

การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง



นางสาวพรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-9856-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA RHISOME

Miss Phanwilai Kingsuwanarat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-9856-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง
โดย นางสาวพรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. ศิริกุล จันทร์สว่าง

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญญาแก้ว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพาณิชกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.ศิริกุล จันทร์สว่าง)

..... กรรมการ
(ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์: การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง (ETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA RHISOME) อ.ที่ปรึกษา : รศ ดร. จิรกานต์ เมื่อนาโพธิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.ศิริกุล จันทร์สว่าง, 137 หน้า. ISBN 974-17-9856-3

เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในเหง้ามันสำปะหลัง ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล โดยปกติเซลลูโลสจะอยู่รวมกับส่วนประกอบอื่น ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเซลลูโลสกับเอนไซม์ในปฏิกิริยารย่อย ดังนั้นในการผลิตจะต้องทำการแยกส่วนประกอบดังกล่าวออกจากโครงสร้างของเหง้ามันสำปะหลัง ในขั้นการปรับสภาพ ซึ่งในงานวิจัยใช้วิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยพบว่าวิธีการปรับสภาพวิธีที่ดีที่สุด คือ การแช่เหง้ามันสำปะหลังในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะได้ตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่มีเซลลูโลสประกอบอยู่ 96.46 % เฮมิเซลลูโลส 1.85 % และลิกนิน 1.69 % จากเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี ซึ่งมีส่วนประกอบคือ เซลลูโลส 82.14 % เฮมิเซลลูโลส 11.41 % และลิกนิน 6.45 % ตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่ได้นำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูลิวรีกซ์ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อกรัมเซลลูโลสเท่ากับ 4.079 หน่วย FPUต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการย่อย 24 ชั่วโมง ที่สภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยโดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 8.30 กรัมต่อลิตร และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 21.62 %

เมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังมาเลี้ยงเชื้อ *Zymomonas mobilis* strain TISTR 405 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับ ATCC 10988 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยการเลี้ยงเชื้อในสารอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 25 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อคือที่ 5.0 เมื่อทำการหมักในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จะได้เอทานอล 10.60 กรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์เป็น 69.84 % ค่าผลได้ของเซลล์จากสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโต (y_{XS}) 0.14 กรัมต่อกรัม ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร (y_{PS}) 0.68 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตเอทานอล 0.30 กรัมต่อลิตร·ชม.

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4270445421: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORD: CASSAVA RHISOME/ HYDROLYZE/FERMENTATION/ETHANOL

PHANWILAI KINGSUWANNARUT: ETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA RHISOME.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.CHIRAKARN MUANGNAPOH, Dr. Ing. THESIS CO-

ADVISOR: SIRIKUL CHANSAWANG, Ph.D., 137 pp. ISBN: 974-17-9856-3

Cellulose, the important component in cassava rhisome, can be used as precursor in the production of ethanol. The other components in cassava rhisome such as hemicellulose and lignin are the inhibitors of the reaction between cellulose and enzyme in enzymatic hydrolysis. These must be separated in the pretreatment step. The cassava rhisome was treated with 2.0 M NaOH for 24 hours at room temperature and refluxed at 50 °C for 90 minutes. The treated cassava rhisome contained 96.46 % cellulose, 1.85 % hemicellulose and 1.69 % lignin, compared with the untreated cassava rhisome, which contained 82.14 % cellulose, 11.41 % hemicellulose and 6.45 % lignin. The pretreated cassava rhisome residue was subjected to cellulose hydrolysis at the concentration of enzyme-to-cellulose ratio of 4.079 unit FPU : 1 g, in 0.05 M Citrate buffer at pH 4.8 and then heated in a shaking waterbath at 50 °C for 24 hours to produce the reducing sugar to support the fermentation. The concentration of reducing sugar was 8.30 g/l and the percentage of conversion was 21.62.

Enzyme hydrolysate from cassava rhisome was used to cultivated the strain of *Zymomonas mobilis* TISTR 405 as same as ATCC 10988. The study on ethanol production revealed that the optimal condition for *Zymomonas mobilis* TISTR 405 to grow in cassava rhisome hydrolysate were 25 g/l reducing sugar concentration at 30 °C. The reducing sugar solution was fermented at pH 5.0 by anaerobic condition for 60 hours. Under these conditions, the maximal ethanol production of 10.60 g/l were obtained, the percentage of conversion was 69.84. The cell yield ($y_{x/s}$), ethanol yield ($y_{p/s}$) and specific ethanol productivity were 0.14 g/g, 0.68 g/g and 0.30 g/l·hr respectively

Department....Chemical Engineering.....Student's signature.....

Field of study..Chemical Engineering.....Advisor's signature.....

Academic year.....2002.....Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือที่ดียิ่งจากหลายๆ ท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ดร.ศิริกุล จันท์สว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำวิธีการทำงานวิจัยตลอดจนตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพาณิชกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ ที่ได้เสนอข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ และ แก้ไขเพิ่มเติมส่วนที่บกพร่องของงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ชุตินมณีย์ สติรพิพัฒน์กุล ที่ช่วยสอนเทคนิคการเลี้ยงเชื้อตลอดจนให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บริษัท อีสเอเชียติก ประเทศไทย จำกัด (มหาชน) ที่สนับสนุนเอนไซม์ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ที่ให้อனுเคราะหฺ์จุลินทรีย์ *Zymomonas mobilis* strain UQM 410 มาใช้ในงานวิจัย

เนื่องจากทุนวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน และทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี ที่คอยเป็นกำลังใจให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือจนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

และขอกราบขอบพระคุณบิดา และมารดา และขอบคุณทุกๆ คน ในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนทางการศึกษาตลอดมาจนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
สัญลักษณ์.....	ณ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.2 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ทฤษฎี.....	4
2.1 เหง้ามันสำปะหลัง.....	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง.....	4
2.2 ส่วนประกอบในเซลล์พืช.....	6
2.2.1 เซลลูโลส (cellulose).....	8
2.2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลส.....	8
2.2.1.2 ปริมาณเซลลูโลสในพืชชนิดต่างๆ.....	12
2.2.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose).....	13
2.2.3 ลิกนิน (lignin).....	14
2.3 จลนพลศาสตร์การเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง.....	16
2.3.1 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.....	16
2.3.2 การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ (yield coefficient).....	20
2.3.3 ลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์ (product formation).....	22
2.4 สมการสมดุลมวลและการคำนวณอัตราจำเพาะ (specific rate).....	23
2.4.1 สมการสมดุลมวลสารของเซลล์และการคำนวณอัตราการเจริญเติบโต จำเพาะ (specific growth rate, μ).....	24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 สมการสมดุลมวลของสารอาหารและคำนวณอัตราการใช้สารอาหาร จำเพาะ (specific consumption rate, q_s).....	25
2.4.3 สมการสมดุลมวลของผลิตภัณฑ์และการคำนวณอัตราการใช้สารอาหาร จำเพาะ (specific production rate, q_p).....	25
3. ตรวจเอกสาร.....	26
3.1 กระบวนการผลิต.....	26
3.1.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment).....	26
3.1.1.1 วิธีทางกายภาพ (physical pretreatment).....	26
3.1.1.2 วิธีทางเคมี (chemical pretreatment).....	27
3.1.1.3 วิธีทางเคมีฟิสิกส์ (physico-chemical pretreatment).....	29
3.1.1.4 วิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment).....	30
3.1.2 การย่อย.....	30
3.1.2.1 การย่อยด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis).....	30
3.1.2.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis).....	31
3.1.3 การผลิตเอทานอลจากการหมัก.....	39
3.1.3.1 ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมัก.....	39
3.1.3.2 เชื้อเคมีของกระบวนการผลิตเอทานอลโดยการหมัก.....	44
3.1.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก.....	46
4. เคมีภัณฑ์ อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	49
4.1 เคมีภัณฑ์.....	49
4.2 เอนไซม์.....	50
4.3 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง.....	50
4.4 เชื้อจุลินทรีย์.....	51
4.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	51
4.6 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์.....	52
4.7 วิธีการทดลอง.....	52
5. ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	58
5.1 การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง.....	58

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง.....	67
5.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405.	78
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	100
6.1 สรุปผลการทดลอง.....	100
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	102
รายการอ้างอิง.....	103
ภาคผนวก.....	107
ภาคผนวก ก. วิธีวิเคราะห์.....	108
ภาคผนวก ข. เส้นกราฟมาตรฐาน.....	116
ภาคผนวก ค. ข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลอง.....	121
ภาคผนวก ง. ตัวอย่างการคำนวณผลการทดลอง.....	133
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	137

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....	8
2.2	ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่างๆ ของพืช.....	12
2.3	สรุปค่าผลได้สำหรับการเจริญแบบใช้อากาศของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน.....	21
3.1	เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยกรด.....	32
3.2	เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยเอนไซม์.....	32
3.3	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส.....	33
3.4	องค์ประกอบหลักในเซลล์ของ Zymomonas.....	41
3.5	อิทธิพลของออกซิเจนที่มีต่อการหมักของ Zymomonas.....	44
5.1	แสดงส่วนประกอบของเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี.....	58
5.2	ผลการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพ โดยการบด และผ่านการปรับสภาพทางเคมีด้วยสารละลายไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ.....	60
5.3	การเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ.....	76
5.4	อัตราจำเพาะ, อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดและค่าผลได้ที่คำนวณได้จากการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่างๆ กัน.....	83
5.5	อัตราจำเพาะ, อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดและค่าผลได้ที่คำนวณได้จากการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 g/l ที่ pH ต่างๆ กัน.....	88
5.6	อัตราจำเพาะ, อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดและค่าผลได้ที่คำนวณได้จากการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่างๆ กัน.....	94
5.7	การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ.....	99

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะของต้นมันสำปะหลังและรากของต้นมันสำปะหลัง.....	4
2.2	แสดงลักษณะหัวของต้นมันสำปะหลัง.....	5
2.3	แสดงลักษณะเหง้ามันสำปะหลัง.....	5
2.4	แสดงส่วนประกอบในผนังเซลล์พืช.....	6
2.5	แสดงการแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช.....	7
2.6	สูตรโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส และ ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสใน เซลลูโลส.....	9
2.7	ลักษณะของไฟบริล.....	10
2.8	โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป.....	11
2.9	ผนังเซลล์ของพืชเมื่อเซลล์เริ่มแก่.....	11
2.10	สูตรโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส.....	13
2.11	โมเลกุลลิกนินที่ยึดติดกับไมโครไฟบริลของเซลลูโลส.....	15
2.12	สูตรโครงสร้างของลิกนิน.....	15
2.13	ลักษณะการเจริญของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง.....	16
2.14	อิทธิพลของความเข้มข้นของ Mg^{2+} ต่อระยะปรับตัวของการเลี้ยงเชื้อ <i>E. aerogenes</i>	17
2.15	ลักษณะการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ในการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง (a) การสร้างผลิตภัณฑ์แบบ growth-associated (b) การสร้างผลิตภัณฑ์แบบ mixed- growth-associated และ (c) การสร้างผลิตภัณฑ์แบบ nongrowth-associated.....	22
3.1	แสดงวิธีการปรับสภาพวัตถุดิบ.....	28
3.2	การย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสด้วยต่าง.....	31
3.3	โครงสร้างของเซลลูโลสและตำแหน่งที่เอนไซม์ต่างๆ เข้าทำปฏิกิริยา.....	35
3.4	การย่อยสลายและการเข้าไปทำปฏิกิริยาของเอนไซม์.....	36
3.5	การย่อยสลายและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์.....	37
3.6	แผนภาพแสดงขบวนการเอทเนออร์-คูไดรอปฟ์ ของ <i>Zymomonas mobilis</i>	45
5.1	ปริมาณเซลลูโลสในตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพและหลังผ่าน การปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น และอุณหภูมิต่างๆ....	61
5.2	ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับสภาพตะกอนเหง้า มันสำปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆ.....	62

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
5.3	ผลของอุณหภูมิในการปรับสภาพตะกอนแห้งมันสำปะหลังด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	63
5.4	ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่สูญเสียไประหว่างการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ.....	64
5.5	% cellulose yield ในตะกอนแห้งมันสำปะหลัง หลังปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ.....	65
5.6	ผลของค่าความเป็นกรดต่างในการย่อยสลายเซลลูโลสในแห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูบรักซ์ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส.....	67
5.7	ผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายเซลลูโลสในแห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูบรักซ์ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8.....	68
5.8	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในแห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเซลลูโลสต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	69
5.9	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยเซลลูโลสในกระดาศกรอง, แห้งมันสำปะหลังแห้ง และแห้งมันสำปะหลังเปียก ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	70
5.10	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในแห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเซลลูโลสต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	72
5.11	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อหน่วย FPU ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสในแห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 ที่ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมแห้งมันสำปะหลังต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	72

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
5.12	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 ที่ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ค่าต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	73
5.13	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อหน่วย FPU ในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 ที่ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ค่าต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	73
5.14	ผลของเวลาในการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูบรีกซ์ 4.079 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส.....	75
5.15	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	78
5.16	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	79
5.17	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	80
5.18	แสดงลักษณะการเจริญเติบโต การใช้สารอาหาร และการผลิตเอทานอลของ <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 g/l, 25 g/l และ 40 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	81
5.19	แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะของ <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 g/l, 25 g/l และ 40 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
5.20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	84
5.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 6.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	84
5.22 แสดงลักษณะการเจริญเติบโต การใช้สารอาหาร และการผลิตเอทานอลของ <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 25 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้นต่างๆ กันคือ 5.0, 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	86
5.23 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะของ <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 25 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้นต่างๆ กันคือ 5.0, 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	87
5.24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลกลูโคสและเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	89
5.25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลกลูโคสและเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	90
5.26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลกลูโคสและเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	90
5.27 แสดงลักษณะการเจริญเติบโต การใช้สารอาหาร และการผลิตเอทานอลของ <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 g/l, 25 g/l และ 40 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	92
5.28 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะของ <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 g/l, 25 g/l และ 40 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส...	93

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
5.29 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ และน้ำตาลกลูโคสที่ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....	95
5.30 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ และน้ำตาลกลูโคสที่ 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....	96
5.31 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 405 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ และน้ำตาลกลูโคสที่ 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....	97



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์

X	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
S	ความเข้มข้นของสารอาหาร (กรัมต่อลิตร)
P	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)
t	เวลา (ชั่วโมง)
T	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
μ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
q_s	อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (กรัมสารอาหารต่อกรัมเซลล์·ชั่วโมง)
q_p	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์·ชั่วโมง)
$Y_{P/S}$	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์)
$Y_{X/S}$	ผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหาร (กรัมเซลล์ต่อกรัมสารอาหาร)
P_{max}	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (กรัมต่อลิตร·ชั่วโมง)
k_d	อัตราจำเพาะการตายของจุลินทรีย์ (ต่อชั่วโมง)
n	ค่าคงที่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัญหาการขาดแคลนพลังงานเป็นปัญหาที่ทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอันมาก ดังเห็นได้จากแนวโน้มการศึกษาเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนจากด้านต่างๆ เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานจากความร้อนใต้พิภพ ฯลฯ มาใช้แทนพลังงานจากน้ำมันดิบ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่ได้รับความสะดวกจากนักวิทยาศาสตร์เนื่องจากหาได้ง่าย มีราคาถูก และยังมีสารอาหารบางอย่างเหลืออยู่ในปริมาณที่น่าจะนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก

เหง้ามันสำปะหลัง (สุวรรณี แสงเพ็ชร, 2542) เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่มีมากถึง 6 ล้านตันต่อปี ในปัจจุบันได้นำเหง้ามันสำปะหลังเพียงบางส่วนเท่านั้นมาเผาเป็นเชื้อเพลิง แต่บางส่วนไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ใดๆจึงกลายเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่ถ้านำมาวิเคราะห์องค์ประกอบในเหง้ามันสำปะหลังจะพบว่า มีเซลลูโลสอยู่มาก ดังนั้นถ้าเราสามารถนำเหง้ามันสำปะหลังมาแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เช่น กลูโคส ก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ชนิดนี้ เนื่องจากกลูโคสใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น แอลกอฮอล์ กรดซิตริก ผงชูรส ซอร์บิทอล อุตสาหกรรมอาหารต่างๆ และเป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมอุตสาหกรรมต่างๆ ภายในประเทศ ช่วยลดต้นทุนในการผลิต และช่วยลดการสั่งซื้อผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากต่างประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะนำเหง้ามันสำปะหลังมาใช้ในการผลิตเอทานอล

เอทานอล(ethanol) (ธีรภัทร ศรีนรคุตร, 2544) หรือที่เรียกอีกชื่อว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นสารอินทรีย์มีสัญลักษณ์ทางเคมีคือ C_2H_5OH เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย ละลายในน้ำและในสารอินทรีย์อื่นๆ ได้ดี ซึ่งเอทานอลยังมีประโยชน์อีกหลายประการ เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้ในการผลิตยา ใช้เป็นตัวทำละลายในการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อขับเคลื่อนเครื่องยนต์ และใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนให้แก่ น้ำมันเบนซินสำหรับรถยนต์ เป็นต้น

การผลิตเอทานอลเพื่อใช้งานในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามวิธีการผลิต คือ synthetic ethanol เป็นเอทานอลชนิดที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้เอทิลีน (ethylene) เป็นวัตถุดิบ และ fermentation ethanol เป็นเอทานอลชนิดที่ผลิตโดยวิธีการหมักสารชีวมวล แต่เดิมจะนิยมใช้วิธีการสังเคราะห์เอทานอล เพราะเป็นกระบวนการที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก แต่ต้องใช้สารเริ่มต้นที่เป็นผลผลิตจากปิโตรเลียม ซึ่งในปัจจุบันมีการขึ้นราคาน้ำมันปิโตรเลียมและเกิดภาวะการขาดแคลนน้ำมันปิโตรเลียมจึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ทำให้นักวิทยาศาสตร์เริ่มสนใจผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักสารชีวมวลมากขึ้นเพราะจะได้ต้นทุนที่ถูกกว่า

การนำเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต้องประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังนี้คือ ขั้นตอนการปรับสภาพสารประกอบเซลลูโลส (pretreatment) โดยกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ อันได้แก่ ลิกนิน (lignin) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสม และเพิ่มพื้นที่ในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส (hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิทิวซ์ และขั้นตอนการหมัก (fermentation) เป็นการนำน้ำตาลรีดิทิวซ์มาใช้ในการผลิตเอทานอล ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด แต่ที่สำคัญที่สุดคือยีสต์ในجنัส *Saccharomyces* ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง ต่อมาพบว่านอกจากยีสต์แล้วยังมีแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง แบคทีเรียชนิดนี้คือ *Zymomonas mobilis*

ในปัจจุบันได้มีการวิจัยการผลิตเอทานอลโดยใช้ *Zymomonas mobilis* ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการในการผลิตเอทานอล เช่น ความสามารถในการสร้างเอทานอลได้ในปริมาณสูง ความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง ความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีกรดสูง ความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในที่มีเอทานอลสูงเป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับ ATCC 10988 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ในการผลิตเอทานอล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังโดยเอนไซม์เซลลูเลส
- 1.2.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ

3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาหาปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในเหง้ามันสำปะหลังที่ได้ผ่านการปรับสภาพทางเคมีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ
- 1.3.2 ศึกษาผลของความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส และเวลาที่มีต่อการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์
- 1.3.3 ศึกษาการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์ ที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์
- 1.3.4 ศึกษาผลของความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 เป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีจำนวนมากและราคาถูก
- 1.4.2 เป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีค่าน้อยให้มีมูลค่าสูงขึ้น
- 1.4.3 เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำเอาเหง้ามันสำปะหลังไปใช้ในการผลิตเอทานอลในชนบท
- 1.4.4 เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 เหง้ามันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชในตระกูล Euphorbiaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Manihot esculentacrantz มีชื่อทางการค้าว่า cassava หรือ tapioca มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ทางทวีปอเมริกาใต้ ต่อมาได้ขยายไปสู่แหล่งอื่นๆ ของโลก สำหรับประเทศไทยมีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกที่ภาคใต้เป็นครั้งแรกเพื่อใช้ทำแป้งและสาकु ต่อมาได้ขยายพื้นที่ปลูกมายังภาคตะวันออก ได้แก่ ชลบุรี ระยอง และจังหวัดใกล้เคียง เนื่องจากมีสภาพดิน ฟ้า อากาศ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปลูก ดังนั้นจึงได้มีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างรวดเร็วไปสู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้กลายเป็นแหล่งปลูกที่ใหญ่ที่สุดของประเทศไทย

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กประกอบด้วยลำต้นที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-6 เซนติเมตร สูงประมาณ 1-4 เมตร สีของลำต้นจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ ดังรูปที่ 2.1

ก)



ข)



รูปที่ 2.1 ก) แสดงลักษณะของต้นมันสำปะหลัง

ข) แสดงรากของต้นมันสำปะหลัง

ส่วนที่อยู่ใกล้ยอดมีสีเขียว ส่วนแก่ที่ต่ำลงมาอาจมีสีน้ำเงิน สีเหลือง หรือสีน้ำตาล ใบของต้นจะมีสีเขียวเข้มมีลักษณะเป็นแฉกๆ ตั้งแต่ 5-9 แฉก รากของลำต้นจะเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) รากเหล่านี้เป็นคลังสะสมอาหารมีลักษณะโตเรียก “หัว” หัวของมันสำปะหลังนี้จะมีประมาณ 5-15 หัว มีความยาว 15-100 เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-15 เซนติเมตร โดยมีแบ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะหัวของต้นมันสำปะหลัง

เหง้ามันสำปะหลังเป็นส่วนที่อยู่เหนือรากของลำต้นมันสำปะหลัง โดยจะรวมถึงส่วนโคนของลำต้นมันสำปะหลังอีกประมาณ 30 เซนติเมตร ซึ่งคนและสัตว์กินไม่ได้ จึงต้องหั่นหรือสับให้เป็นชิ้นเล็กแล้วตากแดดให้แห้ง (cassava rhizome chip) นำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง แต่เนื่องจากในประเทศไทยมีเหง้ามันสำปะหลังในปริมาณมาก นำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงแค่เพียงบางส่วนเท่านั้น และส่วนใหญ่ก็กลายเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ส่วนประกอบจะพบว่า มีเซลลูโลสอยู่ในปริมาณมาก ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเหง้ามันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เพื่อเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรให้มีมูลค่ามากขึ้น

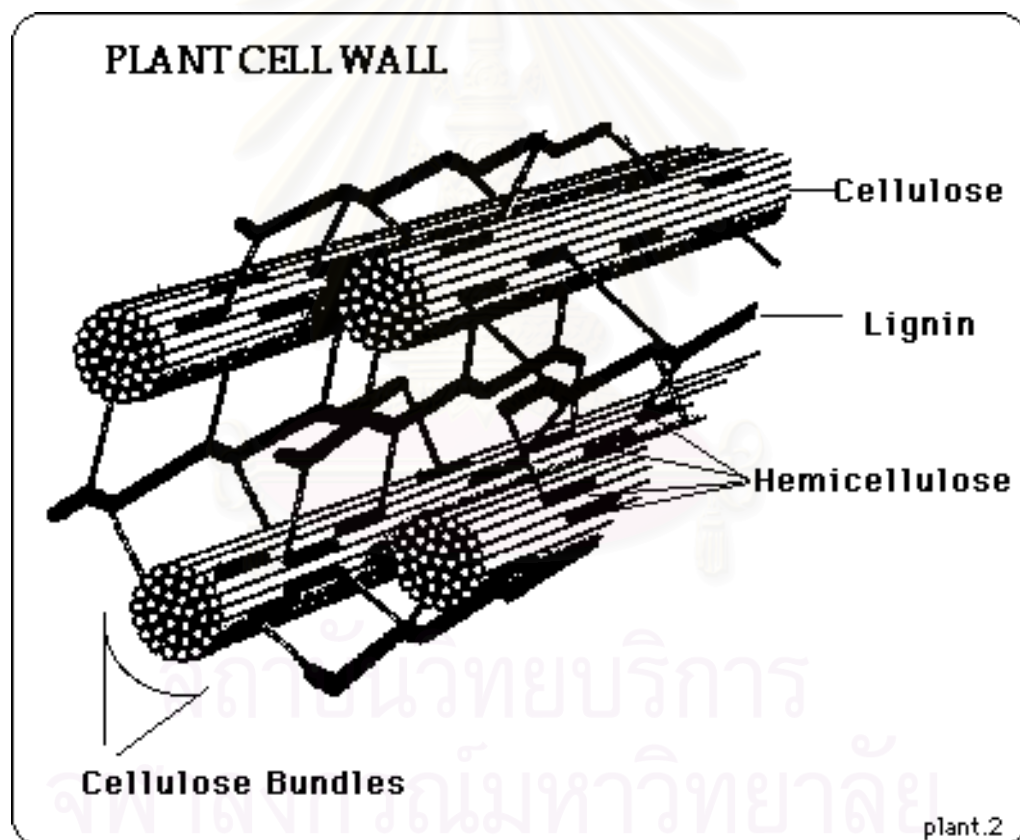


เหง้ามันสำปะหลัง

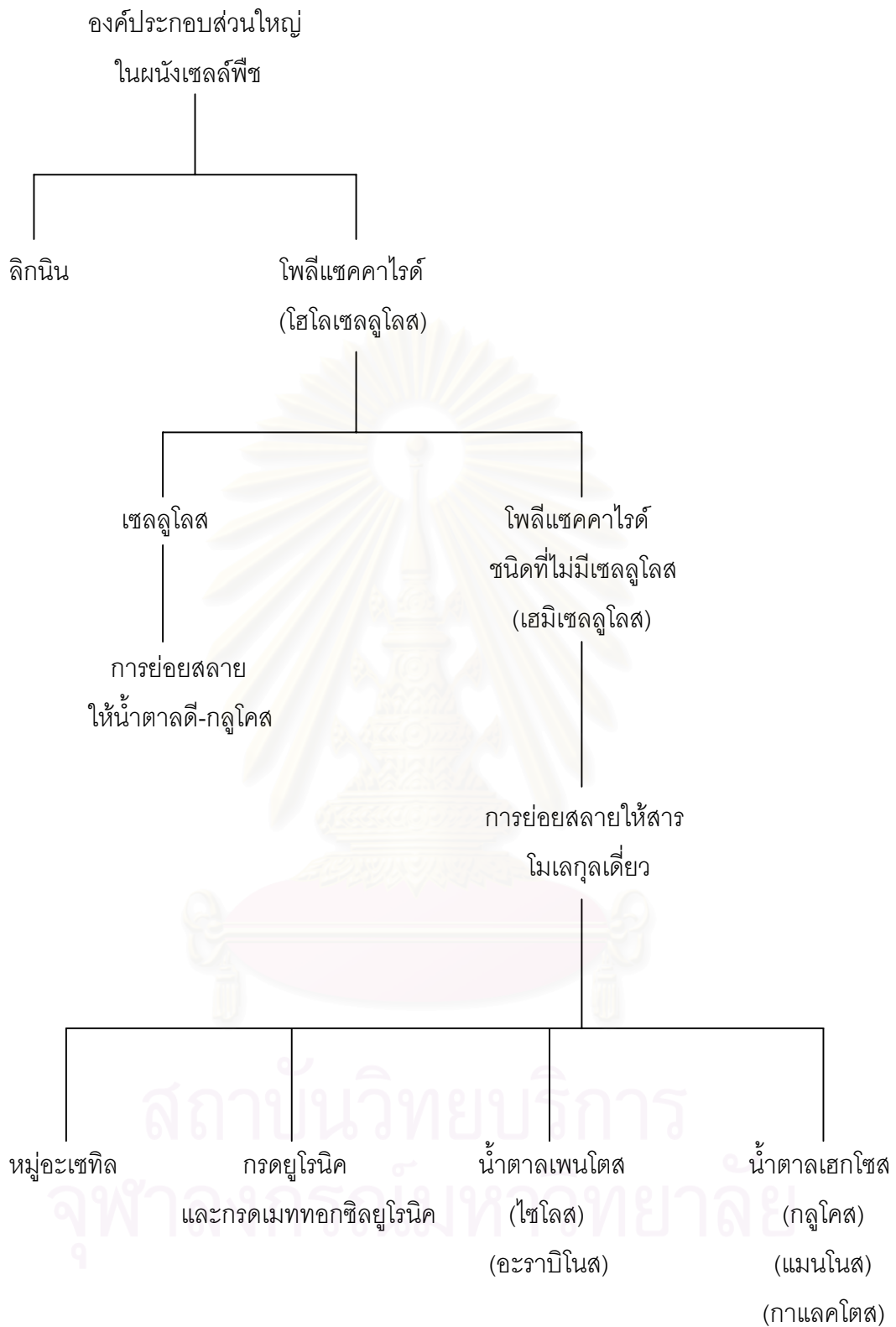
รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะเหง้ามันสำปะหลัง (ธีรภัทร,2544)

2.2 ส่วนประกอบในเซลล์พืช

พืชเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติประเภทที่ใช้แล้วเกิดกลับมาใช้ได้ใหม่ในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นพืชจึงเป็นแหล่งสารประกอบอินทรีย์แหล่งใหญ่ที่สำคัญในอนาคต ส่วนประกอบหลักของพืช ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ดังรูปที่ 2.4 และ รูปที่ 2.5 ซึ่งมีปริมาณที่แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและภาวะที่เจริญเติบโตของพืชนั้นๆ ดังแสดงใน ตารางที่ 2.1 การนำส่วนประกอบของพืชชนิดต่างๆ มาใช้ให้เหมาะสมกับงานและเกิดประโยชน์สูงสุด จึงจำเป็นต้องทราบลักษณะโครงสร้างของพืชและปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ที่มีในพืชนั้นๆ ด้วย



รูปที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบในผนังเซลล์พืช



รูปที่ 2.5 แสดงการแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช(Greulich V.A.,1973 อ้างถึงใน ปรภาณี สติรพิพัฒน์กุล, 2532)

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ปิยวรรณ สายมโนพันธ์ และ พัชรินทร์ ฉัตรประเสริฐ, 2540; Martin A.M.,1991)

ชนิดของวัสดุ เหลือทิ้งทางการ เกษตร	ส่วนประกอบทางเคมี (%)			
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
เศษไม้ที่เหลือทิ้ง	45-56	10-25	18-30	-
ฟางข้าว	32.1	24	12.5	17.5
ฟางข้าวสาลี	30.5	28.4	18.0	2.4
ชานอ้อย	33.4	30	18.9	2.4
ซังข้าวโพด	45	35	15	-
ต้นมันสำปะหลัง	32.2	13.85	26.96	-

2.2.1 เซลลูโลส (cellulose)

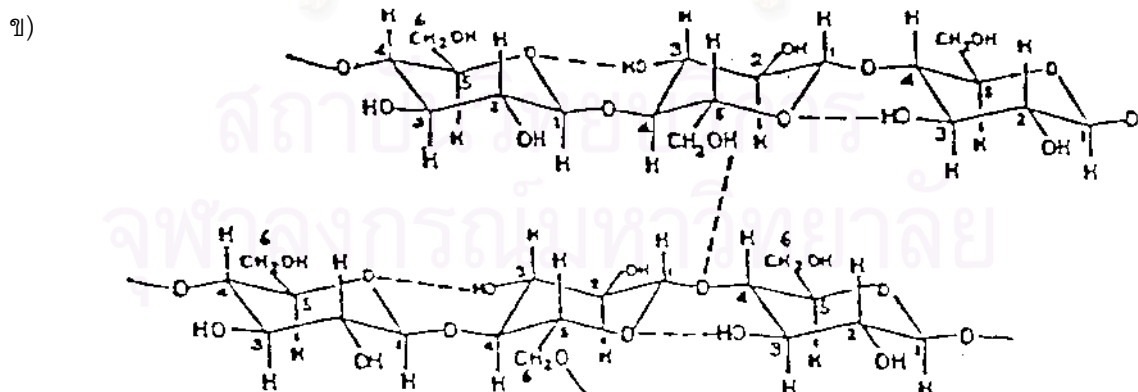
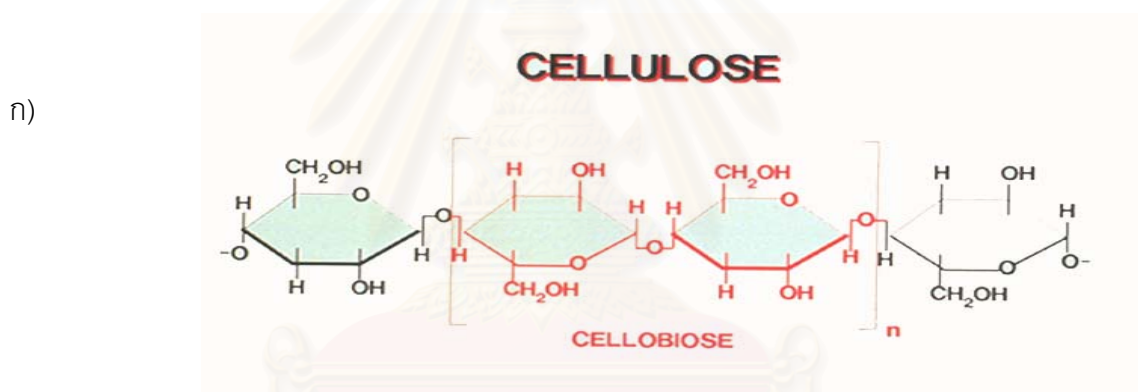
เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช พบตามผนังเซลล์ของพืชทุกชนิด มีหน้าที่ช่วยทำให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักจะพบรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส กัม เพนโตแซน แทนนิน ไชมัน และสารเกิดสี เป็นต้น

2.2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลส (ระวีวรรณ แก้วกล้า, 2538; Joban และ Carl-Joban, 2000)

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของดี-กลูโคส (D-glucose) ในรูปแบบต้า-ดี-กลูโคไพรานอส (β -D-glucopyranose) หลาย

โมเลกุลเรียงต่อกันเป็นโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ แต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะ 1,4-ไกลโคซิดิก (1,4-glycosidic bond) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 ของกลูโคสกับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสโมเลกุลถัดไป

โดยรูปแบบ (conformation) ของการจัดเรียงตัวของหน่วยดี-กลูโคสจะอยู่ในลักษณะเป็นรูปเก้าอี้ (chair form) แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อบริเวณสายเซลลูโลสที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลดี-กลูโคสในอีกสายหนึ่ง การจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไปคือ $-(C_6H_{10}O_5)_n-$ เมื่อ n คือจำนวนหน่วยของดี-กลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้างดังรูปที่ 2.6



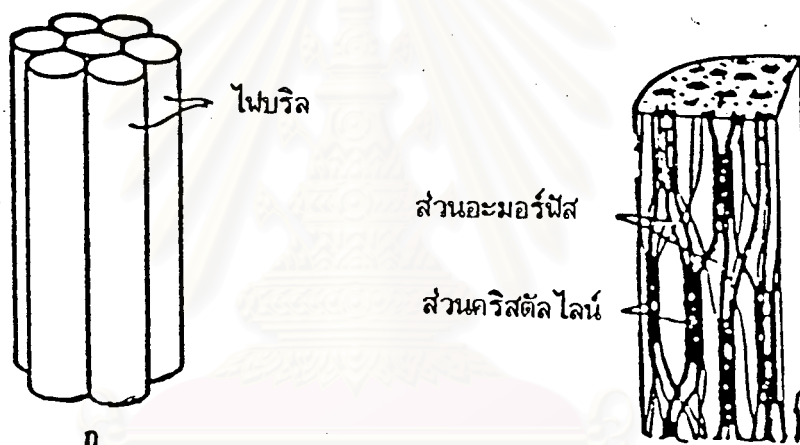
รูปที่ 2.6 ก) สูตรโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส

ข) ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส

(Nisizawa, 1973 อ้างถึงใน สันทนา เสถียรไพศาล, 2539)

หน่วยย่อยของ ดี-กลูโคส ต่อ 1 โมเลกุลเซลลูโลส (degree of polymerization) จะมีตั้งแต่ 15 หน่วยจนถึง 14,000 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลมีค่า 50,000 – 2,500,000 ดาลตัน (น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสเท่ากับ 180.16 ดาลตัน) ความยาวของหน่วยย่อย ดี-กลูโคส 0.515 nm และความยาวทั้งหมดของโมเลกุลเซลลูโลสมีค่ามากกว่า 5 μm

จากการจัดเรียงตัวเหล่านี้ทำให้สายเซลลูโลสเรียงตัวขนานซึ่งกันและกันอย่างมีระเบียบ ในลักษณะที่เรียกว่า คริสตัลไลน์ไมเซล (crystalline micelles) โดยแต่ละไมเซลประกอบด้วยโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีรูปร่างเป็นแถบหนา ไมเซลประมาณ 10-20 ไมเซลจะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ดังรูปที่ 2.7



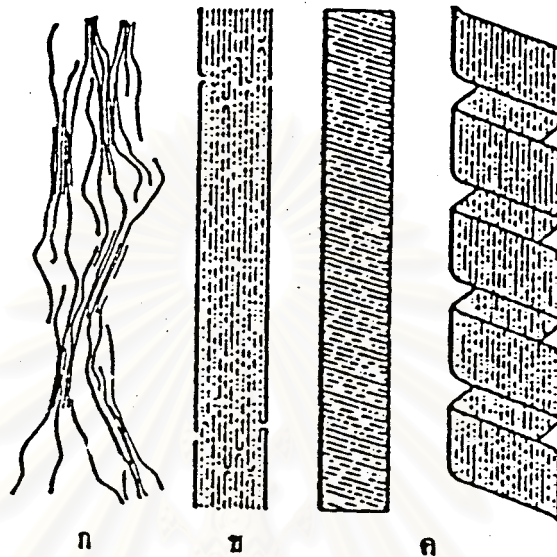
รูปที่ 2.7 ลักษณะของไฟบริล

- ก. กลุ่มไมโครไฟบริลที่เรียงตัวขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน
- ข. ภาพตัดตามยาวของไมโครไฟบริล

ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะคือ (Nisizawa และ Kayutosi, 1973 อ้างถึงใน ปรานี สติรพิพัฒน์กุล, 2532)

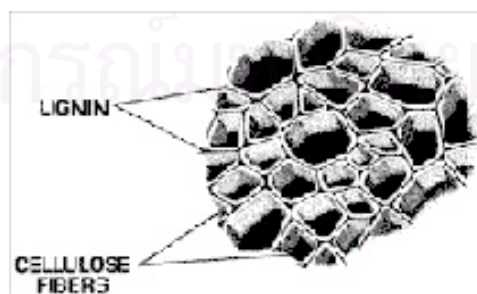
1) ฟริงจ์ไมเซลล์ (fringe micelles) คือ ไมโครไฟบริลที่เรียงตัวเป็นริ้วๆ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และอสัณฐาน (amorphous) รูปที่ 2.8 ก

- 2) โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส รูปที่ 2.8 ข
- 3) โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นหนา เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิ้น และริบบิ้นจะม้วนเป็นเกลียว (helix) รูปที่ 2.8 ค



รูปที่ 2.8 โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป

ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน ดังรูปที่ 2.9 นอกจากนี้ยังมีโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ ที่ปะปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) โพลียูโรไนด์ (polyuronide) อะราแบน (araban) และกาแลคแตน (galactan) โดยมักพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส



รูปที่ 2.9 ผนังเซลล์ของพืชเมื่อเซลล์เริ่มแก่

เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ สารอินทรีย์ใดๆ และในสารละลายต่างอ่อน หรือกรดอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรดแก่หรือต่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรดหรือต่างได้เป็น 3 ชนิด คือ (TAPPI, 2000-2001)

1) แอลฟา-เซลลูโลส (α -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง

2) เบต้า-เซลลูโลส (β -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

3) แกมมา-เซลลูโลส (γ -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง และละลายได้ในสารละลายกรดแต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

2.2.1.2 ปริมาณเซลลูโลสในพืชชนิดต่างๆ

ปริมาณของเซลลูโลสในส่วนต่างๆ ของพืชนั้น จะมีมากน้อยแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับจะเป็นพืชชนิดใดและส่วนไหนของพืช ตัวอย่างปริมาณเซลลูโลสที่พบในพืชชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

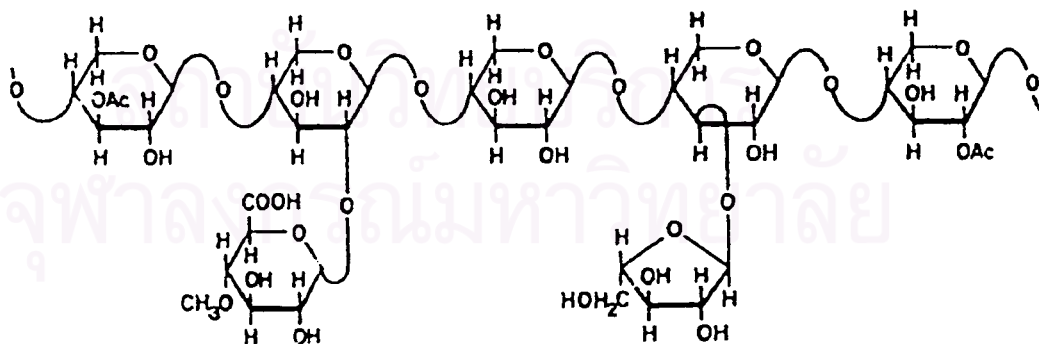
ตารางที่ 2.2 ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่างๆ ของพืช (James P. และ Casey, 1960; พิสุทธิพวงนาค, 2542)

ชนิดพืช	ส่วนต่างๆ ของพืช	ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ข้าว	แกลบ (hulls)	42
	ฟาง (straw)	30-42
ข้าวโอต	แกลบ (hulls)	51
	ฟาง (straw)	40
ข้าวบาเลย์	ฟาง (straw)	40
ข้าวโพด	ต้น (stover)	36-43
	ซัง (cobs)	28

ชนิดพืช	ส่วนต่างๆ ของพืช	ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ไม้สน	ลำต้น	41-44
ป่าน	เส้นใย	65
ฝ้าย	เปลือกหุ้มเมล็ด	60
	เส้นใย	91
	ลำต้น (stalks)	35
อ้อย	ต้นแก่	42
	ชานอ้อย (bagasse)	48
ถั่วเหลือง	เปลือก	52
สับปะรด	กากแห้ง	25

2.2.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสเป็นอินทรีย์สารที่พบมากเป็นอันดับสองรองมาจากเซลลูโลส มีลักษณะเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) ซึ่งส่วนมากเป็นดี-ไซแลน (D-xylan) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส (xylose) หลายๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (ระวีวรรณ แก้วกล้า, 2538; Ross, 1950) ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Ericksson, Blanchette และ Ander, 1990 อ้างถึงใน พิสุทธิ พวงนาค, 2542)

สายโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเฮเทอโรจีนัส(heterogenous) ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดปนกัน คือ

ก. เพนโตแซน (pentosan) ส่วนใหญ่เป็นไซแลน และอะราแบน (araban) เมื่อนำไปย่อยจะได้น้ำตาลไซโลสและอะราบินอส (arabinose) ไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่น

ข. เฮกโซแซน (hexosan) ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน (mannan) กาแลคแทน (galactan) และกลูแคน (glucan) เมื่อถูกย่อยจะได้น้ำตาลแมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และกลูโคส ตามลำดับ

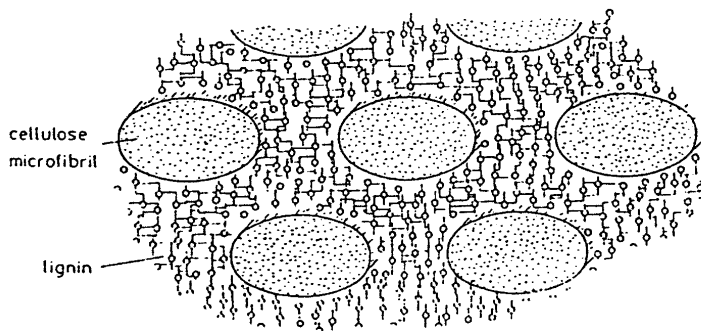
ค. โพลียูโรไนด์ (polyuronides) ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดโพลียูโรนิก (polyuronic acid) และยังพบกรดยูโรนิก (uronic acid) ปนอยู่ด้วย

ข้อแตกต่างของเฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลสคือ เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยกรดสารละลายเจือจาง สามารถละลายได้ในสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สายโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่า และมีความยาวของสายโพลีเมอร์สั้นกว่า โดยมีความยาวประมาณ 40 หน่วยกลูโคส (TAPPI, 2000-2001)

2.2.3 ลิกนิน (lignin)

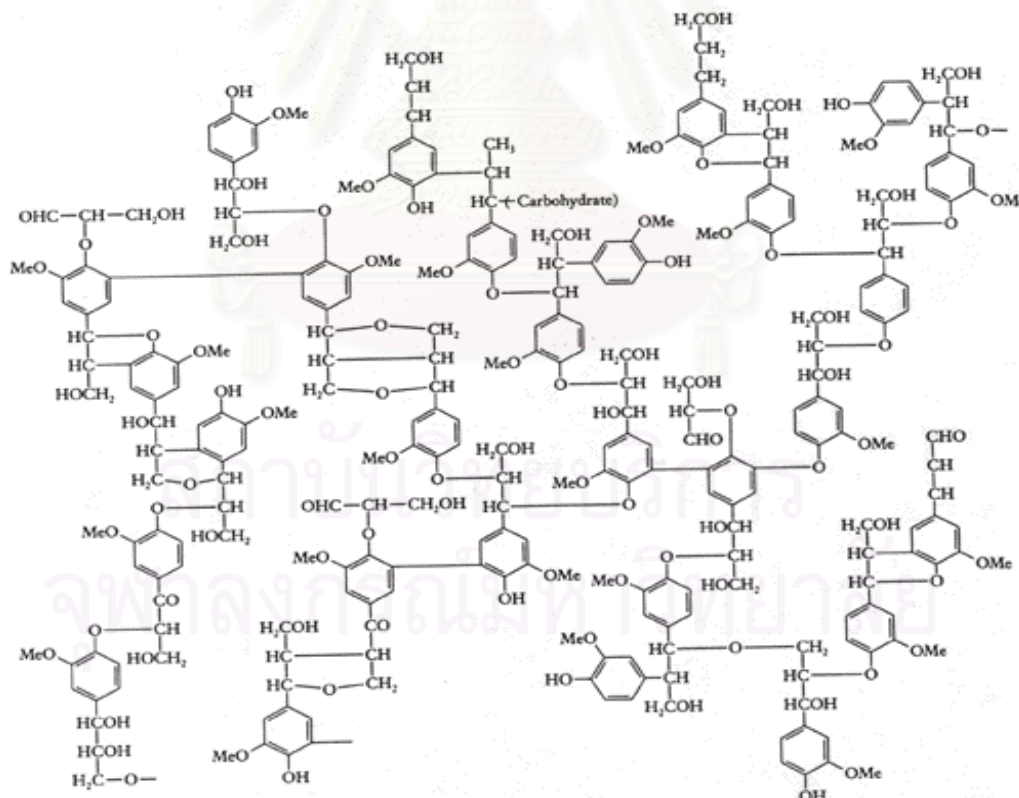
เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืชรองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบได้ในส่วนผนังเซลล์ชั้นที่สอง และ middle lamella ของพืชชั้นสูง โดยในพืชที่อ่อนนุ่มจะมีลิกนินเพียงเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อพืชแก่ขึ้น ลิกนินถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการที่เรียกว่า lignification โดยโมเลกุลของลิกนินจะแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่าง cellulose fibrils และสายของเฮมิเซลลูโลส ลิกนินที่พบในส่วนผนังเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ และป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยอีกด้วย ดังรูปที่ 2.11 (Stephen Y.L. และ Carlton W.D., 1992)

โครงสร้างของลิกนิน เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) หรือเรียกว่า เป็น ฟีนอลิกโพลีเมอร์ (phenolic polymer) โดยมีหน่วยฟีนิลโพรเพน (phenylpropane unit)



รูปที่ 2.11 โมเลกุลลิกนินที่ยึดติดกับไมโครไฟบริลของเซลลูโลส (Brett

เรียงต่อกันแบบสุ่ม (random) ที่หน่วยฟีนอล (phenol unit) อาจเป็น กัวอีเอซิล (guaiacyl) หรือไซริงกิล (syringyl) ดังแสดงในรูป 2.12 ที่ตำแหน่งแอลฟา และเบต้าของโมเลกุลลิกนิน อาจเกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุล หรือคาร์บอนในหน่วยฟีนอลอาจเกิดพันธะกับคาร์บอนในอีกหน่วยหนึ่งภายในสายโพลีเมอร์ที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลลิกนิน ทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ในเอทานอล หรือเมทานอลที่ร้อนและในสารละลายไฮเดรียมไฮดรอกไซด์



รูปที่ 2.12 สูตรโครงสร้างของลิกนิน (Glazer A.W.และ Nikaido H.,1995)

2.3 จลนพลศาสตร์การเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง

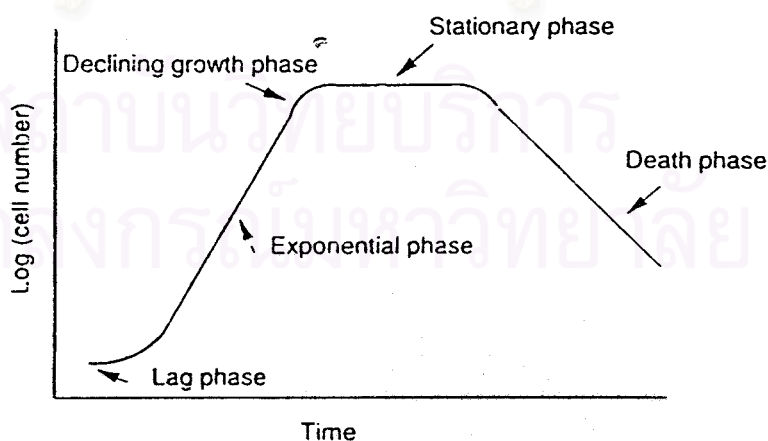
2.3.1 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ต้องอาศัยสภาวะแวดล้อมทางฟิสิกส์ เคมี และสารอาหารที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น มีสารอาหารบริบูรณ์คือ มีทั้งแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ สารเร่งการเจริญเติบโต (growth factor) ชนิดต่างๆ ตลอดจนการควบคุมอุณหภูมิและพีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อบางส่วนเป็นแหล่งพลังงาน และบางส่วนถูกใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโต และสร้างผลิตภัณฑ์ จากการใช้สารอาหารนี้ทำให้มวลของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตามเวลาซึ่งสามารถอธิบายได้ง่าย ดังสมการที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Microbial growth kinetic) (สาโรจน์ ศิริคັນสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ, 2538)

สารอาหาร + เซลล์ \rightarrow ผลิตภัณฑ์ที่ถูกขับออกมาออกเซลล์ + ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น

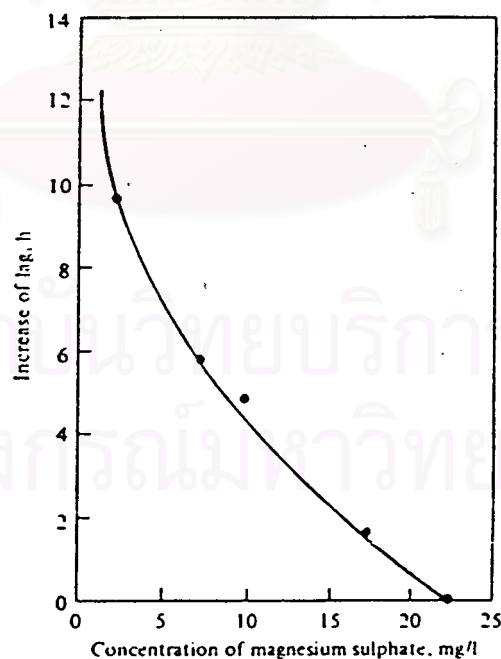


การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ตามเวลาในถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่อง แบ่งออกได้เป็น 5 ระยะ ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 ลักษณะการเจริญของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง

1) ระยะปรับตัว (Lag phase) หลังจากการถ่ายเชื้อ (Inoculation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จุลินทรีย์ยังคงไม่มีการเจริญเติบโต แต่จะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ระยะที่ใช้ในการปรับตัวนี้ จะมากหรือน้อยมีผลจากหลายปัจจัย เช่น อายุ ความเข้มข้น ปริมาณหัวเชื้อ ตลอดจนสารช่วยการเจริญเติบโต (growth factors) เนื่องจากเมื่อเซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ความเข้มข้นของวิตามิน, กรดอะมิโน และ ไอออนต่างๆ (เช่น Mg^{2+} , Ca^{2+} และอื่นๆ) อาจจะถูกถ่ายเทผ่านผนังเซลล์เป็นผลให้ความเข้มข้นต่ำลงอย่างมาก ซึ่งสารเหล่านี้อาจเป็นสิ่งจำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึม และการเฝ้าจางอาจไปลดอัตราการทำงานบางส่วนใน pathway ตัวอย่างเช่นในการเพาะเลี้ยง *E. aerogenes* การเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการลดระยะเวลาในการปรับตัว ดังรูปที่ 2.14 เนื่องจากแมกนีเซียมเป็นสารกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) ของแบคทีเรียดังกล่าวและยังมีผลต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ในทำนองเดียวกัน ถ้าหัวเชื้ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ต่างจากเดิม จะเกิดระยะปรับตัวขึ้น เนื่องจากความต้องการเอนไซม์ชนิดใหม่ เพื่อเหนี่ยวนำเข้าสู่กระบวนการสลายสารอาหารคาร์บอน นอกจากนี้หัวเชื้อที่ให้ระยะการปรับตัวสั้น เซลล์ในหัวเชื้อ ควรมีอายุน้อยอยู่ในระยะการเจริญเติบโตทวีคูณ และต้องเติมในปริมาณมากเพียงพอ (ประมาณ 5-10% โดยปริมาตร) สำหรับในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ในระดับอุตสาหกรรมจะต้องกำหนดให้ระยะปรับตัวของจุลินทรีย์ มีช่วงเวลาที่สั้นที่สุด



รูปที่ 2.14 อิทธิพลของความเข้มข้นของ Mg^{2+} ต่อระยะปรับตัวของการเลี้ยงเชื้อ *E. aerogenes*

2) ระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (Log หรือ Exponential phase) ในช่วงนี้เซลล์มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่แล้ว เซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนและมวลขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นทวีคูณ (exponential) กับเวลาอย่างต่อเนื่อง และเป็นช่วงเวลาของ balanced growth ซึ่งทุกองค์ประกอบของเซลล์เจริญเติบโตด้วยอัตราเดียวกัน นั่นคือองค์ประกอบเฉลี่ยของเซลล์ได้ยังคงประมาณได้คงที่ในช่วงการเจริญเติบโตนี้ และในช่วง balanced growth อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่คำนวณจากทั้งจำนวนเซลล์และมวลของเซลล์จะได้ค่าเท่ากัน สำหรับในระยะนี้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) มีค่าเท่ากับ

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2.2)$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นของเซลล์จูลินทรีย์ (g/l)
 t = เวลา (h)
 μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (h^{-1})

3) ระยะการเจริญเติบโตแบบถดถอย (Declining growth phase) เป็นช่วงที่อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง เนื่องจากสภาพที่ไม่เหมาะสมหลายประการ

- สารอาหารไม่เพียงพอ เนื่องจากถูกใช้หมดไปทำให้จุลินทรีย์ชะงักการเจริญเติบโต
- ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ เนื่องจากมีปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้น ทำให้สภาพความหนืดเพิ่มขึ้น อัตราการส่งผ่านของออกซิเจนต่ำลง
- การสะสมเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์บางชนิดที่เป็นพิษยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น เอทานอลและผลิตภัณฑ์บางชนิด ทำให้พีเอชเปลี่ยนไป เช่น กรดซิตริก เป็นต้น
- สารช่วยการเจริญเติบโตถูกใช้หมดไป ได้แก่ วิตามิน และ โคอาร์บอนต่างๆ
- สภาพแวดล้อมของจุลินทรีย์เนื่องจากการเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้พื้นที่ต่อหน่วยเซลล์ลดลง

การเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมอย่างรวดเร็วดังที่กล่าวมาส่งผลให้หลังจากช่วงนี้ไปจะเป็น unbalanced growth สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงในช่วงนี้เกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้นมาก

4) ระยะคงที่ (Stationary phase) เป็นช่วงที่อัตราการเจริญเติบโตสุทธิเป็นศูนย์ ซึ่งในความเป็นจริงแล้วจุลินทรีย์ มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่มีค่าเท่ากับอัตราการตาย (Death rate) ดังนั้นปริมาณเซลล์จะมีค่าคงที่เป็นระยะเวลาหนึ่ง เนื่องจากเซลล์ย่อยสลายกันเองเพราะขาดแคลนอาหาร (endogenous metabolism) และเกิดการออกซิเดชัน สารพอลิเมอร์ โปรตีน และ สารอื่นๆที่สะสมอยู่ในเซลล์ ถึงแม้ว่าในช่วงนี้อัตราการเจริญเติบโตสุทธิจะเป็นศูนย์ แต่เซลล์บางชนิดยังมีการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งอาจเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในกระบวนการหมัก เช่น การผลิต antibiotic

5) ระยะตาย (Declining phase) ในระยะนี้อัตราการตายของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสามารถอาศัยสมการ 2.3 เขียนแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ขึ้นใหม่อธิบายได้ดังสมการที่ 2.4

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.3)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - k_d X \quad (2.4)$$

เมื่อ $k_d =$ อัตราจำเพาะการตายของจุลินทรีย์ (h^{-1})

ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ k_d มีค่าน้อยมาก แต่ในระยะคงที่และระยะตาย พบว่า k_d มีค่าเพิ่มขึ้น แสดงว่าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้อัตราการตายของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นทำให้จุลินทรีย์สลายตัวเอง (autolysis) อัตราการตายมีค่ามากกว่าอัตราการเจริญเติบโตปริมาณเซลล์จึงลดลงเรื่อยๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.2 การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ (yield coefficient)

เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโตเชื่อมโยงกับการใช้สารอาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้น จึงมีการนิยามพารามิเตอร์ที่เชื่อมโยงสัมประสิทธิ์ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Stoichiometry) และแสดงถึงประสิทธิภาพของการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นเซลล์และผลิตภัณฑ์ ซึ่งก็คือสัมประสิทธิ์ผลได้ (yield coefficient) โดยนิยามเป็นอัตราส่วนโดยมวลของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในการหมักที่ได้มาจากการใช้สารอาหาร เช่น

$$\text{ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร} = \frac{\text{การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของชีวมวล}}{\text{การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหาร}}$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \quad (2.5)$$

$$\text{ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร} = \frac{\text{การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์}}{\text{การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหาร}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \quad (2.6)$$

ในบางกรณีสัมประสิทธิ์ผลได้ของชีวมวลที่วัดได้จากการทดลอง (observed growth yield, $Y_{X/S, \text{obs}}$) อาจจะไม่ใช่ค่าการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตอย่างแท้จริงเนื่องจากมีสารอาหารบางส่วนถูกใช้ไปเนื่องจากความต้องการพลังงานในการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นค่าอิสระกับอัตราการเจริญเติบโต และยังมีสารอาหารบางส่วนถูกใช้ไปเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์ ด้วยเหตุนี้การใช้สารอาหารรวม ($-\Delta S$) จึงถูกแบ่งออกเป็นสองส่วนได้แก่ เป็นการใช้สารอาหารในการสร้างเซลล์ และส่วนที่เหลืออยู่เป็นการใช้สารอาหารเพื่อการดำรงชีวิตและการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นค่าผลได้ของเซลล์ที่แท้จริง ($Y_{X/S, G}$) แสดงได้ดังสมการ 2.7

$$Y_{X/S, G} = \frac{\Delta X}{-\Delta S_G} \quad (2.7)$$

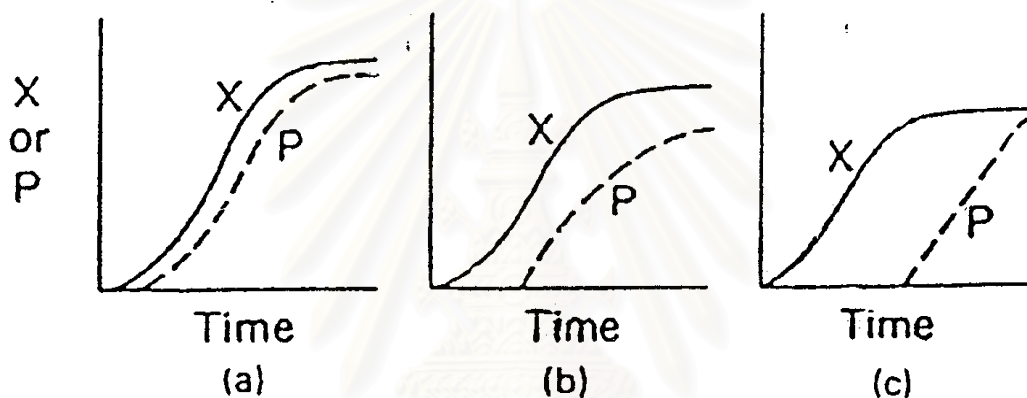
ค่าผลได้ของเซลล์จากแหล่งคาร์บอนและพลังงานส่วนใหญ่มีค่าประมาณ 1.0 ± 0.4 กรัม ชีวมวลต่อกรัมของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ [Shuler และ Karge, 1992] โดยตารางที่ 2.3 แสดงตัวอย่างของค่า Y_{XS} สำหรับสารอาหารและจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในบางการทดลองอาจจะพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ไม่ใช่ค่าคงที่ แต่อาจจะแปรผันกับเวลา หรือ สิ่งแวดล้อมทางกายภาพและเคมี เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งในความเป็นจริง เซลล์จะมีการจัดระบบของตัวเองในลักษณะที่ต่างกันเมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป

ตารางที่ 2.3 สรุปค่าผลได้สำหรับการเจริญแบบใช้อากาศของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

Organism	Substrate	Y_{XS}		
		g/g	g/mol	g/g-C
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Maltose	0.46	149.2	1.03
	Mannitol	0.52	95.2	1.32
	Fructose	0.42	76.1	1.05
	Glucose	0.40	72.7	1.01
<i>Candida utilis</i>	Glucose	0.51	91.8	1.28
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glucose	0.43	77.4	1.08
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Glucose	0.38	68.4	0.95
<i>Rhodospseudomonas spheroides</i>	Glucose	0.45	81.0	1.12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose	0.50	90.0	1.25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ribose	0.35	53.2	0.88
	Succinate	0.25	29.7	0.62
	Glycerol	0.45	41.8	1.16
	Lactate	0.18	16.6	0.46
	Pyruvate	0.20	17.9	0.49
	Acetate	0.18	10.5	0.43
	<i>Candida utilis</i>	Acetate	0.36	21.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Acetate	0.28	16.8	0.70
<i>Candida utilis</i>	Ethanol	0.68	31.2	1.30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ethanol	0.49	22.5	0.93
<i>Klebsiella</i> sp.	Methanol	0.38	12.2	1.01
<i>Methylomonas</i> sp.	Methanol	0.48	15.4	1.28
<i>Pseudomonas</i> sp.	Methanol	0.41	13.1	1.09
<i>Methylococcus</i> sp.	Methane	1.01	16.2	1.34
<i>Pseudomonas</i> sp.	Methane	0.80	12.8	1.06
<i>Pseudomonas</i> sp.	Methane	0.60	9.6	0.80
<i>Pseudomonas methanica</i>	Methane	0.56	9.0	0.75

2.3.3 ลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์ (Product formation)

ผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์จากหลายขบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ และที่ผ่านมามีหลายรูปแบบที่ถูกเสนอขึ้นเพื่อแบ่งแยกผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการสร้างผลิตภัณฑ์หนึ่งซึ่งง่ายและใช้กันอย่างกว้างขวาง คือแบบจำลองที่อธิบายการสร้างผลิตภัณฑ์ซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต โดยแบ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากจุลินทรีย์ออกได้เป็น 3 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 ลักษณะการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ในการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง (a) การสร้างผลิตภัณฑ์แบบ growth-associated (b) การสร้างผลิตภัณฑ์แบบ mixed-growth-associated และ (c) การสร้างผลิตภัณฑ์แบบ nongrowth-associated (Shuler and Kargi, 1992 อ้างถึงใน พิษญา ภูพนิตพันธ์, 2545)

(a) การสร้างผลิตภัณฑ์สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (growth-associated products) ในกรณีนี้การสร้างผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific production rate, q_p) เป็นสัดส่วนกับอัตราการเจริญเติบโต

$$q_p = \mu Y_{p/x} \quad (2.8)$$

หรือมักเรียกว่าเมแทบอลไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) ยกตัวอย่างเช่น กระบวนการผลิตเอทานอลจากการหมักกลูโคสแบบไร้ออกซิเจนโดยใช้ยีสต์ และการผลิตกรดกลูโคนิกจากกลูโคสโดยใช้ *Gluconobacter*

(b) การสร้างผลิตภัณฑ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (Nongrowth-associated products) การสร้างผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นในช่วง stationary phase และมีค่าเท่ากับศูนย์ในช่วงที่เซลล์เจริญเติบโต หรือเรียกว่าเมแทบอลไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่นกระบวนการผลิต antibiotic และวิตามิน ดังนั้นอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะจะเป็นค่าคงที่

$$q_p = b \quad (2.9)$$

(c) การสร้างผลิตภัณฑ์ผสมกันระหว่างแบบสัมพันธ์และไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (mixed growth-associated) การสร้างผลิตภัณฑ์มีลักษณะรวมกันระหว่าง growth-associated กับ nongrowth-associated ยกตัวอย่างเช่น กระบวนการผลิตกรดอะมิโน, กรดแลคติก และ พอลิแซคคาไรด์ที่ขับออกมานอกเซลล์ (xanthan และ pullan) ดังนั้นค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะเป็นดังสมการต่อไปนี้

$$q_p = a\mu + b \quad (2.10)$$

สมการข้างต้นคือ สมการของ Luedeking และ Piret, 1959 ถ้าการสร้างผลิตภัณฑ์จะเป็นแบบไม่สัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโต แต่ถ้าการสร้างผลิตภัณฑ์จะเป็นแบบสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตและคือ $Y_{x/s}$

2.4 สมการสมดุลมวลและการคำนวณอัตราจำเพาะ (Specific rate)

สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จะเป็นระบบปิดไม่มีการเติมสารอาหารเข้าและดึงผลิตภัณฑ์ ออกจากถังปฏิกรณ์ ดังนั้นความเข้มข้นของสารอาหาร, เซลล์ และผลิตภัณฑ์ จึงเปลี่ยนแปลงตามเวลา โดยมีสมมติฐานคือ ของเหลวถังหมัก มีการผสมกันอย่างสมบูรณ์ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ขึ้นกับปริมาณสารอาหารที่กำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยา (rate-limiting nutrient) เพียงหนึ่งชีวิต ในขณะที่สารอาหารชนิดอื่นๆ มีในปริมาณที่เกินพอ และ

เป็นการทำสมดุลมวลสารในช่วง balance growth (เซลล์อยู่ในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ) ดังนั้นสมการสมดุลมวลสารขององค์ประกอบ ภายในถังปฏิกรณ์แสดงได้ดังนี้

$$\frac{d(\text{ปริมาณของ})}{dt(\text{อาหารเลี้ยงเชื้อ})} (\text{ความเข้มข้นของ}) (\text{องค์ประกอบ } i) = (\text{ปริมาณของ}) (\text{อาหารเลี้ยงเชื้อ}) \left(\frac{\text{มวลของที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา}}{\text{หนึ่งหน่วยปริมาตร} \cdot \text{หนึ่งหน่วยเวลา}} \right)$$

$$\frac{d(V_R \cdot C_i)}{dt} = V_R \cdot R_{fi} \quad (2.11)$$

ปริมาณของน้ำหมักคงที่

$$\frac{dC_i}{dt} = r_{fi} \quad (2.12)$$

2.4.1 สมการสมดุลมวลสารของเซลล์และการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ)

สำหรับดำเนินการแบบไม่ต่อเนื่องความเข้มข้นของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา ดังนั้นจากที่ 2.12 สมดุลมวลสารของเซลล์จึงเขียนได้เป็น

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu X(t) \quad (2.13)$$

และสามารถคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์, ได้จากวิธีอินทิกรัล โดยจัดรูปสมการเป็น

$$\int_{t_0}^{t_1} \mu dt = \int_{X(t_0)}^{X(t_1)} \frac{1}{X(t)} dX(t)$$

$$\mu [t_1 - t_0] = \ln X(t_1) - \ln X(t_0)$$

$$\ln X(t_1) = \mu [t_1 - t_0] + \ln X(t_0) \quad (2.14)$$

จากสมการที่ (2.14) จะเห็นได้ว่าเมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln X(t_1)$ กับ $[t_1 - t_0]$ จะได้สมการเส้นตรงที่ความชันของกราฟมีค่าเท่ากับ อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์, μ (ต่อชม.) และพบว่าจุลินทรีย์ใดๆ ที่อยู่ในระยะการเติบโตแบบทวีคูณนี้ จะมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

2.4.2 สมการสมดุลมวลของสารอาหารและคำนวณอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (Specific consumption rate, q_s)

สำหรับการดำเนินการแบบไม่ต่อเนื่องความเข้มข้นของเซลล์และสารอาหารเปลี่ยนแปลงไปตามเวลา ดังนั้นจากสมการที่ 2.11 สมดุลมวลสารของสารตั้งต้นจึงเขียนได้เป็น

$$\frac{dS(t)}{dt} = -q_s X(t) \quad (2.15)$$

ดังนั้นสามารถคำนวณหาอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ, q_s (กรัมสารอาหารต่อกรัมเซลล์. ชม.)

2.4.3 สมการสมดุลมวลของผลิตภัณฑ์และการคำนวณอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific production rate, q_p)

สำหรับการดำเนินการแบบไม่ต่อเนื่องความเข้มข้นของเซลล์และผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา ดังนั้นจากสมการที่ 2.11 สมดุลมวลสารของผลิตภัณฑ์ จึงเขียนได้เป็น

$$\frac{dP(t)}{dt} = q_p X(t) \quad (2.16)$$

ดังนั้นสามารถคำนวณหาอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ, q_p (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์. ชม.)

ตรวจเอกสาร

3.1 กระบวนการผลิต

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง โดยนำส่วนเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์ โดยมีกระบวนการที่สำคัญ คือ

3.1.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)

เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอยู่ในรูปที่เป็นผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส แต่ส่วนที่นำมาใช้จริงคือส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ดังนั้นในขั้นแรกของการผลิตจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของ วัตถุดิบก่อน เพราะเป็นตัวลดพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ การมีลิกนินปริมาณมากจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมัก(fermentation) นอกจากนี้โครงสร้างเซลลูโลสที่เป็นผลึกยังทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการปรับสภาพ คือ เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ วิธีปรับสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธีใหญ่ๆ คือ

3.1.1.1 วิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

ก. การลดขนาดของสารโดยวิธีบดหรือโม่บด เป็นการบดผลึกของเส้นใยที่ประกอบด้วยไมโครไฟบริลจำนวนมากซึ่งในแต่ละไมโครไฟบริลนั้นประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline region) ให้แตกออก เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้นรวมทั้งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น

ข. การทำออกซิเดชันแบบเปียก (wet oxidation) เป็นการให้ความร้อนกับวัสดุลิกนินเซลลูโลส โดยทำที่อุณหภูมิ 120 °C ในน้ำหรือในที่มีออกซิเจนภายใต้ความดันสูง

ค. กระบวนการใช้อิน้ำความดันสูง เป็นการทำให้วัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบนั้นอ้อมตัวด้วยไอน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง แล้วลดความดันลงทันที ทำให้น้ำระเหยอย่างรวดเร็ว เป็นเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในวัสดุลิกนินเซลลูโลส โดยการเสียสภาพของโครงสร้างของผนังเซลล์พืชไป ซึ่งจะทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน เป็นการเพิ่ม

ขึ้นของพื้นที่ผิวเฉพาะมากขึ้น และเป็นการลดองศาการเกิดโพลีเมอร์ไรเซชัน (degree of polymerization) ของเซลลูโลสไป ทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่าง เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน แตกออก และเป็นการปล่อยให้ลิกนินออกมาจากของเหลวในผนังเซลล์

นฤมล ศรียุทธวิรัตน์ และ กาญจนา ทูมมานนท์ (2529) ได้ทำการปรับสภาพกากสับปะรด ในส่วนที่เป็นเศษเนื้อสับปะรดจากโรงงาน 3 วิธี คือ การไม่จมน้ำได้ขนาดอนุภาคประมาณ 250 ไมครอน การอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 3 ชั่วโมง และการไม่ควบคุมกับการอบไอน้ำ จากการทดลองพบว่า การปรับสภาพโดยการไม่ควบคุมกับการอบไอน้ำ จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด

Martin, Cerez และ Briones (1995) ศึกษาการปรับสภาพไม้สน โดยใช้ไอน้ำความดันสูง ที่อุณหภูมิ 200 และ 220 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ กัน ได้ผลการทดลองดังตาราง

Steam explosion conditions	Reducing sugars (g/l)	Percent sugars recovered after steam explosion	pH	Percent pulp recovery
Steam explosion at 200°C				
2 min steam	1.0	2.2	5.5	85
4 min steam	1.4	3.0	5.0	83
7 min steam	1.9	4.2	5.0	82
Steam explosion at 220°C				
30 s steam; discharge at 20.7 MPa	2.2	4.6	4.6	83
30 s steam; discharge at 27.6 MPa	2.4	5.0	4.6	85
2 min steam	3.5	7.6	4.4	73
4 min steam	4.1	9.6	4.1	70
7 min steam	3.5	8.3	3.7	74

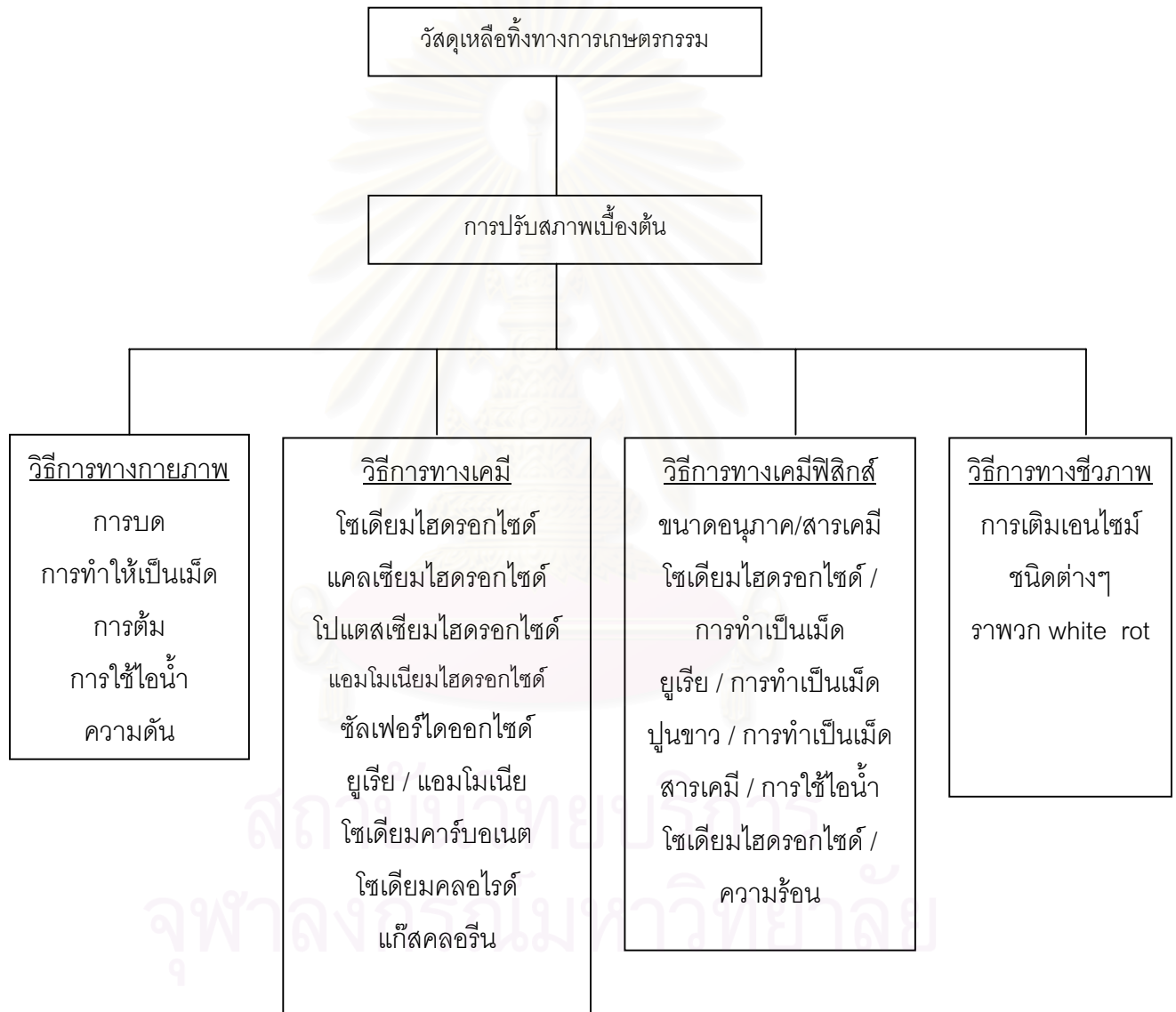
จากตารางพบว่า การเพิ่มอุณหภูมิมีผลทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้น แต่การเพิ่มเวลาไม่ค่อยมีผลต่อการเพิ่มของน้ำตาลรีดิวซ์มากนัก

3.1.1.2 วิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment) แบ่งได้เป็น

ก. การใช้กรด เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายกรดแก่ เช่น กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา

ข. การใช้ต่าง เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายต่าง เช่น สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ จะมีผลทำให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินละลายน้ำออกมา และยังทำให้เกิดการ พองตัว (swelling) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ

ค. การใช้สาร Oxidant สารเคมีที่ใช้ได้แก่ SO_2 , ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ที่สามารถ กำจัดลิกนิน เช่น NaClO_2 , KB_2O_2 , KIO_3 , SO_3 โดยจะมีผลต่อการละลายของลิกนิน



รูปที่ 3.1 แสดงวิธีการปรับสภาพวัตถุดิบ

Okeke และ Obi (1995) ศึกษาการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 M ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่าการปรับสภาพก่อนนำไปย่อยจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทำให้ได้ผลผลิตของน้ำตาลสูงขึ้น 24-53 %

Janusz Szczodrak (1988) ทำการปรับสภาพฟางข้าวสาธิตโดยเปรียบเทียบวิธีทางกายภาพด้วยกระบวนการใช้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กับวิธีทางเคมีโดยใช้เอทานอล 96% และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 % พบว่าการปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพด้วยกระบวนการใช้ความร้อน และวิธีทางเคมีจะมีปริมาณลิกนินเหลืออยู่ในฟางข้าว 30.6% และ 5.4% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพทางเคมีทำให้สามารถกำจัดลิกนินออกไปได้มากกว่า

Farooq Latif และ Mohammad Ibrahim Rajoka (2001) ทำการปรับสภาพซังข้าวโพด โดยนำมาซังข้าวโพดมาบดให้มีขนาด 0.5 - 1 มิลลิเมตร นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2% ในอัตราส่วน 1:5 แล้วนำไป autoclave เป็นเวลา 15 นาที พบว่าก่อนปรับสภาพมีส่วนประกอบของ เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส, ลิกนิน และอะซิเตต เป็น 41%, 36%, 7% และ 3.2% ตามลำดับ หลังจากปรับสภาพแล้วจะได้เซลลูโลสมากขึ้นเป็น 57% และมีส่วนประกอบอื่นๆ ลดลง

ปราณี สิริพิพัฒน์กุล (2532) ได้ทำการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้สารละลายกรด ต่างและการใช้ไอน้ำที่ความดันสูง พบว่าการปรับสภาพผักตบชวากับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะช่วยให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด

ระวีวรรณ แก้วกล้า (2538) ได้ทำการปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที จะทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสเกิดได้ดีขึ้น

3.1.1.3 วิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-Chemical Pretreatment) เป็นการปรับสภาพ วัสดุดิบ โดยใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การบดรวมกับวิธีการทางกายภาพ

Acebal และคณะ (1986) ทำการปรับสภาพฟางข้าวโดยเปรียบเทียบวิธีทางกายภาพโดยการบด และวิธีทางเคมีฟิสิกส์โดยการบดและแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 %w/v เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้วิธีทางเคมีฟิสิกส์ในการปรับสภาพฟางข้าว ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเซลลูโลสสูงกว่าการใช้วิธีทางกายภาพเพียงอย่างเดียว คือ 0.557% และ 0.243% ตามลำดับ

3.1.1.4 **วิธีทางชีวภาพ (Biological Pretreatment)** เป็นการใช้ออนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้เปลี่ยนอยู่ในรูปโซ่ตรง และช่วยลดความเป็นผลึก

3.1.2 การย่อย

เนื่องจากเหง้ามันสำปะหลังมีสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้นเมื่อนำมาทำการย่อยสลายจะได้น้ำตาลออกมา โดยถ้าทำการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันคือกลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส (cellobiose) และพวกโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ปนกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อย่อยสลายจะได้น้ำตาลหลายชนิดปนกันขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส การย่อยสลายสามารถทำได้ 2 วิธีใหญ่ๆ คือ

3.1.2.1 การย่อยสลายด้วยสารเคมี (Chemical Hydrolysis)

เป็นการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง โดยจะไปทำลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน ส่วนใหญ่การย่อยสลายแบบนี้ต้องการสภาวะที่รุนแรง

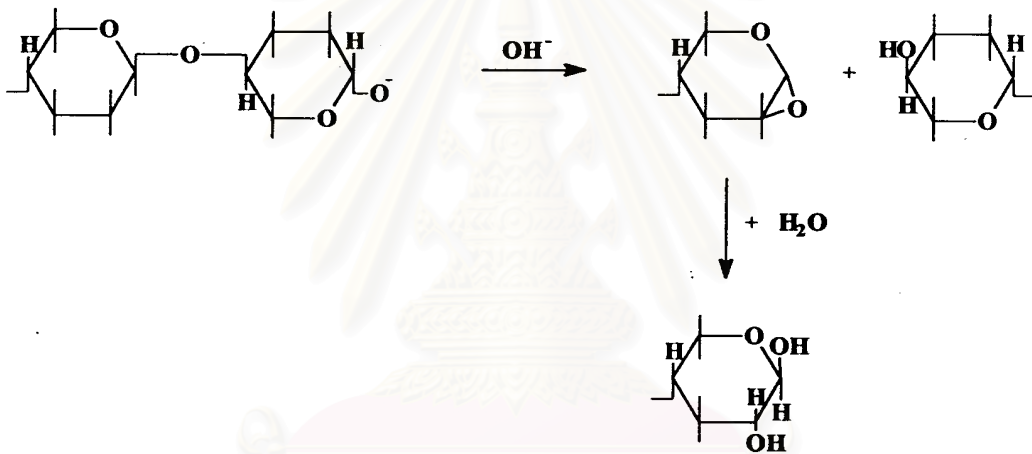
ก. การย่อยสลายด้วยกรด (Acid Hydrolysis) อาจแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ คือ

1) Homogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่มีข้อเสียคือ จะต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้และการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ (recycle) รวมทั้งปัญหาการสูญเสียกรดไปกับส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย และการผูกมัดของเครื่องมือจากการใช้กรดแก่

2) Heterogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดอ่อนแต่ต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส ผลการย่อยคือ เซลลูโลสยังมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่ (fibrous structure) วิธีการนี้จะไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ แต่จะถูกทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว หรือ แคลเซียมคาร์บอเนต

ข. การย่อยสลายด้วยด่าง (Alkaline Hydrolysis)

สารเคมีที่นิยมใช้ คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทิลีนไดอะมีน และ แอมโมเนีย เป็นต้น จะมีผลทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง โดยปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อยซึ่งใช้ในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส แสดงไว้ดังรูปที่ 3.2 (James P. และ Casey, 1960)



รูปที่ 3.2 การย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสด้วยด่าง

3.1.2.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

เป็นการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดโดยมากเป็นราและแบคทีเรีย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่สภาวะซึ่งไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกสลายต่อไป นอกจากนี้เอนไซม์มีความจำเพาะ (specificity) ต่อวัตถุดิบที่จะย่อยสลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดปัญหาการผูกพันของเครื่องมืออีกด้วย

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยกรด

ผลดี	ผลเสีย
<ol style="list-style-type: none"> 1. วัตถุดิบไม่ต้องผ่านการปรับสภาพก่อน 2. ปฏิกริยาเกิดเร็ว ง่าย และสั้น 3. ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้มีราคาถูกและหาง่าย 4. ปฏิกริยาสามารถทำให้เกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ (กรณีการใช้กรดแก่) 5. ให้ผลิตภัณฑ์สูง (กรณีการใช้กรดแก่) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นไม่เจาะจงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์ 2. น้ำตาลที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นสารอื่น เช่น เฟอฟูรัล และสารเคมีอื่นๆ 3. ต้องใช้อุณหภูมิสูง (กรณีการใช้กรดอ่อน) 4. ถ้าใช้กรดแก่ ต้องมีกระบวนการแยกกรด 5. ก่อนนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยไปใช้ต้องปรับสภาพให้เป็นกลางก่อน 6. ผลพลอยได้ของปฏิกริยาของการย่อยด้วยกรด เช่น เฟอฟูรัล เป็นพิษต่อเซลล์ 7. ต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่สามารถทนต่อการกัดกร่อนของกรดได้ ซึ่งราคาแพง 8. การกำจัดสารเคมีที่เหลือจากกระบวนการทำได้ยาก

ตารางที่ 3.2 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยเอนไซม์

ผลดี	ผลเสีย
<ol style="list-style-type: none"> 1. สภาพที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างไม่รุนแรง 2. ปฏิกริยามีความเฉพาะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง 3. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น 4. สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยได้ 5. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน 	<ol style="list-style-type: none"> 1. วัตถุดิบต้องผ่านการปรับสภาพก่อน 2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ สามารถยับยั้งปฏิกริยาที่เกิดขึ้นได้ (product inhibition) 3. สูญเสียเอนไซม์ไป เนื่องจากถูกดูดซับบนวัสดุที่ไม่ย่อย 4. เสี่ยงต่อการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์ 5. ถ้าระบบมีสารที่เป็นตัวขัดขวางปฏิกริยา เช่น เฮมิเซลลูโลสหรือลิกนิน อัตราการเกิดปฏิกริยาจะช้าลง

1) เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

เอนไซม์ที่ย่อยสสารประกอบเซลลูโลส คือ เซลลูเลส ปัจจุบันมีการวิจัยกันอย่างกว้างขวาง โดยเน้นถึงการพัฒนาระบบการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ และวัชพืชให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้มากมาย

แหล่งของเอนไซม์ที่หาง่าย และมีความสามารถสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสนี้ โดยมากจะมาจากจุลินทรีย์ซึ่งมีอยู่หลายชนิด ดังตารางที่ 3.3 ที่นิยมนำมาใช้คือ เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma reesei*

ตารางที่ 3.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

รา	แบคทีเรีย	แอคติโนมัยซีตัส
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Streptomyces</i> sp.
<i>Aspergillus acculeatus</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Thermoactinomyces</i> sp.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Thermomonospora curvata</i>
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Fusarium solani</i>		
<i>Irpex lacteus</i>		
<i>Penicillium funmiculosum</i>		
<i>Phanerochaete</i>		
<i>Chrysosporium</i>		
<i>Schizophyllum commune</i>		
<i>Sclerotium rolfsii</i>		
<i>Sporotrichum cellulophilum</i>		
<i>Talaromyces emersonii</i>		
<i>Thielavia terrestris</i>		
<i>Trichoderma koningii</i>		
<i>Trichoderma reesei</i>		
<i>Trichoderma viride</i>		

เอนไซม์เซลลูเลสนี้มีสมบัติเป็น multicomponent enzyme โดยมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกันดังนี้ (Shimada et al., 1990 อ้างถึงในลลิตา นิตศนจากรุกุล, 2541)

1. เอ็นโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ Endo β -1, 4-glucan glucanohydrolase หรือ EBG หรือ C_x

ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1,4 ภายในสายเซลลูโลสตรงบริเวณโครงสร้างอะมอร์ฟัส อย่างสุ่ม (randomly acting) ทำให้เกิดปลายอิสระขึ้นทำให้ได้เซลโลไบโอส (cellobiose), โอลิโกเซลลูโลส (oligocellulose) และกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก

2. เอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase) หรือ Exo β -1, 4-glucan cellobiohydrolase หรือ CBH หรือ C_1

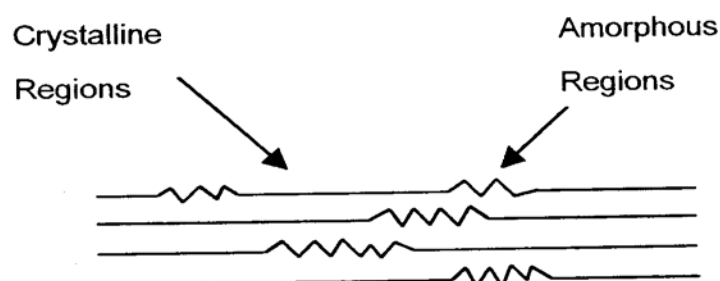
ทำหน้าที่ย่อยสลายโดยการตัดโมเลกุลของเซลโลไบโอสออกจากปลายที่เป็นอิสระนั้นหรือคือการย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกเซลลูโลส ไปเป็นเซลโลไบโอสนั่นเอง

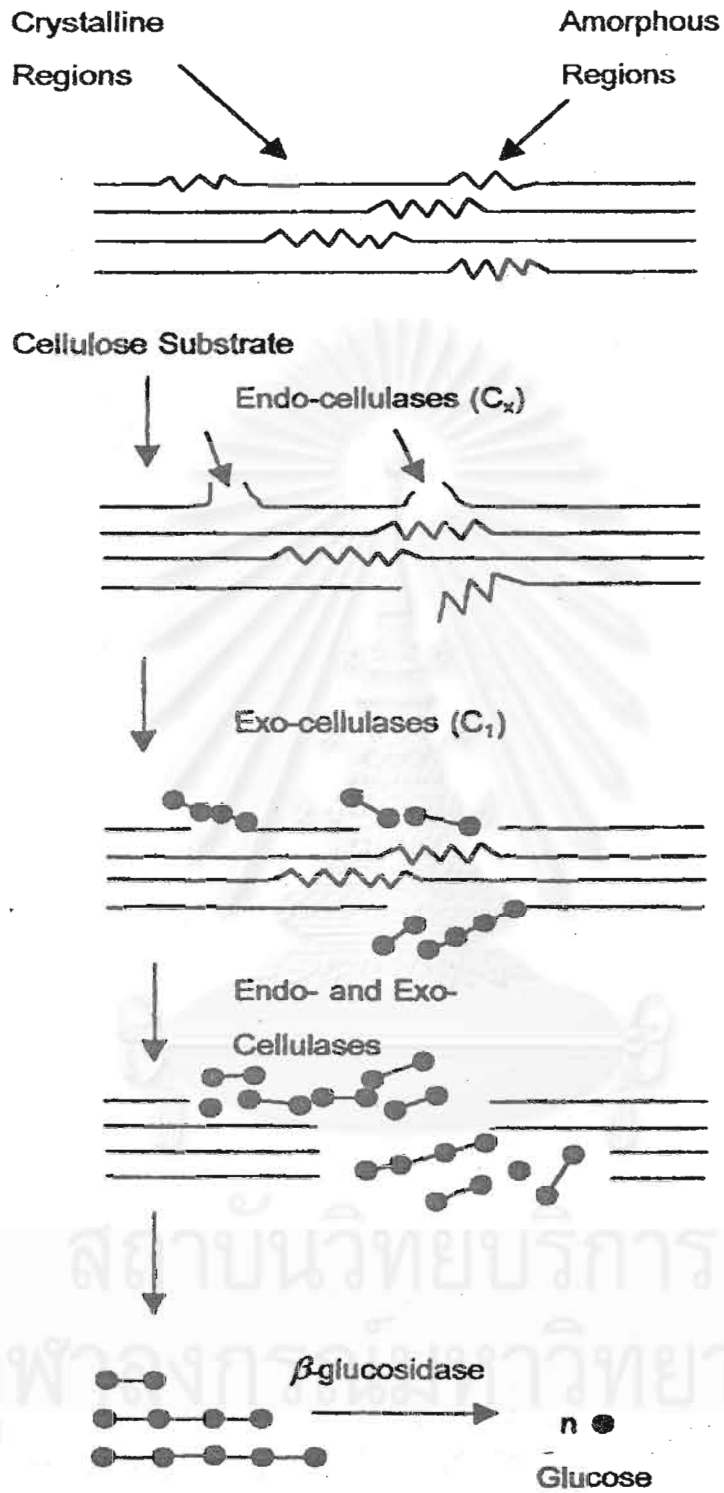
3. เบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) หรือ เซลโลไบเอส (cellobiase) หรือ C_0

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคส ซึ่งเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเป็นตัวส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์เอ็นโดกลูคาเนส และเอนไซม์เอ็กโซกลูคาเนส ทำให้อย่อยสลายได้กลูโคสมากขึ้น การย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ปริมาณกลูโคสมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในเซลลูเลสว่าจะมีมากหรือน้อย ดังนั้นเอนไซม์ตัวนี้จึงเป็นกุญแจสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

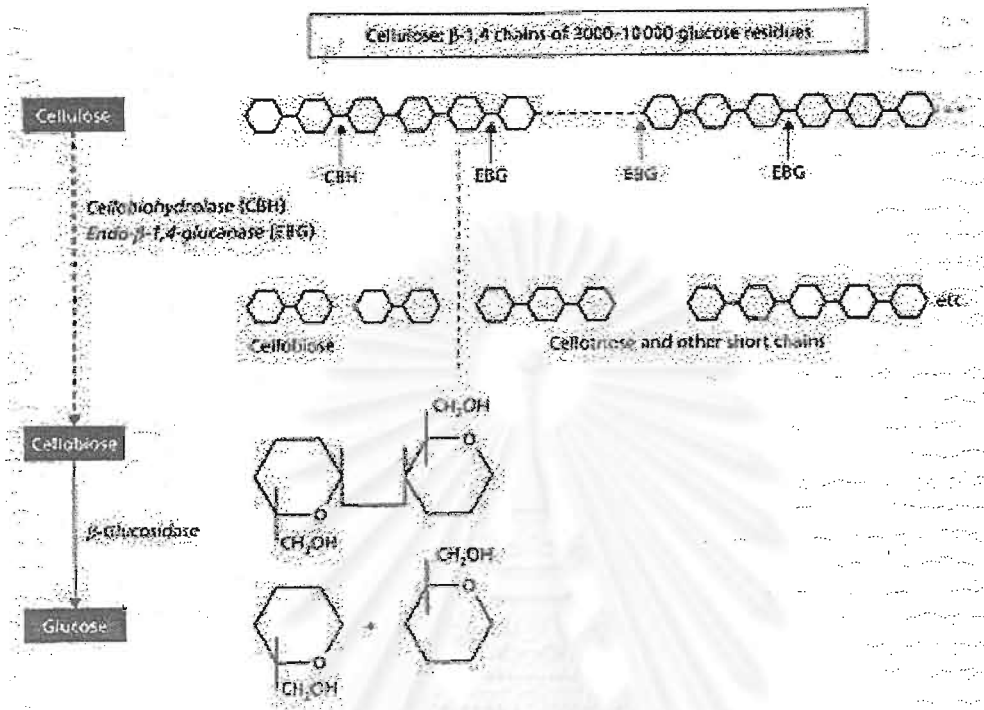
การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ในดินนั้น จะเกิดขึ้นเมื่อมีเซลลูโลส เซลโลไบโอส หรือโพลีแซคคาไรด์อื่น ที่มีโมเลกุลของกลูโคสประกอบอยู่เป็นตัวกระตุ้น (inducer) จุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ C_x และ C_1 ซึ่งเป็น extracellular enzymes ขับออกมาออกเซลล์ และย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านี้ให้มีขนาดเล็กลง จนสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ หลังจากนั้น เอนไซม์ C_0 ซึ่งเป็น intracellular enzyme จึงเข้าทำการย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคส

กลไกของเอนไซม์เซลลูเลส และตำแหน่งที่เข้าทำปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 3.3 และรูปที่ 3.4



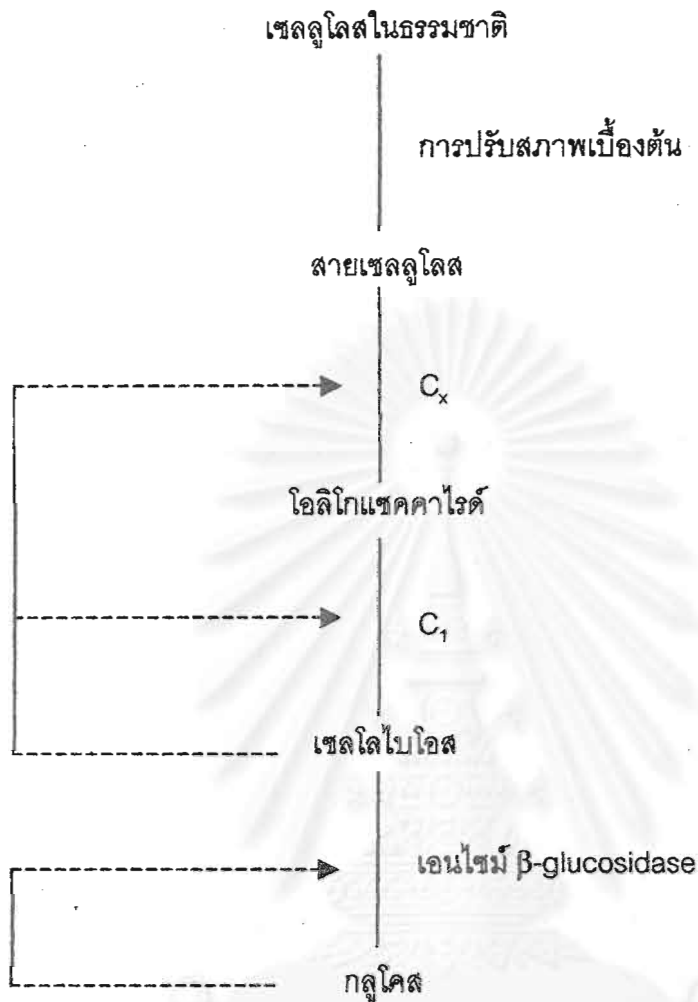


รูปที่ 3.3 โครงสร้างของเซลลูโลสและตำแหน่งที่เอนไซม์ต่างๆ เข้าทำปฏิกิริยา



รูปที่ 3.4 การย่อยสลายและการเข้าไปทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมากขึ้นดังนี้คือ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น และส่งผลยับยั้งอย่างต่อเนื่อง คือทำให้ในระบบมีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น โดยที่เซลโลไบโอสจะเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์เอ็นโดกลูคาเนส และ เอนไซม์เอ็กโซกลูคาเนสต่อไป ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์น้อยลง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงช้าลงและหยุดในที่สุด ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 การย่อยสลายและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

2) เอนไซม์เซลลูบริกซ์ (Cellubrix)

เป็นเอนไซม์ที่ผสมระหว่างเอนไซม์ 2 ชนิดด้วยกันคือ เอนไซม์เซลลูเลส กับเอนไซม์เซลโลไบเอส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้ดียิ่งขึ้น และในงานวิจัยนี้ได้ให้เอนไซม์เซลลูบริกซ์ในการย่อยเซลลูโลส

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

1. อุณหภูมิ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น 2 เท่า ทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส เมื่อเขียนกราฟระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับอุณหภูมิพบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะสูงที่สุดที่อุณหภูมิหนึ่ง ที่อุณหภูมินี้เรียกว่า "optimum temperature" เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าที่จุดนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะต่ำลง เนื่องจากเอนไซม์จะเกิดการเสียสภาพ หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์เซลล์ลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส
2. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ค่าหนึ่ง ที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้กิจกรรม (activity) ของเอนไซม์จะลดลง pH ที่ค่านี้เรียกว่า "optimum pH" เซลลูบริกซ์มี optimum pH อยู่ในช่วง 4.8 ถึง 5.5
3. ความเข้มข้นของสับสเตรท (substrate) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และจะช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้น และในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก
4. ปริมาณเอนไซม์ เมื่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงจุดสูงสุด พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยา จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์
5. ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) การศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ มีประโยชน์ในการอธิบายกระบวนการทำงานของเอนไซม์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่มีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนจะมีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ด้วย เช่น ความร้อน สภาพความเป็นกรด-ด่าง ตัวทำละลายอินทรีย์ ยูเรีย หรือรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น

สมบัติของสับสเตรทที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

1. ความเป็นผลึก วัตถุประสงค์ที่มีความเป็นผลึกอยู่มากทำให้การย่อยเกิดขึ้นได้ยาก
2. พื้นที่ผิวสัมผัส ถ้าพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทมีมาก โอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาจะมีมาก
3. ปริมาณลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุประสงค์ เนื่องจากทำให้การย่อยเกิดขึ้นได้ยากขึ้น
4. องศาการเกิดโพลีเมอร์ไรเซชัน (degree of polymerization) โมเลกุลของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นใยที่แข็งแรง เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนยึดอยู่จึงย่อยได้ยาก ดังนั้นการเพิ่มองศาการเกิดโพลีเมอร์ไรเซชันจะทำให้ความแข็งแรงของเส้นใยมีมากขึ้น ซึ่งจะย่อยได้ยากขึ้น

เนื่องจากการนำเอนไซม์มาใช้มีข้อดี ข้อเสีย และข้อจำกัดหลายอย่าง ดังนั้นการนำเอนไซม์มาใช้จะต้องออกแบบระบบให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะทำได้ ปลอดภัยเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่จะนำไปหมักต่อไป

3.1.3 การผลิตเอทานอลจากการหมัก

การผลิตเอทานอล คือกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ (yeast) แบคทีเรีย (bacteria) โดยปกติจะเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic process) เรียกกระบวนการเปลี่ยนนี้ว่ากระบวนการหมัก (fermentation process) การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลจำเป็นต้องพิจารณาถึง ปริมาณน้ำตาลที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้, กระบวนการผลิต, ปริมาณและความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ, การเปลี่ยนเป็นเอทานอลของน้ำตาล, วัฏจักรปฏิบัติการ, สภาพของกระบวนการ

3.1.3.1 ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมัก

ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมักคือ จุลินทรีย์ อาหาร ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ อากาศ ปัจจัยทั้ง 5 นี้จะมีผลเกี่ยวเนื่องซึ่งกันและกัน การทำให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพจะต้องทำการปรับสภาวะให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดและประหยัดที่สุด

3.1.3.1.1 จุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องและรู้จักกันดีซึ่งใช้ในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันคือ ยีสต์ *Saccharomyces* นอกจากนี้แล้วยังพบว่ามีแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบเชื้อทั้งสองชนิดพบว่าแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้รวดเร็วกว่ายีสต์ *Saccharomyces* 2 ถึง 3 เท่าและปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ก็มีปริมาณใกล้เคียงกัน สามารถทนอุณหภูมิได้สูงกว่าซึ่งเหมาะสมสำหรับประเทศไทยที่มีอากาศร้อน สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเป็นกรดสูง และใช้ต้นทุนการผลิตถูกกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ในการผลิตเอทานอล (นริศ รัตนประภัสร์ และ พรรณี จันทร์ปฐมพงศ์, 2525)

ก. การค้นพบของเชื้อ Zymomonas

Zymomonas mobilis เป็นแบคทีเรียหนึ่งในจำนวนแบคทีเรียย่อยชนิดที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้มาก ในราวปี ค.ศ. 1911 Barker และ Hillier ค้นพบและได้แยกเชื้อ Zymomonas จากน้ำผลไม้พวกไซเดอร์ (cider) และพบว่า Zymomonas เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำผลไม้พวกไซเดอร์มีลักษณะขุ่นและมีกลิ่นรสที่ผิดปกติ จากนั้นก็ได้มีผู้ทดลองศึกษาแยก Zymomonas ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น เบียร์ (beer) ไวน์ (wine) น้ำอ้อย และน้ำผึ้ง เป็นต้น ด้วยความสามารถของเชื้อ Zymomonas ในการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีผู้สนใจเชื้อนี้กันมากขึ้นโดยเฉพาะในราวปี ค.ศ. 1930 – 1940 ในหมู่นักจุลชีววิทยาชาวเยอรมันพยายามใช้เชื้อ Zymomonas นี้ในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูลของ Swings และคณะในปี ค.ศ. 1977 พบว่า Zymomonas ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอทานอลได้อย่างต่ำ 1.5 โมล/กลูโคส 1 โมล (คำพูน และคณะ, 2525)

ข. ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ Zymomonas มีดังนี้คือ

- 1) มีรูปร่างเป็นแท่งยาว 2-6 ไมโครเมตร กว้าง 1-1.4 ไมโครเมตร การเรียงตัวอาจอยู่เป็นคู่หรือเป็นเชลเดี่ยว
- 2) ย้อมสีแกรมจะติดสีแดง (gram negative)
- 3) มีแฟลกเจลลา (flagella) 1-4 อัน ในตำแหน่งขั้วเชล
- 4) เป็นแบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างสปอร์
- 5) ไม่เจริญบน Nutrient agar หรือ Nutrient broth เมื่อเจริญในอาหารแข็ง โคโลนี (colony) มีสีขาวครีม
- 6) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน แต่สามารถทนต่อออกซิเจนได้บ้าง
- 7) สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตสได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 °C และในช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) 5.0-7.0 และมีองค์ประกอบหลักในเชลดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบหลักในเซลล์ของ Zymomonas

องค์ประกอบ	ปริมาณ (น้ำหนักแห้ง)
Proteins	
- growth phase	65 - 69 %
- stationary phase	54%
RNA	17 - 22 %
DNA	2.70%
Carbohydrates	4 - 5 %
Poly-B-hydroxybutyrate	0%
Polyphosphate	0%
Sulfur	0.50%
Ammonia	0.1 - 0.5 $\mu\text{mol/mg}$
Amino acids	0.02 - 0.2 $\mu\text{mol/mg}$
ATP	
- exponential phase	1.5 $\mu\text{g/mg}$
- starvation	0 - 0.4 $\mu\text{g/mg}$

ค. คุณสมบัติของ Zymomonas ที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลคือ (สรวง และคณะ, 2525)

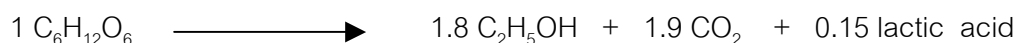
1) ความสามารถสร้างเอทานอลได้ในปริมาณสูง พบว่า Zymomonas สามารถสร้างเอทานอลได้ถึง 1.5-1.9 โมลต่อน้ำตาลกลูโคส 1 โมล โดยใช้น้ำตาล 98% ในการสร้างแอลกอฮอล์อีก 2% ใช้สำหรับการเจริญ ในขณะที่ยีสต์พวก Saccharomyces ใช้เพียง 90% ของน้ำตาลที่มีสำหรับการสร้างแอลกอฮอล์ ดังนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจาก Zymomonas จะมีปริมาณมากกว่าจากยีสต์

2) คุณภาพของเอทานอลที่ได้ เอทานอลที่ผลิตจาก Zymomonas จะมี higher alcohol เชื้อปนอยู่ 0.6 มิลลิกรัมต่อน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ซึ่งน้อยกว่ายีสต์พวก Saccharomyces ที่หมักในสภาพเดียวกันถึง 40 เท่า

- 3) ความสามารถในการเจริญในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง *Zymomonas* ส่วนใหญ่สามารถเจริญและหมักให้ได้แอลกอฮอล์ในสภาวะที่มีน้ำตาลเข้มข้นถึง 25% และบางสายพันธุ์ถึง 30%
- 4) ความสามารถในการเจริญในที่ที่มีแอลกอฮอล์สูง *Zymomonas* ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในเอทานอล 5.5% และมีบางสายพันธุ์ที่ทนได้ถึง 7.7% และ 10% ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถเจริญและหมักให้ได้แอลกอฮอล์ในสภาพที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง
- 5) ความสามารถเจริญในสภาพที่มีกรดสูง โดย *Zymomonas* สามารถเจริญในสภาพที่มี pH 3.5-4.0 ซึ่งจัดว่าเป็น pH ที่ต่ำมากสำหรับแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีสำหรับป้องกันการปะปนของเชื้ออื่น
- 6) ความทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) พบว่า *Zymomonas* ทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ถึง 500 ส่วนในล้าน (ppm) ซึ่งเป็นปริมาณที่แบคทีเรียและจุลินทรีย์หลายชนิดถูกยับยั้ง ลักษณะเช่นนี้เป็นประโยชน์เมื่อใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นตัวทำลายเชื้อที่ปะปนมาและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ตกค้างอยู่จะไม่มีผลต่อการเจริญของ *Zymomonas*
- 7) การตกตะกอนของ *Zymomonas* จะมีการตกตะกอนจับตัวกันในลักษณะที่เรียกว่า flocculation ซึ่งเหมาะและสะดวกในการแยกเซลล์ออกจากหมัก

3.1.3.1.2 อาหาร หมายถึง สารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งใช้ในการดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ สารอาหารที่จำเป็นได้แก่

ก. คาร์บอน คาร์บอนเป็นสารอาหารหลักที่แบคทีเรียต้องได้รับเพียงพอ เพื่อการดำรงชีวิตและการขยายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส ได้โดยใช้ขบวนการแบบเอนเทอร์-ดูโดรอฟฟ์ (Entner-Doudoroff pathway) ดังรูปที่ 3.6 ในการย่อยสลายได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนั้นยังมีกรดแลคติก (lactic acid) และอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เกิดขึ้นเล็กน้อย ในน้ำหมักที่มี yeast extract จะมีกรดซัคซินิก (succinic acid) เกิดขึ้นด้วยเนื่องจากกรดอะมิโน (amino acid) ใน yeast extract เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) และถ้าหมักในน้ำหมักที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีในระยะ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจะใช้น้ำตาลกลูโคสได้เกือบหมดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 2 วัน สมการการใช้น้ำตาลกลูโคสแสดงได้ดังสมการ



ข. ไนโตรเจน ในน้ำหมักที่มี peptone หรือ yeast extract เชื้อ *Zymomonas mobilis* จะมี generation time ต่ำสุดและผลิตเอทานอลได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อพันธุ์นี้ในน้ำหมักที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแหล่งอื่น เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับเชื้อสายพันธุ์นี้ yeast extract ไม่ใช่แหล่งพลังงานแต่เกี่ยวข้องโดยตรงกับขบวนการสังเคราะห์ทางชีววิทยา (biosynthesis) เช่น การสร้างสารที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์สำหรับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ที่ใช้ในน้ำหมัก

ค. เกลือแร่ วิตามินชนิดต่างๆ ชนิดของแร่ธาตุที่แบคทีเรียต้องการจะแตกต่างกันไปในแบคทีเรียแต่ละชนิด สำหรับ *Zymomonas mobilis* เจริญและผลิตเอทานอลได้ในน้ำหมักที่มีองค์ประกอบของ KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ โดย KH_2PO_4 ทำหน้าที่เป็นแหล่งฟอสเฟต ส่วน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จะมีผลต่อการย่อยสลายกลูโคส คือ ถ้ามีอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้การย่อยสลายกลูโคสเป็นไปด้วยดี และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ glucose-6-phosphate dehydrogenase

3.1.3.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของกระบวนการหมัก มีผลต่อเมตาโบลิซึมของเซลล์ ซึ่งอาจมีผลทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดชะงักลง การเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการหมัก จะช่วยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบไว้ได้อย่างดี นอกจากนี้ยังสามารถลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญของ *Zymomonas mobilis* จะอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 7.0

3.1.3.1.4 อุณหภูมิ มีผลโดยตรงกับการเจริญของแบคทีเรีย รวมทั้งจลนพลศาสตร์ของการหมัก ซึ่งอัตราการเจริญของแบคทีเรียจะสูงขึ้นตามอุณหภูมิจนถึงจุดหนึ่ง ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงเกินจุดนี้ไปแบคทีเรียจะเจริญได้ช้าลง และตายไปในที่สุด และกระบวนการหมักเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน (exothermic process) จึงมีการคายความร้อนออกมา ซึ่งถ้าปล่อยให้มีการคายความร้อนออกมามากเกินอาจทำให้แบคทีเรียตายได้ ดังนั้นจึงต้องปรับให้ได้ตามความสามารถของแบคทีเรีย นอกจากนี้พบว่าอุณหภูมิมียผลต่ออัตราการใช้น้ำตาล ซึ่งจะลดลงตามค่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของ *Zymomonas mobilis* จะอยู่ในช่วง 30 ถึง 38 องศาเซลเซียส

3.1.3.1.5 การให้อากาศ (aeration) การให้อากาศในเครื่องหมักมีความจำเป็นและสำคัญสำหรับการหมักแบบได้พื้นผิวของจุลินทรีย์ที่ต้องใช้ออกซิเจน เพราะออกซิเจนจากอากาศที่

ละลายในน้ำหมักมีน้อยมาก และมีเฉพาะที่บริเวณใกล้ๆ พื้นผิวสัมผัสของอากาศกับน้ำหมักเท่านั้น ส่วนได้ผิวของน้ำหมักที่ลึกลงไปจะไม่มีออกซิเจนอยู่เลย ยีสต์ส่วนใหญ่ที่ผลิตเอทานอลในชั้นอุตสาหกรรมจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการหายใจและสร้างเซลล์ เป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อในกระบวนการหมัก ดังนั้นการให้อากาศจึงจำเป็นต้องกระทำอย่างเพียงพอ แต่ *Zymomonas mobilis* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์จะมีค่าสูง เมื่อทำสภาวะการหมักให้ปราศจากออกซิเจนอย่างแท้จริง ดังแสดงในตารางที่ 3.5 ถึงแม้ในสภาวะที่มีออกซิเจน *Zymomonas* จะเจริญและสามารถผลิตเอทานอลได้แต่ขณะเดียวกัน ก็จะได้ผลิตภัณฑ์สารประกอบชนิดอื่นๆ ออกมามากด้วยซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ ดังนั้นในการใช้เชื้อ *Zymomonas* จึงไม่ต้องทำการเติมอากาศแต่อย่างใด ทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายทางด้านพลังงานลงได้

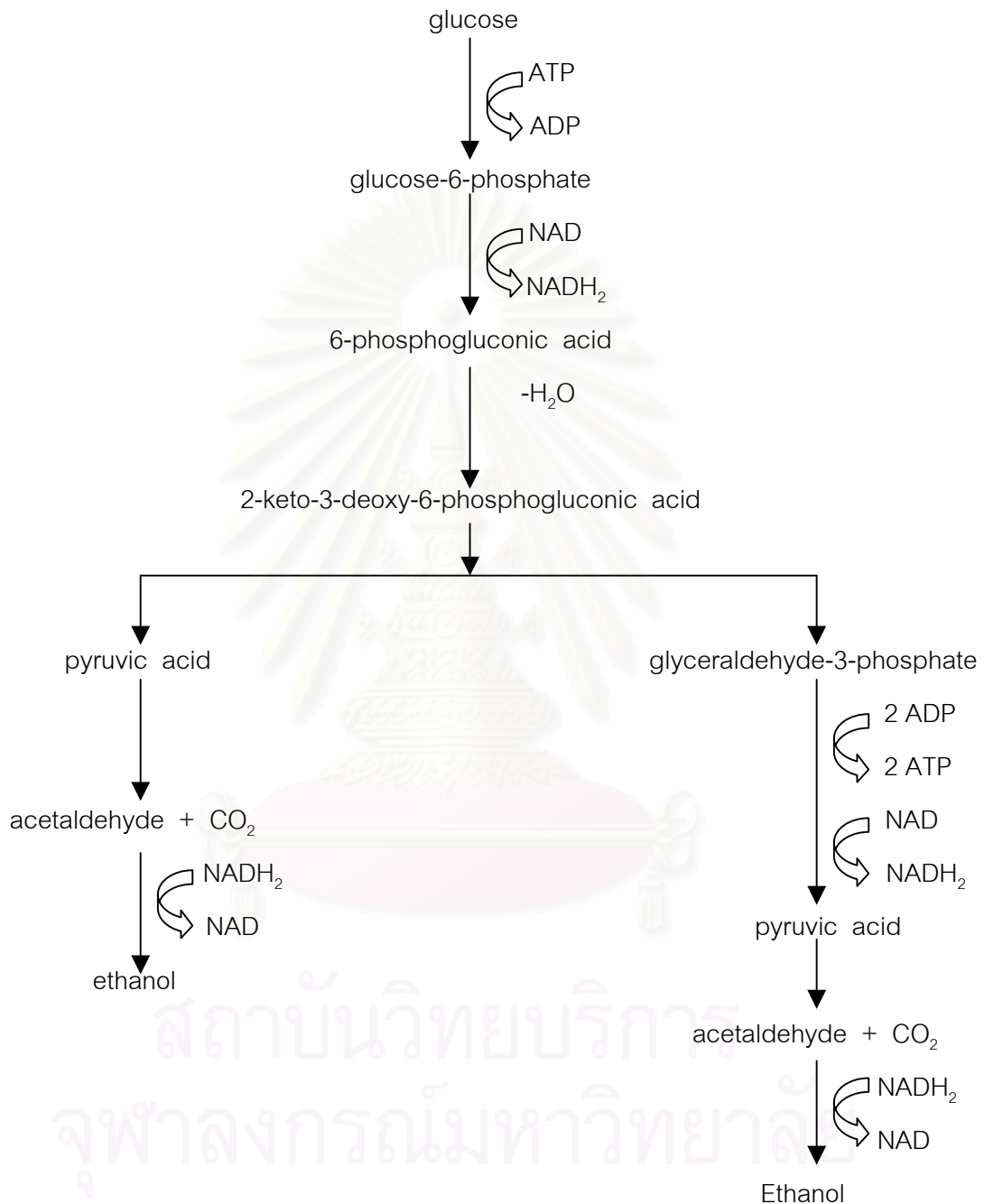
ตารางที่ 3.5 อิทธิพลของออกซิเจนที่มีต่อการหมักของ *Zymomonas*

สารประกอบที่เชื้อผลิตขึ้น	ปริมาณผลิตภัณฑ์เมื่อเติมออกซิเจนในปริมาณ (โมล)		
	0	0.6	1.5
CO ₂	1.94	1.96	1.91
ethanol	1.99	1.91	1.7
acetaldehyde	-	0.021	0.17
acetoin	-	0.01	0.04
acetic acid	0.01	0.06	0.03
lactic acid	0.002	0.002	0.004
glycerol	0.004 - 0.03	0.009	0.019

3.1.3.2 ชีวเคมีของกระบวนการผลิตเอทานอลโดยการหมัก

Zymomonas จะใช้ขบวนการแบบเอนเนอร์ – ดูโดรอฟฟ์ (Entner – Doudoroff pathway) ในการผลิตเอทานอล คือกลูโคส 1 โมเลกุลเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate ต้องใช้พลังงาน 1 ATP จาก glucose-6-phosphate ถูกเปลี่ยนเป็น 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic acid แล้วจึงได้เป็น pyruvate 1 โมเลกุล กับ glyceraldehyde-3-phosphate อีก 1 โมเลกุล ในขบวนการแบบนี้ glyceraldehyde-3-phosphate ที่เกิดขึ้น 1 โมเลกุลนี้จะเปลี่ยน

เป็น pyruvate 1 โมเลกุลได้โดยจะให้พลังงานออกมา 2 ATP จาก pyruvate จะเปลี่ยนเป็นเอทานอลในขั้นสุดท้ายได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 แผนภาพแสดงขบวนการเอทานอร์-คูไดรอฟฟี ของ *Zymomonas mobilis*

3.1.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

Skotnicki et al. (1981) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส โดยการเปรียบเทียบ *Zymomonas mobilis* สายพันธุ์ต่างๆ ได้ผลการทดลองดังตาราง

สายพันธุ์	กลูโคส (100 g/l)		ซูโครส (100 g/l)	
	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)	เอทานอล (g/l) ที่ 20 ชั่วโมง	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)	เอทานอล (g/l) ที่ 20 ชั่วโมง
ATCC 10988	2.8	25.7	2.5	23.2
Ag11	1.3	26.0	1.0	24.0
B70	1.5	22.0	1.8	25.1
CP4	1.2	33.7	1.5	25.0
3TH Delft	3.7	20.3	0	23.6
Zabi	2.4	14.3	1.8	25.0
Z6	1.4	27.5	1.0	29.2
ATCC 29192	2.4	31.0	>24	0
238	3.8	12.7	>24	0
S30.2	4.0	30.3	>24	0
S30.A	3.8	26.6	>24	0

จากตารางพบว่า ถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมัก *Zymomonas* สายพันธุ์ CP4 Ag11 และ Z6 จะใช้เวลาในการผลิตเอทานอลน้อยกว่าสายพันธุ์อื่น และถ้าใช้น้ำตาลซูโครสในการหมัก *Zymomonas* สายพันธุ์ S30.A, S30.2, 238 และ ATCC 29192 จะใช้เวลาในการผลิตเอทานอลเกิน 24 ชั่วโมง ดังนั้น *Zymomonas* สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณเอทานอลในปริมาณมากและใช้เวลา น้อยคือ *Zymomonas* สายพันธุ์ ATCC 10988, Ag11, CP4 และ Z6

Kademi A. และ Baratti J. (1996) ศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* MSN 77 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 โดยใช้ น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไม้แอสเพน จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร จะให้เอทานอลสูงสุด ที่ 30.15 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเอทานอล สูงสุดเป็น 2.0 กรัมต่อลิตร·ชั่วโมง

Reddy O.V.S. และ Basappa S.C. (1996) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังด้วยกระบวนการผลิตแบบ SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เชื้อ *Endomycopsis fibuligera* NRRL 76 และ *Zymomonas mobilis* พบว่าถ้าใช้การหมักแบบ mixed culture จะสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าการหมักแบบ monoculture โดยสามารถผลิตเอทานอลได้ 10.5 %v/v จากแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 22.5 %w/v และถ้าเติมเอนไซม์ กลูโคสไมเลส 0.01% ในกระบวนการหมักแบบ SSF จะสามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นเป็น 13.2 %v/v

Horst W.D. และ Paul F.G. (1985) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส โดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39767) ทำการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 6 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจนถึง 200 กรัมต่อลิตร จะได้ประสิทธิภาพของการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นเอทานอลมากกว่า 90 % และใช้เวลาในการหมักไม่เกิน 32 ชั่วโมง แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมากกว่า 200 กรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นเอทานอลที่ได้จะลดลง ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 200 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดถึง 95.5 กรัมต่อลิตร และได้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นเอทานอล 94.1 % ใช้เวลาในการหมัก 32 ชั่วโมง

นริศ ธนัทประภัสร์ และ พรรณี จันทรปฐุมพงศ์ (2525) ได้ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 จากการทดลองพบว่า

- 1) เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอช 5.0-5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- 2) เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 % (โดยน้ำหนัก) เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ 4.5 % ในเวลา 17.5 ชั่วโมง
- 3) เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 15 % (โดยน้ำหนัก) เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ 9.3 % ในเวลา 9 วัน
- 4) จากการศึกษารูปแบบของการเติมอาหารเสริม yeast extract เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารเสริม yeast extract มีผลต่อการผลิตเอทานอล และการเจริญเติบโตของเชื้อ *Zymomonas mobilis*

สรวง อุดมวรภัณฑ์ และคณะ (2525) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของ *Zymomonas mobilis* UQM 410 (ATCC 10988) กับความสามารถในการผลิตเอทานอลจากการทดลองพบว่า

- 1) สูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Zymomonas mobilis* UQM 410 ในการผลิตเอทานอลที่เหมาะสมที่สุดคือ สารสกัดยีสต์ (yeast extract) 0.1 %, แอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 0.1 %, โบแทสเซียมไดไฮโดรเจนอโทฟอสเฟต $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ 0.15 % และแมกนีเซียมซัลเฟต $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ 0.05 %
- 2) ในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 4.5 - 8.5 จะไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล แต่จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5 - 6 นั้นเป็นช่วงที่มี lag phase สั้นที่สุด และสามารถผลิตเอทานอลได้เร็วที่สุด
- 3) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อคืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- 4) เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 15 % โดยสามารถผลิตเอทานอลได้ 5.3 % ในเวลา 48 ชั่วโมง

ระวีวรรณ แก้วกล้า (2538) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5013 พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จะได้เอทานอลเข้มข้น 1.3 % โดยปริมาตร

สันทนา เสถียรไพศาล (2539) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยป่านครนารานต์ด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Acrophialophora* sp. และยีสต์ *Candida brassicae* IFO 1664 โดยการรวมปฏิบัติการย่อยสลายและการหมักไว้เป็นขั้นตอนที่ต่อเนื่องในถังหมักเดียวกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation) พบว่าค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.9125 เปอร์เซ็นต์ (0.3042 กรัมต่อกรัมสับสเตรท) และการเติม casein peptone เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ soy peptone เข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารเสริม สามารถผลิตเอทานอลได้ 1.267 เปอร์เซ็นต์ (0.422 กรัมต่อกรัมสับสเตรท) และ 0.9301 เปอร์เซ็นต์ (0.310 กรัมต่อกรัมสับสเตรท) ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าสับสเตรทที่ไม่มีการเติมอาหารเสริม 1.76 และ 1.29 เท่าตามลำดับ

บทที่ 4

เคมีภัณฑ์ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

4.1 เคมีภัณฑ์

- 4.1.1. เหม่ง้ำมันสำปะหลัง
- 4.1.2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] ของบริษัท Merck, Germany.
- 4.1.3. โซเดียมโบรเมตไฮดรอกไซด์ [KNaC₄H₄O₆·4H₂O] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.4. โบรเมตไฮดรอกไซด์โครเมต [K₂Cr₂O₇] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.5. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก [C₇H₄N₂O₇] ของบริษัท Fluka chemika, Switzerland
- 4.1.6. กรดซิตริก [COOHCH₂C(OH)COOHCH₂COOH·H₂O] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.7. โซเดียมซัลเฟต [Na₂C₆H₅O₇·2H₂O] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.8. ฟีนานโทรอลีนโมโนไฮเดรต [C₁₂H₈N₂·H₂O] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.9. กรดซัลฟูริก [H₂SO₄] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.10. เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต [(NH₄)₂SO₄·FeSO₄6H₂O] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.11. เฟอร์รัสซัลเฟต [FeSO₄·7H₂O] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.12. กลูโคส [C₆H₁₂O₆] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.13. เอทานอล 99.8 % [C₂H₆O] ของบริษัท Merck, Germany.
- 4.1.14. กรดไฮโดรคลอริก [HCl] ของบริษัท Merck, Germany.
- 4.1.15. แอมโมเนียมซัลเฟต [(NH₄)₂SO₄] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.16. โบรเมตไฮดรอกไซด์ไฮโดรเจนอโทฟอสเฟต [KH₂PO₄] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

- 4.1.17. แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4 \cdot 7H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.
- 4.1.18. สารสกัดยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Merck, Germany
- 4.1.19. อาการ์ (bacto – agar) ของบริษัท Difco, USA
- 4.1.20. น้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำกรองผ่านไส้กรองเรซิน และเยื่อแผ่นเซรามิก 0.2 ไมครอน

4.2 เอนไซม์

- 4.2.1 เซลลูบริกซ์ (Cellubrix) ของบริษัท อีส เอเชียติก ประเทศไทย จำกัด (มหาชน)

4.3 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง

- 4.3.1 เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer / hot plate) รุ่น RCT basic ของบริษัท Ika labortechnik , Germany.
- 4.3.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KUBOTA 5100 ของบริษัท Kubota corporation, Japan.
- 4.3.3 เครื่องกวน (stirrer) รุ่น RW20ZM.n. ของบริษัท Ika labortechnik , Germany.
- 4.3.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Julabo ของบริษัท Labartechnik GMBH, Germany.
- 4.3.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments, USA.
- 4.3.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digits balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
- 4.3.7 เครื่องคัดขนาดอนุภาค (seiving)
- 4.3.8 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BH - 2 ของบริษัท OLYMPUS , Japan.
- 4.3.9 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น VS-124 ของบริษัท ISSCO, USA.
- 4.3.10 หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HL24ADY ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

- 4.3.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
- 4.3.12 เครื่องกลั่นแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan
- 4.3.13 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (hot air oven) รุ่น ULM500 ของบริษัท Memmert, Germany

4.4 เชื้อจุลินทรีย์

- 4.4.1 เชื้อ *Zymomonas mobilis* strain TISTR 405 ซึ่งเป็น strain เดียวกันกับ ATCC 10988 สั่งซื้อจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท)

4.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.5.1 อาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็ง เอียง (nutrient agar slant) มีสูตรอาหารดังนี้คือ

4.5.1.1	กลูโคส	2.5 %
4.5.1.2	สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	1.0 %
4.5.1.3	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนอโทฟอสเฟต [KH_2PO_4]	0.15 %
4.5.1.4	แอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	0.1 %
4.5.1.5	แมกนีเซียมซัลเฟต [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$]	0.05 %
4.5.1.6	เอการ์ (bacto-agar)	2.0 %

- 4.5.2 อาหารเหลวสำหรับเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น

4.5.2.1	กลูโคส	4.0 %
4.5.2.2	สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	1.0 %
4.5.2.3	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนอโทฟอสเฟต [KH_2PO_4]	0.15 %
4.5.2.4	แอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	0.1 %
4.5.2.5	แมกนีเซียมซัลเฟต [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$]	0.05 %

4.6 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

4.6.1 วิธีเก็บรักษาแบบระยะยาว

เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (lyophilization) ซึ่งเป็นการทำให้เซลล์แข็งตัวในสภาพสุญญากาศ เมื่อต้องการนำออกมาใช้จึงนำออกมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว เพื่อเพิ่มปริมาณและบำรุงเซลล์ให้แข็งแรง ระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้เชื้อจะไม่มีอาการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์อย่างแน่นอน

4.6.2 วิธีเก็บรักษาแบบระยะสั้น

เชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง (agar slant) ที่มีสูตรอาหารตามข้อ 4.5.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บเชื้อได้นานประมาณ 2 สัปดาห์

4.7 วิธีการทดลอง

4.7.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง

นำเหง้ามันสำปะหลังมาล้างด้วยน้ำประปาหลายครั้งจนสะอาดแล้วนำมาตากให้แห้ง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด นำมาร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดเล็กกว่า 0.25 มิลลิเมตร และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ในเหง้ามันสำปะหลัง ได้แก่ เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยใช้วิธีใน TAPPI 203 om-88 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก) หลังจากนั้นทำการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีก่อนนำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยมีวิธีการต่างๆ ดังนี้

4.7.1.1 แช่เหง้ามันสำปะหลังที่บดแล้วในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 โมลาร์ ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเหง้ามันสำปะหลังต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 1 ต่อ 10 ที่อุณหภูมิห้อง โดยเหง้ามันสำปะหลังแช่อยู่ในสารละลายตลอดเวลา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.7.1.2 หลังแช่เหง้ามันสำปะหลังครบ 24 ชั่วโมงแล้ว นำมากรองสารละลายไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ออกด้วยผ้ากรอง แล้วเติมลงไปใหม่โดยใช้ความเข้มข้นเดียวกับความเข้มข้นที่ใช้แช่ในอัตราส่วนเดิม นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30, 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

4.7.1.3 นำเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว นำมากรองผ่านผ้ากรองแล้วล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น จนน้ำล้างตะกอนมีสภาพเป็นกลาง (pH ประมาณ 7.0) โดยการทดสอบด้วยกระดาษลิตมัสโดยต้องไม่เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเหง้ามันสำปะหลังที่หายไปในช่วงการปรับสภาพ และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณส่วนประกอบต่างๆในเหง้ามันสำปะหลัง ได้แก่ เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยใช้วิธีใน TAPPI 203 om-88 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

4.7.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ

4.7.2.1 การหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

การหาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง โดยใช้วิธีของ Mandel และ Sternbery (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ (FPU) คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

4.7.2.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสม

ซึ่งตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยวิธีการที่เหมาะสมจากข้อ 4.7.1 น้ำหนัก 51.8 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.0-6.0 จากนั้นเติมปริมาณเอนไซม์เซลลูบริกซ์เข้มข้น 54 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง และนำไปทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นลง ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีของ

Mandel และ Sternbery (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยน
 เหน้้ำมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

4.7.2.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.7.2.2 แต่ใช้สารละลายซีเตรต
 บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้สูงที่สุด นำไปทำปฏิกิริยาใน
 อ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่โดยแปรผันค่าของอุณหภูมิในช่วง 35-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ผลิตได้จากการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ และคำนวณ
 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหน้้ำมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

4.7.2.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบรีกซ์ต่อการย่อย สลายเหน้้ำมันสำปะหลัง

4.7.2.4.1 การเปรียบเทียบการย่อยกระดาษกรอง, เหน้้ำมันสำปะหลังแห้ง
 และเหน้้ำมันสำปะหลังเปียกโดยใช้เอนไซม์เซลลูบรีกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.7.2.2 โดยใช้กระดาษกรอง, เหน้
 น้ำมันสำปะหลังแห้ง และเหน้้ำมันสำปะหลังเปียกในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด
 ต่างที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้สูงที่สุด โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์เซลลูบรีกซ์ที่
 ความเข้มข้น 20, 80 และ 140 หน่วยเอนไซม์ FPU ต่อกรัมเหน้้ำมันสำปะหลัง นำไปทำปฏิกิริยาใน
 อ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.7.2.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบ
 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหน้้ำมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

4.7.2.4.2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบรีกซ์ในการย่อยเซลลูโลสใน
 เหน้้ำมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศา
 เซลเซียส

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.7.2.4.1 โดยใช้เหน้้ำมันสำปะหลัง
 ที่ได้จากข้อ 4.7.2.4.1 โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์เซลลูบรีกซ์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.8-140
 หน่วย FPU ต่อกรัมเหน้้ำมันสำปะหลัง

4.7.2.5 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสม

ซึ่งตะกอนแห้งำมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 51.8 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองจำนวน 11 หลอด เติมสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมจากข้อ 4.7.2.2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์เซลลูโลสในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.7.2.4 นำไปทำปฏิกิริยาพร้อมกันในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.7.2.3 เก็บตัวอย่างสารละลายที่ละหลอดไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 30 และ 50 ของการย่อย และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแห้งำมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เวลาต่างๆ

4.7.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Zymomonas mobilis* เพื่อผลิตเอทานอล

4.7.3.1 การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นในข้อ 4.5.2 โดยให้มีปริมาตรทั้งสิ้น 500 มิลลิลิตร แล้วถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียวประมาณ 12-14 หลอด หลอดละ 14 มิลลิลิตร และใส่ในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นใช้เข็มเย็บเชื้อ เย็บเชื้อ 1 ลูกจาก agar slant ใส่ลงหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองลงในน้ำหมักในขวดรูปชมพู่ที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในตู้ปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปใช้เป็นเชื้อหมักเริ่มต้น

4.7.3.2 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลรีดิวซ์ในการผลิตเอทานอล

4.7.3.2.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ

โดยเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสในแห้งำมันสำปะหลังให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 10 กรัมต่อลิตร, 25 กรัมต่อลิตร และ 40 กรัมต่อลิตร ด้วยเครื่องกลั่นแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) นำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาปรับค่าความเป็นกรดต่างให้มีค่าเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เติมสารอาหารที่จำเป็นตามข้อ 4.5.2 แต่ไม่ต้องเติมกลูโคส

4.7.3.2.2 การเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ให้ปราศจากเชื้อ

นำสารละลายจากข้อ 4.7.3.2.1 ถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียว ประมาณ 6-8 หลอด หลอดละ 14 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

4.7.3.2.3 การหมัก

ทำการถ่ายเชื้อหมักเริ่มต้นจากข้อ 4.7.3.1 ลงในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วจากข้อ 4.7.3.2.2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ในตู้ปลอดเชื้อ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทีละหลอดตามเวลา นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น

4.7.3.3 ศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของน้ำตาลรีดิวซ์ในการผลิตเอทานอล

4.7.3.3.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ให้มีความเป็นกรดต่าง ๆ เตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ

4.7.3.2 นำมาปรับค่าความเป็นกรดต่างให้มีค่าเท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เติมสารอาหารที่จำเป็นตามข้อ 4.5.2 แต่ไม่ต้องเติมกลูโคส

4.7.3.3.2 การเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ให้ปราศจากเชื้อ

นำสารละลายจากข้อ 4.7.3.3.1 ถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียว ประมาณ 6-8 หลอด หลอดละ 14 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

4.7.3.3.3 การหมัก

ทำการถ่ายเชื้อหมักเริ่มต้นจากข้อ 4.7.3.1 ลงในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วจากข้อ 4.7.3.3.2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ในตู้ปลอดเชื้อ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทีละหลอดตามเวลา นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น

4.7.3.4 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลกลูโคส

4.7.3.4.1 การเตรียมน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นเป็น 10 กรัมต่อลิตร, 25 กรัมต่อลิตร และ 40 กรัมต่อลิตร นำน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ มาปรับค่าความเป็นกรดต่าง ให้มีค่าเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เติมสารอาหารที่จำเป็นตามข้อ 4.5.2 แต่ไม่ต้องเติมกลูโคส

4.7.3.4.2 การเตรียมน้ำตาลกลูโคสให้ปราศจากเชื้อ

นำสารละลายจากข้อ 4.7.3.4.1 ถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียว ประมาณ 8-14 หลอด หลอดละ 14 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

4.7.3.4.3 การหมัก

ทำการถ่ายเชื้อหมักเริ่มต้นจากข้อ 4.7.3.1 ลงในสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ฆ่าเชื้อแล้วจากข้อ 4.7.3.4.2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ในตู้ปลอดเชื้อ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างที่ละหลอดตามเวลา นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น

บทที่ 5

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 ผลจากการศึกษาการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง

5.1.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี พบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่ในเหง้ามันสำปะหลัง เป็นเซลลูโลส 82.14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่เหลือเป็นเฮมิเซลลูโลส 11.41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และลิกนิน 6.45 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
เซลลูโลส	82.14
เฮมิเซลลูโลส	11.41
ลิกนิน	6.45

ผลจากการวิเคราะห์ พบว่าเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่พบมากที่สุดที่พบมากที่สุดในเหง้ามันสำปะหลัง จึงเป็นแรงจูงใจที่จะทำการศึกษาและวิจัยเพื่อนำเหง้ามันสำปะหลังกลับมาใช้ประโยชน์ให้คุ้มค่า โดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกลูโคส เนื่องจากกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น แอลกอฮอล์ กรดซิตริก ผงชูรส ซอร์บิทอล อุตสาหกรรมอาหารต่างๆ และเป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหารเป็นต้น การผลิตกลูโคสจากเหง้ามันสำปะหลังจึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทางหนึ่ง

เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย คือ เหน้้ำมันสำปะหลัง ซึ่งยังมีเฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นส่วนประกอบอยู่ในโครงสร้าง และเป็นตัวขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นขั้นตอนแรกจึงต้องทำการปรับสภาพเหน้้ำมันสำปะหลัง เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากโครงสร้าง และปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

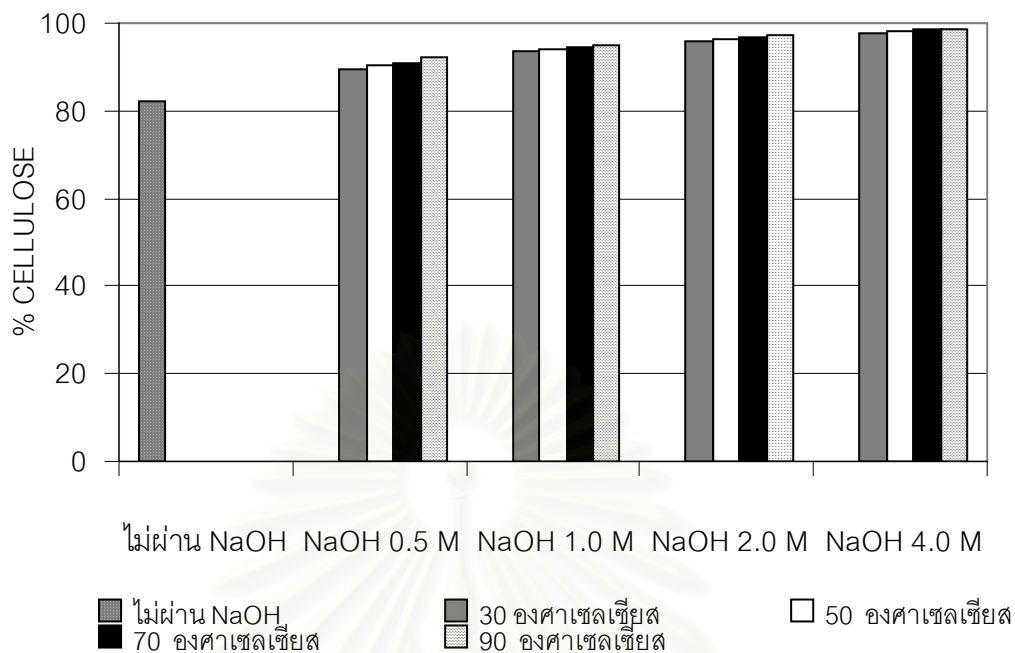
5.1.2 การศึกษาการปรับสภาพเหน้้ำมันสำปะหลังโดยใช้สารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ

จากการทดลองโดยการแช่เหน้้ำมันสำปะหลังที่บดแล้ว ในสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเหน้้ำมันสำปะหลังต่อสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่ความเข้มข้นและอัตราส่วนเดียวกับที่แช่ ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 90 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 และ 5.5

จากตารางที่ 5.1 รูปที่ 5.1 และรูปที่ 5.2 พบว่าเมื่อนำเหน้้ำมันสำปะหลังมาปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด จะมีปริมาณเซลลูโลสอยู่ 82.14 % และเมื่อนำมาผ่านการปรับสภาพทางเคมีโดยใช้สารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น และอุณหภูมิต่างๆ กันจะได้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณเฮมิเซลลูโลสกับลิกนินลดลง อธิบายได้ว่าสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ เข้าไปทำปฏิกิริยาสลายพันธะของโครงสร้างโมเลกุลระหว่างลิกนินและเซลลูโลส ทำให้โครงสร้างโมเลกุลเกิดการแตกออก เมื่อดำน้ำทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา และสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ยังเข้าไปทำให้เกิดการพองตัวของโครงสร้างของเซลลูโลสอีกด้วย (Christakopoulos P. และคณะ, 1991; Soto M.L. และคณะ, 1994; Johan Gallichsen และ Hannu Paulapuro, 2000)

ตารางที่ 5.2 ผลการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพ โดยการบด และผ่านการปรับสภาพทางเคมีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น และอุณหภูมิต่างๆ

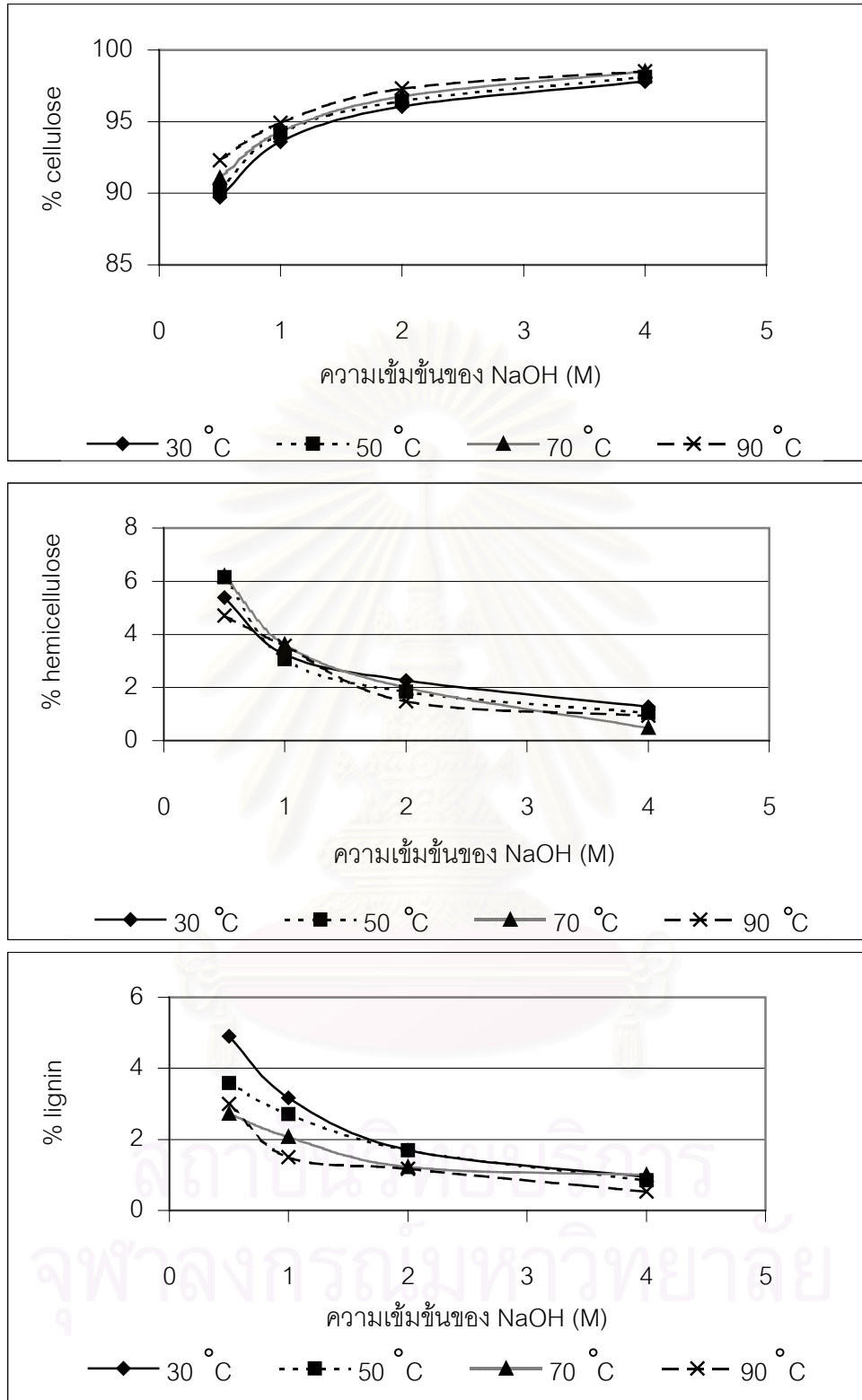
ความเข้มข้น ของ NaOH (M)	อุณหภูมิ ที่ใช้ต้ม (°C)	ปริมาณส่วนประกอบในตะกอน เหง้ามันสำปะหลัง (%น้ำหนักแห้ง)			น้ำหนักเหง้ามันสำปะหลัง ที่หายไปในการปรับสภาพ (%)	% yield
		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน		
0.5	30	89.72	5.38	4.90	20.18	71.61
	50	90.26	6.15	3.59	20.93	71.37
	70	91.08	6.20	2.72	20.57	71.43
	90	92.29	4.71	3.00	23.87	70.26
1.0	30	93.59	3.24	3.17	21.32	73.64
	50	94.22	3.07	2.71	21.87	73.62
	70	94.30	3.63	2.07	22.54	73.05
	90	94.92	3.58	1.50	24.33	71.83
2.0	30	96.05	2.26	1.69	23.71	73.28
	50	96.46	1.85	1.69	25.15	72.20
	70	96.77	2.01	1.22	25.96	71.65
	90	97.33	1.49	1.18	28.91	69.19
4.0	30	97.79	1.27	0.94	26.27	72.10
	50	98.11	1.04	0.85	26.74	71.88
	70	98.52	0.48	1.00	28.84	70.11
	90	98.52	0.94	0.54	29.43	69.53



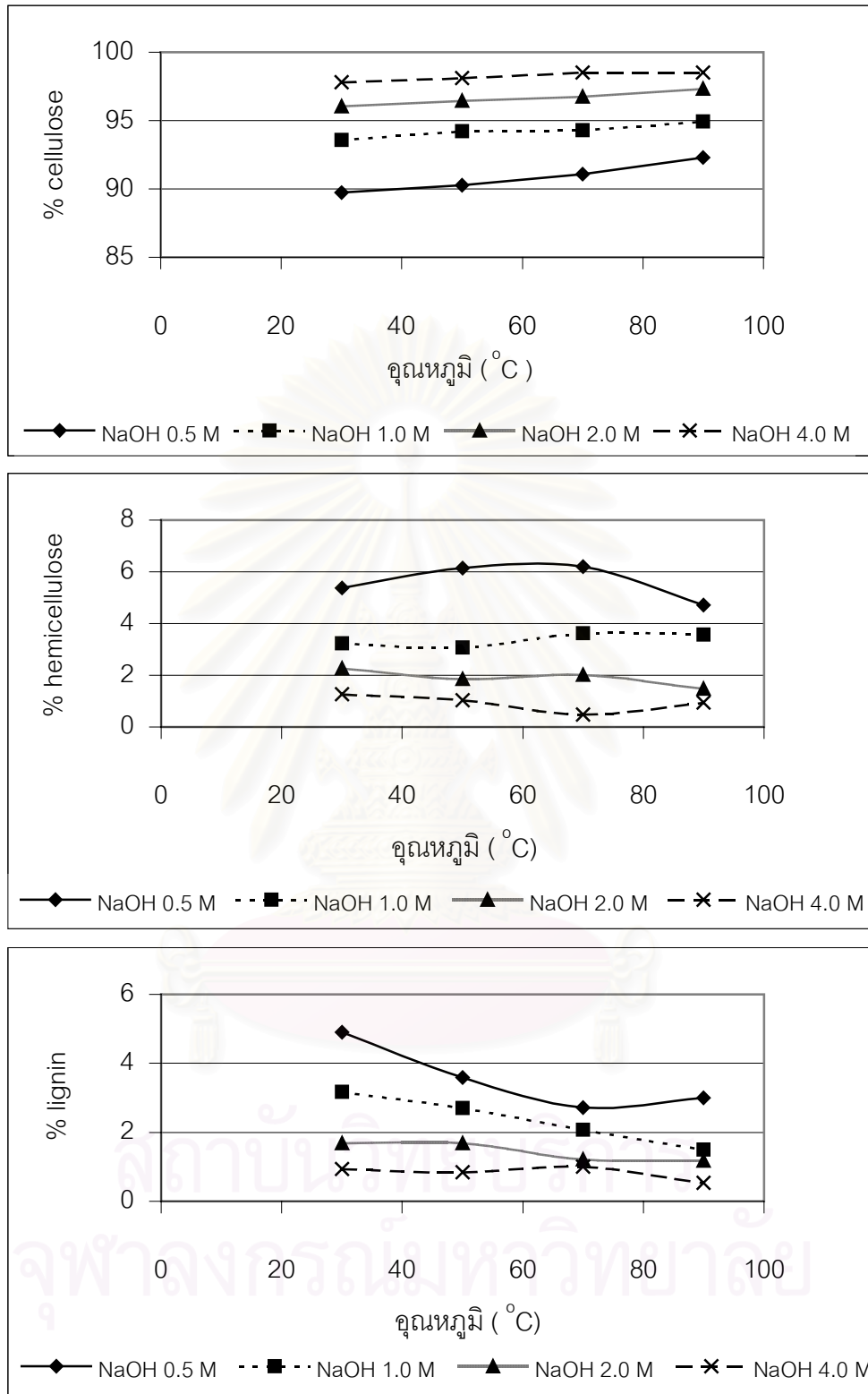
รูปที่ 5.1 ปริมาณเซลลูโลสในตะกอนแห้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และ หลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและ อุณหภูมิต่างๆ

จากตารางที่ 5.2 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้น จะมี น้ำหนักของแห้งมันสำปะหลังที่หายไปในช่วงการปรับสภาพสูงขึ้นด้วย

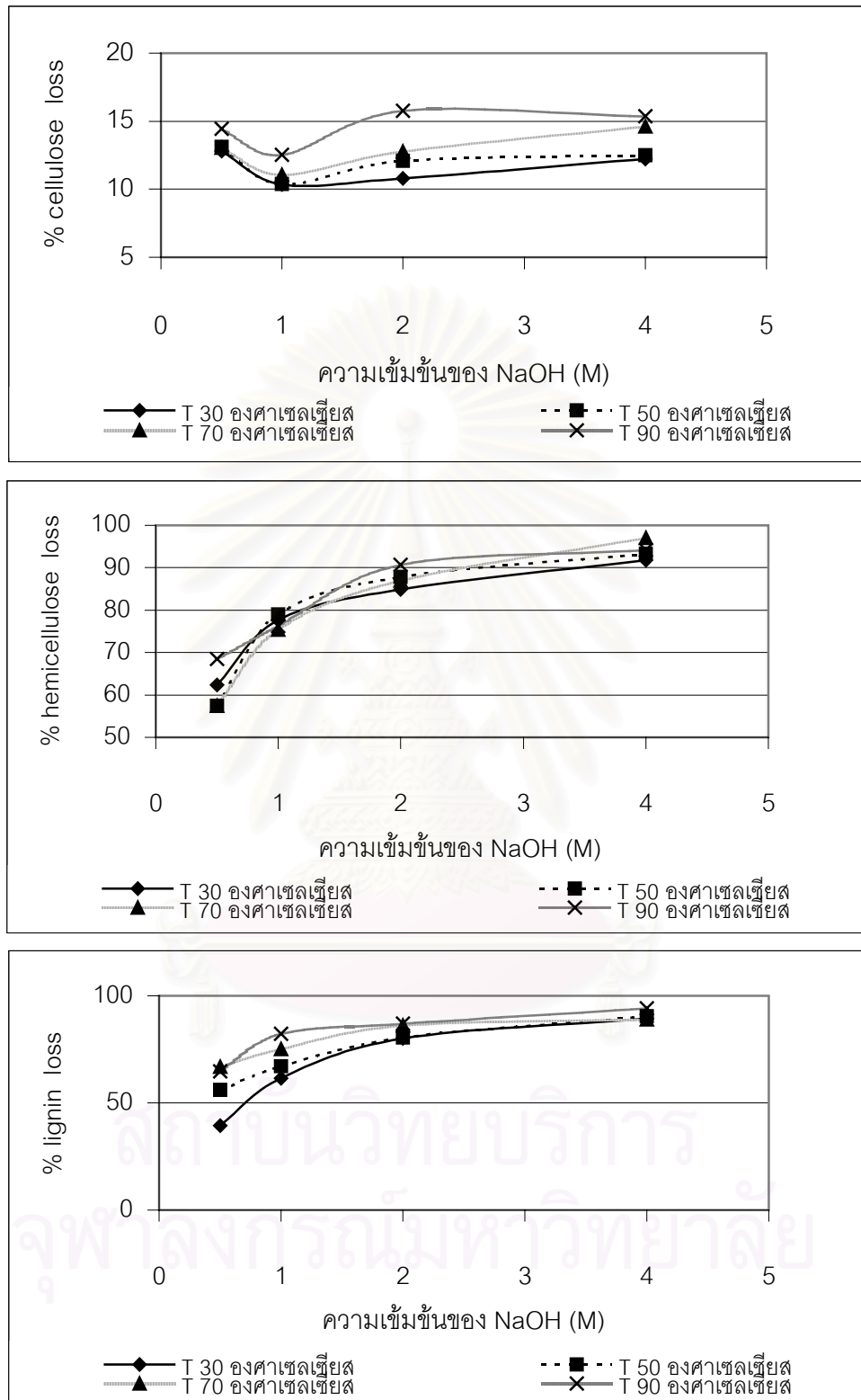
จากรูปที่ 5.2 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ในตะกอนแห้งมันสำปะหลังหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้น ทำให้ตะกอนแห้งมันสำปะหลังมีเปอร์เซ็นต์เซลลูโลสเพิ่มขึ้น และเฮมิเซลลูโลสกับลิกนินลดลง เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าไปทำปฏิกิริยาละลายพันธะของโครงสร้างระหว่างลิกนินและเซลลูโลส จึงทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสหลุดออกมาจากตะกอนแห้งมันสำปะหลังได้มากขึ้น (Christakopoulos P. และคณะ, 1991; Soto M.L. และคณะ, 1994; Johan Gallichsen และ Hannu Paulapuro, 2000)



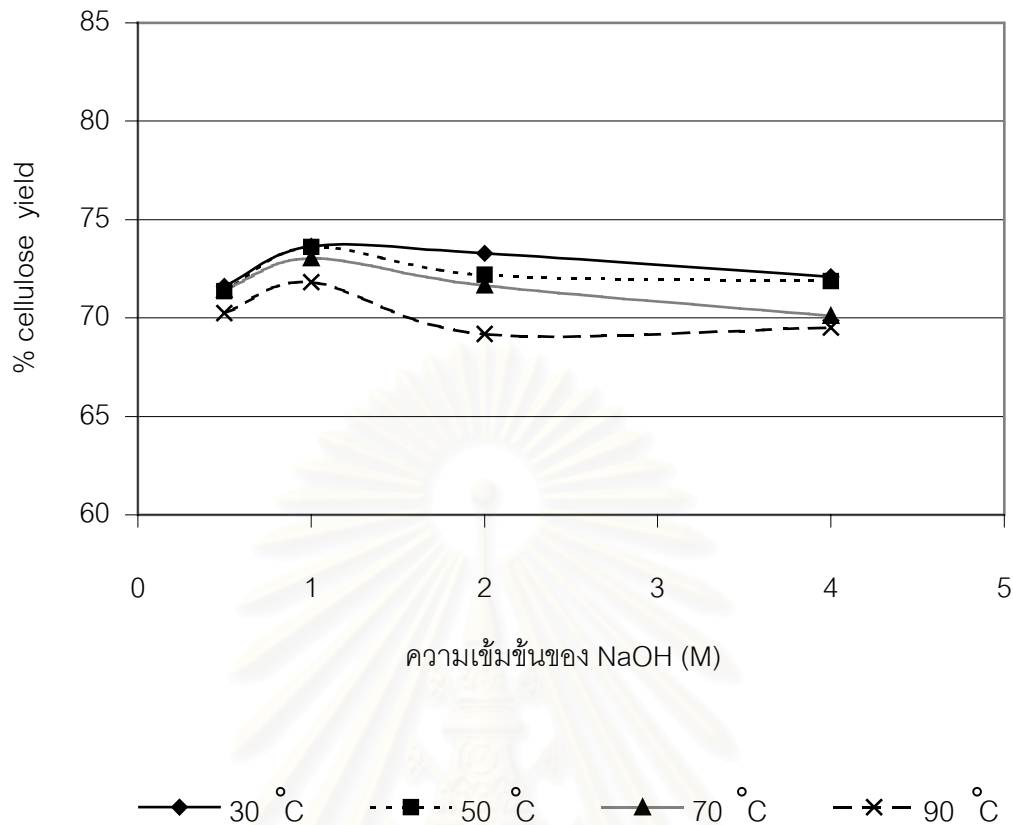
รูปที่ 5.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับสภาพ ตะกอนแห้งน้ำมันล่าปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 5.3 ผลของอุณหภูมิในการปรับสภาพตะกอนแห้งมันสำปะหลังด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 5.4 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่สูญเสียไประหว่างการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 5.5 % cellulose yield ในตะกอนแห้งน้ำมันสำปะหลัง หลังปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ

จากรูปที่ 5.3 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ในตะกอนแห้งน้ำมันสำปะหลังหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กับ อุณหภูมิที่ใช้ต้มสารละลาย พบว่าเมื่อให้อุณหภูมิที่ใช้ต้มสารละลายเพิ่มขึ้น มีผลทำให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถแพร่เข้าไปในโครงสร้างของเซลลูโลสได้เร็วขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยาและเกิดการบวมตัวได้เร็วขึ้น จึงสามารถละลายและแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกมาได้มากขึ้น (Soto M.L. และคณะ, 1994)

แต่ถ้าเปรียบเทียบผลการทดลองจากรูปที่ 5.2 กับรูปที่ 5.3 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีผลมากกว่าการเพิ่มอุณหภูมิ เนื่องจากว่าในการทดลองได้ใช้เวลาในการต้มสารละลายเป็นเวลา 90 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่มากเพียงพอที่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะสามารถแพร่เข้าไปในโครงสร้าง และทำปฏิกิริยาได้หมด แต่ถ้าใช้เวลาในการต้มสารละลายน้อยกว่านี้ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์อาจจะแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยาได้ยังไม่หมด ก็จะสามารถเห็นผลของอุณหภูมิได้ชัดเจนมากกว่านี้

จากรูปที่ 5.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ที่สูญเสียไปในระหว่างการปรับสภาพ กับ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายสูงขึ้น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าไปทำปฏิกิริยาละลายพันธะของโครงสร้างระหว่างลิกนินและเซลลูโลส ทำให้มีเอมิเซลลูโลส และลิกนินสูญเสียไปในระหว่างการปรับสภาพสูงขึ้น และยังทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสมีขนาดเล็กลง ทำให้มีการสูญเสียเซลลูโลสไปในระหว่างการปรับสภาพซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงระหว่าง 10-16 % ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ต่อมาพิจารณาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยพิจารณาจากรูปที่ 5.5 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % cellulose yield กับ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะได้ % cellulose yield มีค่าระหว่าง 69-74 % ซึ่งมีค่าแตกต่างกันไม่มาก และที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ จะให้ % cellulose yield สูงที่สุด รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 2 โมลาร์

แต่จากรูปที่ 5.2 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % lignin กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ นั้นยังมีปริมาณลิกนินเหลืออยู่ในโครงสร้างสูง ดังนั้นจึงไม่เลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 1 โมลาร์ แต่เลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เพราะเหลือปริมาณลิกนินอยู่น้อย และมี % cellulose yield อยู่สูง

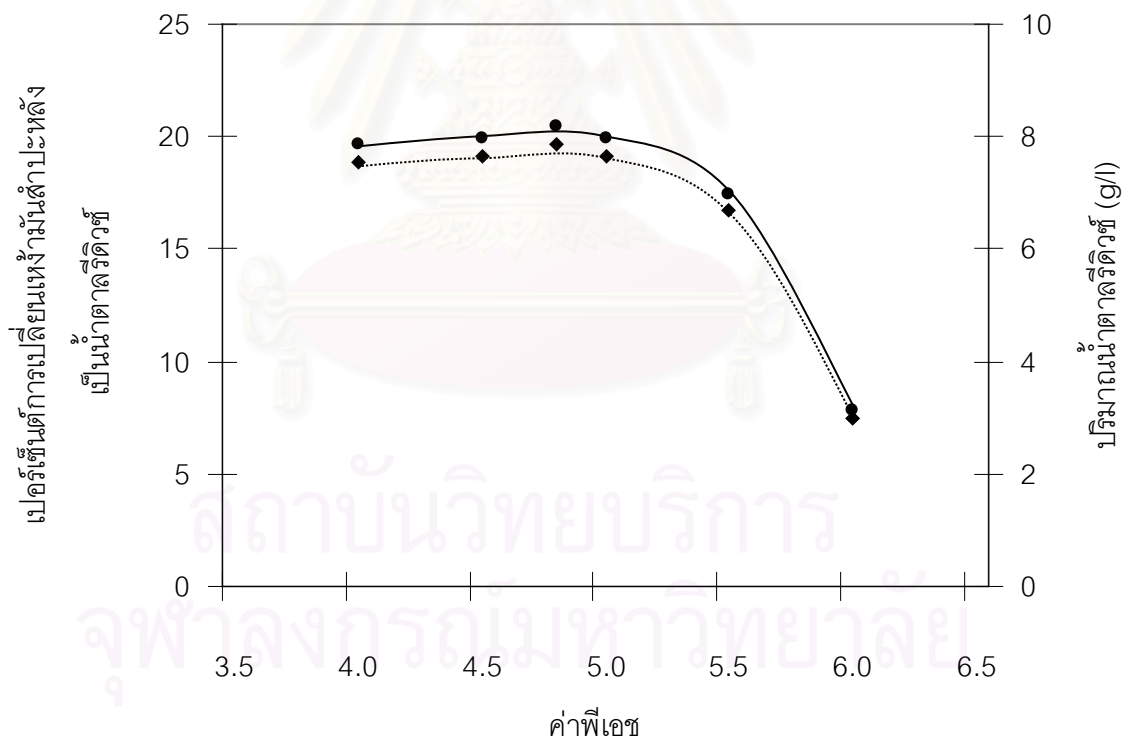
ต่อมาพิจารณาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากรูปที่ 5.5 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส จะให้ % cellulose yield ค่อนข้างสูง และเมื่อพิจารณาจากค่าในตารางที่ 5.1 พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลลูโลสสูงกว่า และเหลือเอมิเซลลูโลสน้อยกว่า ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส

ดังนั้นในการปรับสภาพตะกอนเหง้ามันสำปะหลังด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง

5.2.1 ผลของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม ในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

จากการทดลองโดยการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 4.0-6.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์จะมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.8 โดยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 7.85 กรัม/ลิตร และได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 20.46 ดังแสดงในรูปที่ 5.6 การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่าง เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างกันมีผลทำให้กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มีการแตกตัวของอิออนให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการจับกันของเอนไซม์ และสับสเตรทได้แตกต่างกัน

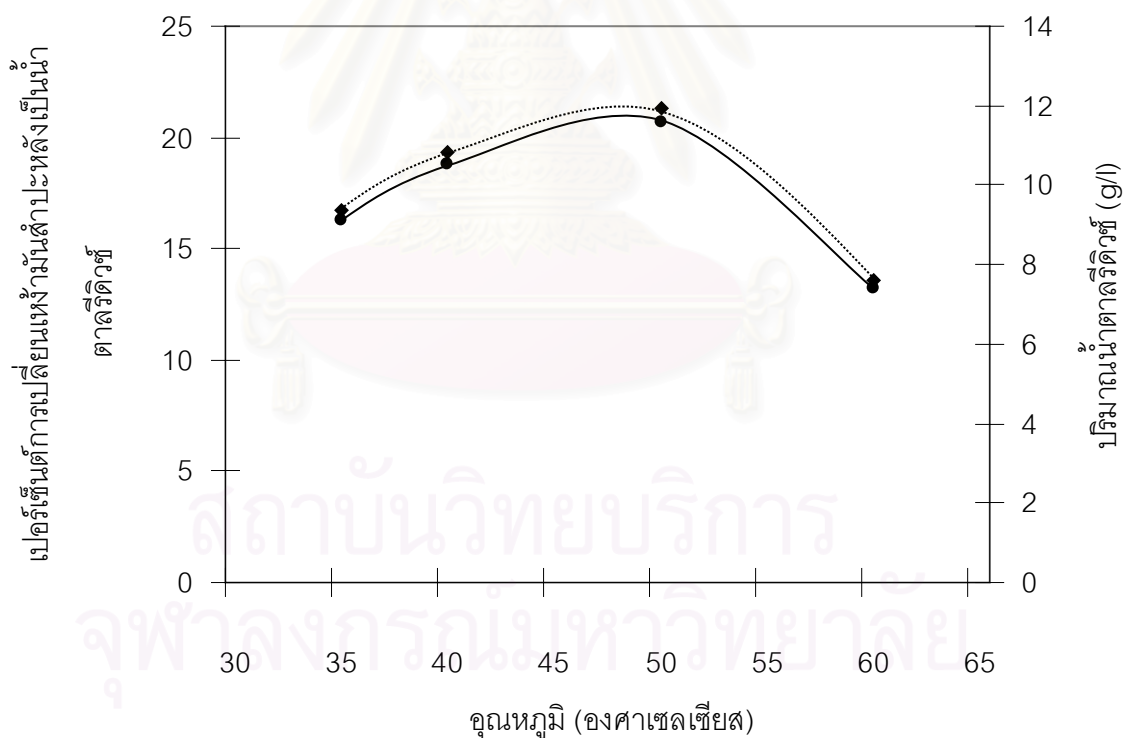


- เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
- ◆ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

รูปที่ 5.6 ผลของค่าความเป็นกรดต่างในการย่อยสลายเซลลูโลส ในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5.2.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลส ในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

ผลการทดลองเมื่อดำเนินการวิจัยเช่นเดียวกับข้อ 5.2.1 โดยใช้ค่าความเป็นกรดต่างของซีเตรตบัฟเฟอร์ที่ 4.8 และผันแปรอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตั้งแต่ 35 - 60 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์เซลลูบริกซ์จะทำการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงนี้มีผลทำให้ทั้งเอนไซม์และสับสเตรทที่เข้าทำปฏิกิริยากันมีพลังงานจลน์เพิ่มขึ้น การชนกันต่อหน่วยเวลาเพิ่มขึ้นทำให้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อให้อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิที่เกิน 50 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีหรืออยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นอุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับการย่อยเหง้ามันสำปะหลังคือที่ 50 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 5.7



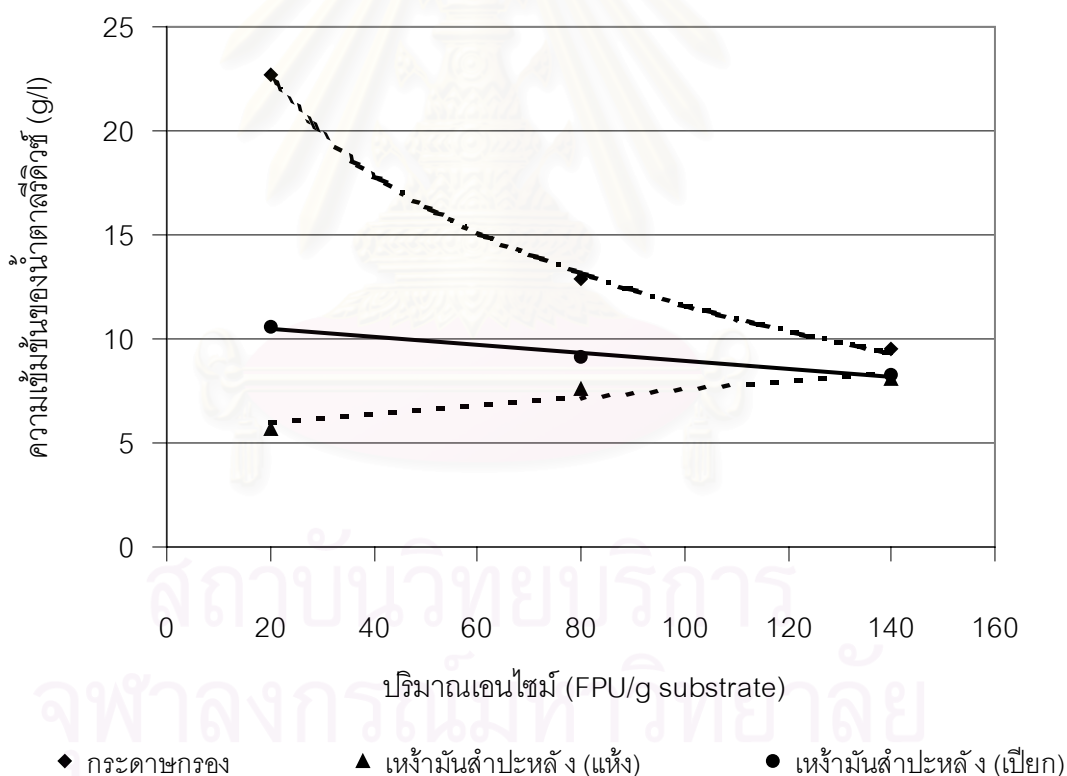
- เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
- ◆ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

รูปที่ 5.7 ผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8

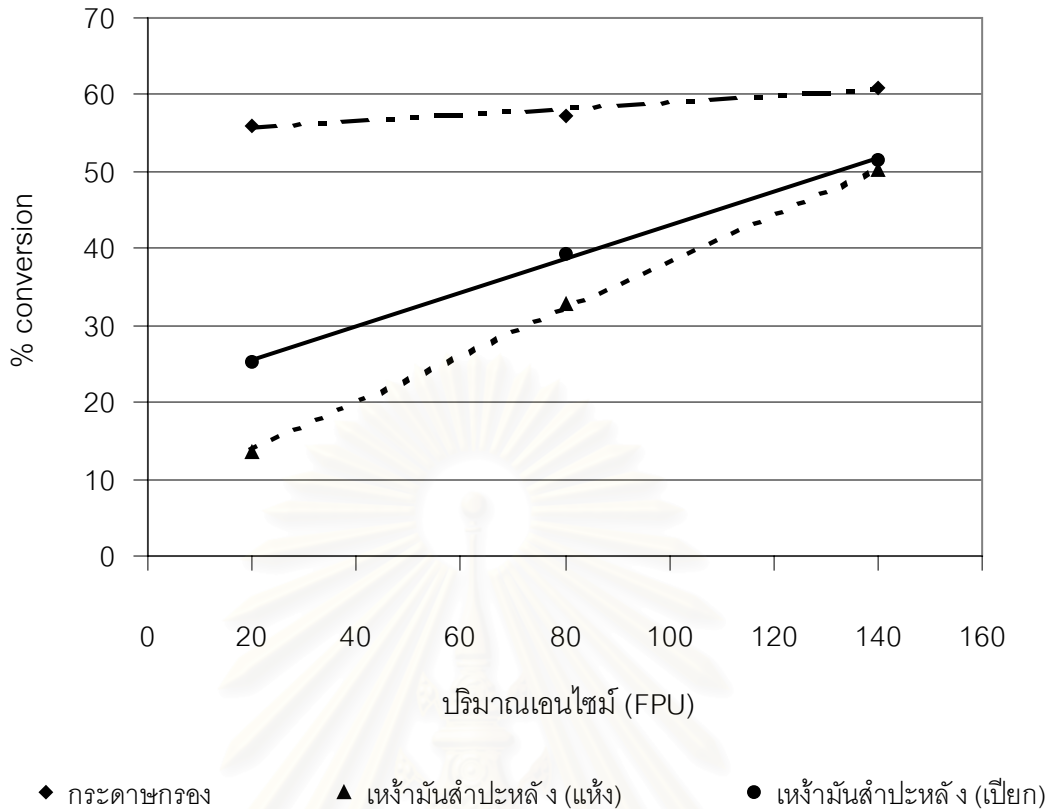
5.2.3 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5.2.3.1 การเปรียบเทียบการย่อยกระดาษกรอง, เหง้ามันสำปะหลังแห้ง และเหง้ามันสำปะหลังเปียกโดยใช้เอนไซม์เซลลูบริกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อทดลองย่อยสลายกระดาษกรอง, เหง้ามันสำปะหลังแห้ง และเหง้ามันสำปะหลังเปียกด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 5.2.1 กับข้อ 5.2.2 คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 4.8 โดยผันแปรปริมาณของเอนไซม์ต่อกรัมตั้งแต่ 20 -140 หน่วย FPU ต่อกรัมได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5.8 และ 5.9



รูปที่ 5.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกระดาษกรอง, เหง้ามันสำปะหลังแห้ง และเหง้ามันสำปะหลังเปียก ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5.9 เปอร์เซนต์การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยเซลลูโลสในกระจกกรอง, เหม้ามันสำปะหลังแห้ง และเหม้ามันสำปะหลังเปียก ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 5.8 และรูปที่ 5.9 พบว่าในการย่อยกระจกกรอง เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะได้เปอร์เซนต์การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (%conversion) เพิ่มขึ้นแต่ไม่มากนัก แต่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง อาจเป็นเพราะที่ปริมาณเอนไซม์ 20 หน่วย FPU ต่อกรัม นั้นเพียงพอต่อปฏิกิริยาการย่อย และเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มอีกจึงไม่ค่อยมีผลต่อการย่อยจึงทำให้ได้เปอร์เซนต์การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นไม่มากนัก และที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเป็นเพราะเมื่อใส่ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาตรของสารละลายเพิ่มขึ้นมากกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อคิดเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ต่อสารละลายทั้งหมดจึงมีค่าลดลง

ส่วนการย่อยเหง้ามันสำปะหลังแบบเปียกจะได้อผลคล้ายๆ กับการย่อยกระดาศกรอง นั่นคือเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (%conversion) เพิ่มขึ้น แต่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง

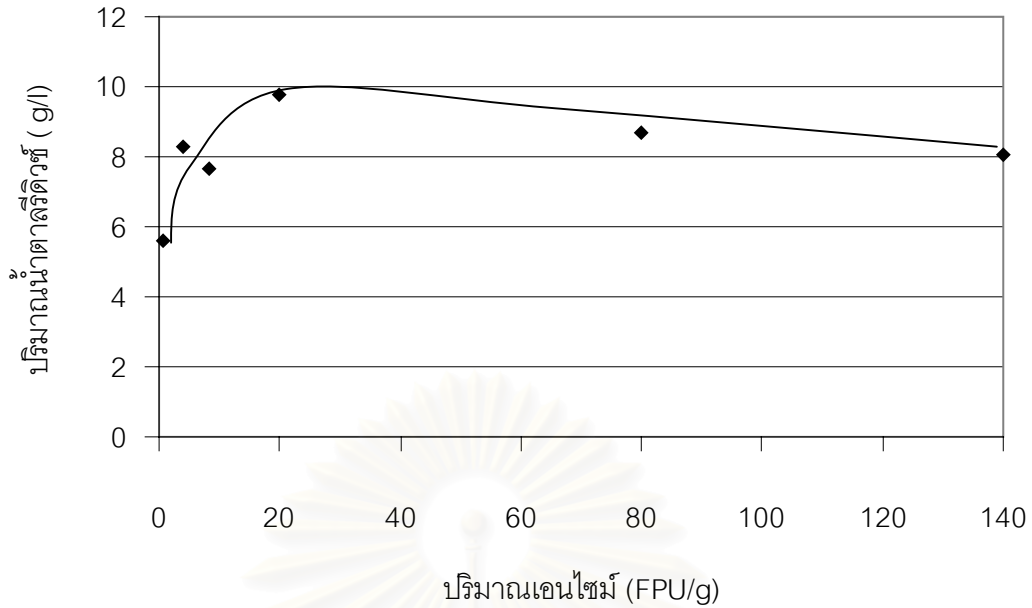
แต่ในการย่อยเหง้ามันสำปะหลังแบบแห้งจะได้ผลแตกต่างกัน นั่นคือเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (%conversion) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น แสดงว่าเอนไซม์ที่ใส่เพิ่มเข้าไปในสารละลายยังสามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังแบบแห้งได้อีก

และเมื่อเปรียบเทียบสับสเตรททั้งสามชนิด พบว่าเมื่อใช้กระดาศกรองจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าเมื่อใช้เหง้ามันสำปะหลังแบบเปียกและแบบแห้ง เนื่องจากกระดาศกรองนั้นเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ แต่ในเหง้ามันสำปะหลังนั้นยังมีสิ่งเจือปนเหลืออยู่บ้างทำให้เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาได้ยากกว่าจึงได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่า

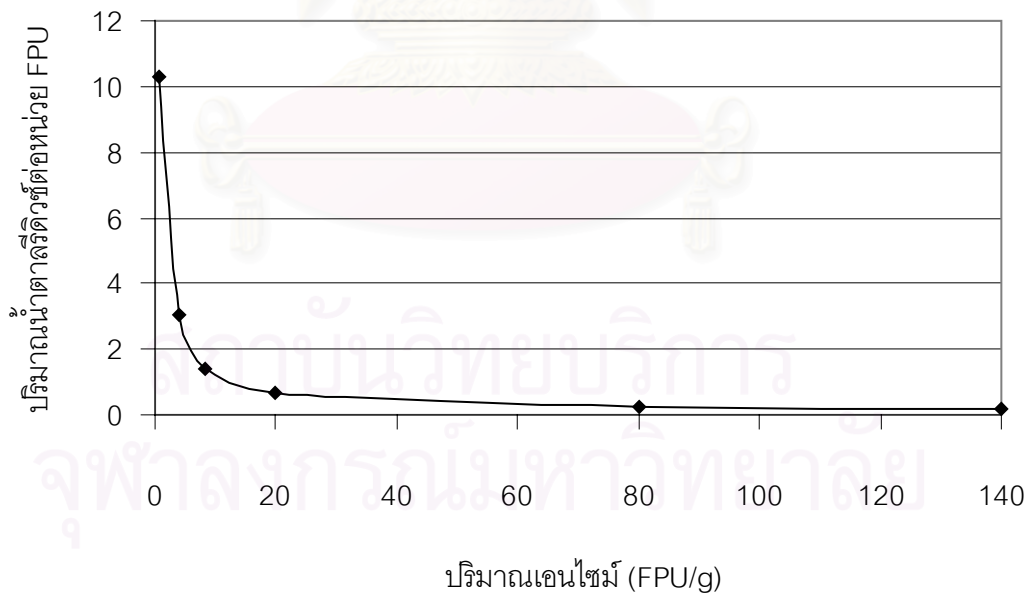
ถ้าเปรียบเทียบระหว่างเหง้ามันสำปะหลังแบบแห้งและแบบเปียก พบว่าถ้าใช้เหง้ามันสำปะหลังแบบเปียกจะได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า อาจเป็นเพราะว่ามีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างของเหง้ามันสำปะหลังแบบเปียกอยู่แล้ว เมื่อใส่เอนไซม์ลงไปทำปฏิกิริยาทำให้เอนไซม์สามารถแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยาได้ง่ายและเร็วกว่า ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ใช้เหง้ามันสำปะหลังแบบเปียกในการทดลองต่อไป

5.2.3.2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

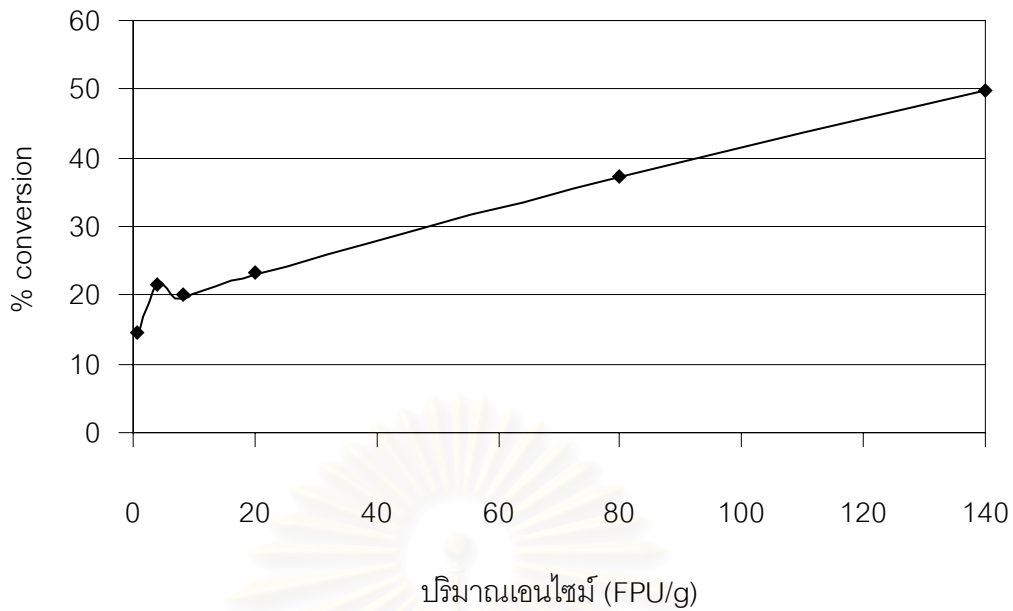
เมื่อทดลองย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังที่ได้ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 5.2.1 กับข้อ 5.2.2 คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 4.8 โดยผันแปรปริมาณของเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังตั้งแต่ 0.8-140 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5.10, 5.11, 5.12 และ 5.13



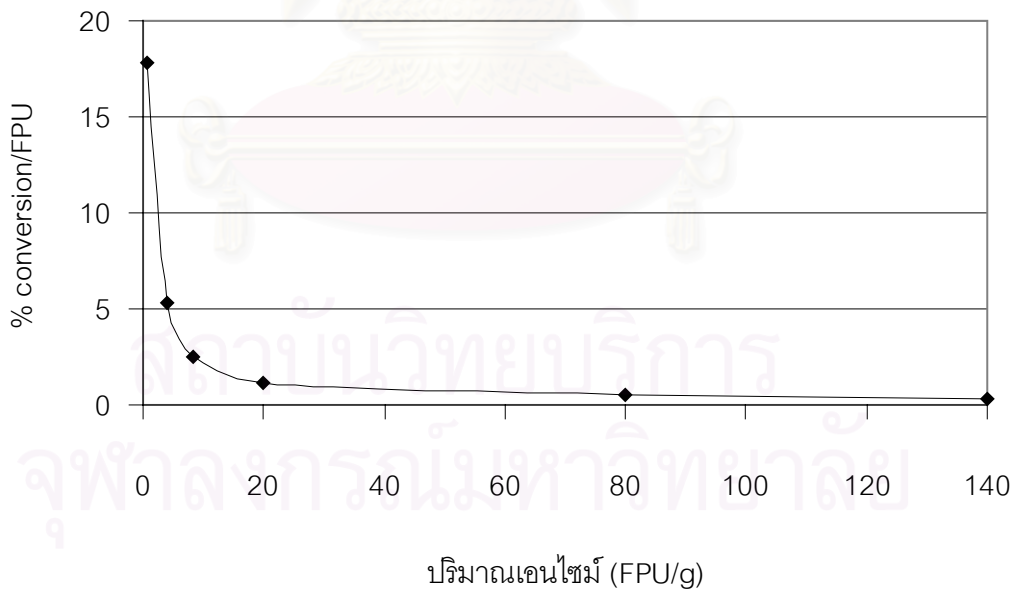
รูปที่ 5.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเซลลูโลสต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อหน่วย FPU ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 ที่ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5.12 เปรอ์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ในการย่อยเซลลูโลส ในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 ที่ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ค่าต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5.13 เปรอ์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อหน่วย FPU ในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 ที่ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ค่าต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

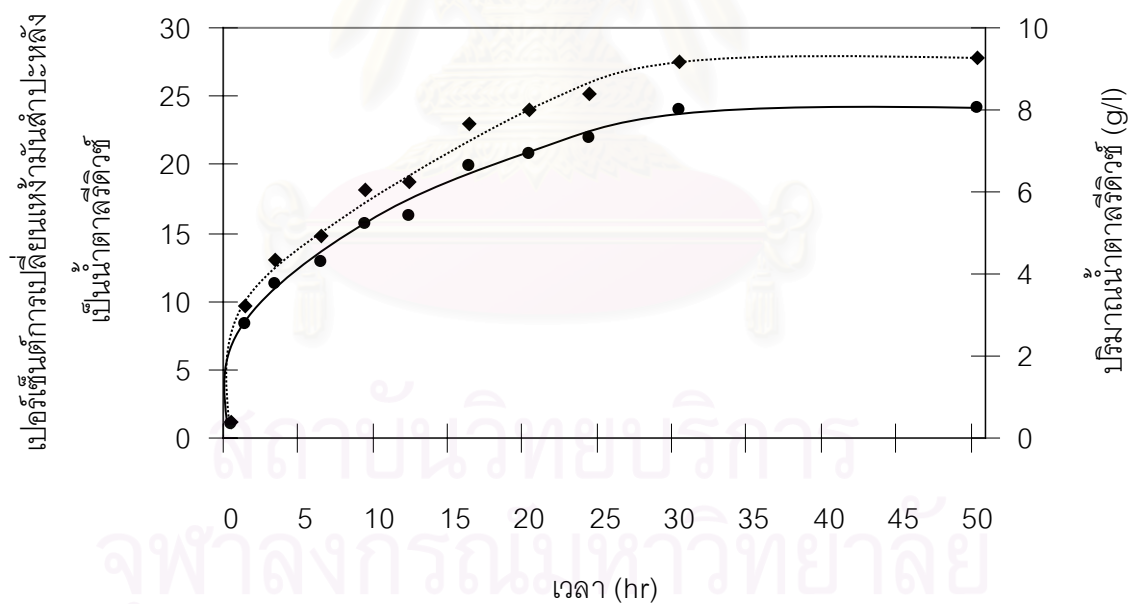
จากรูปที่ 5.10 พบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น การย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังก็มีค่าเพิ่มขึ้นด้วยทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น แต่หากปริมาณเอนไซม์มากกว่า 20 หน่วยFPU/กรัมเซลลูโลส แล้วจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง ถึงแม้ว่าจากรูปที่ 5.12 จะพบว่าได้ % การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้นก็ตาม แต่จากรูปที่ 5.13 จะเห็นได้ว่า % การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ต่อหน่วย FPU กลับลดลง แสดงว่าจริงๆ แล้วเอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาได้ไม่ดี

เมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณมากเกินไป จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จนกระทั่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ปฏิกิริยาจึงหยุด จึงไม่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอีก ดังนั้นจะเห็นได้ว่าที่ปริมาณเอนไซม์ 20 หน่วย FPU/g จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด แต่ว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณเอนไซม์ ที่ 20 กับที่ 4.079 หน่วย FPU/g จะเห็นได้ว่าที่ปริมาณเอนไซม์ 20 หน่วยFPU/g จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าเพียง 1.46 g/l แต่จะต้องใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่าตัว

และเมื่อดูผลจากรูปที่ 5.11 จะเห็นได้ว่า ที่ปริมาณเอนไซม์ 4.079 หน่วย FPU/g จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อหน่วย FPU มากกว่า แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้มีประสิทธิภาพมากกว่า ดังนั้นในงานวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 4.079 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อใช้ในการหมักต่อไป

5.2.4 ผลของการหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยปริมาณเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 4.079 หน่วย FPU/กรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ผลการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.8 ใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 4.079 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิของการย่อยเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เวลาต่างๆ ได้ผลดังรูปที่ 5.14 พบว่าในช่วงแรกของการย่อย จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเริ่มช้าลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากชั่วโมงที่ 24 ของการย่อย จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ไม่เพิ่มขึ้นมากนัก ไม่ว่าจะทำปฏิกริยานานกว่า 24 ชั่วโมงเป็นเวลาเท่าใดก็ตาม จึงยุติปฏิกริยาที่ชั่วโมงที่ 24 ของการย่อย และเลือกค่าดังกล่าวเป็นเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาการย่อยเซลลูโลสจากเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ในงานวิจัยนี้



- เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
- ◆ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

รูปที่ 5.14 ผลของเวลาในการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 4.079 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5.3 การเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

วัตถุดิบ	เอนไซม์		ชนิดของบัฟเฟอร์	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง			ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
	ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณเอนไซม์ FPU/g		ค่าพีเอช	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (hr)		
เปลือกเมล็ดทานตะวัน	เซลลูเลส และ เซลโลไบเอส	25	ซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 M	4.8	50	72	น้ำตาลรีดิวซ์ 21 g/l	Soto M.L. และคณะ, 1994
ฟางข้าว	เซลลูเลส	40	โซเดียมซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	4.5	50	48	Saccharification 93 % และ glucose yield 73 %	Janusz Szczodrak, 1897
น้ำเสียจาก วัสดุจำพวก ไร่ ข้าว, ชังข้าวโพด (agro-waste materials)	เซลลูเลส และยีสเซลลูเลสจาก เชื้อ Sporotrichum pruinsum และ Arthrographis sp.	-	โซเดียมซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	5.0	30	24	น้ำตาลกลูโคส 0.84-2.47 g/l และ glucose yield 12.5-28 %	Okeke B.C. และ Obi S.K.C. , 1995
ไร่ข้าว	เซลลูเลส จากเชื้อ Aspergillus niger	0.1 g/l	ซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 M	7.0	65	3	น้ำตาลกลูโคส 2.2 g/l และ Saccharification 52.1 %	Sharma A. และ คณะ, 2001
ไม้สน (softwood)	เซลลูเลส และ เบต้า-กลูโคซิเดส	12	-	4.8	40	96	น้ำตาลกลูโคส 26.2 g/l และ น้ำตาลแมนโนส 7.1 g/l	Mats Larsson และ คณะ, 1997
กากสับปะรด	เซลลูเลส และ อะไมโลกลูโคซิเดส	-	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	6.0	35	67	น้ำตาลรีดิวซ์ 58.63 % , %yield 78.43 และ % conversion 74.75	กาญจนา ทูมมานนท์ และคณะ, 2529
ฟางข้าว	เซลลูเลส	0.5 ml/g cellulose	โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 M	4.0	55	16	น้ำตาลรีดิวซ์ 557.07 mg/g และ Saccharification 49.58 %	ระวีวรรณ แก้วกล้า, 2537
ผักตบชวา	เซลลูเลส และ เบต้า-กลูโคซิเดส	30:30	ซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	4.8	50	24	น้ำตาลกลูโคส 71.67 g/l และ Saccharification 84 %	ปราณี สิริพิพัฒน์ กุล, 2532
เหง้ามันสำปะหลัง	เซลลูบริกซ์	4.079	ซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	4.8	50	24	น้ำตาลรีดิวซ์ 8.30 g/l และ Saccharification 21.62 %	งานวิจัยนี้

จากตารางที่ 5.3 เป็นการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ พบว่าสภาวะที่ใช้การทดลอง เช่นพีเอช อุณหภูมิ และเวลา มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่นๆ

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้และในงานวิจัยอื่นๆ พบว่าจากงานวิจัยของ Mats Larsson และคณะ (1997) ได้ทำการย่อยไม้อ่อน (softwood) เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส 12 FPU/g พบว่าจะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 26.2 g/l และน้ำตาลแมนโนส 7.1 g/l ซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้นั้นคือในงานวิจัยนี้ได้ใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยกว่า 3 เท่า จึงได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่า 3 เท่าด้วย

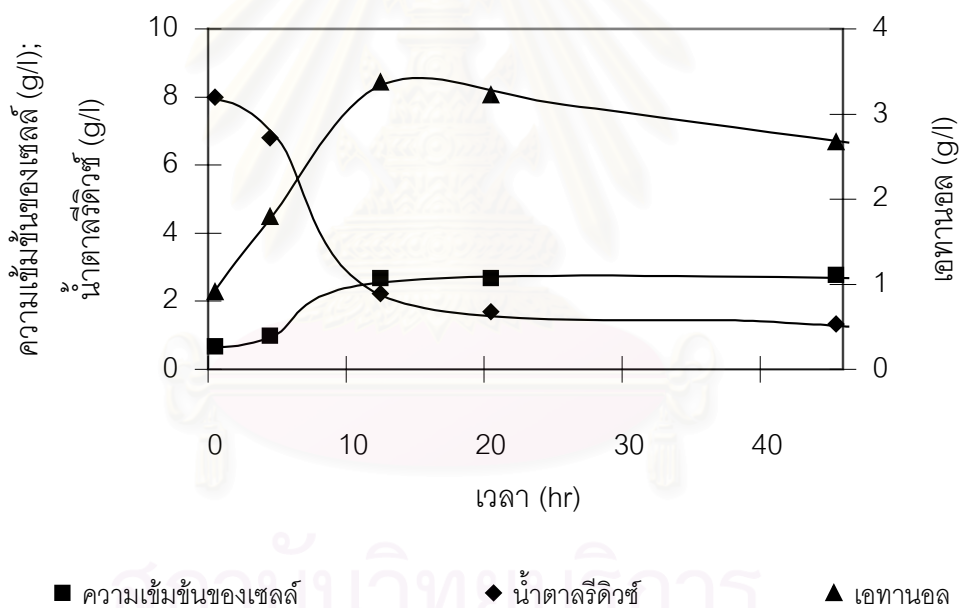
แต่เมื่อเปรียบเทียบผลจากงานวิจัยของ Soto M.L. และคณะ (1994) ได้ทำการย่อยเปลือกเมล็ดทานตะวันเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เซลโลไบเอส 25 FPU/g พบว่าจะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 21 g/l จะเห็นได้ว่าถ้าในงานวิจัยนี้ใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากัน จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 405

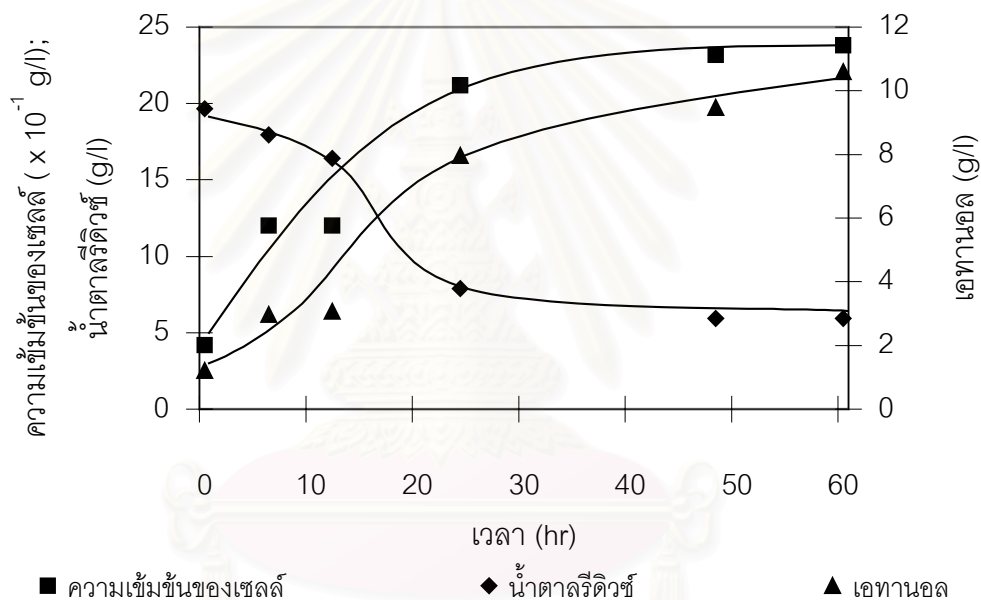
5.3.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

จากการทดลองโดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง ในสภาวะที่เหมาะสมโดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ เริ่มต้น 3 ค่าคือ 10 g/l 25 g/l และ 40 g/l มาปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.0 และเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียแล้วทำการถ่ายเชื้อลงไป นำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.15, 5.16 และ 5.17



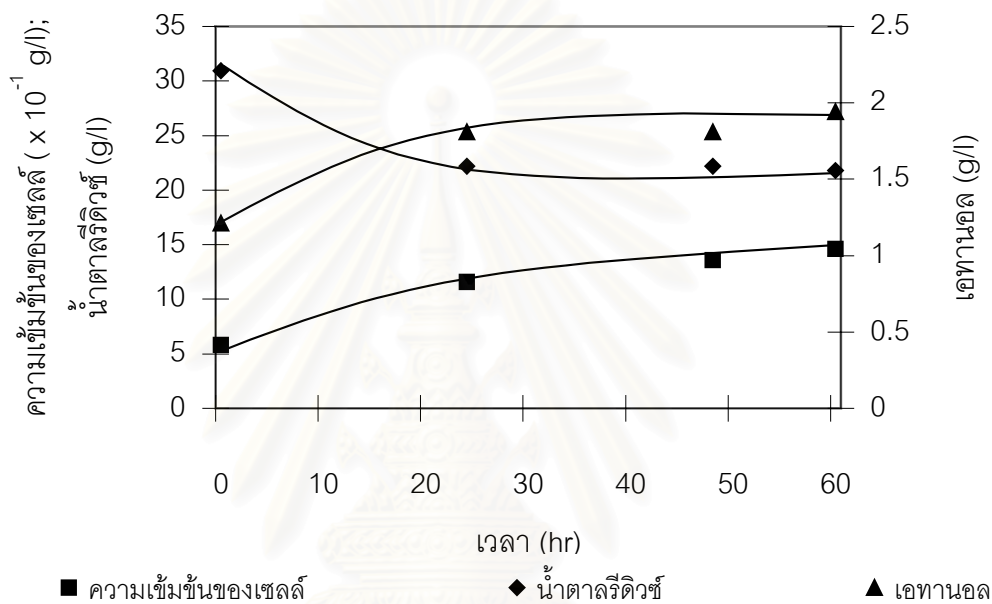
รูปที่ 5.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอลตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 5.15 เมื่อทำการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่าในช่วง 15 ชั่วโมงแรกของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และความเข้มข้นของเซลล์ และเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน แสดงว่าเชื้อได้ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโตรวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว เป็นการสร้างผลิตภัณฑ์แบบ growth-associated products หลังจากนั้นสารอาหารเริ่มเหลือน้อยลงมีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มคงที่ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 3.37 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 5.16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอลตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

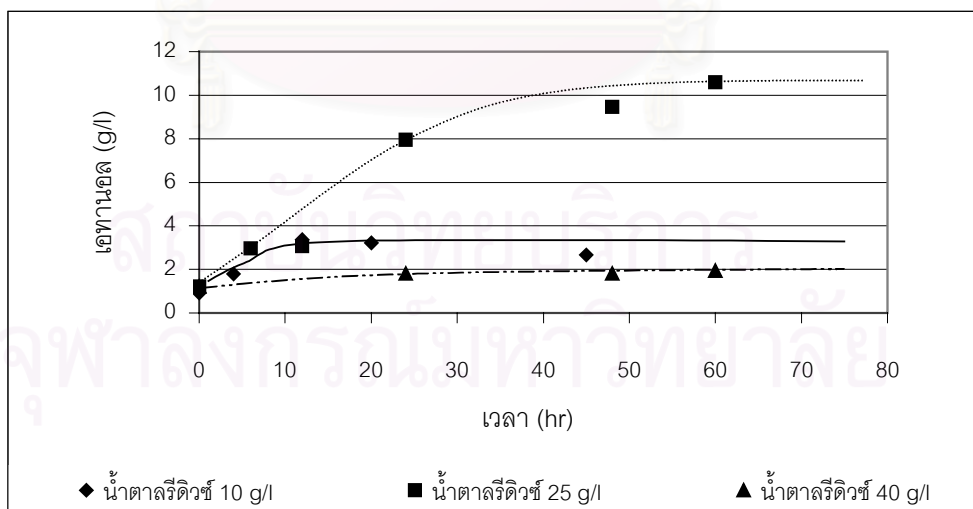
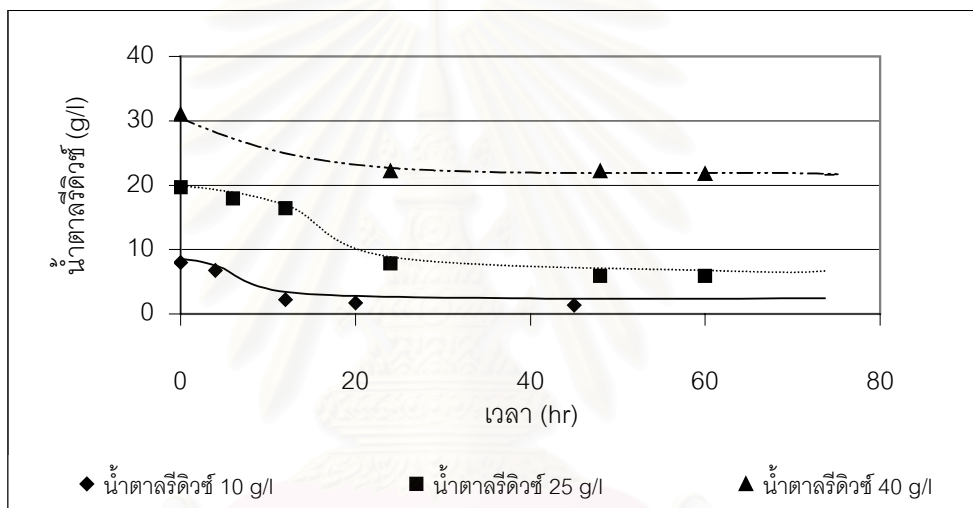
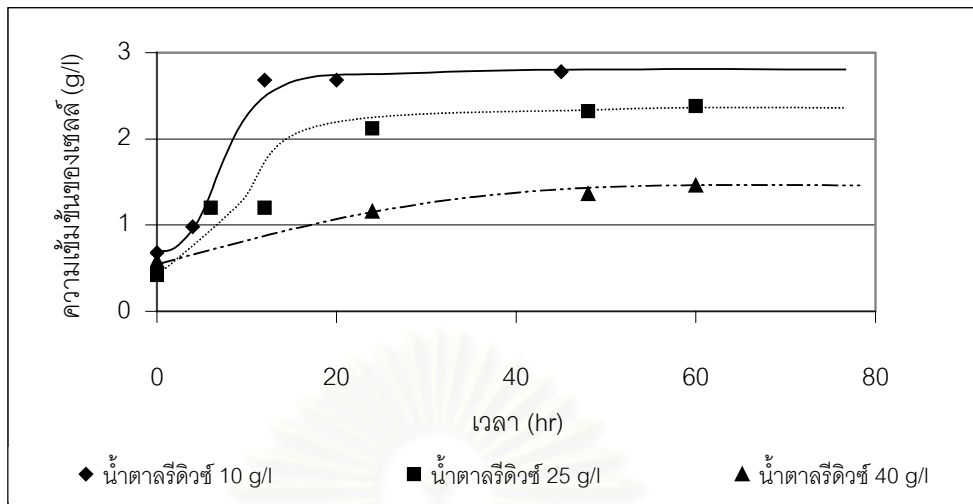
จากรูปที่ 5.16 เมื่อทำการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองคล้ายๆ กับรูปที่ 5.15 นั่นคือในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ,ความเข้มข้นของเซลล์และเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน ที่ใช้เวลานานขึ้นอาจเนื่องจากว่าได้ใส่สารอาหารลงไปมากกว่า จากการทดลองจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 10.60 กรัมต่อลิตร



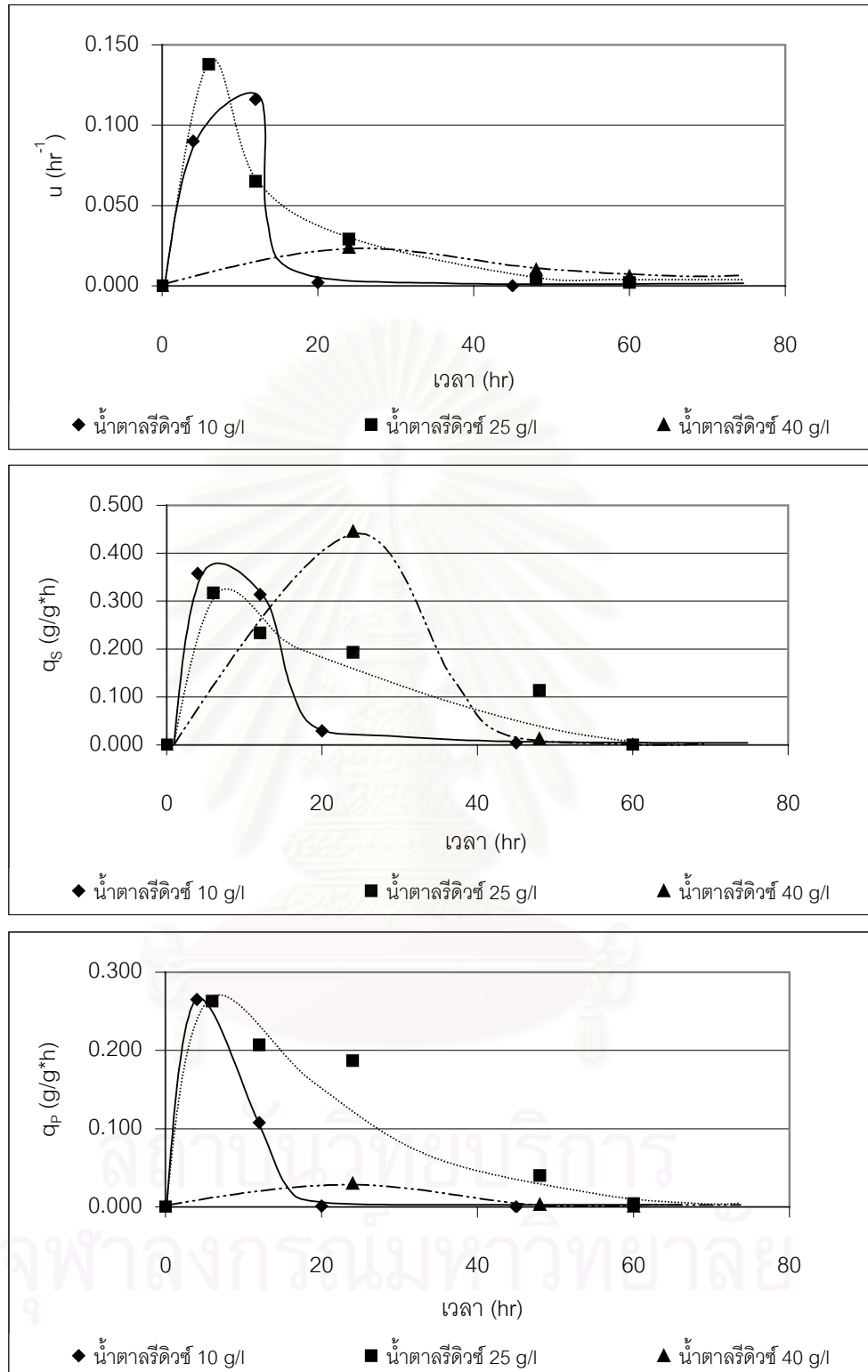
รูปที่ 5.17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอลตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 5.17 เมื่อทำการผลิตเอทานอลโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าเชื้อไม่ค่อยมีการเจริญเติบโตและมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้น้อยมาก มีผลทำให้ผลิตเอทานอลได้น้อย อาจเนื่องมาจาก ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงๆ จะมีสิ่งเจือปนอยู่มาก ทำให้เชื้ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจึงไม่ค่อยมีการเจริญเติบโต

หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 ความเข้มข้น เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอลได้ผลดังตารางที่ 5.3, รูปที่ 5.18 และ 5.19



รูปที่ 5.18 แสดงลักษณะการเจริญเติบโต การใช้สารอาหาร และการผลิตเอทานอลของ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 g/l, 25 g/l และ 40 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5.19 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะของ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ที่ ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 g/l, 25 g/l และ 40 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

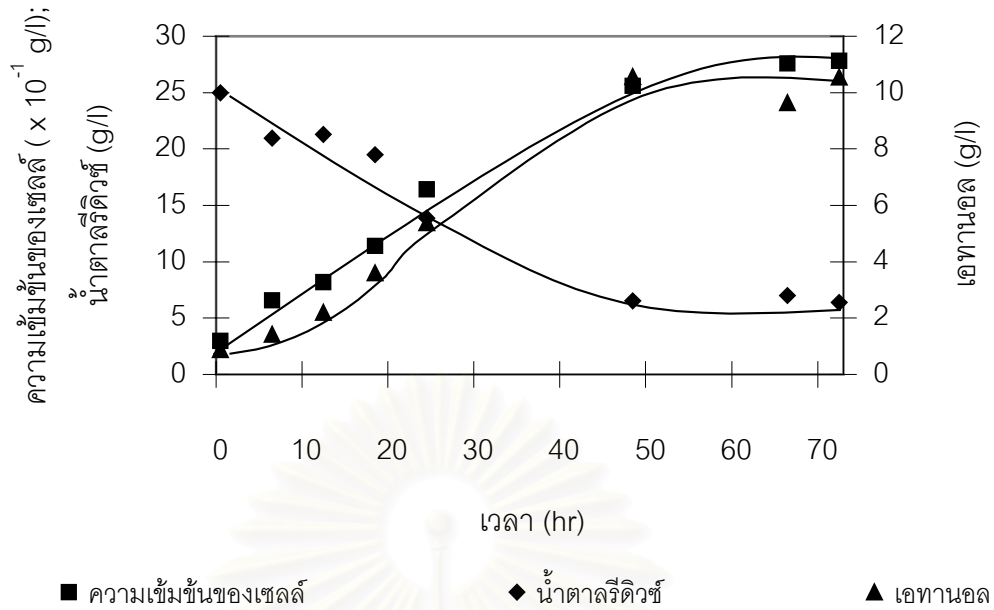
ตารางที่ 5.4 อัตราจำเพาะ, อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด และค่าผลได้ที่คำนวณได้จากการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่างๆ กัน

	น้ำตาลรีดิวซ์ 10 g/l	น้ำตาลรีดิวซ์ 25 g/l	น้ำตาลรีดิวซ์ 40 g/l
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) (ต่อชม.)	0.12	0.14	0.02
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด ($q_{S,max}$) (กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมเซลล์·ชม.)	0.36	0.32	0.45
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด ($q_{P,max}$) (กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์·ชม.)	0.27	0.26	0.03
อัตราสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max}) (กรัมต่อลิตร·ชม.)	0.32	0.30	0.08
ค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหาร ($Y_{X/S}$) (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	0.35	0.14	0.10
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{P/S}$) (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	0.43	0.68	0.08
เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็น ผลิตภัณฑ์ (% conversion)	72.25	69.84	29.59

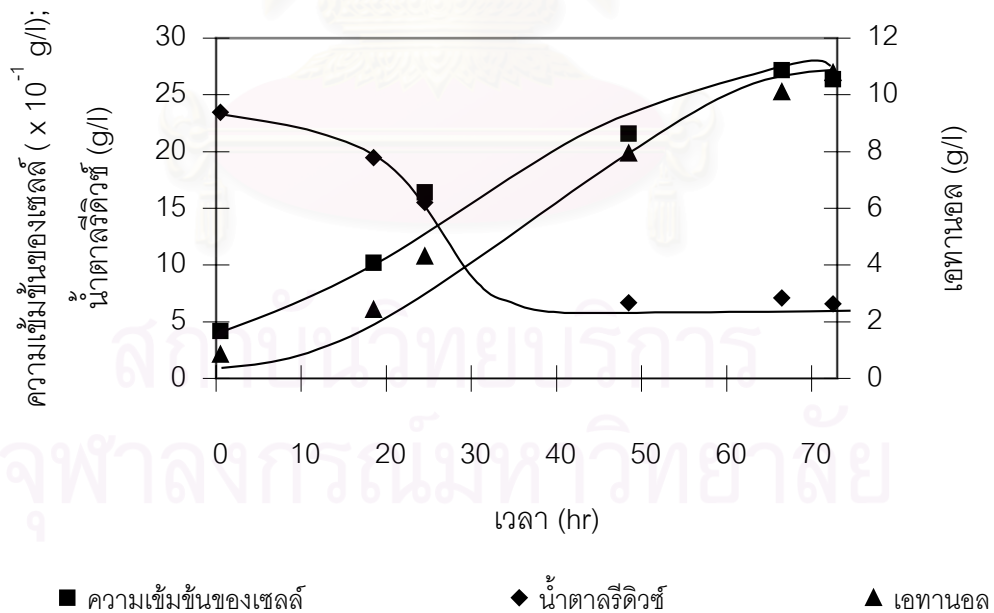
จากรูปที่ 5.18 และรูปที่ 5.19 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นจาก 10 กรัมต่อลิตรเป็น 25 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเป็น 40 กรัมต่อลิตร จะผลิตเอทานอลได้ลดลง และจากตารางที่ 5.4 พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 25 กรัมต่อลิตร จะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารสูงที่สุด ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมที่สุดคือ 25 กรัมต่อลิตร

5.3.2 ผลของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

จากการทดลองโดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสในหมักมันสำปะหลังในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตรมาปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.5 และ 6.0 และเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย แล้วทำการถ่ายเชื้อลงไป นำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.20, 5.21



รูปที่ 5.20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวิซ์ และเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

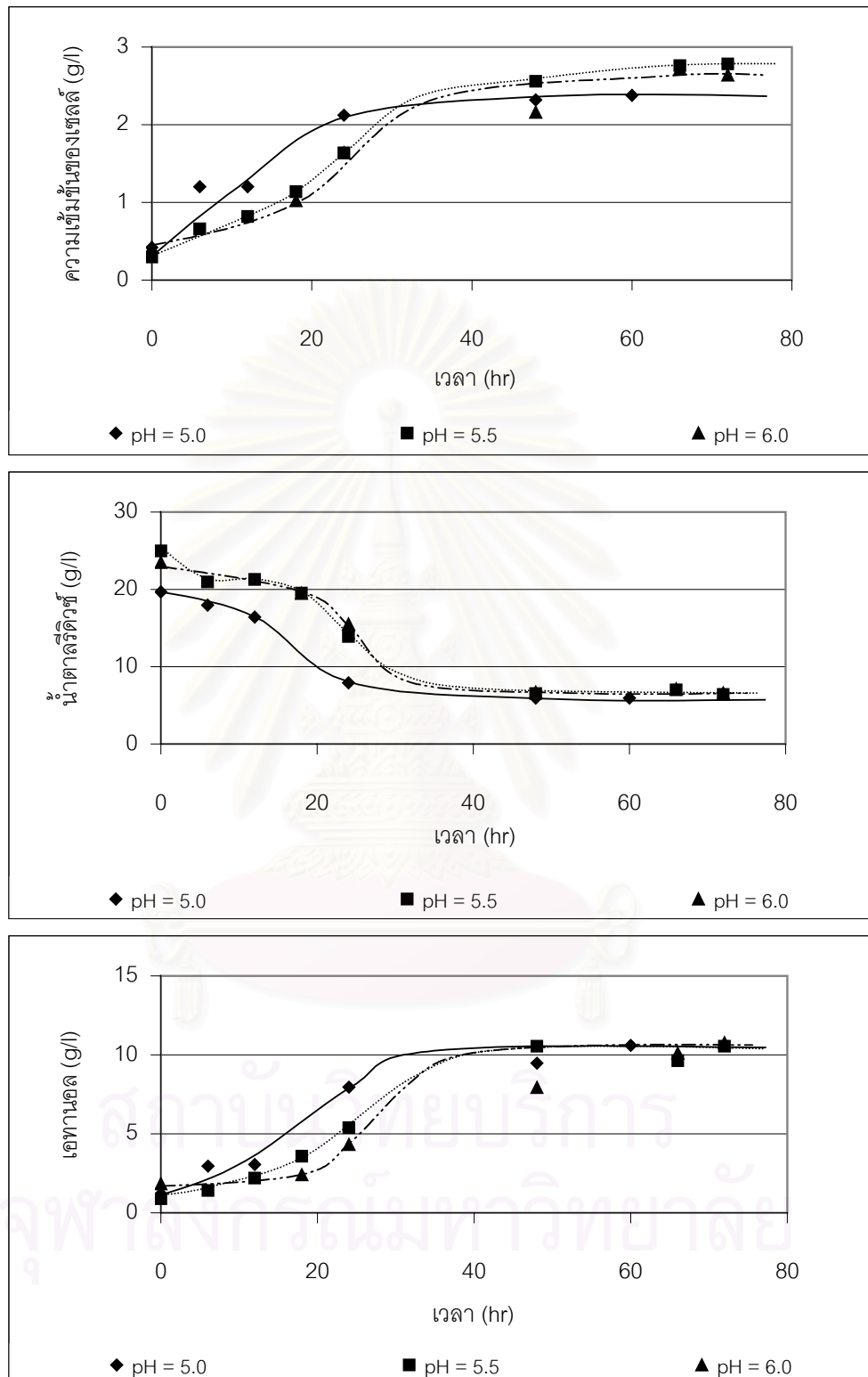


รูปที่ 5.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลรีดิวิซ์ และเอทานอล ตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 6.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

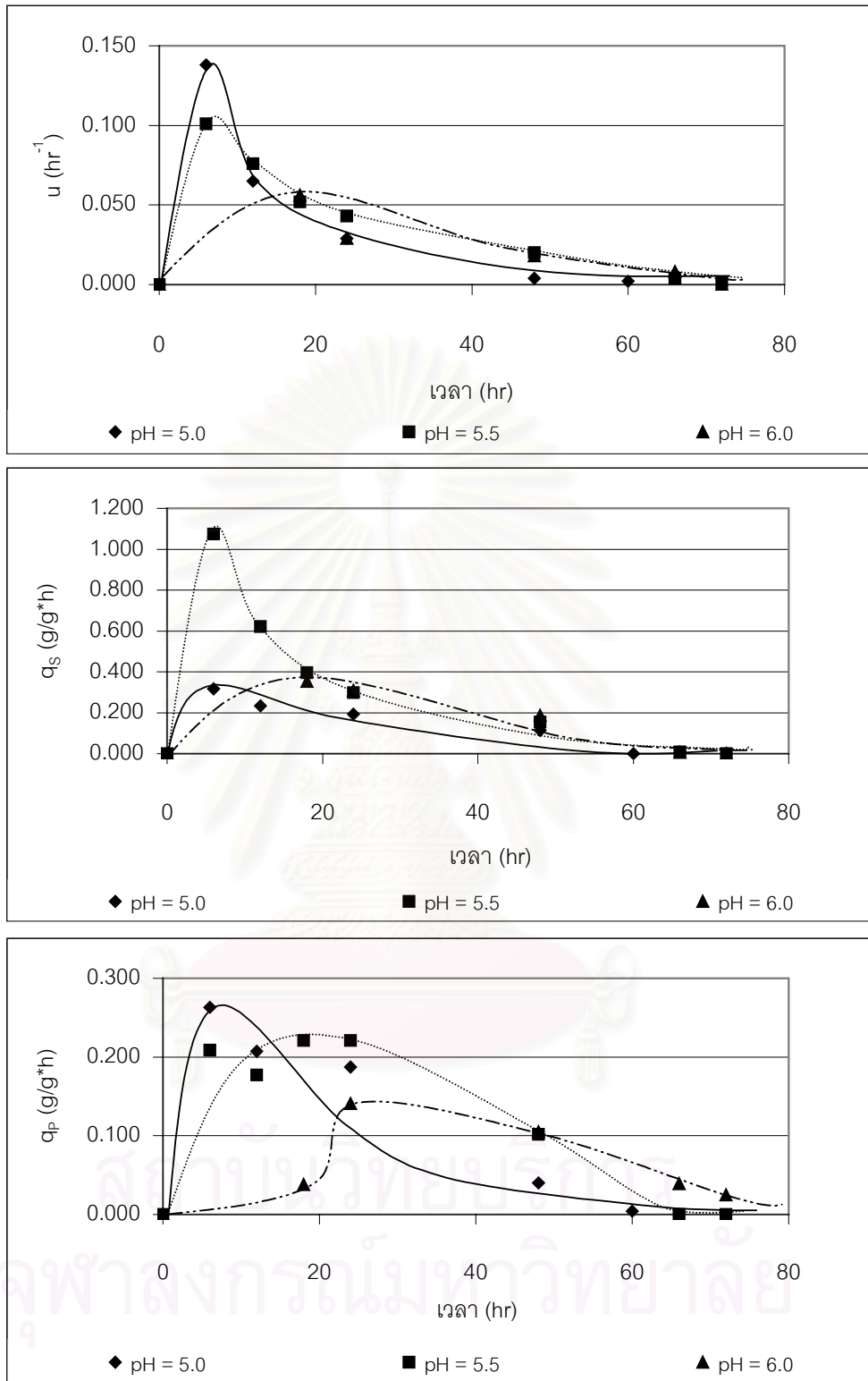
จากรูปที่ 5.20 เมื่อทำการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลรีดิวิซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 ได้ผลการทดลองคล้ายๆ กับรูปที่ 5.15 นั่นคือในช่วง 50 ชั่วโมงแรกของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และความเข้มข้นของเซลล์ และเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ที่ใช้เวลานานขึ้นอาจเนื่องจากว่าได้ใส่สารอาหารลงไปมากกว่า จากการทดลองจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 10.55 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 5.21 เมื่อทำการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลรีดิวิซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 6.0 ได้ผลการทดลองคล้ายๆ กับรูปที่ 5.15 นั่นคือในช่วง 30 ชั่วโมงแรกของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และความเข้มข้นของเซลล์ และเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ที่ใช้เวลานานขึ้นอาจเนื่องจากว่าได้ใส่สารอาหารลงไปมากกว่า จากการทดลองจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 10.77 กรัมต่อลิตร

หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดต่างของน้ำตาลรีดิวิซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตรที่ 5.0, 5.5 และ 6.0 เพื่อศึกษาหาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล ได้ผลดังตารางที่ 5.4, รูปที่ 5.22 และ 5.23



รูปที่ 5.22 แสดงลักษณะการเจริญเติบโต การใช้สารอาหาร และการผลิตเอทานอลของ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 25 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้นต่างๆ กันคือ 5.0, 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5.23 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะของ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ที่ ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 25 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้นต่างๆ กันคือ 5.0, 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

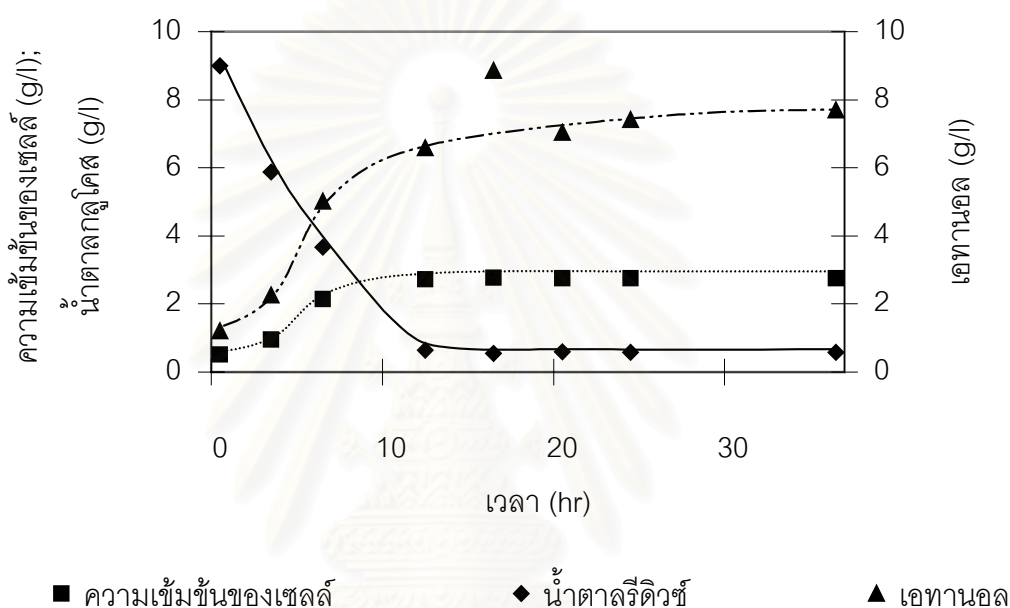
ตารางที่ 5.4 อัตราจำเพาะ, อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด และค่าผลได้ที่คำนวณได้จากการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 g/l ที่ pH ต่างๆ กัน

	pH = 5.0	pH = 5.5	pH = 6.0
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) (ต่อชม.)	0.14	0.10	0.06
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด ($q_{s,max}$) (กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมเซลล์·ชม.)	0.32	1.07	0.35
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด ($q_{p,max}$) (กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์·ชม.)	0.26	0.22	0.14
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max}) (กรัมต่อลิตร·ชม.)	0.30	0.25	0.26
ค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหาร ($Y_{x/s}$) (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	0.14	0.13	0.13
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{p/s}$) (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	0.68	0.52	0.53
เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็น ผลิตภัณฑ์ (% conversion)	69.84	74.37	71.89

จากรูปที่ 5.22 และรูปที่ 5.23 เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันค่าความเป็นกรดต่าง 3 ค่า คือ ที่ 5.0, 5.5 และ 6.0 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นทั้ง 3 ค่า เชื้อ *Zymomonas* สามารถเจริญเติบโตและการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลได้ผลดีใกล้เคียงกัน แต่ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 เชื้อจะสามารถผลิตเอทานอลโดยใช้เวลาน้อยกว่า แสดงว่าเชื้อใช้เวลาในการปรับตัวน้อยจึงสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่า และจากตารางที่ 5.5 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 จะได้อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด 0.30 กรัมต่อลิตร·ชั่วโมง และค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร 0.68 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งได้ค่ามากกว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างอื่นๆ ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอทานอลคือ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 25 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 แต่จะเห็นได้ว่าที่สภาวะที่เหมาะสมนี้เอทานอลที่ผลิตได้ก็ยังมีปริมาณน้อย ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้น้ำตาลกลูโคสในการเลี้ยงเชื้อ *Zymomonas mobilis*

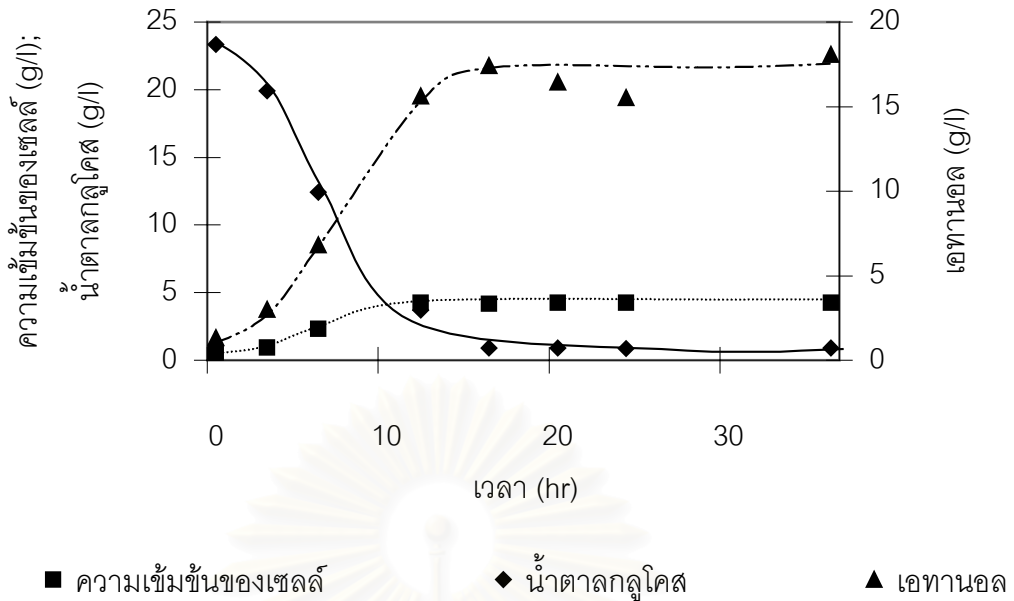
5.3.3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล

โดยทำการทดลองเตรียมน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นเป็น 10 g/l 25 g/l และ 40 g/l มาปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.0 และเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย แล้วทำการถ่ายเชื้อลงไป นำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.24, 5.25 และ 5.26

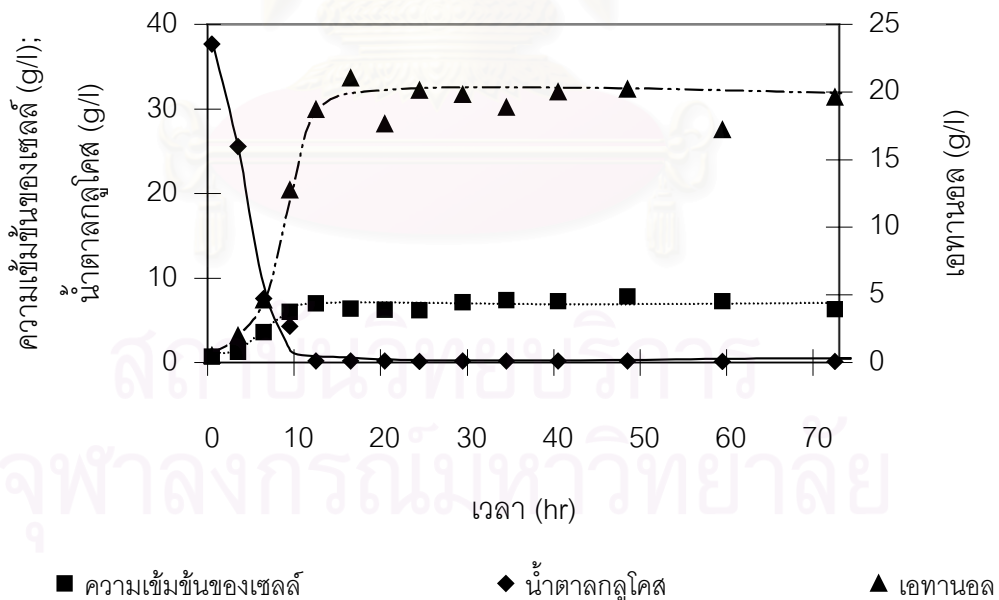


รูปที่ 5.24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลกลูโคสและเอทานอลตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 5.24 เมื่อทำการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และความเข้มข้นของเซลล์ และเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน แสดงว่าเชื้อได้ใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตรวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว หลังจาก 12 ชั่วโมง สารอาหารเริ่มเหลือน้อยลงมีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มคงที่แต่ก็ยังสามารถผลิตเอทานอลได้ในอัตราที่ช้าลง โดยสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 7.70 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 5.25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลกลูโคสและเอทานอลตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ: ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

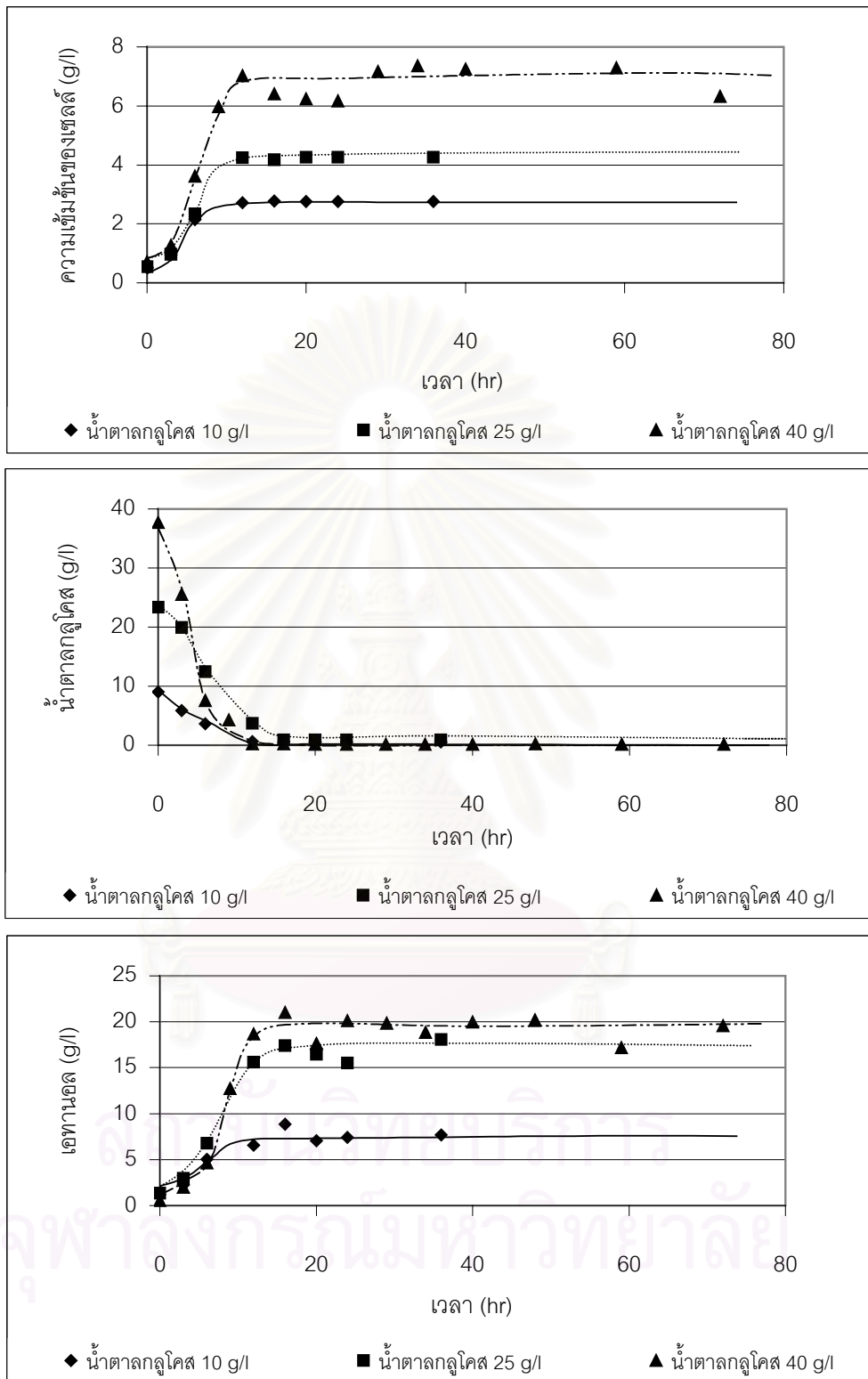


รูปที่ 5.26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์, น้ำตาลกลูโคสและเอทานอลตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะ : ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

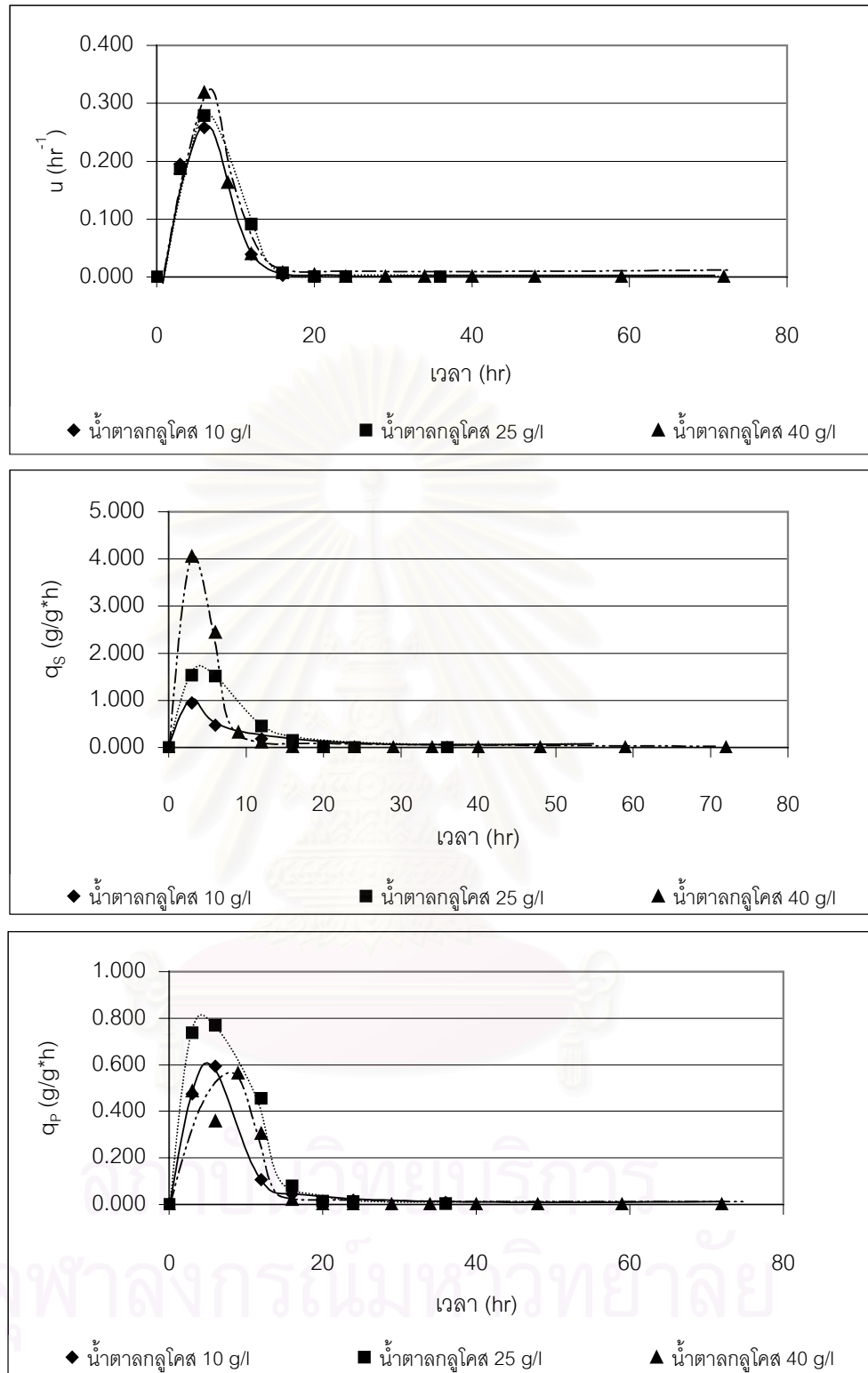
จากรูปที่ 5.25 เมื่อทำการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร พบว่าในช่วง 16 ชั่วโมงแรกของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และความเข้มข้นของเซลล์ และเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน แสดงว่าเชื้อได้ใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตรวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว หลังจาก 16 ชั่วโมงสารอาหารเริ่มเหลือน้อยลงมีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มคงที่ โดยสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 18.09 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 5.26 เมื่อทำการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และความเข้มข้นของเซลล์ และเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน แสดงว่าเชื้อได้ใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตรวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว หลังจาก 12 ชั่วโมงสารอาหารเริ่มเหลือน้อยลงมีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มคงที่ โดยสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 20.12 กรัมต่อลิตร

และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสทั้ง 3 ค่า ได้ผลดังตารางที่ 5.5 และรูปที่ 5.27 กับ 5.28



รูปที่ 5.27 แสดงลักษณะการเจริญเติบโต การใช้สารอาหาร และการผลิตเอทานอลของ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 g/l, 25 g/l และ 40 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5.28 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะของ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ที่ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 g/l, 25 g/l และ 40 g/l โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

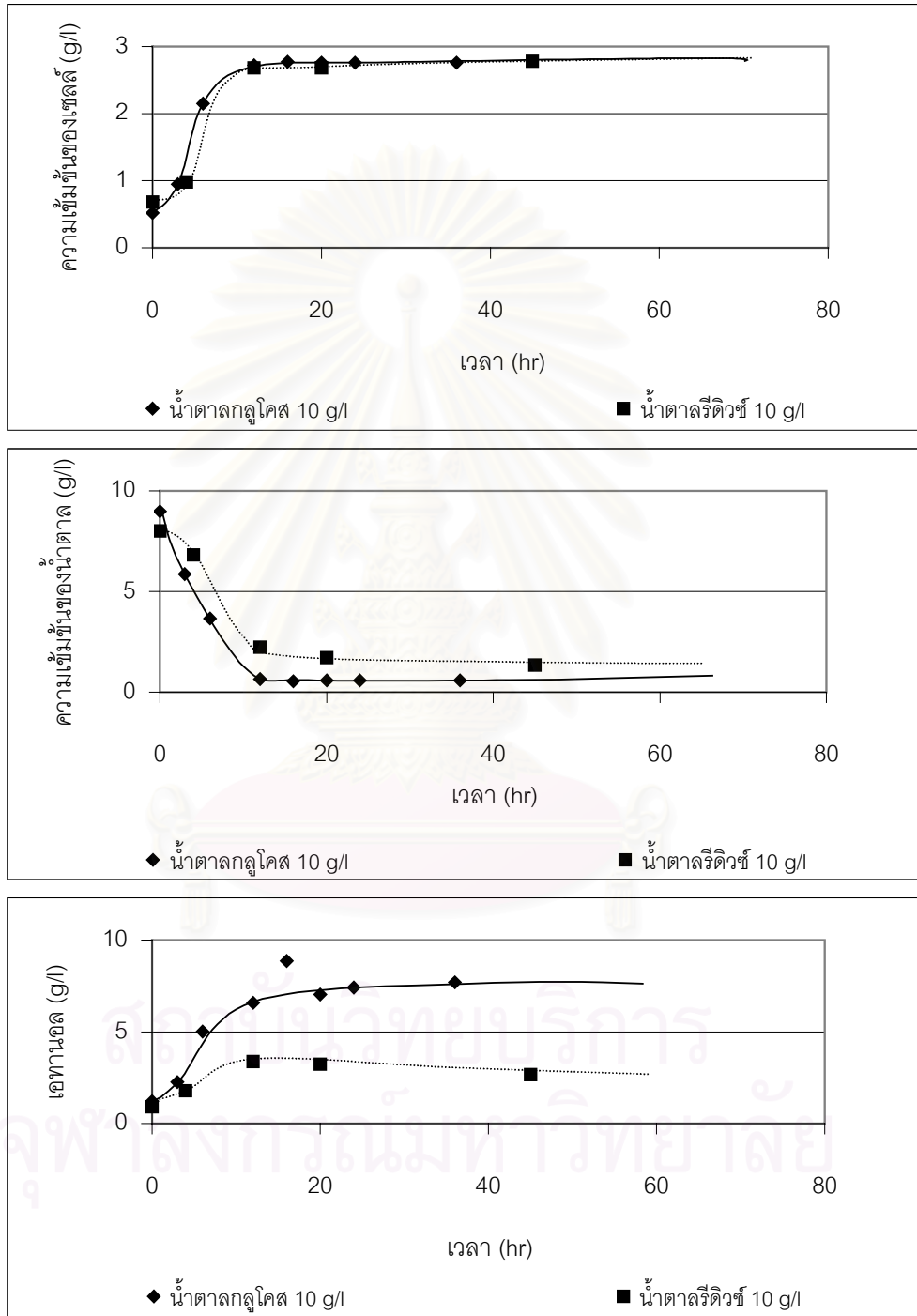
ตารางที่ 5.6 อัตราจำเพาะ, อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด และค่าผลได้ที่คำนวณได้จากการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่างๆ กัน

	น้ำตาลกลูโคส 10 g/l	น้ำตาลกลูโคส 25 g/l	น้ำตาลกลูโคส 40 g/l
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) (ต่อชม.)	0.26	0.28	0.32
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด ($q_{S,max}$) (กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมเซลล์·ชม.)	0.94	1.53	4.05
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด ($q_{P,max}$) (กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์·ชม.)	0.59	0.77	0.56
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max}) (กรัมต่อลิตร·ชม.)	0.68	1.06	1.22
ค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหาร ($Y_{X/S}$) (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	0.27	0.17	0.17
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{P/S}$) (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	0.77	0.75	0.52
เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็น ผลิตภัณฑ์ (% conversion)	93.55	96.06	99.58

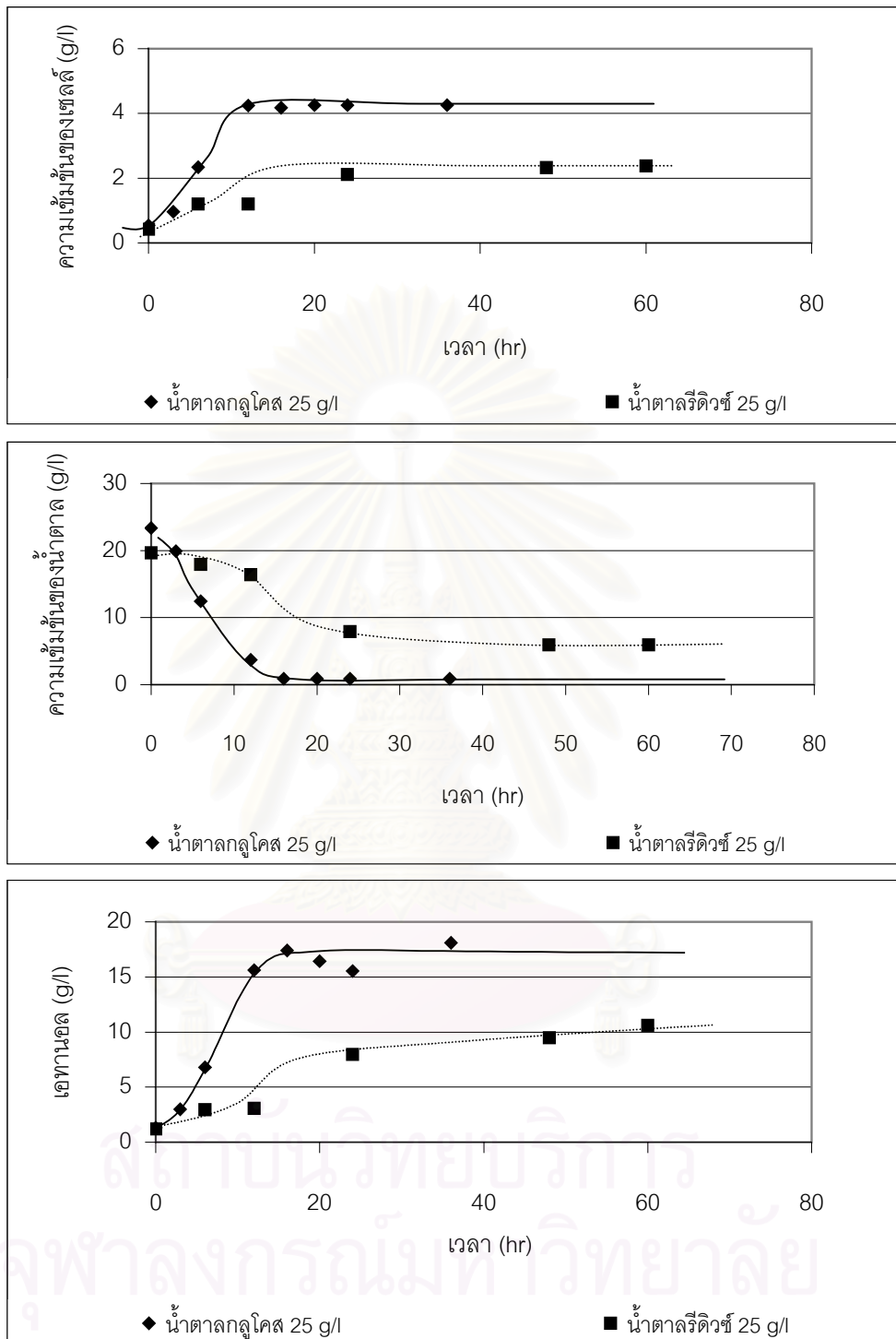
จากรูปที่ 5.27 และรูปที่ 5.28 พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร, 25 กรัมต่อลิตร และ 40 กรัมต่อลิตร ให้ผลการทดลองคล้ายๆ กัน นั่นคือในช่วงเริ่มต้นของการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และความเข้มข้นของเซลล์ และเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน พอหลังจากนั้นสารอาหารเริ่มเหลือน้อยลงมีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มคงที่

และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจนถึง 40 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าเชื้อยังสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็วและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงว่าถ้าให้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเพิ่มมากกว่า 40 กรัมต่อลิตร เชื้อก็ยังสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ดีจนถึงค่าค่าหนึ่งที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะมากเกินไป มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอล

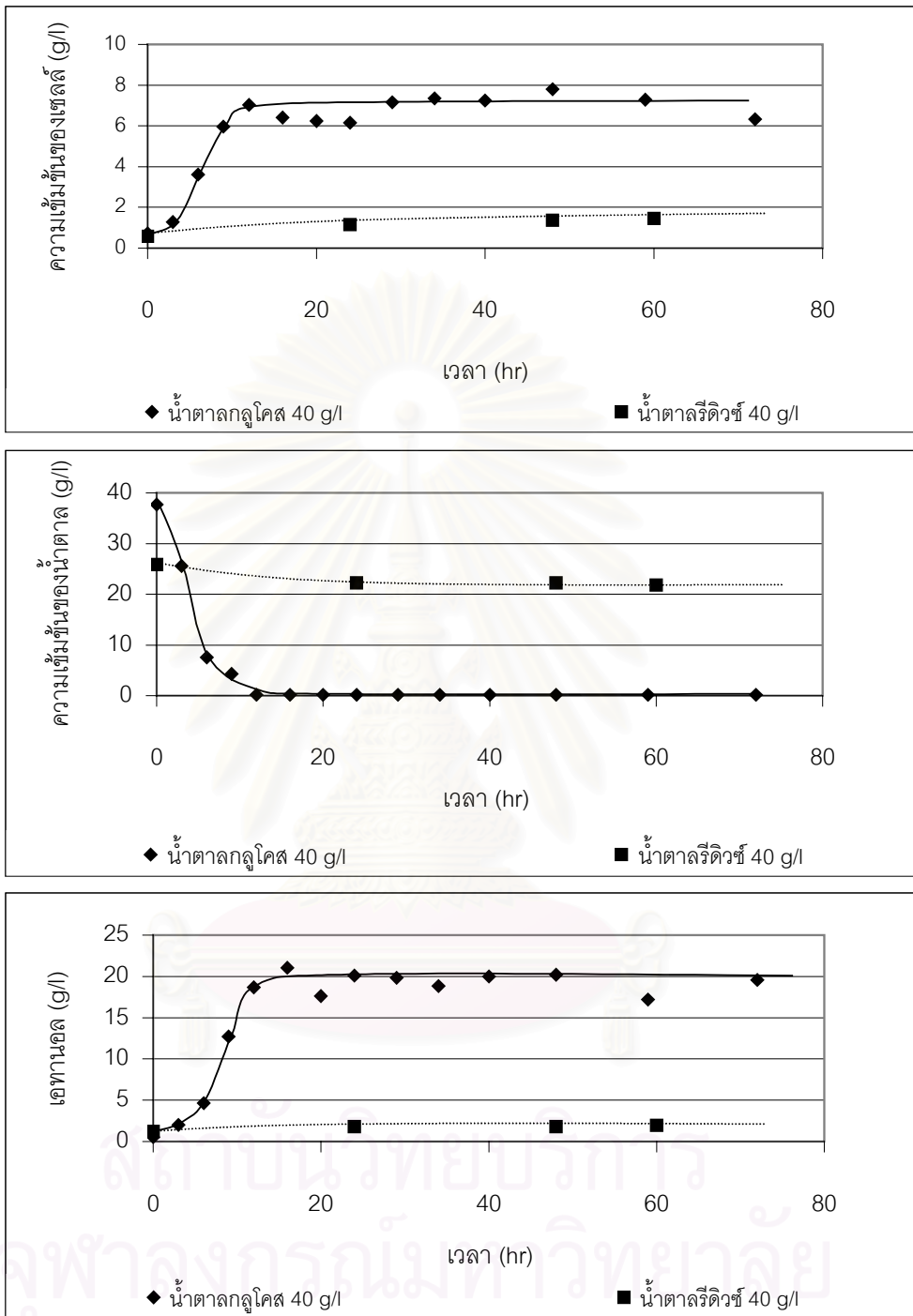
และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลดังรูปที่ 5.29, 5.30 และ 5.31



รูปที่ 5.29 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลกลูโคสที่ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 5.30 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ และน้ำตาลกลูโคสที่ 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 5.31 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ และน้ำตาลกลูโคสที่ 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

จากรูปที่ 5.29 และ 5.30 เป็นการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลกลูโคสที่ 10 กรัมต่อลิตร และ 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถใช้สารอาหารในการสร้างการเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกัน แต่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากในน้ำน้ำตาลรีดิวซ์ยังมีสิ่งเจือปนเหลืออยู่ จึงทำให้เชื้อผลิตเอทานอลได้ต่ำกว่า

และจากรูปที่ 5.31 เป็นการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลกลูโคสที่ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสเชื้อจะสามารถใช้น้ำตาลในการสร้างการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้เกือบหมด แต่ถ้าใช้น้ำตาลรีดิวซ์เชื้อจะไม่ค่อยเจริญเติบโตและผลิตเอทานอล เนื่องจากว่าเมื่อน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้นสิ่งเจือปนที่สะสมอยู่ก็มีมากขึ้นจึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอล

จากตารางที่ 5.7 เป็นตารางการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากกระบวนการหมักในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ จากตารางพบว่าสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง เช่น ค่าพีเอช และอุณหภูมิ ได้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยต่างๆ

จากงานวิจัยของ Christahopoulos P. และคณะ (1991) ได้ทำการทดลองผลิตเอทานอลจากฟางข้าวโดยใช้เชื้อ *Fusarium oxysporum* strain F3 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร จะผลิตเอทานอลได้ 8 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า แต่ได้ปริมาณเอทานอลน้อยกว่าในงานวิจัยนี้

และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kademi A. และ Baratti J. (1996) ได้ทำการทดลองผลิตเอทานอลจากไม้แอสเพนโดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* strain MSN77 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 61.1 กรัมต่อลิตร จะผลิตเอทานอลได้ 30 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าใช้เชื้อชนิดเดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ ซึ่งเชื้อ *Zymomonas mobilis* strain MSN 77 สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นได้สูงกว่าเชื้อ *Zymomonas mobilis* strain TISTR 405

ตารางที่ 5.7 การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

แหล่งคาร์บอน	จุลินทรีย์	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง			ความเข้มข้นของ น้ำตาลเริ่มต้น (g/l)	ความเข้มข้นของ เอทานอล (g/l)	% conversion	ethanol yield (g/g)	เอกสารอ้างอิง
		พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (hr)					
น้ำตาลกลูโคส	Zymomonas mobilis strain CP 4	5.0	30	-	60	55	-	0.46	Zhang และคณะ, 1995 อ้างถึง ใน Roger P.L และคณะ, 1997
ไม้แอสเพน	Zymomonas mobilis strain MSN 77	5.0	40	15	61.1	30	99.5	0.50	Kademi A. และ Baratti J., 1996
น้ำอ้อย	Zymomonas mobilis strain UQM 2716 (ATCC 39767)	6.8	35	29	121	60.8	95.4	-	Horst W.D. และ Paul F.G., 1985
ฟางข้าว	Fusarium oxysporum strain F3	5.5	30	72	40	8	67.5	0.275	Christahopoulos P. และ คณะ, 1991
ฟางข้าว	Saccharomyces cerevisiae strain TISTR 5013	5.0	30	96	2.7 กรัม	1.3056 กรัม หรือ 1.3 %	-	-	ระวีวรรณ แก้วกล้า, 2538
น้ำตาลกลูโคส	Zymomonas mobilis strain ATCC 10988	5.0-5.5	30	17.5	100	45	-	-	นริศ ธนทรัพย์ศรี และ พรรณี จันทร์ปฐมพงศ์, 2525
น้ำตาลกลูโคส	Zymomonas mobilis strain UQM 410 (ATCC 10988)	5.0-6.0	30	48	150	53	-	-	สรวง อุดมวรภัณฑ์ และ คณะ, 2525
เหง้ามันสำปะหลัง	Zymomonas mobilis strain TISTR 405 (ATCC 10988)	5.0	30	60	25	10.60	69.84	0.68	งานวิจัยนี้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยเป็นการนำเหง้ามันสำปะหลังที่เหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ ด้วยการนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล โดยนำเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังมาย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์แล้วนำไปหมักเป็นเอทานอล โดยมี 3 ขั้นตอนหลัก ซึ่งพอสรุปสภาวะของงานวิจัยได้ดังนี้ คือ

1. การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง

1.1 จากการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่า สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะเข้าไปสลายพันธะของโครงสร้างโมเลกุลระหว่างลิกนินกับเซลลูโลส ทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสหลุดออกมาจากตะกอนเหง้ามันสำปะหลัง และยังช่วยให้เส้นใยเซลลูโลสเกิดการพองน้ำ ทำให้การแพร่ของเอนไซม์เข้าไปในโครงสร้างผนังเซลล์ได้มากขึ้น

1.2 เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถละลายเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกมาได้มากขึ้น โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 โมลาร์

1.3 เมื่อให้อุณหภูมิที่ใช้ในการต้มสารละลายเพิ่มขึ้น มีผลทำให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถแพร่เข้าไปในโครงสร้างของเซลลูโลสได้เร็วขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยาและเกิดการบวมตัวได้เร็วขึ้น จึงสามารถละลายและแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกมาได้มากขึ้น โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

1.4 ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีผลต่อการแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสมากกว่าผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการต้ม เพราะในการทดลองได้ใช้อุณหภูมิในการต้มสารละลายเป็นเวลา 90 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่มากเพียงพอที่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะแพร่เข้าไปในโครงสร้างและทำปฏิกิริยาได้เกือบหมด

1.5 ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือเมื่อนำเหง้ามันสำปะหลังมาบด และร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดเล็กกว่า 0.25 มิลลิเมตร นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองแยกสารละลายออก แล้วเติมลงไปใหม่ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเหง้ามันสำปะหลังต่อสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 10 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะได้ปริมาณเซลลูโลส 96.46 % เฮมิเซลลูโลส 1.85 % และลิกนิน 1.69 % โดยจะสามารถละลายเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกมาได้มากที่สุด

2. การย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง

2.1 จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง ด้วยเอนไซม์เซลลูบรักซ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ เมื่อนำเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ มาทำปฏิกิริยาในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 4.8 และปริมาณเอนไซม์ 4.079 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 และจากการศึกษาการเปรียบเทียบการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังแบบแห้ง และแบบเปียก พบว่าการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังแบบเปียกจะให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้เหง้ามันสำปะหลังแบบแห้ง เนื่องจากเส้นใยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังแบบเปียกเกิดการพองน้ำ ทำให้การแพร่ของเอนไซม์เข้าไปในโครงสร้างผนังเซลล์ได้มากขึ้น

3. การผลิตเอทานอล

3.1 เมื่อนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเอทานอล โดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* stain TISTR 405 ซึ่งเป็น strain เดียวกันกับ ATCC 10988 จากการศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมต่อการหมักนั้น พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลและให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงกว่าการหมักที่ความเข้มข้น 10 และ 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดคือ 10.60 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ เป็น 0.68 กรัมต่อกรัม และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด 0.30 กรัมต่อลิตร*ชั่วโมง

3.2 ศึกษาหาค่าความเป็นกรดต่างที่ดีที่สุดในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอล พบว่าที่ความเป็นกรดต่าง 5.0 เชื้อจะสามารถผลิตเอทานอลโดยใช้เวลาน้อยที่สุด

3.3 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอล เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ และน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าถ้าใช้น้ำตาลรีดิวิซ์เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะผลิตเอทานอลได้ต่ำกว่า เนื่องจากในน้ำตาลรีดิวิซ์ยังมี impurity เหลืออยู่ และถ้าใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ 40 กรัมต่อลิตรเชื้อจะไม่ค่อยเจริญเติบโตและผลิตเอทานอล เนื่องจากว่าเมื่อน้ำตาลรีดิวิซ์มากขึ้น impurity ที่สะสมอยู่ก็มีมากขึ้นจึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอล

ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่าเหง้ามันสำปะหลังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งนับเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้กลายเป็นผลผลิตที่มีคุณค่า

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เอนไซม์เซลลูโลสรีกซ์ในการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองนั้นมีราคาแพง อาจมีผลทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลสูง ถ้าสามารถทำการผลิตเอนไซม์ขึ้นมาใช้เองอาจจะช่วยประหยัดต้นทุนได้ดีขึ้น
2. จากการทดลองพบว่า ถ้าใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์สูง ทำให้เชื้อไม่ค่อยเจริญเติบโต และได้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นน่าจะเปลี่ยนกระบวนการหมักจากการหมักแบบ batch เป็นแบบ fed batch โดยการควบคุมอัตราการเติมสับสเตรต เพื่อทำให้การเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการเกิดผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- คำพูน คุณานุกร, สรวง อุดมวรรณท์ และ ธัชพล กิตติจิตต์. การคัดเลือกแบคทีเรีย Zymomonas สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ ในการสร้างแอลกอฮอล์จากแหล่งน้ำตาลในธรรมชาติ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525.
- ธีรภัทร ศรีนรคุตร. เชื้อเพลิงเอทานอล: ทุษฎีเกี่ยวกับเอทานอล. วารสารการวิจัยและพัฒนา. 1(2544):57-64.
- นริศ ธนัทประภัสร์ และ พรรณี จันท์ปฐมพงศ์. การศึกษาความเหมาะสมของการผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อพันธุ์ Zymomonas mobilis. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525.
- นฤมล ศรียุทธธีรัตน์ และ กาญจนา ทูมมานนท์. การผลิตเอทานอลจากกากสับประรด. ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2529.
- ปราณี สติรพิพัฒน์กุล. การผลิตอะซิโตน-บิวทานอลจากผักตบชวาที่ถูกลดด้วยเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532.
- ปิยวรรณ สายมนอินทร์ และ พัชรินทร์ ฉัตรประเสริฐ. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส จากขยะกระดาษโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2538.
- พรชัย รวมศิลป์ และ สิริชัย เผ่าพหล. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสจากขยะจาก การเกษตร. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2540.
- พิชญา ภู่งนิตพันธ์. แบบจำลองจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจากแป้งมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545.
- พิสุทธิ พวงนาค. การกลายพันธุ์ของรา Acrophialophora sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539.
- ระวีวรรณ แก้วกล้า. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชา เคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2538.

- ลลิตา นีทัศน์จารุกุล. ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อ Cellulase Activity ในดินนาข้าว. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.
- สรวง อุดมวรภัณฑ์, คำพูน คุณานุกร และ รัชพล กิตติจิตต์. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของ *Zymomonas mobilis* กับความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525.
- สันทนา เสถียรไพศาล. การเปลี่ยนแปลงชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย *Acrophialophora* sp. และ *Candida brassicae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1. สำนักพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2538.

ภาษาอังกฤษ

- Acebal C., Castillon M.P., Estrada P., Mata I., Costa E., Aguado J., Romero D., Jimenez F. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM 9414 on physically treated wheat straw. Appl Microbiol Biotechnol. 24 (1986): 218-223.
- Farooq Latif, Mohammad Ibrahim Rajoka. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. Bioresource Technology 77 (2001): 57-63.
- Glazer A.W., Nikaido H. Microbial Biotechnology. New York : W.H. Freeman, 1995.
- Horst W.D., Paul F.G. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 22 (1985): 405-410.
- James P., Casey. Pulp and paper chemistry and chemical technology. USA : John Wiley & sons, 1960.
- Janusz Szcsodrak. The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. Biotechnology and Bioengineering. 32 (1988): 771-776.
- Johan Gullichsen, Hannu Paulapuro. Papermaking Science and Technology, Book 3 Forest Products Chemistry. Finland: Fapet Jyvaskyla, 2000.

- Johan Gullichsen, Carl-Joban Fogelholm. Chemical Pulping. Finland: Fapet Jyvaskyla, 2000.
- Kademi A., Baratti J. Effect of substrate concentration on ethanol production by *Zymomonas mobilis* on cellulose hydrolysate. Biotechnology Letters, vol.18 no. 9 (1996): 1019-1024.
- Martin R.San, Perez C., Briones R. Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*pinus radiata*) using steam explosion. Bioresource Technology 53 (1995): 217-223.
- Martin A.M. Bioconversion of waste materials to industrial products. London: Elsevier Applied Science, 1991.
- Mats Larsson, Mats Galbe, Guido Zacchi. Recirculation of process water in the production of ethanol from softwood. Bioresource technology. vol 60(1997): 143-151.
- Okeke B.C. Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases. Bioresource Technology 51 (1995): 23-27.
- Reddy O.V.S., Basappa S.C. Direct fermentation of cassava starch to ethanol by mixed cultures of *Endomycopsis fibuligera* and *Zymomonas mobilis*: Synergism and Limitations. Biotechnology Letters. vol. 18 no. 11 (1996): 1315-1318.
- Rogers P.L., Joachimsthal E.L., Haggett K.D. Ethanol from lignocellulosics: Potential for a *Zymomonas*-Based process. Australasian Biotechnology. vol. 5 no. 5 (1997): 304-309.
- Rogers P.L., Lee K.J., Tribe D.E. High productivity ethanol fermentation with *Zymomonas mobilis*. Process Biochem. 15 (1980): 7-11.
- Ross Aiken Gortner. Outlines of biochemistry. USA : John Wiley & sons, 1950.
- Sharma A., Khare S.K., Gupta M.N. Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase. Bioresource technology. vol. 78(2001): 281-284.
- Skotnicki M.L., Lee K.J., Tribe D.E., Rogers P.L. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. Applied and Environmental Microbiology. vol. 41 no. 4 (1981): 889-893.

Soto M.L., Kominguez H., Nunez M.J., Lima J.M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. *Bioresource technology*. vol. 49(1994): 53-59.

Stephen Y.L., Carlton W.D. Methods in lignin chemistry. Springer series in wood science, 1992.

TAPPI. Method for determination of alpha-, beta-, gamma-cellulose in pulp.

Technical Association of Pulp and Paper Industry, 2000-2001.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ใช้วิธีใน TAPPI 203 om-88

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีเตรียม : ละลายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 175 กรัม ในน้ำกลั่น และเจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต [$K_2Cr_2O_7$] เข้มข้น 0.5 นอร์มัล

วิธีเตรียม : ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 24.52 กรัมในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

3. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐานเข้มข้น 0.100 นอร์มัล

วิธีเตรียม : ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 4.904 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

4. สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตเข้มข้น 0.100 นอร์มัล

วิธีเตรียม : ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต [$Fe(NH_4)(SO_4) \cdot 6H_2O$] หนัก 40.5 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำการหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้ โดยนำไปไตเตรทกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน

วิธีหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอน : ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 12 มิลลิลิตร ลงในขวด โดยเอียงขวดทำมุมประมาณ 45 องศากับพื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หยดอินดิเคเตอร์ 2 ถึง 4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต ที่ต้องการทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

วิธีการคำนวณ :

$$N_2V_2 = N_1V_1$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต, นอร์มัล

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, นอร์มัล

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต, มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, มิลลิลิตร

5. สารละลายอินดิเคเตอร์ (indicator)

วิธีเตรียม : ละลาย 1,10-ฟีนานโทโรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) หนัก 1.5 กรัม กับเฟอร์ริสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot H_2O$) 0.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ในการไตเตรท

6. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ (ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.84)

7. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 นอร์มัล

วิธีเตรียม : ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 83.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งฟาง (ตะกอนฟาง) หนัก 1.5 กรัม น้ำหนักแห้ง ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร บันทึกรับน้ำหนักฟางไว้ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา จับเวลาทันทีที่เติมสารละลาย นำไปกวนบนเครื่องกวนสารเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังครบเวลา กวนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

2. กรองสารละลายเพื่อแยกตะกอนฟางออกโดยทิ้งสารละลายใส 10 มิลลิลิตรแรกของการกรอง เก็บสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์ปริมาณ แอลฟา-เซลลูโลส (เซลลูโลส)

3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.2 ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตรลงไป โดยเอียงขวดทำมุม 45 องศา กับพื้น เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.3 หยดอินดิเคเตอร์ 2 ถึง 4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟต ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนกระทั่งสารละลาย เปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้ม เป็นสีน้ำตาลอมม่วง บันทึกปริมาตรสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟต

3.4 เตรียมสารละลายแบลนด์ (blank) โดยปิเปตโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำวิธีการเดียวกับสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.1 ถึง 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 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง, มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายแบลงค์, มิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟต, นอร์มัล

A = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้, มิลลิลิตร

W = น้ำหนักฟางแห้ง, กรัม

6.85 = มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

4. การวิเคราะห์ปริมาณ แกมมา- เซลลูโลส

4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระบอกตวงที่มีจุกปิด เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 นอร์มัล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 ถึง 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 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 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง, มิลลิลิตร

V_4 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายแบลงค์, มิลลิลิตร

5. การวิเคราะห์ปริมาณ เบต้า- เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

การคำนวณ

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

2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน

คำนวณได้จาก ลิกนิน = 100 - เปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลส - เปอร์เซ็นต์ของเฮมิเซลลูโลส

3. วิธีวิเคราะห์หาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง โดยใช้วิธีของ Mandel และ Sternbery

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. สารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรดต่าง 4.8

วิธีเตรียม : ละลายกรดซิตริก 2.1014 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร และละลายโซเดียมซีเตรต 4.4115 กรัมในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งสองส่วนมาผสมกัน และเก็บในตู้เย็น

2. สารละลายกรดไดโนโตรซาลิไซลิก

วิธีเตรียม : ละลายกรดไดโนโตรซาลิไซลิก 5 กรัมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และค่อยๆ ละลายโซเดียมโปแตสเซียมทาร์ทเรตอีก 150 กรัม จนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร และเก็บในขวดที่บดแสงที่อุณหภูมิห้อง

วิธีวิเคราะห์

1. ใส่กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร จำนวน 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง

2. เติมสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรดต่าง 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเอนไซม์อีก 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 4

4. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Mandel และ Sternbery

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก
2. กลูโคส

การทำกราฟมาตรฐาน

1. อบกลูโคสที่อุณหภูมิ 105 – 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมหลอดทดลองให้มีสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

หลอดที่	กลูโคส (ml)	น้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้นของกลูโคส(mg/ml)
1	0	1.0	0
2	0.2	0.8	0.1
3	0.4	0.6	0.2
4	0.6	0.4	0.3
5	0.8	0.2	0.4
6	1.0	0	0.5

2. เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด และผสมให้เข้ากัน
3. นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นโดยย้ายมาวางในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา
4. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็นแบลนด์
5. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ แล้วหาค่าความชัน

วิธีวิเคราะห์

1. ดูตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ทำตามข้อ 3, 4 ในการทำกราฟมาตรฐาน โดยแปลงค่าใช้ตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตรแทน
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน

5. การตรวจวัดการเจริญของเชื้อ

5.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

การทำกราฟมาตรฐาน

สำหรับการทำกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร มีวิธีการดังนี้ นำตัวอย่างที่เก็บได้ในระยะการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น (1:50, 1:25, 1:20, 1:10, 1:5 เป็นต้น) นำส่วนหนึ่งไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร และอีกส่วนนำไปอบแห้งหาน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัม/ลิตร นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อใช้ในการคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจากตัวอย่างที่วัดค่าการดูดกลืนแทนการหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยตรง

วิธีวิเคราะห์ : ดูตัวอย่างน้ำหมักมาจำนวน 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 5 มิลลิลิตร นำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ตัวทำละลายเป็นแปลงค์ นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจากกราฟมาตรฐาน

5.2 การหาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

วิธีวิเคราะห์ : ดูตัวอย่างน้ำหมักมาแล้วหยดลงบนแผ่น Haemocytometer ปิดด้วยคัพเวอร์กลาส (cover glass) ทั้งแผ่นสไลด์ และคัพเวอร์กลาสจะต้องทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นก่อนและหลังการนับเซลล์ในแต่ละครั้ง นำไปตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียจากกล้อง

จุดตรวจคนโดยตรง จะสังเกตเห็นเซลล์มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เห็นนี้ โดยนับเซลล์ที่อยู่บนช่องใหญ่ในแนวเส้นทแยงมุม ซึ่งเป็นการสุ่มตัวอย่างที่ได้ค่าเฉลี่ยที่ดีที่สุด นำมาคำนวณหาค่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับได้

6. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

ในงานวิจัยนี้ใช้แก๊สโครมาโตกราฟีของ Shimadzu Model GC – 7AG

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

คอลัมน์ยาว 2 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.3 มิลลิเมตร บรรจุด้วย porapak Q อุณหภูมิคอลัมน์คงที่ที่ 190 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (injector) 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ (detector) 240 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาณของผลิตภัณฑ์หาได้จากการเทียบพื้นที่ใต้พีค (peak) ของสารที่ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ

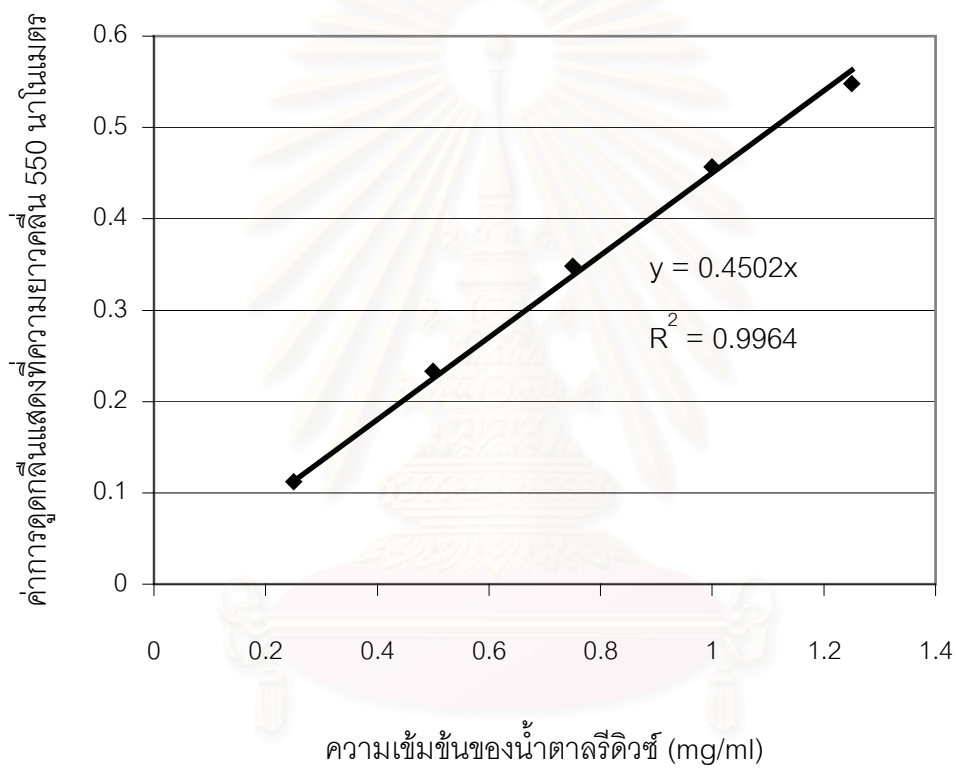
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



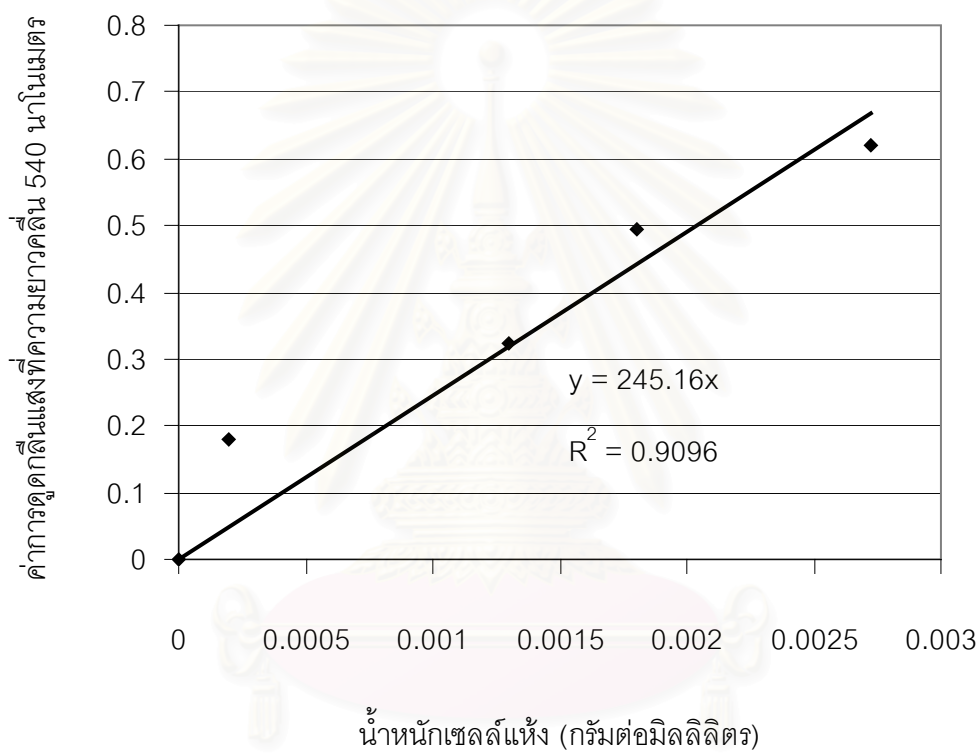
ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เส้นกราฟมาตรฐาน

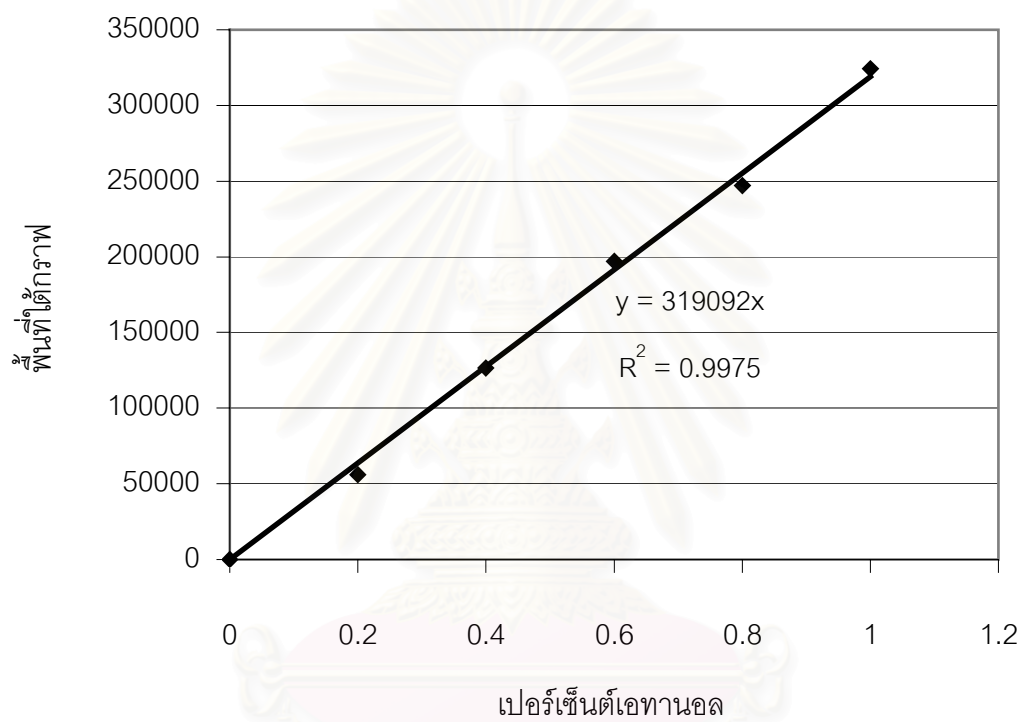


รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาน้ำตาลรีดิวซ์



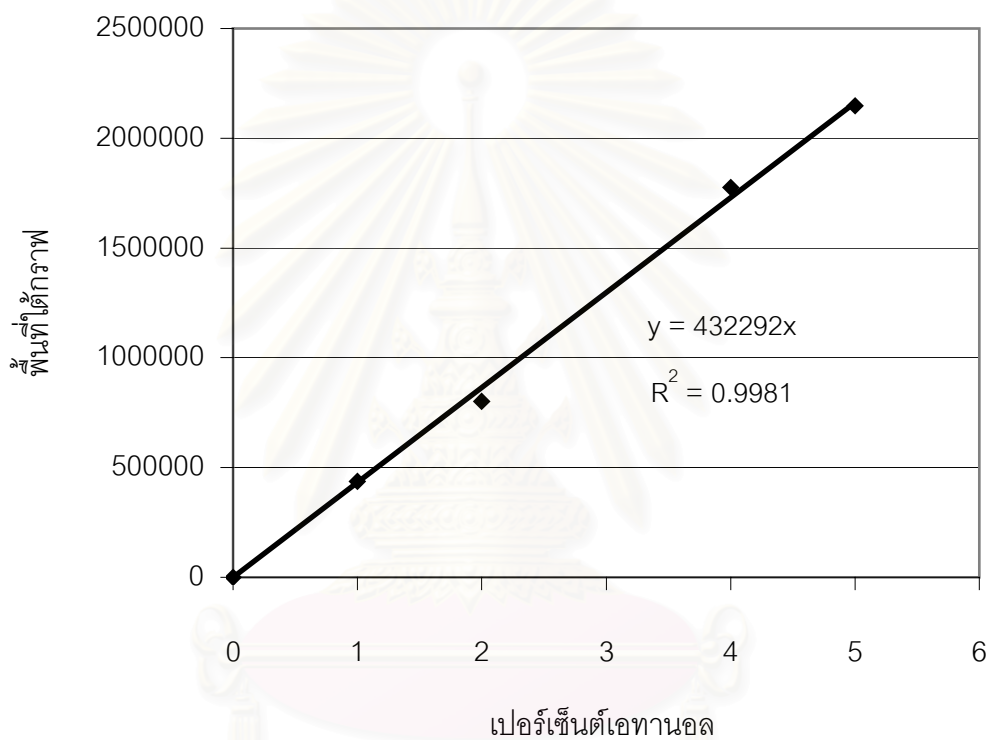
รูปที่ ๒.2 กราฟมาตรฐานสำหรับหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาเปอร์เซ็นต์เอทานอล ระหว่าง 0-1 %

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาเปอร์เซ็นต์เอทานอล ระหว่าง 1-6 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลอง

1. การศึกษาการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง

1.1 ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลัง ที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

ตารางที่ ค.1 ผลจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆ ในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

ส่วนประกอบต่างๆ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
เซลลูโลส	82.14
เฮมิเซลลูโลส	11.41
ลิกนิน	6.45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 ศึกษาการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ

ตารางที่ ค.2 ผลการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด และผ่านการปรับสภาพทางเคมีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่างๆ

ความเข้มข้น ของ NaOH (M)	อุณหภูมิที่ ใช้ต้ม (°C)	ปริมาณส่วนประกอบในตะกอน เหง้ามันสำปะหลัง (%น้ำหนักแห้ง)			ปริมาณส่วนประกอบในตะกอนเหง้ามันสำปะหลัง ที่สูญเสียไปในระหว่างการปรับสภาพ (%น้ำหนักแห้ง)			น้ำหนักเหง้ามันสำปะหลัง ที่หายไปในการปรับสภาพ (%)	% yield
		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน		
0.5	30	89.72	5.38	4.90	12.82	62.40	39.38	20.18	71.61
	50	90.26	6.15	3.59	13.11	57.41	55.97	20.93	71.37
	70	91.08	6.20	2.72	13.04	57.41	66.98	20.57	71.43
	90	92.29	4.71	3.00	14.46	68.54	64.65	23.87	70.26
1.0	30	93.59	3.24	3.17	10.35	77.65	61.40	21.32	73.64
	50	94.22	3.07	2.71	10.38	78.97	67.13	21.87	73.62
	70	94.30	3.63	2.07	11.07	75.37	75.19	22.54	73.05
	90	94.92	3.58	1.50	12.55	76.25	82.33	24.33	71.83
2.0	30	96.05	2.26	1.69	10.79	84.93	80.00	23.71	73.28
	50	96.46	1.85	1.69	12.10	87.91	80.47	25.15	72.20
	70	96.77	2.01	1.22	12.76	86.94	86.05	25.96	71.65
	90	97.33	1.49	1.18	15.77	90.71	86.98	28.91	69.19
4.0	30	97.79	1.27	0.94	12.22	91.76	89.30	26.27	72.10
	50	98.11	1.04	0.85	12.49	93.34	90.39	26.74	71.88
	70	98.52	0.48	1.00	14.63	97.02	88.99	28.84	70.11
	90	98.52	0.94	0.54	15.35	94.22	94.11	29.43	69.53

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง

2.1 การศึกษาหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ ค.3 ผลจากการวิเคราะห์หาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรดต่าง

4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

วัตถุดิบ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	% การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลัง เป็นน้ำตาลรีดิวซ์
กระดาศกรอง	15.21	10.14	27.38
เหง้ามันสำปะหลังแบบแห้ง	7.52	5.01	13.07
เหง้ามันสำปะหลังแบบเปียก	9.46	6.31	16.43

2.2 การศึกษาหาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามัน สำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

ตารางที่ ค.4 ผลการหาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่
ผ่านการปรับสภาพแล้ว

pH	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	% การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
4.0	7.55	19.68
4.5	7.65	19.94
4.8	7.85	20.46
5.0	7.65	19.94
5.5	6.70	17.46
6.0	3.00	7.82

2.3 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

ตารางที่ ค.5 ผลการหาค่าของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	% การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
35	6.25	16.30
40	7.22	18.81
50	7.95	20.72
60	5.07	13.20

2.4 การศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูโลสที่ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

ตารางที่ ค.6 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูโลสที่ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง (FPU/g)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	% การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณน้ำตาลต่อหน่วย FPU (g/FPU)	% การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ต่อหน่วย FPU
0.816	5.58	14.56	10.27	17.84
4.079	8.30	21.62	3.05	5.30
8.158	7.68	20.02	1.41	2.45
20	9.76	23.24	0.67	1.16
80	8.71	37.36	0.27	0.47
140	8.04	49.84	0.20	0.36

2.5 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

ตารางที่ ค.7 ผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพความเข้มข้น 4.079 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เวลา (hr)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	% การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
0	0.41	1.08
1	3.20	8.34
3	4.33	11.30
6	4.95	12.91
9	6.04	15.73
12	6.24	16.27
16	7.64	19.90
20	8.00	20.84
24	8.41	21.92
30	9.18	23.94
50	9.29	24.21

3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 405

3.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.8 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.05	0.68	8.00	0.91	2.10	0.000	0.000	0.000
4	5.05	0.98	6.81	1.79	2.50	0.090	0.358	0.265
12	4.96	2.68	2.22	3.37	5.60	0.116	0.314	0.108
20	4.97	2.68	1.70	3.22	7.70	0.002	0.029	0.001
45	4.99	2.78	1.34	2.67	10.90	0.000	0.004	-0.011

ตารางที่ ค.9 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.06	0.42	19.66	1.21	1.40	0.000	0.000	0.000
6	5.06	1.20	17.96	2.96	1.60	0.138	0.317	0.263
12	5.05	1.20	16.40	3.06	2.05	0.065	0.234	0.207
24	5.05	2.12	7.89	7.96	2.50	0.029	0.193	0.187
48	5.03	2.32	5.93	9.47	3.20	0.004	0.114	0.040
60	5.04	2.38	5.93	10.60	3.30	0.002	0.000	0.004

ตารางที่ ค.10 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.06	0.58	30.96	1.21	1.20	0.000	0.000	0.000
24	5.06	1.16	22.19	1.81	2.20	0.024	0.446	0.030
48	5.04	1.36	22.19	1.81	2.10	0.010	0.013	0.003
60	5.06	1.46	21.80	1.94	2.30	0.006	0.000	0.001

3.2 ผลของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.11 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.06	0.42	19.66	1.21	1.40	0.000	0.000	0.000
6	5.06	1.20	17.96	2.96	1.60	0.138	0.317	0.263
12	5.05	1.20	16.40	3.06	2.05	0.065	0.234	0.207
24	5.05	2.12	7.89	7.96	2.50	0.029	0.193	0.187
48	5.03	2.32	5.93	9.47	3.20	0.004	0.114	0.040
60	5.04	2.38	5.93	10.60	3.30	0.002	0.000	0.004

ตารางที่ ค.12 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.48	0.30	24.97	0.88	2.00	0.000	0.000	0.000
6	5.43	0.66	20.95	1.42	3.30	0.101	1.074	0.209
12	5.43	0.82	21.31	2.19	3.60	0.076	0.621	0.177
18	5.42	1.14	19.50	3.59	3.50	0.052	0.395	0.221
24	5.44	1.64	13.88	5.38	2.20	0.043	0.298	0.221
48	5.37	2.56	6.55	10.56	3.40	0.020	0.154	0.102
66	5.41	2.76	7.02	9.63	8.00	0.004	0.008	0.000
72	5.38	2.78	6.40	10.55	6.40	0.001	0.000	0.000

ตารางที่ ค.13 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.83	0.42	23.48	1.84	2.35	0.000	0.000	0.000
18	5.74	1.02	19.45	2.42	3.00	0.056	0.354	0.035
24	5.73	1.64	15.53	4.31	1.70	0.029	0.308	0.141
48	5.59	2.16	6.66	7.94	3.20	0.018	0.187	0.105
66	5.59	2.72	7.12	10.10	9.60	0.008	0.007	0.039
72	5.56	2.64	6.60	10.77	8.00	0.000	0.000	0.025

3.3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.14 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.06	0.52	8.99	1.21	0.36	0.000	0.000	0.000
3	4.98	0.95	5.87	2.26	0.74	0.195	0.943	0.476
6	4.76	2.15	3.66	5.02	1.92	0.258	0.475	0.594
12	4.81	2.72	0.64	6.58	2.08	0.039	0.188	0.107
16	4.80	2.77	0.55	8.86	1.76	0.003	0.025	0.044
20	4.82	2.76	0.59	7.04	1.44	0.001	0.005	0.015
24	4.78	2.76	0.58	7.41	1.84	0.000	0.001	0.017
36	4.84	2.76	0.58	7.70	1.84	0.000	0.000	0.009

ตารางที่ ค.15 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.02	0.54	23.35	1.33	0.36	0.000	0.000	0.000
3	4.93	0.96	19.91	2.99	0.74	0.187	1.529	0.738
6	4.72	2.34	12.43	6.80	1.92	0.279	1.511	0.770
12	4.67	4.24	3.70	15.61	2.08	0.091	0.453	0.455
16	4.62	4.18	0.90	17.41	1.76	0.007	0.151	0.079
20	4.63	4.26	0.92	16.44	1.44	0.001	0.014	0.015
24	4.64	4.26	0.88	15.53	1.84	0.001	0.000	0.013
36	4.64	4.26	0.92	18.09	1.84	0.000	0.000	0.004

ตารางที่ ค.16 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์)	μ (h^{-1})	q_s (g/g·h)	q_p (g/g·h)
0	5.11	0.72	37.67	0.52	0.18	0.000	0.000	0.000
3	5.00	1.28	25.54	1.98	0.68	0.188	4.051	0.488
6	4.76	3.62	7.56	4.62	1.41	0.319	2.444	0.359
9	4.61	5.97	4.30	12.73	2.82	0.163	0.324	0.564
12	4.54	7.02	0.19	18.68	5.06	0.040	0.114	0.305
16	4.59	6.40	0.18	21.02	6.08	0.008	0.020	0.022
20	4.62	6.24	0.16	17.63	6.64	0.004	0.001	0.000
24	4.64	6.16	0.15	20.12	6.24	0.001	0.000	0.000
29	4.69	7.16	0.17	19.81	5.52	0.001	0.000	0.000
34	4.60	7.36	0.17	18.84	3.52	0.001	0.000	0.000
40	4.63	7.24	0.16	19.98	2.32	0.001	0.000	0.000
48	4.63	7.80	0.18	20.19	3.44	0.000	0.000	0.000
59	4.62	7.28	0.13	17.19	3.20	0.000	0.000	0.000
72	4.72	6.32	0.13	19.58	1.92	0.000	0.000	0.000



ภาคผนวก ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างการคำนวณผลการทดลอง

1. ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของเซลลูโลส (% cellulose yield) คำนวณจากความสัมพันธ์

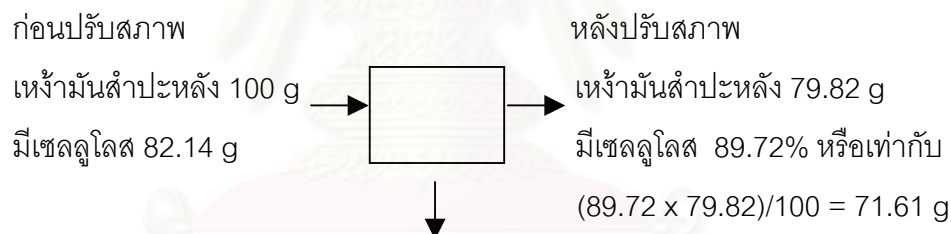
$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลได้ของเซลลูโลส} = \frac{\text{ปริมาณของเซลลูโลสที่ได้หลังการปรับสภาพ}}{\text{ปริมาณของเหง้ามันสำปะหลัง}} \times 100$$

แทนค่าผลการทดลองจากตารางที่ ค.2 ในภาคผนวก ค

จะได้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลได้ของเซลลูโลส} = \frac{(100 - 20.18) \times 89.72}{100} = 71.61$$

2. ปริมาณส่วนประกอบในตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่สูญเสียไปในระหว่างการปรับสภาพ คิดได้จากการใช้สมดุลมวลสาร ดังตัวอย่างโดยใช้ตารางที่ ค.2 ในภาคผนวก ค



หายไปในการปรับสภาพ

เหง้ามันสำปะหลัง 20.18 g

มีเซลลูโลส = 82.14 - 71.61 = 10.53 g

คิดเป็น $(10.53 / 82.14) \times 100 = 12.82 \%$

3. เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวิซ์ (% conversion)

$$\text{คำนวณจาก} = \frac{\text{น้ำหนักกรัมของน้ำตาลรีดิวิซ์} \times 162 \times 100}{\text{น้ำหนักกรัมของเหง้ามันสำปะหลัง} \times 180}$$

4. การคำนวณหาหน่วยของเอนไซม์ (unit of enzyme)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (FPU) คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

$$\text{คำนวณได้จาก} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ได้ (กรัม)} \times 10^6}{180 \times 60}$$

แทนค่าผลการทดลองจากตารางที่ ค.3 ในภาคผนวก ค
จะได้

$$\begin{aligned} \text{ความสามารถในการย่อยกระดาษกรองของเอนไซม์} &= \frac{(15.21 \times 10^{-3}) \times 10^6}{180 \times 60} \\ &= 1.41 \text{ FPU} \\ &= 2.82 \text{ FPU / ml ของเอนไซม์} \end{aligned}$$

5. การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่างๆ (μ , q_s และ q_p)

การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (q_s) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) จากทฤษฎีในหัวข้อที่ 2.4 สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\mu = (1/X) \frac{dX}{dt} = (1/X) \frac{\Delta X}{\Delta t}$$

$$q_s = -(1/X) \frac{dS}{dt} = -(1/X) \frac{\Delta S}{\Delta t}$$

$$q_p = (1/X) \frac{dP}{dt} = (1/X) \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

6. อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (Volumetric ethanol productivity, P_{\max})

$$\text{คำนวณได้จาก} = \frac{\text{ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุด (กรัมต่อลิตร)}}{\text{เวลาที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (ชั่วโมง)}}$$

7. ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังเป็นผลิตภัณฑ์ (% conversion)

$$\text{คำนวณได้จาก} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)}}$$

แทนค่าผลการทดลองจากตารางที่ ค.8 ในภาคผนวก ค
จะได้

$$\% \text{ conversion} = \frac{(8 - 2.22) \times 100}{8} = 72.25$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ เกิดเมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดสมุทรสาคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย