของการย่อย

จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเริ่มช้าลงในหลังชั่วโมงที่ 6 ในอัตราคงที่ จนถึง ชั่วโมงที่ 16 และหลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าคงที่ และพรพรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ได้ทำการทดลองย่อยเซลลูโลสในแห้งามันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์ยี่ห้อ cellubrix ทำการย่อยที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.8 เป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่า ช่วงแรกของการย่อยจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน และเริ่มช้าลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากชั่วโมงที่ 24 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะไม่เพิ่มขึ้นมากนักไม่ว่าจะทำปฏิกิริยานานขึ้นเท่าใดก็ตาม การปรับสภาพด้วยกรดทำให้ลิกโนเซลลูโลสถูกย่อยด้วยเซลลูเลสได้ดียิ่งขึ้น กรดกำจัดเฮมิเซลลูโลส ลิกนินที่อยู่บริเวณรอบๆเซลลูโลส และลดบริเวณโครงสร้างที่มีการจัดเรียงตัวโมเลกุลเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูง (crystalline) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลลูเลส (McMillan, 1994) ในรูปที่ 4.26 แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพด้วยกรดมีความจำเป็นสำหรับการนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอล การวิจัยนี้พบว่าการปรับสภาพด้วยกรดทำให้ประสิทธิภาพการย่อยของเซลลูเลสสูงขึ้นตามลำดับดังนี้ ชั่งข้าวโพด ฟางข้าว ลำไย ออบแห้ง และชานอ้อย

ผลการทดลองใช้เซลลูเลสทางการค้า ยี่ห้อ CYTO[®]CL ผสมกับ GC 220 ของบริษัท Genecor, Finland เพื่อเพิ่มอัตราส่วนเอนโดกลูคาเนส:บีต้ากลูโคซิเดสเป็น 3:1 โดยใช้เอนไซม์ผสมจำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบ ทั้ง 4 ชนิด ที่ 50 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง พบว่า ใน 24 ชั่วโมงแรกของการย่อยชานอ้อย ชั่งข้าวโพด และฟางข้าว จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นไม่มาก และชั่วโมงที่ 72 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลดลงอาจเนื่องมาจากน้ำตาลรีดิวซ์ถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เฟอร์ฟูรัล เป็นต้น Davis และคณะ (2005) พบว่าระหว่างการย่อย wheat stillage ด้วยเซลลูเลส ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไฮโดรไลส 22 % จะถูกเปลี่ยนเป็นเฟอร์ฟูรัล เมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่ได้ก่อน และหลังการย่อยด้วยเซลลูเลส พบว่าปริมาณกลูโคสที่ได้เพิ่มขึ้นมากที่สุด ส่วนไฮโดรไลส กาแลคโตส อะราบินอส เพิ่มขึ้นไม่มากนัก

ตารางที่ 4.7 เป็นการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ พบว่า ภาวะที่ใช้ในการทดลอง เช่น ค่ากรด-เบส อุณหภูมิ มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่น เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Saha และคณะ (2005) ซึ่งใช้ปริมาณเซลลูเลสใกล้เคียงกัน โดย Saha และคณะ ได้ทำการย่อย wheat straw โดยใช้เซลลูเลสผสมระหว่างยี่ห้อ Celluclast และยี่ห้อ Novozyme อัตราส่วนของ

เอนโดกลูคาเนส:ปีต้ากลูโคซิเดสเท่ากับ 4:1 ที่ 45 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 485 ± 22 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งน้อยกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้โดยการย่อยที่ 50 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวิซ์จากชานอ้อย ชังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว 520.13, 693.51, 518.20 และ 466.19 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ

3. การหมักเอทานอล (ethanol fermentation)

เมื่อนำสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ทดสอบด้วย เซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO[®] CL และ GC 220 จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาปรับค่ากรด-เบสเป็น 4.5 เติมน้ำเกลือ 0.4 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร และเติมกลูโคส 10 กรัม/ลิตร หมักโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะการหมักแบบไร้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.29 ลำไยอบแห้ง และชังข้าวโพดมีปริมาณกลูโคสใกล้เคียงกันมาก แต่พบว่าได้เอทานอลจากลำไยอบแห้งสูงกว่าชังข้าวโพด ทั้งนี้เพราะในสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์ของชังข้าวโพด มีปริมาณกรดอะซีติกสูงกว่าสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์ของลำไยอบแห้งมาก ในทำนองเดียวกัน ชานอ้อยมีปริมาณกลูโคสต่ำกว่าในชังข้าวโพด แต่ปริมาณเอทานอลที่ได้ใกล้เคียงกันมาก อาจเป็นเพราะในสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์จากชังข้าวโพดมีปริมาณกรดอะซีติกและสารยับยั้งชนิดอื่น ๆ สูงกว่าในสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์จากชานอ้อย แม้ว่าในสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์จากชานอ้อยจะพบไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลสูงกว่าในสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์จากชังข้าวโพดก็ตาม ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลนอกจากขึ้นกับชนิดและปริมาณของน้ำตาลแล้วยังขึ้นกับชนิดและปริมาณของสารยับยั้ง รวมทั้งชนิดของวัตถุดิบที่ใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (ชานอ้อย ชังข้าวโพด ลำไยอบแห้ง และฟางข้าว) มี 3 ขั้นตอนหลัก คือ การปรับสภาพ การย่อยด้วยเซลลูเลส และการหมักเอทานอล

1. การปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

จากการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง พบว่ากรดสามารถเข้าไปละลายเฮมิเซลลูโลสออกมา และยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการทำงานของเซลลูเลสให้ดียิ่งขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของกรดในการปรับสภาพ ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น แต่ถ้าใช้ภาวะที่รุนแรงจนเกินไปน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะลดลง เนื่องจากน้ำตาลที่เกิดขึ้นอาจจะทำปฏิกิริยาต่อกับกรดเกิดเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เฟอร์ฟูรัล, ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล เป็นต้น ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก และพบว่าเมื่อใช้ความดันไอน้ำร่วมทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เพิ่มขึ้นด้วย

จากผลการทดลองพบว่า ภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 10 กรัมเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คือ นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาบด หรือตัด และร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดประมาณ 20 mesh นำไปย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที ซึ่งก่อให้เกิดสารเฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลในปริมาณที่ต่ำ

2. การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลส

การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหลังผ่านการปรับสภาพด้วยเซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO[®]CL และ GC 220 (เอนโดกลูคาเนส:ปีต้ากลูโคซิเดส=3:1) จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลพบว่าชังข้าวโพดจะให้กลูโคสสูงสุด คือ 13.39 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ ลำไยอบแห้ง 13.36 กรัม/ลิตร ชานอ้อย 11.68 กรัม/ลิตร และฟางข้าว 10.71 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

3. การหมักเอทานอล

เมื่อนำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเซลลูเลสผสมระหว่าง CYTO[®]CL และ GC 220 เป็นสับเซตรพในการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 และมีการเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิห้องในสภาวะการหมักแบบไร้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์จากลำไยอบแห้งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 24.43 %โดยน้ำหนัก รองลงมา คือ ชั่งข้าวโพด 20.78 %โดยน้ำหนัก ชานอ้อย 20.76 %โดยน้ำหนัก และ ฟางข้าว 16.58 %โดยน้ำหนัก ถึงแม้ว่าลำไยอบแห้งจะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดก็ตาม แต่มีข้อจำกัดเรื่องราคาและปริมาณเพราะการผลิตเอทานอลจากลำไยอบแห้งนั้นสำคัญและจำเป็นเฉพาะเมื่อเกิดภาวะลำไยอบแห้งล้นตลาดเท่านั้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทั้งชานอ้อย และชั่งข้าวโพดเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นของการผลิตเอทานอลเท่าเทียมกันเมื่อทำการปรับสภาพตัวกรด

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. การใช้เซลลูเลสทางการค้าในการย่อยทำให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลสูง ถ้าสามารถผลิตเซลลูเลสขึ้นมาใช้เองจะช่วยทำให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลลดลง อย่างไรก็ตามการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเซลลูเลส เซลลูเลสที่ผลิตประกอบด้วยอัตราส่วนเอนโดกลูคาเนส เอ็กโซกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดสที่เหมาะสม มีความเสถียรสูง ตลอดจนการสกัดและกระบวนการผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพนั้นยังต้องการศึกษาวิจัยและระยะเวลาอีกนาน

2. ในระหว่างการย่อยด้วยเซลลูเลสนั้น บีต้ากลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลยับยั้งต่อเนื่องทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนโดกลูคาเนส และเอ็กโซกลูคาเนส ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้าลงและหยุดในที่สุด ปริมาณกลูโคสที่ได้จึงค่อนข้างต่ำ วิธีการที่จะลดปัญหานี้อาจใช้กระบวนการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนวัตถุดิบเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส และหมักกลูโคสให้เป็นเอทานอลในขั้นตอนเดียวกัน ทำให้ลดปัญหาการยับยั้งการทำงานของเซลลูเลส เนื่องจากกลูโคสที่เป็นตัวยับยั้งถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยจุลินทรีย์จึงไม่มีการสะสม อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักควรเป็นสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ เนื่องจากอุณหภูมิการหมักจะได้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

3. ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเอนไซม์มีค่าต่ำ ดังนั้นการทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มามีความเข้มข้นสูงขึ้น เช่น โดยกระบวนการ ultrafiltration และ reverse osmosis จะทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้เพิ่มขึ้น

4. สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการย่อยด้วยเซลลูเลส พบว่ามีไซโลสสูงรองลงมาจากกลูโคส งานวิจัยนี้ใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5596 ซึ่งสามารถใช้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสในการหมักเอทานอล การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหมักทั้งกลูโคสและไซโลสเป็นเอทานอล เช่น recombinant *Zymomonas mobilis*, recombinant *Escherichia coli*, recombinant *S. cerevisiae* จะช่วยให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น และหากเป็นสายพันธุ์ที่ทนร้อนด้วย จะช่วยลดต้นทุนการผลิตของ cooling tower ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ อีกทั้งสามารถใช้ในกระบวนการผลิตแบบ SSF

5. การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ควรพิจารณาถึงการผลิตผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นๆ (co-products) เช่น organic acids, organic alcohol เป็นต้นร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยให้โรงงานสามารถลดต้นทุน และมีกำไรจากการผลิตมากขึ้น

6. ในการหมักเอทานอลจาก dilute acid enzymatic hydrolyzate ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงคือ ชนิดและปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ชนิดและปริมาณสารยับยั้ง และอัตราส่วนของคาร์บอน:ไนโตรเจน (C:N) เพื่อให้การหมักมีภาวะที่เหมาะสมที่สุด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- คณะกรรมการมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทนเอทานอล และไบโอดีเซล. 175 หน้า.
- เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2544. การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังแบบครั้งคราวโดยการเติมสับสเตรทขึ้นกับพีเอช. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 216 หน้า.
- พรพนวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 137 หน้า.
- ระวีวรรณ แก้วกล้า. 2537. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 171 หน้า.
- วรารุณี ครูสง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. คณะเทคโนโลยีชีวการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 163 หน้า.
- วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2530. การผลิตไซโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยวิธีเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี. กรุงเทพฯ.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2536. ยีสต์และชีวเคมีของการหมักเอธิลแอลกอฮอล์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 1-16.

ภาษาอังกฤษ

- Alves, L.A., Felipe, M.G.A., Silva, J.B., Silva, S.S., and Prata, A.M.R. 1998. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-72, 89-98.
- Cadoche, L., and Gerardo, P.L. 1989. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biological wastes.* 30: 153-157.

- Ciftci, T., Constantinides A., and Wang S.S. 1983. Optimization of conditions and cell feeding procedures for alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2007-2023.
- Converti, A., Perego, P., Lodi, A., Pasisi, F., and Borghi, M.D. 1985. Kinetic study of *Saccharomyces* Strains: Performance at High sugar concentration. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1108-1114.
- Davis, L., Jeon, Y.J., Svenson, C., Rogers, Peter., Perce J., and Peiris P. 2005. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. *Biomass Bioenergy.* 29: 49-59.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern Mycology*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Delgenes, J.P., Moletta, R., and Navarro, J.M. 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.* 19: 220-225.
- Donald, V., Judith, G.V., and Charlotte, W.P. 2002. Fundamentals of Biochemistry 2002. John Wiley & Sons Inc., New Jersey. 64 p.
- Drazic, M., and Nozinic, R. 1984. Saccharification of corn cobs using mixed enzyme system. *Third European Congress on Biotechnology.* 87-91, Germany: Verlag Chemic.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulose activities (Recommendations of Commission on Biotechnology IUPAC). *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268.
- Knauf, M., and Moniruzzaman, M. 2004. Lignoellulosic biomass processing: A perspective. *International sugar journal.* 106: 147-150.
- Krishna, S.H., Reddy, T.J., and Chowdary G.V. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Biores Technol.* 77: 193-196.
- Lee, Jeewon. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56: 1-24.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- Luong, F.H.T. 1985. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation: On the inhibitory of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 27(3): 280-285.
- Mandels, M. 1985. Application of cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 414-416.
- 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.
- Milller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. *Anal chem.* 31: 426-428.
- Murphy, J.D., and McCarthy, K. 2005. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied energy.* 82: 148-166.
- National Renewable Energy Laboratory. 2000. The DOE bioethanol pilot plant [Online]. Available from: www.ott.doe.gov/biofuels. [2006, February]
- Nigam, J.N. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. Biotechnol.* 87: 17-27.
- Novozymes and BBI international. 2005. Fuel ethanol: A technological evolution [Online]. Available from: www.bbibiobiofuels.com. [2005, December]
- Palmqvist, E., and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Biores Technol.* 74: 25-33.
- Philippidis, G.P., Smith, T.K., and Wyman, C.E. 1993. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol Bioeng.* 41: 846-853.
- Philippidis, G.P. 1996. Cellulose bioconversion technology. In: Wyman, C.E. (Ed.), Handbook on Bioethanol: Production and utilization. Taylor & Francis, Washington, DC. P. 253-285.
- 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.
- Saita, M., and Slaughter, J.C. 1984. Acceleration of the rate of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of ammonium ion. *Enzymol. Microb. Technol.* 6: 395-398.

- Somogyi, M.J. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Sternberg, D., Vijaykumar, P., and Reese, E.T. 1977. β -Glucosidase : microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.* 23: 139-147.
- Sun, Y., and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores Technol.* 83: 1-11.
- Sun, Y., and Cheng, J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Biores Technol.* 96: 1599-1606.
- 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.
- Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2000-2001. Method for determination of alpha- beta and gamma- cellulose in pulp technical association of pulp and paper industry.
- The Columbia Electronic Encyclopedia. 2006. Furfural [Online]. Available from: <http://www.infoplease.com/ce6/sci/A0819898.html>. [2006, April]
- U.S. department of energy. 2002. Hand book for handling, storing, and dispensing E85. Washington DC USA.
- U.S. department of energy, office of energy efficiency and renewable energy, office of transportation technologies. 2004. Process description [Online]. Available from: http://www.eere.energy.gov/biomass/sugar_platform.html [2004, March].
- Varga, E., Réczey, K., and Zacchi, G. 2004. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Humana Press.* 114: 509-523.
- Vlasenko, E.Yu., Ding, H., Labavitch, J.M., and Shoemaker, S.P. 1996. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Biores Technol.* 59: 109-119.
- Weil, J., Westgate, P., Kohlmann, K., and Ladisch, R.M. 1994. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 1002-1004.
- Wen, Z., Liao, W., and Chen, S. 2005. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Proc Biochem.* 40: 3087-3094.
- Wyman, C. 1999. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annu Rev Energy Environ.* 24: 189-226.

- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D.J., and Saddler, J.N. 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied biochem and biotech.* 115: 1115-1126.
- Yáñez, R., Alonso, J.L., and Parajó, J.C. 2004. Production of hemicellulosic sugars and glucose from residual corrugated cardboard. *Proc Biochem.* 39: 1543-1551.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสใช้วิธีใน TAPPI 203 om-88

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 17.5 %

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] 175 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.5 นอร์มัล

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต [K₂Cr₂O₇] 24.52 กรัมในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

3. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต มาตรฐานเข้มข้น 0.100 นอร์มัล

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 4.904 กรัมในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

4. สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตเข้มข้น 0.100 นอร์มัล

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต [Fe(NH₄)(SO₄).6H₂O] 40.5 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการหาค่าเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้ โดยนำไปไตเตรทกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน

การหาความเข้มข้นที่แน่นอน ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร ลงในขวด โดยเอียงขวดทำมุมประมาณ 45 องศา กับพื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หยดอินดิเคเตอร์ 2 ถึง 4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต ที่ต้องการทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

การคำนวณ

$$N_2V_2 = N_1V_1$$

เมื่อ	N_1	=	ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต, นอร์มัล
	N_2	=	ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, นอร์มัล
	V_1	=	ปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต, มิลลิลิตร
	V_2	=	ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, มิลลิลิตร

5. สารละลายอินดิเคเตอร์ (indicator)

ละลาย 1,10-ฟีนาโนโทรลีนโมโนไฮเดรต $[C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O]$ 1.5 กรัม กับเฟอร์รัสซัลเฟต $[FeSO_4 \cdot H_2O]$ 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 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

- ใส่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 1.5 กรัม น้ำหนักแห้ง ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร บันทึกน้ำหนักไว้ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % 100 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟิวส์ จับเวลาทันทีที่เติมสารละลาย นำไปกวนบนเครื่องกวนสารเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลังครบเวลากวนให้เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
- กรองสารละลายเพื่อแยกตะกอนออกโดยทิ้งสารละลายใส 10 มิลลิลิตรแรกของการกรอง เก็บสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ 100 มิลลิลิตร
- 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 องศา กับพื้น เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

- 3.3. หยดอินดิเคเตอร์ 2–4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนกระทั่งสารละลาย เปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้มเป็นสีน้ำตาลอมม่วง บันทึกปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต
- 3.4. เตรียมสารละลายแบลนด์ (blank) โดยปิเปตโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % 5 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำวิธีเดียวกับสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.1-3.3

3.5. การคำนวณ

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

เมื่อ	V_1	=	ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง, มิลลิลิตร
	V_2	=	ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายแบลนด์, มิลลิลิตร
	N	=	ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, นอร์มัล
	A	=	ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้, มิลลิลิตร
	W	=	น้ำหนักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแห้ง, กรัม
	6.85	=	มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

4. การวิเคราะห์ปริมาณ แกมมา-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. การคำนวณ

$$\text{แกมมา-เซลลูโลส} = [6.85 (V_4 - V_3) \times N \times 20 / (A \times W)]$$

เมื่อ	V_3	=	ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง, มิลลิลิตร
	V_4	=	ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายแบลนด์, มิลลิลิตร

5. การวิเคราะห์ปริมาณ บีต้า-เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

การคำนวณ

$$\text{บีต้า-เซลลูโลส} = 100 - (\text{แอลฟา-เซลลูโลส} + \text{แกมมา-เซลลูโลส})$$

2. การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เซลลูโลส

การเตรียมสารเคมี

1. ดีเอ็นเอส รีเอเจนต์ (DNS reagent)

ชั่งสารไดไนโตรซาลิไซลิก [$C_7H_4N_2O_7$] 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบนเครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (32 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วค่อยๆเติม โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตต [$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$] 600 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 2000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชา อุณหภูมิห้อง

2. 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8

ชั่งโซเดียมซิเตรต 14.71 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติม 1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก 75 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 4.8 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

3. 0.025 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.5

ชั่งโซเดียมซิเตรต 7.35 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติม 1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก 37.5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 4.8 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) ความเข้มข้น 2 %

ละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 2 กรัม ด้วย 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายซาลิซิน (D-salicin) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลายซาลิซิน [$C_{13}H_{18}O_7$] 0.4 กรัม ด้วย 0.025 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ด้วยวิธี Carboxymethyl Cellulase Assay (Ghose,1987)

1. เติมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเข้มข้น 2 % 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส อยู่ผสมให้เข้ากัน
3. นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
4. เติมสารละลายดีเอ็นเอเอส รีเอนเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นนาน 5 นาที
5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เป็นหลอดควบคุม (blank) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

การวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส (Sternberg,1976)

1. เติมสารละลายซาลิซินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน 0.025 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีซาลิซิน อยู่ผสมให้เข้ากัน
3. นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
4. เติมสารละลายดีเอ็นเอเอสรีเอนเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นนาน 5 นาที
5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.025 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นหลอดควบคุม (blank) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

การคำนวณหาค่า unit of enzyme ตามวิธีของ The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

$$\begin{aligned} 1 \text{ หน่วยของเอนไซม์} &= 1 \text{ ไมโครโมล ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที} \\ &= 1 \text{ ไมโครโมล ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที} \\ &= 0.180 \text{ มิลลิกรัม ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที} \end{aligned}$$

ค่าแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคซิเดส จะได้ว่า

$$\begin{aligned} \text{ถ้า } 0.180 \text{ มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาทีมีค่า} &= 1 \text{ หน่วย} \\ 1.000 \text{ มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 30 นาทีมีค่า} &= \frac{1 \text{ หน่วย}}{0.180 \times 30} \\ &= 0.185 \text{ หน่วย} \end{aligned}$$

$$\text{หากปลดปล่อยกลูโคส } X \text{ มิลลิกรัม ใน 30 นาทีมีค่า} = \frac{(X) \times 0.185 \text{ หน่วย}}{0.5}$$

$$\text{หรือ อาจคิดเป็น} = \frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส} \times 0.185 \text{ หน่วย/มิลลิลิตร}}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}}$$

การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายดีเอ็นเอเอส รีเอนเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

การวิเคราะห์หาค่าความเสถียรของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและบีต้ากลูโคซิเดส

เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในเอฟเพนดอร์ฟ (eppendorf) นำไปบ่มอุณหภูมิที่ต้องการหา
ค่าความเสถียรของเอนไซม์ เก็บตัวอย่างเอนไซม์ที่เวลา 0, 0.5, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ชั่วโมง
นำไปวิเคราะห์หาแอกทิวิตีตามวิธีข้างต้น

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต [Na ₂ CO ₃]	20	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH]	4	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทต [C ₄ H ₄ KNaO ₆ ·4H ₂ O]	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
2. สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

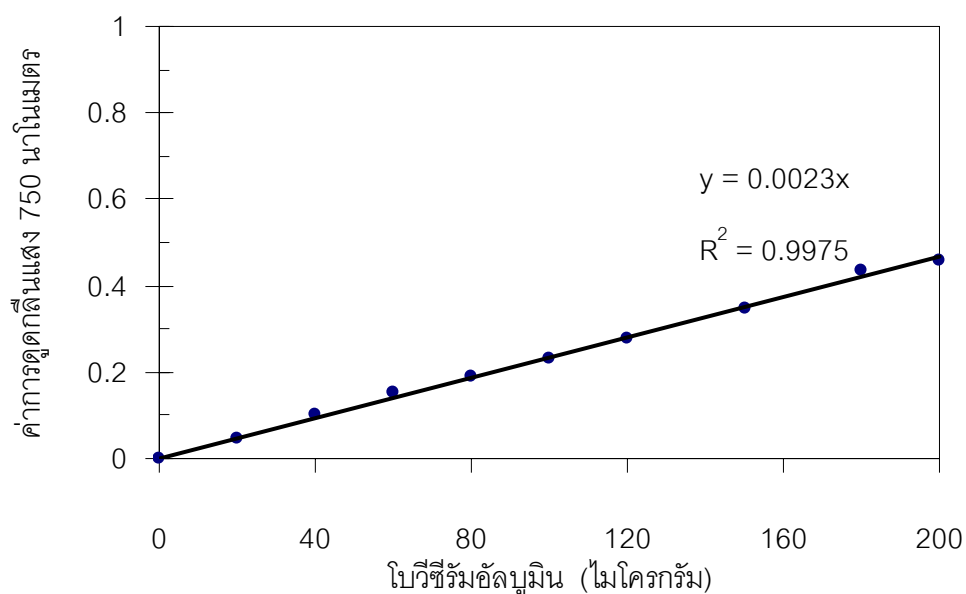
คอปเปอร์ซัลเฟต [CuSO ₄ ·5H ₂ O]	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร
3. สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

สารละลาย Lowry A	50	ส่วน
สารละลาย Lowry B	1	ส่วน
4. สารละลาย Lowry D ประกอบด้วย

โฟลีน-ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin-phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน
5. การเตรียมโบวีซีรั่มอัลบูมินมาตรฐาน(Bovine serum albumin) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
โดยละลายโบวีซีรั่มอัลบูมิน 20 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร
เจือจางสารละลายที่ได้ให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180 และ
200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. นำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีปริมาณโปรตีนเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ
2. เติมสารละลาย Lowry C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
3. เติมสารละลาย Lowry D ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
4. กราฟมาตรฐานใช้โบวีซีรัมอัลบูมิน(Bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโบวีซีรัมอัลบูมิน (ไมโครกรัม) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS method (Miller, 1959)

การเตรียมสารเคมี

1. ดีเอ็นเอส รีเอเจนต์

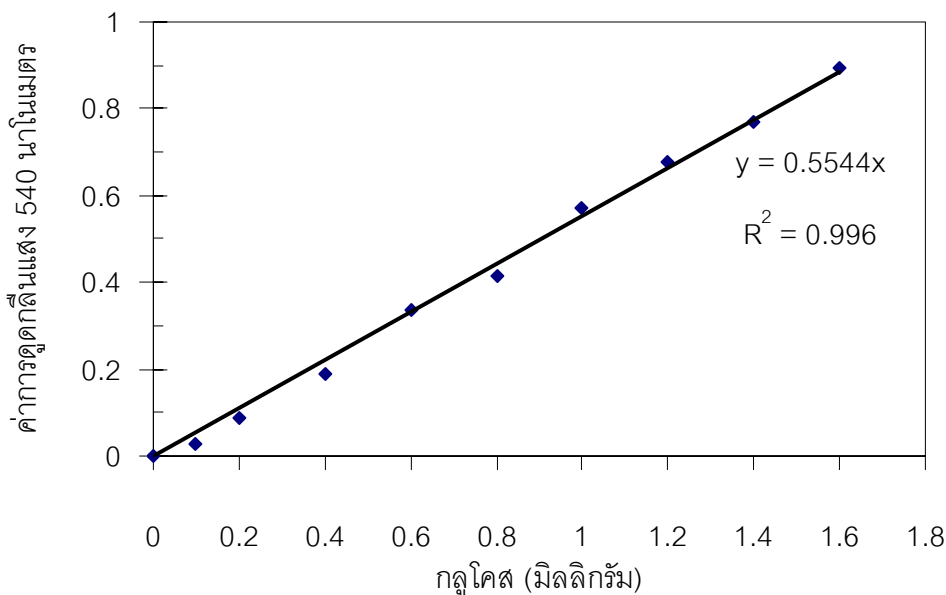
ชั่งสารไดโนโตรซาลิไซลิก 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบนเครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (32 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วค่อยๆเติมโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตต 600 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 2000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชา อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายกลูโคส 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายที่ได้ให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เติมสารละลายดีเอ็นเอส รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส (สารละลาย blank ใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในสารละลายกลูโคสมาตรฐาน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ทำการเจือจางตัวอย่างในกรณีที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 1 มิลลิตรต่อมิลลิตร

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ค่า O.D.}_{540} \times \text{dilution}}{\text{slope}}$$

5. วิธีวิเคราะห์น้ำตาล (กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กาแลคโตส แมนโนส) สารยับยั้ง (เฟอร์ฟูรัล ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล กรดอะซิติก กรดแลคติก) และเอทานอล

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Agilent Technology Ltd., USA รุ่น Agilent®1100 Series ซึ่งประกอบด้วย Quaternary pump, on-line degasser, Autoinjector, Column Thermostat และเครื่องตรวจวัดชนิด Refractive index ประมวลผลข้อมูลโดย ChemStation Software

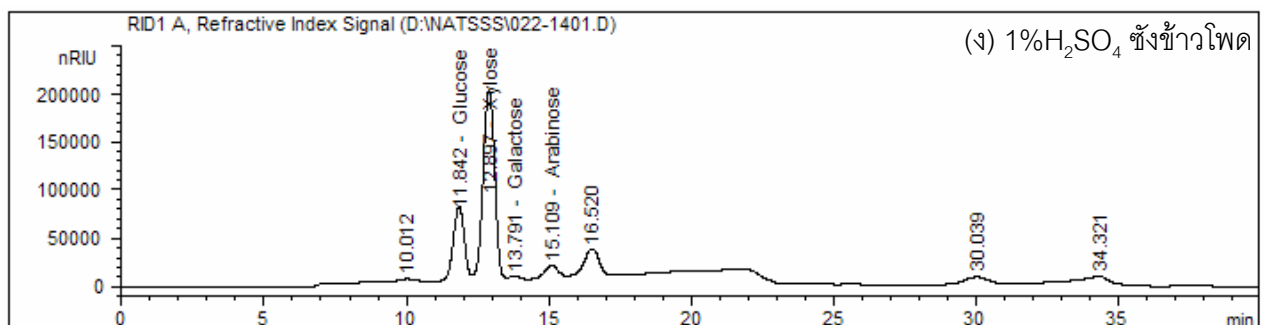
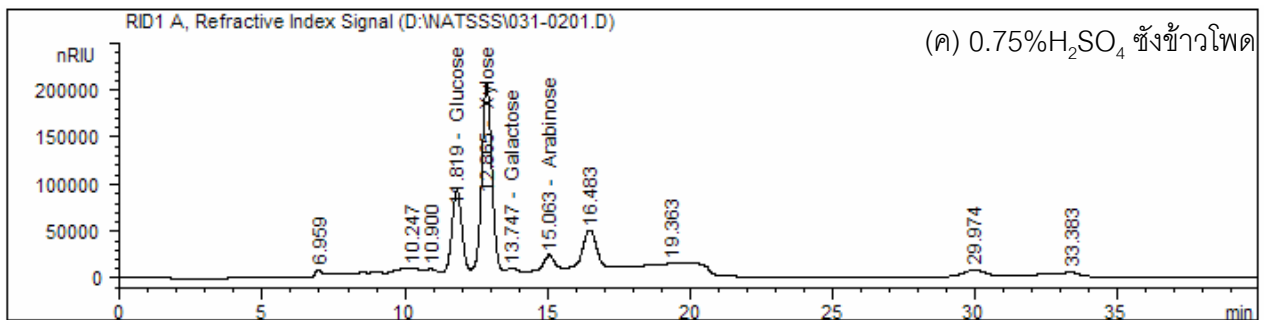
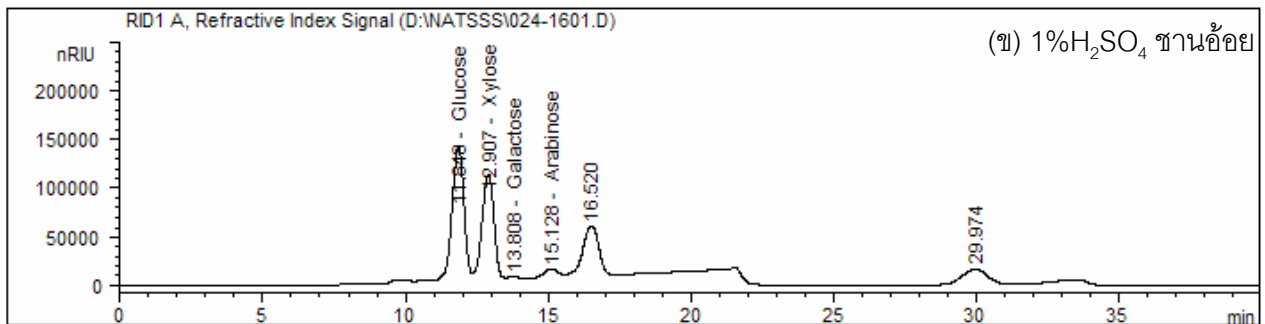
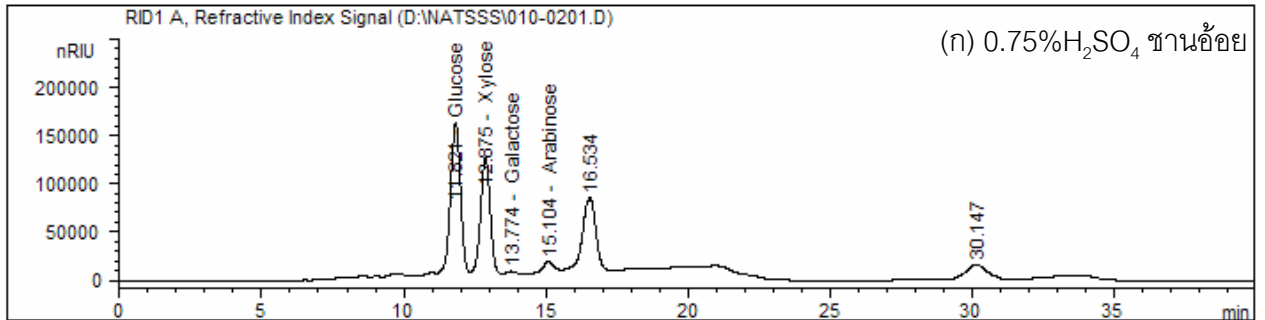
สภาวะการวิเคราะห์น้ำตาล

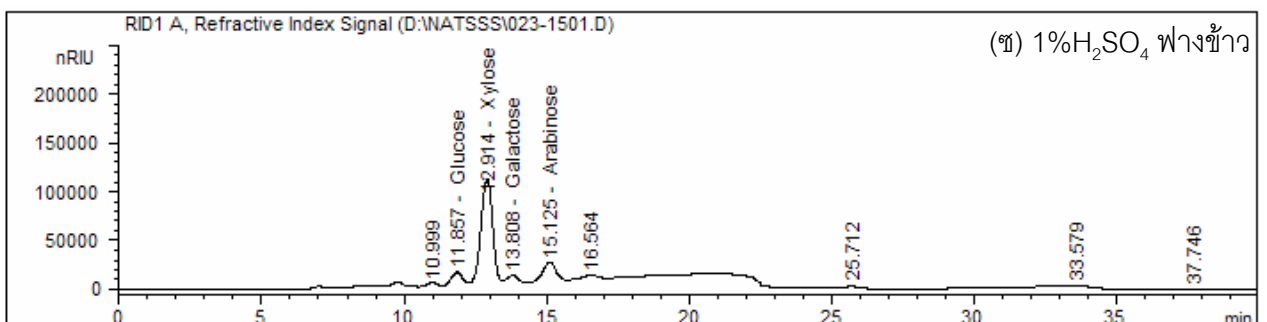
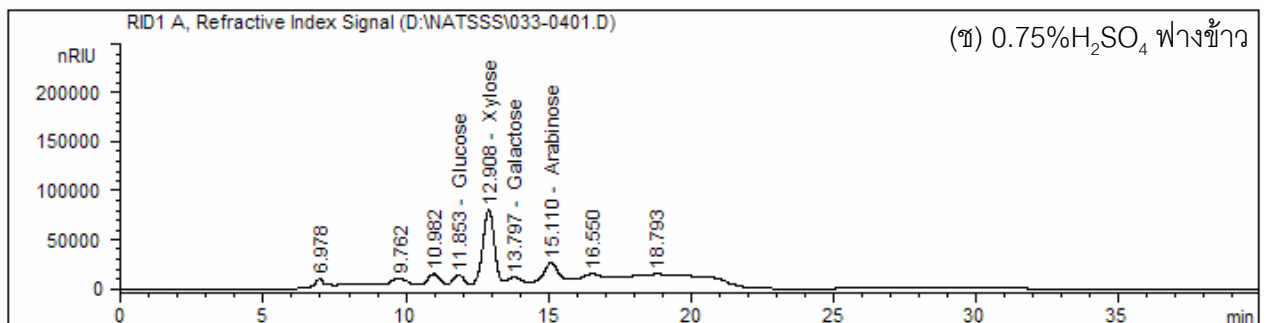
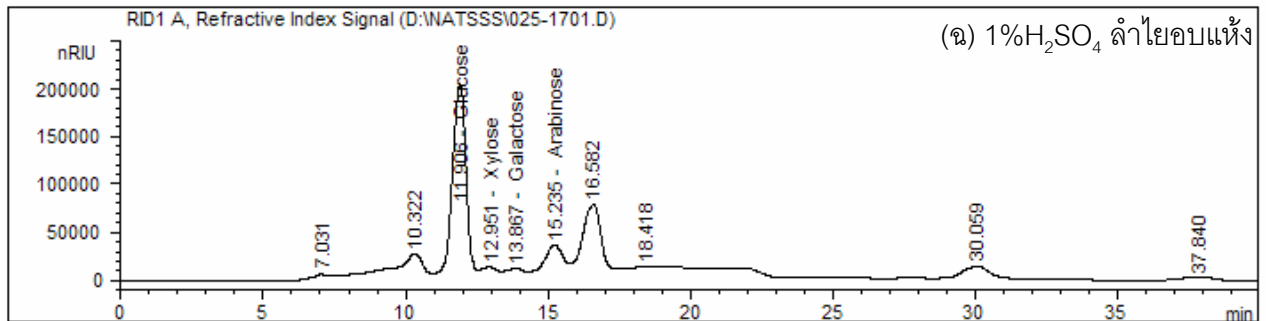
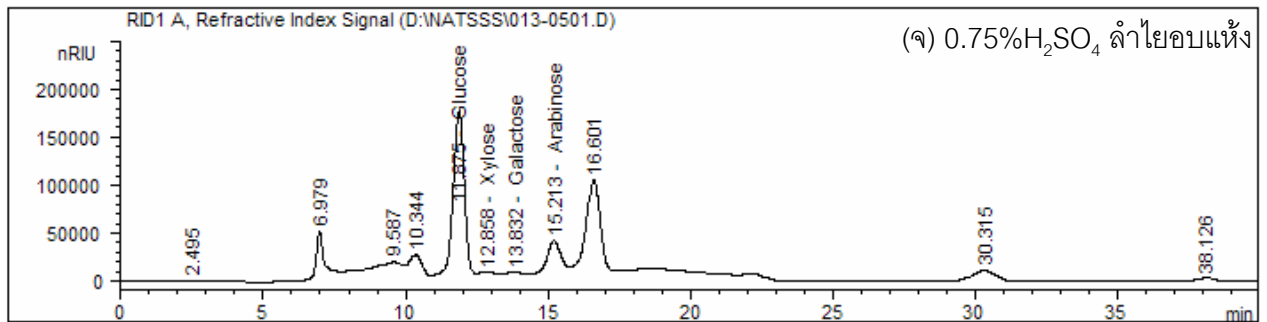
คอลัมน์ :	Aminex column HPX-87P (300 x 7.8) (Bio-rad, Richmond, CA) และ Carbo-P micro-guard cartridge
เฟสเคลื่อนที่ :	น้ำ
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ :	0.6 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิคอลัมน์ :	80 องศาเซลเซียส
ปริมาตรตัวอย่าง :	20 ไมโครลิตร

สภาวะการวิเคราะห์กรดอินทรีย์, เอทานอลม HMF และ Furfural

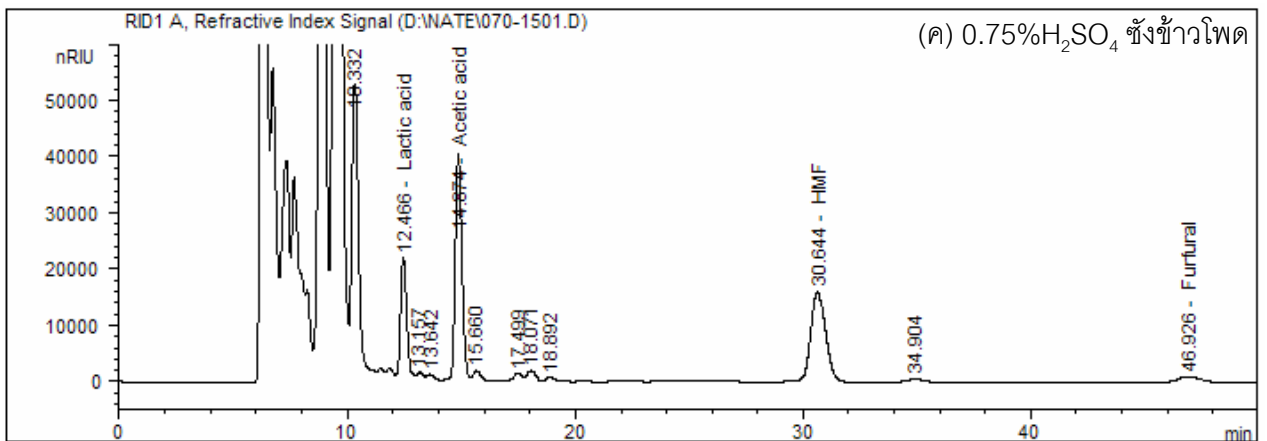
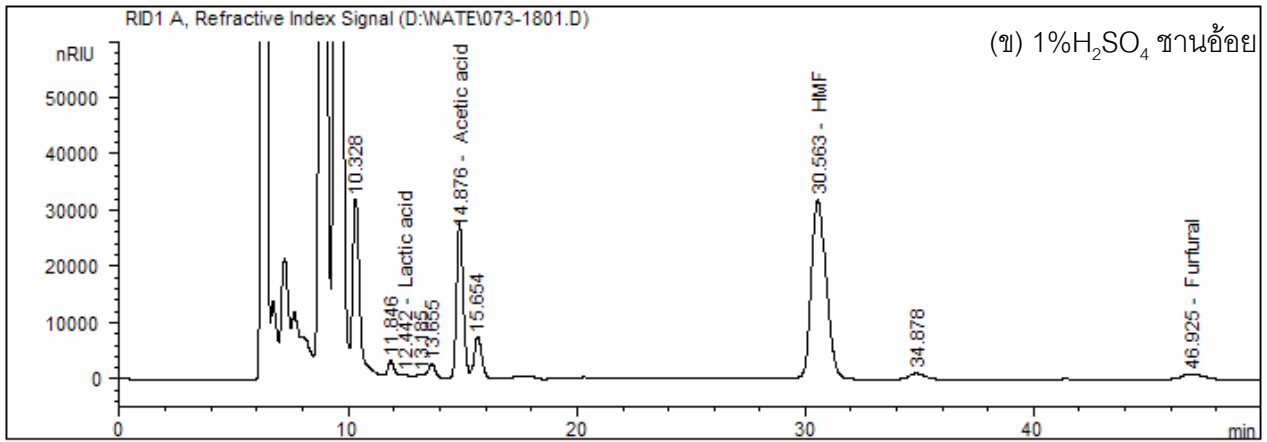
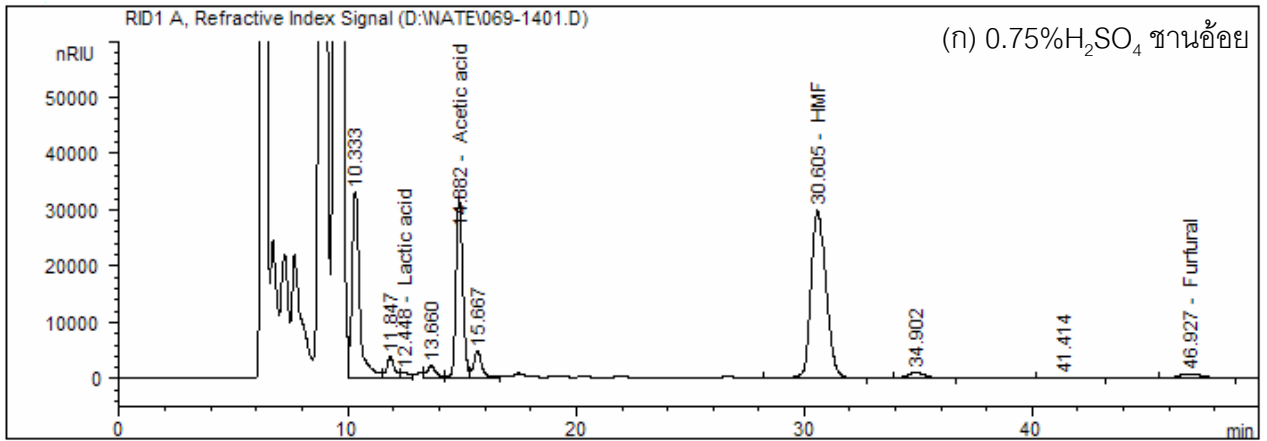
คอลัมน์ :	Aminex column HPX-87H (300 x 7.8) (Bio-rad, Richmond, CA) และ Cation H micro-guard cartridge
เฟสเคลื่อนที่ :	กรดซัลฟิวริก 0.01 นอร์มัล
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ :	0.6 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิคอลัมน์ :	55 องศาเซลเซียส
ปริมาตรตัวอย่าง :	50 ไมโครลิตร

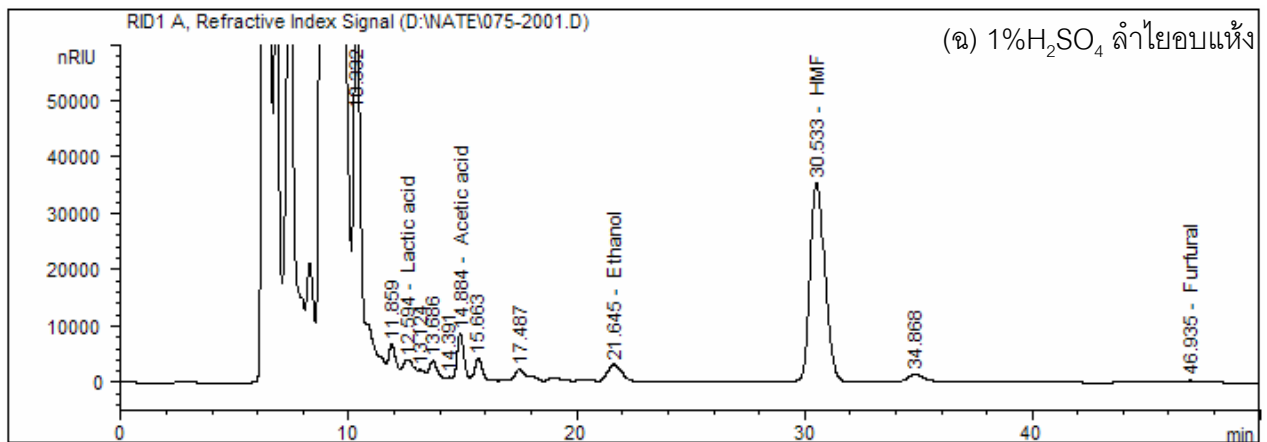
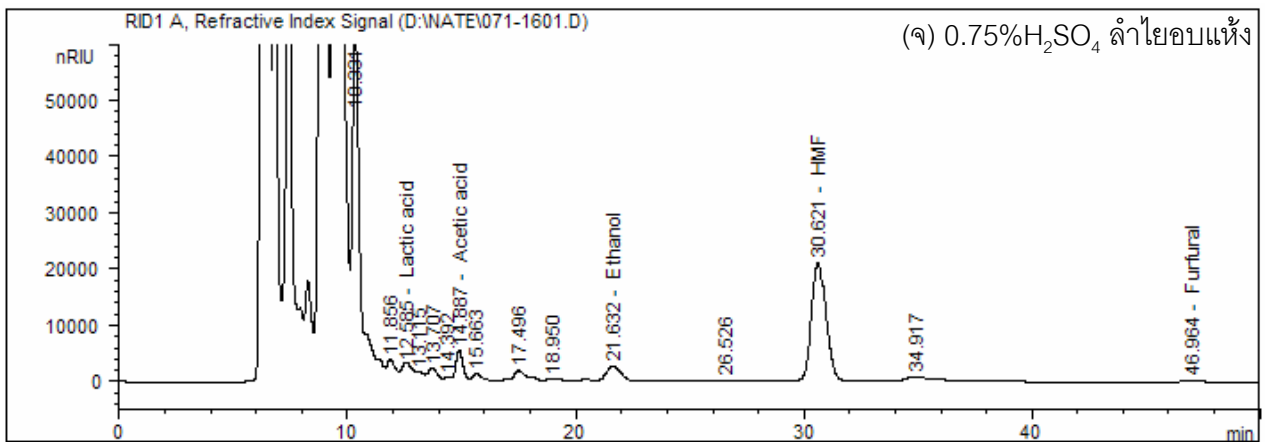
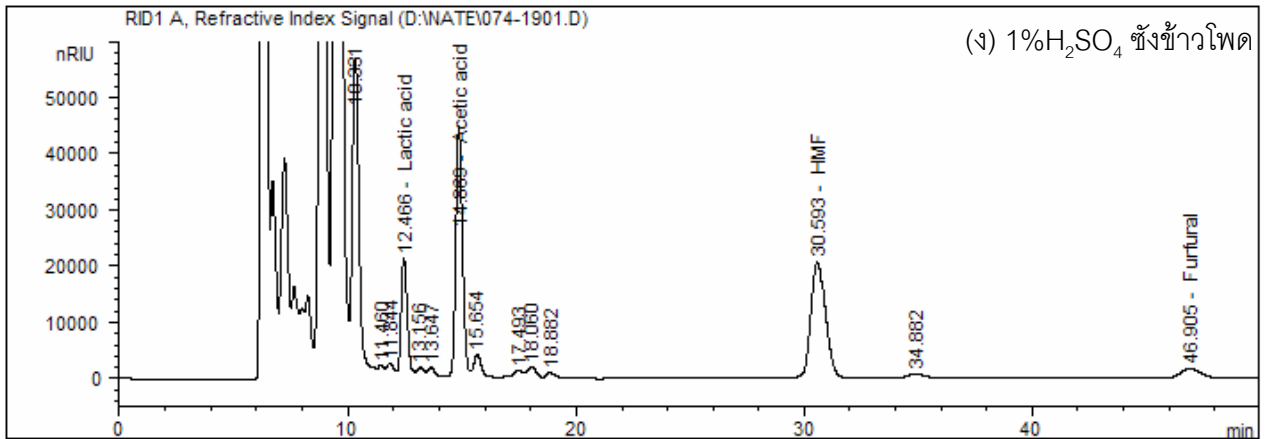
ภาคผนวก ข

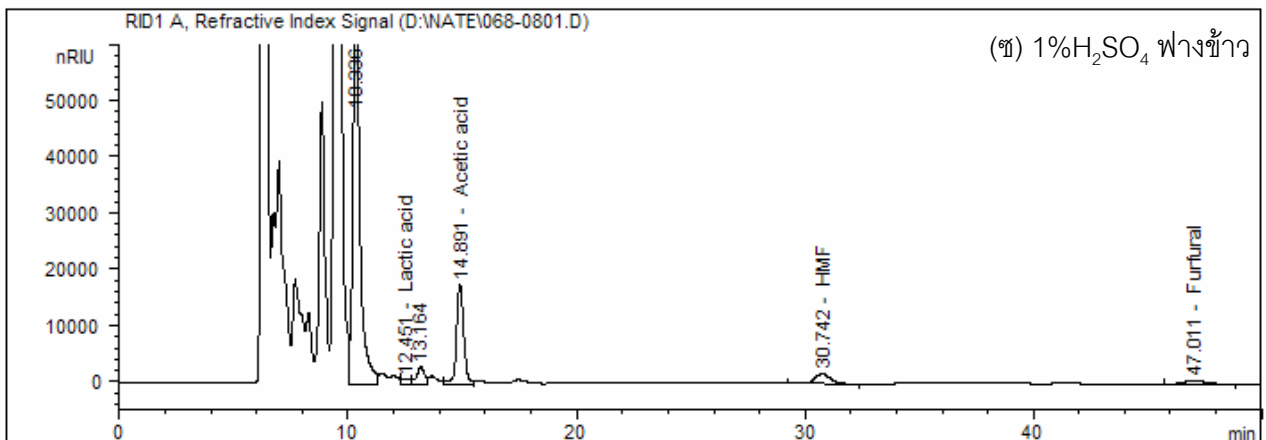
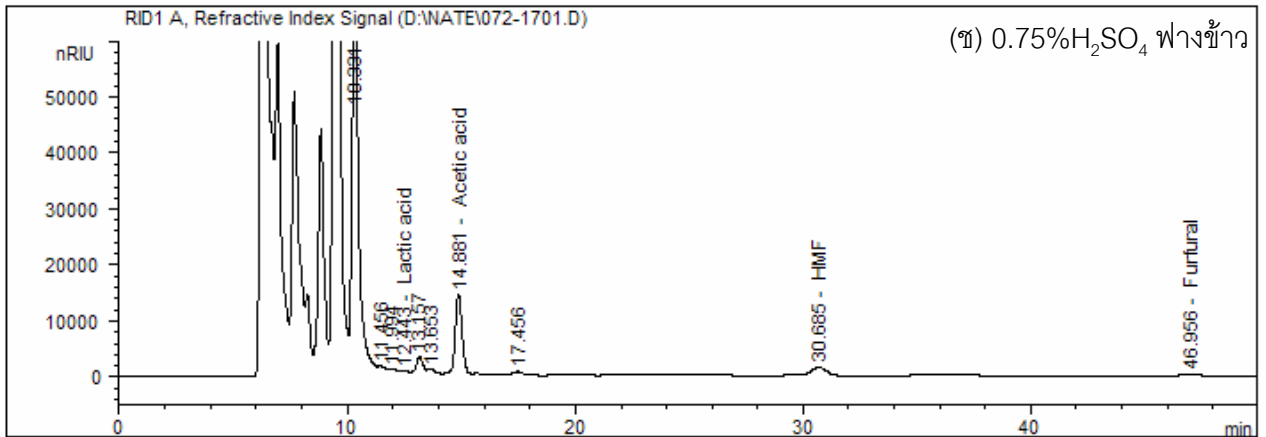




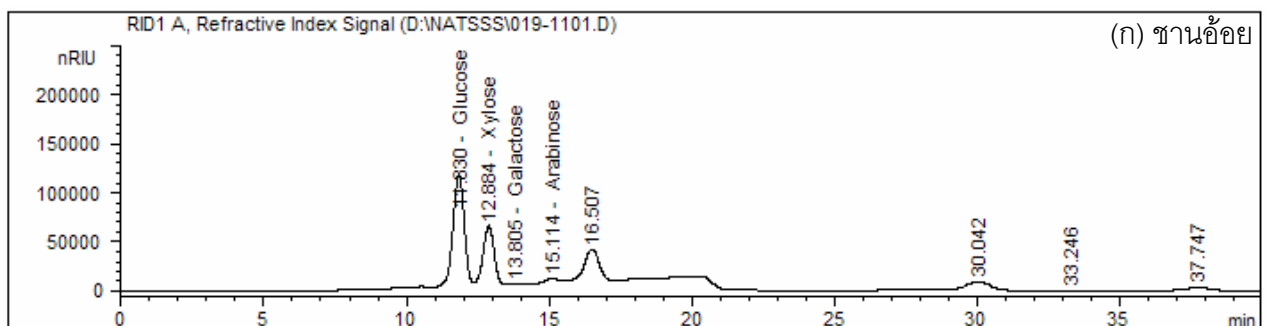
รูปที่ ข.1 โครมาโตแกรมของน้ำตาล (กลูโคส ไคโลส กาแลคโตส อะราบินอส) ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที

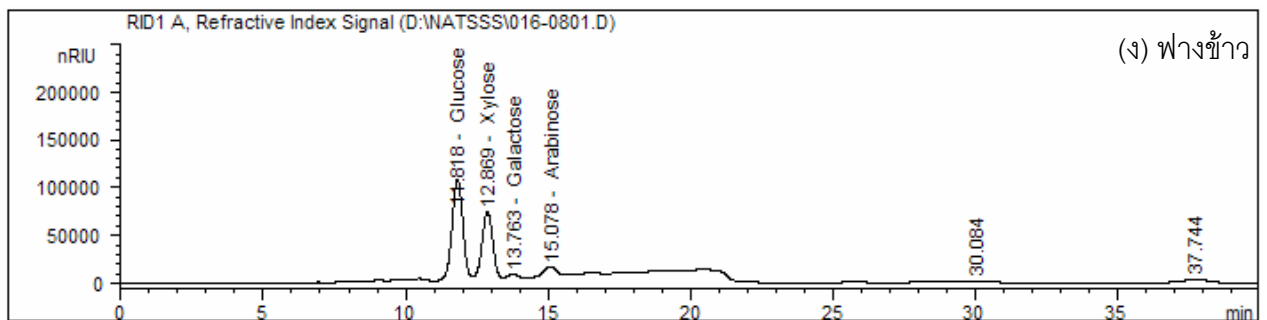
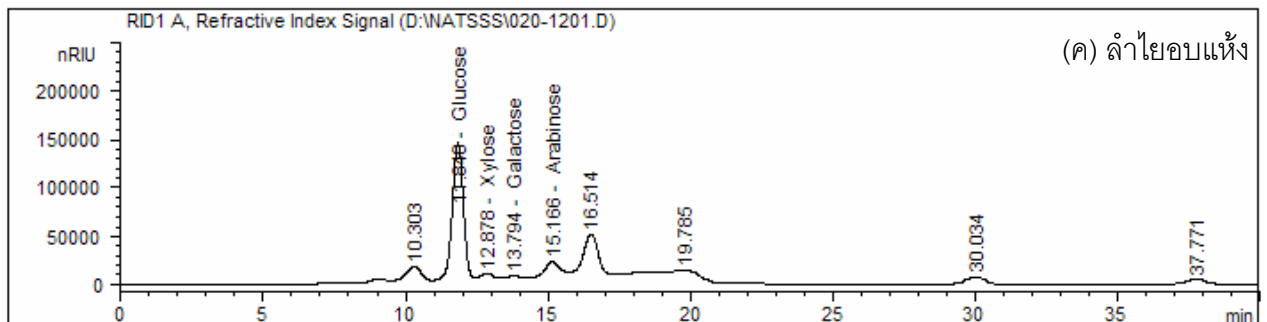
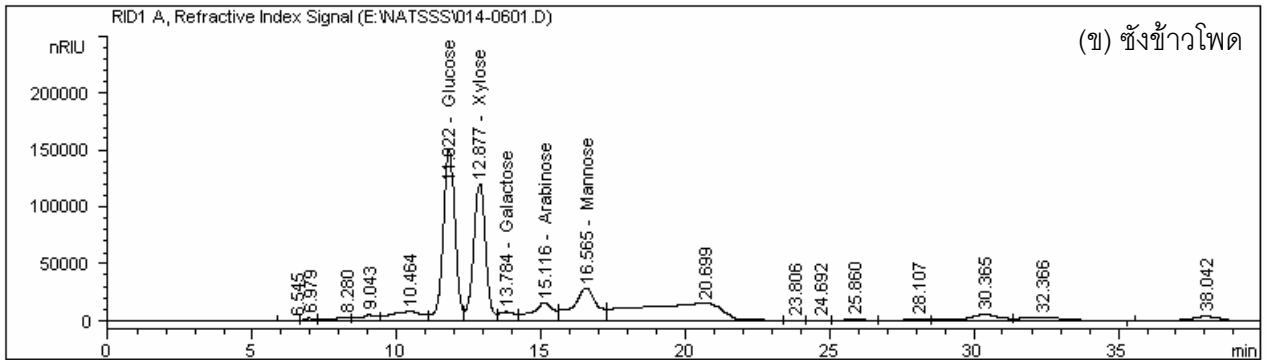




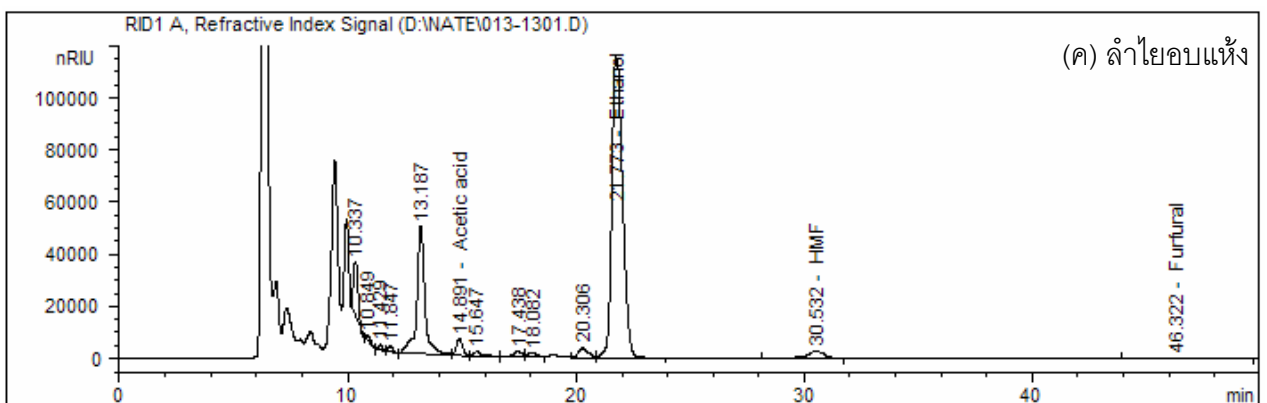
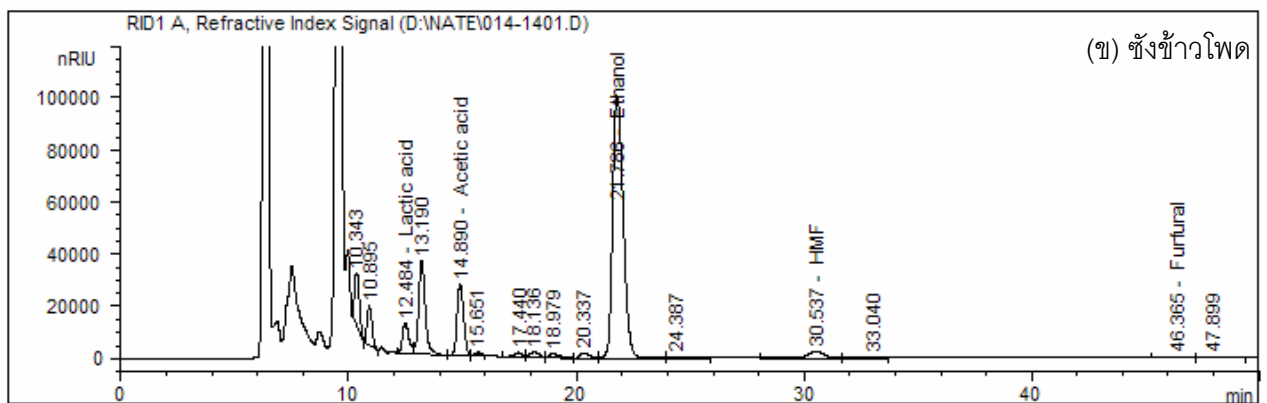
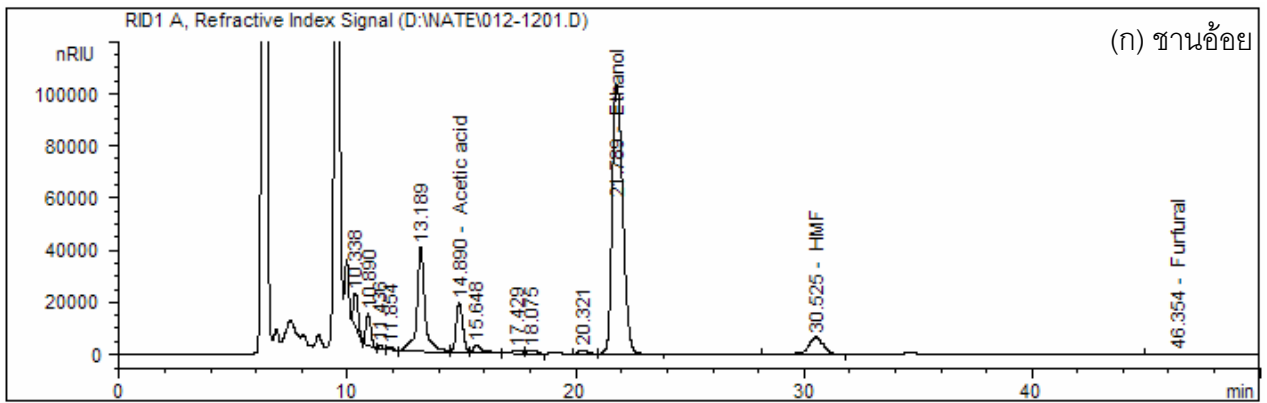


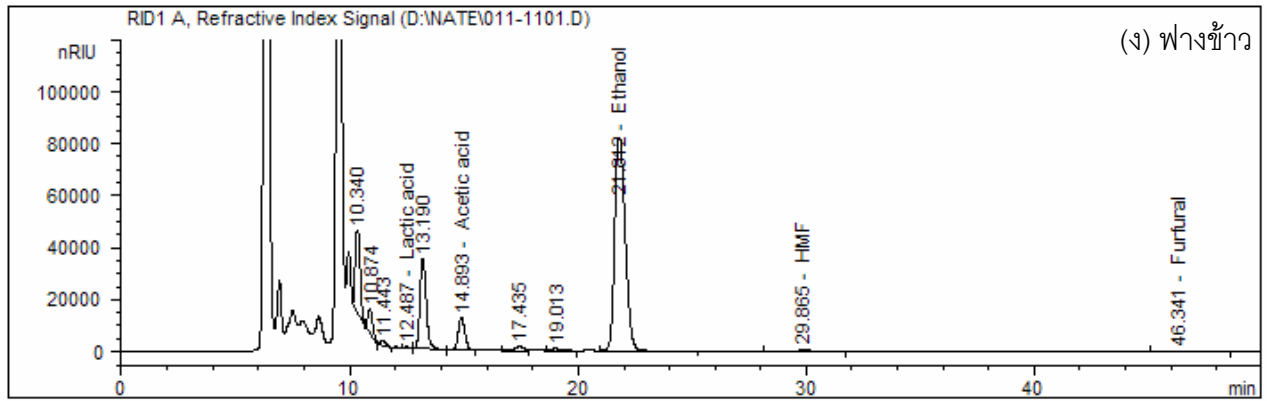
รูปที่ ข.2 โครมาโตแกรมของสารยับยั้งบางชนิด (เฟอร์ฟูรัล ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล กรดอะซีติก กรดแลคติก) ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที





รูปที่ ข.3 โครมาโตแกรมของน้ำตาล (กลูโคส ไซโลส กาแลคโตส อะราบิโนส) ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 0.75 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 60 นาที และย่อยด้วยเซลล์ผสมระหว่างยี่ห้อ CYTO[®] CL และ GC 220 (เอนโดกลูคาเนส:ปีต้ากลูโคซิเดส=3:1) จำนวน 81 หน่วยเอนไซม์ (เอนโดกลูคาเนส) ที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง





รูปที่ ข.4 โครมาโตแกรมของเอทานอล ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีการเติมกลูโคสหมักโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจรรุวรรณ สัมพันธ์วิช เกิดวันที่ 19 พฤษภาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2546 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตที่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เมื่อปี พ.ศ. 2547