


การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของแอลฟาเซลลูโลสจากพืชไปเป็นเอทานอล



นางสาว ศรัญญา ยิ้มย่อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1333-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOCONVERSION OF ALPHA CELLULOSE FROM WEEDS INTO ETHANOL



Miss Sarunya Yimyong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany

Department of Botany

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2004

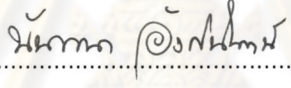
ISBN 974-53-1333-5

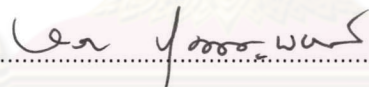
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงเชิงชีวภาพของแอลฟาเซลลูโลสจากวัชพืชไปเป็นเอทานอล
โดย นางสาว ศรัญญา ยิ้มย่อง
สาขาวิชา พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษา แสงวัฒนาโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

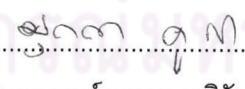

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษา แสงวัฒนาโรจน์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

ศรัณญา ยิ้มย่อง: การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของแอลฟาเซลลูโลสจากวัชพืชไปเป็นเอทานอล
(BIOCONVERSION OF ALPHA CELLULOSE FROM WEEDS INTO ETHANOL)

อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร.อุษา แสง
วัฒนาโรจน์; 91 หน้า. ISBN: 974-53-1333-5

การใช้ชีวมวลของวัชพืชในเขตร้อน ได้แก่ กัง (*Thysanolaena maxima*) แคม (*Phragmites karka*) ฐปฤษา (*Typha angustifolia*) เล้า (*Saccharum spontaneum*) ลำเอียง (*Coix aquatica*) หญ้าขจรจบดอกเล็ก (*Pennisetum polystachyon*) หญ้าคา (*Imperata cylindrica*) และหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) เป็นวัตถุดิบในการผลิต เป็นเยื่อเซลลูโลสละเอียด โดยอาศัยขั้นตอนการย่อยด้วยกรดและด่าง ซึ่งวัชพืชทั้งหมดมีปริมาณเซลลูโลสอยู่ในช่วงร้อยละ 32.1 - 42.5 พบว่า เยื่อเซลลูโลสละเอียดจากกัง มีปริมาณแอลฟา-เซลลูโลสและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงสุด เมื่อนำเยื่อเซลลูโลสละเอียดจากวัชพืชแต่ละชนิด ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเซลลูเลสด้วยเชื้อรา *Tricoderma reesei* Rut C-30 พบว่ากิจกรรมของเซลลูเลสดีที่สุด เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากเยื่อเซลลูโลสละเอียดของเล้า มีค่าเอกโซกลูคาเนส 2.349 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และเบต้า-กลูโคซิเดส 0.267 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ส่วนเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากเยื่อเซลลูโลสละเอียดของหญ้าเนเปียร์ พบว่า ให้ค่าเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ 34.906 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน จึงนำเซลลูเลสทั้งสองแหล่งไปใช้ เพื่อการผลิตเอทานอลด้วยการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (SSF) โดยใช้ยีสต์ทนร้อน *Kluveromyces marxianus* NRRL Y-1109 ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 พบว่า มีปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 0.26 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับ 0.43 กรัมต่อกรัมสับสเตรท เมื่อใช้เซลลูเลสที่มีเยื่อเซลลูโลสละเอียดจากเล้าเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับการผลิตเอทานอล และฐปฤษาเป็นแหล่งของเซลลูโลส

ภาควิชา พฤษศาสตร์

สาขาวิชา พฤษศาสตร์

ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต.....ศรัณญา ยิ้มย่อง.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

44724145: MAJOR BOTANY

KEY WORD: WEED, BIOMASS, PULP, ALPHA-CELLULOSE, SSF

SARUNYA YIMYONG: BIOCONVERSION OF ALPHA CELLULOSE FROM WEEDS INTO ETHANOL. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. USA SANGWATANAROJ, Ph.D.; 91 pp. ISBN: 974-53-1333-5

Plant biomass of tropical weeds including *Thysanolaena maxima*, *Phragmites karka*, *Typha angustifolia*, *Saccharum spontaneum*, *Coix aquatica*, *Pennisetum polystachyon*, *Imperata cylindrica* and *P. purpureum* were used as the substrate for the production of weed pulp. The plants originally contained percentage of cellulose in the range between 32.1 – 42.5%. The production involved the extraction with prehydrolysis and alkali boiling processes. *T. maxima* provided the highest amount of cellulose yield and alpha-cellulose containing. When the pulp from these weeds were used as the carbon source for cellulase production by *Trichoderma reesei*, we found that the pulp of *S. spontaneum* provided the highest amount of cellulases with the specific activities of 2.349 U/mg protein (exoglucanase), and 0.267 U/mg protein (β -glucosidase), while the pulp of *P. purpureum* provided the highest amount of cellulase with the specific activity of 34.906 U/mg protein for endoglucanase. Ethanol production of three weeds with the highest specific activity (*P. purpureum*, *P. karka* and *T. angustifolia*) using Simultaneous Saccharification and Fermentation process (SSF) with cellulase produced from the pulp of *S. spontaneum* and *P. purpureum* with *Trichoderma reesei* and thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus*, were performed under shaking condition (125 rpm), 40 °C, and pH 5.0. The maximum ethanol yield was found to be 0.26 g.l⁻¹ (0.43 g.g⁻¹) from *T. angustifolia* and cellulase of the pulp of *S. spontaneum*.

Department Botany

Field of Study Botany

Academic year 2004

Student's signature..... Sarunya Yimyong.....

Advisor's signature..... Assoc. Prof. Hunsa Punnapayak.....

Co-advisor's signature..... Asst. Prof. Sangwatanaroj.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากความเมตตา และความอนุเคราะห์จากหลาย ๆ ฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. ھرรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษา เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้โอกาส คำแนะนำ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ รศ. นันทนา อังกินันท์ หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ. มุกดา คูหิรัญ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร. กฤษณา ศิริเลิศมุกด และ คุณศรีจไล ขุนทน นักวิทยาศาสตร์แห่งสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ กำลังใจ และความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ หน่วยปฏิบัติการการใช้ประโยชน์จากชีวมวลของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับทุนพัฒนาอาจารย์ วิทยาเขตสารสนเทศ จังหวัดสระแก้ว

ขอขอบพระคุณ คุณจรรยา ธงไชย และนักวิทยาศาสตร์แห่งกรมวิทยาศาสตร์บริการ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณสุภาภรณ์ ไสภณพัฒนะโกศา คุณสีหนาท ประสงค์สุข คุณกมลชัย ชะเอม และ คุณชรรค์ชัย ดันเมฆ ที่ให้ความเมตตา ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณสุทธิรัตน์ เลิศนันท์ คุณเสาวนีย์ อภาวคิน คุณนิสาชล เทศศรี และ คุณพิรุร ตั้งศิริปัญญากุล เพื่อนที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ อยู่เคียงข้างกันเสมอมา

ขอขอบคุณ สมาชิกในห้องปฏิบัติการการใช้ประโยชน์จากชีวมวลของพืช รวมทั้งทุกท่านที่เกี่ยวข้องแม้มิได้เอ่ยชื่อในที่นี้ก็ตาม ที่ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องของข้าพเจ้า ที่ให้ความรัก และเป็นกำลังใจเพื่อให้สามารถฝ่าฟันอุปสรรคต่างๆ ไปได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ตรวจเอกสาร.....	4
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	18
3.1 ตัวอย่างวัชพืชที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
3.2 การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช.....	22
3.3 การหาปริมาณเถ้าในชีวมวล.....	25
3.4 การผลิตเยื่อเซลลูโลสละเอียด.....	25
3.5 การหาปริมาณความชื้นในเยื่อเซลลูโลสละเอียด.....	27
3.6 การหาปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส เบต้า-เซลลูโลส และแกมม่า-เซลลูโลส.....	27
3.7 การผลิตเซลลูเลส.....	29
3.8 การวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส.....	30
3.9 การหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (SSF).....	32
3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	33
4. ผลการทดลอง.....	34
4.1 ตัวอย่างวัชพืชที่ใช้ในงานวิจัย.....	34
4.2 การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชและปริมาณเถ้า.....	34
4.3 การผลิตเยื่อเซลลูโลสละเอียด.....	35
4.4 การหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตและปริมาณความชื้นของวัชพืช.....	38
4.5 การหาปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส เบต้า-เซลลูโลส และแกมม่า-เซลลูโลส.....	39

4.6 แอคติวิตีจำเพาะของเซลล์และปริมาณโปรตีน.....	40
4.7 การหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง.....	43
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	46
5.1 ตัวอย่างวัชพืชที่ใช้ในงานวิจัย.....	46
5.2 การหาองค์ประกอบของชีวมวล เถ้า และการผลิตเยื่อเซลลูโลสละเอียดของ วัชพืช.....	46
5.3 ปริมาณความชื้นและปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส เบต้า-เซลลูโลส และ แกมมา-เซลลูโลสในเยื่อเซลลูโลสละเอียดที่ผลิตได้.....	46
5.4 การผลิตเซลลูเลส.....	48
5.5 การหมักและย่อยสลาย.....	49
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	52
6.1 ตัวอย่างวัชพืชที่ใช้ในงานวิจัย.....	52
6.2 องค์ประกอบของชีวมวล เถ้า และการผลิตเยื่อเซลลูโลสละเอียดของวัชพืช....	52
6.3 ปริมาณความชื้นและปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส เบต้า-เซลลูโลส และ แกมมา-เซลลูโลสในเยื่อเซลลูโลสละเอียดที่ผลิตได้.....	52
6.4 การผลิตเซลลูเลส.....	53
6.5 การหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง.....	54
รายการอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก.....	59
ภาคผนวก ก.....	60
ภาคผนวก ข.....	69
ภาคผนวก ค.....	72
ภาคผนวก ง.....	77
ภาคผนวก จ.....	83
ภาคผนวก ฉ.....	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	91

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้าของวัชพืช.....	35
2 เปอร์เซ็นต์ผลผลิตและปริมาณความชื้นของวัชพืช.....	39
3 ปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส เบต้า-เซลลูโลส และ แกมมา-เซลลูโลสของเยื่อ เซลลูโลสละเอียดจากวัชพืช.....	40
4 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและปริมาณโปรตีนที่ใช้วัชพืชเป็นแหล่ง คาร์บอน.....	42
5 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและปริมาณโปรตีนที่ใช้เยื่อเซลลูโลสละเอียด ของวัชพืชเป็นแหล่งคาร์บอน.....	43
6 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสสำหรับการหมักแบบ SSF.....	44
7 ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และกากที่เหลือจากการหมักในระดับ ฟลาสก์.....	45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ไลส.....	6
2 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ไลส.....	7
3 เปรียบเทียบโครงสร้างของน้ำตาลเซลโลไบโอส มอลโตส และซูโครส.....	8
4 ลักษณะโครงสร้างของเฮมิเซลล์ไลส.....	9
5 ลักษณะโครงสร้างของลิกนิน.....	9
6 ยีสต์ <i>K. marxianus</i> NRRL Y-1109.....	16
7 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากลำไย.....	35
8 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากหญ้าคา.....	36
9 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากหญ้าขจรจบ.....	36
10 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากหญ้าเนเปียร์.....	36
11 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากแหม.....	37
12 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากเลา.....	37
13 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากกัง.....	37
14 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากรูปฤาษี.....	38
15 เยื่อเซลล์ไลสละเอียดจากแอลฟา-เซลล์ไลส.....	38
16 เชื้อรา <i>T. reesei</i> Rut C-30.....	41
17 ลำไย.....	60
18 หญ้าคา.....	61
19 หญ้าขจรจบดอกเล็ก.....	62
20 หญ้าเนเปียร์.....	63
21 แหม.....	64
22 เลา.....	65
23 กัง.....	66
24 รูปฤาษี.....	67
25 กราฟมาตรฐานกลูโคส.....	77
26 กราฟมาตรฐานโปรตีน.....	78

27	กราฟมาตรฐานเอทานอล.....	79
28	กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวิซ์.....	80
29	ลักษณะของตารางที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์.....	83



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย