

การเปลี่ยนแปลงชีวภาพของลิแกโนเซลลูโลสเป็นเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและ
การหมักแบบต่อเนื่องโดย *Acrophialophora* sp. และ *Candida brassicae*

นางสาว สันทนา เสถียรไพศาล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-387-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17057449

BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSICS TO ETHANOL BY
SIMULTANEOUS HYDROLYSIS AND FERMENTATION TECHNIQUES
USING *Acrophialophora* sp. AND *Candida brassicae*

Miss Santana Sathienpaisal

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

Programme of Biotechnology

Graduate School

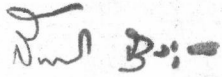
Chulalongkorn University

1996

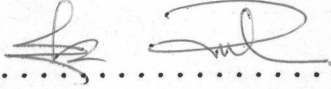
ISBN 974-634-387-4

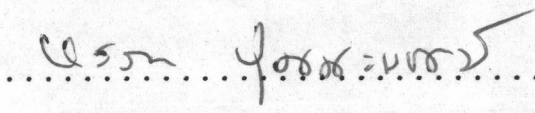
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงชีวภาพของลิกนินเซลลูโลสเป็นเอทานอลด้วย
วิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย
Acrophialophora sp. และ *Candida brassicae*
โดย นางสาว สันทนา เสถียรไพศาล
หลักสูตร เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ھرรษา บุญพะยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ มุกดา กุหิรัญ

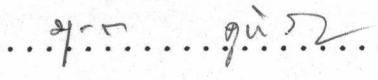
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

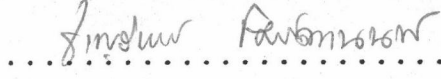

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุษวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ดร. สุเมธ ตันตระเชียร)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ھرรษา บุญพะยัคฆ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ มุกดา กุหิรัญ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โจนิจิตานนท์)



พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

สันทนา เสถียรไพศาล : การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทานอลด้วยวิธีการ
ย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย Acrophialophpra sp. และ Candida
brassicae (BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSICS TO ETHANOL BY SIMULTA-
NEOUS HYDROLYSIS AND FERMENTATION TECHNIQUES USING Acrophialphora sp.
AND Candida brassicae) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ทรรษา ปุณณะพยัคฆ์ รศ. มุกดา
คุหิรัญ , 106 หน้า. ISBN 974-634-387-4

กระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องใช้ในการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลู
โลสโดยการรวมปฏิริยาการย่อยสลายและการหมักไว้เป็นขั้นตอนที่ต่อเนื่องในถังหมักเดียวกัน โดยเซลลู
โลสจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสจากนั้นยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสที่ได้ไป
เป็นเอทานอลอย่างรวดเร็ว เมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและ
การหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Acrophialophora sp. และยีสต์ Candida
brassicae โดยใช้เส้นใยป่านศรนารายณ์เป็นวัสดุหมัก พบว่า การใช้ปริมาณเอนไซม์ 25 เท่า โดยค่าน
วนจากจำนวนของน้ำหนักแห้งวัสดุหมัก ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น 3×10^{10} เซลล์/มล. pH 5.0 อุณหภูมิ
45^๐C สามารถให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 0.9125 เปอร์เซ็นต์ (0.3042 กรัม/กรัมสับสเตรท (g/g))
และการเติม casein peptone ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ soy peptone ความเข้มข้น
0.075 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารเสริม สามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้ 1.267 เปอร์เซ็นต์ (0.422 g/g)
และ 0.9301 เปอร์เซ็นต์ (0.310 g/g) ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าวัสดุหมักที่ไม่มีการเติมอาหารเสริม 1.76
เท่า และ 1.29 เท่า ตามลำดับ

การศึกษาแนวทางในการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างเชื้อรา
Acrophialophora sp. และยีสต์ Candida brassicae พบว่าใช้เชื้อราที่มีอายุ 6 วัน ความเข้มข้น
ยีสต์เริ่มต้น 3×10^{10} เซลล์/มล. ที่อุณหภูมิ 45^๐C สามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้ 0.7822 เปอร์เซ็นต์
(0.2607 g/g)

ภาควิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ.....
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ.....
ปีการศึกษา2538.....

ลายมือชื่อนิสิตสันทนา เสถียรไพศาล.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาศ.ดร. ทรรษา ปุณณะพยัคฆ์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วมผศ.ดร. มุกดา คุหิรัญ.....

C526568 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: SIMULTANEOUS HYDROLYSIS AND FERMENTATION / Acrophialophora sp. / Candida brassicae

SANTANA SATHIENPAISAL : BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSICS TO ETHANOL BY SIMULTANEOUS HYDROLYSIS AND FERMENTATION TECHNIQUES USING Acrophialophora sp. AND Candida brassicae. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., ASSO.PROF. MUKDA KUHIRUN 106 pp. ISBN 974-634-387-4

The simultaneous hydrolysis and fermentation (SHF) process has been used for the production of ethanol from lignocellulosic using one bioreactor with continuous reactions starting from the saccharification of cellulose to glucose followed by a rapid conversion of glucose by yeast to ethanol. Optimum conditions of the SHF process using Acrophialophora sp. cellulase, Candida brassicae and Agave sisalana fiber were investigated. The condition of having 25 folds enzyme, 3×10^{10} cells/ml yeast inoculum pH 5.0 at 45°C gave the maximum ethanol yields of 0.9125 % (0.3042 g/g substrate). Addition of 0.05 % casein peptone or 0.075 % soy peptone as supplements were beneficial giving ethanol yields of 1.267 % (0.422 g/g or 1.76 folds increased) from casein peptone and 0.9301 % (0.310 g/g or 1.29 folds increased) from soy peptone respectively.

Study of the co-cultured fermentation process using Acrophialophora sp. and Candida brassicae revealed that the use of 6 day-old fungal culture, 3×10^{10} yeast cells/ml, at 45°C gave ethanol yield of 0.7822 % (0.2607 g/g).

ภาควิชา..... BIOTECHNOLOGY.....

สาขาวิชา..... BIOTECHNOLOGY.....

ปีการศึกษา..... 2538.....

ลายมือชื่อนิสิต..... สันตนา แซ่เทียนpaisal.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... หุนสา พูนPAYAK.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... มุกดา กุหิRUN.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผศ.ดร.हररषषष ढुณณะพัยคณั้ อาจารย์ที่ปรึกษาและ รศ.มุกดา กุหิรัณู อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วมที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆตลอดระยะเวลาของการวิจัย

กราบขอบพระคุณ ดร.สุเมธ ดันตระเชียร และ ผศ.ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ที่ได้กรุณา เป็นกรรมการสอบ และให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สัณห์ พลิชยกุล ที่ได้กรุณา รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และให้คำแนะนำด้านการเรียนในชั้นปีที่ 1 ของการเรียนในระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพฤกษศาสตร์รวมทั้ง เจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาประจำคณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา ที่ได้ให้วิชาความรู้ ในการเรียนระดับชั้นปริญญาโท

ขอขอบคุณ คุณเกรียงศักดิ์ แซ่ลี และคุณ พรรษา คมสูง จากบริษัท สนเปียว จำกัด อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ ที่อำนวยความสะดวกและอนุเคราะห์เสั้เนียบ ปรานศรณารายณ์ที่นำมาใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพและ พฤกษศาสตร์ทุกคนที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีมาตลอด

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ พี่น้องในครอบครัว เสถียรไพศาลทุกท่านที่คอยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านตลอดการ เรียนในระดับปริญญาโท

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ

บทที่

1. บทนำ	1
2. การตรวจเอกสาร	7
3. อุปกรณ์และวิธีการศึกษา	21
4. ผลการทดลอง	28
5. วิเคราะห์ผลการทดลอง	64
6. สรุปผลการทดลอง	71
รายการอ้างอิง	72
ภาคผนวก	80
ประวัติผู้เขียน	106

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการ ย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	29
2. ผลของความเข้มข้นยีสต์ เริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการ ย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	33
3. ผลของความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการ ย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	37
4. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการ ย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	41
5. ผลของการเติม casein peptone type S ต่อการผลิต เอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	45
6. ผลของการเติม soy peptone ต่อการผลิต เอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	48
7. ผลของอายุเชื้อรา เริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน	52
8. ผลความเข้มข้นยีสต์ เริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน	56
9. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน	60

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงสูตรโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างของ เซลลูโลส	9
2. แสดงการหมักเอทานอลที่ใช้ปริมาณเอนไซม์แตกต่างกัน	30
3. ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลาย และการหมักแบบต่อเนื่อง	31
4. แสดงการหมักเอทานอลที่ใช้ความเข้มข้นยีสต์แตกต่างกัน	34
5. ผลของความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการ ย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	35
6. แสดงการหมักเอทานอลที่ใช้ความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน	38
7. ผลของความความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการ ย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	39
8. แสดงการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	42
9. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและ การหมักแบบต่อเนื่อง	43
10. แสดงการหมักเอทานอลที่มีการเติม casein peptone เป็นอาหารเสริม	46
11. ผลของการเติม casein peptone type S ต่อการผลิตเอทานอล ด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	47
12. แสดงการหมักเอทานอลที่มีการเติม soy peptone เป็นอาหารเสริม	49
13. ผลของการเติม soy peptone ต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการ ย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง	50
14. แสดงการหมักเอทานอลแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน ที่อายุเชื้อราแตกต่างกัน	53

15.	ผลของอายุ เชื้อรา เริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้ เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน	54
16.	แสดงการหมัก เอทานอลแบบใช้ เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน ที่ความเข้มข้นยีสต์แตกต่างกัน	57
17.	ผลของความเข้มข้นยีสต์ เริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้ เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน	58
18.	แสดงการหมัก เอทานอลแบบใช้ เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	61
19.	ผลของอุณหภูมิในการหมักต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้ เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน	62
20.	แผนภูมิการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส	63