

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
บทที่ 1	บทนำ
1.1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย
1.3	ขอบเขตของโครงการวิจัย
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ
บทที่ 2	ทฤษฎีและวารสารที่เกี่ยวข้อง
2.1	ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย
2.2	การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง
2.3	วัสดุลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอล
2.4	เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ต้องการใช้เพื่อย่อยลิกโนเซลลูโลส
2.5	กระบวนการหมักสถานะของแข็ง (solid-state fermentation) เพื่อผลิตเอนไซม์
2.6	กระบวนการหมักกึ่งเหลว (submerged fermentation) เพื่อผลิตเอทานอล
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย
3.1	การเตรียมวัตถุดิบ
3.2	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี
3.3	การเตรียมจุลินทรีย์ผสม
3.4	การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักแข็งกากกะทิด้วยเชื้อผสม RT-P3
3.5	การหมักแข็งกากกะทิด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ที่สภาวะเหมาะสม
3.6	การผลิตเอนไซม์ผสมสด CCNR-RT-P3
3.7	การผลิตผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3

สารบัญเรื่อง

		หน้า
3.8	การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์ในขั้นตอนเดียวจากกากกะติด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอล	53
3.9	การหมักกึ่งเหลวแบบกะในขั้นตอนเดียวจากกากกะติด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอลที่สภาวะเหมาะสม	56
3.10	กระบวนการหมักกึ่งเหลวแบบ Fed-batch เพื่อผลิตเอทานอลจากกากกะติด้วยผงเอนไซม์ผสม CCN-RT-P3	56
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์	57
4.1	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากกะติ	57
4.2	ผลของปริมาณอาหารเหลวต่อการหมักแข็งกากกะติด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3	58
4.3	ผลการผลิตผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3	71
4.4	การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกึ่งเหลวแบบกะจากกากกะติด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอล	76
4.5	ผลของการหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะและกึ่งกะจากกากกะติด้วยเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสม	79
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย	85
5.1	วัตถุประสงค์	85
5.2	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักแข็งกากกะติด้วยจุลินทรีย์ผสม	86
5.3	การผลิตผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3	88
5.4	การใช้วิธีการทดลองออร์โทโกนอลหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกึ่งเหลวแบบกะจากกากกะติด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอล	88
5.5	การหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะและกึ่งกะจากกากกะติด้วยเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสม	89
เอกสารอ้างอิง		90

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบโดยประมาณ (%) ของวัสดุชีวมวลชนิดต่างๆ หรือของเหลือทิ้งจากเกษตรกรรม ที่สามารถถูกนำไปใช้สำหรับการย่อยสลายให้ได้น้ำตาลอย่างมีศักยภาพเพื่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ ร้อยละของเก่าและอื่นไม่ได้แสดงไว้ในตาราง	12
ตารางที่ 2.2 ข้อได้เปรียบและข้อด้อยของกระบวนการปรับสภาพเบื้องต้นวัสดุลิกโนเซลลูโลสแบบต่างๆ	15
ตารางที่ 2.3 ผลได้ของเอทานอลชีวภาพจากการย่อยสลายลำต้นข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น	19
ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบสถานะและสมรรถนะของกระบวนการที่ใช้ย่อยสลายเซลลูโลส 3 แบบ	20
ตารางที่ 2.5 ชนิดโพลีแซคคาไรด์หลักที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลส	27
ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสของวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่างๆ	30
ตารางที่ 2.7 เอนไซม์หลักบางชนิดที่ต้องการใช้ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสให้เป็นโมโนเมอร์	37
ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารเหลวสำหรับการหมักแข็งกากกะทิด้วยเชื้อผสม RT-P3	46
ตารางที่ 3.2 การออกแบบชุดการทดลองแบบสุ่มของการหมักกึ่งเหลวแบบกะ	54
ตารางที่ 3.3 การออกแบบชุดการทดลองแบบสุ่มด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอลเพื่อหาสถานะที่เหมาะสม	55
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากกะทิจากตลาดและโรงงาน	57
ตารางที่ 4.2 กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส น้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมจากการหมักแข็งกากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 จากงานเพาะเชื้อด้วยอาหารเหลว LM ที่ pH เท่ากับ 5 ที่สถานะเหมาะสม	61
ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส น้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมจากการหมักแข็งกากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้วปริมาณต่างๆ ที่อัตราส่วนกากกะทิต่ออาหารเหลวคงที่เท่ากับ 1:3	64
ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมของการหมักแข็งกากกะทิจากตลาด (CCNR-M) และกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F)	67

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 4.5	กิจกรรมของเอนไซม์ผสมของกากกะทิจากตลาด (CCNR-M) และกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F)	68
ตารางที่ 4.6	ร้อยละความชื้นของเอนไซม์ผสมจากกากกะทิตะหว่างการอบแห้ง	74
ตารางที่ 4.7	พลังงานไฟฟ้าและค่าใช้จ่ายในการอบแห้งแต่ละการทดลอง	74
ตารางที่ 4.8	ค่าใช้จ่ายวัตถุดิบและสารเคมีของการหมักแข็งกากกะทิในตู้บ่มต้นแบบ	75
ตารางที่ 4.9	ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานของการหมักแข็งกากกะทิในตู้บ่มต้นแบบ	75
ตารางที่ 4.10	ผลของเอทานอลที่ได้จากการหมักกึ่งเหลวกากกะทิด้วยผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวปริมาตร 100 mL โดยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 1)	76
ตารางที่ 4.11	ผลการคำนวณความเข้มข้นเอทานอลที่สภาวะต่างๆ ของการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์โดยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 1)	77
ตารางที่ 4.12	ผลของเอทานอลที่ได้จากการหมักกึ่งเหลวกากกะทิด้วยผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวปริมาตร 100 mL วิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 2 และ 3)	78
ตารางที่ 4.13	ผลการคำนวณความเข้มข้นเอทานอลที่สภาวะต่างๆ ของการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์โดยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 2 และ 3)	79
ตารางที่ 5.1	เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของอนุภาคกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน	85
ตารางที่ 5.2	ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมแมนแนนเนส ไฮแลนเนส และเซลลูเลส ของการหมักแข็งกากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากงานพีดีเอและซามแก้ว ระยะเวลาหมัก 6 วัน	87
ตารางที่ 5.3	ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมแมนแนนเนส ไฮแลนเนส เซลลูเลส และระยะเวลาหมักของการหมักแข็งกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน	87
ตารางที่ 5.4	ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมและน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมเซลลูเลส แมนแนนเนส และไฮแลนเนส ก่อนและหลังการอบแห้ง	88

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	แผนภาพการผลิตเอทานอลชีวภาพจากชีวมวลประเภทวัสดุ lignocellulosic (ก) กระบวนการแบบดั้งเดิม (ข) กระบวนการหมักแบบรวมปฏิกริยาและการหมักร่วม (simultaneous saccharification and co-fermentation process, SSCF) (ค) consolidated bioprocessing (CBS), LCB, lignocellulosic biomass เส้นประแทนทางเลือกของกระบวนการเพิ่มเติมขึ้นกับกระบวนการบำบัดเบื้องต้นที่เลือกใช้	13
รูปที่ 2.2	แผนภาพจุดประสงค์การปรับปรุงสภาพเบื้องต้นของวัสดุ lignocellulosic	14
รูปที่ 2.3	ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายหลักที่เกิดระหว่างไฮโดรไลซิสของวัสดุ lignocellulosic	16
รูปที่ 2.4	แผนภาพของการย่อยสลายด้วยกรดเจือจาง (ขั้นตอนที่ 1 และ ขั้นตอนที่ 2) และการหมักแบบแยกของน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซส	18
รูปที่ 2.5	การทำงานของเอนไซม์ย่อยสลาย cellulose	20
รูปที่ 2.6	โครงสร้างของแมนแนนและเอนไซม์ที่ต้องการย่อยสลายแมนแนน (ก) สายโซ่ตรงแมนแนน สายโซ่ตรงหลักแมนแนนถูกย่อยสลายด้วย เบต้า-แมนแนนเนส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (ข) แอนโนส ซึ่งถูกย่อยต่อไปโดยเบต้า-แอนโนซิเดส (β -annosidase) ผลได้ในที่สุดคือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแมนโนส	24
รูปที่ 3.1	กากกะทิจากตลาดชุมชนเคหะรังสิตถูกนำตากแดดเพื่อไล่ความชื้น	42
รูปที่ 3.2	เครื่องหาการกระจายขนาดอนุภาคกากกะทิโดยใช้ตะแกรงมาตรฐาน	42
รูปที่ 3.3	ไดโคเดอร์มา รีซี RT-P1 เติบโตบนอาหารแข็งพีดีเอ	43
รูปที่ 3.4	แซคคาโรมายซีส ซีวีซี RT-P2 เติบโตบนอาหารแข็งวายเป็นเอ็มเอ	44
รูปที่ 3.5	เชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (ก) วันแรก (ข) อายุ 7 วัน	45
รูปที่ 3.6	กากกะทีก่อนการทำให้ปลอดเชื้อ (ก และ ค) แหล่งที่ 1 ตลาด (ข) แหล่งที่ 2 โรงงาน	47
รูปที่ 3.7	หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลว	47
รูปที่ 3.8	การหมักแข็งกากกะทิในขามแก้วด้วยหัวเชื้อผสม RT-P3 ในอาหารเหลวสูตร LM ที่ pH5	48
รูปที่ 3.9	การหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสมจากตลาดและโรงงานในตู้บ่มต้นแบบที่ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$	49

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 3.10	(ก) กากกะทิจากตลาดและโรงงาน (ข) หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม	50
รูปที่ 3.11	(ก) การผสมกากกะทิจากตลาดกับหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่องกวนผสม (ข) ปิดฝากล่องด้วยฟิล์มพลาสติกเจาะรูถี่ๆ	50
รูปที่ 3.12	การหมักแข็งกากกะทิจากตลาดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 10 ลิตร ด้วยหัวเชื้อผสม RT-P3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสมในตู้บ่มต้นแบบ	50
รูปที่ 3.13	การเตรียมเอนไซม์ผสมใส่ตะกร้าก่อนเข้าเครื่องอบแห้ง	51
รูปที่ 3.14	การคลุกผสมเอนไซม์ก่อนการอบแห้งในกล่องขนาดใหญ่	51
รูปที่ 3.15	การเรียงตะกร้าอบแห้งที่มีเอนไซม์ผสมเข้าเครื่องอบแห้งต้นแบบ	51
รูปที่ 3.16	ตำแหน่งการวางตะกร้าในเครื่องอบแห้งต้นแบบ	52
รูปที่ 3.17	ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายในเครื่องอบแห้งต้นแบบ	52
รูปที่ 3.18	การบรรจุผงเอนไซม์ผสมใส่ถุงเคลือบอะลูมิเนียมกันความชื้น	52
รูปที่ 3.19	การหมักกึ่งเหลวแบบกะ (ซ้ายมือ) และกึ่งกะ (ขวามือ) ที่สภาวะเหมาะสมในถังปฏิกรณ์แก้ว ขนาด 20 ลิตร เพื่อผลิตเอทานอลจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3	56
รูปที่ 4.1	ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาตรอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4	58
รูปที่ 4.2	กิจกรรมของเซลล์ลูลส์กับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาตรอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4	59
รูปที่ 4.3	กิจกรรมของแมนแนนเนสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาตรอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4	59
รูปที่ 4.4	กิจกรรมของไซแลนเนสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาตรอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4	60
รูปที่ 4.5	น้ำตาลรีดิวซ์กับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาตรอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4	60
รูปที่ 4.6	กิจกรรมของเซลล์ลูลส์กับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาตรอาหารเหลวคงที่ แปรผันหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ	62

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 4.7	กิจกรรมของแมนแนนเนสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลวคงที่ แปรผันหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในขามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ	62
รูปที่ 4.8	กิจกรรมของไซแลนเนสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลวคงที่ แปรผันหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในขามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ	63
รูปที่ 4.9	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์กับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลวคงที่ แปรผันหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในขามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ	63
รูปที่ 4.10	ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสม RT-P3 กับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลวคงที่ แปรผันหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในขามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ	64
รูปที่ 4.11	ความแตกต่างของสีระหว่างกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน	65
รูปที่ 4.12	เปรียบเทียบการหมักแข็งกากกะทิจากตลาดที่ระยะเวลาเริ่มต้น (ซ้าย) และ 7 วัน (ขวา)	66
รูปที่ 4.13	เปรียบเทียบการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานที่ระยะเวลาเริ่มต้น (ซ้าย) และ 7 วัน (ขวา)	66
รูปที่ 4.14	โปรไฟล์การเติบโตของจุลินทรีย์ผสมสำหรับการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากตลาด (CCNR-M) และกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F)	67
รูปที่ 4.15	โปรไฟล์น้ำตาลรีดิวซ์ของกากกะทิจากตลาด (CCNR-M) และกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F)	68
รูปที่ 4.16	โปรไฟล์ของแมนแนนเนส ไซแลนเนส และเซลลูเลส แอคทีวิตี้ ที่ได้จากการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากตลาด	69
รูปที่ 4.17	โปรไฟล์ของแมนแนนเนส ไซแลนเนส และเซลลูเลส แอคทีวิตี้ ที่ได้จากการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน	70
รูปที่ 4.18	กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนสของเอนไซม์ผสมก่อนและหลังการอบแห้ง	71

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 4.19	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ผสมก่อนและหลังการอบแห้ง	72
รูปที่ 4.20	กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนสของเอนไซม์ผสมก่อนและหลังการอบแห้ง คำนวณบนพื้นฐานของ 1 กรัมน้ำหนักแห้งสับสเตรท (Gram dried substrate, gds)	72
รูปที่ 4.21	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ผสมก่อนและหลังการอบแห้ง คำนวณบนพื้นฐานของ 1 กรัมน้ำหนักแห้งสับสเตรท (Gram dried substrate, gds)	73
รูปที่ 4.22	โปรไฟล์ร้อยละความชื้นของเอนไซม์ผสมระหว่างการอบแห้ง	74
รูปที่ 4.23	โปรไฟล์ของเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมของการหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะ	81
รูปที่ 4.24	โปรไฟล์กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนสของการหมักเอทานอลกึ่งเหลวแบบกะ	81
รูปที่ 4.25	โปรไฟล์ของเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมของการหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกึ่งกะ	83
รูปที่ 4.26	โปรไฟล์กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ของการหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกึ่งกะ	83
รูปที่ 4.27	การหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะ (ก) และ (ค) และกึ่งกะ (ข) และ (ง) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 15 ลิตรที่สภาวะเหมาะสม	84