



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนากระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อผลิตน้ำตาลจากของเสียอินทรีย์
ที่มาจากสับปะรด อ้อย และทุเรียน

Development of Enzyme Hydrolysis Processes to Produce Fermentable Sugars of
Organic Waste from Pineapple, Sugar Cane and Durian

นามผู้วิจัย นางสาวถิรวรรณ บุญวงศ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์สุจินดา กรรณสูต, ประ.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ธีรภัทร ศรีนรคุตร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรัตน์ บัวเลิศ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนากระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อผลิตน้ำตาลจากของเสียอินทรีย์
ที่มาจากสับปะรด อ้อย และทุเรียน

Development of Enzyme Hydrolysis Processes to Produce Fermentable Sugars of
Organic Waste from Pineapple, Sugar Cane and Durian

โดย

นางสาวถิรวรรณ บุญวงศ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรบัณฑิตสิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2557

ถาวรธรรม บุญวงศ์ 2557: การพัฒนากระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อผลิตน้ำตาลจากของ
เสียนินทรีย์ที่มาจากสับปะรด อ้อย และทุเรียน ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์
สิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สุจินณา วรรณสุด, ปร.ด.
106 หน้า

งานวิจัยนี้ศึกษาการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์และการลดพิษลิกโนเซลลูโลส จากจุก
สับปะรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกทุเรียน ผลจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ
ส่วนใหญ่ประกอบด้วยไฮโดรเซลลูโลส เมื่อทำการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่
เข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ความร้อนในหม้อนึ่งมาเชื่อมความดันไอ ที่อุณหภูมิ
121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรี
ดิวซ์ในจุกสับปะรดเท่ากับ 61.87 ± 0.59 กรัมต่อลิตร เปลือกทุเรียน 56.83 ± 0.36 กรัมต่อลิตร และ
ยอดและใบอ้อย 49.00 ± 1.14 กรัมต่อลิตร แล้วทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ พบว่า ปริมาณ
เอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) 60 FPU/g substrate เป็นปริมาณที่เหมาะสมมากที่สุดในการ
ไฮโดรไลซิสวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด ซึ่งการให้ปริมาณน้ำตาลระหว่างการย่อยสลายค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น
และเสถียรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป การใช้เอนไซม์ 60 FPU/g substrate ในวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด
ให้ผลผลิตน้ำตาลปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่ 72 ชั่วโมง จุกสับปะรดให้
ผลผลิตน้ำตาลปริมาณสูงสุด 113.70 ± 0.47 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส
เท่ากับร้อยละ 94.91 ± 0.54 และจากการศึกษาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสม (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 กรัมต่อ
20 กรัมจุกสับปะรด) ในการลดพิษระหว่างการย่อยสลาย จุกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย
กรด ปริมาณกรดอะซิติกในสารละลายที่ผ่านการลดพิษมีค่าลดลง เมื่อทำการหมักสารละลายที่ได้
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ปริมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เชื้อยีสต์สามารถ
ผลิตเอทานอลได้เร็วและสูงกว่าการไม่ลดพิษ เมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณเอทาน
อลสูงสุดที่ผลิตได้จากการลดพิษที่เติมผงถ่านร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ
 36.91 ± 0.91 กรัมต่อลิตร ค่าผลผลิตสุทธิเท่ากับ 253.94 กิโลกรัมต่อตัน

Thirawan Boonwong 2014: Development of Enzyme Hydrolysis Processes to Produce Fermentable Sugars of Organic Waste from Pineapple, Sugar Cane and Durian. Master of Science (Environmental Science), Major Field: Environmental Science, Department of Environmental Science. Thesis Advisor: Miss Sujinna Karnnasuta, Ph.D. 106 pages.

This research studied on enzyme hydrolysis and detoxification process of hydrolysates of lignocelluloses from pineapple crown, durian peel and sugar cane leaves and top. The Lignocellulosic materials mainly composed of holocellulose (cellulose and hemicelluloses). So, after pretreatment of lignocellulosic feedstocks with 2.0% (w/v) sulfuric acid (H_2SO_4) and autoclaved at $121^\circ C$ pressure 15 lb/in^2 for 15 min, reducing sugar of the pineapple crown had a high concentration ($61.87 \pm 0.59 \text{ g/L}$), durian peel ($56.83 \pm 0.36 \text{ g/L}$) and sugarcane leaves ($49.00 \pm 1.14 \text{ g/L}$) respectively. Then pretreated samples were added cellulose enzyme (Cellic[®] CTec2) and the highest concentration of total reducing sugar in each feedstock was hydrolyzed at 60 FPU/g (DS). After hydrolysis of pretreatment feedstocks, the reducing sugar yields were increased as the saccharification time increased, from 0 to 24 hour and be stable continuously at 24 hours. Sugar yield significantly different ($P < 0.05$) at 24 hours, the total reducing sugar of pineapple crown is highest ($113.70 \pm 0.47 \text{ g/L}$) and the conversion percentage of holocellulose of pineapple crown was 94.91 ± 0.54 . However, pineapple crown was suitable for cellulosic hydrolysis and ethanol productions.

Then the research focus on simultaneous saccharification and detoxification process by studying effectiveness of activated carbon dosage, acetic acid concentration loss. The acetic acid in hydrolysate lignocelluloses were absorbed by activated carbon (2.5, 5.0, 7.5 and 10.0% (w/v)). When fermented the solution was used to detoxification with activated carbon 7.5% (w/v) by *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596, found to be maximal ethanol $36.91 \pm 0.91 \text{ g/L}$ at 72 hour, or 253.94 kg/ton (DW).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สุจินดา วรรณสูต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ธีรภัทร ศรีนรคุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย คำแนะนำ และช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ตลอดจน รศ.อิทธิพล ราศีเกรียงไกร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ชเนศ อุทิศธรรม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณยุทธศักดิ์ สุบการี คุณนันทนา บำรุงเชื้อ คุณสุทธิกมล สุทธิกุล และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือที่ดีตลอดมา และขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ได้ให้แหล่งทุนวิจัย ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัย อีกทั้งขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง และเพื่อนๆ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ เป็นกำลังใจ และส่งเสริมผู้วิจัยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

ถิรวรรณ บุญวงศ์

เมษายน 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(7)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(12)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	39
อุปกรณ์	39
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	71
สรุป	71
ข้อเสนอแนะ	73
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	74
ภาคผนวก	80
ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง	81
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการวิเคราะห์	99
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	104
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	106

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สถิติการผลิตสับปะรด ปี พ.ศ.2552-2556	10
2	องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกสับปะรด	12
3	สถิติการผลิตทุเรียน ปี พ.ศ.2552-2556	15
4	องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกทุเรียน	15
5	สถิติการผลิตอ้อย ปี พ.ศ.2552-2556	16
6	องค์ประกอบทางเคมีของยอดและใบอ้อย	16
7	องค์ประกอบของวัตถุดิบ	50
8	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นน้ำตาลอิสระที่ละลายได้ในวัตถุดิบชนิดต่างๆ	53
9	คุณลักษณะถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในกระบวนการลดพิษ (detoxification)	62
10	อัตราการลดลงของปริมาณน้ำตาลในกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification)	66
ตารางผนวกที่		
ก1	สัดส่วนขนาดและปริมาณของวัตถุดิบที่ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีขนาดตะแกรง 2.0 มิลลิเมตร	82
ก2	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการปรับสภาพจุกสับปะรด เปลือกทุเรียน และ ยอดและใบอ้อย ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	82
ก3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากจุกสับปะรดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	83

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก4	ประสิทธิภาพการย่อยโฮโลเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำลูกสับปะรดที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate	84
ก5	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจากเปลือกทุเรียนขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	85
ก6	ประสิทธิภาพการย่อยโฮโลเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำเปลือกทุเรียนที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate	86
ก7	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากยอดและใบอ้อยขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก8 ประสิทธิภาพการย่อยโฮโลเซลลูโลส (%Holo cellulose conversion) จากการนำยอดและใบอ้อยที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate	88
ก9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในจุดสับประรด เปลือกทุเรียน และยอดและใบอ้อย ปริมาณ 20g/100mL ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น ร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการไฮโดรไลซิสต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate	89
ก10 ปริมาณกรดอะซิติกในจุดสับประรดระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วย ถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดย น้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	90
ก11 ปริมาณกรดอะซิติกในจุดสับประรดที่ลดลงระหว่างกระบวนการไฮโดรไล ซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร)	91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า	
ก12	<p>ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในจุดสับปะรดระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที</p>	92
ก13	<p>ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในจุดสับปะรดที่ลดลงระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)</p>	93
ก14	<p>ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596</p>	94
ก15	<p>ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596</p>	95
ก16	<p>ปริมาณน้ำตาลฟิวที่ที่ได้จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วย <i>P. stipitis</i> TISTR 5806</p>	96

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก17	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิซและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย <i>P. stipitis</i> TISTR 5806	97
ก18	การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการย่อยสลาย โดยใช้ Anova: Single Factor และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	98

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	องค์ประกอบในผนังเซลล์พืช	4
2	โครงสร้างของเซลล์พืชชีวมวลลินโนเซลลูโลส	5
3	โครงสร้างเซลลูโลส (cellulose)	5
4	โครงสร้างเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)	7
5	โครงสร้างลิกนิน (lignin)	8
6	โครงสร้างของผนังเซลล์พืช	8
7	สารแทรกในชีวมวล	9
8	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์สับปะรด	11
9	วัสดุเหลือทิ้งจากสับปะรด	12
10	น้ำตาลที่ละลายได้ (น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์) ในของเสียเหลือทิ้งจากสับปะรด	13
11	เปลือกทุเรียน	14
12	ใบและยอดอ้อย	17
13	การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส	18
14	กลไกการย่อยสลายเซลลูโลส	19
15	กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์	24
16	โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสที่ทำให้เกิดสารยับยั้งการหมัก	26
17	กลไกของกรดอะซิติกที่มีผลต่อการตายของเซลล์ยีส <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
18	การเคลื่อนตัวของสารถูกดูดซับในการดูดซับ	31
19	วิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) และการผลิตเอทานอล	34
20	การหมักเอทานอลจากกลูโคส	35
21	การหมักเอทานอลจากไซโลส	35
22	(ก) จุกสับปะรด (ข) เปลือกทุเรียน และ (ค) ยอดและใบอ้อย ที่ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีขนาดตะแกรง 2.0 มิลลิเมตร	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	จุกสับปะรดที่ผ่านร่อนแยกขนาด(ก) ขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร (ข) ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร (ค) ขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร (ง) ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร และ (จ) ขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร	46
24	สัดส่วนของขนาดและปริมาณจุกสับปะรดที่ผ่านการลดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร	46
25	เปลือกทุเรียนที่ผ่านร่อนแยกขนาด (ก) ขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร (ข) ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร (ค) ขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร (ง) ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร และ (จ) ขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร	47
26	สัดส่วนของขนาดและปริมาณเปลือกทุเรียนที่ผ่านการลดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร	47
27	ยอดและใบอ้อยที่ผ่านร่อนแยกขนาด (ก) ขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร (ข) ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร (ค) ขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร (ง) ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร และ (จ) ขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร	48
28	สัดส่วนของขนาดและปริมาณยอดและใบอ้อยที่ผ่านการลดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร	48
29	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการปรับสภาพจุกสับปะรด เปลือกทุเรียน และ ยอดและใบอ้อย ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	52
30	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากจุกสับปะรดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำจุกสับประรดที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate	55
32	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากเปลือกทุเรียนขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	56
33	ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำเปลือกทุเรียนที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate	57
34	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากยอดและใบอ้อยขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	58
35	ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำยอดและใบอ้อยที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
36	จุกสับปะรด เปลือกทุเรียน และยอดและใบอ้อย ปริมาณ 20g/100mL ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H ₂ SO ₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการไฮโดรไลซิสด้วย เอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate	60
37	ปริมาณกรดอะซิติกในจุกสับปะรดระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วย ถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H ₂ SO ₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	64
38	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในจุกสับปะรดระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วย ถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พร้อมกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic [®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H ₂ SO ₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	65
39	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (-----) และเอทานอล (—) จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
40	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (-----) และเอทานอล (—) จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วย <i>P. stipitis</i> TISTR 5806	68
ภาพผนวกที่		
ข1	ภาพขยายตารางที่กำลังขยาย 10X ประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่ แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุอยู่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีเส้นเส้นล้อมรอบ โดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุอยู่ อีก 16 ช่อง	102
ค1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยวิธี DNS method	105

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFEX	=	ammonia fiber explosion
ATP	=	adenosine triphosphate
Ca(OH) ₂	=	calcium hydroxide
C ₆ H ₁₂ O ₆	=	glucose
DNS	=	dinitrosalicylic acid
EMP	=	Embden-Meyerhof-Parnas pathway
HMF	=	hydroxymethylfurfural
H ₂ SO ₄	=	sulfuric acid
MPa	=	เมกะปาสกาล
NaOH	=	sodium hydroxide
<i>P. stipitis</i>	=	<i>Pichai stipitis</i>
<i>S. cerevisiae</i>	=	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	=	standard deviation
TCA cycle	=	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>
-Q _{RS}	=	อัตราการลดลงของน้ำตาล (rate of reducing sugar loss)
Yp/s	=	ผลผลิตสุทธิที่ได้จากกระบวนการผลิต (yield of ethanol production)
<i>Z. mobilis</i>	=	<i>Zymomonas mobilis</i>

การพัฒนากระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อผลิตน้ำตาลจากของเสียอินทรีย์ ที่มาจากสับปะรด อ้อย และทุเรียน

Development of Enzyme Hydrolysis Processes to Produce Fermentable Sugars of Organic Waste from Pineapple, Sugar Cane and Durian

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีแหล่งทรัพยากรด้านพลังงานไม่เพียงพอต่อความต้องการ ทำให้มีการนำเข้าทรัพยากรด้านพลังงานจากต่างประเทศ ต้องแสวงหาแหล่งพลังงานใหม่ และพัฒนาพลังงานทดแทน ทั้งนี้เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) โดยเฉพาะ เอทานอล เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญและมีความต้องการใช้ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น เพราะเอทานอลเป็นองค์ประกอบหนึ่งของแก๊สโซฮอล์ (gasohol) ทั้งนี้กระบวนการผลิตเอทานอลทำได้โดยนำวัตถุดิบผ่านกระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) และกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เป็นโมโนเมอร์ของน้ำตาลก่อน แล้วใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์เพื่อกลายเป็นเอทานอลต่อไป โดยปริมาณเอทานอลที่ได้จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไลซิส ดังนั้นการพัฒนากระบวนการไฮโดรไลซิสจึงถือว่าเป็นกระบวนการสำคัญต่อปริมาณผลผลิตน้ำตาลและเอทานอล เนื่องจากเมื่อนำวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสผ่านกระบวนการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิส ลิกโนเซลลูโลสจะทำให้ได้น้ำตาลออกมามากกว่าร้อยละ 90 และทำให้เกิดการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมพื้นฐาน ทำให้วัตถุดิบและผลผลิตทางการเกษตรตลอดจนของเสียที่เหลือจากการเกษตรมีเป็นจำนวนมาก งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการพัฒนากระบวนการไฮโดรไลซิส เพื่อประสิทธิภาพและผลผลิตน้ำตาลที่ได้จากของเสียอินทรีย์ทางการเกษตร ได้แก่ จุกสับปะรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกทุเรียน

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกผลิตภัณฑ์สับปะรดกระป๋องสูงที่สุดในโลก (Ketnawa, 2012) โดยของเสียจากกระบวนการผลิต เช่น จุก เปลือก ก้านผล และแกน จากกระบวนการผลิตสับปะรดกระป๋องสามารถผลิตเอทานอลได้ (Nigam, 1999) ซึ่งสัดส่วนของจุกสับปะรดมีประมาณร้อยละ 2-4 ของน้ำหนักสับปะรด

ทั้งหมด ทั้งนี้จากผลผลิตในปี พ.ศ.2556 (2,209,351 ตัน) ทำให้มีปริมาณจุกสับประคคิดเป็น 88,374 ตันต่อปี

อ้อยเป็นพืชตระกูลหญ้าชนิดหนึ่งที่ทำให้ประโยชน์แก่มนุษย์ต่อการใช้เป็นอาหารและเป็นพืชสำคัญอันดับ 4 ของโลกเมื่อพิจารณาในแง่ผลผลิต รองจาก ข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าว โดยในปี พ.ศ.2556 ประเทศไทยมีปริมาณการผลิตอ้อย 100,095,580 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) จากศักยภาพในการผลิตอ้อยทำให้มีปริมาณของใบและยอดอ้อยเหลือทิ้งในไร่อ้อยประมาณ 24,022.939 ล้านตันต่อปี

ทุเรียนเป็นผลไม้เขตร้อน ที่ได้รับการส่งเสริมและกำหนดมาตรฐานการส่งออกไปขายยังต่างประเทศทั้งในรูปแบบของผลสดและแปรรูปในลักษณะต่างๆ แต่ยังมีทุเรียนบางส่วนที่ไม่ได้เกณฑ์มาตรฐานจำนวนมาก จึงมีการตั้งกองทุนในการส่งเสริมและรวมกลุ่มแปรรูปทุเรียน แต่การแปรรูปทุเรียนทำให้เกิดเปลือกเหลือทิ้งจำนวนมากต้องหาวิธีการจัดการ ทั้งนี้เปลือกทุเรียนเป็นวัสดุที่มีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสสูง (Foo and Hameed, 2011) และสามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ (ฉัตติยา, 2553) ปี พ.ศ.2556 ปริมาณผลผลิตทุเรียนอยู่ที่ 569,238 ตันต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) เมื่อคิดเป็นปริมาณเปลือกที่เหลือทิ้งจะเท่ากับ 381,389 ตันต่อปี

ของเสียนทรีย์ที่เหลือทางการเกษตรเหล่านี้เป็นชีวมวลลิกโนเซลลูโลส ที่มีโครงสร้างภายในซับซ้อนประกอบด้วย เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) เป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่แตกต่างกัน (Chaiyamate, 2011) ซึ่งลักษณะโครงสร้าง วัตถุประสงค์และสถานะต่างๆ ในกระบวนการไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลสอาจมีความสัมพันธ์ต่อปริมาณผลผลิตน้ำตาลที่ได้ อาจจะได้ข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นแนวทางและพัฒนาความเป็นไปได้เชิงพาณิชย์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณผลผลิตน้ำตาลและเอทานอลต่อไป ทั้งยังเป็นการสร้างมูลค่าของของเสีย ขจัดปัญหาการจัดการของเสีย และเพิ่มผลผลิตพลังงานที่เป็นที่ต้องการสูง

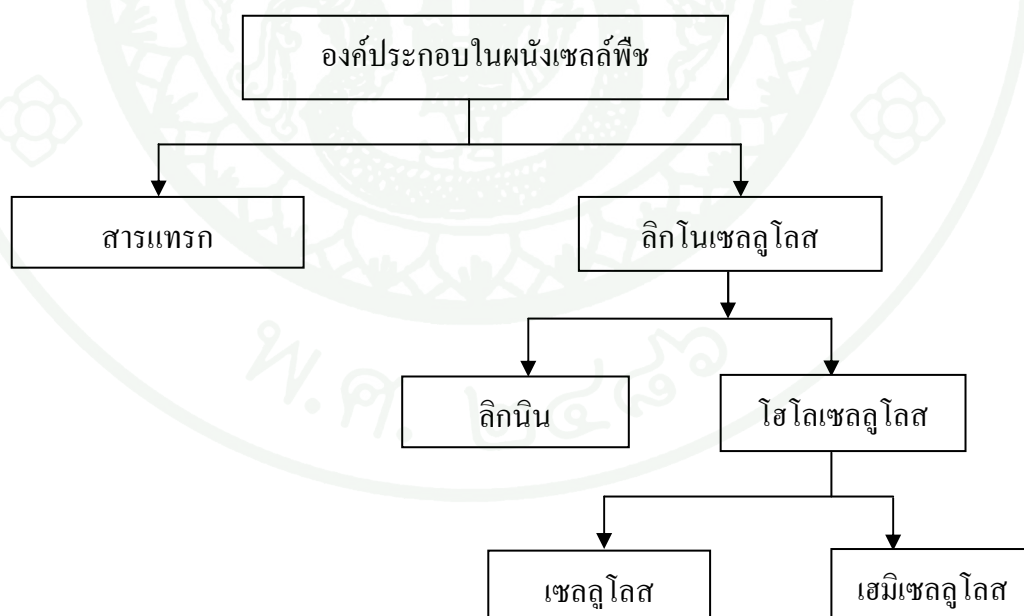
วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะและประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อผลผลิตน้ำตาล จากจุกสับประรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกทุเรียน
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชีวมวล ได้แก่ จุกสับประรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกทุเรียน ในการให้ผลผลิตน้ำตาล
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการลดพิษไฮโดรไลเซต (lignocellulosic hydrolysates) จากจุกสับประรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกทุเรียน

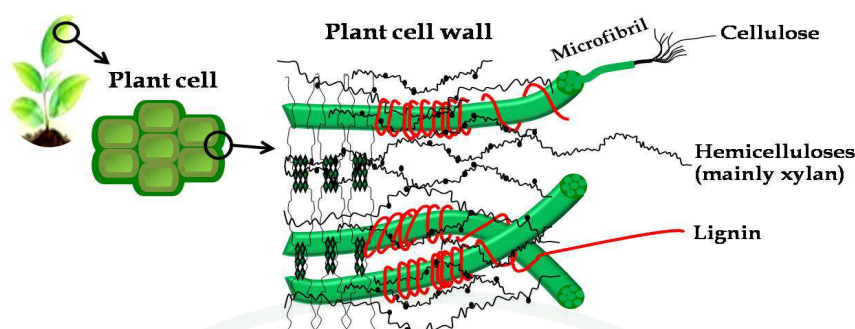
การตรวจเอกสาร

1. ลิกโนเซลลูโลส

พืชเป็นชีวมวลที่มีแหล่งสารประกอบอินทรีย์ กักเก็บพลังงานจากธรรมชาติและสามารถนำมาใช้ผลิตพลังงานได้ พืชมีโครงสร้างภายในที่ซับซ้อน ส่วนประกอบหลัก ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) หรือรวมเรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) และอาจมีสารอื่นๆ อยู่บ้าง เช่น สารแทรก (extractive) และเถ้า (ash) (Velden *et al*, 2010) (ภาพที่ 1) ปริมาณสารประกอบที่พบมีสัดส่วนที่แตกต่างกันภายในโครงสร้างผนังเซลล์พืช โดยสามารถแบ่งสารประกอบที่พบได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไม้เนื้อแข็งและกลุ่มของไม้เนื้ออ่อน ในส่วนของไม้เนื้อแข็งจะพบเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ไม้เนื้ออ่อนพบลิกนินเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ชีวมวลลิกโนเซลลูโลสสามารถเปลี่ยนรูปเป็นพลังงานได้ เพราะในขั้นตอนของการเจริญเติบโตของพืชนั้นใช้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแป้งและน้ำตาล แล้วกักเก็บไว้ตามส่วนต่างๆ ของพืช



ภาพที่ 1 องค์ประกอบในผนังเซลล์พืช

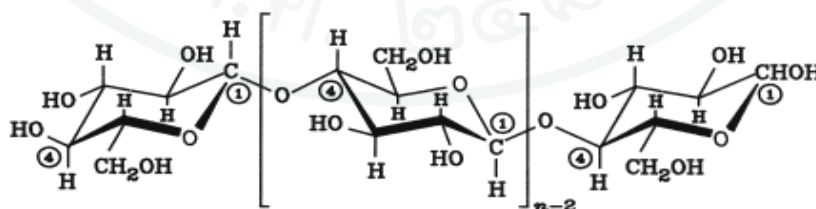


ภาพที่ 2 โครงสร้างของเซลล์พืชชีวมวลลินเซลลูโลส

ที่มา: Ratanakhanokchai *et al.* (2013)

1.1 เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ โครงสร้างประกอบด้วยโฮโมโพลีเมอร์ (homopolymer) ของกลูโคสประมาณ 10,000 หน่วย ที่มีพันธะแบบ β -1,4 glucosidic linkage สารโซจึงมีการเชื่อมต่อกันและกันด้วยพันธะไฮโดรเจน การจัดเรียงตัวของโมเลกุลลักษณะกลับไปกลับมา 180 องศา ดังภาพที่ 3 เกิดเป็นโครงสร้างลักษณะเส้นใย (fiber) มีลักษณะเป็น crystalline fibrillar micelles ที่มีความทนทานต่อแรงดึง นอกจากนี้เซลลูโลสยังถูกห้อมล้อมด้วยเฮมิเซลลูโลส และห่อหุ้มภายนอกด้วยลิกนิน ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างพืชและมีการเรียงตัวอยู่ในรูปของผลึก (พัชรีและคณะ, 2551; Bakker *et al.*, 2010) เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ กรดอ่อน และด่าง แต่ละลายได้ดีในกรดและเบสแก่ เช่น กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก ด่างแอมโมเนีย และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Fan *et al.*, 1987)



ภาพที่ 3 โครงสร้างเซลลูโลส (cellulose)

ที่มา: Bakker *et al.* (2010)

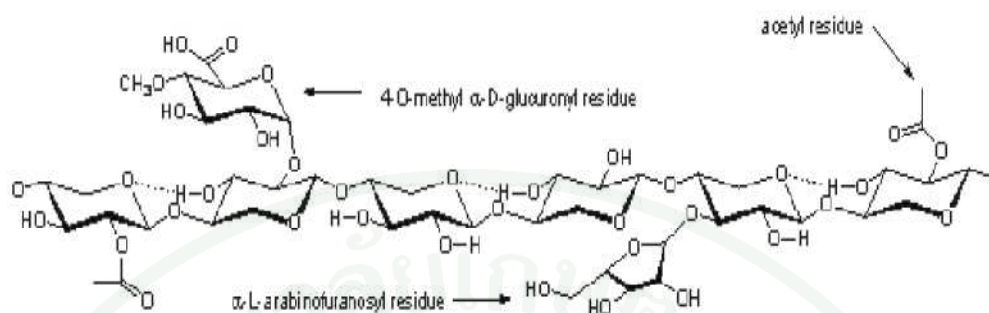
เซลลูโลส ($C_6H_{12}O_5$)_{2n} มีโครงสร้างเส้นใยเล็กๆ ที่เรียกว่า ไฟบริล (fibril) ซึ่งมีลักษณะเป็นมัดยาวรวมกันอยู่อย่างแข็งแรงด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล การจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสนั้นบางตอนก็ขนานกันเป็นระเบียบ (crystalline) บางส่วนเรียงกันไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ทำให้เกิดช่องว่างแทรกอยู่ระหว่างโมเลกุลกัน ทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างหลายรูปแบบ ซึ่งบริเวณนี้ทำให้เซลลูโลสสลายตัวและแยกออกจากกันได้โดยการเข้าทำปฏิกิริยาของของเหลว เช่น กรดแก่ นอกจากนี้ยังอาจเกิดเป็นรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายโดยแรงกล เนื่องจากความไม่เป็นระเบียบและขีดจำกัดของความยืดหยุ่นของไมโครไฟบริล ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามปริมาณการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด คือ (ยุทธศักดิ์, 2551)

- 1) แอลฟาเซลลูโลส คือ เซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 17.5
- 2) บีตาเซลลูโลส คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 17.5 ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด
- 3) แกมมาเซลลูโลส คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 17.5 และสารละลายกรด แต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

1.2 เซมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เซมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่วนใหญ่จะพบเซมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ชั้นนอกสุด และพบส่วนน้อยในผนังเซลล์ชั้นที่ 2 โดยจะถูกย่อยสลายและสกัดออกจากผนังเซลล์พืชได้ในสถานะที่ไม่รุนแรง เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลมีโซ่กิ่งเป็นจำนวนมากคล้ายกับโครงสร้างของเพคติน ทั้งนี้มีโพลีเมอร์สายตรงและกิ่งก้าน เช่น กลูโคแมนโนส ดีแมนโนส ดีกาแลกแทน อะราบิโนส ชนิดที่พบมากที่สุด คือ ไชเลน โดยพบในผนังเซลล์พืช (Bakker *et al.*, 2010) เป็น heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ิก (glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง β -1,4 เป็นโซ่หลักและมีน้ำตาลชนิดอื่นมาต่อกันเป็นโซ่สาขา หรือโซ่แขนงที่ตำแหน่ง β -1,6 ทั้งนี้ไม่ละลายน้ำและมีความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) เซมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยได้ด้วยสารละลายด่างเจือจางและสลายได้

ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ข้อแตกต่างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสคือ เฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกิ่งก้านมากกว่า และมีความยาวของสายโซ่สั้นกว่า

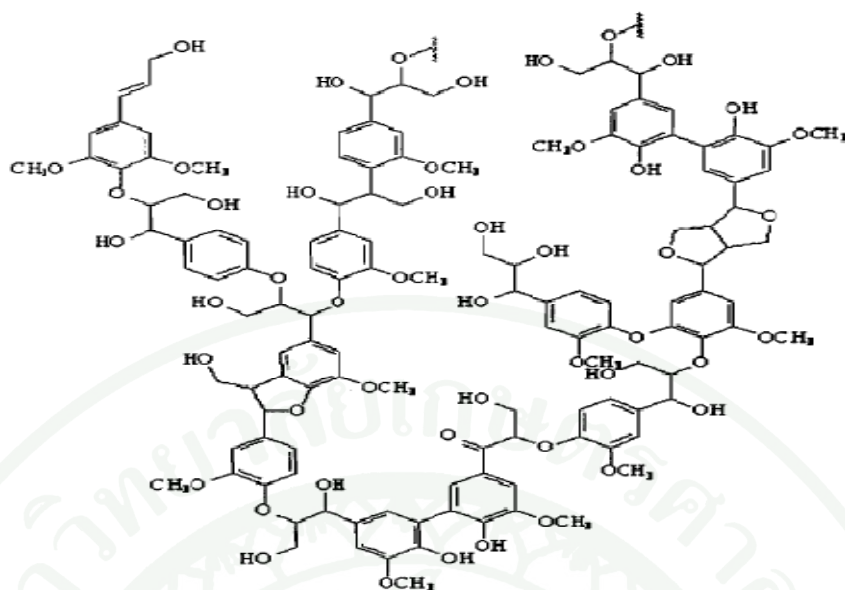


ภาพที่ 4 โครงสร้างเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

ที่มา: Bakker *et al.* (2010)

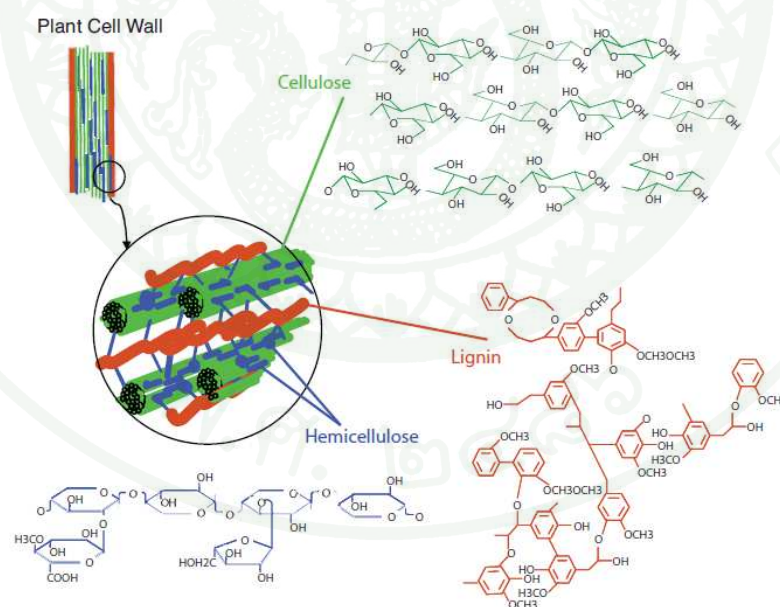
1.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน (lignin) เป็นพอลิเมอร์ของสารประกอบที่โมเลกุลเป็นวงแหวน และมีความซับซ้อนมากที่สุด ซึ่งในวัตถุดิบแต่ละชนิดมักพบลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 20-35 โดยทำหน้าที่รวมมัดของเส้นใยของพอลิแซ็กคาไรด์ไว้ด้วยกัน มักพบอยู่ร่วมกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ภายในโครงสร้างลิกนินประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นโพลีเทอร์ฟีนอลิกสามมิติ (three dimension phenolic compound) (ประเวศ และคณะ, 2552) ลิกนินจากไม้เนื้ออ่อน หญ้า และไม้เนื้อแข็งมีองค์ประกอบของหมู่แทนที่พวกเมทอกซี (methoxy) และการเกิดพันธะระหว่างหมู่ฟีนิล (phenyl) ที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 5 โครงสร้างลิกนิน (lignin)

ที่มา: Bakker *et al.* (2010)

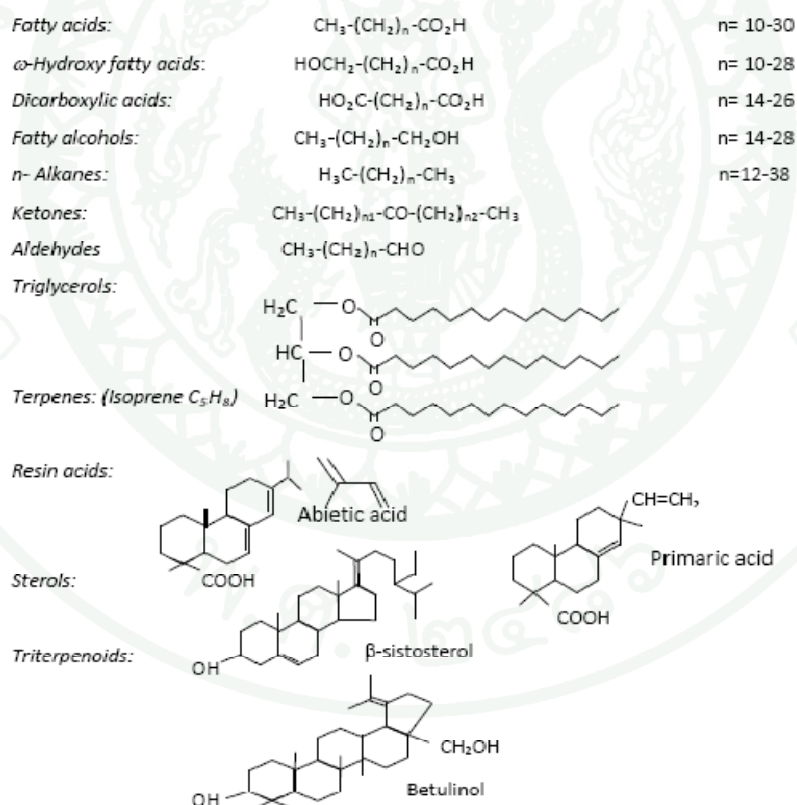


ภาพที่ 6 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช

ที่มา: Kowsari (n.d.)

1.4 สารแทรกเนื้อไม้ (extractives)

สารแทรก หมายถึง สารที่ไม่ใช่องค์ประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์ สารแทรก อาจจะเป็นกรด เบส หรือกลางก็ได้ เช่น สารไอโซพรีน เทอร์ปีน สเตอโรไอโซคลิก ไก กรดเรซิน สารพอลิฟีนอลต่างๆ และอัลคาลอยด์ เป็นต้น มีอยู่ประมาณร้อยละ 5-30 โดยน้ำหนัก ปริมาณสารแทรกในไม้จะแปรผันตามชนิดของไม้ พันธุ์ไม้ และระหว่างพืชชนิดเดียวกัน โครงสร้างแต่ละส่วนจะมีสารแทรกที่แตกต่างกัน Posey และ Robinson (1969) พบว่า ปริมาณสารแทรกในส่วนของเนื้อไม้ต้นฤดู (early wood) จะมีมากกว่าเนื้อไม้ปลายฤดู (late wood) และมากกว่าในเนื้อไม้ปกติ (normal wood) ทั้งนี้แก่นไม้มีสารแทรกมากกว่ากระพี้ ปริมาณสารแทรกจะมีมากในส่วนที่อยู่ใกล้กับใจไม้และจะลดลงในส่วนที่อยู่ห่างออกไปตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารแทรกมีมากขึ้นตามอายุของต้นไม้



ภาพที่ 7 สารแทรกในชีวมวล

ที่มา: Perez (2008)

2. ของเสียนิทรียจากการเกษตร

2.1 จุกสับปะรด

สับปะรด (pineapple) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ananas comosus* เป็นมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ระหว่างเส้นละติจูดที่ 15-30 องศาใต้ และลองจิจูดที่ 40-60 องศาตะวันตก ได้แก่ บริเวณตอนกลางและตอนใต้ของประเทศบราซิล (วิจิตร, 2545) การปลูกสับปะรดในประเทศไทยส่วนใหญ่ปลูกเพื่อส่งโรงงานสับปะรด พันธุ์ที่ปลูกในปัจจุบัน ได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวีย พันธุ์นางแล (เขียงราย) พันธุ์สวี (ชุมพร) พันธุ์ภูเก็ต พันธุ์ปัตตานี และพันธุ์อินทรีชดขาว-แดง (ฉะเชิงเทรา) แหล่งเพาะปลูกสับปะรดที่สำคัญ ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ราชอง ชลบุรี เพชรบุรี และพิษณุโลก ผลผลิตออกมากช่วงเดือนมีนาคม-มิถุนายน และพฤศจิกายน-มกราคม ทั้งนี้ผลผลิตสับปะรดสดภายในประเทศร้อยละ 70-80 จะส่งเข้าโรงงานแปรรูป ที่เหลือใช้บริโภคสดภายในประเทศร้อยละ 20-30 โดยปี พ.ศ.2556 ปริมาณผลิตสับปะรดประมาณ 2.21 ล้านตันต่อปี โดยไทยเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ของโลกซึ่งส่งออกสับปะรดกระป๋องประมาณ 641 พันตัน หรือร้อยละ 51.16 ของปริมาณการส่งออกทั้งหมด รองลงมาได้แก่ ฟิลิปปินส์และอินโดนีเซีย ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สถิติการผลิตสับปะรด ปี พ.ศ.2552-2556

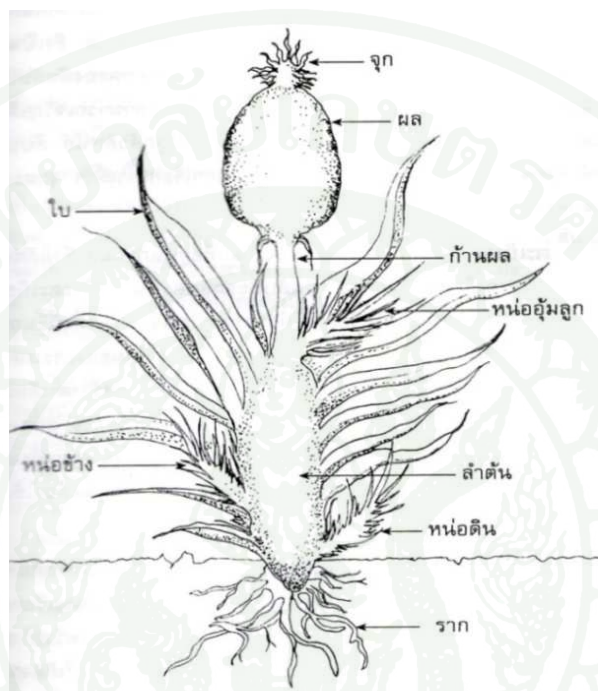
รายการ	ปี 2552	ปี 2553	ปี 2554	ปี 2555	ปี 2556
เนื้อที่เก็บเกี่ยว (ไร่)	566,599	583,200	645,981	646,610	573,120
ผลผลิต (ล้านตัน)	1.89	1.93	2.58	2.52	2.21
ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)	3,427	3,300	4,012	3,895	3,855

หมายเหตุ ข้อมูล เมษายน 2557

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2556)

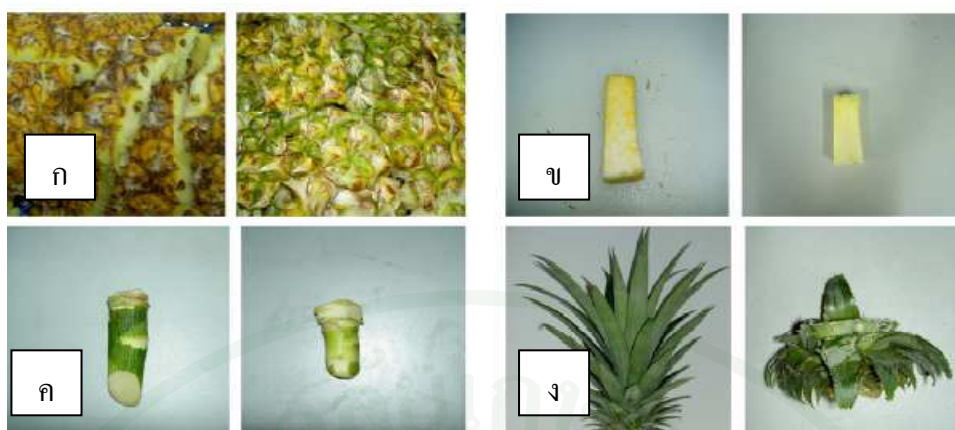
จุกหรือเหง้าสับปะรดเป็นส่วนสำคัญในการแบ่งแยกสกุลสับปะรด ตามปกติมีจุกเดียว ซึ่งอยู่บนส่วนบนของผล โดยรับน้ำและอาหารจากต้นผ่านก้านและแกนออกไปสู่จุกหรือเหง้า ซึ่งส่วนของจุกหรือเหง้ามีแกนกลางเป็นลำต้นเล็กๆ มีสารอาหารจำพวกแป้งสะสมและมีเนื้อเยื่อที่ปลายยอด เป็นส่วนต่อเนืองของผลและเนื้อเยื่อเจริญ เมื่อแยกจุกออกจากผลแล้วนำไปปลูกสามารถ

เจริญเติบโตต่อไปได้ แต่ปัจจุบันมีเกษตรกรน้อยมากที่จะนำไปใช้ในการปลูกครั้งต่อไป จุก
 สับปะรดจึงกลายเป็นวัสดุที่เหลือทิ้งและจัดการยาก (จิราพรรณ, 2548) สัดส่วนของจุกสับปะรด
 เท่ากับร้อยละ 2-4 ของน้ำหนักสับปะรดทั้งผล ซึ่งจากผลผลิตในปี พ.ศ.2556 ปริมาณจุกสับปะรดคิด
 เป็น 44,187-88,374 ตันต่อปี



ภาพที่ 8 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์สับปะรด

ที่มา: จิราพรรณ (2548)



ภาพที่ 9 วัสดุเหลือทิ้งจากสับประรด (ก) เปลือก (ข) แกนผล (ค) ก้าน และ (ง) จุก

ที่มา: Ketnawa (2012)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกสับประรด

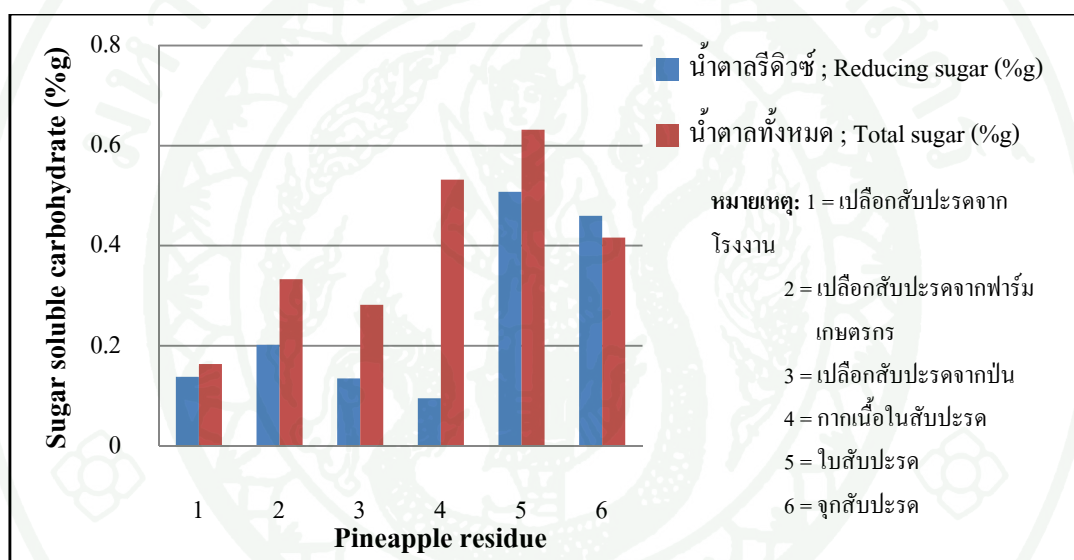
องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกสับประรด	ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง
เซลลูโลส	42.11
เฮมิเซลลูโลส	21.16
ลิกนิน	9.50

ที่มา: Chaiyamate (2011)

Nigam (1999) ได้นำของเสียจากโรงงานผลิตสับประรดกระป๋องมาผลิตเอทานอล ซึ่งเกิดขึ้นประมาณ 450-500 ลิตรต่อวัน ทั้งนี้ของเสียดังกล่าวมีองค์ประกอบหลักของน้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลรีคิวซ์ที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการหมักเอทานอล เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24553 หมักในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่ำ (pH) 4.5 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงถึงร้อยละ 92.5

จากการศึกษาของ อนันท์ และคณะ (2557) องค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือจากสับประรดที่ใช้ในการทดลองทั้ง 6 ชนิด คือ เปลือกสับประรดจากโรงงาน (fresh pineapple peel by factory) เปลือกสับประรดจากฟาร์มเกษตรกร (compost pineapple peel by farm) เปลือกสับประรดปั่น (grid pineapple peel by farm) กากเนื้อในสับประรด (pineapple pulp) ใบสับประรด (pineapple leaf)

และจุกสับปะรด (pineapple crown) พบว่า มีปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ปริมาณเยื่อใยหรือคาร์โบไฮเดรตประเภทโครงสร้างจะมีมากใน เปลือก กาก เนื้อใน จุก และใบ สับปะรด ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ในเศษเหลือจากสับปะรด พบว่า เศษเหลือจากสับปะรดทั้ง 6 ชนิด มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่า ในใบสับปะรดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด รองลงมาคือ จุก สับปะรด (ภาพที่ 10) ซึ่งพืชส่วนใหญ่รวมถึงสับปะรดจะมีการเก็บสะสมพลังงานอยู่ในรูปของ น้ำตาล คือ น้ำตาลกลูโคส โดยพลังงานเหล่านี้จะถ่ายทอดไปสู่สัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร พืชจะเก็บ กลูโคสไว้ในรูปแป้งซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ น้ำตาลกลูโคสก็เป็นส่วนหนึ่งของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย เช่นกัน



ภาพที่ 10 น้ำตาลที่ละลายได้ (น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์) ในของเสียเหลือทิ้งจากสับปะรด

ที่มา: อนันต์ และคณะ (2557)

2.2 เปลือกทุเรียน

ทุเรียนเป็นพืชพื้นเมืองของบรูไน อินโดนีเซีย และมาเลเซีย เป็นที่รู้จักใน โลกตะวันตก ประมาณ 600 ปีมาแล้ว ทุเรียนเป็นไม้ผลยืนต้นในอันดับ Mavales วงศ์ Bombacaceae สกุล Durio ประเทศไทยปลูกกันมากในบริเวณภาคตะวันออกและภาคใต้ เป็นพืชที่ชอบอากาศร้อนและฝนตกชุก ชอบสภาพดินร่วนปนทราย ระบายน้ำได้ดี จึงสามารถปลูกได้ดีทางภาคตะวันออก เช่น จังหวัด จันทบุรี ระยอง ตราด ปราจีนบุรี และทางภาคใต้ เช่น ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ปัจจุบันทุเรียนเป็น

ไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญซึ่งนอกจากบริโภคในประเทศแล้ว ยังสามารถส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งส่งออกทุเรียนที่สำคัญของโลกประเทศหนึ่ง (สมศักดิ์, 2530) ทั้งนี้การส่งออกมีทั้งการส่งออกในรูปแบบของทุเรียนสดและทุเรียนแปรรูป ซึ่งของเสียจากการแปรรูปทุเรียน คือ เปลือกทุเรียนที่มีวิธีการจัดการและกำจัดยาก ต้องใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย

ทุเรียนเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปริมาณการผลิตทุเรียนในปี พ.ศ.2556 อยู่ที่ 569,238 ตันต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) มีสัดส่วนของเนื้อเปลือก และเมล็ด เท่ากับร้อยละ 25.5, 67.4 และ 7.1 ตามลำดับ (วรวรรณ, 2554) ทั้งนี้ในปี พ.ศ. 2556 มีเปลือกทุเรียนเหลือทิ้ง 381,389 ตันต่อปี



ภาพที่ 11 เปลือกทุเรียน

ที่มา: เพ็ญพิชา (2552)

ตารางที่ 3 สถิติการผลิตทุเรียน ปี พ.ศ.2552-2556

รายการ	ปี 2552	ปี 2553	ปี 2554	ปี 2555	ปี 2556
เนื้อที่เก็บเกี่ยว (ไร่)	628,244	611,206	603,340	581,524	569,238
ผลผลิต (ล้านตัน)	0.66	0.57	0.51	0.51	0.57
ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)	1,053	929	843	879	985

หมายเหตุ ข้อมูล เมษายน 2557

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2556)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกทุเรียน

องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกทุเรียน	ร้อยละ โดยน้ำหนักแห้ง
เซลลูโลส	35.16
เฮมิเซลลูโลส	33.03
ลิกนิน	1.25

ที่มา: Chaiyamate (2011)

2.3 ยอดและใบอ้อย

ใบอ้อยประกอบด้วยกาบใบและตัวใบ ใบอ้อยเหยียดกางออกจากลำอ้อยสลับกันสองข้าง ทำมุมแก่กันน้อยกว่า 180 องศา เมื่ออ้อยยังเล็กอยู่ใบอ้อยจะมีขนาดเล็กมากเท่ากับกลีบหรือเกล็ดเล็กๆ เท่านั้น กาบใบจะติดอยู่กับลำปล้องตรงข้อและโอบรอบปล้องเอาไว้โดยรอบ กาบใบมีความยาวตั้งแต่หนึ่งนิ้วจนถึงหนึ่งฟุตหรือมากกว่านั้น กาบใบอาจจะเรียบหรือมีขนาดเล็กๆ ปกคลุมอยู่และขนสั้นๆ เหล่านี้อาจจะร่วงหล่นหมดหรือติดอยู่เล็กน้อยเมื่อกาบใบแห้ง ความยาวของใบอ้อยมี

ขนาดต่างๆ กัน แต่โดยทั่วไปมักจะอยู่ในราวหนึ่งเมตร ความกว้างของใบจะกว้างที่สุดประมาณ 10 เซนติเมตร ใบอ้อยใบหนึ่งจะมีเนื้อที่ประมาณ 0.05 ตารางเมตร

พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง และมีโรงงานน้ำตาลตั้งอยู่ตามภาคต่างๆ 46 โรงงาน (ละอองดาว และธวัชชัย, 2548) ทั้งนี้ผลผลิตอ้อยปี พ.ศ.2556 ได้ 24,022,939 ตันตันต่อปี ซึ่งปริมาณยอดและใบอ้อยย่อมมากเช่นกัน โดยมักจะกำจัดด้วยวิธีการเผา

ตารางที่ 5 สถิติการผลิตอ้อย ปี พ.ศ.2552-2556

รายการ	ปี 2552	ปี 2553	ปี 2554	ปี 2555	ปี 2556
เนื้อที่เก็บเกี่ยว (ไร่)	6,310,000	7,870,000	8,307,350	8,393,000	8,259,969
ผลผลิต (ล้านตัน)	68.81	95.95	98.40	103.379	100.095
ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)	10,910	12,190	12,280	12,310	12,118

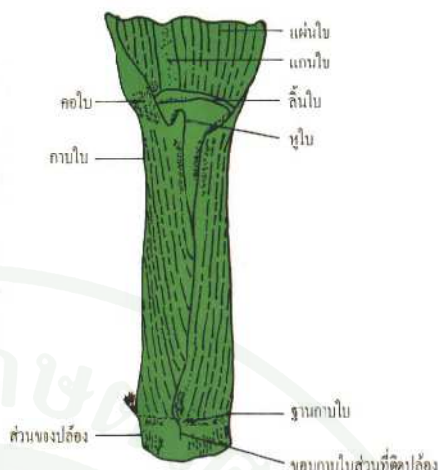
หมายเหตุ ข้อมูล เมษายน 2557

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2556)

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของยอดและใบอ้อย

องค์ประกอบทางเคมีของยอดและใบอ้อย	ร้อยละ โดยน้ำหนักแห้ง
ไฮโดรเซลลูโลส	68.6
เซลลูโลส	38.0
เฮมิเซลลูโลส	30.6
ลิกนิน	12.8

ที่มา: ประเวศ และคณะ (2552)



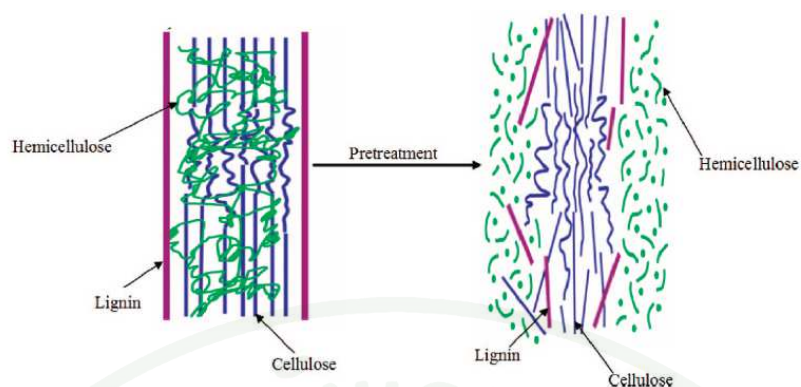
ภาพที่ 12 ใบและยอดอ้อย

ที่มา: กลุ่มน้ำตาล เค ไอ. (2552)

ประเวศ และคณะ (2552) ได้ศึกษาความเหมาะสมสำหรับการย่อยสลายยอดและใบอ้อย โดยพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ พบว่า หลังจากปรับสภาพยอดและใบอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1.5 (w/v) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์ Accellerase1000 ปริมาณ 40 FPU/g substrate เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถึง 386.38 mg/g substrate ประสิทธิภาพของการย่อยสลายไฮโดรเซลลูโลสเป็นน้ำตาลร้อยละ 50.69

3. การปรับสภาพ (Pretreatment)

เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตอยู่ในรูปที่เป็นผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนที่นำมาใช้จริงคือส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ดังนั้นในขั้นแรกของการผลิตจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เพื่อปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม ลดความเป็นผลึก เพิ่มความเป็นรูพรุน และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีขึ้น นั่นคือ 1) เพิ่มปริมาณการผลิตน้ำตาล 2) ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต 3) ลดต้นทุนการผลิต ซึ่งวิธีการในการปรับสภาพอาจใช้วิธีการทางกายภาพ วิธีการทางเคมี และ/หรือวิธีการทางชีวภาพ



ภาพที่ 13 การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: Hsu *et al.* (1980)

3.1 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

3.1.1 การลดขนาด

การลดขนาดวัตถุดิบเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว เช่น การใช้แรงอัดและแรงเฉือน (compressive and shearing force) ทำลายพันธะที่เชื่อมต่อกันของเซลลูโลสให้แตกสลายเพื่อให้มีขนาดเล็กกลง

ประเวศ และคณะ (2552) ได้ศึกษาขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมไบโอดีเซล เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรไลซิสเป็นน้ำตาล รวมทั้งความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์และวิศวกรรม พบว่า การเตรียมขอดีและไบโอดีเซลด้วยกรดซัลฟิวริกและไบโอดีเซลที่มีขนาด 0-10 มิลลิเมตร เหมาะที่สุดสำหรับการให้ผลผลิตน้ำตาลซึ่งหลังจากการย่อยสลาย 24 ชั่วโมง จะให้น้ำตาลรีดิวซ์ถึง 35-36 กรัมต่อลิตร โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไฮโดรไลซิสเซลลูโลสประมาณร้อยละ 48-49

3.1.2 ไพโรไลซิส (pyrolysis)

กระบวนการไพโรไลซิสเป็นกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบที่อุณหภูมิสูง ปริมาณ 200-600 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันบรรยากาศ ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีที่ผันกลับ

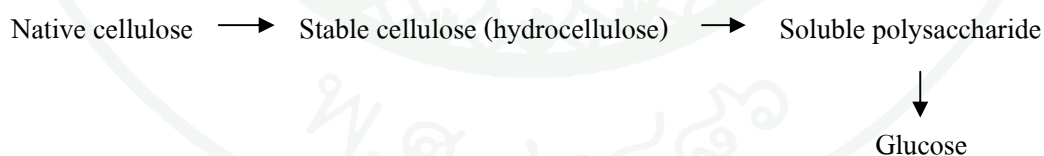
ไม่ได้ (irreversible reaction) ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไพโรไลซิสขึ้นกับธรรมชาติของวัสดุ ความชื้น เวลา อุณหภูมิ ขนาดอนุภาค (บุษศักดิ์, 2551)

3.2 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

3.2.1 การย่อยสลายด้วยกรดเจือจาง

การย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเจือจาง นิยมใช้กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) แต่ทั้งนี้ก็มีผลเสียคือ ผลผลิตน้ำตาลจากการย่อยสลายที่ได้มีปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มอุณหภูมิและความดันสามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายให้ได้ปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของกรดสามารถเพิ่มผลผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้นได้ แต่ควรคำนึงถึงจุดที่เหมาะสมที่สุดของความเข้มข้นของกรดที่ใช้และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย (Fan *et al.*, 1987)

กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดจะทำให้พันธะ β -(1,4) ของโครงสร้างแตกออกแล้วเกิดเป็นน้ำตาล โดยเกิดเป็นสายโซ่สั้นๆที่มีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนเดิม ปลายของสายโซ่เซลลูโลสจะเป็นหมู่อัลดีไฮด์ที่มีสมบัติรีดิวซิ่ง (reducing) ซึ่งพันธะของเซลลูโลสนี้จะไวต่อกรดและมีการตัดแบบสุ่ม (พัชรีย์ และคณะ, 2551) ในภาวะของการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดเจือจางที่ร้อนจะทำให้เซลลูโลสที่อยู่ในลักษณะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (hydrocellulose) กลายเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ และจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นน้ำตาลกลูโคส (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลส

ที่มา: Fan *et al.* (1987)

Jung *et al.*, (2013) ได้ทำการปรับสภาพทลายปาล์มด้วยกรดซัลฟิวริก เจือจาง เพื่อนำสารละลายที่ได้ไปทำการหมัก โดยสภาวะที่ดีที่สุดของการปรับสภาพที่ได้จากการทดลอง คือ การใช้กรดซัลฟิวริกร้อยละ 1.0 โดยมีมวลต่อปริมาตร ด้วยเครื่องย่อยไมโครเวฟ (microwave

digester) ที่ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส หลังจากการย่อยเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดถึงร้อยละ 88.5

การย่อยสลายวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด นอกจากได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลแล้ว ยังพบสารพิษที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย เมื่ออยู่ในภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง กลูโคสและไซโลสจะถูกย่อยสลายเป็นอนุพันธ์ฟิวราน เช่น เฟอร์ฟูรอล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (hydroxymethylfurfural; HMF) ที่สามารถย่อยสลายต่อได้เป็นกรดฟอร์มิก (formic acid) และในกรณีของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล เมื่อย่อยสลายแล้วจะได้กรดเลวูลินิก (levulinic acid) ส่วนลิกนินเมื่อเกิดการย่อยสลายแล้วจะเกิดสารประกอบฟีนอลิก และกรดอื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (Mussatto and Roberto, 2004)

3.2.2 Ammonia fiber explosion (AFEX)

การนำวัตถุดิบไปใส่ลงในสารละลายแอมโมเนียที่อุณหภูมิและความดันสูงแล้วลดความดันอย่างรวดเร็วคล้ายการระเบิดด้วยไอน้ำ จะเป็นการเพิ่มอัตราการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสเป็นน้ำตาล ซึ่งใช้ได้กับลิกโนเซลลูโลสหลายประเภท เช่น ชังข้าวโพด หญ้า และพืชตระกูลถั่ว (Sun and Cheng, 2001)

3.2.3 Stream explosion (autohydrolysis)

การระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีการทั่วไปที่ใช้มากในการเตรียมลิกโนเซลลูโลส วิธีนี้วัตถุดิบจะถูกปรับสภาพที่ระดับความดันน้ำสูง แล้วลดความดันอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้วัตถุดิบระเบิดแล้วเกิดการสลายตัว การระเบิดด้วยไอน้ำเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 160-260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69-4.83 MPa เป็นเวลา 2-3 นาที หลังจากนั้นเอาออกมาที่สภาวะอุณหภูมิปกติ (Sun and Cheng, 2001)

3.3 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

เป็นการเตรียมลิกโนเซลลูโลสทางชีวภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ เช่น White rot fungi และ Soft rot fungi ผลที่ได้คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว วิธีทางชีวภาพใช้พลังงาน

ต่ำ ไม่เกิดของเสียต่อสิ่งแวดล้อมและเกิดได้ในสภาวะธรรมชาติ ทั้งนี้ White rod fungi สามารถย่อยสลายลิกนินได้ เซลลูโลส จะถูกปล่อยออกมาแล้วถูกย่อยสลายต่อด้วย Brown rot fungi

ส่วนเอนไซม์ที่ใช้ย่อยลิกโนเซลลูโลส เช่น เซลลูเลส (cellulases), กลูคูโรนิเดส (glucuronidase), ไซลานเนส (xylanase), เบตาไซโลซิเดส (β -xylosidase), ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase), แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และแลคเคส (laccase) เป็นต้น

4. การไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

การไฮโดรไลซิสเป็นการย่อยสลายวัสดุชนิดลิกโนเซลลูโลส เมื่อทำการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสเซลลูโลสจะได้น้ำตาลออกมามากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ปรับสภาพ ซึ่งได้น้ำตาลเพียงร้อยละ 20 โดยเมื่อการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยสลายไม่สมบูรณ์จะเกิดทั้ง กลูโคส เซลโลไบโอส และ โอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลหลายอย่างปะปนมาขึ้นอยู่กับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส (ประเวศ และคณะ, 2552) ทั้งนี้การไฮโดรไลซิสสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

4.1 การไฮโดรไลซิสด้วยสารเคมี

เป็นการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายกรดหรือด่างซึ่งจะทำปฏิกิริยาทำลายพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน ถ้าการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ในกรณีที่ใช้กรดจะเรียกกระบวนการนี้ว่า two stage acid process ซึ่งเป็นการทำต่อจากการย่อยด้วยกรดในกระบวนการปรับสภาพ ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถใช้ได้ทั้งกรดอ่อนและกรดแก่ ปัญหาสำหรับการใช้กรดแก่นอกจากราคาของอุปกรณ์ที่ใช้จะแพงกว่าแล้ว การนำกรดกลับมาใช้ใหม่เพื่อลดปริมาณกรดที่ต้องใช้เป็นเรื่องที่สำคัญ (ฉัตติยา, 2553)

4.2 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบมากในจุลินทรีย์หลายชนิด แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสได้ส่วนมากจะสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเข้าไปย่อยสลายเซลลูโลส นอกจากนี้อาจจะย่อยเซลโลไบโอสซึ่ง

ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุล และจะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้เช่นกัน แต่แบคทีเรียบางชนิด อาจย่อยสลายได้เฉพาะเฮมิเซลลูโลสเท่านั้น ทั้งนี้แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจะย่อยเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ ส่วนราและแอคติโนมัยซีต จะได้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักและเกิดกรดอินทรีย์ในปริมาณน้อย อัตราการย่อยเริ่มต้นจะถูกจำกัดด้วยกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ของคาร์โบไฮเดรต เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสารตัวกลางซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่มีน้ำตาล (Bisaria and Ghose, 1981) และการเพิ่มปริมาณของเซลลูเลสในกระบวนการย่อยสลายในระดับหนึ่งสามารถเพิ่มผลผลิตและอัตราการย่อยสลายได้ แต่มักจะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ส่วนใหญ่แล้วปริมาณเซลลูเลสที่ใช้จะขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของสารตั้งต้น

ทั้งนี้ กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1) การดูดซับของเอนไซม์เซลลูเลสลงบนพื้นผิวของเซลลูโลส 2) การย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาล (fermentable sugars) และ 3) เอนไซม์หลุดออกจากผิวหน้าของเซลลูโลส

การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จะทำให้เกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากกว่าการเกิดสารยับยั้ง เพราะเอนไซม์เซลลูเลสจะไปกระตุ้นเป็นการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแต่ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาล (Palmqvist and Hagerdal, 2000) เมื่อมีการย่อยสลายไปในระยะหนึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจะลดลง จึงต้องมีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactants) ซึ่งมีความสามารถในการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติพื้นผิวเซลลูโลสและเพิ่มโอกาสการเข้าจับของเซลลูโลสกับเอนไซม์เซลลูเลสได้มากขึ้น

5. เอนไซม์เซลลูเลส

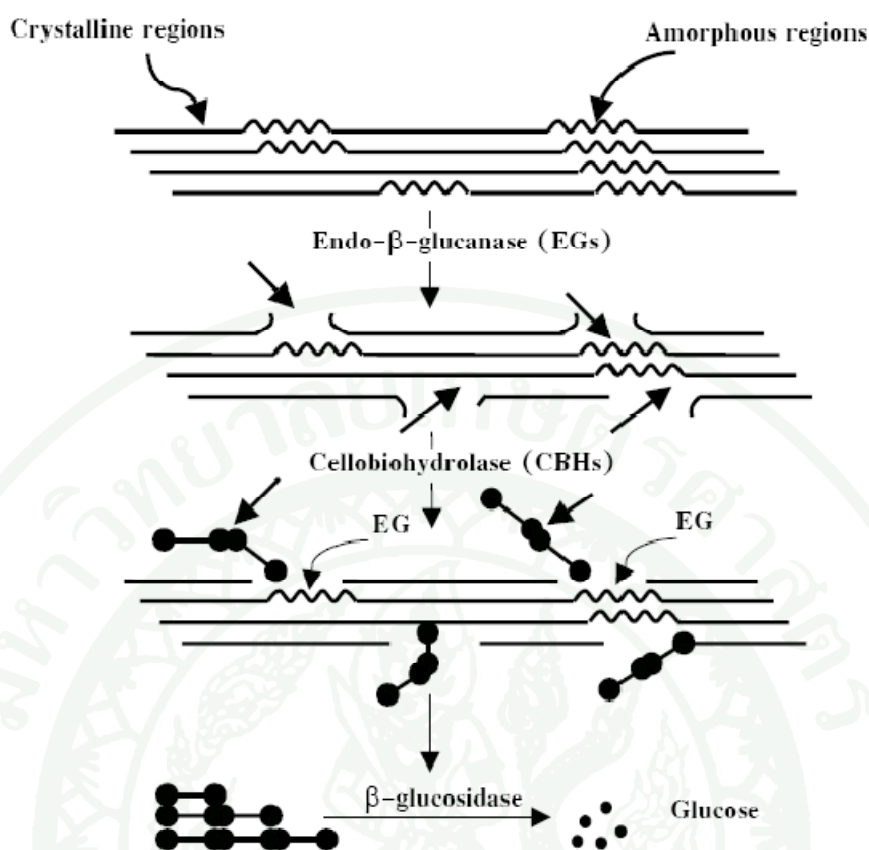
เอนไซม์เซลลูเลสมีโครงสร้างหลักสองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลส คือ ส่วนที่จับกับเซลลูโลส (Cellulose Binding Domain, CBD) และส่วนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (catalytic domain) ซึ่งแบ่งเอนไซม์เซลลูเลสออกเป็น 3 ชนิด คือ endo- β -glucanase (EC 3.2.1.4), exo- β -glucanase (EC 3.2.1.91) และ β -glucosidase (EC 3.2.1.21) ซึ่งมีความแตกต่างกันดังนี้ (Bhat, 1997)

5.1 Endo- β -glucanase หรือ 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase ตัดพันธะ β -1,4-glycosidic bond ภายในสายเซลลูโลสอย่างสุ่มได้กลูโคสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ทำให้ลดความยาวของโพลีเมอร์ลงอย่างรวดเร็ว แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นช้า

5.2 Exo- β -glucanase หรือ 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase ตัดสายเซลลูโลสจากด้านปลาย non-reducing ได้กลูโคส ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ความยาวของโพลีเมอร์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

5.3 β -glucosidase หรือ cellobiase ย่อยเซลโลไบโอส (cellobiose) และ โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นกลูโคส

นั่นคือ เซลลูเลสจะจับกับเซลลูโลสได้เป็น enzyme cellulose complex แล้ว endoglucanase จะย่อยส่วนที่ไม่เป็นระเบียบของเซลลูโลส ทำให้เส้นใยขาดเป็นช่วงๆ แล้ว exoglucanase จะเข้าย่อยส่วนปลายของเส้นใยที่ขาด ซึ่งสายโซ่โมเลกุลเซลลูโลสที่ใหญ่จะถูกย่อยให้สั้นลง จากนั้นจะถูกย่อยต่อจนเป็นกลูโคสโดย β -glucosidase (ภาพที่ 15) โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 15 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

ที่มา: Stöhr (1999)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีนที่มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีนเท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์และโลหะอื่นๆ ในการเร่ง โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส แต่อาจจะต่ำกว่าหรือสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิต โดยเอนไซม์จะมีความคงทนต่อสารเคมีได้ดี มีเพียงอออนของปรอทที่สามารถยับยั้งการทำงานได้อย่างสมบูรณ์

จากการศึกษาของ Krishna *et al.* (1998) พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นได้เร็ว และได้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุด แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60 และ 65 องศาเซลเซียส การไฮโดรไลซิสลดลง ส่วนอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส (35-50 องศาเซลเซียส) อัตราการไฮโดรไลซิสจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น

Han *et al.* (2013) ศึกษาการไฮโดรไลซิสโดยการใช้ออนไซม์เซลลูเลส (Cellic C Tec II) 30 FPU/g substrate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 4.8 (0.05 M sodium citrate buffer) ซึ่งมีการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ปริมาณเอทานอล 46.00 กรัมต่อลิตร หรือประมาณร้อยละ 77.36 ของการใช้ปริมาณวัตถุดิบร้อยละ 20

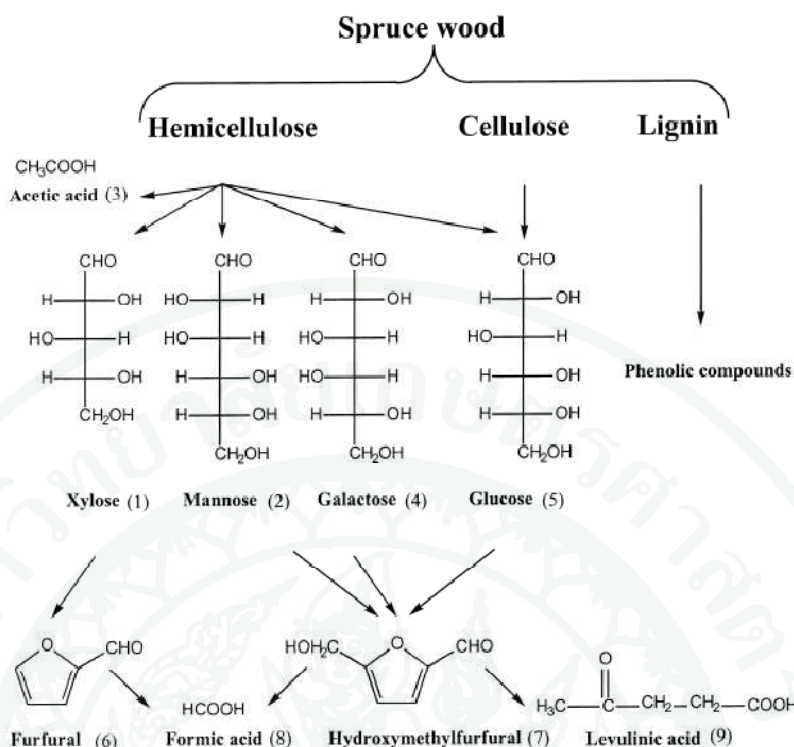
Mawadza *et al.* (2000) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจาก *Bacillus sp.* CH43 สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ คือ ช่วง pH 5.0-6.5 โดยเอนไซม์จากเชื้อสายพันธุ์นี้จะคงสภาพที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และยังคงเกิดกิจกรรมได้อย่างสมบูรณ์ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

การใช้ออนไซม์เซลลูเลสในการไฮโดรไลซิสจะมีราคาต้นทุนที่ต่ำกว่าการใช้กรดหรือเบส เพราะทำในสภาวะที่เป็นกลาง ซึ่งไม่มีความยุ่งยากในการเลือกใช้อุปกรณ์และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

6. ตัวยับยั้ง (Inhibitor) และการลดพิษ (Detoxification)

6.1 ตัวยับยั้ง (Inhibitor)

จากกระบวนการไฮโดรไลซิสวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดจะเกิดผลผลิตข้างเคียง (by-product) ของกระบวนการ ได้แก่ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (hydroxymethylfurfural; 5-HMF) กรดอะซิติก (acetic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) และสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ซึ่งเป็นสารพิษที่ยับยั้งกระบวนการหมัก โดยกรดจะทำให้เซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส ส่วนเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นไซโลส แมนโนส กรดอะซิติก กาแลกโทส และกลูโคส ซึ่งเมื่อมีการไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิและความดันสูงมักจะทำให้เกิดสารยับยั้ง โดยกลูโคสและไซโลสจะเปลี่ยนเป็นเฟอร์ฟูรอลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล ทั้งนี้เมื่อเฟอร์ฟูรอลถูกย่อยสลายจะได้เป็นกรดฟอร์มิก ส่วนเมื่อไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลถูกย่อยสลายจะกลายเป็นกรดลิวลินิก และสารประกอบฟีนอลจะเกิดขึ้นเมื่อมีการย่อยสลายลิกนิน ดังนั้นเมื่อต้องการได้ผลผลิตแอลกอฮอล์ในปริมาณที่สูงจึงต้องมีการลดปริมาณสารพิษดังกล่าวออกก่อนกระบวนการหมัก (Kamal *et al.*, 2011)



ภาพที่ 16 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสที่ทำให้เกิดสารยับยั้งการหมัก

ที่มา: Palmqvist and Hagerdal (2000)

ทั้งนี้ สารพิษที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยกรด สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของน้ำตาล ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของลิกนิน อนุพันธ์ที่ได้จากองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส และไอออนของโลหะหนัก (Mussatto and Roberto, 2004)

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของน้ำตาล ในระหว่างการย่อยสลายด้วยกรด น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมจะสลายตัวเป็นเฟอร์ฟูรอลและละลายอยู่ในน้ำหมัก ซึ่งความเป็นพิษมักแปรผันตามความเข้มข้นของเฟอร์ฟูรอลและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตมวลเซลล์ได้สำหรับไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล ซึ่งเป็นสารพิษที่ได้จากการย่อยสลายน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม และให้ผลเหมือนกับเฟอร์ฟูรอล คือทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตในระยะปรับตัว (lag phase) เป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม HMF มีพิษต่อเซลล์น้อยกว่าเฟอร์ฟูรอล และมักพบ HMF ในสารละลายจากการย่อยสลายด้วยกรดในปริมาณที่ต่ำกว่าด้วย

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของลิกนิน เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยกรดในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารพิษที่มีผลต่อการหมักมากที่สุด มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์รุนแรงกว่าอนุพันธ์ฟิวราน ถึงแม้ว่ามีความเข้มข้นต่ำกว่าก็ตาม

อนุพันธ์ที่ได้จากองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส สารพิษที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารที่ถูกสกัดออกจากวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสและกรดอะซิติก จากหม้ออะซิติกที่พบในเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมักเกิดขึ้นเมื่อย่อยสลายด้วยกรด โดยสารที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เมื่อค่ากรดต่าง (pH) ของการหมักลดลง กรดอะซิติกสามารถละลายได้ในไขมัน ทำให้เกิดการเล็ดผ่านสารเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เมื่อภายในเซลล์ที่มีค่ากรดต่าง (pH) ประมาณ 7.4 กรดอะซิติกจะแตกตัวและสะสมอยู่ในไซโทพลาสซึมในรูปของโปรตอน ทำให้ค่ากรดต่าง (pH) ภายในเซลล์ต่ำลงและเกิดภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์ ตลอดจนเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายในที่สุด

ไอออนของโลหะหนัก เช่น เหล็ก โครเมียม นิกเกิล และทองแดง ที่เกิดจากการกัดกร่อนของอุปกรณ์และภาชนะจะมีพิษต่อเอนไซม์ในวิถีเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งไอออนของเหล็กมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการใช้ไซโลส

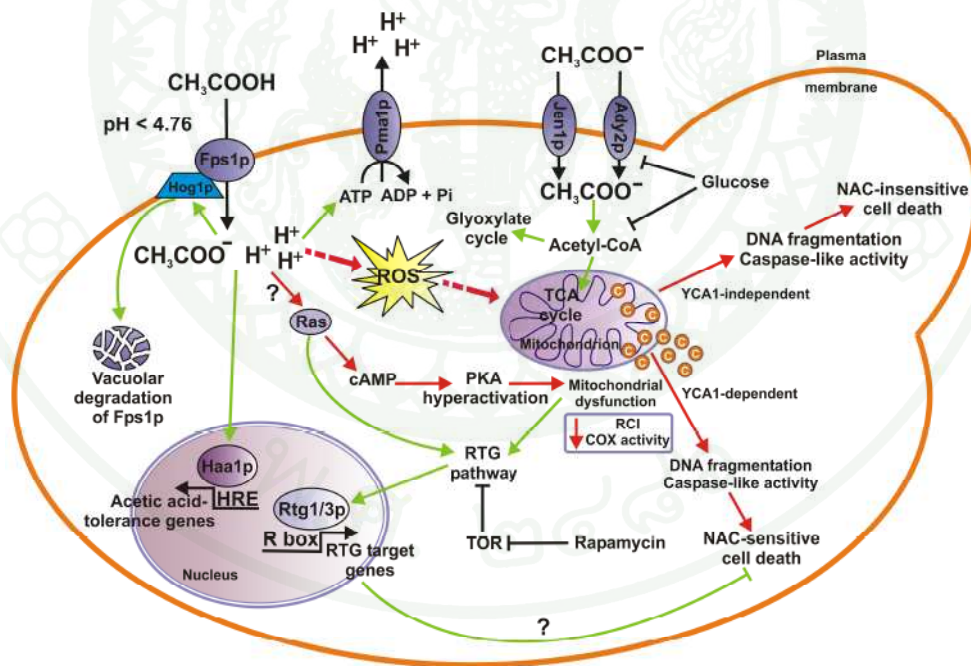
6.1.1 กลไกในการยับยั้ง (Mechanisms of inhibition)

1) กรดอ่อน (weak acids)

กรดอ่อนที่เป็น undissociated weak acid สามารถละลายได้ในไขมัน จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการแพร่กระจายเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ และไซโทซอลหรือของเหลวภายในเซลล์ ซึ่งจะปลดปล่อยของสารละลายในเซลล์ ทั้งนี้คุณสมบัติของไฮโดรไลเซสวัตุคิบลิกโนเซลลูโลสจะขึ้นอยู่กับพีเอสนั้น พีเอสจึงเป็นตัวแปรสำคัญในระหว่างกระบวนการหมัก

การหมักมีค่าพีเอสต่ำจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และยังมีศักยภาพเพิ่มความแตกต่างของโปรตอน (proton gradient) ในผนังเซลล์ เป็นผลให้อัตราการดูดซึมโปรตอนสูงขึ้น ซึ่งทั้ง 2 กลไกจะมีผลต่อการปลดปล่อย (เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ ATPase ในการรักษาไอออนของเซลล์) และการสะสมไอออนภายในเซลล์ (Palmqvist and Hagerdal, 2000)

Giannattasio *et al.* (2013) กล่าวว่า กลไกของกรดอะซิติกที่มีผลต่อการตายของเซลล์ยีส *Saccharomyces cerevisiae* เกิดขึ้นเมื่อกรดอะซิติกที่แตกตัวเข้าสู่เซลล์ยีสต์ผ่าน Jen1p และ Ady2p จะทำให้เกิด acetyl CoA เพื่อเข้าสู่ TCA cycle แต่ทั้งนี้การเข้ามาของอะซิเตทผ่าน Jen1p และ Ady2p อาจถูกยับยั้งได้โดยกลูโคสภายในเซลล์ แต่ในสภาวะที่ความเป็นกรดต่ำ ($pK_a=4.76$) และมีกลูโคสเช่นกัน กรดอะซิติกจะเข้ามาในเซลล์โดยไม่แตกตัวผ่านช่อง Fps1p แล้วเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ ไฮโดรเจนไอออนจะมีสภาวะเป็นกรด โดยการเหนี่ยวนำของโปรตอน เซลล์จะขับโปรตอนออกผ่าน Pma1p ด้วยเอนไซม์ ATPase ในกรณีที่โปรตอนไม่ถูกขับออกจากเซลล์ อาจจะไปกระตุ้นการทำงานของ Hog1p ซึ่งเป็นเอนไซม์ MAP Kinase ที่ทำงานในกระบวนการตั้งเเคราะห์ ATP (phosphorylation), กระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) และกระตุ้นให้แควคิโวลอยย่อยสลาย Fps1p แต่เซลล์ก็ยังสามารถปรับตัวในสภาวะที่มีกรดอะซิติกสูงได้ด้วย Haa1p ยีนนี้ แต่ในทางตรงกันข้ามความเข้มข้นของกรดอะซิติกทำให้เกิดการสะสม ROS ทำให้ cyt c ถูกปลดปล่อยออกจาก TCA cycle cyt c ยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียทำให้เซลล์ยีสต์ตายได้ (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 กลไกของกรดอะซิติกที่มีผลต่อการตายของเซลล์ยีส *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา: Giannattasio *et al.* (2013)

2) เฟอร์ฟูรอล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล

เฟอร์ฟูรอล จะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีอากาศหรือมีออกซิเจนน้อย ซึ่งในกระบวนการหมักทำให้เกิด furfuryl alcohol และบางกรณีจะเปลี่ยนเฟอร์ฟูรอลเป็นกรดฟูโรอิก (furoic acid) โดย *S. cerevisiae* ได้ ทั้งนี้การลดปริมาณเฟอร์ฟูรอลมีผลให้ NAD^+ สามารถทำงานได้ตามปกติ ถือเป็น oxidizing agent ที่สามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่น และเปลี่ยนเป็น NADH ซึ่งเป็น reducing agent สามารถให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่นได้หรือส่งเข้า electron transport system เพื่อนำไปสร้าง ATP และนั่นคือ เฟอร์ฟูรอลมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ด้วย อัตราการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลจะน้อยกว่าการเกิดเฟอร์ฟูรอลซึ่งอาจเป็นเพราะการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ลดลง ซึ่งไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลจะทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่วงระยะปรับตัว (lag phase) ยาวขึ้น (Palmqvist and Hagerdal, 2000)

3) สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds)

เนื่องจากมีมวลโมเลกุลขนาดเล็กและเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งมีผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดความแข็งแรงและประสิทธิภาพในการเลือกสารผ่านเข้าออกได้ลดลง ส่งผลให้การเคลื่อนที่เข้าออกของเอนไซม์หรือสารจำเป็นอื่นๆ เข้าสู่เซลล์ได้น้อยลงจนทำให้มีความผิดปกติในการใช้น้ำตาลของเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต ถึงแม้ว่ามีความเข้มข้นต่ำกว่าก็ตาม สารประกอบฟีนอลมีผลต่อการเข้าออกของสารระหว่างเยื่อหุ้มชีวภาพของเซลล์และการปลดปล่อยเอนไซม์ ซึ่งสารประกอบฟีนอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีความเป็นพิษสูง ส่วนกลไกในการทำงานยังไม่มีข้อมูลแน่ชัด (Palmqvist and Hagerdal, 2000) ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายไม้เนื้อแข็งด้วยกรดที่ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จะทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลงร้อยละ 30

6.2 การลดพิษ (Detoxification)

จากกระบวนการไฮโดรไลซิสวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดจะเกิดสารพิษ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งกระบวนการหมัก ดังนั้น เมื่อต้องการได้ผลผลิตแอลกอฮอล์ในปริมาณที่สูงจึงต้องมีการลดตัวยับยั้งดังกล่าวก่อน

วิธีลดพิษขึ้นอยู่กับไฮโดรไลเซทิก โนเชลลูโลสและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก เพราะระดับของสารพิษที่ออกมาจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดมีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และความสามารถในการทนต่อสารพิษของสายพันธุ์จุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยวิธีการกำจัดสารพิษมีดังนี้

6.2.1 วิธีทางกายภาพ (Physical methods)

วิธีการระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum evaporation) ใช้สำหรับลดสารพิษสารที่ระเหยได้ (volatile compounds) เช่น กรดอะซิติก เฟอร์ฟูรอล และวานิลลิน แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้กลับเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ non-volatile compounds toxic ซึ่งมีจะเป็นอนุพันธ์ของลิกนิน (Palmqvist and Hagerdal, 2000)

6.2.2 วิธีการทางเคมี (Chemical method)

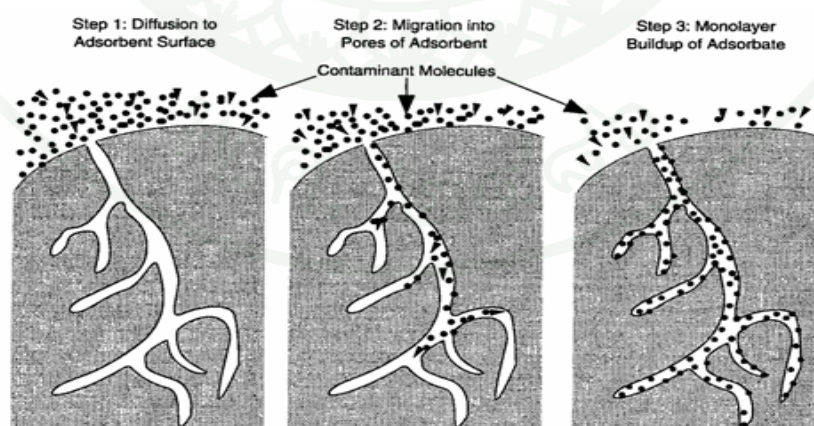
การปรับความเป็นกรดต่าง (adjust pH) การปรับความเป็นกรดให้สูงขึ้นด้วยด่าง โดยเฉพาะ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ และ NaOH จะส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของเฟอร์ฟูรอล (furfural) และสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ไม่ว่าจะปรับความเป็นกรดต่างให้เป็นกลาง (neutralization) หรือการปรับให้สูงมากๆ (over-liming) วิธีนี้จะเป็นการทำให้ค่าความเป็นด่างสูงขึ้น ผลสมกับการให้ความร้อน วิธีนี้สามารถกำจัดเฟอร์ฟูรอล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล พบว่าการใช้เบสในการปรับค่าให้เป็น 10 จะช่วยลดคีโตนได้ร้อยละ 22 ลดความเข้มข้นของเฟอร์ฟูรอลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลได้ร้อยละ 20 แต่ไม่สามารถกำจัดกรดอะซิติกได้

Ion-exchange resin วิธีนี้สามารถกำจัดสารยับยั้งได้ดีทั้งสามกลุ่มคือ เฟอร์ฟูรอล สารประกอบฟีนอล ฟูแรน กรดอะซิติก กรดฟอมิก และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล ถึงแม้ว่าการใช้วิธี Ion-exchange resin มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารยับยั้ง แต่ด้วยต้นทุนที่สูงอาจจะมีความเป็นไปได้ยากในระดับอุตสาหกรรม

การแลกเปลี่ยนไอออนทำได้โดย การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ การดูดซับด้วยดินเบา (diatomaceous earth) และเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange resins) ทั้งนี้วัสดุดังกล่าวอาจมีการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ซึ่งจะทำให้เกิดการฟอร์มตัวและตกตะกอนของด้วยยับยั้งมากขึ้น (Palmqvist and Hagerdal, 2000)

Kamal *et al.* (2011) ได้ทำการเติมถ่านกัมมันต์ชนิดผง (powder activated charcoal) ผสมกับไฮโดรไลเซสที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิส โดยแปรผันปริมาณถ่านกัมมันต์ที่ร้อยละ 1.0 และ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งมีการเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 30 นาที และ 60 นาที (อุณหภูมิห้อง) ทั้งนี้เมื่อได้ไซโลสจากกระบวนการไฮโดรไลซิสแล้วจะทำการหมักต่อด้วย *Candida Tropicalis* จากการศึกษา พบว่า เมื่อมีการลดสารพิษแล้วปริมาณเฟอร์ฟูรอลลดลงร้อยละ 53 และสารประกอบฟีนอลลดลงร้อยละ 78 เมื่อใช้ถ่านกัมมันต์ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 60 นาที ซึ่งการลดพิษมีผลโดยตรงต่อกระบวนการหมักโดยมีการเพิ่ม specific growth rate สูงถึง 1.179 g cell/substrate

กลไกการดูดซับ (adsorption mechanism) จะเกิดจากแรงดึงดูด (attractive force) ระหว่างโมเลกุลของสารอินทรีย์และพื้นผิวของสารดูดซับ ซึ่งแรงดึงดูดทั้งหมดจะเกิดจากปฏิกิริยาแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic interaction) โดยกลไกการดูดซับจะเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของสารถูกดูดซับ (adsorbate) เข้าใกล้สารดูดซับ (adsorbent) ซึ่งเป็นผลมาจากแรงดึงดูดเอาชนะพลังงานจลน์ของสารถูกดูดซับกระบวนการดูดซับจึงเกิดขึ้น กระบวนการดูดซับประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 โมเลกุลสารถูกดูดซับเคลื่อนที่เข้าหาโมเลกุลของตัวดูดซับ ขั้นตอนที่ 2 โมเลกุลสารถูกดูดซับ เกิดการแพร่ผ่านชั้นฟิล์มของน้ำ (film diffusion) และเกิดการแพร่เข้าสู่โพรงหรือช่องว่างภายในตัวดูดซับ ขั้นตอนที่ 3 เกิดการดูดซับระหว่างโมเลกุลสารถูกดูดซับกับพื้นที่ผิวภายในโพรงหรือช่องว่างภายในตัวดูดซับ ซึ่งถูกติดผิวด้วยแรงทางกายภาพและ/หรือทางเคมี (Sundstrom, 1979) (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 การเคลื่อนตัวของสารถูกดูดซับในการดูดซับ

ที่มา: อริศรา (2539)

6.2.3 วิธีการทางชีวภาพ (Biological method)

ทำโดยการใช้เอนไซม์เฉพาะ (specific enzyme) หรือจุลินทรีย์ที่สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีสารยับยั้ง เช่น การใช้เอนไซม์แลคเคส (laccase) และเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ของราขาวผ่านกระบวนการ oxidative polymerization ซึ่งสามารถใช้สารประกอบฟีนอลเป็นสารตั้งต้นได้ หรือใช้จุลินทรีย์ที่มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ เช่น mutant species ของ *S. cerevisiae* (Palmqvist and Hagerdal, 2000)

6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับของถ่านกัมมันต์ (กรองกาญจน์, 2530)

6.3.1 พื้นที่ผิวและ โครงสร้างรูพรุนของตัวดูดซับ

ความสามารถในการดูดซับจะเพิ่มขึ้นเมื่อพื้นที่ผิวของวัสดุที่เป็นตัวดูดซับมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม โครงสร้างรูพรุนก็มีส่วนช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวให้มีความสามารถในการดูดซับเพิ่มขึ้น เพราะถ้าขนาดของสารที่ถูกดูดซับไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนของวัสดุที่เป็นตัวดูดซับได้ ความสามารถในการดูดซับก็จะต่ำลง

6.3.2 ขนาดของวัสดุที่เป็นตัวดูดซับ

ในกรณีที่วัสดุที่เป็นตัวดูดซับ ไม่มีรูพรุน พื้นที่ผิวจะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดลดลง ซึ่งทำให้ความสามารถในการดูดซับเพิ่มขึ้นด้วย แต่ถ้าวัสดุที่เป็นตัวดูดซับมีรูพรุนมากๆ พื้นที่ผิวที่ใช้ในการดูดซับจะอยู่ในรูพรุน เพราะฉะนั้นในกรณีนี้ความสามารถในการดูดซับจะไม่ขึ้นกับขนาดของวัตถุ

6.3.3 เคมิที่ผิวหน้า

หมู่ฟังก์ชันเฉพาะที่อยู่บนผิววัสดุที่เป็นตัวดูดซับ จะมีคุณสมบัติที่มีผลกับกระบวนการดูดซับ เช่น ถ้าโมเลกุลที่เป็นตัวดูดซับเป็นพวกออกไซด์และมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นกรด ความสามารถในการดูดซับก็จะลดลง แต่ถ้ามีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นหมู่คาร์บอนิก ความสามารถในการดูดซับจะเพิ่มมากขึ้น

6.3.4 ความมีขี้ของโมเลกุล

ความสามารถในการดูดซับจะลดลงเมื่อความมีขี้ของตัวถูกดูดซับเพิ่มขึ้น เพราะการเพิ่มความมีขี้จะทำให้ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น

6.3.5 ไฮโดรเจนไอออน หรือค่าความเป็นกรด-ด่าง

โดยทั่วไปถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง อัตราการดูดซับจะเร็วและมาก เพราะไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเกาะติดผิวสารดูดซับได้ดี ทำให้สารดูดซับมีสภาพเป็นกลางเสมอ เนื่องจากสารดูดซับทั่วไปมักจะไม่มีขี้จนถึงมีขี้ลบนเล็กน้อย ดังนั้นการที่สารดูดซับมีสภาพเป็นกลางจึงทำให้โมเลกุลที่ไม่มีขี้ของสารในน้ำมาเกาะที่ผิวของสารดูดซับได้ดี

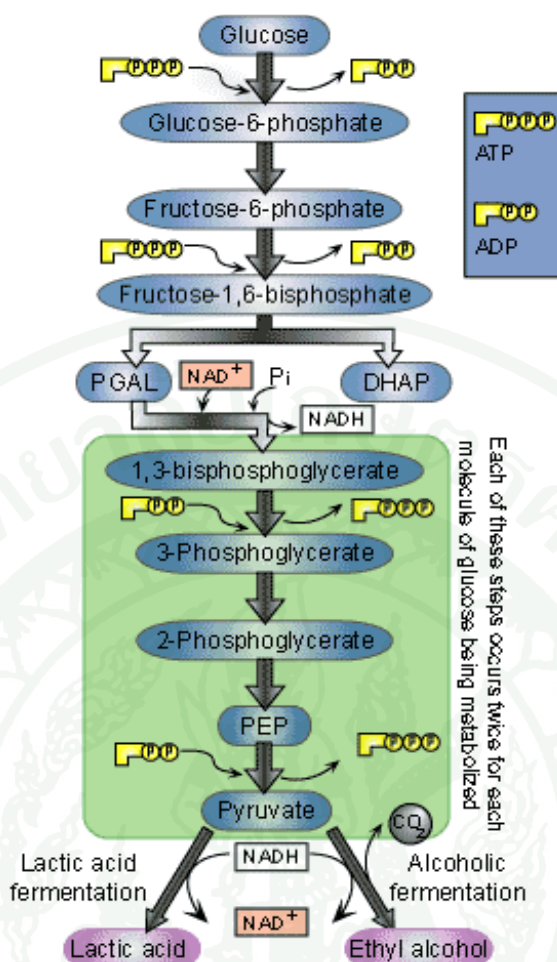
6.3.6 อุณหภูมิ

ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้น อัตราเร็วของการดูดซับจะเพิ่มขึ้น แต่ความสามารถในการดูดซับจะลดลง เนื่องจากการดูดซับเป็นปฏิกิริยาแบบคายความร้อน

7. กระบวนการหมักเอทานอล

การหมัก หมายถึง การสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ส่วนการหมักในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม หมายถึง กระบวนการผลิตใดๆ ก็ตาม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก ซึ่งครอบคลุมทั้งแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน

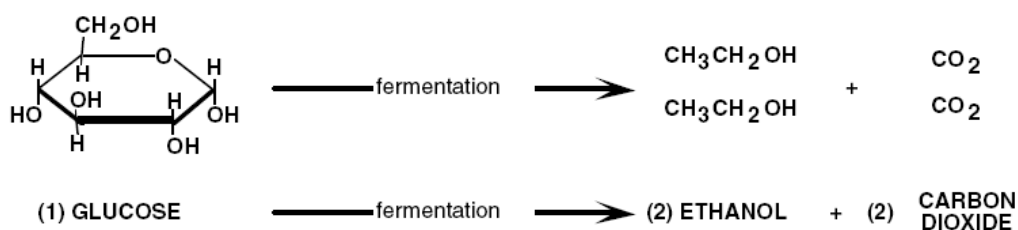
การหมักเอทานอลจากน้ำตาลโดยยีสต์เกิดโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway โดยวิถีนี้ไม่มีโมเลกุลของออกซิเจนเข้ามาเกี่ยวข้อง เริ่มจากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล แล้ว Fructose-1,6-bisphosphate เปลี่ยนเป็น Glyceraldehyde-3-phosphate 2 โมเลกุล จะได้ไพรูเวต 2 โมเลกุล ต่อจากนั้นไพรูเวตจะถูกดึงเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออก (decarboxylation) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวตดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenase) เป็นตัวเร่งการสร้างแอซีทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) ซึ่งจะถูกเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งสร้างเอทานอล ตามลำดับ (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 วิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) และการผลิตเอทานอล

ที่มา: Cheese Science (2011)

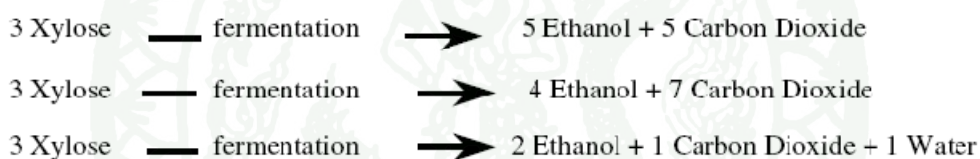
ปริมาณของสารต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักน้ำตาลโดยยีสต์ โดยคำนวณได้ว่า ในการหมักเอทานอลจากกลูโคส 1 กรัม ได้เอทานอล 0.511 กรัม และได้คาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม นั่นคือมีค่าผลผลิตตามทฤษฎี (theoretical yield หรือ Gay-Lussac yield) สำหรับการหมักเอทานอลเท่ากับร้อยละ 51.1 แต่ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้จะอยู่ในช่วงร้อยละ 90-95 ของค่าผลผลิตทางทฤษฎี ทั้งนี้เพราะน้ำตาลบางส่วนถูกยีสต์ใช้เพื่อการเจริญ และถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล ซักซินเนต เป็นต้น



ภาพที่ 20 การหมักเอทานอลจากกลูโคส

ที่มา: Murphy and McCarthy (2005)

ส่วนน้ำตาล Xylose เมื่อนำมาหมักจะเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำออกมาด้วย ส่วนเอทานอลจะได้มาในปริมาณที่ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสภาวะและสายพันธุ์เชื้อที่ใช้ (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 การหมักเอทานอลจากไซโลส

ที่มา: Murphy and McCarthy (2005)

ต้นทุนการผลิตเอทานอลของไทยที่ผลิตจากกากน้ำตาลเฉลี่ยประมาณลิตรละ 21.87 บาท (คำนวณที่ราคากากน้ำตาลเฉลี่ยกิโลกรัมละ 3.17 บาท) เพิ่มขึ้นร้อยละ 15.2 ตามราคากากน้ำตาล สำหรับต้นทุนการผลิตเอทานอลจากมันเส้น เฉลี่ยลิตรละ 21.22 บาท (คำนวณที่ราคาหัวมัน เฉลี่ยกิโลกรัมละ 2.13 บาท) เพิ่มขึ้นร้อยละ 5.2 ตามราคาหัวมันที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากต่างประเทศมีความต้องการผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังของไทยจำนวนมาก

7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์

7.1.1 ความเข้มข้นของเอทานอล

การเจริญและการหมักเอทานอลโดยยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล โดยพบว่าเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนัก ทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง และการเจริญของยีสต์จะหยุดลงเมื่อมีเอทานอลร้อยละ 4.7-7.8 โดยน้ำหนัก โดยไปเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ และสรีรวิทยาของเซลล์ที่ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือเปลี่ยนแปลงไป

7.1.2 ความเข้มข้นของซัสเตรต

ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลจะทนต่อแรงดันออสโมซิส ทั้งนี้เพราะนอกจากเจริญแล้วยังสามารถหมักเอทานอลในที่ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงได้ โดยทั่วไปพบว่าอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่าร้อยละ 15 การหมักเอทานอลของยีสต์จะหยุดลง

7.1.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป โดยปกติอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลโดยยีสต์จะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส และพบว่ายีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันไม่ไวต่อปฏิกิริยาจึงทำให้มีการสะสมไพรูเวตและเอทานอล การหมักเอทานอลที่มีอัตราการหมักสูงจะส่งผลให้ความร้อนเกิดขึ้นสูง โดยพบว่าในระหว่างการหมักจะมีความร้อนเพิ่มขึ้นในอัตรา 149.5 แคลอรีต่อกรัมน้ำตาลซูโครส หรือ 140.2 แคลอรีต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส ความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นพลังงานคายความร้อน (exothermic energy) ส่งผลให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น

7.1.4 ความเป็นกรดต่าง หรือพีเอช

ยีสต์สามารถเจริญได้ค่อนข้างดีที่พีเอช 3.6-6.0 แต่พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 4.5-5.0 ในระหว่างการหมักพีเอชอาจลดต่ำลงอันเนื่องมาจากกรดที่สร้างจากยีสต์ ซึ่งถ้าพีเอชต่ำลงถึง 3.0 ยีสต์บางสายพันธุ์จะหยุดการหมักหรือหมักได้ไม่ดี ดังนั้นการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารสำหรับหมักจึงมีความสำคัญ ในอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำ ควรมีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 5.5 ส่วนในอาหารที่มีความเป็นบัฟเฟอร์สูง ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 4.0-5.0

7.1.5 คาร์บอนไดออกไซด์

โดยทั่วไปคาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งต่อการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน การมีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นสูงยังยับยั้งการหมักเอทานอลได้ โดยคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ จึงส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมบางอย่างของเอนไซม์ ทำให้มีผลต่อสภาพการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (permeability) ในการขนส่งสาร

7.1.6 ธาตุอาหาร

ยีสต์ต้องการธาตุอาหารเพื่อการเจริญและการหมักเอทานอล ซึ่งพบว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักมีธาตุอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นนอกเหนือจากคาร์โบไฮเดรต แต่วัตถุดิบบางชนิดอาจต้องมีการเติมธาตุอาหารเสริมบางอย่างลงไปเพื่อให้ประสิทธิภาพการหมักของยีสต์ดีขึ้น สำหรับธาตุอาหารที่ยีสต์ต้องการใช้เป็นส่วนประกอบหลัก (major component) ของเซลล์ คือ คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน ส่วนธาตุอาหารรอง (minor component) คือ ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โพแทสเซียม และแมกนีเซียม และธาตุที่ยีสต์ต้องการในปริมาณน้อยมาก (trace element) ได้แก่ แมงกานีส โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก และสารอื่นๆ เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และวิตามิน

7.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลมีทั้งแบคทีเรียและยีสต์ แต่ส่วนใหญ่ที่นิยมใช้กันคือยีสต์ ได้แก่ *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *C. tropicalis* และ *Kluyvermyces spp.* สำหรับแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการหมักเอทานอล ได้แก่ *Zymomonas mobilis* แต่ในทางอุตสาหกรรมมักเลือกใช้ *S.*

cerevisiae มากกว่าทั้งนี้เพราะ *Z. mobilis* มีชีวมวลต่ำ ทำให้ต้องระมัดระวังในเรื่องการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งมีความทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลต่ำกว่ายีสต์



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1.1 จุกกั๊บประด ใบและยอค้อย และเปลือกทุเรียน นำวัสดุคักกล่าวมาทำให้แห้ง โดยการตากแดดและลดขนาดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดน้อยกว่่า 10 มิลลิเมตร แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่ปราศจากควมชื้น

1.2 เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (commercial cellulose: Cellic C[®]Tec2) บริษัท Novozymes โดยมีกิจกรรมเท่ากับ 864.15 FPU/mL วัดด้วยวิธี Filter Paper Activity ที่ pH 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

2.1 เครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีตะแกรงร่อนขนาด 0.2 มิลลิเมตร

2.2 เครื่องชั่งอย่างละเอียด รุ่น Sartorius Basic

2.3 ตู้อบ (oven) บริษัท MEMMART รุ่น 600

2.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) บริษัท UVIKON XS รุ่น

SECOMAM

2.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) บริษัท Yamato รุ่น SP300

2.6 เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) บริษัท Scientific Industry รุ่น Vortex-genie

2.7 หลอดทดลอง

2.8 ซ้อนตักสาร

2.9 ปีกเกอร์

2.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท SANYO รุ่น SR-F215

2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (incubator shaker)

2.12 ขวดทดลอง (duran) ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.13 Tip ขนาด 10 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 1000 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร

2.14 ออโตปีเปต (autopipette) 10 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 1000 ไมโครลิตร และ 200

ไมโครลิตร

2.15 กระจบอทดวงกระจายกรอง

2.16 เครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Vacuum filtration)

2.17 ตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส)

2.18 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) บริษัท VISION

SCIENCIENTIFIC รุ่น VS 8480SFN

2.19 อ่างน้ำเย็น (water bath) ตู้ปลอดเชื้อ (biohazard class2) บริษัท Clean USA

2.20 เครื่องแกสโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography; GC) บริษัท Agilent Technologies รุ่น 6890N

2.21 เครื่องวัดความชื้น (moisture analyzer) รุ่น AMD MX-50

2.22 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

2.23 เฮมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)

3. สารเคมี

3.1 Sulfuric acid (H_2SO_4)

3.2 Glucose ($C_6H_{12}O_6$)

3.3 3,5-Dinitrosalicylic acid

3.4 Sodium Hydroxide (NaOH)

3.5 Sodium potassium tartrate

3.6 Activated carbon (commercial grad)

4. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 และ *Pichai stipitis* TISTR 5806

วิธีการ

1. การวิเคราะห์หัตถุคิบั ได้แก่ จุกสับัประรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกกุเรียน

วิเคราะห์ห่อ้งคั้ประกอบทางเคมีได้แก่ สารแทรก และลิกโนเซลลูโลส: เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่สถาบันคั้คว้าและพัฒนาผลิถผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีคัวัชั้ที่เป็่นน้ำตาลอิสระที่ละลายได้โดยการนำหัตถุคิบั (ขนาดนั้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ไปซั้่ง 20g/100ml ในขวดทดลอง (duran) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั้่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คลุกให้เข้ากันแล้วนำส่วนของเหลว (liquid fraction) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

2. ศึกษาการปรับสภาพจุกสับัประรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกกุเรียน

นำหัตถุคิบั ได้แก่ จุกสับัประรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกกุเรียน ที่ผ่านชั้นตอนการลดขนาดแล้ว (ขนาดประมาณนั้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ไปซั้่ง 20g/100ml ในขวดทดลอง (duran) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยนำน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนในหม้อนัึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลง แล้วปรับพีเอสประมาณ 5.0

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีคัวัชั้ วิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยเตรียมสารละลาย DNS reagent (3,5-Dinitrosalicylic acid) ซั้่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid 20 กรัม ละลายในน้ำกลั้่น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบน hot plate เติมสารละลาย Sodium hydroxide (32 กรัม ในน้ำกลั้่น 300 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วค่อยเติม Sodium potassium tetrates 600 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 2,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 1.0 กรัมต่อลิตร โดยการซั้่งน้ำตาลกลูโคสที่อบแห้งแล้วปริมาตร 0.10 กรัม ละลายในน้ำกลั้่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็่น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายที่ได้ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง โดยดูดสารละลายมาตรฐานกลูโคส 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ปิเปตสารละลายไดโนโตรซาลิไซเลต (DNS reagent) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลาประมาณ 10 นาที แช่ในอ่างน้ำเย็น 10 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำไปเทียบค่าประมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3. ศึกษาสถานะในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

นำวัตถุดิบ ได้แก่ จุกสับประรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกทุเรียน ที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาดแล้ว (ขนาดประมาณน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ไปชั่ง 20g/100ml ในขวดทดลอง (duran) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนในหม้อน้ำเชื่อมมาเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลง แล้วปรับพีเอสประมาณ 5.0 แยกของแข็งและของเหลวที่ได้โดยการกรองด้วยระบบสุญญากาศ ส่วนของของแข็ง (solid fraction) หาน้ำหนักแห้งเพื่อคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ต้องใช้ในกระบวนการไฮโดรไลซิส

นำจุกสับประรด ยอดและใบอ้อย และเปลือกทุเรียน ที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาดแล้ว (ขนาดประมาณน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ชั่งวัตถุดิบ 20g/100ml ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนในหม้อน้ำเชื่อมมาเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลง ปรับพีเอสเท่ากับ 5.0 แล้วทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate โดยบ่มด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อไฮโดรไลซิสผ่านไป 72 ชั่วโมง แยกของแข็งและของเหลวที่ได้โดยการกรองด้วยระบบสุญญากาศ นำเอาส่วนของของแข็งที่ได้อบที่ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าเป็นน้ำหนักแห้งที่เหลือของกาก และแยกเอาส่วนของของเหลวไปวัดปริมาตรแล้ววิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS (Miller, 1959) และคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายโฮโลเซลลูโลส (%holocellulose conversion) วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการไฮโดรไลซิสและคัดเลือกชนิดวัตถุดิบที่ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด

4. ศึกษาการลดพิษตัวยับยั้งการหมัก

เตรียมผงถ่านกัมมันต์ โดยการล้างน้ำเพื่อลดสิ่งเจือปนที่อยู่ในช่องว่างและรูพรุนของถ่าน ออก ปรับพีเอสให้เป็นกลางแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง อบที่ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

นำวัตถุดิบได้จากคัดเลือกในขั้นตอนการศึกษาสภาวะในการไฮโดรไลซิส ที่ลดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ชั่งวัตถุดิบ 20g/100ml ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิตร เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิตร ให้ความร้อนในหม้อ นึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลง เติมผงถ่านที่ผ่านการเตรียมร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วปรับพีเอสเท่ากับ 5.0 ทำการย่อยสลายต่อยูเอ็นไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณที่ได้จากการศึกษาสภาวะในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ แล้วบ่มด้วยเครื่องเขย่าควบคุม อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างที่เก็บไปตรวจหาปริมาณน้ำตาลและสารพิษในไฮโดรไลเซส วิเคราะห์ปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมแก่กระบวนการไฮโดรไลซิส

นำสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายในขั้นต้น วัดปริมาตรสารละลายที่เหลือ แยกใส่ขวดรูปชมพู่ (flask) ปริมาตร 100 มิลลิตร เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เติมน้ำตาลอาหาร (Yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)HPO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร) เติมน้ำเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5596 หรือ *P. stipitis* TISTR 5806 ปริมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอล

5. สถานที่ทำการวิจัยและระยะเวลาการทำวิจัย

ทำการวิจัยห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ภาคเรียนที่ 1-2 ปีการศึกษา 2556

6. แหล่งทุนสนับสนุน

ทุนภาคีบัณฑิต สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)



ผลและวิจารณ์

1. วัตถุประสงค์และองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุประสงค์

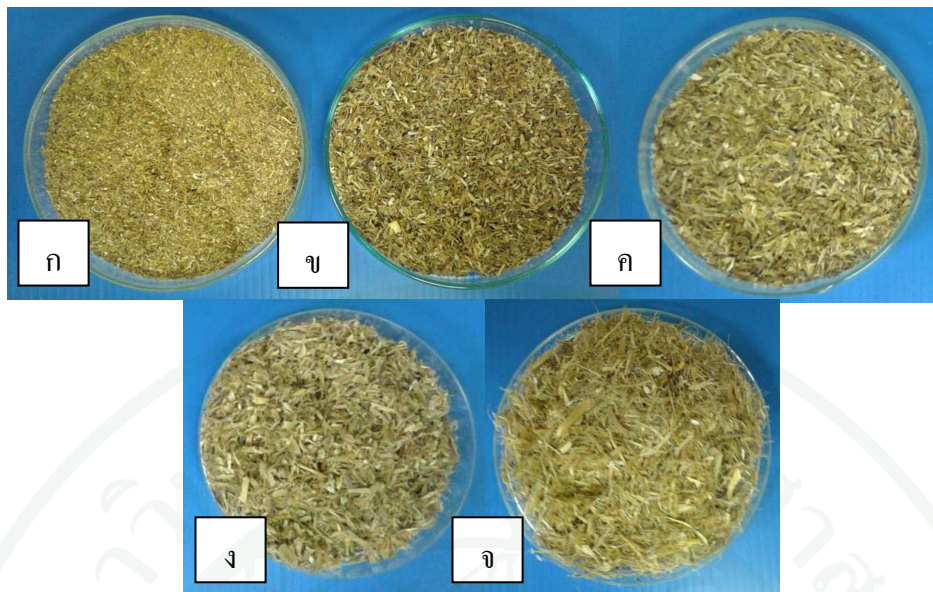
1.1 วัตถุประสงค์

เมื่อวัตถุประสงค์ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีขนาดตะแกรง 2.0 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการใช้แรงกลหรือกระบวนการทางกายภาพเพื่อทำลายโครงสร้างเซลล์ของวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถทำปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีในขั้นต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง ทั้งนี้ การตัดหรือบดให้ขนาดวัตถุประสงค์เล็กลง จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว (surface area) เพื่อให้ตัวเร่งปฏิกิริยา หรือ เอนไซม์สามารถจับวัตถุประสงค์ได้ง่ายขึ้นในขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุประสงค์และไฮโดรไลซิส Sun and Cheng (2002) กล่าวว่า การบดวัตถุประสงค์สามารถทำลายความเป็นผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มการย่อยสลายได้ ซึ่งวัตถุประสงค์ที่ผ่านเครื่องมือดังกล่าวมีขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร แสดงดังภาพที่ 22

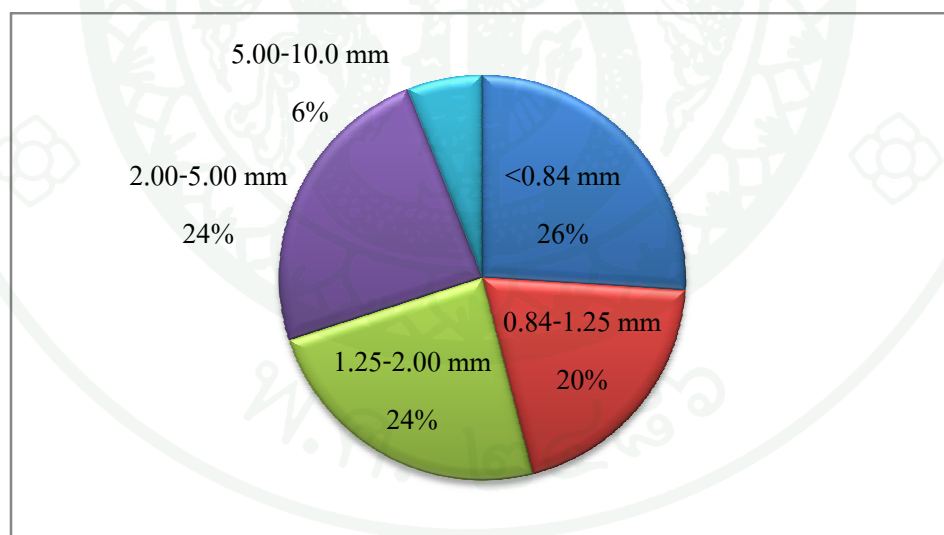


ภาพที่ 22 (ก) จุกสับประรด (ข) เปลือกทุเรียน และ (ค) ยอดและใบอ้อย ที่ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีขนาดตะแกรง 2 มิลลิเมตร

จุกสับประรดที่ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีขนาดตะแกรง 2.0 มิลลิเมตร เมื่อนำมาร่อนแยก (ภาพที่ 23) พบว่า วัตถุประสงค์ส่วนใหญ่มีขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 26 รองลงมาขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร และขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร มีปริมาณเท่ากันคิดเป็นร้อยละ 24 ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 20 และขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 6 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 23 จุกสับปะรดที่ผ่านร่อนแยกขนาด (ก) ขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร (ข) ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร (ค) ขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร (ง) ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร และ (จ) ขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร



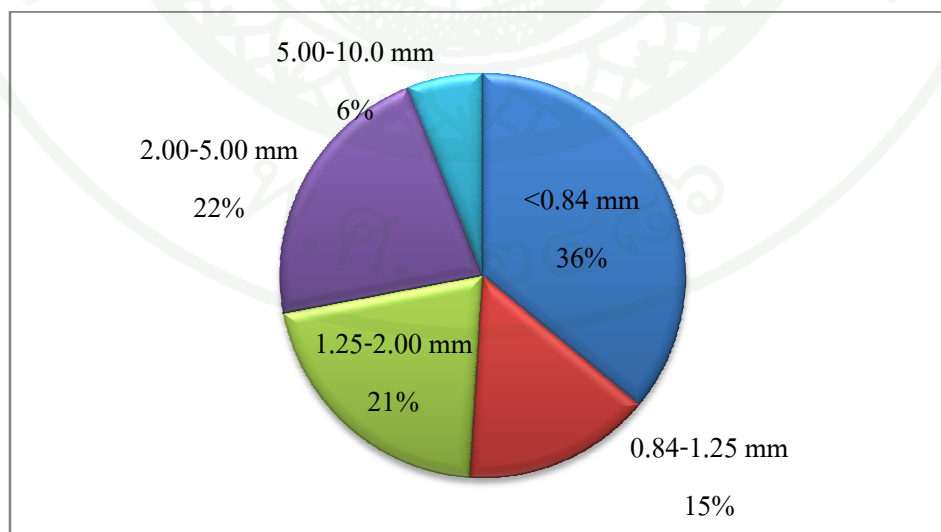
ภาพที่ 24 สัดส่วนของขนาดและปริมาณจุกสับปะรดที่ผ่านการลดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร

เปลือกทุเรียนที่ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีขนาดตะแกรง 2.0 มิลลิเมตร เมื่อนำมาร่อนแยก (ภาพที่ 25) พบว่า วัสดุคิบบส่วนใหญ่มีขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 36 รองลงมาคือขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 22 ขนาด 1.25-

2.00 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 21 ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 15 และขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 6 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ (ภาพที่ 26)

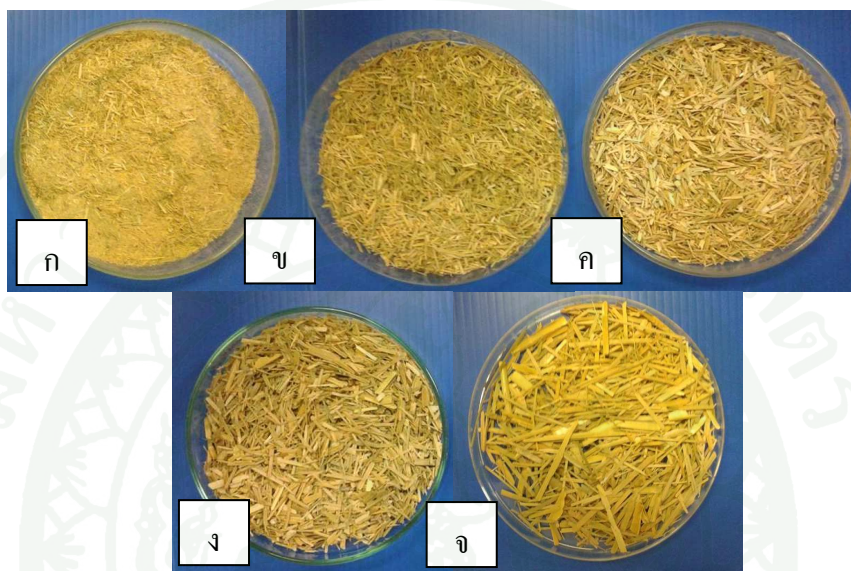


ภาพที่ 25 เปลือกทุเรียนที่ผ่านร่อนแยกขนาด (ก) ขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร (ข) ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร (ค) ขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร (ง) ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร และ (จ) ขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร

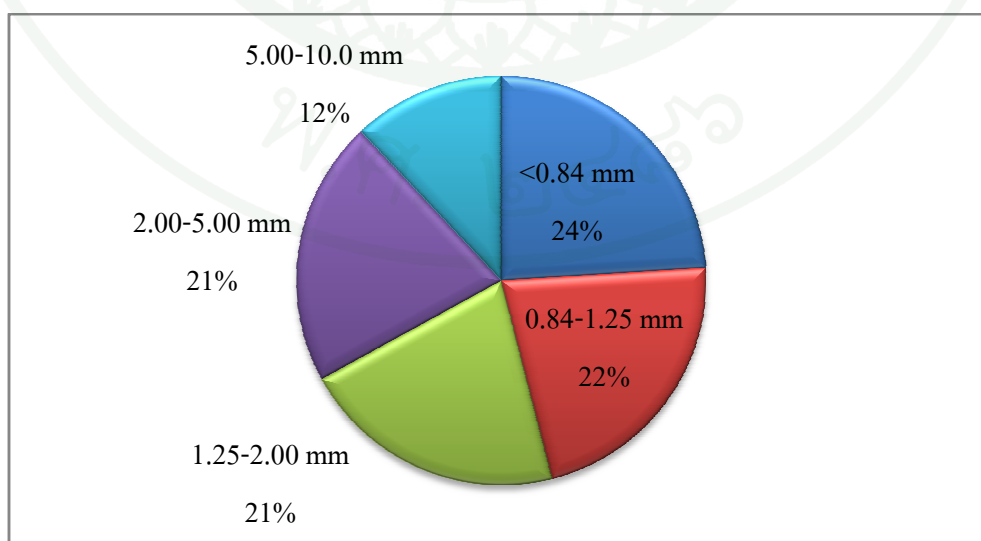


ภาพที่ 26 สัดส่วนของขนาดและปริมาณเปลือกทุเรียนที่ผ่านการลดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร

ใบและยอดอ้อยที่ผ่านการลดขนาดแล้วเมื่อนำมาร่อนแยก (ภาพที่ 27) พบว่า วัสดุคืบส่วนใหญ่มีขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 24 รองลงมาคือขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 22 ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร และ 2.00-5.00 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 21 และขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 12 (โดยน้ำหนัก) (ภาพที่ 28)



ภาพ 27 ยอดและใบอ้อยที่ผ่านร่อนแยกขนาด (ก) ขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร (ข) ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร (ค) ขนาด 2.00-5.00 มิลลิเมตร (ง) ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร และ (จ) ขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร



ภาพที่ 28 สัดส่วนของขนาดและปริมาณยอดและใบอ้อยที่ผ่านการลดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสัดส่วนของวัตถุดิบที่ขนาดต่างๆ พบว่า วัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณมากที่สุดที่ขนาดน้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร โดยเปลือกทุเรียนมีปริมาณมากที่สุด ทั้งนี้จุก สับปะรดและเปลือกทุเรียนที่ผ่านการร่อนแยกขนาดมีสัดส่วนของปริมาณวัตถุดิบที่ขนาดต่างๆ คล้ายคลึงกัน ซึ่งที่ขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร มีปริมาณน้อยที่สุด สำหรับยอดและใบอ่อนที่ขนาด น้อยกว่า 0.84 มิลลิเมตร, ขนาด 0.84-1.25 มิลลิเมตร, ขนาด 1.25-2.00 มิลลิเมตร และขนาด 2.0-5.0 มิลลิเมตร มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งที่ขนาด 5.00-10.00 มิลลิเมตร ยอดและใบอ่อนมีปริมาณ มากกว่าจุกสับปะรดและเปลือกทุเรียนร้อยละ 6 (โดยน้ำหนัก)

1.2 องค์ประกอบของวัตถุดิบ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ พบว่า เปลือกทุเรียนมีปริมาณสารแทรก (extractives) สูงที่สุดร้อยละ 44.53 รองลงมาคือ จุกสับปะรด ร้อยละ 36.47 และยอดและใบอ่อน ร้อยละ 20.70 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ทั้งนี้วัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณสารแทรกจำพวกสารละลาย ในแอลกอฮอล์เบนซีน (alcohol-benzene solubility) มากที่สุด โดยเปลือกทุเรียนมีปริมาณร้อยละ 21.57 รองลงมาได้แก่ จุกสับปะรด ร้อยละ 15.65 และยอดและใบอ่อน ร้อยละ 8.56 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ทั้งนี้จุกสับปะรดมีปริมาณสารแทรกที่เป็นสารละลายในแอลกอฮอล์ (alcohol solubility) สูงสุดร้อยละ 4.89 รองลงมาได้แก่ เปลือกทุเรียน และยอดและใบอ่อน ร้อยละ 3.91 และ 2.97 (โดย น้ำหนัก) ตามลำดับ โดยสารแทรกจำพวกสารละลายในแอลกอฮอล์เบนซีน (alcohol-benzene solubility) และสารละลายในแอลกอฮอล์ (alcohol solubility) จะแทรกอยู่ในผนังเซลล์ของพืช มี อิทธิพลที่ชัดเจนเกี่ยวกับการบวม (swelling) ของโครงสร้างผนังเซลล์และต่อมาส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติภายนอกของเซลล์พืช (Mantanis *et al.*, 1995)

ทั้งนี้ส่วนประกอบส่วนใหญ่ในวัตถุดิบเป็น เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (โฮโลเซลลูโลส) โดยองค์ประกอบเหล่านี้เป็นส่วนสำคัญมาก เพราะประกอบขึ้นด้วยน้ำตาลรีดิิวซ์ คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) และไซโลส (xylose) เป็นหลัก โดยในยอดและใบอ่อน มีปริมาณโฮโลเซลลูโลส ร้อยละ 61.29 จุกสับปะรดร้อยละ 42.17 และเปลือกทุเรียนร้อยละ 36.20 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ โดย ปริมาณลิกนินในยอดและใบอ่อน มีปริมาณสูงที่สุดร้อยละ 13.21 เปลือกทุเรียนร้อยละ 9.69 และจุก สับปะรดร้อยละ 8.89 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

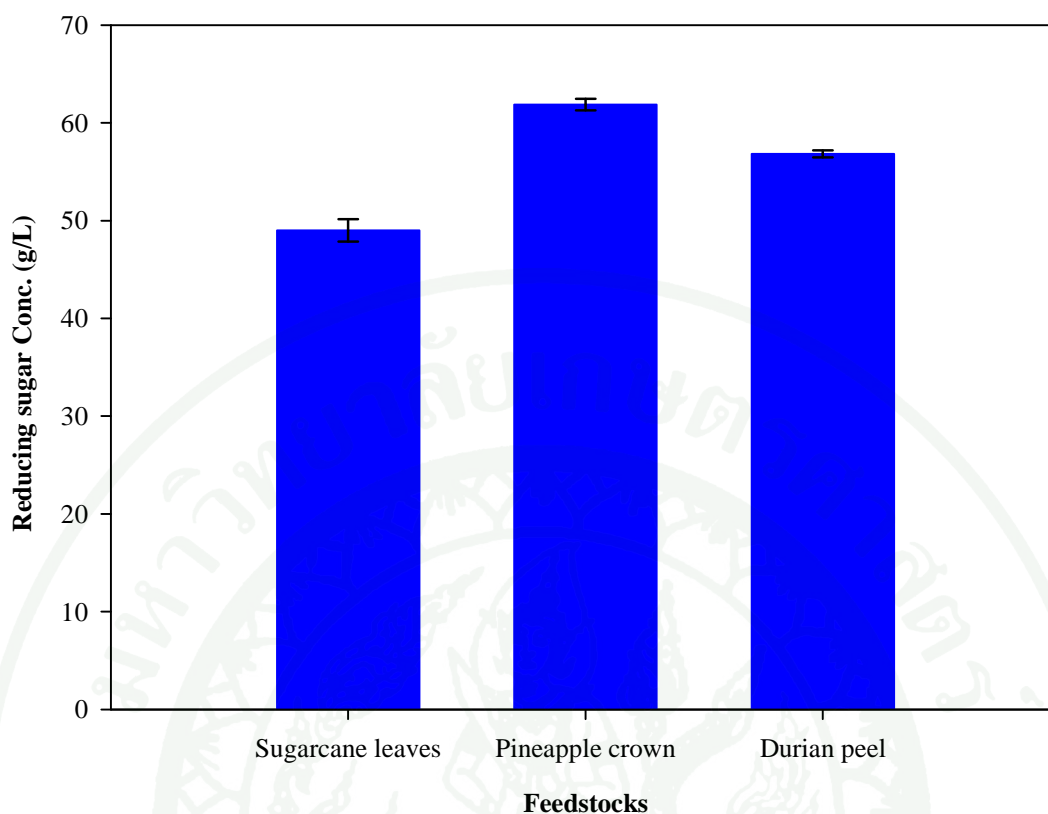
ตารางที่ 7 องค์ประกอบของวัตถุดิบ (หน่วย %โดยน้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)	วัตถุดิบ (raw material)			มาตรฐาน (standard)
	จุกสับประรด	เปลือก ทุเรียน	ยอดและใบอ้อย	
1. ปริมาณสารแทรก (extractives)	36.47	44.53	20.70	
1.1 สารละลายใน แอลกอฮอล์เบนซีน (alcohol- benzene solubility)	15.65	21.57	8.56	TAPPI-T204- om-97
1.2 สารละลายใน แอลกอฮอล์ (alcohol solubility)	4.89	2.97	3.19	TAPPI-T264- om-97
1.3 การละลายในน้ำร้อน (hot water solubility)	15.93	19.69	8.95	TAPPI-T207- om-93
2. ลิกนิน (lignin)	8.89	9.69	13.21	TAPPI-T222- om-98
3. โฮโลเซลลูโลส (holocellulose)	42.17	36.20	61.29	Acid chloride Method of Browning
4. แอลฟาเซลลูโลส (alpha- cellulose)	22.30	20.57	36.64	TAPPI-T203- om-93
5. เถ้า (ash)	6.90	3.50	6.37	Official Final Action Method (A.O.A.C.1980)
6. ความชื้น (moisture content)	13.34	8.62	9.00	Moisture analyzer) รุ่น AMD MX-50

2. ผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริก ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เนื่องจากวัตถุดิบเป็นสารพอลิกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน หากต้องการ conversion yield ที่สูง ต้องมีการทำการปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) ก่อน จากการศึกษาของ Krishna *et al.* (1989) การไฮโดรไลซิสไบโอสด้วยเอนไซม์ พบว่าไบโอสที่ปรับสภาพจะทำให้การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสูงกว่าร้อยละ 40 แต่การไม่ปรับสภาพจะทำให้การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไม่ถึงร้อยละ 20 ทั้งนี้จึงทำการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลง แล้วปรับพีเอช ประมาณ 5.0 พบว่า การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในจุดสับประรดเท่ากับ 61.87 ± 0.59 กรัมต่อลิตร เปลือกทุเรียน 56.83 ± 0.36 กรัมต่อลิตร และยอดและไบโอส 49.00 ± 1.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 29) ซึ่งการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) จะเกิดการทำลายพันธะ glycosidic linkage และการใช้กรดในการปรับสภาพจะได้น้ำตาลโมลกุลเดี่ยวจากเซลลูโลสออกมาบางส่วน วัตถุดิบจะอ่อนนุ่ม เอนไซม์สามารถเข้าถึงและทำปฏิกิริยาได้ดี โดยการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบในพืชโดยใช้กรดซัลฟิวริกกับความร้อนจะให้ผลดีที่สุดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก คือ ขนาดและรูปร่างของวัตถุดิบ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย รวมทั้งอัตราส่วนระหว่างกรดซัลฟิวริกกับวัตถุดิบ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (ฉัตรดิยา, 2553.)

วัตถุดิบที่มีโมลกุลใหญ่จะมีปริมาณลิกโนเซลลูโลสที่มีความหนาแน่นมาก ส่งผลให้ใช้ระยะเวลานานในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย และอาจจะต้องใช้กรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อให้ได้น้ำตาล (Bower *et al.*, 2007) นั้นจะเห็นได้ว่ายอดและไบโอสซึ่งมีความหยาบและขนาดใหญ่กว่าวัตถุดิบอื่นจึงให้น้ำตาลรีดิวซ์ออกมาในปริมาณที่น้อยกว่าวัตถุดิบอื่นๆ กอปรกับปริมาณลิกนินที่มีมาก จะเสริมความแข็งแรงให้กับโครงสร้างของเซลล์ และขัดขวางการทำปฏิกิริยาทางเคมีของกรดซัลฟิวริก อีกทั้งปริมาณสารแทรกที่มีอยู่น้อยทำให้ไม่เกิดการบวม (swelling) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผนังเซลล์ของยอดและไบโอส



ภาพที่ 29 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการปรับสภาพจุกสับประรด เปลือกทุเรียน และยอดและใบอ้อย ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เนื่องจากในวัตถุดิบที่เป็นของเสียอินทรีย์ทางการเกษตรมีการสะสมน้ำตาลในส่วนต่างๆ ซึ่งจัดเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตประเภทที่ไม่เป็นโครงสร้างสามารถละลายได้ง่าย (non-structural carbohydrate หรือ soluble carbohydrate) จากการศึกษาของ อนันท์ และคณะ (2557) เมื่อพิจารณาถึงคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ในรูปน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนต่างๆ ของสับประรด พบว่า ใบและจุกสับประรด มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในรูปน้ำตาลรีดิวซ์สูง และจากงานวิจัยของ Muller (1978) ได้รายงานข้อมูลว่าในเปลือกสับประรดตรวจพบปริมาณน้ำตาลพอกซูโครส (70%) กลูโคส (20%) และฟรุคโตส (10%) ตามลำดับ ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในเศษเหลือจากสับประรดยังเป็นกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ ดังนั้นในส่วนต่างๆ ของวัตถุดิบที่นำมาใช้ (จุกสับประรด เปลือกทุเรียน ยอดและใบอ้อย) ย่อมมีคาร์โบไฮเดรตในรูปของน้ำตาลที่ละลายได้

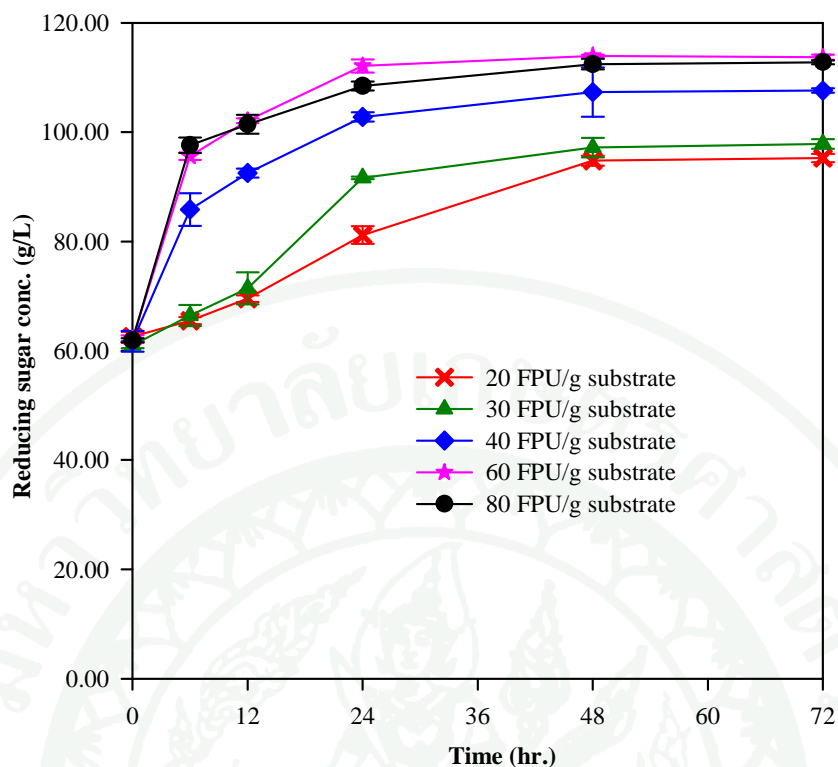
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นน้ำตาลอิสระที่ละลายได้ในวัตถุดิบ พบว่า จุกสับประดามีปริมาณน้ำตาลสูงที่สุด 30.81 ± 6.51 กรัมต่อลิตร เปลือกทุเรียน 15.77 ± 1.22 กรัมต่อลิตร และยอดและใบอ้อย 2.01 ± 0.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นน้ำตาลอิสระที่ละลายได้ในวัตถุดิบชนิดต่างๆ

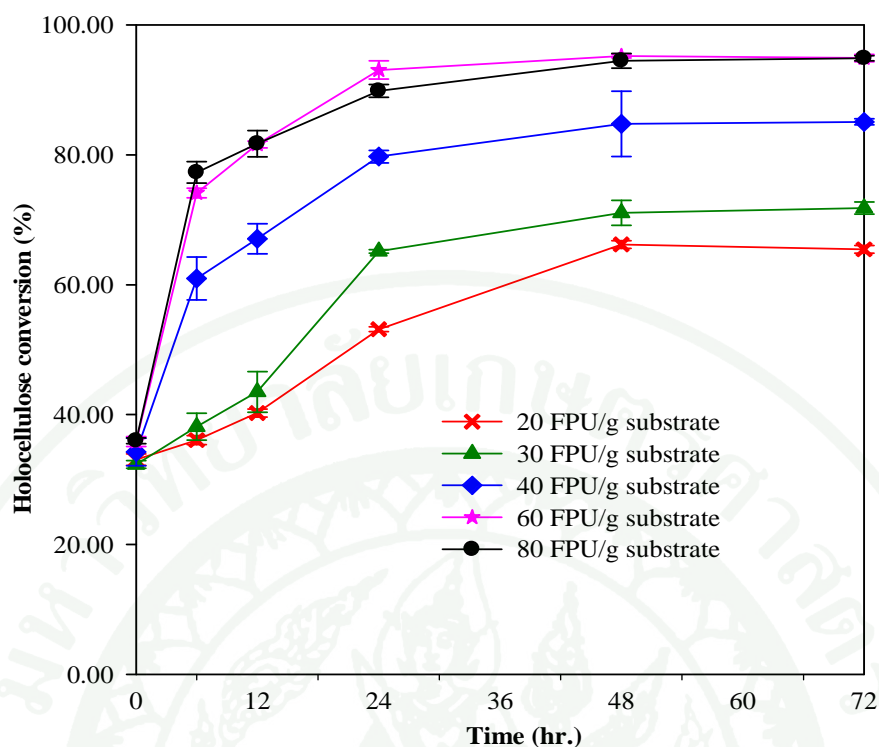
วัตถุดิบ (feedstocks)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)
จุกสับประด	30.81 ± 6.51
เปลือกทุเรียน	15.77 ± 1.22
ยอดและใบอ้อย	2.01 ± 0.60

3. ผลการศึกษาสถานะในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2)

จากการนำจุกสับประดที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดประมาณ 0-10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate บ่มด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พิจารณาผลของปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสจุกสับประด พบว่าปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ให้ปริมาณน้ำตาลค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นและเสถียรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป โดยปริมาณเอนไซม์ 20 และ 30 FPU/g substrate ให้ปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ 40, 60 และ 80 FPU/g substrate อย่างชัดเจน ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น ทั้งนี้ปริมาณเอนไซม์ 60 และ 80 FPU/g substrate จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน โดยที่ชั่วโมงที่ 72 การใช้เอนไซม์ 60 FPU/g substrate ให้น้ำตาลสูงสุด 113.70 ± 0.47 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 30) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) ที่คำนวณจากปริมาณน้ำตาลที่ได้จากไฮโดรเซลลูโลสซึ่งไม่รวมน้ำตาลอิสระที่ละลายได้ในวัตถุดิบ การใช้เอนไซม์ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ชั่วโมงที่ 72 ให้ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลสเท่ากับร้อยละ 65.4 ± 0.58 , 71.83 ± 0.95 , 85.09 ± 0.46 , 94.91 ± 0.54 และ 94.87 ± 0.40 ตามลำดับ (ภาพที่ 31) นั่นคือการใช้เอนไซม์ปริมาณ 60 และ 80 FPU/g substrate จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน



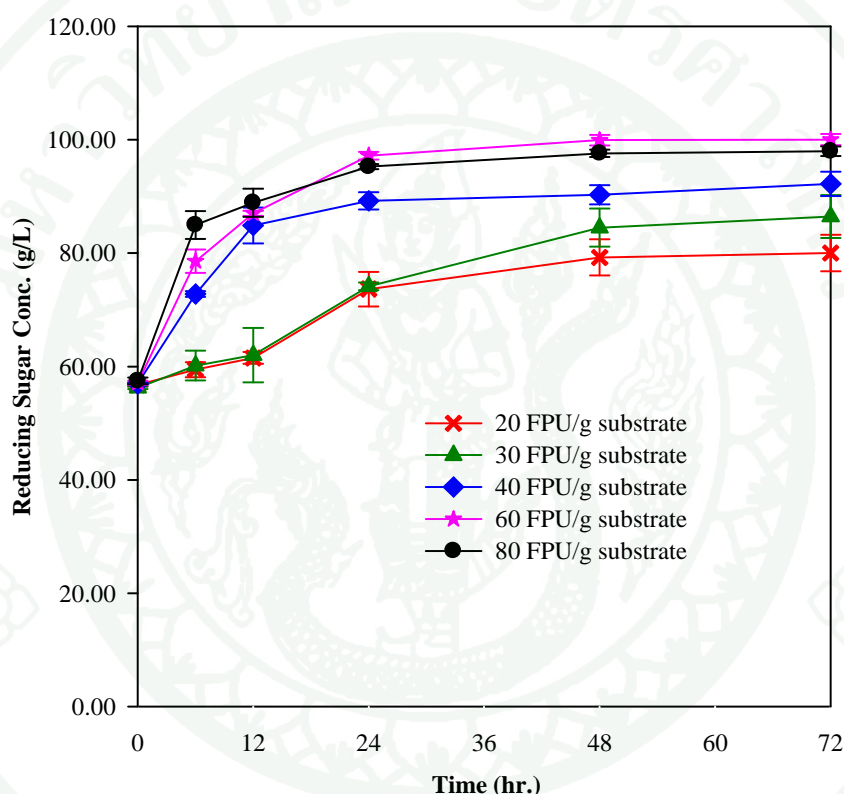
ภาพที่ 30 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic® CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากจุกสับประรดขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



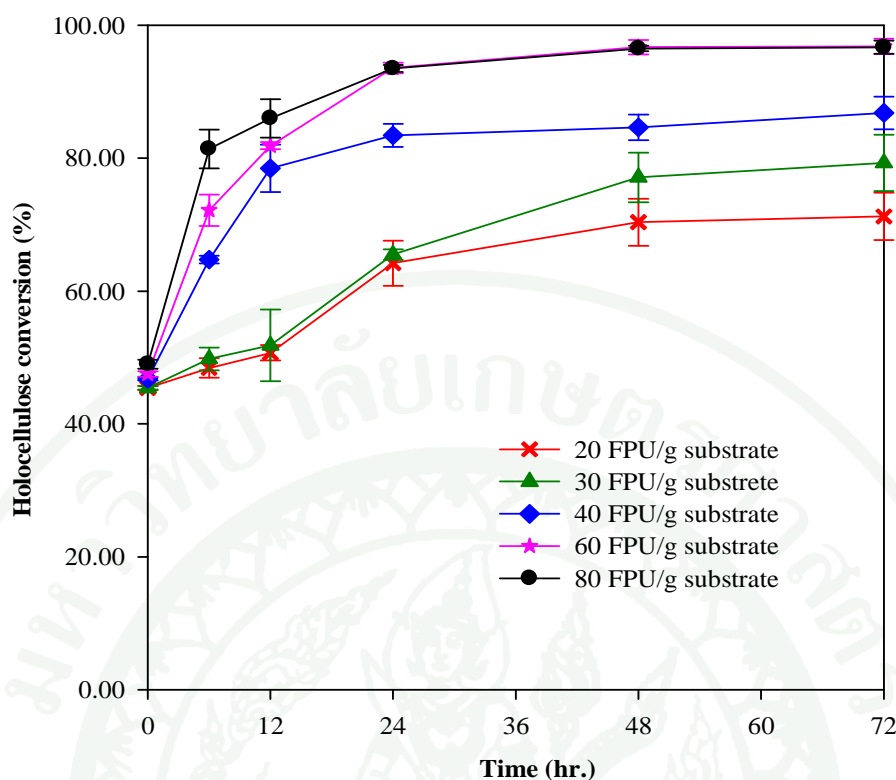
ภาพที่ 31 ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำลูกสับปะรดที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate

จากการนำเปลือกทุเรียนที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดประมาณ 0-10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate โดยบ่มด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาผลของปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส พบว่าปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ให้ปริมาณน้ำตาลค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นและที่ใช้เอนไซม์ 40, 60 และ 80 FPU/g substrate เสถียรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป โดยปริมาณเอนไซม์ 20 และ 30 FPU/g substrate ให้ปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ 40, 60 และ 80 FPU/g substrate อย่างชัดเจน ปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น ทั้งนี้ปริมาณเอนไซม์ 60 และ 80 FPU/g substrate ได้ผลที่ไม่แตกต่างกัน โดยชั่วโมงที่ 72 การใช้เอนไซม์ 60

FPU/g substrate ให้น้ำตาลสูงสุด 100.01 ± 0.99 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 32) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) ที่คำนวณจากปริมาณน้ำตาลที่ได้จากไฮโดรเซลลูโลสไม่รวมน้ำตาลอิสระที่ละลายได้ในวัตถุดิบ ซึ่งการใช้เอนไซม์ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ชั่วโมงที่ 72 ให้ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลสเท่ากับร้อยละ 71.23 ± 3.56 , 79.30 ± 4.23 , 86.81 ± 2.44 , 96.82 ± 1.14 และ 96.69 ± 0.99 ตามลำดับ (ภาพที่ 33) นั่นคือการใช้เอนไซม์ปริมาณ 60 และ 80 FPU/g substrate จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน



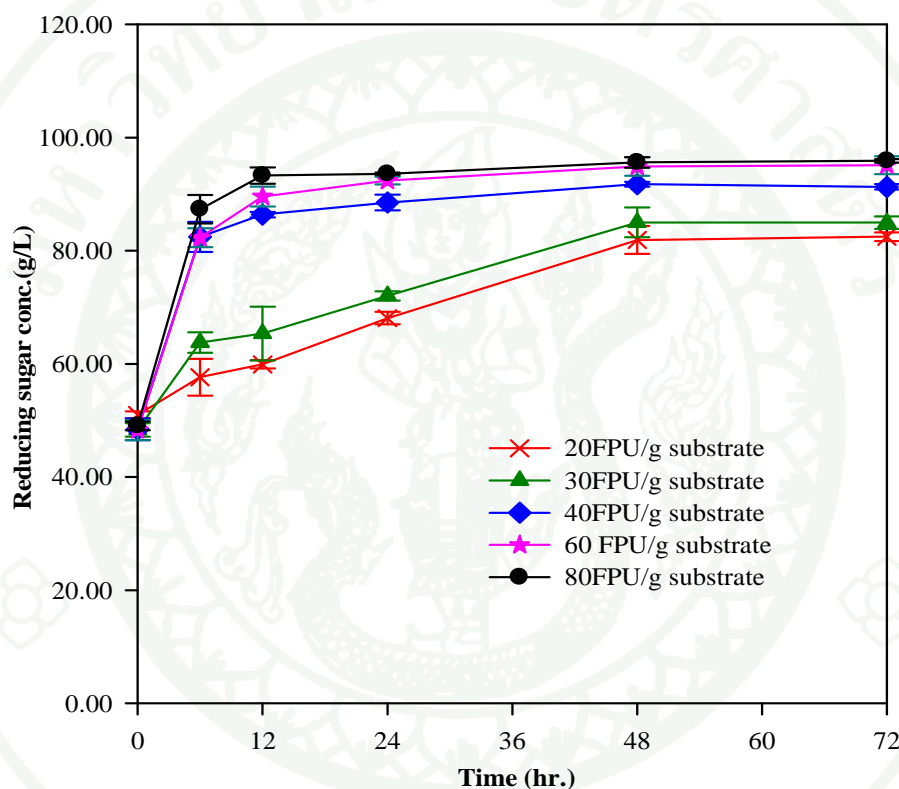
ภาพที่ 32 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากเปลือกทุเรียนขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



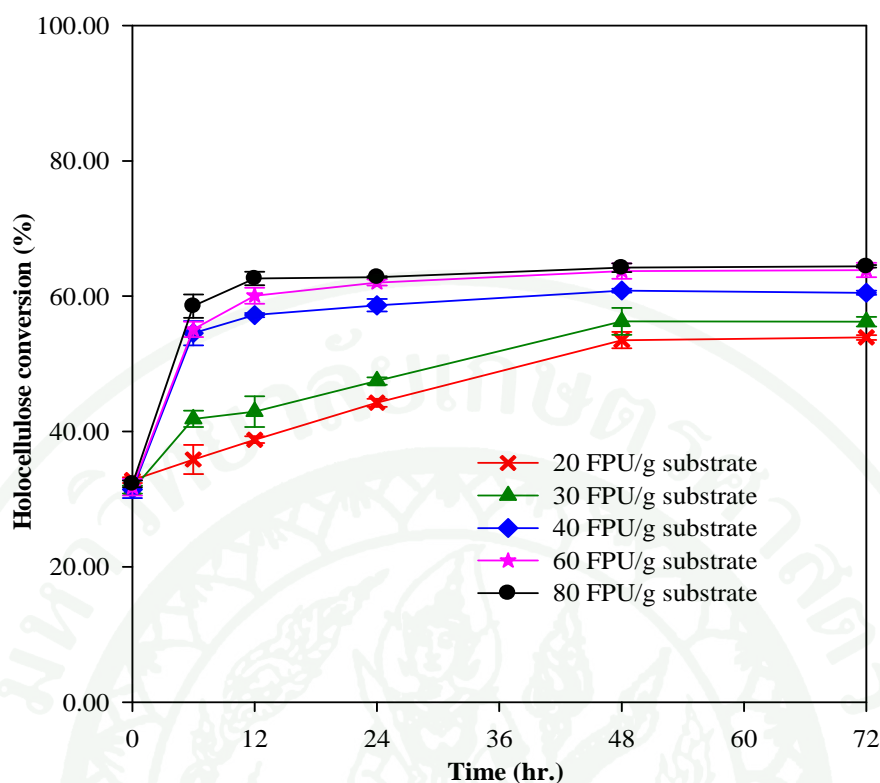
ภาพที่ 33 ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำเปลือกทุเรียนที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate

จากการนำยอดและใบอ้อยที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดประมาณ 0-10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate บ่มด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พิจารณาผลของปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส พบว่าปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ให้ปริมาณน้ำตาลค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นและเสถียรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไปเช่นเดียวกับจุดสับประรดและเปลือกทุเรียน โดยการใช้เอนไซม์ 20 และ 30 FPU/g substrate ให้ปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ 40, 60 และ 80 FPU/g substrate อย่างชัดเจน ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น ทั้งนี้ปริมาณเอนไซม์ 60 และ 80 FPU/g substrate ได้ผลที่ไม่แตกต่างกัน โดยชั่วโมงที่ 72 การใช้เอนไซม์ 60 FPU/g substrate ให้ผลผลิตน้ำตาล 95.09 ± 1.57 กรัมต่อลิตร ที่ 80 FPU/g substrate ให้ผลผลิตน้ำตาล

95.87±0.30 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 34) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโฮโลเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) ที่คำนวณจากปริมาณน้ำตาลที่ได้จากโฮโลเซลลูโลสไม่รวมน้ำตาลอิสระที่ละลายได้ในวัตถุดิบ ซึ่งการใช้เอนไซม์ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ชั่วโมงที่ 72 ให้ประสิทธิภาพการย่อยโฮโลเซลลูโลสเท่ากับร้อยละ 53.89±0.36, 56.22±0.72, 60.50±0.32, 63.84±1.07 และ 64.40±0.20 ตามลำดับ (ภาพที่ 35) นั่นคือการใช้เอนไซม์ปริมาณ 60 และ 80 FPU/g substrate จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 34 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากยอดและใบอ้อยขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

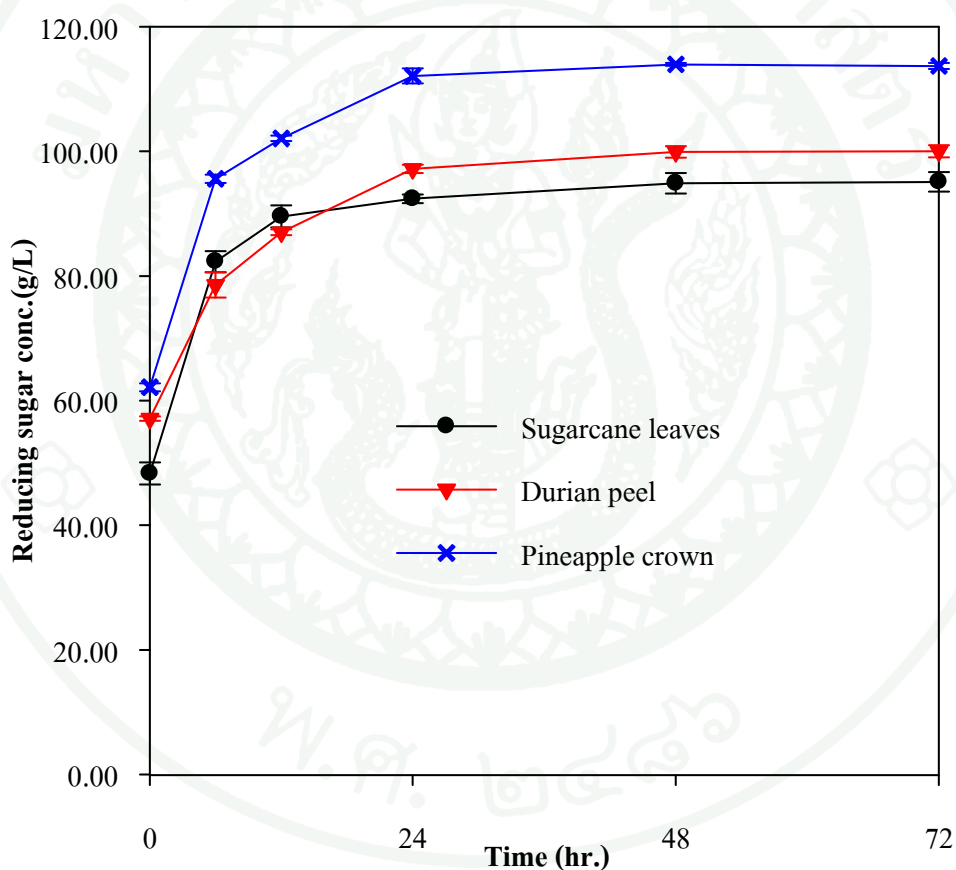


ภาพที่ 35 ประสิทธิภาพการย่อยโฮโลเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำยอดและใบอ้อยที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate

ดังนั้นจากการหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ส่วตฤดบที่ง 3 ชนิด ที่มีขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ปริมาณ 20g/100mL ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลที่ได้ ประสิทธิภาพการย่อยโฮโลเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ พบว่า ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) 60 FPU/g substrate เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของวัสดุที่ที่เหมาะสมสำหรับให้ผลผลิตน้ำตาลและการผลิตเอทานอล โดยการไฮโดรไลซ์ส่วตฤดบที่ง 3 ชนิดด้วยปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) 60 FPU/g substrate จากการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าวัสดุที่ง 3 ชนิดให้ผลผลิตน้ำตาลปริมาณที่แตกต่างกัน

กันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่ 72 ชั่วโมง จุกสับประดจะให้ผลผลิตน้ำตาลปริมาณ 113.70 ± 0.47 กรัมต่อลิตร เปลือกทุเรียน 100.01 ± 0.99 กรัมต่อลิตร และยอดและใบอ้อย 95.09 ± 1.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลจากจุกสับประดามีมากที่สุดเนื่องจากจุกสับประดามีปริมาณลิกนินที่น้อยสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเปลือกทุเรียนและยอดและใบอ้อย และลักษณะทางกายภาพของจุกสับประดามีขนาดเล็กกว่าวัตถุดิบประเภทอื่น ทำให้สะดวกในการเตรียม ส่งผลให้ต้นทุนในการเตรียมจุกสับประดเพื่อผลิตเอทานอลต่ำลง จุกสับประดจึงเป็นวัตถุดิบที่ดีกว่าเปลือกทุเรียนและยอดและใบอ้อยในการผลิตเอทานอล จากเหตุผลข้างต้น จะเห็นว่าจุกสับประดมีข้อได้เปรียบในการนำมาผลิตเอทานอล และอาจจะส่งผลให้การผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงโดยใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ



ภาพที่ 36 จุกสับประด เปลือกทุเรียน และยอดและใบอ้อย ปริมาณ 20g/100mL ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการไฮโดรไลซิสต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate

ดังนั้นจากการศึกษาจึงสรุปว่า จุกสับประดปริมาณ 20g/100mL ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการไฮโดรไลซิสต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

4. ผลการศึกษาการลดพิษด้วยยังการหมักด้วยผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon)

การย่อยสลายองค์ประกอบของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดที่มีความเข้มข้นสูงสามารถที่จะเข้าทำลายพันธะภายในวัตถุดิบได้เร็วกว่าการใช้กรดความเข้มข้นต่ำ นอกจากนั้นความร้อนยังเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเร็วขึ้น แต่การใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงนี้ก็มีข้อจำกัดคือ ความเข้มข้นของกรดเป็นพิษ กัดกร่อน และก่อให้เกิดสารพิษยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ในการหมัก เช่น กรดอ่อน (weak acids) เฟอร์ฟูรอล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล และสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) Badal *et al.* (2005) กล่าวว่า ในการปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง พบว่า เมื่อใช้กรดที่มีความเข้มข้นและอุณหภูมิที่สูงจะเกิดสารพิษจำพวกเฟอร์ฟูรอล ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล สารประกอบฟีนอลลิก และกรดอะซิติก ซึ่งสารเหล่านี้มีผลทำให้ความเป็นกรดต่างของน้ำหมักลดลง และมีผลยับยั้งการทำงานของเซลล์ยีสต์ด้วย

ทั้งนี้จึงทำการกำจัดสารพิษ (detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ โดยถ่านกัมมันต์จะดูดซับสารพิษในระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสจุกสับประดซึ่งได้จากขั้นตอนการคัดเลือกวัตถุดิบและศึกษาสภาวะในการไฮโดรไลซิส โดยถ่านกัมมันต์ที่ใช้มีคุณสมบัติดังนี้ คือ ความชื้นร้อยละ 2.4 ความเป็นกรดต่าง (pH) 10.2 มีองค์ประกอบของไอโอดีน 951.1 มิลลิกรัมต่อกรัม ทั้งนี้โดยส่วนใหญ่มีขนาด 8-16 mesh (2.38-4.76 มิลลิเมตร) ร้อยละ 94.2 ขนาดมากกว่า 16 mesh (4.76 มิลลิเมตร) ร้อยละ 3.6 และขนาดน้อยกว่า 8 mesh (2.38 มิลลิเมตร) ร้อยละ 2.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

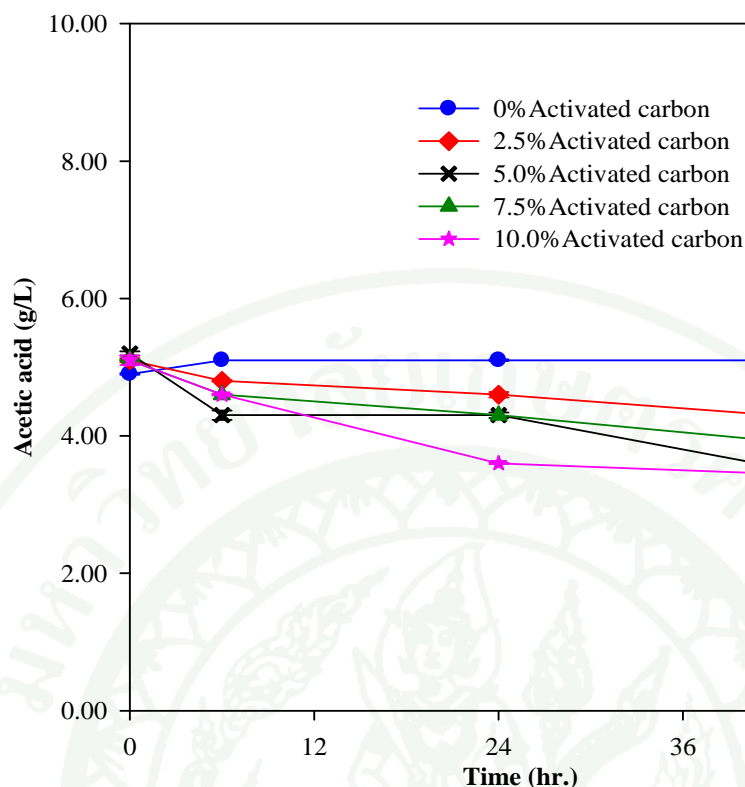
ตารางที่ 9 คุณลักษณะถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในกระบวนการลดพิษ (detoxification)

คุณลักษณะของผงถ่านกัมมันต์ (parameter of activated carbon)						
Moisture	pH	ASH	IODINE	< 8 mesh	8-16 mesh	> 16 mesh
(%)		(%)	(mg./g.)	(%)	(%)	(%)
2.4	10.2	2.1	951.1	2.2	94.2	3.6

จากการศึกษาการลดสารพิษ (detoxification) ในขั้นตอนการย่อยสลาย (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ โดยการเติมผงถ่านที่ผ่านการเตรียมร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นเกิดจากกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตร ซึ่งกรดอะซิติกส่วนใหญ่เกิดจากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสกลูโคซิลโรโนไซเลน (hemicelluloses glucuronoxylan) ซึ่งมีหมู่อะซิทิล (ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของกลูโคซิลโรโนไซเลน) ซึ่งจากงานวิจัยของ Narendranath *et al.* (2001) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกในสารละลายเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต (specific growth rate; μ) ของเชื้อ *S. cerevisiae* จะลดลงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล ($R^2 > 0.9$) และความเข้มข้นของกรดอะซิติกมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยทำให้การเจริญเติบโตในช่วง Lag phase ยาวนานขึ้นตามความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่มีอยู่ ปริมาณความเข้มข้นประมาณ 0.50 กรัมต่อลิตร มีผลลดการเจริญและลดอัตราการใช้กลูโคสในกระบวนการผลิตเอทานอลของเซลล์ยีสต์ ทั้งนี้กรดอะซิติกในปริมาณที่สูงจะทำให้สารละลายมีค่า pKa สูง กรดอะซิติกที่อยู่ในรูปแบบที่ไม่แตกตัวจะเข้าทางเซลล์ผ่านเซลล์เมมเบรนแล้วจะเกิดการแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออน (H^+) เป็นสาเหตุให้มีการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมในเซลล์ เซลล์จะทำการปล่อยโปรตอน โดยการใช้ ATP ด้วย ATPase

จากการศึกษาสถานะที่มีการเติมผงถ่านระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิส พบว่าการเติมผงถ่านร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้ปริมาณกรดอะซิติกลดลง ในขณะที่สารละลายที่ไม่ได้ลดพิษหรือไม่เติมผงถ่านไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติก ทั้งนี้ปริมาณกรดอะซิติกที่ลดลงแปรผัน โดยตรงกับปริมาณผงถ่านกัมมันต์ที่เติมลงไป โดยชั่วโมงที่ 72 สารละลายที่ได้การเติมผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 4.20 ± 0.03 , 3.30 ± 0.04 , 3.80 ± 0.07 และ 3.40 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 37) มีการลดลงของเท่ากับร้อยละ 17.65, 36.54, 25.49 และ 33.34 ตามลำดับ ทุกสถานะมีอัตราการลดลงสูงสุดใน 6 ชั่วโมงแรก ซึ่งอัตราการลดลงสูงสุดเกิดขึ้นในสถานะที่มีการเติมผงถ่าน

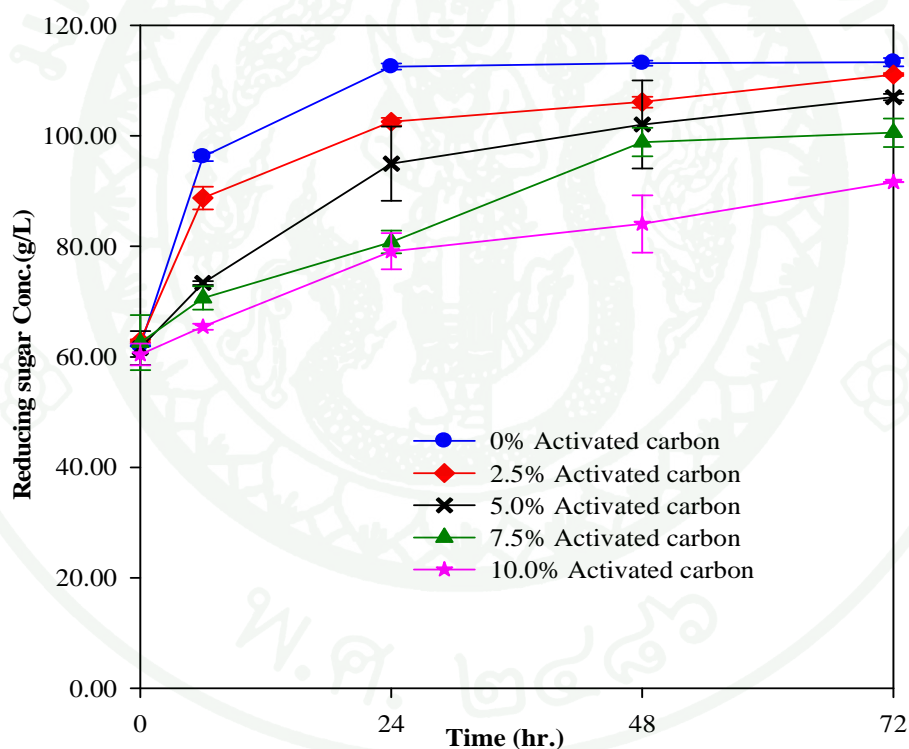
ร้อยละ 5.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 0.038 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง(ตารางที่ภาคผนวกที่ 11) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lee *et al.* (2011) พบว่า การย่อยสลายไม้เนื้อแข็งด้วยกรดซัลฟิวริก เข้มข้นร้อยละ 3.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จะทำให้เกิดกรดอะซิติก 5.79 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ผลของการดูดซับกรดอะซิติกด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 2.5 และ 5.0 สามารถดูดซับกรดอะซิติกได้ร้อยละ 14 และ 25 ตามลำดับ การดูดซับกรดอะซิติกของผงถ่านยังสามารถที่จะใช้เป็นดัชนีที่ดีในการดูดซับเฟอร์ฟูรอลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล แต่อย่างไรก็ตามปริมาณการดูดซับขึ้นอยู่กับปริมาณถ่านกัมมันต์ที่ใช้ ทั้งนี้ไอโซเทอมการดูดซับของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลและเฟอร์ฟูรอลความเข้มข้นจะเพิ่มสูงขึ้นและอิ่มตัว ในขณะที่ไอโซเทอมการดูดซับของกรดอะซิติกแสดงพฤติกรรมที่แตกต่างเมื่อเทียบกับซับไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลและเฟอร์ฟูรอล ซึ่งผลของการดูดซับไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลและเฟอร์ฟูรอลจะสูงกว่าการดูดซับกรดอะซิติก



ภาพที่ 37 ปริมาณกรดอะซิติกในจุกสับประดระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลที่ได้ระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) พบว่าปริมาณน้ำตาลลดลง ในขณะที่สารละลายที่ไม่ได้ลดพิษไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lee *et al.* (2011) พบว่า ถ่านกัมมันต์มีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับกรดอะซิติก เฟอร์ฟูรอล ไฮดรอกซีเมทิล เฟอร์ฟูรอล และสารพิษตัวอื่นๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลายด้วยกรดได้ แต่ก็ยังคงมีปริมาณน้ำตาลบางส่วนที่ถูกดูดซับด้วยผงถ่านเช่นกัน ซึ่งมีรายงานตั้งแต่ร้อยละ 1-30 ซึ่งขึ้นอยู่กับกระบวนการ ปริมาณผงถ่าน และระยะเวลา ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณผงถ่านเป็นผลให้ปริมาณน้ำตาลที่ถูกดูดซับจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน

ทั้งนี้จากผลการทดลองปริมาณน้ำตาลที่ถูกดูดซับแปรผัน โดยตรงกับปริมาณผงถ่านกัมมันต์ที่เติมลงไป การเติมผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้ชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณน้ำตาลที่ได้เท่ากับ 113.34 ± 0.77 , 111.10 ± 0.26 , 107.00 ± 0.57 , 100.57 ± 2.57 และ 91.63 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 38) ในสารละลายที่มีการเติมผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จะเห็นได้ว่าการลดลงของผลผลิตน้ำตาล ซึ่งลดลงเท่ากับร้อยละ 1.98, 5.59, 11.27 และ 19.15 ตามลำดับ ทั้งนี้มีอัตราการลดลงเท่ากับ 0.46, 1.21, 1.51 และ 1.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ทุกสภาวะมีอัตราการลดลงสูงสุดใน 6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) สูงสุดในสภาวะที่มีการเติมผงถ่านร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ 5.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณการลดลงของน้ำตาลร้อยละ 31.99 (ตารางที่ภาคผนวกที่ 13)



ภาพที่ 38 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในจุดสับประคที่ได้อัตราการลดพิษ (detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พร้อมกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 10 อัตราการลดลงของปริมาณน้ำตาลในกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification)

ปริมาณผงถ่านกัมมันต์ (w/v)	$-Q_{RS}$ (g/L/h)
2.5% Activated carbon	0.46
5.0% Activated carbon	1.21
7.5% Activated carbon	1.51
10.0% Activated carbon	1.86

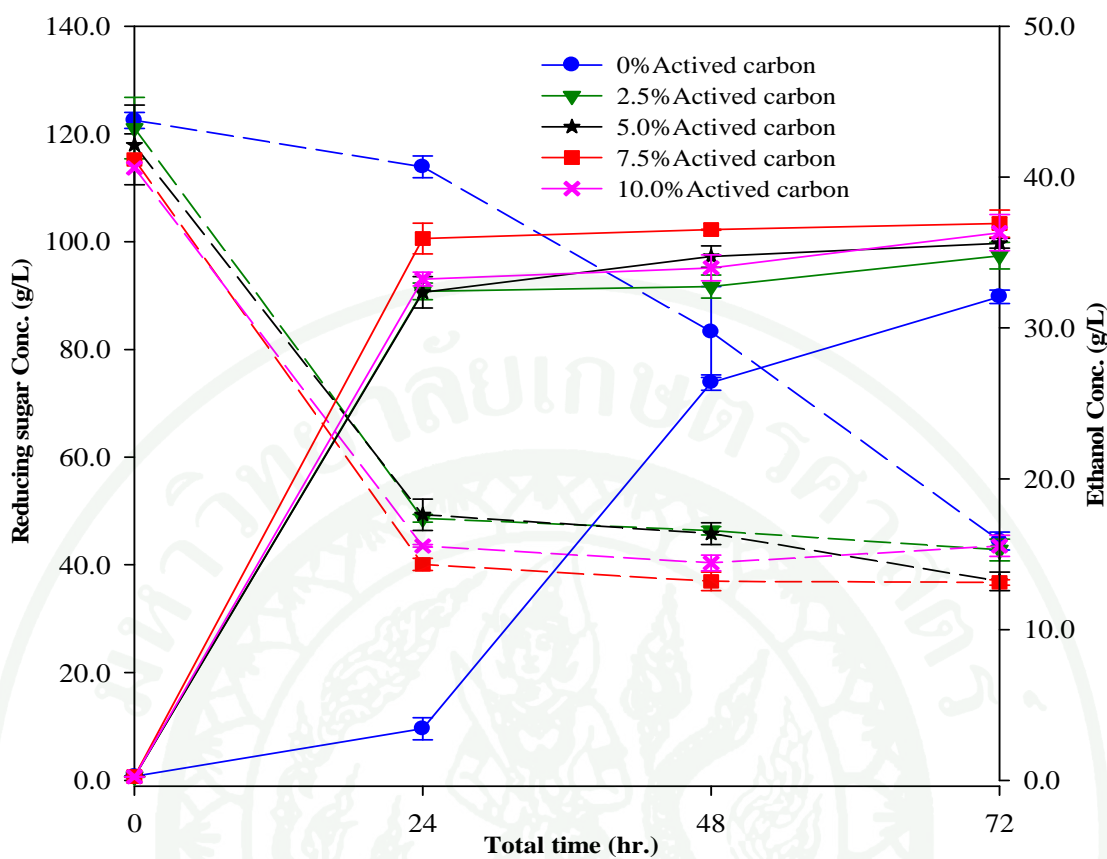
หมายเหตุ $-Q_{RS}$ = อัตราการลดลงของน้ำตาล (rate of reducing sugar loss)

จากการศึกษาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสม (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 กรัมต่อ 20 กรัมจุกสับปะรด) ในการลดพิษ ระหว่างการย่อยสลายจุกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด ผลปรากฏว่า สารละลายที่ผ่านการลดพิษด้วยผงถ่านที่ปริมาณต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะซิติก และน้ำตาล ทั้งนี้วิธีการลดพิษด้วยถ่านกัมมันต์ถือว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการกำจัดสารพิษมากกว่าวิธีอื่นๆ ดังเช่นวิธีการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ Laccase และ Peroxidase จากเชื้อรา *Trametes versicolor* สามารถออกซิไดส์สารพอลิเมอร์กลุ่มฟีนอลได้ ทำให้อัตราการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นแต่เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะทำให้สามารถกำจัดสารยับยั้งได้เฉพาะ เช่น การลดพิษโดยใช้เอนไซม์ Laccase สามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ แต่ไม่มีผลต่อการกำจัดสารฟูแรนและกรดอะซิติก หรือวิธีการปรับความเป็นกรด่าง ไม่ว่าจะปรับให้เป็นกลาง (neutralization) หรือการปรับให้สูงมากๆ (over-liming) วิธีนี้จะไม่สามารถกำจัดกรดอะซิติกได้ และถึงแม้ว่าวิธีการ Ion-exchange resin จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารยับยั้ง แต่ด้วยต้นทุนที่สูง อาจจะมีความเป็นไปได้ยากในระดับอุตสาหกรรม

เมื่อทำการหมักสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายจุกสับปะรดที่มีการลดพิษด้วยผงถ่านกัมมันต์ในปริมาณต่างๆ กับ *S. cerevisiae* TISTR 5596 ปริมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสม (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 กรัมต่อ 20 กรัมจุกสับปะรด) ในการลดพิษ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลจะลดลง ในช่วงเวลาที่ 24 ของการหมักสารละลายที่เติมผงถ่านร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มีน้ำตาลเหลืออยู่ 113.88 ± 2.00 , 48.64 ± 0.72 , 49.31 ± 2.92 , 40.07 ± 1.13 และ 43.52 ± 0.24 กรัมต่อลิตร ในส่วนของปริมาณเอทานอลเท่ากับ 3.43 ± 0.73 , 32.41 ± 0.56 , 32.36 ± 1.03 , 35.92 ± 1.01 และ 33.23 ± 0.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการใช้ผงถ่าน

ปริมาณร้อยละ 10.0 ในการลดพิษ เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วและสูงกว่าการใช้ผงถ่าน ร้อยละ 2.5-7.5 (ภาพที่ 39) และการเติมผงถ่านเชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วและสูงกว่าการ ไม่เติมผงถ่าน เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของถ่านกัมมันต์ (concentration of activated carbon) เพิ่มขึ้นพื้นที่ผิวจะเพิ่มขึ้นซึ่งทำให้ความสามารถในการดูดซับเพิ่มขึ้นด้วยและเมื่อผงถ่านที่ใช้มี ปริมาณน้อย อาจทำให้ดูดซับสารยับยั้งได้น้อยและยังคงเหลือปริมาณสารยับยั้งอยู่ในสารละลาย บางส่วน ทำให้เชื้อเจริญได้ไม่เต็มที่ในช่วงแรกของการหมัก (Mussatto and Roberto, 2004) และ จากการศึกษานี้ของ Kamal *et al.* (2011) พบว่า เมื่อทำการลดพิษสารยับยั้งการหมักด้วยการเติม ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (powder activated charcoal) ร้อยละ 1.0 และ 2.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมกับไฮโดรไลเซสที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสต้นสาธู การใช้ผงถ่านร้อยละ 2.5 จะลด ปริมาณสารพิษได้สูงกว่าการใช้ผงถ่านร้อยละ 1.0 ซึ่งทำให้ปริมาณเฟอร์ฟูรอลลดลงร้อยละ 53 และ สารประกอบฟีนอลลดลงร้อยละ 78 เมื่อทำการหมักสารละลายที่ได้ต่อด้วย *C. Tropicalis* มีการเพิ่ม specific growth rate สูงถึง 1.179 กรัมเซลล์ต่อวัตุดิบ

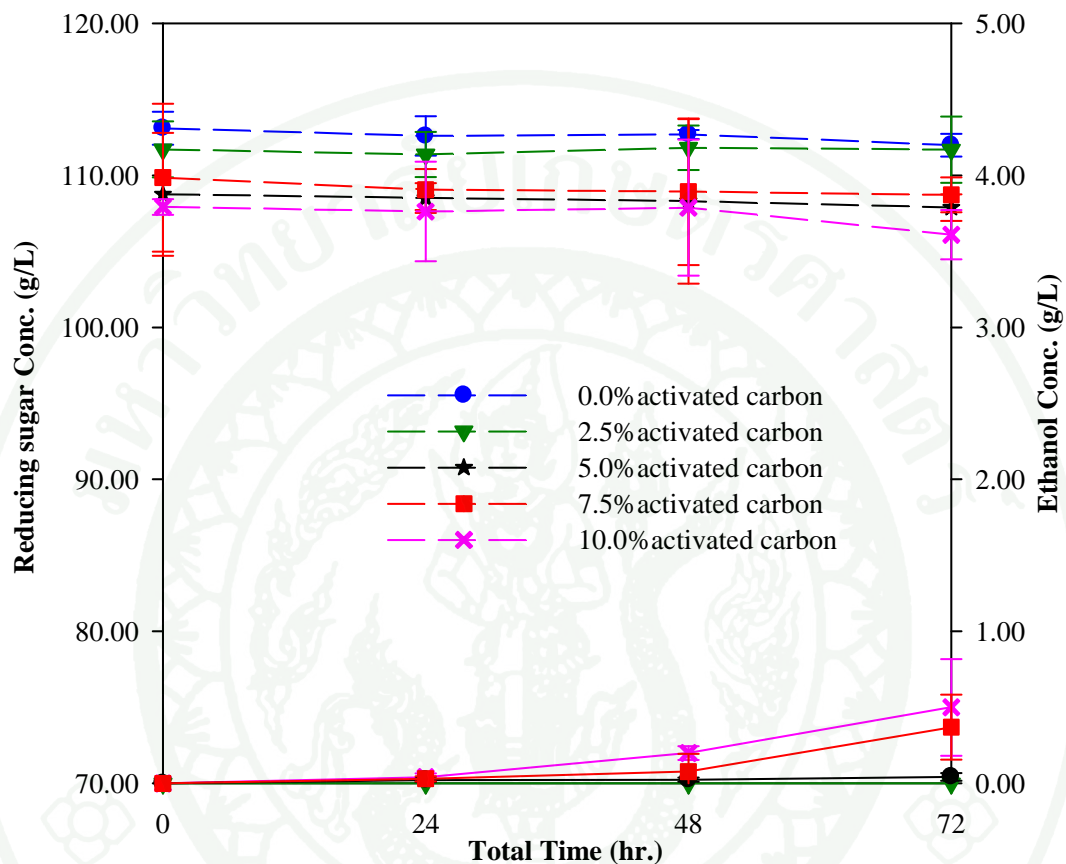
ทั้งนี้ปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักใน ชั่วโมงที่ 72 ปริมาณเอทานอลที่มีการเติมผงถ่านกัมมันต์ในปริมาณต่างๆ (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 กรัม ต่อ 20 กรัมจุกสับประด) เท่ากับ 32.06 ± 0.44 , 34.78 ± 0.88 , 35.61 ± 0.33 , 36.91 ± 0.91 และ 36.31 ± 1.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 44.44 ± 1.65 , 42.77 ± 2.02 , 36.95 ± 1.7 , 36.75 ± 0.53 และ 43.52 ± 1.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณเอทานอลสูงสุดในการเติมผงถ่าน ร้อย ละ 7.5 เท่ากับ 36.91 ± 0.91 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 39) เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมักพบว่าปริมาณเอทานอลก่อนข้างคงที่ ค่าผลผลิตสุทธิ (Yp/s) เท่ากับ 253.94 กิโลกรัมต่อตัน (น้ำหนักแห้ง)



ภาพที่ 39 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (-----) และเอทานอล (—) จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5596

เมื่อทำการหมักสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายจุลชีพประดที่มีกรดเดมฟงถ่านในปริมาณต่างๆ กับ *P. stipitis* TISTR 5806 ปริมาณ 1.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยกลูโคส 5 สามารถเจริญได้ พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าน้อยมาก สารละลายที่ไม่เติมผงถ่านและที่เติมผงถ่านร้อยละ 2.5 กรัมต่อ 20 กรัมจุลชีพประด ไม่มีการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลเลย โดยเชื้อเริ่มที่จะผลิตเอทานอลในสารละลายที่เติมผงถ่านร้อยละ 7.5 และ 10.0 กรัมต่อ 20 กรัมจุลชีพประด เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจนถึงสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีน้ำตาลเหลืออยู่ 107.88 ± 0.87 , 108.72 ± 1.15 และ 106.10 ± 1.62 กรัมต่อลิตร ในส่วนของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.043 ± 0.025 , 0.37 ± 0.21 และ 0.50 ± 0.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 40) ค่าผลผลิตสุทธิ (Yp/s) เท่ากับ 3.44 กิโลกรัมต่อตัน (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้มีน้อยมากเมื่อเทียบกับด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังคงมีปริมาณสารพิษสูงเกินไปเนื่องจากความ

เข้มข้นของกรดที่ใช้ในการปรับสภาพอาจจะสูง ซึ่งทำให้เชื้อ sensitive ต่อสารพิษและไม่สามารถเจริญได้



ภาพที่ 40 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (-----) และเอทานอล (—) จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วย *P. stipitis* TISTR 5806

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการหมักสารละลายที่ไม่ได้ลดพิษ (non-detoxification) กับสารละลายที่มีการลดพิษ (detoxification) ในสารละลายที่มีการลดพิษจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า (high yield) และมีอัตราการผลิตสูงกว่า (high productivity) บ่งชี้ได้ว่าในสารละลายที่ได้จากการเตรียม (pretreatment) หรือการย่อย (hydrolysis) จะมีสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทำให้การเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลหยุดชะงัก แต่เมื่อกำจัดสารยับยั้งออกไปเชื้อจุลินทรีย์สามารถที่จะเจริญ

และผลิตเอทานอลได้ ดังนั้นการการลดพิษ (detoxification) จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการทำให้สารละลายที่ได้มีความเหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

วัตถุดิบที่ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีขนาดตะแกรง 2.0 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่ประกอบด้วยไฮโลเซลลูโลส (เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส) ซึ่งจุกสับประดามี ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นน้ำตาลอิสระที่ละลายได้สูงที่สุด 30.81 ± 6.51 กรัมต่อลิตร รองลงมา ได้แก่ เปลือกทุเรียน 15.77 ± 1.22 กรัมต่อลิตร และยอดและใบอ้อย 2.01 ± 0.60 กรัมต่อลิตร

การหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ส่ววัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด ที่มีขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ปริมาณ 20 กรัม/100มิลลิลิตร ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลที่ได้ ประสิทธิภาพการย่อยไฮโลเซลลูโลส และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ พบว่า ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) 60 FPU/g substrate เป็นปริมาณที่เหมาะสมมากที่สุดในการไฮโดรไลซ์ส่ววัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด ซึ่งให้ปริมาณผลผลิตน้ำตาลระหว่างการย่อยสลายค่อยๆ เพิ่มขึ้นและเสถียรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป การใช้เอนไซม์ 60 FPU/g substrate ในจุกสับประด้าให้น้ำตาลสูงสุด 113.70 ± 0.47 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพการย่อยไฮโลเซลลูโลสเท่ากับ ร้อยละ 94.91 ± 0.54

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับให้ผลผลิตน้ำตาลและการผลิตเอทานอลโดยการไฮโดรไลซ์ส่ววัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดด้วยปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) 60 FPU/g substrate จากการวิเคราะห์วัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดให้ผลผลิตน้ำตาลปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่ 72 ชั่วโมง จุกสับประด้าให้ผลผลิตน้ำตาลปริมาณ 113.70 ± 0.47 กรัมต่อลิตร เปลือกทุเรียน 100.01 ± 0.99 กรัมต่อลิตร และยอดและใบอ้อย 95.09 ± 1.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจากการศึกษาจึงสรุปว่า จุกสับประด้าปริมาณ 20g/100mL ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการไฮโดรไลซ์ส่วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

การกำจัดสารพิษ (detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์โดยการดูดซับกรดอะซิติกด้วยถ่านกัมมันต์ทำให้ปริมาณกรดอะซิติกลดลงในขณะที่สารละลายที่ไม่ได้ลดพิษหรือไม่เติมผงถ่านไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะซิติก ทั้งนี้ปริมาณกรดอะซิติกที่ลดลงแปรผัน โดยตรงกับปริมาณผง

ถ่านกัมมันต์ที่เติมลงไป การดูดซับกรดอะซิติกด้วยผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณการลดลงสูงสุดร้อยละ 36.54 ซึ่งอัตราการลดลงสูงสุดใน 6 ชั่วโมงแรก เท่ากับ 0.038 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และพบว่าปริมาณน้ำตาลลดลงในระหว่างการลดพิษด้วย ทั้งนี้ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงแปรผันโดยตรงกับปริมาณผงถ่านกัมมันต์ที่เติมลงไปเช่นกัน ในสารละลายที่มีการเติมผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีการลดลงของผลผลิตน้ำตาลร้อยละ 19.15 อัตราการลดลงสูงสุดของปริมาณน้ำตาลใน 6 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 5.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

จากการศึกษาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสม (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 กรัมต่อ 20 กรัมจุกสับประรด) ในการลดพิษ ระหว่างการย่อยสลายจุกสับประรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดผลปรากฏว่า สารละลายที่ผ่านการลดพิษด้วยผงถ่านที่ปริมาณต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะซิติกและน้ำตาล ทั้งนี้วิธีการลดพิษด้วยถ่านกัมมันต์ถือว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการกำจัดสารพิษมากกว่าวิธีอื่นๆ

เมื่อทำการหมักสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายจุกสับประรดที่มีการเติมผงถ่านในปริมาณต่างๆ กับ *S.cerevisiae* TISTR 5596 ปริมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การเติมผงถ่านเชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วและสูงกว่าการไม่เติมผงถ่าน ทั้งนี้ปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณเอทานอลสูงสุดในการเติมผงถ่านร้อยละ 7.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 36.91 ± 0.91 กรัมต่อลิตร ค่าผลผลิตสุทธิ (Y_p/s) เท่ากับ 253.94 กิโลกรัมต่อตัน (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งสูงกว่าปริมาณเอทานอลจากสารละลายที่ไม่ได้ลดพิษร้อยละ 10.41

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการหมักสารละลายที่ไม่ได้ลดพิษ (non-detoxification) กับสารละลายที่มีการลดพิษ (detoxification) ในสารละลายที่มีการลดพิษจะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า (high yield) และมีอัตราการผลิตสูงกว่า (high productivity) บ่งชี้ได้ว่าในสารละลายที่ได้จากการเตรียม (pretreatment) หรือการย่อย (hydrolysis) จะมีสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทำให้การเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลหยุดชะงัก แต่เมื่อกำจัดสารยับยั้งออกไปเชื้อจุลินทรีย์สามารถที่จะเจริญและผลิตเอทานอลได้ ดังนั้นการลดพิษ (detoxification) จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการทำให้สารละลายที่ได้มีความเหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์

ข้อเสนอแนะ

ในการปรับสภาพ (pretreatment) โดยใช้กรดซัลฟิวริกร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อาจจะทำให้เกิดสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจนทำให้เชื้อที่ sensitive บางชนิดไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งอาจจะลดความเข้มข้นกรดที่ใช้ในการปรับสภาพ เพื่อให้จุลินทรีย์ที่ sensitive ที่สามารถย่อยน้ำตาล C5 สามารถเจริญได้

ปริมาณเอทานอลที่หมักจากสารละลายที่มีการลดพิษ พบว่าสูงกว่าปริมาณเอทานอลจากสารละลายที่ไม่ได้ลดพิษร้อยละ 10.41 แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาค่าต้นทุนในการผลิตจากน้ำตาล (ราคาอ้างอิงประเทศไทย 2556) กับต้นทุนในการผลิตที่มีการลดพิษ (ผงถ่านที่ใช้ร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าต้นทุนในการผลิตเอทานอลที่มีการลดพิษจะสูงกว่าถึงการผลิตเอทานอลที่ไม่มีการลดพิษถึงร้อยละ 33.31 ดังนั้นอาจจะมีการสรรหาหรือใช้วัสดุชนิดอื่นเข้ามาแทนที่การใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการลดพิษ

ทั้งนี้หากพิจารณาในระดับอุตสาหกรรมการนำวัตถุดิบเข้าสู่โรงงาน เกษตรกรต้องมีการตากแดดหรือลดความชื้นในวัตถุดิบก่อน โดยในการจัดซื้อวัตถุดิบจะคำนึงถึงหลักเกณฑ์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องตั้งแต่แหล่งที่มา ความสอดคล้องด้านนโยบายในการดำเนินธุรกิจทางสังคมและสิ่งแวดล้อม และต้นทุนที่สามารถแข่งขันได้ในอุตสาหกรรม เพื่อเป็นการสนับสนุนเกษตรกรภายในท้องถิ่นและประหยัดในเรื่องต้นทุนการขนส่งวัตถุดิบ ทั้งนี้ถ้าราคาวัตถุดิบที่ใช้เฉลี่ยราคาประมาณกิโลกรัมละ 2.13 บาท (คำนวณเทียบที่ราคาหัวมันสำปะหลัง) ซึ่งจะเป็นราคาที่ทำให้มีต้นทุนในการผลิตเอทานอลประมาณ 21.87 บาทต่อลิตร

น้ำเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล อาจนำไปผลิตก๊าซชีวภาพโดยหมักด้วยกระบวนการ Anaerobic Digester ให้เกิดเป็นก๊าซมีเทนซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ได้ และสามารถกำจัดปัญหากลิ่นเหม็นได้ไปในตัว ทั้งนี้อาจนำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตเมื่อผ่านการบำบัดแล้วไปปลูกพืชบางชนิด เนื่องจากน้ำเสียที่บำบัดได้อาจมีธาตุอาหารบางอย่างที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเป็นการสร้างสภาพสิ่งแวดล้อมที่ดี นอกจากนี้ผงถ่านและเศษวัตถุดิบที่เหลือจากการผลิต อาจจะนำมาหมักเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยหมักชีวภาพ นำไปใช้ในการปรับปรุงสภาพดิน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรองกาญจน์ ภูระรัตน์. 2530. การศึกษาประสิทธิภาพของการกำจัดพาราควอตโดยวิธีตกตะกอนด้วยสารเคมีและการดูดซับด้วยถ่าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กลุ่มน้ำตาล เค 10. 2552. โรคใบขาวอ้อย. แหล่งที่มา: <http://www.korachindustry.co.th>, 13 ตุลาคม 2555.

จิราพรรณ คล้ายกิจจา. 2548. สับปะรด. พิมพ์ครั้งที่ 2 เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ.

ณัตติยา จันทวงษา. 2553. การพัฒนาการแปรรูปทุเรียนและเปลือกกล้วยน้ำว้าเป็นน้ำตาลสำหรับการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

พัชรี บุญศิริ, ปิติ ชูจิตต์, เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์ และอุบล ชำอ่อน. 2551. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 5 โรงพิมพ์คลังนานวิทยา, ขอนแก่น.

เพ็ญพิชา เตียว. 2552. กระถางเปลือกทุเรียน สลายเป็นปุ๋ยชีวภาพ ลดภาวะโลกร้อน. แหล่งที่มา: <http://www.thairath.co.th/column/eco/capable/33728>, 13 ตุลาคม 2555.

ประเวศ ต้อยเต็มวงศ์, จีรศักดิ์ คงเกียรติขจร, ปิยรัตน์ บุญแสวง และธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2552. การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ยุทธศักดิ์ สุขการี. 2551. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยวิธี **Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ละอองดาว แสงห่อ และรัชชชัย ศุภดิษฐ์. 2548. ผลกระทบจากการเผาใบอ้อยและแนวทางการแก้ไข. **THAI JOURNAL OF ENVIROMENTAL MANAGEMENT NIDA THAILAND 2 (1): 85-102.**

วรวรรณ สังกแก้ว. 2554. การแปรรูปเปลือกทุเรียนเป็นวัสดุเชื้อเพลิง: การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะคุณภาพ ต้นทุนการผลิต และความคิดเห็นของผู้ใช้ถ่านที่ผลิตจากเปลือกทุเรียน และเปลือกทุเรียนผสมผงถ่านและขี้เลื่อย. **Research Journal of Pibulsongkram Rajabhat University** 7 (13): 51-59.

วิจิตร วังใน. 2545. **สับปะรด พืชอุตสาหกรรม**. พิมพ์ครั้งที่ 1 เจริญรัตน์การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ศิราวุธ สาระขัน. 2553. การศึกษาแนวทางที่เหมาะสมในการผลิตและใช้เชื้อเพลิงชีวมวลจากใบอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมศักดิ์ วรรณศิริ. 2530. **ทุเรียน**. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. **ผลผลิตทางการเกษตร**. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th>, 12 สิงหาคม 2556.

อนันท์ เชาว์เครือ, ญาณิกา ไหละครบุรี, โชติรส คุณมี, ชวันรศ สันทอง และสุภาวดี จิมทอง. 2557. การประเมินคุณค่าทางโภชนาการและคาร์โบไฮเดรตในรูปน้ำตาลที่ละลายได้ของเศษเหลือจากสับปะรด. **แก่นเกษตร** 42 (1): 301-306.

อริศรา พุ่มคชา. 2539. การศึกษาสารดูดซับร่วมกับสารส้มในการกำจัดสีโรงงานฟอกย้อมสิ่งทอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

Bakker, R.R.C., L.L.M. Bermúdez, P.F.H. Harmsen and W.J.J. Huijgen. 2010. **Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass**. Energy research centre, Naterlands.

Badal, C.S., B.I. Loren, A.C. Michael and Y.V. Wu. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochem.** 40: 3693-3700.

- Bhat, M.K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol Adv.** 15: 583-620.
- Bisaria, V.S. and T.K. Ghose. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrate, microorganism, enzyme and product. **Enzyme and Microbial technology** 3 (2): 90-140.
- Bower, S., R. Wikramasinghe, N.J. Nagle and D.J., Schell. 2008. Modelling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid and solutions at pretreatment condition for lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** 99 (15): 7354-7362.
- Chaiyamate, P. 2011. **Production of Cellulosic Ethanol from Durian and Pineapple Peel by *Saccharomyces cerevisiae* via Batch Fermentation.** M.E. Thesis, Khon Kean University.
- Cheese Science. 2011. **Biochemistry is Your Friend. For Reals.** Available Source: <http://www.cheesescience.com/2011/09/16/biochemistry-is-your-friend/>, January 13, 2014.
- Fan, L.T., M.M. Gharpuray and Y.H. Lee. 1987. Cellulose hydrolysis. **Berlin Heidelberg: Springer-Verlag** 5-174.
- Foo, K.Y. and B.H. Hameed. 2011. Transformation of durian biomass into a highly valuable end commodity: trends and opportunities. **Biomass and Bioenergy** 35: 2470-2478.
- Giannattasio, S.,N., Guaragnella, M. Zdravlevic and E. Marra. 2013. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontier in Microbiology** 4 (33): 1-7.
- Han, M., K.E. Kang, Y. Kim and G.W. Choi. 2013. High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. **Process Biochemistry** 48: 488–495.

- Hsu, T.A., M.R. Ladisch and G.T. Tsao. 1980. Alcohol from cellulose. **Chem. Technol** 10 (5), 315–319.
- Jung, Y.H., I.J. Kim, H.K. Kim and K.H. Kim. 2013. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. **Bioresource Technology** 132: 109–114.
- Kamal, S.M.M., N.L. Mohamad, A.G.L. Abdullah and N. Abdullah. 2011. Detoxification of sago trunk hydrolysate using activated charcoal for xylitol production. **Procedia Food Science** 1: 908 – 913.
- Ketnawa, S., P. Chaiwutb and S. Rawdkuen. 2012. Pineapple wastes: a potential source for bromelain extraction. **Food and Bioproducts Processing** 90: 385–391.
- Kowsari, M. n.d. **Picture of Lignocelluloses Structure**. Available Source: <http://biofuel.webgarden.com>, September 30, 2013.
- Krishna, S.H., K.Prasanthi, G.V. Chowdary and C. Ayyanna. 1998. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. **Process Biochemistry**. 33 (8): 825-830.
- Lee, M.J., R.A. Venditti, H. Jameel and W.R. Kenealy. 2011. Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. **Biomass and Bioenergy**. 35: 626-636.
- Mawadza, C., R. Hatti-Kaul, R. Zvauya and B. Mattiasson. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnol.** 83: 177-187.
- Murphy J.D. and K. McCarthy. 2005. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. **Applied Energy** 82: 148–166.

- Mantanis, G.I., R.A. Young, and R.M. Rowell. 1995. Swelling of wood part III effect of temperature and extractives on rate and maximum swelling. **Holzforchung** 49 (3) : 239-248.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry** 31 (3): 426–428.
- Muller, Z. O. 1978. Feeding potential of pineapple waste for cattle. **World animal Review** 25:25-29.
- Mussatto, S.I. and I.C. Roberto. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology** 93: 1-10.
- Narendranath, N.V., K.C. Thomas and W.M. Ingledew. 2001. Effects of acetic and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in manimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 26:171-177.
- Nigam, j.n. 1999. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. **Journal of Biotechnology** 72: 197–202.
- Palmqvist, E. and B.H. Hagerdal. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology** 74: 25-33.
- Perez, M.G. 2008. **The Formation of Polyaromatic Hydrocarbons and Dioxins During Pyrolysis: A Review of the Literature with Descriptions of Biomass Composition, Fast Pyrolysis Technologies and Thermochemical Reactions.** Washington State University, 57 pages.

Posey, C.E. and D.W., Robinson. 1969. Extractives of shortleaf pine: an analysis of contributing factors and relationship. **TAPPI J.** 52: 110–115.

Ratanakhanokchai K., R. Waeonukul, P. Pason, C. Tachaapaikoon, K.L. Kyu, K. Sakka, A. Kosugi and Y. Mori. 2013. **Biomass Now - Cultivation and Utilization.** Miodrag Darko Matovic.

Stöhr, R. 1999. **Build-up and Mode of Action of Enzymes for the Textile Industry.**
Available Source: http://www.drpetry.de/artikel/artikel_1.html, December 2, 2009.

Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology** 83: 1–11.

Sundstrom, D.W. and H.B. Klei. 1979. **Wastewater Treatment.** Prentice hall, New Jersey.

Velden, M.V., J. Baeyens, A. Brems, B. Janssens and R. Dewil. 2010. Fundamentals kinetics and endothermicity of the biomass pyrolysis reaction. **Renewable energy** 35: 232-242.





ตารางผนวกที่ ก1 สัดส่วนขนาดและปริมาณของวัตถุดิบที่ผ่านการลดขนาดเครื่องสับไม้ (wood chopper) ที่มีขนาดตะแกรง 2.0 มิลลิเมตร

ขนาด	สัดส่วนวัตถุดิบ (%)		
	จุกสับประรด	เปลือกทุเรียน	ใบและยอดอ้อย
<0.84 mm	26	36	24
0.84-1.25 mm	20	15	22
1.25-2.00 mm	24	21	21
2.00-5.00 mm	24	22	21
5.00-10.0 mm	6	6	12

ตารางผนวกที่ ก2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการปรับสภาพจุกสับประรด เปลือกทุเรียน และยอดและใบอ้อย ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Feedstocks	Reducing Sugar	SD
Sugarcane leaves	49.0013	1.1423
Pineapple crown	61.8732	0.5877
Durian peel	56.8307	0.3583

ตารางผนวกที่ ก3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากจุดกลับประคบน้ำดันน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Time (hr.)	Reducing sugar conc. (g/L)									
	20FPU/g substrate	SD	30FPU/g substrate	SD	40FPU/g substrate	SD	60FPU/g substrate	SD	80FPU/g substrate	SD
0	62.6027	0.8561	61.0053	0.5598	61.7239	1.9117	62.1442	0.6489	61.8898	0.3849
6	65.4974	0.6744	66.4284	1.9379	85.8428	2.9825	95.5724	0.6505	97.5993	1.4339
12	69.5021	0.5946	71.4468	2.9238	92.5163	0.8116	102.0878	0.4485	101.4179	1.7431
24	81.1392	1.6075	91.6276	0.2558	102.7812	0.8664	112.0989	1.228	108.4362	0.8545
48	94.7597	0.9226	97.1636	1.7893	107.3104	4.5205	113.9611	0.2305	112.4442	0.9694
72	95.2621	0.758	97.8663	0.8845	107.6021	0.4168	113.6992	0.4726	112.7858	0.3443

ตารางผนวกที่ ก4 ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำจุกสับประรดที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการย่อยสลายต่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate

Time (hr.)	Holocellulose conversion (%)									
	20FPU/g substrate	SD	30FPU/g substrate	SD	40FPU/g substrate	SD	60FPU/g substrate	SD	80FPU/g substrate	SD
0	33.0757	0.8907	32.3432	0.5996	34.2549	2.1183	35.8778	0.743	35.9692	0.4455
6	36.0873	0.7016	38.1521	2.0758	60.9803	3.3048	74.1533	0.7448	77.2965	1.6595
12	40.2536	0.6186	43.5275	3.1318	67.0909	2.3132	81.6136	0.5136	81.7159	2.0173
24	53.1529	0.364	65.1439	0.274	79.7492	0.96	93.0763	1.4061	89.8383	0.9889
48	66.1908	0.5965	71.0737	1.9165	84.7679	5.009	95.2086	0.264	94.4768	1.1219
72	65.4573	0.5826	71.8264	0.9474	85.0911	0.4618	94.9087	0.5411	94.8722	0.3985

ตารางผนวกที่ ก5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากเปลือกทุเรียนขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Time (hr.)	Reducing sugar conc. (g/L)									
	20FPU/g substrate	SD	30FPU/g substrate	SD	40FPU/g substrate	SD	60FPU/g substrate	SD	80FPU/g substrate	SD
0	56.7177	0.2911	56.2586	0.2277	56.953	0.2327	57.1122	0.3624	57.4291	0.5842
6	59.4448	1.3256	60.1462	2.646	72.7736	0.5237	78.5643	2.0463	84.952	2.476
12	61.4943	1.0458	61.9656	4.8093	84.8661	3.1405	86.9972	0.4687	88.8755	2.464
24	73.6509	3.0558	74.1295	0.7103	89.2207	1.5122	97.1901	0.6866	95.248	0.4564
48	79.2338	3.1878	84.48	3.3384	90.2859	1.6941	99.908	0.9356	97.5946	0.6417
72	80.0137	3.2141	86.4301	3.7733	92.1968	2.1467	100.012	0.9888	97.9611	0.8441

ตารางผนวกที่ 6 ประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำเปลือกทุเรียนที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate

Time (hr.)	Holocellulose conversion (%)									
	20FPU/g substrate	SD	30FPU/g substrate	SD	40FPU/g substrate	SD	60FPU/g substrate	SD	80FPU/g substrate	SD
0	45.4018	0.3228	45.4402	0.2556	46.7764	0.2643	47.5162	0.4165	49.0071	0.6872
6	48.4255	1.4698	49.8032	1.7144	64.7457	0.5948	72.1719	2.3519	81.3845	2.9127
12	50.6979	1.1596	51.8452	5.3975	78.4806	3.5671	81.8642	0.5387	86	2.8986
24	64.1768	3.3882	65.4966	0.7972	83.4266	1.7176	93.5793	0.7892	93.4965	0.5369
48	70.367	3.5346	77.113	3.7467	84.6365	1.9241	96.7031	1.0753	96.5022	0.4073
72	71.2318	3.5637	79.3015	4.2348	86.8068	2.4383	96.8226	1.1365	96.6881	0.993

ตารางผนวกที่ ก7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากยอดและใบอ้อยขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Time (hr.)	Reducing sugar conc. (g/L)									
	20FPU/g substrate	SD	30FPU/g substrate	SD	40FPU/g substrate	SD	60FPU/g substrate	SD	80FPU/g substrate	SD
0	50.9699	0.6231	48.3122	1.2031	48.3992	1.9251	48.2903	1.7826	49.0348	0.7472
6	57.6023	3.2322	63.7536	1.7835	82.416	2.6598	82.2865	1.6757	87.3124	2.5017
12	59.8955	0.7355	65.3162	4.736	86.3567	0.4727	89.5412	1.7592	93.2497	1.4582
24	68.0576	1.113	72.0088	0.8124	88.5063	1.3773	92.382	0.6705	93.5853	0.1792
48	81.8648	2.4687	84.983	2.6326	91.7142	0.4467	94.8675	1.6288	95.5864	0.9505
72	82.4548	0.7452	84.9316	1.1044	91.2447	0.4688	95.0859	1.5665	95.874	0.2957

ตารางผนวกที่ ก8 ประสิทธิภาพการย่อยโฮโลเซลลูโลส (%Holocellulose conversion) จากการนำยอดและใบอ้อยที่ผ่านขั้นตอนการลดขนาด (ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) ที่เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 20, 30, 40, 60 และ 80 FPU/g substrate

Time (hr.)	Holocellulose conversion (%)									
	20FPU/g substrate	SD	30FPU/g substrate	SD	40FPU/g substrate	SD	60FPU/g substrate	SD	80FPU/g substrate	SD
0	32.801	0.4174	31.3942	0.5912	31.4532	1.3052	31.7529	1.223	32.2637	0.5127
6	35.8616	2.1654	41.8638	1.2093	54.5174	1.8034	55.0776	1.1497	58.5259	1.7164
12	38.779	0.4927	42.9233	2.2813	57.1893	0.3205	60.055	1.207	62.5994	1.0005
24	44.2489	0.5809	47.4611	0.5508	58.6468	0.9339	62.0041	0.46	62.8297	0.1230
48	53.4991	1.1909	56.2579	1.9865	60.8218	0.3029	63.7094	1.1175	64.2026	0.6521
72	53.8944	0.3589	56.2231	0.7195	60.5035	0.3179	63.8592	1.0748	64.4	0.2029

ตารางผนวกที่ 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในจุกสับประด เปลือกทุเรียน และยอดและใบอ่อน ปริมาณ 20g/100mL ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการไอโครไลซิสต่อด้วย เอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate

Time (hr.)	Reducing sugar conc.					
	sugarcane leaves (g/L)	SD	durian peel (g/L)	SD	pineapple crown (g/L)	SD
0	48.2903	1.7826	57.1122	0.3624	62.1442	0.6489
6	82.2865	1.6757	78.5643	2.0463	95.5724	0.6505
12	89.5412	1.7592	86.9972	0.4687	102.0878	0.4485
24	92.382	0.6705	97.1901	0.6866	112.0989	1.228
48	94.8675	1.6288	99.908	0.9356	113.9611	0.2305
72	95.0859	1.5665	100.012	0.9888	113.6992	0.4726

ตารางผนวกที่ ก10 ปริมาณกรดอะซิติกในจุกสับประครระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Time (hr.)	0% Activated carbon		2.5% Activated carbon		5.0% Activated carbon		7.5% Activated carbon		10.0% Activated carbon	
	acetic acid conc.	SD	acetic acid conc.	SD	acetic acid conc.	SD	acetic acid conc.	SD	acetic acid conc.	SD
0	4.9	0.01	5.1	0.03	5.2	0.03	5.1	0.01	5.1	0.07
6	5.1	0	4.8	0.01	4.3	0.07	4.6	0.01	4.6	0.01
24	5.1	0.01	4.6	0.04	4.3	0.04	4.3	0	3.6	0.01
48	5.1	0	4.2	0.03	3.3	0.04	3.8	0.07	3.4	0.02

ตารางผนวกที่ ก11 ปริมาณกรดอะซิติกในจุกสับประรดที่ลดลงระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

Time (hr.)	2.5% Activated carbon		5.0% Activated carbon		7.5% Activated carbon		10.0% Activated carbon	
	%acetic acid loss	rate of acetic acid loss (g/L/h)	%acetic acid loss	rate of acetic acid loss (g/L/h)	%acetic acid loss	rate of acetic acid loss (g/L/h)	%acetic acid loss	rate of acetic acid loss (g/L/h)
6	5.88	0.013	17.31	0.038	9.80	0.021	9.80	0.021
24	9.80	0.004	17.31	0.000	15.69	0.006	29.41	0.021
48	17.65	0.006	36.54	0.014	25.49	0.007	33.33	0.003
AVG		0.007		0.017		0.011		0.015

ตารางผนวกที่ ก12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในลูกสับประครระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellic[®] CTec2) ปริมาณ 60 FPU/g substrate ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เตรียมด้วยกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) เข้มข้นร้อยละ 2.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Time (hr.)	0% Activated carbon		2.5% Activated carbon		5.0% Activated carbon		7.5% Activated carbon		10.0% Activated carbon	
	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD
	conc.		conc.		conc.		conc.		conc.	
0	61.98	0.11	62.85	0.30	61.57	3.06	62.56	5.01	60.42	1.99
6	96.22	0.77	88.74	2.06	73.35	0.35	70.65	2.11	65.44	0.54
24	112.54	0.54	102.55	0.71	94.97	6.74	80.79	2.06	79.09	3.27
48	113.15	0.46	106.1	1.01	102.05	7.95	98.85	2.57	84.05	5.19
72	113.34	0.77	111.1	0.26	107.00	0.57	100.57	2.57	91.63	0.01

ตารางผนวกที่ ก13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในจุลสัปดาห์ที่ลดลงระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

Time (hr.)	2.5% Activated carbon		5.0% Activated carbon		7.5% Activated carbon		10.0% Activated carbon	
	%reducing sugar loss	rate of reducing sugar loss (g/L/h)	%reducing sugar loss	rate of reducing sugar loss (g/L/h)	%reducing sugar loss	rate of reducing sugar loss (g/L/h)	%reducing sugar loss	rate of reducing sugar loss (g/L/h)
6	7.77	1.246667	23.76845	3.811667	26.57452	4.261667	31.98919	5.13
24	8.88	0.41625	15.61223	0.732083	28.21219	1.322917	29.72277	1.39375
48	6.23	0.146875	9.809987	0.23125	12.63809	0.297917	25.71807	0.60625
72	1.98	0.031111	5.593789	0.088056	11.26698	0.177361	19.15476	0.301528
AVG		0.460226		1.215764		1.514965		1.857882

ตารางผนวกที่ ก14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5596

Time (hr.)	0% Activated carbon		2.5% Activated carbon		5.0% Activated carbon		7.5% Activated carbon		10.0% Activated carbon	
	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD
0	122.5079	1.4891	121.0831	5.6758	117.9547	7.395	115.2842	0	113.7014	0
24	113.881	2.0049	48.6364	0.7161	49.3078	2.9138	40.0747	1.1282	43.5159	0.2414
48	83.2439	8.4431	46.3428	0.7644	45.8026	2.0245	36.9327	1.7443	40.3581	1.4943
72	44.4364	1.6492	42.7715	2.02	36.9532	1.7169	36.7519	0.5276	43.5182	1.9759

ตารางผนวกที่ ก15 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5596

Time (hr.)	0% Activated carbon		2.5% Activated carbon		5.0% Activated carbon		7.5% Activated carbon		10.0% Activated carbon	
	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD
0	0.265	7.07E-03	0.2533	0.0115	0.2433	0.0252	0.25	0.01	0.24	0.01
24	3.425	0.7283	32.4067	0.5515	32.3567	1.0337	35.92	1.0136	33.2333	0.4565
48	26.365	0.5162	32.7367	0.7646	34.72	0.7051	36.505	0.0354	33.9733	0.8622
72	32.06	0.4384	34.78	0.8768	35.61	0.3297	36.91	0.9057	36.31	1.198

ตารางผนวกที่ ก16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วย *P. stipitis* TISTR 5806

Time (hr.)	0% Activated carbon		2.5% Activated carbon		5.0% Activated carbon		7.5% Activated carbon		10.0% Activated carbon	
	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD	reducing sugar	SD
0	113.1032	1.0866	111.7117	1.8364	108.7501	4.0429	109.8507	4.8622	107.9206	0.5163
24	112.5911	1.2996	111.3747	1.4844	108.5067	0.9772	109.0655	1.3569	107.6208	3.2767
48	112.6923	0.2896	111.8161	1.4716	108.2921	5.4012	108.9222	4.8295	107.8749	4.4773
72	111.989	0.7498	111.69	2.1873	107.878	0.8744	108.7163	1.1515	106.0975	1.6239

ตารางผนวกที่ ก17 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและการลดพิษ (Simultaneous Saccharification and Detoxification) ด้วยถ่านกัมมันต์ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย *P. stipitis* TISTR 5806

Time (hr.)	0% Activated carbon		2.5% Activated carbon		5.0% Activated carbon		7.5% Activated carbon		10% Activated carbon	
	ethanol	SD	ethanol	SD	ethanol	SD	ethanol	SD	ethanol	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0.022	0.0127	0.03	0.0173	0.041	0.0237
48	0	0	0	0	0.024	0.0139	0.078	0.1155	0.2	0.045
72	0	0	0	0	0.043	0.0248	0.37	0.2136	0.5	0.3175

ตารางผนวกที่ ก18 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการย่อยสลาย โดยใช้ Anova: Single Factor และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Groups	Count	Sum	Average	Variance
sugarcane leaves	6	502.453	83.742	323.937
Durian Peel	6	519.784	86.631	280.678
Pineapple crown	6	599.564	99.927	397.191

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	894.197	2	447.099	1.339	0.292	3.682
Within Groups	5009.029	15	333.935			
Total	5903.226	17				



1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth

ละลาย YM broth (อาหารสำเร็จรูป) 10.50 กรัม ต่อน้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร โดยในการทดลองจะใช้ YM broth ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร จึงเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มลงไป 30 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรสุดท้าย เทลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและกระดาษนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM slant

ละลาย YM broth (อาหารสำเร็จรูป) 10.50 กรัม ต่อน้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร และเติมวุ้น (agar) 20 กรัมต่อลิตร ละลายส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว หลอดละประมาณ 7 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมาวางเอียง (เพิ่มพื้นที่ผิวในหลอดเลี้ยงเชื้อ) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผิวหน้าอาหารแห้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM plate

ละลาย YM broth (อาหารสำเร็จรูป) 10.50 กรัม ต่อน้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร และเติมวุ้น (agar) 20 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายตามกำหนด ปิดด้วยจุกสำลีและกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาเทลง plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผิวหน้าอาหารแห้ง แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง

วิธีการเตรียม

1. คูณสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลอง
3. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
4. แช่หลอดทดลองในน้ำเย็น 10 นาที
5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1-1 กรัมต่อลิตร (Blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟิวในสารละลายตัวอย่าง สามารถคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง X อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน}}$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ใช้เครื่องวิเคราะห์ความชื้นรุ่น MX-50 ยี่ห้อ AND บริษัท A & D จำกัด (มหาชน) โดยใช้โหมด Standard ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส น้ำหนัก 5.0 กรัม ซึ่งให้หน่วยวัด %by weight

6. การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วย Haemocytometer

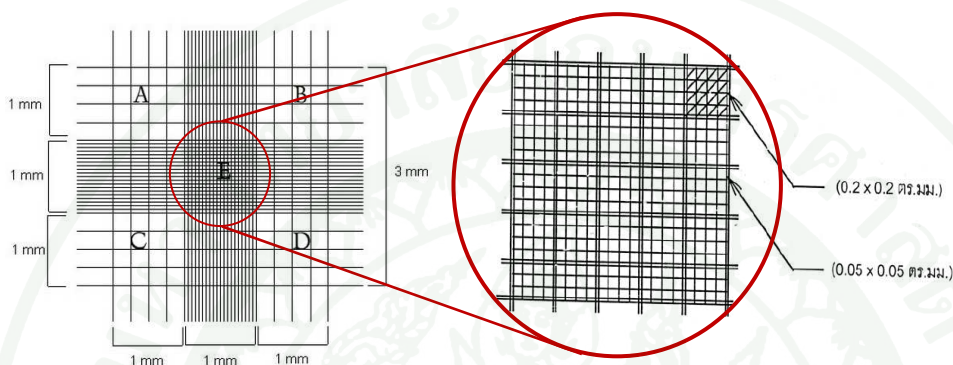
ล้างเครื่องมือให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ปิดทับบริเวณสีเหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้ autopipette ดูดตัวอย่าง และปลาย autopipette ที่ด้านแหลมซึ่งมีช่องว่างระหว่างสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ ก่อๆ ปล่อยให้ตัวอย่างให้ซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ตรวจสอบโดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40 หรือ 60 เท่า นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องใหญ่ ควรตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 5 ช่องใหญ่ (ช่องใหญ่ประกอบด้วย 16 ช่องเล็ก)

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

ขนาดความลึกของ Haemocytometer	=	0.1	mm
ขนาดพื้นที่ 1 ช่องใหญ่ของ Haemocytometer	=	0.2 x 0.2	mm ²

$$\begin{aligned}
 \text{ปริมาตร 1 ช่องใหญ่ของ Haemocytometer} &= 0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \\
 &= 0.02 \text{ cm} \times 0.02 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm} \\
 &= 0.4 \times 10^5 \text{ cm}^3
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Y)} &= \text{จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ใน 1 ช่องใหญ่} \\
 &= (Y \times 10^6 \times \text{Dilution ml.})/4
 \end{aligned}$$



ภาพผนวกที่ ข1 ภาพขยายตารางที่กำลังขยาย 10X ประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุน้อย 25 ช่อง แต่ละช่องมีเส้น 3 เส้นล้อมรอบ โดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุน้อย อีก 16 ช่อง

7. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography (Agilent Technologies 6890N Network System) โดยใช้ Headspace (Agilent Technologies G1888 Network Headspace Sampler) ในการฉีดตัวอย่างเข้าไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

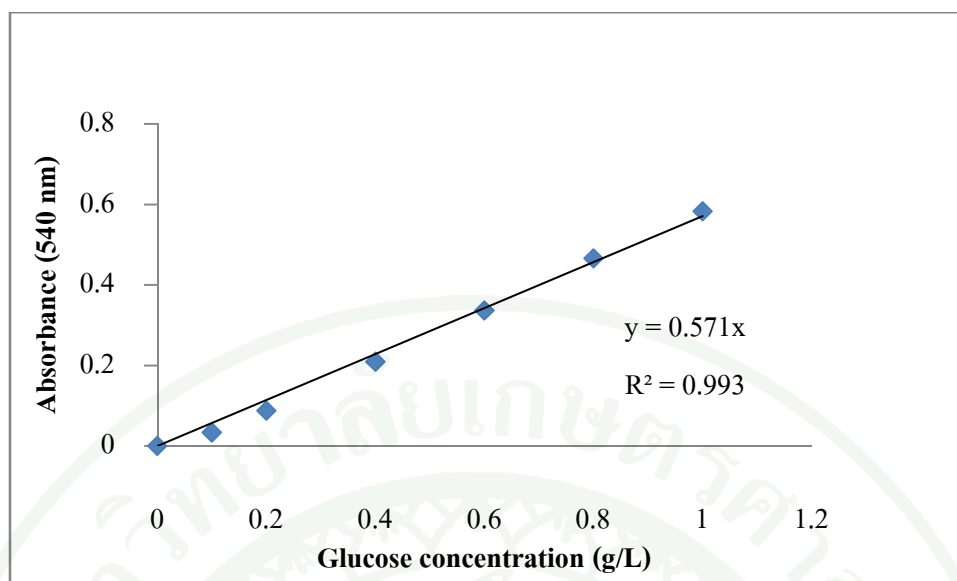
สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column : HP-INNOWAX 19091 N-133
 Column description : ท่อเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 0.251 มิลลิเมตร
 เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 ไมโครเมตร
 ความยาว 30 เมตร

Column Temperature : 120 องศาเซลเซียส
(15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 120 องศาเซลเซียส)
Inject Temperature : 220 องศาเซลเซียส
Detector : FID (flame-ionized detector)
Carrier gas, flow rate : Helium อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที







ภาพผนวกที่ ค2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยวิธี DNS method

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวฉวีวรรณ บุญวงศ์
เกิดวันที่ 8 กรกฎาคม 2532
สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง
ประวัติการศึกษา วท.บ.(จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ทุนการศึกษาที่ได้รับ ทุนภาคีบัณฑิต สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
(วว.) (พ.ศ.2556)

