

บรรณานุกรม

- กล้าณรงค์ ศรีรอด, สิริพล โกสินทรเสนีย์, เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, ปฐมา จาดกานนท์และสิทธิโชค วัลลภาทิตย์. (2548), การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อลดต้นทุนการผลิตและปลอดภัยจากผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม. รายงานวิจัยเสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จำนวน 120 หน้า
- ณรงค์ชัย สดาวรรจิตร. วิธีการฟื้นผิวผลตอบสนองโดยใช้แผนการทดลองแบบบล็อกซ์ – วิลสัน. รายงานกระบวนวิชา 208793 : สัมมนาสถิติ ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2549.
- นคร ทิพย์วงศ์ (2552), เทคโนโลยีการแปลงสภาพชีวมวล. สำนักพิมพ์ สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น) กรุงเทพฯ.
- ปารเมศ ชูติมา. (2545), การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- วสิษฐ์ รอดทัศน. (2548), การผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเชื้อกระดาษเหลือทิ้ง. วิทยานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิไลวรรณ ลินะกุล. (2552), ผลของการทำปฏิกิริยาคัดแยกเชื้อจากไม้ไผ่ต่อการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุนันท์ รังสีกาญจน์ส่อง. (2534), คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ HPLC. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- AOAC. “Official method of analysis,” Association of official analytical chemists. 16th Ed; Washington, D.C., USA. 1995.
- A.T.W.M. Hendriks and G. Zeeman, “Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass,” *Bioresource Technology*, vol. 100, (no. 1), pp. 10-18, 2009.
- B. Qi, X. Chen, and Y. Wan, “Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production,” *Bioresource Technology*, vol. 101, (no. 13), pp. 4875-4883, 2010.
- C.A. Cardona Alzate and O.J. Sánchez Toro, “Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass,” *Energy*, vol. 31, (no. 13), pp. 2447-2459, 2006.

- C. Cara, E. Ruiz, J.M. Oliva, F. Sáez, and E. Castro, "Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification," *Bioresource Technology*, vol. 99, (no. 6), pp. 1869-1876, 2008.
- C.S. Goh, K.T. Tan, K.T. Lee, and S. Bhatia, "Bio-ethanol from lignocellulose: Status, perspectives and challenges in Malaysia," *Bioresource Technology*, vol. 101, (no. 13), pp. 4834-4841, 2010.
- C.V.T. Mendes, M.G.V.S. Carvalho, C.M.S.G. Baptista, J.M.S. Rocha, B.I.G. Soares, and G.D.A. Sousa, "Valorisation of hardwood hemicelluloses in the kraft pulping process by using an integrated biorefinery concept," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 87, (no. 3), pp. 197-207, 2009.
- D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiment*, New York: John Wiley 2001.
- D.J. Hayes, "An examination of biorefining processes, catalysts and challenges," *Catalysis Today*, vol. 145, (no. 1-2), pp. 138-151, 2009.
- G.-L. Guo, W.-H. Chen, W.-H. Chen, L.-C. Men, and W.-S. Hwang, "Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production," *Bioresource Technology*, vol. 99, (no. 14), pp. 6046-6053, 2008.
- I. Ballesteros, M. Ballesteros, P. Manzanares, M.J. Negro, J.M. Oliva, and F. Sáez, "Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 42, (no. 1), pp. 84-91, 2008.
- J.-S. Kim, S.-C. Park, J.-W. Kim, J.C. Park, S.-M. Park, and J.-S. Lee, "Production of bioethanol from lignocellulose: Status and perspectives in Korea," *Bioresource Technology*, vol. 101, (no. 13), pp. 4801-4805, 2010.
- J.Y. Zhu, X.J. Pan, G.S. Wang, and R. Gleisner, "Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine," *Bioresource Technology*, vol. 100, (no. 8), pp. 2411-2418, 2009.
- J.Y. Zhu and X.J. Pan, "Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation," *Bioresource Technology*, vol. 101, (no. 13), pp. 4992-5002, 2010.
- M. Balat and H. Balat, "Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel," *Applied Energy*, vol. 86, (no. 11), pp. 2273-2282, 2009.

- N. Sathitsuksanoh, Z. Zhu, T.-J. Ho, M.-D. Bai, and Y.-H.P. Zhang, "Bamboo saccharification through cellulose solvent-based biomass pretreatment followed by enzymatic hydrolysis at ultra-low cellulase loadings," *Bioresource Technology*, vol. 101, (no. 13), pp. 4926-4929, 2010.
- R.H.a.M. Myers, D.C., "*Response Surface Methodology*", New York: John Wiley & Sons, 2002.
- T.A. Lloyd and C.E. Wyman, "Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids," *Bioresource Technology*, vol. 96, (no. 18), pp. 1967-1977, 2005.
- T.K. GHOSE, "Measurement of cellulase activities," *Applied Chemistry Division Commission on Biotexhnology*, vol. 59, (no. 2), pp. 257-268, 1987.
- T. Shimokawa, M. Ishida, S. Yoshida, and M. Nojiri, "Effects of growth stage on enzymatic saccharification and simultaneous saccharification and fermentation of bamboo shoots for bioethanol production," *Bioresource Technology*, vol. 100, (no. 24), pp. 6651-6654, 2009.
- Y. Chen, B. Dong, W. Qin, and D. Xiao, "Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol," *Bioresource Technology*, vol. 101, (no. 18), pp. 6994-6999, 2010.
- Y. Sun and J.J. Cheng, "Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production," *Bioresource Technology*, vol. 96, (no. 14), pp. 1599-1606, 2005.
- Y. Teramoto, S.-H. Lee, and T. Endo, "Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking," *Bioresource Technology*, vol. 99, (no. 18), pp. 8856-8863, 2008.
- X. Zhang, W. Qin, M.G. Paice, and J.N. Saddler, "High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates," *Bioresource Technology*, vol. 100, (no. 23), pp. 5890-5897, 2009.
- W. Zhu, J.Y. Zhu, R. Gleisner, and X.J. Pan, "On energy consumption for size-reduction and yields from subsequent enzymatic saccharification of pretreated lodgepole pine," *Bioresource Technology*, vol. 101, (no. 8), pp. 2782-2792, 2010.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การคำนวณสารละลาย

การคำนวณเพื่อเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก ต่อน้ำหนัก) ซึ่งเตรียมในปริมาตร 200 มิลลิลิตร

สารละลาย 100 กรัม จะมีซัลฟิวริกอยู่ 0.4 กรัม

ดังนั้นต้องทราบก่อนว่าน้ำ 100 กรัมมีค่ากี่มิลลิลิตร โดยสามารถหาได้โดยอาศัยจากความหนาแน่น น้ำมีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 1 g/ml จากสมการ

$$D=M/V$$

โดยที่

D คือ ค่าความหนาแน่นของน้ำ มีหน่วยเป็น g/ml

M คือ มวลของน้ำ มีหน่วยเป็น g

V ปริมาตรของน้ำมีหน่วยเป็น ml

แทนค่าสมการจะได้

$$V = M/D$$

$$V = 100 \text{ g} / 1 \text{ g/ml}$$

$$V = 100 \text{ ml}$$

กรดซัลฟิวริก 0.4 กรัมมีค่ากี่มิลลิลิตร คำนวณได้จาก

$$V = M/D$$

โดยที่

D คือค่าความหนาแน่นของกรดซัลฟิวริกมีค่าเท่ากับ 1.84 kg/l

M คือ มวลของน้ำ มีค่าเท่ากับ 0.4 g

V ปริมาตรของน้ำมีหน่วยเป็น ml

แทนค่าสมการจะได้

$$V = M/D$$

$$V = 0.4 \text{ g} / 1.84 \text{ kg/l}$$

$$V = 0.217 \text{ ml}$$

ดังนั้นเมื่อต้องการเจือจางกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.4 ร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนักในสารละลาย 100 มิลลิลิตรต้องเตรียมกรดซัลฟิวริก 0.217 มิลลิลิตร

การคำนวณเพื่อเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่ความเข้มข้น 0.6, 1.0, 1.4 และ 1.6 % (w/w) มีวิธีการคำนวณดังนี้

- กรดซัลฟิวริก 0.6 กรัมมีค่ากิโลมิลลิลิตร คำนวณได้จาก $V = M/D$

แทนค่า

$$V = 0.6 \text{ g} / 1.84 \text{ kg/l}$$

$$V = 0.326 \text{ ml}$$

ดังนั้นเมื่อต้องการเจือจางกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.6 ร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนักในสารละลาย 100 มิลลิลิตรต้องเตรียมกรดซัลฟิวริก 0.326 มิลลิลิตร

- กรดซัลฟิวริก 1.0 กรัมมีค่ากิโลมิลลิลิตร คำนวณได้จาก $V = M/D$

แทนค่า

$$V = 1.0 \text{ g} / 1.84 \text{ kg/l}$$

$$V = 0.543 \text{ ml}$$

ดังนั้นเมื่อต้องการเจือจางกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 1.0 ร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนักในสารละลาย 100 มิลลิลิตรต้องเตรียมกรดซัลฟิวริก 0.543 มิลลิลิตร

- กรดซัลฟิวริก 1.4 กรัมมีค่ากิโลมิลลิลิตร คำนวณได้จาก $V = M/D$

แทนค่า

$$V = 1.4 \text{ g} / 1.84 \text{ kg/l}$$

$$V = 0.761 \text{ ml}$$

ดังนั้นเมื่อต้องการเจือจางกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 1.4 ร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนักในสารละลาย 100 มิลลิลิตรต้องเตรียมกรดซัลฟิวริก 0.761 มิลลิลิตร

- กรดซัลฟิวริก 1.6 กรัมมีค่ากิโลมิลลิลิตร คำนวณได้จาก $V = M/D$

แทนค่า

$$V = 1.6 \text{ g} / 1.84 \text{ kg/l}$$

$$V = 0.87 \text{ ml}$$

ดังนั้นเมื่อต้องการเจือจางกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 1.6 ร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนักในสารละลาย 100 มิลลิลิตรต้องเตรียมกรดซัลฟิวริก 0.87 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

การเตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (sodium citrate buffer) เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับสภาพเป็น 1 ลิตร

สารละลาย A : เตรียมสารละลาย 0.05 M citric acid ($C_6H_8O_7H_2O$ 10.51 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : เตรียมสารละลาย 0.05 M sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7 2H_2O$ 14.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)
3.0	46.5	3.5
3.2	43.7	6.3
3.4	40.0	10.0
3.6	37.0	13.0
3.8	35.0	15.0
4.0	33.0	17.0
4.2	31.5	18.5
4.4	28.0	22.0
4.6	25.5	24.5
4.8	23.0	27.0
5.0	20.5	29.5
5.2	18.0	32.0

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส

การคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสตามหลักของ The International Union of Biochemistry

$$\begin{aligned} 1 \text{ enzyme unit} &= 1 \mu\text{mol ของ substrate ที่ถูกย่อยสลายภายใน 1 นาที} \\ &= 1 \mu\text{mol ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายใน 1 วินาที} \\ &= 0.18 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายใน 1 นาที} \end{aligned}$$

ถ้า 0.18 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

$$1 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายใน 60 นาที มีค่า} = 1 \text{ หน่วย} = \frac{0.0925}{0.18 \times 60}$$

ถ้าปลดปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัม ใน 60 นาที มีค่า = $0.0925 \times X$ หน่วย

$$\begin{aligned} \text{และถ้าจากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร} &= 0.0925 \times \text{มิลลิกรัมกลูโคส} \\ 1 \text{ มิลลิลิตร} &= \frac{0.0925 \times \text{มิลลิกรัมกลูโคส}}{0.5} \\ &= \frac{0.0925 \times \text{มิลลิกรัมกลูโคส}}{0.5} \\ &= 0.185 \times * \text{ มิลลิกรัมกลูโคส Unit/ml} \end{aligned}$$

(* แทนค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสลงในสูตร)

การจะใช้เอนไซม์กี่ ml หรือ กี่ g. นั้นขึ้นอยู่กับว่าจะเลือกใช้เท่าไร เพราะสามารถคำนวณกลับมาเป็นค่า unit of enzyme ได้ ซึ่งต้องทราบก่อนว่าเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร จะให้ค่า unit of enzyme ปริมาณเท่าไร (สามารถทำได้จากวิธีการดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น) ถ้าปริมาณเอนไซม์เข้มข้นมาก สามารถทำการ dilute ลงเป็นจำนวนเท่าได้และคูณกลับด้วยจำนวนเท่าที่ทำการ dilute ตัวอย่างเช่น ถ้า dilute เอนไซม์ 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐานแล้วสมมติได้ 5 mg/ml ก็ให้คูณ 5 เข้าไปก็จะได้ 25 mg/ml และนำไปแทนค่าในสูตร

(หมายเหตุ : เวลา 60 นาที ในการทำปฏิกิริยาใช้กับเอนไซม์ exoglucanase เท่านั้น)

เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสประกอบไปด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน คือ endoglucanase, exoglucanase และ β -glucosidase ดังนั้นการวัดค่า activity จึงใช้สารตั้งต้น ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น และการทดสอบ activity ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดก็ใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกันด้วย FPU (filter paper unit) คือ การวัดค่า activity ของเอนไซม์ exoglucanase โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้หรือเอนไซม์ที่ซื้อมาย่อยสารตั้งต้น (กระดาษกรอง Whatman No.1) เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย DNS reagent และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง OD ต่อจากนั้นนำค่า OD ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลเพื่อคำนวณออกมาเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคส (mg/ml) และนำค่าที่ได้ไปแทนค่าในสูตรก็จะได้ค่า activity ของเอนไซม์ออกมาหน่วยเป็น Unit/ml

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) Method

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 4 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.2 เตรียมโดยละลาย 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาณ 2.5 กรัมลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1.1 จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium ttrate) ปริมาณ 75 กรัม นำไปอุ่นและกวนจนละลายหมด เติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 500 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส (standard curve)

2.1 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมล (mM) เตรียมโดยชั่งน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ 0.1802 กรัม นำไปละลายในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำที่ปราศจากไอออน (deionize water; D.I. water) กวนจนละลายหมดจากนั้นนำไปรินลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรใช้น้ำ D.I. ถั่วบีกเกอร์แล้วรินลงในขวดวัดปริมาตร 2-3 ครั้ง เติมน้ำ D.I. ลงในขวดวัดปริมาตรจากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำ D.I.

2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่นำมาใช้งาน (Working standard solution) โดยนำสารละลายในข้อที่ 2.1 มาเจือจางด้วยน้ำ D.I. ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรดังตาราง ง (1)

ตาราง ง (1) ความเข้มข้นของสารละลายที่ปรับเทียบ

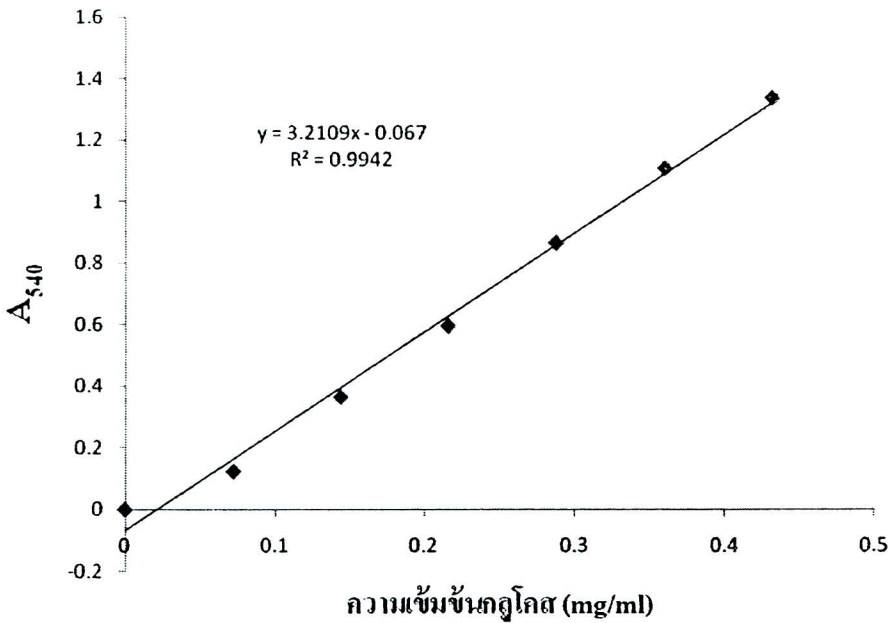
tube no. solution	Blank	1	2	3	4	5	6
10 mM glucose	-	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20
D.I. water	3.00	2.80	2.60	2.40	2.20	2.00	1.80
DNS	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
เขย่าให้เข้ากันและต้มในน้ำเดือด 5 นาที							
วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{540}							

3. กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS นั้นในขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานจะเตรียมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรแล้วคำนวณหาความเข้มข้นในหน่วย (mg/ml) จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น (wavelength) 540 นาโนเมตร ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้ ดังแสดงในตาราง ง(2)

ตาราง ง (2) ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง A ₅₄₀
0.07260	0.123
0.14413	0.364
0.21619	0.595
0.28826	0.864
0.36032	1.107
0.43238	1.337



รูป ง(1) ค่าความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน

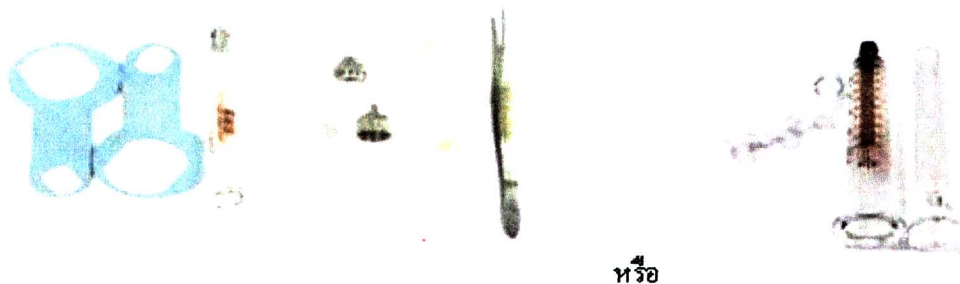
ภาคผนวก จ

การเตรียมกราฟและการกรอง HPLC

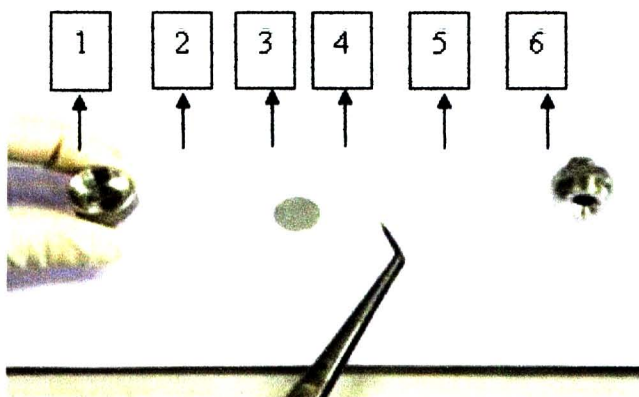
การกรองตัวอย่าง

ตัวอย่างที่จะนำไปฉีดเข้าระบบต้องสะอาดเพียงพอ คือปราศจากสิ่งปนเปื้อนที่จะไปลดหรือทำลายประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนั้นตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้วก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ต้องกรองตัวอย่างด้วย Membrane filter หรือ Syringe membrane filter ขนาด 0.2 หรือ 0.45 μm ก่อน วิธีการกรองดังนี้

1 ชุดการกรองตัวอย่างดังรูป



2 ประกอบชุดการกรองโดยใช้กระดาดกรองขนาด 0.2 μm nylon ประกอบตามลำดับจากซ้ายไปขวา ดังรูป



3. ปิดที่กรองให้แน่นด้วยปะแจดังรูป



4. ต่อที่กรองเข้ากับ syringe ดังรูป



หรือ ต่อ Syringe membrane filter เข้ากับ syringe ดังรูป



5. ปิเปตตัวอย่างใส่ทางด้านบนแล้วใช้ Plunger กดเพื่อให้ตัวอย่างผ่านกระดาษกรองออกมาทางด้านล่าง ที่มี vial รองรับ แล้ว เก็บตัวอย่างที่ผ่านการกรอง นำไป inject ทำการวิเคราะห์ต่อไป ดังรูป



การกรองตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile Phase)

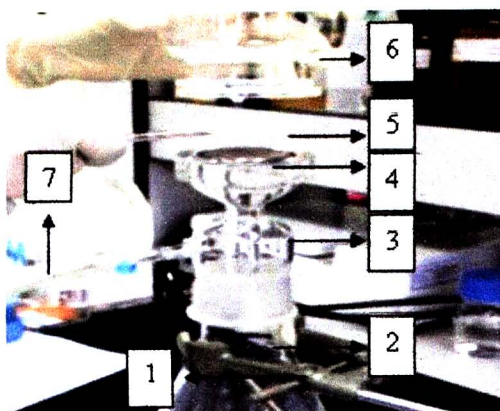
ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้สำหรับเครื่อง HPLC จะต้องเป็นชนิด HPLC grade เท่านั้น และต้องกรองด้วย Membrane ที่เหมาะสมกับชนิดของตัวทำละลาย ขนาด 0.2 หรือ 0.45 μm ก่อนนำไปใช้งาน ดังนี้

1. ชุดการกรอง ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ดังรูป

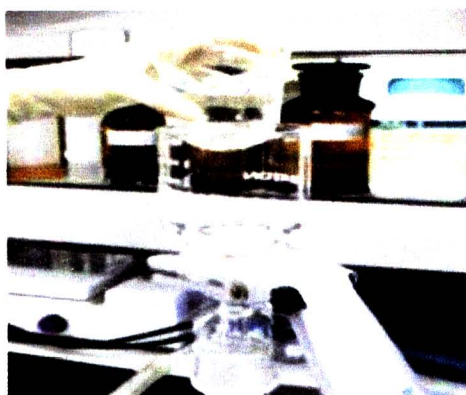




2. ประกอบชุดการกรองทั้ง 7 อย่างดังรูปรวมทั้ง Membrane ขนาด 0.2 หรือ 0.45 μm



3. เทตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ต้องการแล้วเปิดปั๊ม on ของปั๊ม



4. จะได้ส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ผ่านการกรองเก็บส่วนที่ผ่านการกรองใส่ในขวดสำหรับเก็บตัวทำละลายเคลื่อนที่

5. ในกรณีที่ไม่มี Degasser ให้นำตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ผ่านการกรองแล้ว ไปทำการไล่ฟองอากาศด้วยการ Purge ด้วย Helium gas หรือ นำไปเข้าเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำไปใช้งาน

ภาคผนวก ก

ผลการทดลอง

ผลการทดลองจากกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง
ตาราง จ(1) ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่สภาวะแตกต่างกันของหน่อไม้

จำนวนเงื่อนไข (condition)	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	รหัสตัวแปร		ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ml/mg)				ปริมาณน้ำตาลไซโลส (ml/mg)			
			X _L	X _C	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
1	60	0.6	-1	-1	28.05	27.6	26.9	27.52	2.01	1.81	1.90	1.91
2	120	0.6	1	-1	31.09	29.16	27.74	29.33	5.38	6.76	5.46	5.87
3	60	1.4	-1	1	27.64	27.18	27.78	27.53	5.17	5.01	5.2	5.13
4	120	1.4	1	1	31.16	31.6	31.76	31.51	8.78	8.85	8.55	8.73
5	45	1	-1.5	0	26.78	25.94	26.02	26.25	2.24	1.47	1.32	1.68
6	135	1	1.5	0	35.49	32.88	35.12	34.50	8.23	8.33	7.68	8.08
7	90	0.4	0	-1.5	25.06	25.32	23.52	24.63	3.52	3.20	3.91	3.54
8	90	1.6	0	1.5	28.17	27.06	26.66	27.30	9.20	9.68	9.38	9.42
9	90	1	0	0	35.22	27.78	30.42	31.14	3.32	3.47	4.42	3.74
10	90	1	0	0	31.01	29.52	29.20	29.91	3.51	2.73	3.11	3.12
11	90	1	0	0	32.41	30.46	31.64	31.50	4.71	4.74	4.28	4.58
12	90	1	0	0	32.89	30.06	29.74	30.90	4.54	4.92	4.67	4.71

ตาราง จ(2) ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่สภาวะแตกต่างกันของไม้ไผ่อ่อน

จำนวนเงื่อนไข (condition)	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	รหัสตัวแปร		ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ml/mg)				ปริมาณน้ำตาลเซลโลส (ml/mg)			
			X _t	X _c	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
1	60	0.6	-1	-1	14.42	14.78	13.87	14.36	10.45	11.67	13.22	11.78
2	120	0.6	1	-1	15.96	17.09	15.71	16.25	12.14	13.65	11.56	12.45
3	60	1.4	-1	1	16.37	16.13	16.65	16.38	14.98	15.54	15.78	15.43
4	120	1.4	1	1	25.37	26.58	25.54	25.83	15.38	15.21	17.65	16.08
5	45	1	-1.5	0	15.49	15.19	15.05	15.24	13.27	12.48	13.91	13.22
6	135	1	1.5	0	20.42	20.26	20.33	20.34	16.87	14.89	15.92	15.89
7	90	0.4	0	-1.5	13.41	13.85	15.08	14.11	11.91	10.33	9.59	10.61
8	90	1.6	0	1.5	21.14	20.56	22.03	21.24	15.38	18.19	17.16	16.91
9	90	1	0	0	18.38	17.07	17.08	17.51	13.93	14.76	15.49	14.73
10	90	1	0	0	17.55	19.46	17.39	18.13	15.27	14.39	16.05	15.24
11	90	1	0	0	19.98	20.37	19.52	19.96	13.65	14.04	14.33	14.01
12	90	1	0	0	18.56	19.52	18.94	19.01	14.09	14.26	14.02	14.12

ตาราง ๓(3) ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่สภาวะแตกต่างกันของไม่แผ่

จำนวนเงื่อนไข (condition)	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	รหัสตัวแปร		ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ml/mg)				ปริมาณน้ำตาลไซโลส (ml/mg)			
			X _L	X _C	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
1	60	0.6	-1	-1	10.13	8.84	10.55	9.84	10.06	10.71	9.43	10.07
2	120	0.6	1	-1	12.96	13.03	13.22	13.07	9.88	10.72	9.92	10.17
3	60	1.4	-1	1	13.31	13.95	14.56	13.94	10.64	10.43	11.25	10.77
4	120	1.4	1	1	17.67	17.77	18.13	17.86	10.73	11.51	11.22	11.15
5	45	1	-1.5	0	10.62	10.76	11.22	10.87	9.35	9.48	9.91	9.58
6	135	1	1.5	0	18.02	17.83	17.78	17.88	10.08	10.79	9.77	10.21
7	90	0.4	0	-1.5	9.09	10.8	9.66	9.85	10.34	9.59	10.71	10.21
8	90	1.6	0	1.5	17.07	17.29	16.69	17.02	10.77	11.59	10.68	11.01
9	90	1	0	0	15.23	15.9	15.43	15.52	11.45	11.89	11.26	11.53
10	90	1	0	0	17.75	15.49	17.27	16.84	11.13	11.57	11.28	11.33
11	90	1	0	0	17.52	15.52	17.22	16.75	11.92	11.44	11.62	11.66
12	90	1	0	0	17.92	17.73	17.51	17.72	11.63	11.28	11.47	11.46

ผลการทดลองจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

ตาราง ๓(4) ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 12 ชั่วโมง ของหน่อไม้

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 12 ชั่วโมง									
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)					ปริมาณน้ำตาลไซโลส (mg/ml)				
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	60	0.6	39.78	40.15	39.29	39.74	2.25	1.68	2.18	2.04		
2	120	0.6	37.54	36.30	38.23	37.36	1.08	1.21	1.03	1.11		
3	60	1.4	33.65	33.27	35.19	34.04	1.19	1.45	2.11	1.58		
4	120	1.4	38.02	38.49	37.57	38.03	1.31	0.78	0.97	1.02		
5	45	1	27.89	26.56	28.03	27.49	3.72	3.45	3.21	3.46		
6	135	1	15.12	16.89	17.23	16.41	1.25	1.55	1.21	1.34		
7	90	0.4	37.73	36.39	37.48	37.20	3.58	3.43	4.21	3.74		
8	90	1.6	31.82	30.44	31.28	31.18	0.42	1.01	0.34	0.59		
9	90	1	28.52	25.98	25.64	26.71	2.16	1.45	2.57	2.06		
10	90	1	27.89	24.2	26.37	26.15	2.13	2.44	1.88	2.15		
11	90	1	26.22	23.2	30.38	26.60	2.09	2.03	2.18	2.10		
12	90	1	39.78	40.15	39.29	39.74	2.25	1.68	2.18	2.04		

ตาราง ๓(5) ปริมาณน้ำตาจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของหน่อไม้

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 48 ชั่วโมง									
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)					ปริมาณน้ำตาลไซโลส (mg/ml)				
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
1	60	0.6	64.12	66.08	65.49	65.23	3.12	2.57	3.63	3.11		
2	120	0.6	62.25	63.68	61.59	62.51	1.28	2.18	3.02	2.16		
3	60	1.4	64.83	62.93	63.86	63.87	2.89	3.25	2.47	2.87		
4	120	1.4	60.01	59.21	61.13	60.12	2.15	2.18	1.83	2.05		
5	45	1	64.44	65.63	63.88	64.65	4.11	3.23	4.27	3.87		
6	135	1	40.75	39.67	41.89	40.77	2.93	3.41	2.58	2.97		
7	90	0.4	64.01	63.19	65.13	64.11	4.62	3.85	3.92	4.13		
8	90	1.6	53.46	54.32	52.31	53.36	1.51	1.36	1.76	1.54		
9	90	1	48.17	50.17	47.34	48.56	3.45	2.91	3.10	3.15		
10	90	1	49.52	47.88	48.25	48.55	3.54	4.05	2.31	3.30		
11	90	1	48.11	46.49	49.56	48.05	3.41	3.30	2.85	3.19		
12	90	1	49.27	46.54	48.83	48.21	3.22	3.11	3.31	3.21		

ตาราง ๘(๖) ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของหน่อไม้

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 72 ชั่วโมง											
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)						ปริมาณน้ำตาลไซโลส (mg/ml)					
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
1	60	0.6	71.34	72.18	69.86	71.13	4.82	3.43	4.76	4.34				
2	120	0.6	69.53	68.37	70.38	69.43	3.17	3.49	3.92	3.53				
3	60	1.4	70.85	71.23	69.45	70.51	3.03	2.98	3.36	3.12				
4	120	1.4	66.02	65.49	66.85	66.12	2.28	2.14	2.76	2.39				
5	45	1	71.48	69.75	72.87	71.37	5.19	5.32	4.95	5.15				
6	135	1	58.13	59.36	57.49	58.33	3.11	2.78	3.61	3.17				
7	90	0.4	72.51	70.83	73.86	72.40	5.80	4.93	5.89	5.54				
8	90	1.6	69.01	68.24	70.13	69.13	1.51	1.73	2.50	1.91				
9	90	1	57.72	58.88	59.15	58.58	4.22	4.39	5.48	4.70				
10	90	1	59.62	57.59	58.25	58.49	5.14	4.83	5.38	5.12				
11	90	1	58.14	56.79	60.35	58.43	4.36	3.45	5.32	4.38				
12	90	1	58.51	59.34	57.13	58.33	4.14	4.54	4.26	4.31				

ตาราง ก(7) ปริมาณน้ำตาจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 12 ชั่วโมง ของไม้ไผ่อ่อน

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 12 ชั่วโมง									
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)				ปริมาณน้ำตาลไซโลส (mg/ml)					
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
1	60	0.6	34.28	36.47	35.08	35.28	3.11	2.09	3.35	2.85		
2	120	0.6	33.96	31.48	34.38	33.27	3.12	3.64	2.18	2.98		
3	60	1.4	35.45	35.24	33.49	34.73	1.86	1.45	2.61	1.97		
4	120	1.4	20.12	18.89	23.2	20.74	1.41	2.75	1.46	1.87		
5	45	1	33.07	35.39	34.05	34.17	2.10	3.02	1.89	2.34		
6	135	1	20.26	19.92	21.49	20.56	1.81	0.98	1.86	1.55		
7	90	0.4	35.45	36.64	33.78	35.29	2.47	3.83	2.79	3.03		
8	90	1.6	19.25	18.86	20.32	19.48	1.38	0.97	1.67	1.34		
9	90	1	31.03	30.29	32.37	31.23	0.81	1.38	1.39	1.19		
10	90	1	31.92	30.88	29.35	30.72	1.23	0.85	1.31	1.13		
11	90	1	27.98	25.79	30.35	28.04	0.89	1.53	1.25	1.22		
12	90	1	27.90	26.54	28.83	27.76	0.85	1.47	1.29	1.20		

ตาราง ณ(8) ปริมาณน้ำตาจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของไม่ฝ่ออ่อน

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 48 ชั่วโมง									
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาจากกุโคส (mg/ml)					ปริมาณน้ำตาลไซโลส (mg/ml)				
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
1	60	0.6	55.11	54.32	56.21	55.21	5.28	3.41	4.25	4.31		
2	120	0.6	52.25	54.29	53.2	53.25	5.02	4.01	4.13	4.39		
3	60	1.4	55.25	54.53	54.84	54.87	3.02	3.25	3.13	3.13		
4	120	1.4	40.28	39.2	41.67	40.38	3.43	2.74	2.54	2.90		
5	45	1	55.38	53.45	54.28	54.37	3.84	3.34	4.15	3.78		
6	135	1	41.61	39.65	40.57	40.61	2.51	3.64	2.75	2.97		
7	90	0.4	54.28	56.38	55.29	55.32	3.59	5.42	4.47	4.49		
8	90	1.6	39.20	40.11	38.25	39.19	2.18	2.25	3.32	2.58		
9	90	1	47.13	49.35	48.24	48.24	2.02	3.03	2.31	2.45		
10	90	1	48.25	46.23	47.87	47.45	3.53	2.27	1.48	2.43		
11	90	1	49.19	47.63	48.36	48.39	3.05	2.46	3.02	2.84		
12	90	1	47.45	49.49	48.47	48.47	1.88	3.78	2.37	2.68		

ตาราง จ(9) ปริมาณน้ำตาจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 72 ชั่วโมง ของไม่ไผ่อ่อน

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 72 ชั่วโมง									
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาจากไฮโดรไลซิส (mg/ml)					ปริมาณน้ำตาจากไฮโดรไลซิส (mg/ml)				
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	60	0.6	62.83	63.39	62.46	62.89	5.03	5.26	5.08	5.12		
2	120	0.6	59.58	57.35	60.24	59.06	5.21	5.67	4.67	5.18		
3	60	1.4	57.94	58.24	59.45	58.54	3.33	2.58	4.09	3.33		
4	120	1.4	43.89	44.73	42.72	43.78	3.05	3.56	2.42	3.01		
5	45	1	58.4	60.61	59.32	59.44	5.47	4.49	4.23	4.73		
6	135	1	44.28	45.32	46.14	45.25	3.61	2.83	3.12	3.19		
7	90	0.4	63.67	63.11	62.26	63.01	6.02	5.12	4.68	5.27		
8	90	1.6	44.35	44.26	44.47	44.36	2.48	3.82	2.27	2.86		
9	90	1	56.65	55.29	54.32	55.42	3.43	4.61	2.24	3.43		
10	90	1	53.75	55.23	54.75	54.58	3.91	3.67	2.11	3.23		
11	90	1	53.23	54.40	53.29	53.64	3.11	4.54	3.11	3.59		
12	90	1	54.19	54.24	52.32	53.58	4.62	3.22	2.54	3.46		

ตาราง ๘(10) ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 12 ชั่วโมง ของไม้ไผ่แก่

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 12 ชั่วโมง									
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ml/mg)				ปริมาณน้ำตาลไซโตส (ml/mg)					
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
1	60	0.6	31.73	30.82	30.29	30.95	1.97	1.93	1.68	1.86		
2	120	0.6	27.56	28.40	29.67	28.54	1.02	0.98	1.22	1.07		
3	60	1.4	31.72	32.20	30.29	31.40	0.89	0.77	0.95	0.87		
4	120	1.4	27.51	29.1	28.48	28.36	0.85	0.25	0.62	0.57		
5	45	1	32.15	32.48	33.21	32.61	0.32	0.38	0.27	0.32		
6	135	1	28.44	27.49	29.65	28.53	0.58	1.02	0.75	0.78		
7	90	0.4	33.10	32.28	33.39	32.92	0.85	1.28	0.76	0.96		
8	90	1.6	29.53	27.49	29.47	28.83	1.53	1.32	2.03	1.63		
9	90	1	24.12	23.06	26.48	24.55	0.68	0.89	1.08	0.88		
10	90	1	26.04	23.43	25.56	25.01	0.94	0.75	1.12	0.94		
11	90	1	22.11	26.59	25.65	24.78	0.83	0.76	0.97	0.85		
12	90	1	31.73	30.82	30.29	30.95	1.97	1.93	1.68	1.86		

ตาราง จ(11) ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของไม่เผก

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 48 ชั่วโมง									
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ml/mg)					ปริมาณน้ำตาลไซโตส (ml/mg)				
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
1	60	0.6	47.42	48.38	48.1	47.97	3.45	3.92	2.89	3.42		
2	120	0.6	43.41	43.22	44.35	43.66	2.89	3.02	2.78	2.90		
3	60	1.4	42.63	41.47	42.34	42.15	2.50	2.38	3.04	2.64		
4	120	1.4	33.79	33.23	34.14	33.72	2.13	2.45	2.11	2.23		
5	45	1	45.27	47.33	43.48	45.36	1.89	1.92	1.79	1.87		
6	135	1	36.83	36.45	35.75	36.34	2.31	2.52	3.19	2.67		
7	90	0.4	46.21	45.78	46.74	46.24	2.74	2.55	2.87	2.72		
8	90	1.6	38.52	39.37	38.93	38.94	3.11	2.99	3.17	3.09		
9	90	1	37.6	36.30	36.39	36.76	2.25	2.12	2.18	2.18		
10	90	1	38.85	38.56	37.75	38.39	2.16	2.34	2.09	2.20		
11	90	1	39.35	38.54	37.37	38.42	2.28	2.56	2.11	2.32		
12	90	1	47.42	48.38	48.1	47.97	3.45	3.92	2.89	3.42		

ตาราง จ(12) ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 72 ชั่วโมง ของไม่แผ่

จำนวนเงื่อนไข (condition)	การปรับสภาพ		เวลา 72 ชั่วโมง									
	เวลา (min)	ความเข้มข้นกรด (%w/w)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ml/mg)					ปริมาณน้ำตาลไซโลส (ml/mg)				
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
1	60	0.6	60.02	58.05	59.01	59.03	5.24	4.87	4.82	4.98		
2	120	0.6	55.23	56.48	53.87	55.19	4.31	4.22	3.56	4.03		
3	60	1.4	54.98	54.13	55.32	54.81	4.85	3.94	3.73	4.17		
4	120	1.4	45.65	44.84	45.69	45.39	3.38	3.11	3.55	3.35		
5	45	1	58.39	60.16	56.45	58.33	3.19	3.08	3.31	3.19		
6	135	1	45.13	46.35	44.23	45.24	3.31	3.42	2.82	3.18		
7	90	0.4	58.99	57.25	59.18	58.47	4.08	3.33	3.79	3.73		
8	90	1.6	47.65	48.12	47.11	47.63	4.51	4.19	4.96	4.55		
9	90	1	49.12	47.98	46.64	47.91	3.11	3.16	2.93	3.07		
10	90	1	47.43	50.45	48.18	48.69	3.08	3.14	2.86	3.03		
11	90	1	46.72	48.49	49.38	48.20	3.15	2.91	3.16	3.07		
12	90	1	46.39	48.32	47.36	47.36	3.01	3.16	4.02	3.40		

ภาคผนวก ข

ผลงานทางวิชาการที่เผยแพร่





To Whom It May Concern

The Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT), Thailand, join with other GMSTEC members has organized the International Conference for a Sustainable Greater Mekong Subregion (GMSTEC 2010) on August 26-27, 2010 at The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand as part of activities to commemorate the 50th year of KMUTT.

This is a confirmation letter to assure that Miss Nuttida Charhom, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand has attended GMSTEC 2010 on 26-27 August, 2010 and had an oral presentation on the topic: Conversion of Bamboo into Glucose by Dilute Acid and Enzymatic Hydrolysis. We truly appreciate her presence.

Best Regards,

Worant Koetsinchar

Asst. Prof. Woranut Koetsinchar, Ph.D.
Dean, Faculty of Science
Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT)
126 Pracha-uti Road, Bangmod, Thungkru, Bangkok, 10140 Thailand
Tel: +662-470-8974 Fax: +662-427-8050



Conversion of Bamboo into Glucose by Dilute Acid and Enzymatic Hydrolysis

Nuttida Chanhom^{*} and Nakorn Tippayawong

Department Mechanical of Engineering , Faculty of Engineering, Chiang Mai University,
Chiang Mai 50200, Thailand

^{*}Corresponding author: nuttida.c@gmail.com

Abstract

Lignocellulosic biomass is an important alternative energy source to be utilized for ethanol production. In this work, bamboo (*Dendrocalamus asper Backer*) was used as biomass feedstock. A full grown bamboo with height over 7 m was used. Pretreatment was carried out with dilute sulfuric acid at concentrations between 0.4-1.6% w/w, and residence time between 45-135 min at stable temperature of 140 °C. Prehydrolyzate was later analyzed for total sugars by high performance liquid chromatography. For the conditions considered, maximum xylose and glucose yields were obtained from bamboo at 16.91 and 25.83 mg/ml, respectively. Water insoluble solids obtained were hydrolysed with cellulase (*Trichoderma reesei*) and β -glucosidase (Novozyme 188) for 72 h. It was found that increasing yield was obtained with increasing acid concentration and residence time. In addition, the effects of pretreatment severity and high consistency enzymatic hydrolysis greatly increased the sugar concentrations after the hydrolysis.

Keywords: Biomass, Pretreatment, Enzymatic hydrolysis, Glucose, Xylose, Renewable energy

1. INTRODUCTION

Woody biomass is sustainably available in large quantities in various other regions of the world. About 370 million dry tons of woody biomass accounting for 30% of the total biomass is projected to be available [1]. Bamboo biomass is widely distributed in Greater Mekong Subregion and Asia. There are more than 1000 types of bamboo in record over 180,000 km² [2]. Bamboos are of economic and high cultural significance in Asia because they are both

lightweight and exceptionally durable. The treated bamboos are used extensively as building materials for houses, construction scaffolding, flooring, bridges, etc. Also, they are extensively used to make furniture, chopsticks, food steamers, paper pulp, etc., and are grown as ornamental plants. It has high density and can be harvested year round, which eliminates long-term storage. Although bamboo is recognized as a useful resource, its utilization is limited and further development is required. Chemically, woody biomass has higher lignin content



and recalcitrant to microbial, compared to bamboo. For example, typical enzymatic saccharification efficiency of softwood only about 40% [3]. In addition, more energy is required to overcome the recalcitrance of woody biomass through wood pretreatment for enzymatic saccharification. There have been various reports on improved pre-treatment processes that increase the enzymatic saccharification rates of bamboo for bioethanol production.

Specifically, approach of conducting chemical pretreatment is required prior to wood size-reduction and enzymatic cellulose saccharification. Chemical pretreatment can alter the chemical composition and physical structure of wood by partially removing some cell-wall components such as hemicellulose and lignin. Furthermore, direct chemical pretreatment of wood chips can afford a low liquid-to-solid ratio to reduce thermal energy consumption in pretreatment. For mechanical pulping of wood, the requirement for good fiber quality for papermaking limits opportunities to reduce energy through variations of fiberization conditions. The fiber qualities required for papermaking are not directly relevant to and are therefore no longer required for lignocellulose bioconversion. This provides the feasibility to optimize milling process conditions to reduce energy consumption for wood-size-reduction, while maximizing the enzymatic conversion efficiency of cellulose to glucose above 90% under nominal chemical pretreatment conditions [4].

The objective of this work was to investigate the influence and evaluate the

effects of dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of bamboo.

2. METHODOLOGY

2.1 RAW MATERIAL

A full grown bamboo (*Dendrocalamus asper* Backer) was used as raw material [5]. The sample was air-dried and cut to sizes of about 1 x 5 cm. It was then milled and the fraction containing particles with a size less than 0.25 mm were selected to provide a fine size class and stored in plastic bags at room temperature until further processed.

2.2 Dilute acid pretreatment

All of materials were dried at 103 °C for 72 h to ensure a low moisture content, prior to treatment. A biomass sample of 5 g on dry basis was used for each dilute acid treatment experiment [6, 7]. The pretreatment were carried out using 50 ml at acid concentration between 0.4-1.6% w/w. The samples were then held at stable 140 °C for residence times between 45-135 min [8, 9, 10]. After allowing the temperature to drop at 40 °C, the treated samples were immediately quenched. The cooled samples were then quickly separated into solid and liquid fractions by filtration. The filtrate was sampled in order to determine the concentration of glucose and xylose in the hydrolysates. This was done by high preformant liquid-chromatography (HPLC) [11] while the pretreated solid residues were taken to hydrolysis process.

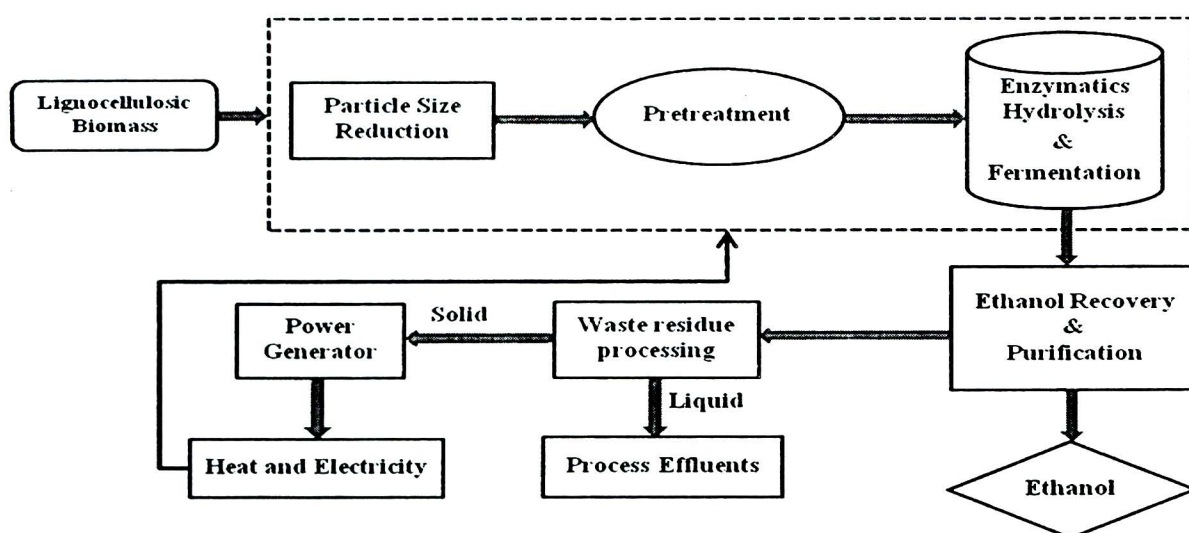


Fig 1 Process flow diagram representing the unit operations for biological conversion of lignocellulosic biomass into ethanol

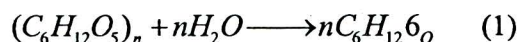
2.3 Carbohydrate and lignin assays

The structural carbohydrate composition of the completely dry biomass was determined using a modified quantitative saccharification (QS). Monomeric sugars were measured by a HPLC with a Bio-Rad Aminex HPX-87P column. Lignin and ash were measured according to the standard NREL biomass [12].

2.4 Enzymatic hydrolysis

The enzymatic hydrolysis was performed in 100 ml Erlenmeyer flasks using 5% dry matter (w/w) and 50 M sodium citrate buffer (pH 4.8) at 2% (w/v) dry pretreatment substrate loading enzyme used was cellulase from *Trichoderma reesei* with an activity of 65 filter paper unites (FPU)/g, and β -glucosidase (Novozyme 188).activity of 590 IU/g (6 unit/mg). Enzyme loading 15 FPU/g of dry pretreated substrate of cellulase and 15

IU/g of dry pretreated substrate of β -glucosidase [11]. It was later analyzed for total sugars by the HPLC. Equation (1) shows the disintegration process of the cellulose molecules by water and after a process of hydrolysis cellulose is degraded into glucose.



2.5 Combined severity factor

The combined severity factor (CSF) was used to compare the efficiencies of hydrolysis time (minute), temperature ($^{\circ}\text{C}$) and acid concentration (% w/w) into single variable [13]. CSF in this study is defined as

$$CSF = \log \left\{ t \exp \left(\frac{T_H - T_R}{14.75} \right) \right\} - pH \quad (2)$$

where t is hydrolysis time in minute, T_H is the hydrolysis temperature in $^{\circ}\text{C}$, T_R is the



reference temperature (most often 100 °C), the fitted value (14.75) of the arbitrary pseudo first order kinetics and pH is the acidity of the aqueous solution in terms of acid concentration.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Raw composition

Table 1 shows the chemical composition of raw material. Bamboo has high cellulose (glucan) content with lignin content. Hemicelluloses content was about 26.5%.

Table 2 Total xylose yield for dilute acid pretreatment

Time (min)	Concentration (%w/w)	CSF	Xylose (mg/ml)	Other sugar* (mg/ml)
60	0.6	1.2	11.78	-
120	0.6	1.3	12.45	-
60	1.4	1.2	15.43	-
120	1.4	1.0	16.08	0.38
45	1.0	1.1	13.22	-
135	1.0	1.5	15.89	-
90	0.4	1.4	10.61	0.22
90	1.6	1.7	16.91	-
90	1.0	1.2	13.86	-

* galactose, arabinose and mannose

3.2 Prehydrolysate composition

Results of xylose and glucose yields are summarized in Tables 2 and 3, for each acid concentration/time combination at stable temperature of 140 °C. The highest xylose yield occurred at 90 min, acid concentration of 1.6% w/w and glucose yield occurred at 120 min, acid concentration of 1.4% w/w. The highest combined glucose and xylose yields were

measured at a residence time of 90 min and acid concentration of 1.6% w/w

Table 1 The chemical composition of aged bamboo

Composition	Aged bamboo (wt%, dry basis)
Cellulose	40.7
Glucan	40.7
Hemicellulose	26.5
Xylan	23.6
Mannan	0.6
Arabinan	1.1
Gallactan	1.2
Ash	1.2
Lignin	27.1

Table 3 Total glucose yield for dilute acid pretreatment

Time (min)	Concentration (%w/w)	CSF	Glucose (mg/ml)	Other sugar* (mg/ml)
60	0.6	1.2	13.86	-
120	0.6	1.3	16.45	-
60	1.4	1.2	15.72	-
120	1.4	1.0	25.83	0.38
45	1.0	1.1	16.91	-
135	1.0	1.5	17.07	-
90	0.4	1.4	15.01	0.22
90	1.6	1.7	21.24	-
90	1.0	1.2	13.86	-

* galactose, arabinose and mannose

3.3 Enzymatic hydrolysis

To assess the effect of different pretreatment conditions tested on the digestibility of pretreated bamboo (WIS fraction), enzymatic hydrolysis tests were performed. The enzymatic hydrolysis yields were expressed as percentage of glucose released for 72 h in relation to potential glucose in WIS fraction. Enzymatic hydrolysis yields are shown in

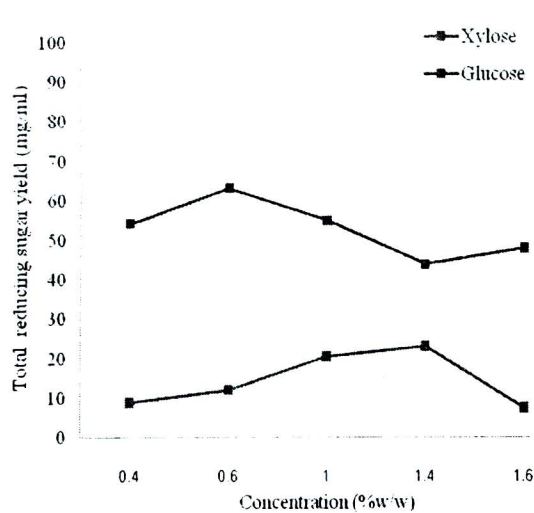


Fig 2 Total reducing sugar yield after enzymatic hydrolysis

Fig 2. The total sugar yield was found to slightly increase as the severity factor increased. In addition, the trend of glucose yield was in contrary to that of the total sugar yield.

3.4 Comparison with literature

Total sugar yields from various lignocelluloses biomass reported in the

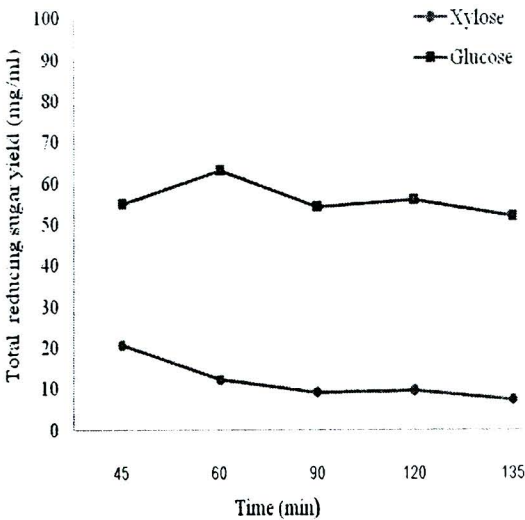


Fig 3 Total reducing sugar yield after enzymatic hydrolysis

literature are shown in Table 4. The yields referred to the total amount of sugars available after pretreatment and enzymatic hydrolysis. It can be seen that total sugar yields from bamboo were comparable to other biomass sources for similar chemicals, temperatures, acid concentrations and residence times used.

Table 4 Comparison with literature for dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass

Lignocellulosic biomass	Acid Type	Concentration (%w/w)	Time (min)	Temperature (°C)	Total sugar yield	Reference
Bamboo	H ₂ SO ₄	0.4-1.6	45-135	140	25.83	This study
Bamboo	H ₂ SO ₄	0.6-1.2	30-90	120-140	15.89	[2]
Olive tree	H ₂ SO ₄	0.2-1.4	10	170-210	13.6-28-33	[8]
Rye straw	H ₂ SO ₄	0.6-1.5	30-90	121	12.5-19.7	[11]
Bermuda grass	H ₂ SO ₄	0.6-1.5	30-90	121	19.5-22.9	[11]
Saline biomass	H ₂ SO ₄	1.4	8	165	36.35	[13]
Pine tree	H ₂ SO ₄	2.21	15-30	180	39.4	[14]
corn cob	H ₂ SO ₄	0.5-2	100-140	100-120	29.84	[15]
Eucalyptus	H ₂ SO ₄	0.92-1.84	30	180	34.9	[16]



4. CONCLUSION

Bamboo biomass is a very important feedstock for the future biofuels. It has composition that was rich in cellulose and hemicelluloses fractions. Conversion by dilute acid to produce sugars was investigated. Acid catalyzed pretreatment of bamboo produced digestible residues and solubilised significant amount of the hemicelluloses fraction.

Maximum glucose yield was obtained at 120 min, 1.4 % w/w and xylose yield was obtained at 90 min, 1.6 % w/w, respectively.

Maximum enzymatic hydrolysis yields of 80% could be achieved with 0.6 % sulfuric acid, at time of 90 min and 5% (w/v) solid concentration.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Faculty of Engineering and the Graduate School, Chiang Mai University. The authors wish to thank Departments of Biology and Agriculture, Chiang Mai University for technical assistance with analytical facilities.

6. REFERENCES

- [1] Zhu, J. Y. and Pan, X. J. (2010) Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production Technology and energy consumption evaluation, *Bioresource Technology*, **101**, 4992–5002.
- [2] Leenakul, W. (2009) Dilute acid pretreatment of bamboo for ethanol production, *Master of Engineering Thesis, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*.
- [3] Zhang, Y. and Pan, Z. (2006) Dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of saline biomass for sugar production, *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, ASABE paper number 067003
- [4] Zhu, J. Y., Wang, G. S., Pan, X. J. and Gleisner, R. (2009) Specific surface for evaluating woodsize -reduction and pretreatment efficiencies, *Chemical Engineering Science*, **64**, 474–485.
- [5] Shimokawa, T., Ishida, M., Yoshida, S. and Nojiri, M. (2009) Effects of growth stage on enzymatic saccharification and simultaneous saccharification and fermentation of bamboo shoots for bioethanol production, *Bioresource Technology*, **100**, 6651–6654.
- [6] Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P. and Jose Negro, M. (2008) Dilute sulfuric acid etreatment of cardoon for ethanol production, *Biochemical Engineering Journal*, **60**, 84–91.
- [7] Campo, I. D., I. Alegr, M. Z., Echeverr, M. and Echeverr, I. (2006) Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production, *Industrial Crops and Product*, **24**, 214–221.
- [8] Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J.M., Saez, F. and Castro, E. (2007) Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by diluteacid pretreatment and enzymatic saccharification, *Bioresource Technology*, **99**, 1869–1876.
- [9] Hayes, D.J.(2009) An examination of biorefining processes, catalysts and challenges, *Catalysis Today*, **145**, 138–151
- [10] Hendriks, A. T. W. M. and Zeeman, G. (2008) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, **80**, 1-9.
- [11] Sun, Y. and Cheng, J. J. (2005) Dilute sulfuric acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol



- productio, *Bioresource Technology*, **96**, 1599-1606
- [12] Sathisuksanoh, N., Zhu, Z., Hoc, T., Bai, M., Heng, Y. and Zhang, P. (2010) Bamboo saccharification through cellulose solvent-based biomass pretreatment followed by enzymatic hydrolysis at ultra-low cellulase loading, *Bioresource Technology*, **101**, 4926-4929
- [13] Lloyd, T. A. and Wyman, C. E. (2005) Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids, *Bioresource Technology*, **96**, 1-11
- [14] Zhu, W., Zhu, J. Y., Gleisner, R. and Pan, X. J. (2010) On energy consumption for sized reduction and enzymatic hydrolysis of lodgepole pine, *Bioresource Technology*, **101**, 2782-2792.
- [15] Chen Y., Dong B., Qin W. and Xiao D. (2010) Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol, *Bioresource Technology*, **101**, 6994-6999
- [16] Wang, G. S., Pan, X. J., Zhu, J. Y., Gleisner, R. and Rockwood, D. (2009) Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods, *Bioresource Technology*, **25**, (4), 6994-6999



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวณัฐดา จันทอม

วัน เดือน ปีเกิด 2 ธันวาคม 2526

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษา โรงเรียนหนองหานวิทยา

ปีการศึกษา 2545

สำเร็จการศึกษาวิทยาสตรบัณฑิต สาขาฟิสิกส์ประยุกต์
(พลังงาน)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีการศึกษา 2549

