



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การเพิ่มมูลค่าอ้อยโดยใช้ประโยชน์จากการย่อยสลาย
เศษยอดและใบอ้อยเพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลและอาหารสัตว์

โดย

ผศ.ดร.จุฑาพร แสงแก้ว และคณะ

พฤษภาคม 2561

สัญญาเลขที่ RDG5750031

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การเพิ่มมูลค่าอ้อยโดยใช้ประโยชน์จากการย่อยสลายเศษ
ยอดและใบอ้อยเพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลและอาหารสัตว์

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.ดร. จุฑาพร แสงแก้ว	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. อ.ดร. พลสันต์ มหาจันทร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. ผศ.ดร. ปานหทัย บัวศรี	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. ผศ.ดร. คณิต วิจิตพันธ์ุ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. น.ส.ณัฐพร หมู่พราหมณ์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชุดโครงการวิจัยด้านอ้อยและน้ำตาล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และ
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ในยุคปัจจุบันกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลจากสารชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก และอ้อยก็เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งเมื่อเกษตรกรเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วก็จะทิ้งส่วนที่เป็นยอดและใบอ้อยไว้เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรจะมีแนวทางในการวิจัยที่จะนำเศษยอดและใบของต้นอ้อยมาใช้ประโยชน์ โดยมีวัตถุประสงค์คือนำเศษยอดและใบอ้อยมาเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์โดยเชื้อรา *Aspergillus tubingensis* HS1-5 และผลิตไบโอเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อย

การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของเศษยอดและใบอ้อยในส่วนขององค์ประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลสพบว่า มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสูงถึง 49.14 % (w/w) การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์โดยการออกแบบการทดลองทางสถิติพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methods) โดยวิธี Central Composite Design (CCD) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์โดยจะพิจารณาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ FPase เป็นหลักคือใช้เศษยอดและใบอ้อยในปริมาณ 14.1 กรัม Mendel's medium ปริมาตร 33 มิลลิลิตร และ pH เป็น 6.68 ให้ค่าพยากรณ์เท่ากับ 191.33 IU/g solid และค่าจริงที่ได้มีค่าสูงถึง 190.74 IU/g solid และเมื่อขยายขนาดการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์พบว่าการผลิตในขนาดปริมาตรรวมเท่ากับ 200 กรัม (10 เท่า) มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ FPase CMCase และ β -glucosidase สูงใกล้เคียงกับสภาวะที่หมักในขนาดรวม 20 กรัม

การทดสอบประสิทธิภาพในการปรับสภาพเศษยอดและใบอ้อยเพื่อให้ได้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเอทานอล พบว่าการใช้ 1% NaOH และตามด้วย 1% H₂SO₄ ให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ร่วมกับการใช้เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ ที่ผลิตโดย *A. tubingensis* HS1-5 ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดถึง 14.6 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาผลิตเอทานอลโดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Ethanol production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หมักเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5339 พบว่ามีการผลิตเอทานอลสูงถึง 5.17 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และเมื่อขยายขนาดการผลิตเอทานอลเป็นขนาด 20 เท่า ของอัตราส่วนเดิม พบว่ามีการผลิตเอทานอลสูงถึง 31.26 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักเอทานอล กรองเอทานอลที่หมักนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดให้ละเอียดและนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบอาหารสัตว์ พบว่า กากวัสดุหมักที่ได้หลังจากการสิ้นสุดกระบวนการหมักเอทานอลมีคุณสมบัติที่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ โดยนำไปปรับสูตรอาหารเพื่อใช้เป็นอาหารหยาบสำหรับโคนมได้

การทดสอบความคงทนของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20, 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ FPase CMCase และ β -glucosidase เป็นเวลา 17 สัปดาห์, 13 สัปดาห์, 11 วัน และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าเซลลูโลสไลติกเอนไซม์มีความคงทนมากกว่า 80% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ดังนั้นการนำเศษยอดและใบอ้อยที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสที่สูงเมื่อถูกย่อยสลายจะได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการนำไปใช้มาเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์และการผลิตไบโอเอทานอล ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญและมีมูลค่าสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งกากวัสดุหมักที่ได้หลังจากการสิ้นสุดกระบวนการหมักเอทานอลมีคุณสมบัติที่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของเศษยอดและใบอ้อยได้อีกทางหนึ่งได้ในอนาคต

Abstract

In the recently, lignocellulosic feedstocks are gaining great interest for bioethanol production. Sugar cane as well-known as plays an important role in Thailand crop. The agriculture residue of sugar cane which farmer always leaves after harvest production both top and sugar cane leave. So the researcher interested for value adds of the waste. The aim of this research, to enhance effectiveness of cellulolytic enzyme production from *Aspergillus tubingensis* and bioethanol by sugar cane top and leaves.

The sugar cane chemical composition was investigated for the component of lignocelluloses which reach 49.14% (w/w). In the order to the optimal condition for high effectiveness production of cellulolytic enzyme was tested by designed statistic experiment as response surface methods following Central Composite Design (CCD) and the optimal conditions for producing cellulolytic enzyme mainly based on FPase activity as 14.1 g of mixed sugar cane top and leave that blending with 33 mL of Mendel's medium and adjust pH at 6.68 which showed the forecast values at 191.33 IU/g solid and the fact value also reach 190.74 IU/g solid. Moreover, the enlargement of cellulolytic enzyme production by using total volume was 200 g (10-fold). The enzymatic activity as FPase, CMCase and Beta-glucosidase were also resemble to the ferment condition at 20g total size.

The optimal pretreatment condition was 1% of NaOH and 1% of H₂SO₄ at 121° C for 60 minutes and the reducing sugar reach 14.6 g/L. The ethanol production process also produced sugar after pretreatment and added 100 mL of ethanol production medium and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5339. From the condition that mentioned before the ethanol product reach 5.17 g/L at 24 hours after fermentation and when rise the scale of ethanol production to 20-fold, the ethanol product highest was 31.26 g/L. After ethanol fermentation, the hydrolysis of substrate was separated and dried at 80° C for 24 hours and gained. Proximate analysis was also determined. The results showed that, the fermented residues after ethanol fermentation had high efficiency for apply to improve the daily cow feed.

The stability of cellulolytic enzymes were determined for 17 weeks, 13 weeks, 11 days and 24 hours by varies temperature at -20, 4, 30 and 45°C. The stability of cellulose enzyme has more than 80%. From the result can indicate that the top and leave of sugar cane has high cellulose composition and after digested them will be the good carbon source as glucose sugar which play a vital role in cellulolytic enzyme production and bioethanol

production. Both cellulolytic enzyme and bioethanol are an important energy source and valuable. Moreover, value added of the end of fermented residues after ethanol fermentation for the daily cow feed will be improved.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เซลลูโลส	2
2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส	3
2.3 การผลิตเอทานอล	4
2.4 อาหารสัตว์	5
2.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 การเตรียมเศษยอดและใบอ้อย	7
3.2 การวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบหลักทางเคมีของใบอ้อย	8
3.2.1 การเตรียมใบอ้อย	8
3.2.2 การเตรียมไฮโดรเซลลูโลสด้วยวิธี Acid chlorite delignification	9
3.2.3 การเตรียมเซลลูโลสด้วยวิธี Alkaline Pretreatment	9
3.2.4 การหาปริมาณเฮมิเซลลูโลส	9
3.2.5 การหาปริมาณลิกนิน	9
3.2.6 การวิเคราะห์หาความชื้น	9
3.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า	10
3.3 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา	10
3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบ solid state	10
3.3.2 ขยายขนาดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 การศึกษากิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์	12
3.4.1 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase	12
3.4.2 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase	12
3.4.3 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ FPase	13
3.5 การย่อยสลายเศษต้นอ้อยใบอ้อยด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์	13
3.6 การศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์และ shelf life ของเอนไซม์	13
3.7 การผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยด้วยวิธี Simultaneous saccharification and fermentation	14
3.8 การศึกษาหองค์ประกอบของกากภายหลังจากการหมักเอทานอล เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์	14
3.8.1 การวิเคราะห์หาความชื้นในอาหารสัตว์	14
3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมด	15
3.8.3 การวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method	16
3.8.4 การวิเคราะห์หาเยื่อใยทั้งหมดในอาหาร	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 ผลการวิเคราะห์หองค์ประกอบหลักทางเคมีของยอดและใบอ้อย	18
4.2 การปรับสูตรสำหรับการเลี้ยงราแบบ solid state fermentation สำหรับผลิตและวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส	19
4.3 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์	27
4.4 ผลการศึกษาคงตัวของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์	45
4.5 การขยายขนาดการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์	49
4.6 การย่อยสลายเศษต้นอ้อยใบอ้อยด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์	50
4.7 การผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อย	52
4.8 การขยายขนาดการผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อย	55
4.9 ผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์	57

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	59
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อุปกรณ์	65
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อและบัฟเฟอร์	68
ภาคผนวก ค สารเคมี	72
ภาคผนวก ง วิธีการวิเคราะห์	74
ภาคผนวก จ บทความสำหรับการเผยแพร่	81

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จาก <i>A. tubingensis</i> HS1-5	10
ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองทางสถิติพื้นผิวตอบสนอง ของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	11
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของยอดและไบอ้อย	18
ตารางที่ 4.2 สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบ solid state	19
ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ	21
ตารางที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ	22
ตารางที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ FPase เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ	23
ตารางที่ 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase เมื่อเลี้ยงใน Mandel's medium ในปริมาตรที่แตกต่างกัน	24
ตารางที่ 4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เมื่อเลี้ยงใน Mandel's medium ในปริมาตรที่แตกต่างกัน	25
ตารางที่ 4.8 กิจกรรมของเอนไซม์ FPase เมื่อเลี้ยงใน Mandel's medium ในปริมาตรที่แตกต่างกัน	26
ตารางที่ 4.9 แสดงกิจกรรมของเซลลูโลไลติกเอนไซม์โดยใช้เศษยอด และไบอ้อยเป็นสับสเตรท	28
ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สำหรับ สมการถดถอยในรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase	30
ตารางที่ 4.11 ค่าสูงสุดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากสมการถดถอยกำลังสอง ในการพยากรณ์โดยมีปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย	34
ตารางที่ 4.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สำหรับ สมการถดถอยในรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ FPase	35
ตารางที่ 4.13 ค่าสูงสุดของกิจกรรมของเอนไซม์ FPase จากสมการถดถอยกำลังสอง ในการพยากรณ์โดยมีปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย	39
ตารางที่ 4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สำหรับ สมการถดถอยในรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase	40

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.15 ค่าสูงสุดของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase จากสมการถดถอยกำลังสองในการพยากรณ์โดยมีปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย	44
ตารางที่ 4.16 ค่าความคงทนของกิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 17 สัปดาห์	45
ตารางที่ 4.17 ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 13 สัปดาห์	46
ตารางที่ 4.18 ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ เก็บที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 11 วัน	47
ตารางที่ 4.19 ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ เก็บที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	48
ตารางที่ 4.20 กิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ที่ผลิตในระดับขนาดการผลิต แบบเล็กและขยายขนาดการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น	49
ตารางที่ 4.21 น้ำตาลรีดิวซ์หลังจากปรับสภาพเศษยอดและใบอ้อยด้วย $1\% \text{ NaOH}$, $1\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ และ $1\% \text{ NaOH}$, $2\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ บ่มร่วมกับ เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ในอัตราส่วน 1:5 และ 1:10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	51
ตารางที่ 4.22 น้ำตาลรีดิวซ์หลังจากปรับสภาพเศษยอดและใบอ้อยด้วย $2\% \text{ NaOH}$, $1\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ และ $2\% \text{ NaOH}$, $2\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ บ่มร่วมกับ เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ในอัตราส่วน 1:5 และ 1:10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	51
ตารางที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเศษยอดและใบอ้อยหลังจาก กระบวนการ Pretreatment ด้วยวิธี TG/DTA	52
ตารางที่ 4.24 ชื่อที่ใช้แสดงแทนตัวอย่างในการหมักเอทานอล	53
ตารางที่ 4.25 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกระบวนการหมักเอทานอลจากเศษยอด และใบอ้อยเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	54
ตารางที่ 4.26 ปริมาณเอทานอลจากกระบวนการหมักเอทานอลจากเศษยอด และใบอ้อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.27 ผลการศึกษารองศ์ประกอบของกากหมักภายหลังจากการหมักเอทานอล เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ที่ขนาด 20 กรัม และ 200 กรัม	57

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	4
ภาพที่ 3.1	7
ภาพที่ 3.2	8
ภาพที่ 3.3	8
ภาพที่ 4.1	31
ภาพที่ 4.2	32
ภาพที่ 4.3	33
ภาพที่ 4.4	36
ภาพที่ 4.5	37
ภาพที่ 4.6	38
ภาพที่ 4.7	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.8 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่างเศษยอดและใบอ้อย (A) และ pH (C)	42
ภาพที่ 4.9 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่างMandel's medium (B) และ pH (C)	43
ภาพที่ 4.10 ผลการผลิตเอทานอลจากการขยายขนาดการหมักเอทานอลเป็น 20 เท่า โดยยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5339 ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	55

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย กระบวนการผลิตอ้อยปัจจุบันเมื่อถึงระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ผู้ผลิตนิยมใช้ไฟเผาต้นอ้อยเพื่อให้เก็บเกี่ยวได้ง่าย แต่การกระทำดังกล่าวจะทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้ลดลง จึงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมทางวิชาการ แต่เนื่องจากจะไม่สะดวกกับผู้เก็บเกี่ยวจึงยังกระทำอยู่ในทุกที่ของประเทศ การใช้วิธีเผาดังกล่าวนอกจากทำให้ผลผลิตน้ำตาลที่ได้ลดลงแล้วยังก่อให้เกิดมลภาวะ และอาจก่อให้เกิดอัคคีภัยขึ้นได้อีกด้วย คณะผู้วิจัยเล็งเห็นถึงปัญหาดังกล่าว จึงมีแนวทางการวิจัยที่จะนำเศษต้นอ้อย อันได้แก่ ส่วนยอดและใบของต้นอ้อย ที่ไม่มีประโยชน์ในขณะนี้ แต่ที่จริงแล้ว ส่วนใบของต้นอ้อยนั้นประกอบไปด้วยองค์ประกอบของเซลลูโลสในปริมาณมากกว่าร้อยละ 70 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งวัสดุเซลลูโลสดังกล่าวเมื่อถูกย่อยสลายแล้วจะได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญและมีมูลค่าสูง ประกอบกับผลพลอยได้ที่เกิดภายหลังกระบวนการหมักเอทานอลด้วยวิธี solid state fermentation ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นอาหารสัตว์ได้เนื่องจากมีปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมโดยเฉพาะแหล่งโปรตีนที่ได้จากเชื้อยีสต์ ดังนั้นการศึกษาวิจัยการใช้ส่วนเหลือทิ้งของต้นอ้อย เช่น ส่วนยอดและใบอ้อย มาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายและผลิตเป็นเอทานอล รวมทั้งผลพลอยได้หลังจากกระบวนการผลิตเอทานอล จะนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางที่จะทำให้เกิดประโยชน์หลายด้านต่อเกษตรกรและประเทศชาติอย่างยิ่ง รวมทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของทิ้งทางการเกษตรของประเทศไทยให้มีค่ามากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับอ้อยโดยการ ผลิตเอทานอลจากการย่อยสลายเศษอ้อยเหลือทิ้งจากการเก็บเกี่ยว เช่น ยอดและใบอ้อย อันประกอบด้วย

1.2.1 เพื่อผลิตเซลลูโลสไดคเอนโซมแบบ solid-state fermentation ด้วยเชื้อรา

Aspergillus tubingensis HS1-5 โดยใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

1.2.2 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเศษต้นยอดและใบอ้อยด้วยสารเคมีและเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5

1.2.3 เพื่อผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยด้วยระบบการหมักที่เหมาะสม

1.2.4 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกากที่ได้หลังการหมักเอทานอลสำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาเป็นอาหารสัตว์

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่ประกอบไปด้วยหน่วยย่อย คือ D-anhydroglucopyranose ต่อกันด้วยพันธะ beta-1,4 glycosidic โดยต่อเรียงกันเป็นสายตรงเรื่อยๆ เกิดเป็นโพลีเมอร์สายยาวที่ไม่มีกิ่งก้านสาขา จำนวนของหน่วยย่อยที่มาต่อกันจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช ตั้งแต่ 200 ถึง 15,000 หน่วย ถ้าพิจารณาภาพเป็นรูปสามมิติของสาย β -1,4 linked glucopyranose พบว่ากลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl group) กลุ่มไฮดรอกซีเมทิล (CH_2OH group) และพันธะ glycosidic จะอยู่ในแนวระนาบเดียวกัน พบว่าหน่วยย่อย D-anhydroglucopyranose นี้ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นแบบ chair form พบประมาณ 2% ของหน่วยย่อยนี้ที่อยู่ในรูป boat หรือ skew form และเนื่องจากสายของ glucan ที่ได้นี้มีผิวหน้าเป็นไฮโดรเจนอะตอมส่วนใหญ่ฉะนั้นโมเลกุลของสาย glucan นี้จึงมีสมบัติเป็น hydrophobic คือไม่ชอบน้ำ ด้วยการต่อพันธะ beta-1,4 นี้จึงเกิดแรงที่ทำให้สาย glucan หมุนบิดตัวได้ 180 องศา รอบแกนกลางจึงทำให้แต่ละสายมีรูปร่างลักษณะที่เปรียบเสมือนแผ่นริบบิ้น สาย glucan แต่ละสายจะมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งเมื่อมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริล แล้วพันธะไฮโดรเจนเกิดระหว่างกลุ่มไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนในวงแหวนของโมเลกุลหน่วยย่อยในสายถัดไป นอกจากนี้ยังพบพันธะไฮโดรเจนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของหน่วยย่อยในสายหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของหน่วยย่อยในอีกสายหนึ่งด้วยสายของ beta-1,4 linked glucan ที่ขนานกันนั้นยึดกันอยู่ด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นจำนวนมาก

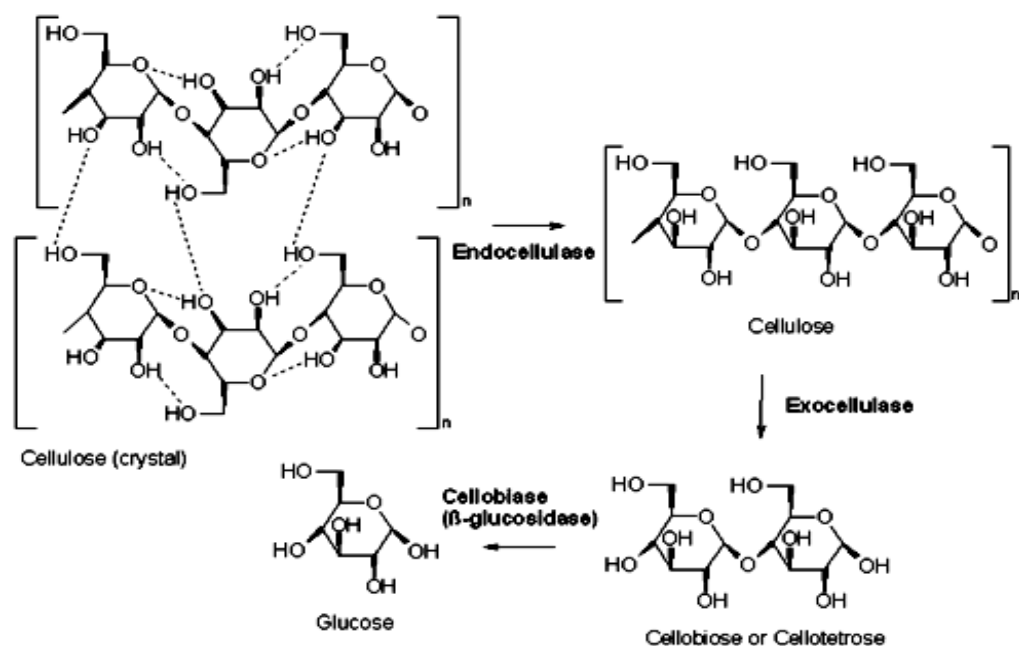
ปริมาณเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งจะมีมากกว่าในไม้เนื้ออ่อน อย่างไรก็ตามปริมาณเซลลูโลสในต้นพืชยังมีความแตกต่างตามอายุของต้นพืช การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์พืช และชนิดของพืช พบเซลลูโลสมากที่ secondary cell wall คือ ประมาณ 50% ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมดที่ primary cell wall คือ ประมาณ 10-20 % ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด ในส่วนของ secondary cell wall เซลลูโลสและสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบร่วมของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพคติน แต่ละชนิดจะรวมตัวกันเป็นไมโครไฟบริล แต่ละสายของไมโครไฟบริลจะเรียงขนานกันและยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยไมโครไฟบริลเหล่านั้นอาจจะม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยไมโครไฟบริลของเซลลูโลส ทำให้รูปร่างของเซลลูโลสในผนังเซลล์มีรูปร่างต่างกัน 3 แบบ

เศษวัสดุทางธรรมชาติต่างๆและพืชเมื่อล้มตายลงจะเกิดการทับถมลงในดินเกิดกระบวนการย่อยสลายทางธรรมชาติ ทำให้ได้สารประกอบอินทรีย์และสารอนินทรีย์เกิดขึ้นและเกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารในดินเป็นสำคัญ ปริมาณเซลลูโลสในพืชจะเปลี่ยนแปลงตามอายุของพืชโดยทั่วไปต้นพืชประกอบไปด้วยเซลลูโลส 40-60 % ในธรรมชาติพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสเป็นแหล่งพลังงานได้ เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่ถูกทำลายได้ยากแต่ถูกย่อยสลายได้เร็วโดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ เป็นต้น

2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส

ปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะสูง เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ปฏิกิริยาไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกทำปฏิกิริยาต่อไป โดย เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน แสดงดังรูปที่ 2.1

Endoglucanase (endo- β -1, 4-glucanase) ตัดพันธะ β -1,4 ภายในสายของเซลลูโลสแบบสุ่ม ผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส และ cello-oligo saccharides ตัวอย่างเอนไซม์ carboxymethyl cellulase Exoglucosidase (exo- β -1, 4-glucanase) ตัดที่บริเวณ non-reducing สุดท้ายของ cellulose ผลผลิตที่ได้คือ cellobiose ตัวอย่างเอนไซม์ cellobiohydrolase beta-glucosidase หรือ cellobiase จะตัดที่พันธะ β -1,4-glycosidic ผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส

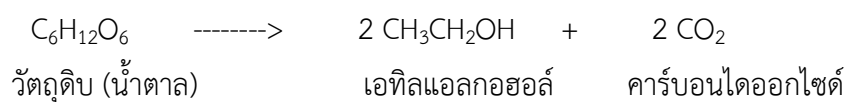


รูปที่ 2.1 กลไกการย่อยเซลลูโลส

(ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:Types_of_Cellulase2.png)

2.3 การผลิตเอทานอล

ปัจจุบันการพัฒนาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (bio-fuel) เป็นเป้าหมายหนึ่งในการพัฒนาประเทศไทยเพื่อลดการนำเข้าน้ำมันดิบและใช้เป็นพลังงานทดแทน ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันเป็นปัจจัยสำคัญในการขับเคลื่อนทางเศรษฐกิจซึ่งทุกวันนี้มีราคาสูงขึ้น จึงต้องมีการพัฒนาหาพลังงานทดแทนน้ำมันดิบ ในกระบวนการผลิตเอทานอลการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนวัตถุดิบ (raw material) ให้กลายเป็นเอทานอล



เอทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางชีวเคมีโดยใช้พืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยมและมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายชนิดตามความเหมาะสมของแต่ละประเทศ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล สาหร่าย ฯลฯ นอกจากนั้นยังมีความพยายามพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสสูง เช่น ฟางข้าว ชี้อ้อย หญ้า เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหล่านี้กำลังเป็นที่สนใจเนื่องจากราคาถูก เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทำให้ต้นทุนของกระบวนการผลิตเอทานอลต่ำลง นั่นคือสอดคล้องกับความต้องการน้ำมันในราคาต่ำ อีกทั้งประเทศไทยยังเป็นประเทศเกษตรกรรมมีวัสดุจำพวกเซลลูโลสมากจึงเหมาะที่จะนำมาเป็นวัสดุในการผลิตเอทานอล โดยเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ จากนั้นน้ำตาลที่ได้ผ่านกระบวนการหมักเพื่อเปลี่ยนให้เป็นเอทานอล

2.4 อาหารสัตว์

อาหารสัตว์ (Feed) หมายถึง อาหารที่สัตว์กินเข้าไปแล้วไม่ทำให้เกิดอันตรายแก่สัตว์ โดยสามารถย่อยและถูกดูดซึมได้ ส่งผลต่อการดำรงชีพ การเจริญเติบโต สืบพันธุ์ และ สร้างผลิตผลต่างๆ ได้ ดังนั้นอาหารสัตว์จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการเลี้ยงและผลิตสัตว์ โดยเป็นแหล่งอาหารที่สัตว์จะนำไปใช้เพื่อเป็นพลังงาน การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์และให้ผลผลิต เช่น เนื้อ นม ไข่ และ ขนสัตว์ เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีการนำส่วนประกอบของยีสต์ ที่เป็นผลพลอยได้ (by product) ที่ได้จากโรงเบียร์ หรือที่ได้จากการผลิตเบียร์มาใช้ประโยชน์ด้วยกันหลากหลายรูปแบบ อาทิเช่น นำมาทำปุ๋ย นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น ซึ่งจะมีทั้งการนำมาใช้ในรูปแบบของเหลว และรูปแบบแห้ง (ผ่านการอบแล้ว) โดยยีสต์ที่ได้จากโรงเบียร์ เป็นยีสต์ที่มีประโยชน์ และเป็นยีสต์ที่ตายแล้ว คงเหลือแต่ผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพ ย่อยสลายได้ทันที นอกจากนี้ยีสต์ที่ได้จากโรงงานผลิตเบียร์ ยังมีอย่างอื่นตามมาด้วย นั่นคือกากของข้าวต่างๆ ที่นำมาทำเบียร์นั่นเอง ทำให้คุณค่าทางอาหาร ที่มีในน้ำยีสต์นั้น มีคุณค่าสูง และเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาทำเป็นอาหารสัตว์ หรือใช้ทำปุ๋ย

จากงานวิจัยนี้เป็นการหมักเอทานอลจากยอดและใบอ้อย โดยผลพลอยได้หลังจากกระบวนการหมักคือกากยอดและใบอ้อยและยีสต์ จะเห็นได้ว่ายีสต์เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ดังนั้นผลพลอยได้จากกระบวนการมีจึงความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

การย่อยสลายเศษใบและยอดอ้อย ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยเซลลูโลสเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่ได้คัดเลือกจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ภายใต้โครงการวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้เซลลูโลสเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2554 โดยได้เชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเซลลูโลสเอนไซม์ คือ เชื้อรา *Aspergillus tubingensis* HS1-5 ที่สามารถผลิต CMCase, FPase และ β -glucosidase ที่มีศักยภาพสูงและสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้เป็นน้ำตาลสำหรับหมักร่วมกับยีสต์และเอทานอลได้ ซึ่งในการวิจัยนี้จะเป็นการต่อยอดงานวิจัยที่ได้ศึกษาผ่านมา โดยการขยายขนาดในการผลิตเอนไซม์ให้ใหญ่ขึ้นและพัฒนากากเอทานอลให้ง่าย นอกจากนั้นจะศึกษาคูณลักษณะกากที่เหลือจากการหมักเอทานอลสำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาไปเป็นอาหารสัตว์ต่อไป

2.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

Singh et al. (2009) การศึกษานี้ศึกษาถึงสภาวะของ pH อุณหภูมิ ที่เหมาะสมของเอนไซม์และความเข้มข้นของสารตั้งต้น สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ไม่ถูกทำลายจากความร้อนของ *Aspergillus heteromorphus* ที่ใช้ในการศึกษา ค่าสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลส คือ pH 4.8 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่า crude enzyme ต่อความเข้มข้นของสับสเตรตเท่ากับ 4:6 กิจกรรมของเอนไซม์ที่คำนวณได้สูงสุดคือ 13.05 U/ml ซึ่งใกล้เคียงกับที่คาดไว้ประมาณ 11.26 U/ml เอนไซม์เซลลูเลสของ *A. heteromorphus* มีประมาณ 60 % ของกิจกรรมที่หลังจาก 1 ชั่วโมง ก่อนการบ่มที่ 90 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบอยู่ที่อุณหภูมิใกล้เคียงกัน ค่า R^2 เท่ากับ 0.9977 และความสำคัญของค่า $p < 0.0001$ แสดงถึงผลของสภาวะที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่เหมาะสม

Shazia et al.(2009) ได้ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิด ซึ่งแปรสภาพจากเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อราที่มีต้นกำเนิดอยู่ที่ประเทศปากีสถาน ได้แก่ *Trichoderma viride* pres. *T. reesie* Rifai, *T. harzianum* Rifai โดยคัดเลือกจากการตรวจสอบการเกิดโซนใสของกิจกรรมเอนไซม์ ในสภาวะการหมักบนอาหาร PDA และ plate screening medium (PMS) ที่ pH 4.0, 5.0 และ 6.0 PMS

พบว่าที่ pH 4.0 มีผลดีที่สุดสำหรับการทดสอบ สายพันธุ์ FCBP-210 และ FCBP-232 ของ *Trichoderma viride* และสายพันธุ์ FCBP-271 และ FCBP-364 ของ *T. reesie* และสายพันธุ์ FCBP-210 และ FCBP-325 ของ *T. harzianum* พบว่ามีความสามารถย่อยเซลลูโลสได้ดีและและมีความการสร้างกิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลสไดคิกผ่านการหมักแบบ submerged โดยตรวจสอบน้ำตาลด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) กิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุดพบที่ 72 ชั่วโมง ของการบ่มที่ 30 ± 2 องศาเซลเซียส pH 4.0

Swangkeaw et al.(2008) ศึกษาการทำเอนไซม์ β -glucosidase ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ของยีสต์ MDD24 ที่ทำให้บริสุทธิ์ ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 657.86 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และมีขนาดของโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน เอนไซม์บริสุทธิ์ β -glucosidase ของยีสต์ MDD24 ถูกยับยั้งการทำงานด้วยน้ำตาลฟรักโทสและซูโครส ในทำนองเดียวกันกลูโคสยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขันด้วยค่าคงที่ของการยับยั้งเท่ากับ 0.0026 โมลาร์ ส่วนเอทานอลมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 4.5 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ถึงแม้ว่าที่สภาวะของการหมักไวน์ (พีเอช 3.5 และ 20 องศาเซลเซียส) กิจกรรมของเอนไซม์มีเพียงประมาณร้อยละ 40 ของกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอชและอุณหภูมิดังกล่าวจากคุณลักษณะต่างๆ ของเอนไซม์ที่ตรวจสอบข้างต้นสรุปได้ว่าสามารถนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MDD24 ไปใช้ในการเพิ่มโมโนเทอร์ปีนในไวน์

Yejun and Hongzhang (2008) การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ β -glucosidase ที่ได้จากเปลือกข้าวโพดเหลือง ซึ่งจะแสดงถึงเอนไซม์ที่ทดสอบใน SSF แสดงค่าความเหมาะสมในการแปรสภาพของพืชด้วยการ glycosyl hydrolase ใน lignocellulose เอนไซม์ β -glucosidase ที่บริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 62.4 kDa หลังจากการเปลี่ยนสภาพของเปลือกข้าวโพดแล้ว สิ่งที่มาคือปัจจัย physicochemical และ kinetic ของเอนไซม์ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสม ความร้อนที่เสถียร pH ที่เหมาะสม ค่า K_m , V_{max} กิจกรรมเอนไซม์ β -glucosidase บน salicin มีความเหมาะสมที่ pH 4.8 และ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลักษณะเฉพาะของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ β -glucosidase ที่มีประโยชน์ใน SFF และใน SFF ได้ปล่อยเอนไซม์ออกมาอย่างรวดเร็วหลังจากย่อยเปลือกข้าวโพดแล้ว และจะยังช่วยส่งเสริมให้เอนไซม์ β -glucosidase บริสุทธิ์มีผลมากกว่าเอนไซม์ β -glucosidase ที่ได้จาก *Aspergillus niger*

Yurayard et al. (2012) แยกราที่มีประสิทธิภาพในการผลิต carboxymethyl cellulase production พบ *Penicillium oxalicum* HS1-3 แยกได้จากดิน จังหวัดชัยภูมิ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมเศษยอดอ้อยและใบอ้อย

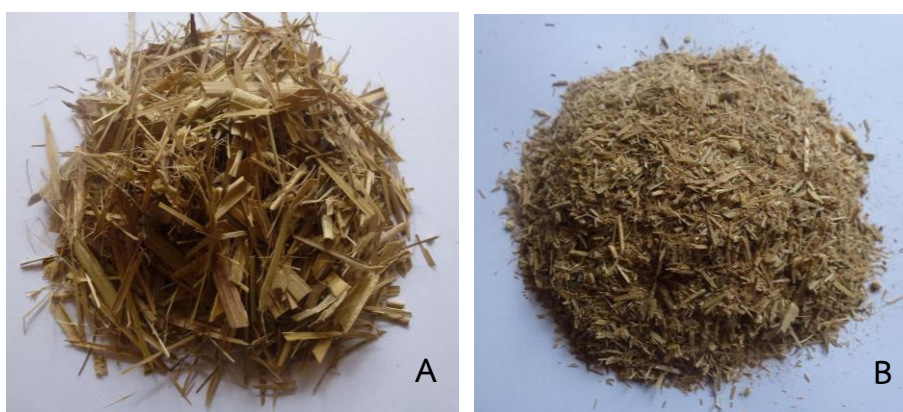
การเก็บตัวอย่างยอดและใบอ้อย เริ่มต้นได้ติดต่อ คุณกิตติพิชญ์ อิงสฤติถาวร เจ้าของไร่อ้อย พูลสวัสดิ์ถาวร (ได้รับคำแนะนำจาก ผศ.ดร. สุวรรณ เนียมสนิท) โดยเก็บตัวอย่างยอดและใบอ้อยจากไร่ อ้อยพูลสวัสดิ์ถาวร หมู่บ้านพาดปอแดง ซึ่งอยู่ใน อำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น (รูปที่ 3.1, 3.2) ในการเก็บตัวอย่างอ้อยจะเก็บส่วนยอดอ้อยที่ชาวไร่อ้อยตัดทิ้ง โดยส่วนยอดมีขนาดเฉลี่ย 5 นิ้ว และมี ใบอ้อยเฉลี่ย จำนวน 7 ใบ โดยการเตรียมตัวอย่างจะนำทั้งยอดและใบ มาปั่นผสมรวมกันทั้งหมด โดย หั่นเศษยอดอ้อยและใบอ้อยเป็นชิ้นเล็กๆ และตากแดดจนแห้ง ปั่นให้ละเอียด ให้มีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร อบให้แห้งที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 3.3)



ภาพที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างยอดและใบอ้อยจากไร่อ้อยพูลสวัสดิ์ถาวร หมู่บ้านพาดปอแดง อำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างยอดและใบอ้อยที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 3.3 ยอดและใบอ้อยภายหลังจากการตัด (A) และป่น (B)

3.2 การวิเคราะห์หองค์ประกอบหลักทางเคมีของใบอ้อย

3.2.1 การเตรียมใบอ้อย

นำใบอ้อยมาล้างด้วยน้ำประปาหลายครั้งจนสะอาดแล้วนำมาตากแดดให้แห้ง จากนั้นนำไปป่นให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องป่นไฟฟ้า นำมาร้อนผ่านตะแกรงให้มีขนาด 35-100 mesh (0.5-0.14 mm) จะได้เป็น Raw I เก็บไว้ในโถดูดความชื้นรอวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การเตรียมไฮโดรคลอไรต์ด้วยวิธี Acid chlorite delignification

การปรับสภาพจะประยุกต์จากวิธีของ Lima และคณะ (2013) ซึ่ง Raw I หนัก 100 กรัม เทใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.6 ลิตร ตามด้วยสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร (ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นเติมกรดอะซิติก

ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย นำไปให้ความร้อนพร้อมกวน ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์และกรดอะซิติกลงในสารละลายทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปกรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของแข็งล้างให้เป็นกลางด้วยน้ำประปา นำไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักจะได้ตัวอย่างที่มีสีขาว เรียกว่า โฮโลเซลลูโลส (เซลลูโลสกับเอมิเซลลูโลส)

3.2.3 การเตรียมเซลลูโลสด้วยวิธี Alkaline pretreatment

ซึ่งตัวอย่างโฮโลเซลลูโลส น้ำหนัก 10 กรัม มาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ในอัตราส่วนร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของแข็งล้างด้วยน้ำประปา นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนัก จะได้เป็นเซลลูโลส

3.2.4 การหาปริมาณเอมิเซลลูโลส

คำนวณจากสมการ

ปริมาณเอมิเซลลูโลส = น้ำหนัก(g) ของโฮโลเซลลูโลส – น้ำหนัก (g) ของเซลลูโลส

3.2.5 การหาปริมาณลิกนิน

ปริมาณลิกนิน(%) = โฮโลเซลลูโลส(%) – เซลลูโลส (%) - ความชื้น(%) - เถ้า (%)

3.2.6 การวิเคราะห์หาความชื้น

ซึ่ง Raw I น้ำหนัก 5 g ใส่ถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในโถดูดความชื้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณความชื้นได้จากสมการที่ 1

$$\text{ความชื้น \%} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}$$

3.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า

ซึ่งตัวอย่าง Raw I หนัก 2 กรัม ลงในถ้วยครุชีเบิลที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ $575 \pm 25^\circ \text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น บันทึกน้ำหนักที่ได้

3.3 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบ solid-state

เชื้อรา *Aspergillus tubingensis* HS1-5 เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงซึ่งคัดแยกได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ เมื่อเพาะเลี้ยงราแบบ solid state บนอาหารที่ประกอบด้วยรำข้าวสาลี (16 กรัม) แกลบ (2 กรัม) และ หมักวัสดุเพาะเลี้ยงเห็ดที่ใช้แล้ว (2 กรัม) pH 5.0 และความชื้นเริ่มต้น 65 % พบปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จาก *A. tubingensis* HS1-5

CMCase (IU/g solid)	FPase (IU/g solid)	β -glucosidase (IU/g solid)
4161.61	166.86	43282.26

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 ในอาหาร ประกอบด้วย รำข้าวสาลีและเศษยอดและใบอ้อย (g/g) ในอัตราส่วน 16:4, 12:8, 8:12, 4:16 และ 2:8 และ Mandel's medium broth (Mandels, 1975) (urea 0.3 กรัมต่อลิตร, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 2 กรัมต่อลิตร, CaCl_2 0.3 กรัมต่อลิตร, MgSO_4 0.3 กรัมต่อลิตร, yeast extract 0.25 กรัมต่อลิตรและ peptone 0.75 กรัมต่อลิตร) pH 5.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (เพื่อให้มีความชื้น 65%) ที่บรรจุในลงถุงพลาสติกชนิดถุงร้อนขนาด 12x18 นิ้ว ปากถุงครอบด้วยท่อพลาสติกกรูปรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร เพื่อบังคับขนาดของปากถุง และปิดปากถุงด้วยจุกสำลีโดยสวมตรึงบริเวณที่ครอบไว้ด้วยท่อพลาสติก ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนหลังจากการฆ่าเชื้อแล้ว (Lotong and Suwanarit, 1983) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 อายุ 3 วัน ที่เพาะเลี้ยงใน PDA slant มาทำให้เป็นสารละลายสปอร์ (spore suspension) ให้มีค่าเท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในถุงปริมาตร 5 มิลลิลิตร คลุกสปอร์ให้ทั่วอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 1, 3, 5, 7 และ 10 วัน แยกกราดออกจากอาหารโดยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเซลลูโลสไดเอนไซม์ พร้อมทั้งวัดปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อย substrate ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง โดยในการเลี้ยง 1 ถุง จะได้ เอนไซม์ประมาณ 20 มิลลิลิตร

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จะใช้วิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methods) ด้วยวิธี Central Composite Design (CCD) เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสม โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 ในอาหาร ประกอบด้วย รำข้าวสาลี และเศษยอดและใบอ้อย (g/g) ในอัตราส่วนต่างๆ และ Mandel's medium ปริมาตรต่างๆ ผลิตเซลล์ูโลไลติกเอนไซม์แบบ solid-state fermentation ด้วยเชื้อรา *Aspergillus tubingensis* HS1-5 โดยใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ูเลส (β -glucosidase, CMCase, FPase) โดยสูตรอาหารแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองทางสถิติพื้นผิวตอบสนองของการผลิตเอนไซม์เซลล์ูเลส

Run	Ratio of sample (g)	Volume mendel's medium (ml)	pH
1	อ้อย 16 g : รำข้าวสาลี 4 g	60.00	4.00
2	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	45.00	5.00
3	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	70.00	5.00
4	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	45.00	5.00
5	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	45.00	5.00
6	อ้อย 16 g : รำข้าวสาลี 4 g	60.00	6.00
7	อ้อย 6 g : รำข้าวสาลี 14 g	30.00	6.00
8	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	45.00	3.32
9	อ้อย 6 g : รำข้าวสาลี 14 g	60.00	6.00
10	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	45.00	5.00
11	อ้อย 2.59 g : รำข้าวสาลี 17.41 g	45.00	5.00
12	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	45.00	6.68
13	อ้อย 16 g : รำข้าวสาลี 4 g	30.00	4.00
14	อ้อย 16 g : รำข้าวสาลี 4 g	30.00	6.00
15	อ้อย 6 g : รำข้าวสาลี 14 g	30.00	4.00
16	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	45.00	5.00
17	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	19.77	5.00
18	อ้อย 19.41 g : รำข้าวสาลี 0.59 g	45.00	5.00
19	อ้อย 11 g : รำข้าวสาลี 9 g	45.00	5.00
20	อ้อย 6 g : รำข้าวสาลี 14 g	60.00	4.00

3.3.2 ขยายขนาดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การขยายขนาดสำหรับการผลิตเอนไซม์ในระดับที่สูงขึ้นโดยทำการทดลองเหมือนการเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบ Solid state ในถุงพลาสติก โดยเลือกสูตรอาหารที่ผลิตเอนไซม์ได้สูง จากนั้นขยายขนาดโดยเพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก 24 x 40 นิ้ว โดยขนาดการผลิตจะมีปริมาตร 1 กิโลกรัม จากนั้นจะผลิตเอนไซม์ให้มีปริมาณมากเพื่อผลิตเอนไซม์สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยในการเลี้ยง 1 ถุง เอนไซม์ประมาณ 520 มิลลิลิตร

3.4 การศึกษากิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์

3.4.1 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase (ดัดแปลง Swangkeaw *et al*, 2008)

ปิเปต 0.002 M p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 0.2 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 45°C 30 นาที ปิเปต 0.25 M Na_2CO_3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานของ p-nitrophenol ที่ A_{405} โดยใช้ p-nitrophenol ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับและคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ หนึ่งยูนิตของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย p-nitrophenyl- β -glucopyranoside แล้วทำให้เกิด p-nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

3.4.2 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (ดัดแปลงจาก Sengupta *et al*, 2000)

ปิเปตสับสเตรต (1% CMC + 0.05M CP buffer) 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองและปิเปตตัวอย่างเอนไซม์ที่ต้องการหาความเข้มข้นของน้ำตาล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วนำไปแช่ในน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ CMCase หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้อย่อยสลาย carboxymethyl cellulose แล้วได้น้ำตาลรีดิคัล 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

3.4.3 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ FPase (Ghose, 1987)

Filter paper ขนาด 3×0.5 เซนติเมตร (0.02 กรัม) เป็นสับสเตรท ใส่ในหลอดปิเปต 0.05M CP buffer 0.5 มิลลิลิตร และปิเปตตัวอย่างเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วนำไปแช่ในน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ FPase หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้อยู่สลาย Filter paper แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาพที่ใช้ในการทดลอง

3.5 การย่อยสลายเศษยอดใบอ้อยด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์

หั่นเศษยอดและใบอ้อยเป็นชิ้นเล็กๆ และตากแดดจนแห้ง ปั่นให้ละเอียดให้มีขนาด 500 ไมโครเมตร อบให้แห้งที่ 90°C เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น pretreatment ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% ในอัตราส่วน 1:10 และใช้ความร้อนที่ 121°C เป็นเวลา 60 นาที (ตรวจ profile การเพิ่มขึ้นของระดับอุณหภูมิในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ) จากนั้นล้างด้วยน้ำจนสภาพเป็นกลาง (แบ่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี) จากนั้นย่อยด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% ในอัตราส่วน 1:10 และใช้ความร้อนที่ 121°C เป็นเวลา 60 นาที และ ล้างด้วยน้ำ (แบ่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี) จากนั้นนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อราที่ผลิตได้ ในอัตราส่วน เอนไซม์ (CMCase 250 IU/ml, FPase 10 IU/ml, β -glucosidase 250 IU/ml) ต่อเศษต้นอ้อยใบอ้อยที่ผ่านการ pretreatment (กรัม) แล้วในอัตราส่วน 1:5 และ 1:10 บ่มที่ 45°C เป็นเวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ศึกษาน้ำตาลที่ได้โดย วิธี DNS หรือ HPLC หรือ glucose oxidase วิเคราะห์และประมวลผลสถานะที่เหมาะสมในการทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด

3.6 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์และ shelf life ของเอนไซม์

การศึกษาลอณภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ที่ผลิตได้เจือจางเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาตรวจหากิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลส (β -glucosidase, CMCase, FPase) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส

การศึกษาค่า pH ต่อกิจกรรมเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ที่ผลิตได้เจือจางเอนไซม์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาตรวจหากิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลส (β -glucosidase, CMCase, FPase) ที่ pH 3-8

การศึกษา Shelf life ของเอนไซม์เซลลูเลส (β -glucosidase, CMCase, FPase) โดยบ่มเอนไซม์ที่ 30, 4 และ -20 องศาเซลเซียส บันทึกปริมาณเอนไซม์ในแต่ละชุดการทดลอง

3.7 การผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยโดยวิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation

ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยโดยวิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation จะทำในโถพลาสติกทรงกระบอกขนาด 18 ลิตร เตรียมหั่นเศษต้นอ้อยใบอ้อยเป็นชิ้นเล็กๆ และตากแดดจนแห้ง บั่นให้ละเอียด ให้มีขนาด 500 ไมโครเมตร อบให้แห้งที่ 90 องศาเซลเซียส 1 วัน ชั่งตัวอย่าง 2 กิโลกรัม จากนั้น pretreatment ด้วย ด่างและกรด ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสลงในวัสดุหมักในอัตราส่วนที่เหมาะสม บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 20.0 กรัมต่อลิตร, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.0 กรัมต่อลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0 กรัมต่อลิตร, yeast extract 5.0 กรัมต่อลิตร, MnSO_4 1.0 กรัมต่อลิตร pH 5.0 ปริมาตร 2, 3 หรือ 4 ลิตร เริ่มหมักเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 (ที่เลี้ยงในอาหาร YPD 24 ชั่วโมง) ให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5×10^5 , 5×10^6 หรือ 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน ศึกษาปริมาณน้ำตาลโดย วิธี DNS หรือ glucose oxidase และเอทานอลด้วย GC

3.8 การศึกษาองค์ประกอบของกากภายหลังจากการหมักเอทานอลเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์

นำกากหลังกระบวนการเก็บเกี่ยวเอทานอลมาวิเคราะห์โดยประมาณ (Proximate analysis) โดยวิธีของ Weende Experiment station โดยวิเคราะห์หาปริมาณ น้ำ (Moisture), โปรตีนหยาบ หรือโปรตีนรวม (Crude protein หรือ $\text{N} \times 6.25$), ไขมันรวม หรือ สิ่งที่สกัดได้ในไขมัน (Crude fat หรือ Ether extract), เยื่อใย (Crude fiber), สารไร้ไนโตรเจนที่ละลายได้ในน้ำ (Nitrogen-free extract) และ เถ้าถ่าน หรือ แร่ธาตุ (Ash หรือ Minerals) เป็นต้น

3.8.1 การวิเคราะห์หาความชื้นในอาหารสัตว์ (Determination of moisture in Animal feed)

เตรียมจานอะลูมิเนียมที่ล้างสะอาดแล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำออกมาจากเตาอบใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก นำกลับไปใส่ในโถอบแห้งจนกระทั่งต้องการใช้จึงนำออกมา บดตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้มีขนาดเล็กเท่าที่จะทำได้ แล้วชั่งน้ำหนักอาหารประมาณ 2-3 กรัม ใส่ในจานอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำจาน

อะลูมิเนียมไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ $100^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ นาน 2 ชั่วโมง นำจานอะลูมิเนียมออกจากเตาอบ แล้วทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง เมื่อเย็นแล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(A-B)}{W} \times 100$$

A = น้ำหนักจานอะลูมิเนียม + ตัวอย่างก่อนการอบ

B = น้ำหนักจานอะลูมิเนียม + ตัวอย่างหลังการอบ

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้เป็นการวิเคราะห์

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมด

เผาเข้ากระเบื้องที่สะอาดและแห้งในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปลอຍให้เย็นในโถอบแห้งแล้วชั่งเพื่อให้ทราบและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน เติมตัวอย่างอาหารที่ต้องการหาเถ้าประมาณ 2 กรัม โดยชั่งให้รู้น้ำหนักที่แน่นอนลงในเข้ากระเบื้อง (ปกติจะเป็นตัวอย่างแห้งที่ได้จากการวิเคราะห์หาความชื้น) นำเข้ากระเบื้องพร้อมตัวอย่างอาหารเข้าไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550-600°C เผาจนเถ้าเป็นสีขาวหรือสีเทาอ่อน ปกติใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ในกรณีที่เถ้าไม่เป็นสีขาว ซึ่งแสดงว่ายังมีสารคาร์บอนหลงเหลืออยู่บ้าง ให้หยดน้ำยาแอมโมเนียมคาร์บอเนต 2-3 หยดลงบนเถ้า ระบายให้แห้งแล้วนำเข้าไปเผาต่อไปในเตาเผาจนได้เถ้าสีขาว ใช้คีมคีบเข้ากระเบื้องจากเตาเผาไปวางให้เย็นในโถอบแห้งแล้วชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด

การคำนวณปริมาณเถ้าทั้งหมด

การคำนวณ

$$\% \text{ เถ้าทั้งหมดในตัวอย่าง} = \frac{(A-B)}{W} \times 100$$

A = น้ำหนักเข้ากระเบื้องที่เย็น + น้ำหนักของเถ้าหลังจากการเผาในเตาเผา

B = น้ำหนักเข้ากระเบื้อง

W = น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการวิเคราะห์

$$\% \text{ เถ้าทั้งหมดในตัวอย่างแห้ง} = \frac{\% \text{ เถ้าทั้งหมดในตัวอย่าง}}{1} \times \frac{100}{\% \text{ สิ่งแห้ง}}$$

$$\% \text{ สิ่งแห้ง (Dry matter)} = 100 - \% \text{ ความชื้น}$$

3.8.3 การวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method

ซึ่งตัวอย่างอาหารให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่บนกระดาษที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (อาหารประเภทปลาป่น กากถั่วต่างๆ ใช้ 1-2 กรัม ธัญพืช ใช้ 2-4 กรัม) แล้วพับกระดาษซึ่งห่อตัวอย่างไว้ในนำมาใส่ใน Kjeldahl digestion flask เติมสารเร่งปฏิกิริยาผสม catalyst mixture นึก 2 กรัม และลูกแก้ว 2-3 เม็ด เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง (bumping) เทกรดกำมะถันเข้มข้น 25 ml. ใส่ลงใน Kjeldahl digestion flask โดยค่อยๆ เท และหากยังมีสารเคมีค้างอยู่จะได้ล้างขวดลงไปด้วย เขย่าอย่างระมัดระวังจนกระทั่งผสมเข้ากันดี เตรียม blank โดยทำเช่นเดียวกันแต่ไม่ใส่ตัวอย่างอาหาร นำ Kjeldahl digestion flask วางในลักษณะเอียงๆ ลงเครื่องมือสำหรับย่อย (digestion apparatus) ให้ความร้อนโดยเริ่มให้ความร้อนน้อยๆ ก่อน จนเมื่อหยุดกระเด็นจึงให้ความร้อนให้เดือด ย่อยไปจนกระทั่งได้สารละลายใส ให้ความร้อนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจว่า oxidation สมบูรณ์แล้วหยุดให้ความร้อน ปล่อยให้เย็น ถ้าที่คอ Kjeldahl digestion flask มีจุดดำๆ ให้ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วให้ความร้อนต่อจนหมดควัน ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 300 ml. ลงใน Kjeldahl digestion flask จึงเติมส่วนผสมของ 4% Boric acid 75 ml. ลงใน Erlenmeyer flask 250 ml. เติม screened methylred indicator 4 หยด แล้วนำไปต่อเข้ากับ condenser ของเครื่องกลั่น จุ่มปลายของ Condenser ลงในกรด สำหรับ Blank ให้ใช้กรดจำนวนที่เท่ากับตัวอย่าง จากนั้นเปิดน้ำให้ไหลผ่าน condenser ให้เย็น ตวงสารละลาย NaOH 45% 80 ml. ค่อยๆ เทลงใน Kjeldahl digestion flask ที่ตั้งอยู่ในลักษณะเอียงเพื่อให้ NaOH ไหลไปตามข้างๆ flask แล้วไหลไปตามข้างๆ flask แล้วรีบนำไปต่อเข้ากับ condenser ของเครื่องกลั่นหมุน Kjeldahl digestion flask เพื่อให้สารผสมเข้ากันดี ให้ความร้อนจนแอมโมเนียถูกกลั่นออกอย่างน้อย 150 ml. ใน Erlenmeyer flask (สังเกตเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู) จึงหยุดให้ความร้อน นำ Erlenmeyer flask ออก ในขณะที่ท่อกลั่นยังอยู่ใน flask เหนือของเหลว ให้ใช้น้ำกลั่นล้างปลายท่อน้ำกลั่นให้ไหลลงใน flask นำ Erlenmeyer flask ซึ่งมีกรดมากเกินไป (excess acid) มา titrate กับ standard 0.10 N HCl จนกระทั่งถึง end point (indicator เปลี่ยนสีจากสีชมพูเป็นสีม่วงแดง) การคำนวณ

1 ml. ของ 1 N HCl = 0.014g Nitrogen

$$\% \text{Nitrogen} = \frac{(S-B) \times 0.014 \times N \times 100}{W}$$

S= ml. ของ HCl ที่ใช้ titrate ตัวอย่าง

B= ml. ของ HCl ที่ใช้ titrate blank

N= Normolity ของ standard HCl

% Crude protein = % Nitrogen × appropriate factor (6.25)

3.8.4 การวิเคราะห์หาเยื่อใยทั้งหมดในอาหาร

ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 2-3 กรัม ใส่ใน Berzelius beaker เติม H_2SO_4 1.25% ลงใน Berzelius beaker 200 ml. (ถ้าอาหารมี % แป้งสูงให้ใส่ prepared asbestos g ก่อนเติมกรด H_2SO_4) นำ Berzelius beaker ไปต่อเข้ากับเครื่องย่อยหาเยื่อใยที่มี condenser เพื่อควบคุมความเข้มข้นของสารละลายให้คงที่เป็นเวลา 30 นาที รับนำสารละลายออกจากเครื่องย่อยแล้วกรองตะกอนด้วยเครื่องบนผ้าลินินบน Buchner funnel ที่ต่อกับ filtering flask โดยอาศัย suction pump ช่วย แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นร้อน จากนั้นชุดตะกอนออกจากผ้าลินินให้หมด ใส่คืนลงใน Beaker ใบเดิม เติมน้ำต่าง NaOH 1.25% ปริมาตร 200 ml ลงใน Beaker แล้วล้างตะกอนอีกครั้ง ด้วยน้ำร้อนจนหมดต่างและล้างด้วย methanol ประมาณ 20-25 ml. ชุดตะกอนออกจากผ้าลินินให้หมด ด้วยช้อนและ spatula แล้วใส่ใน Crucible ที่เผาไว้เรียบร้อยแล้ว (ระวังอย่าให้ตกหล่น)

นำ Crucible พร้อมตะกอนไปอบที่เตาอบอุณหภูมิ $100^{\circ}C$ ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำ Crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccators แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำ Crucible พร้อมตะกอนไปเผาที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนตะกอนถูกเผาไปจนเป็นเถ้า นำ Crucible ออกมาทิ้งให้เย็นให้เย็นใน desiccators แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง

การคำนวณ

$$\% \text{ Crude fiber} = \frac{(A - B) \times 100}{W}$$

A = น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักกากที่ย่อยแล้วหลังอบแห้ง

B = น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักเถ้าหลังจากเผา

W = น้ำหนักของอาหารที่ใช้หาเยื่อใย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบหลักทางเคมีของยอดและใบอ้อย

เศษยอดและใบอ้อยที่นำมาใช้เป็นวัสดุในการหมัก ถูกเตรียมโดยการตากแห้งป่นให้มีขนาดเล็กลงแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเศษยอดและใบอ้อย โดยวิเคราะห์หาเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เถ้า และความชื้น ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ผลการทดลองพบว่าเศษยอดและใบอ้อยมีส่วนประกอบที่เป็นเซลลูโลส มีค่าเป็น 49.14% (w/w) ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสและลิกนินมีค่าเป็น 26.72% (w/w) และ 12.10% (w/w) ตามลำดับ และเมื่อนำเฉพาะส่วนใบมาหาองค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีส่วนประกอบที่เป็นเซลลูโลสเป็น 47.98% (w/w) และเฮมิเซลลูโลสและลิกนินมีค่าเป็น 38.06 และ 3.79 % (w/w) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของยอดและใบอ้อย

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละโดยน้ำหนัก (%)	
	ส่วนยอดและใบอ้อย	ส่วนใบอ้อย
เซลลูโลส	49.14	47.98
เฮมิเซลลูโลส	26.72	38.06
ลิกนิน	12.10	3.79
เถ้า	7.49	6.17
ความชื้น	4.63	4.00

มีหลายงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบของเซลลูโลสในสารชีวมวลที่คล้ายคลึงกับการวิจัย เช่น ศึกษาองค์ประกอบของเซลลูโลสในผักตบชวาพบเป็น 34.6% (w/w) (Das *et al.*, 2015) ศึกษาในฟางข้าว ฟางข้าวสาลี และชานอ้อยพบองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็น 41.02%, 38.50% และ 39% (w/w) ตามลำดับ (Narra, 2016) ในขณะที่ (Roberto, 2013) ได้ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของชานอ้อยก่อนที่จะผ่านกระบวนการแปรสภาพด้วยกรดและด่าง พบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็น 34.1% (w/w) ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสและลิกนินเป็น 29.6% (w/w) และ 19.4% (w/w) ตามลำดับ (Raud *et al.*, 2016) ได้ศึกษาหาองค์ประกอบของเซลลูโลสในฟางข้าวบาร์เลย์ ก่อนที่จะ Pretreatment ด้วยวิธี N₂ exposive พบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลสมากถึง 45.7% (w/w)

การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุหมักนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญเพื่อศึกษาหาปริมาณของเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเศษยอดและใบอ้อยนอกจากจะมีองค์ประกอบของเซลลูโลสที่สูงแล้ว ลิกนินซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ยับยั้งกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลสพบว่ามีค่าเป็น 12.10% (w/w) ซึ่งพบในปริมาณที่ต่ำกว่าที่ศึกษาในในผักตบชวาที่มีลิกนิน 21.4% (w/w) (Das *et al.*, 2015) และชานอ้อยพบลิกนิน 19.4% (w/w) (Roberto, 2013)

4.2 การปรับสูตรสำหรับการเลี้ยงราแบบ solid state fermentation สำหรับผลิตและวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 ในอาหาร ประกอบด้วย รำข้าวสาลี (กรัม) และเศษยอดและใบอ้อย (กรัม) ในอัตราส่วน 16:4, 12:8, 8:12, 4:16 และ 2:8 และ Mandel's medium 50 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้น 70% w/w) ผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์แบบ solid-state fermentation ด้วยเชื้อรา *Aspergillus tubingensis* HS1-5 โดยใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (β -glucosidase, CMCase, FPase) โดยสูตรอาหารแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบ solid state

สูตรอาหาร	ปริมาณรำข้าวสาลี (g)	ปริมาณใบอ้อย (g)
A	16	4
B	12	8
C	8	12
D	4	16
E	2	18

ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบ solid state ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase เมื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยวิธี solid state ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 8 กรัม และใบอ้อย 12 กรัม ที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ให้กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase สูงที่สุดเป็น 80548.92 IU/g solid ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เมื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยวิธี solid state ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 16 กรัม และใบอ้อย 4 กรัม ที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ให้กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงที่สุด

เป็น 3499.99 IU/g solid และกิจกรรมของเอนไซม์ FPase เมื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยวิธี solid state ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 4 กรัม และไบอ้อย 16 กรัม ที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ให้กิจกรรมของเอนไซม์ FPase สูงที่สุดเป็น 105 IU/ml

ในการทดลองขั้นต่อไปจะเลือกใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 8 กรัม และไบอ้อย 12 กรัม เนื่องจากลดปริมาณการใช้รำข้าวลง เนื่องจากรำข้าวสาลีต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพง โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหารดังกล่าวพบเอนไซม์ β -glucosidase, CMCase และ FPase ปริมาณสูง

ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ

สูตรอาหาร	วันที่	β -glucosidase (IU/g solid)	Uncertainty ($\pm$)
A (16:4)	1	102.09 $\pm$ 8.00	8.00
	3	44,640.33 $\pm$ 36,947.85	36,947.85
	5	19,849.38 $\pm$ 6,601.46	6,601.46
	7	22,947.78 $\pm$ 5,274.92	5,274.92
	10	47,239.40 $\pm$ 13,308.05	13,308.05
B (12:8)	1	234.765 $\pm$ 34.79	34.79
	3	63,115.23 $\pm$ 18,534.04	18,534.04
	5	23,022.23 $\pm$ 934.77	934.77
	7	30,814.44 $\pm$ 2,922.96	2,922.96
	10	24,603.03 $\pm$ 8,476.89	8,476.89
C (8:12)	1	406.40 $\pm$ 34.60	34.60
	3	80,548.92 $\pm$ 585.45	585.45
	5	14,404.94 $\pm$ 1,763.18	1,763.18
	7	20,174.45 $\pm$ 3,087.13	3,087.13
	10	42,811.80 $\pm$ 9,574.30	9,574.30
D (4:16)	1	891.93 $\pm$ 188.87	188.87
	3	6,983.07 $\pm$ 1,665.88	1,665.88
	5	6,754.935 $\pm$ 1,734.13	1,734.13
	7	11,914.17 $\pm$ 943.53	943.53
	10	5,458.08 $\pm$ 613.65	613.65
E (2:18)	1	881.13 $\pm$ 263.38	263.38
	3	7,008.60 $\pm$ 639.71	639.71
	5	786.57 $\pm$ 129.27	129.27
	7	8,703.75 $\pm$ 646.80	646.80
	10	3,275.00 $\pm$ 48.21	48.21

ตารางที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ

สูตรอาหาร	วันที่	CMCase (IU/g solid)	Uncertainty (±)
A (16:4)	1	1802.77±28.48	28.48
	3	3499.99±1407.66	1,407.66
	5	1882.41±141.50	141.50
	7	2068.21±51.46	51.46
	10	2208.94±50.38	50.38
B (12:8)	1	519.45±47.14	47.14
	3	1572.84±20.54	20.54
	5	1873.77±47.07	47.07
	7	1975.01±61.95	61.95
	10	2176.85±54.56	54.56
C (8:12)	1	400.92±13.09	13.09
	3	1788.88±179.25	179.25
	5	2000.31±31.34	31.34
	7	2101.84±3.93	3.93
	10	2170.06±79.46	79.46
D (4:16)	1	533.03±42.86	42.86
	3	1359.96±216.85	216.85
	5	1654.63±48.04	48.04
	7	1791.66±73.17	73.17
	10	1791.66±38.80	38.80
E (2:18)	1	650.00±34.25	34.25
	3	1685.19±74.29	74.29
	5	1840.74±60.11	60.11
	7	1929.31±82.87	82.87
	10	1760.19±47.14	47.14

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ FPase เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ

สูตรอาหาร	วันที่	FPase (IU/g solid)	Uncertainty (±)
A (16:4)	1	9.97±	2.31
	3	19.93±	2.61
	5	0.00	0.00
	7	13.33±	1.47
	10	36.02±	5.77
B (12:8)	1	8.30±	0.74
	3	52.05±	1.72
	5	22.71±	3.95
	7	42.49±	9.93
	10	72.36±	0.98
C (8:12)	1	14.89±	0.25
	3	24.57±	2.46
	5	45.39±	0.41
	7	53.39±	1.96
	10	68.89±	2.43
D (4:16)	1	62.64±	1.97
	3	105.22±	4.94
	5	59.74±	2.12
	7	97.36±	10.22
	10	108.12±	25.34
E (2:18)	1	21.15±	6.14
	3	34.86±	5.40
	5	71.32±	3.52
	7	47.47±	15.63
	10	43.89±	0.49

ตารางที่ 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase เมื่อเลี้ยงใน Mandel's medium ในปริมาตรที่แตกต่างกัน

Mandel's medium	วันที่	β -glucosidase (IU/g solid)	Uncertainty ($\pm$)
30 ml	0	0.00	1.49
	1	1847.82	172.36
	3	2130.94	11.60
	5	35575.79	6910.86
	7	40940.63	4772.97
	10	50151.57	696.06
40 ml	0	0.00	2.86
	1	1320.46	53.03
	3	4147.03	36.46
	5	34704.69	3174.14
	7	37307.82	3148.83
	10	39182.82	563.48
50 ml	0	0	6.00
	1	406.40	6.04
	3	80548.92	8.13
	5	14404.94	2423.47
	7	20714.45	3622.65
	10	42811.79	321.65
60 ml	0	0.00	2.32
	1	712.18	175.80
	3	3892.65	89.26
	5	26219.54	82.86
	7	29821.88	2386.49
	10	31907.82	4010.62

ตารางที่ 4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เมื่อเลี้ยงใน Mandel's medium ในปริมาตรที่แตกต่างกัน

Mandel's medium	วันที่	CMCase (IU/g solid)	Uncertainty ($\pm$)
30 ml	0	0.00	72.67
	1	985.83	21.61
	3	2309.44	86.42
	5	1884.45	82.50
	7	2127.96	17.86
	10	2241.39	80.53
40 ml	0	0.00	64.82
	1	1069.17	72.67
	3	1885.83	9.82
	5	1916.38	104.10
	7	2120.55	74.64
	10	2040.00	62.85
50 ml	0	0.00	66.00
	1	400.92	86.04
	3	1788.88	58.13
	5	2000.31	223.47
	7	2101.84	122.65
	10	2170.06	221.65
60 ml	0	0.00	23.57
	1	633.06	115.89
	3	1467.78	343.34
	5	1481.67	19.64
	7	1684.44	60.92
	10	1363.60	178.74

ตารางที่ 4.8 กิจกรรมของเอนไซม์ FPase เมื่อเลี้ยงใน Mandel's medium ในปริมาณที่
แตกต่างกัน

Mandel's medium	วันที่	FPase (IU/g solid)	Uncertainty (±)
30 ml	0	0.00	2.46
	1	41.98	6.63
	3	46.44	3.37
	5	63.51	0.74
	7	67.68	4.17
	10	81.04	6.32
40 ml	0	0.00	17.19
	1	55.00	0.98
	3	47.71	0.49
	5	53.85	2.95
	7	71.49	0.25
	10	66.97	1.7
50 ml	0	0.00	8.00
	1	14.89	12.04
	3	27.57	7.15
	5	45.39	29.27
	7	53.97	26.35
	10	68.89	41.85
60 ml	0	0.00	4.21
	1	25.67	1.23
	3	39.52	1.06
	5	49.05	6.63
	7	49.98	7.61
	10	58.08	3.68

ผลการวิเคราะห์ความชื้นของอาหารเริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราแบบ solid state โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 ในอาหาร ประกอบด้วย รำข้าวสาลี (กรัม) และ เศษยอดและใบอ้อย (กรัม) ในอัตราส่วน 8:12 และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's medium ปริมาตรต่างกัน คือ 30, 40, 50 และ 60 มิลลิลิตร พบว่ามีค่าความชื้นเป็น 60, 65, 70 และ 75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -glucosidase และ FPase คือ 70 % และ CMCase คือ 60 %

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยวิธี solid state ที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ให้กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase สูงที่สุดเป็น 80548.92 IU/g solid ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ให้กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงที่สุดเป็น 2309.44 IU/g solid และกิจกรรมของเอนไซม์ FPase ที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's medium ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ให้กิจกรรมของเอนไซม์ FPase สูงที่สุดเป็น 58.08 IU/g solid

4.3 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ูโลไลติกเอนไซม์

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จะใช้วิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methods) ด้วยวิธี Central Composite Design (CCD) เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสม โดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 ในอาหาร ประกอบด้วย รำข้าวสาลีผสมกับเศษยอดและใบอ้อยในอัตราส่วนต่างๆ จากนั้นเติม Mandel's medium ในปริมาตรที่กำหนดในแต่ละอัตราส่วน ผลิตเซลล์ูโลไลติกเอนไซม์แบบ solid-state fermentation ด้วยเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 โดยใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ูเลส (β -glucosidase, CMCase, FPase)

จากการทดลองเบื้องต้นได้ข้อมูลการผลิตเซลล์ูโลไลติกเอนไซม์ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นการออกแบบการทดลองทางสถิติพื้นผิวตอบสนองของการผลิตเอนไซม์เซลล์ูเลส จะเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.9 แสดงกิจกรรมของเซลล์โลไลติกเอนไซม์โดยใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นสับสเตรท

การ ทดลอง	ใบอ้อย A,(g)	อาหาร B, (g)	pH C	BG (IU/g solid)	CMC (IU/g solid)	FP (IU/g solid)
1	16	60	4	14.23	3470.00	143.71
2	11	45	5	19.39	3847.77	180.28
3	11	70	5	5.91	3308.88	192.78
4	11	45	5	21.55	4114.44	188.61
5	11	45	5	22.10	4392.22	187.92
6	16	60	6	11.16	3908.88	179.58
7	6	30	6	3.42	2061.11	105.97
8	11	45	3.32	23.94	4042.22	171.25
9	6	60	6	2.85	3733.33	139.99
10	11	45	5	23.10	4981.11	190.00
11	2.59	45	5	6.37	3886.66	160.14
12	11	45	6.68	22.00	3908.88	176.80
13	16	30	4	25.75	4075.55	172.63
14	16	30	6	20.48	3753.33	189.30
15	6	30	4	4.73	3738.88	136.53
16	11	45	5	21.00	3958.88	210.13
17	11	19.77	5	10.21	3694.44	165.00
18	19.41	45	5	17.82	4003.33	163.60
19	6	60	4	13.10	3586.66	115.69

BG: β -glucosidase activity

CMC: CMCase activity

FP: FPase activity

จากตารางที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่า ผลการประมวลผลของโปรแกรมจากการเปลี่ยนแปลงตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เมื่อนำข้อมูลจากแผนการทดลองที่ได้มาใช้ในการสร้างสมการถดถอยกำลังสอง (second order regression analysis) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษาที่มีต่อค่ากิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ ได้ค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของ CMCase FPase และ β -glucosidase เท่ากับ 0.7131, 0.8706 และ 0.9365 ตามลำดับ สำหรับสมการถดถอยรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase FPase และ β -glucosidase โดยใช้ค่ารหัสของทั้ง 3 ปัจจัย คือ เศษยอดและใบอ้อย (A), Mandels' medium (B) และ pH (C) ในการพยากรณ์ ดังนี้

$$\text{CMCase} = 4267.70 + 167.23 \times A + 29.02 \times B + 120.08 \times C + 246.25 \times AB + 205.97 \times AC + 323.19 \times BC - 161.20 \times A^2 - 320.35 \times B^2 - 150.87 \times C^2$$

$$\text{FPase} = 121.00 + 22.87 \times A + 5.64 \times B + 7.58 \times C - 10.24 \times A \times B - 2.43 \times AC - 19.10 \times BC - 8.23 \times A^2 - 14.90 \times B^2 + 4.11 \times C^2$$

$$\beta\text{-glucosidase} = 21.51 + 4.89 \times A - 1.52 \times B - 1.70 \times C - 3.58 \times AB + 0.40 \times AC - 0.84 \times BC - 3.71 \times A^2 - 5.19 \times B^2 + 0.13 \times C^2$$

จากสมการถดถอยรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase FPase และ β -glucosidase โดยใช้ค่ารหัสของทั้ง 3 ปัจจัยทำให้ได้ค่าพยากรณ์ของกิจกรรม เป็น 4,333, 191.33 และ 25.16 IU/g solid และจากการทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง แสดงให้เห็นว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ โดยประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางคณิตศาสตร์และสถิติด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) ร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง (CCD) พบว่า ค่ากิจกรรมของ CMCase FPase และ β -glucosidase (5829.63, 190.74 และ 27.14 IU/g solid) มีค่าใกล้เคียงกับค่าค่ากิจกรรมของ CMCase FPase และ β -glucosidase ประมวลผลด้วยโปรแกรม

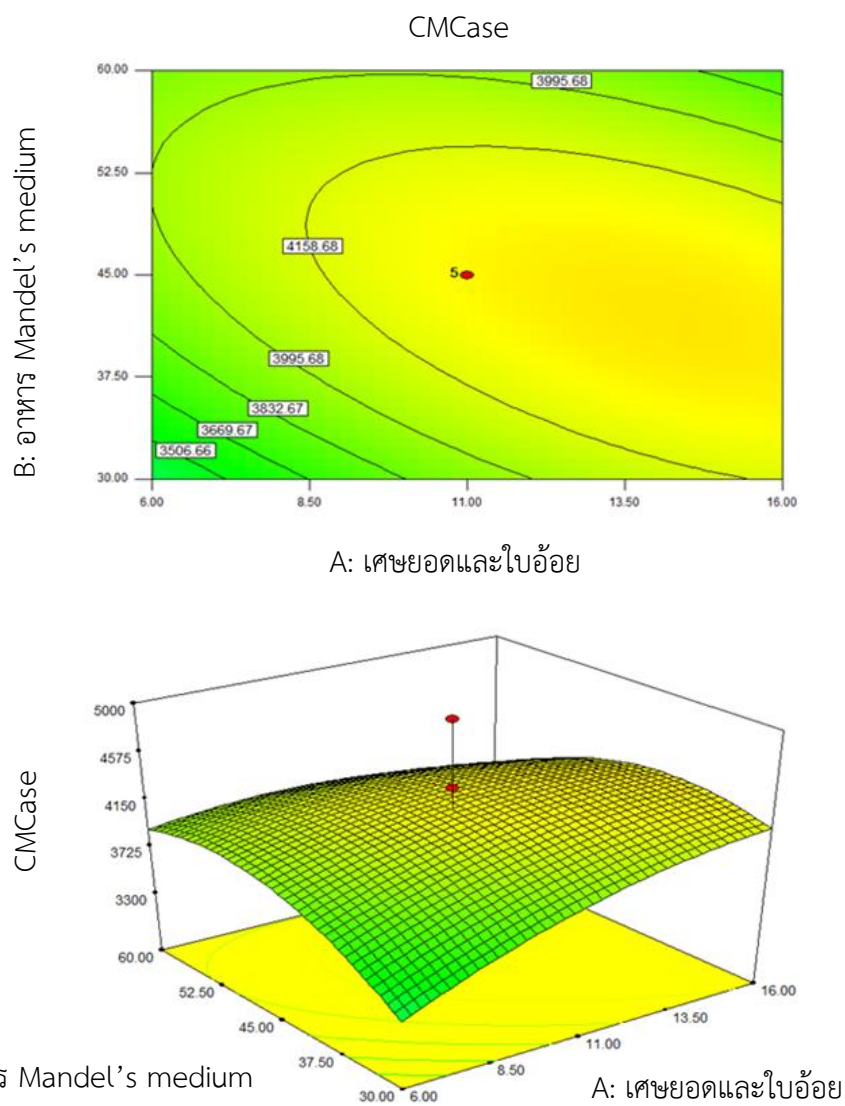
ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สำหรับสมการถดถอยในรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

Source	SS	df	F-value	p-value	
Model	3.934×10^6	9	2.49	0.0956	significant
A-Sugar	3.819×10^5	1	2.17	0.1746	
B-Buf	11459.11	1	0.065	0.8043	
C-pH	1.967×10^5	1	1.12	0.3177	
AB	4.851×10^5	1	2.76	0.1311	
AC	3.394×10^5	1	1.93	0.1982	
BC	8.356×10^5	1	4.75	0.0572	
A ²	3.551×10^5	1	2.02	0.1890	
B ²	1.382×10^6	1	7.86	0.0206	
C ²	3.098×10^5	1	1.76	0.2171	
Residual	1.583×10^6	9			
Lack of Fit	7.635×10^5	5	0.75	0.6293	
Cor Total	5.516×10^6	18			

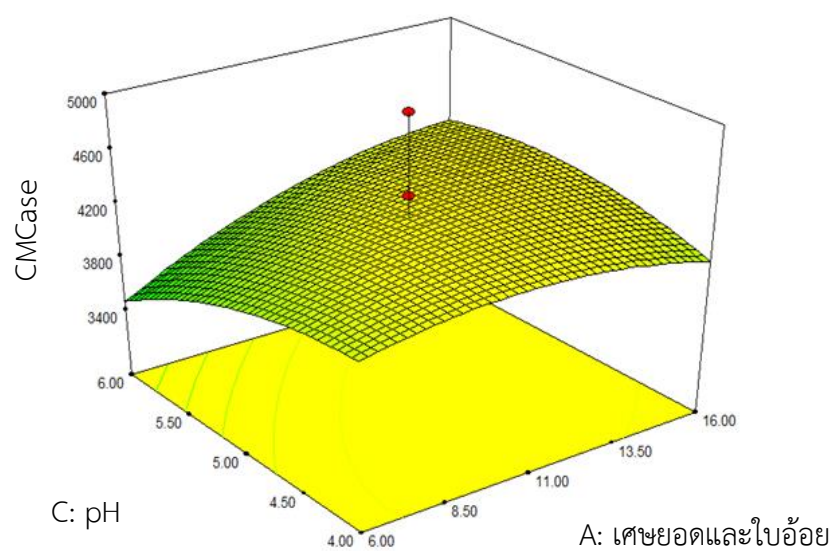
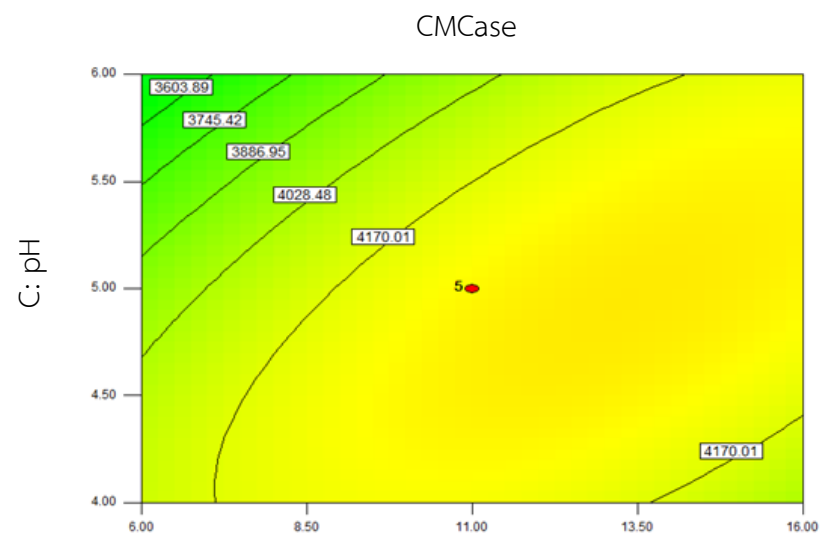
$R^2 = 0.7131$

สำหรับสมการถดถอยรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase โดยใช้ค่ารหัสของทั้ง 3 ปัจจัย คือ เศษยอดและไบอ้อย (A), Mandel's medium (B) และ pH (C) ในการพยากรณ์ดังนี้

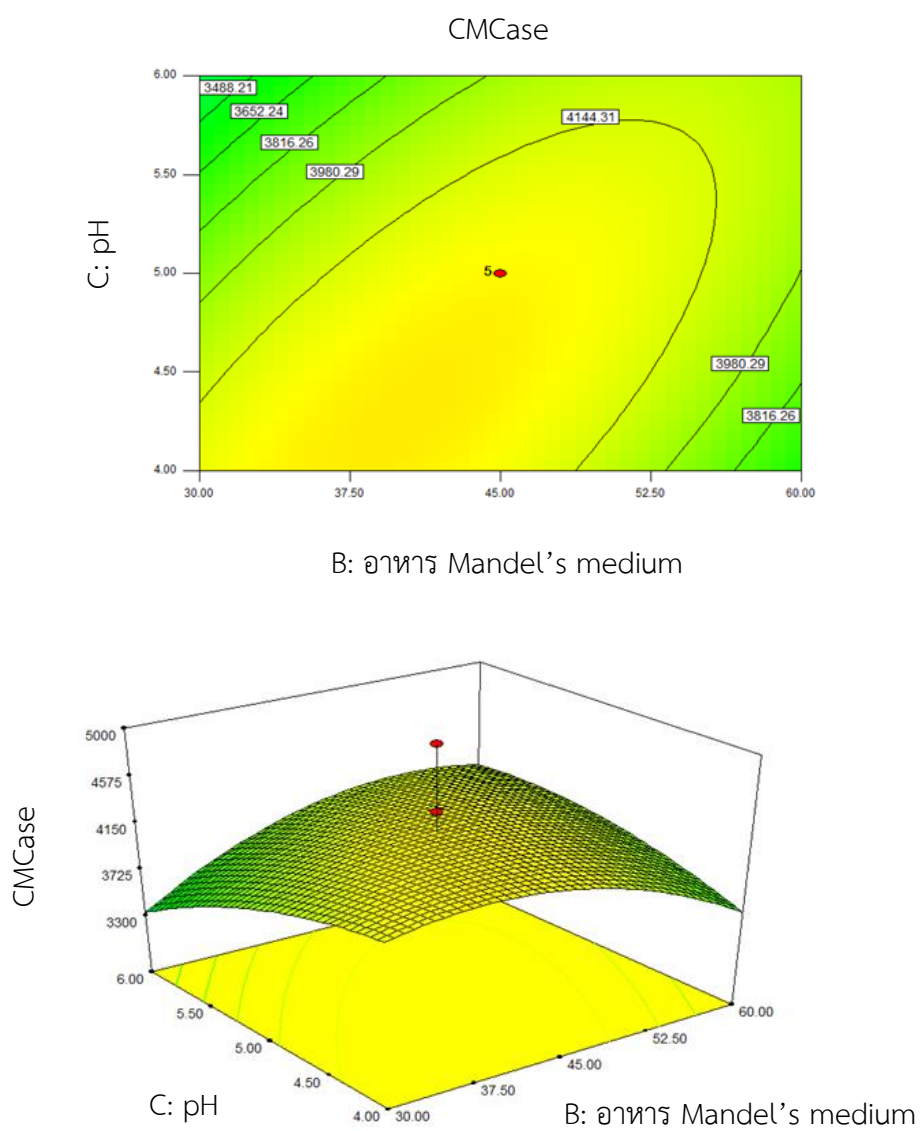
$$\text{CMCase} = 4267.70 + 167.23 \times A + 29.02 \times B + 120.08 \times C + 246.25 \times AB + 205.97 \times AC + 323.19 \times BC - 161.20 \times A^2 - 320.35 \times B^2 - 150.87 \times C^2$$



ภาพที่ 4.1 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่างเศษยอดและใบอ้อย (A) และ Mandel's medium (B)



ภาพที่ 4.2 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่างเศษยอดและใบอ้อย (A) และ pH (C)



ภาพที่ 4.3 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลระหว่าง Mandel's medium (B) และ pH (C)

ตารางที่ 4.11 ค่าสูงสุดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากสมการถดถอยกำลังสองในการพยากรณ์ โดยมีปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย

ปัจจัย	เศษยอดและ ไบอ้อย A, (g)	Mandel's medium B, (ml)	% ความชื้น	pH C	ค่า พยากรณ์	ค่าจริง
	13.16	39.27	64.63	4.55	4,333.00	5,829.63

หลังจากโปรแกรมสร้างสมการถดถอยกำลังสองและทำการประมวลผล จะแสดงสถานะที่เหมาะสมที่สุด (stationary point) ในการผลิตเอนไซม์ CMCase ให้ค่ากิจกรรมมากที่สุดในรูปแบบกราฟสามมิติ ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.1 และ 4.2 และ 4.3 จากกราฟสามมิติพบว่า สถานะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ CMCase คือใช้เศษยอดและไบอ้อยปริมาณ 13.16 กรัม ผสมกับ Mandel's medium ปริมาตร 39.27 มิลลิลิตร และ pH 4.55 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ได้ค่ากิจกรรมของ CMCase เท่ากับ 4,333.00 IU/g solid เมื่อนำสถานะที่ได้จากการประมวลผลของโปรแกรมมาทำการทดลองเพื่อทดสอบซ้ำพบว่าได้ค่ากิจกรรมของ CMCase จากการทดลองเพื่อทดสอบซ้ำมีค่าน้อยค่าที่ได้จากการประมวลผลด้วยโปรแกรมคือ 5829.63 IU/g solid ดังแสดงในตารางที่ 4.11

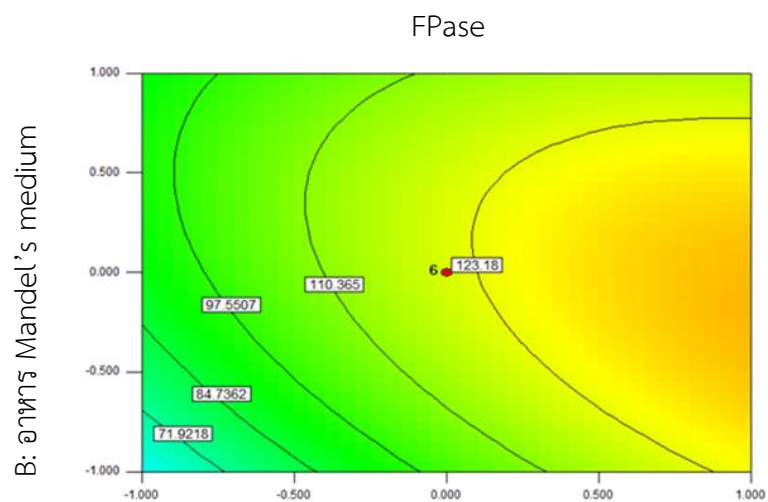
ตารางที่ 4.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สำหรับสมการถดถอยในรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ FPase

Source	SS	df	F-value	p-value	
Model	16595.49	9	7.48	0.0021	significant
A-Sugar	7145.65	1	28.98	0.0003	
B-Buf	434.83	1	1.76	0.2137	
C-pH	783.39	1	3.18	0.1050	
AB	839.37	1	3.40	0.0948	
AC	47.27	1	0.19	0.6708	
BC	2917.64	1	11.83	0.0063	
A ²	977.40	1	3.96	0.0745	
B ²	3201.04	1	12.98	0.0048	
C ²	243.16	1	0.99	0.3441	
Residual	2465.69	10			
Lack of Fit	2465.69	5			
Cor Total	19061.18	19			

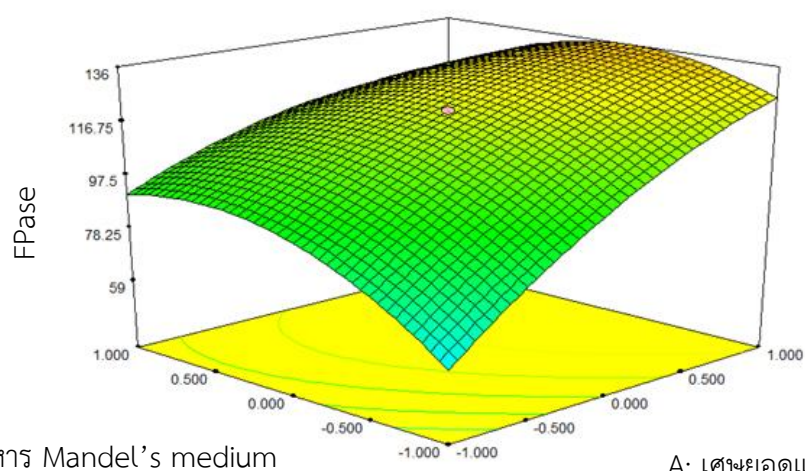
$$R^2 = 0.8706$$

สำหรับสมการถดถอยรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ FPase โดยใช้ค่ารหัสของทั้ง 3 ปัจจัย คือ Sugar cane leaf (A), Mandels' medium (B) และ pH (C) ในการพยากรณ์ ดังนี้

$$\text{FPase} = 121.00 + 22.87 \times A + 5.64 \times B + 7.58 \times C - 10.24 \times A \times B - 2.43 \times AC - 19.10 \times BC - 8.23 \times A^2 - 14.90 \times B^2 + 4.11 \times C^2$$



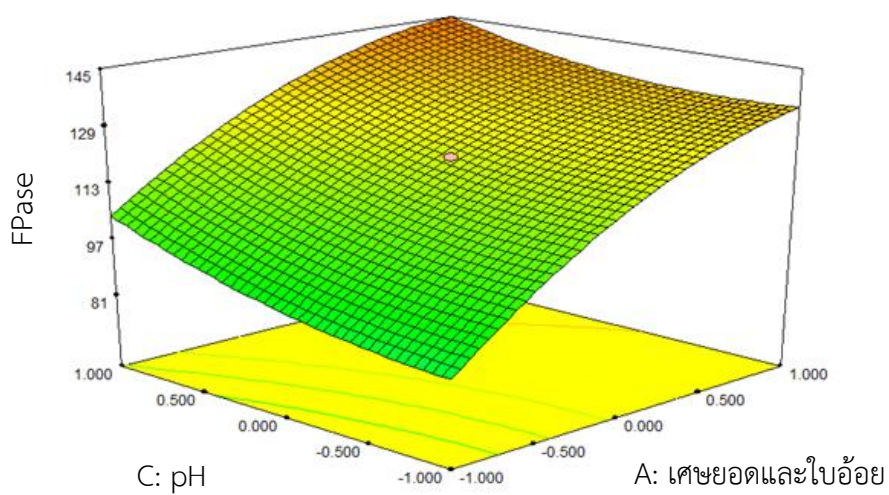
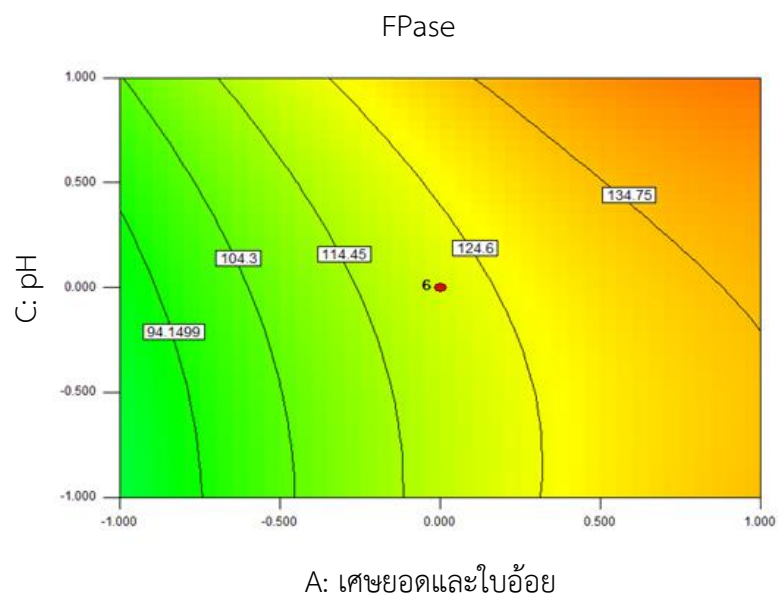
A: เศษยอดและใบอ้อย



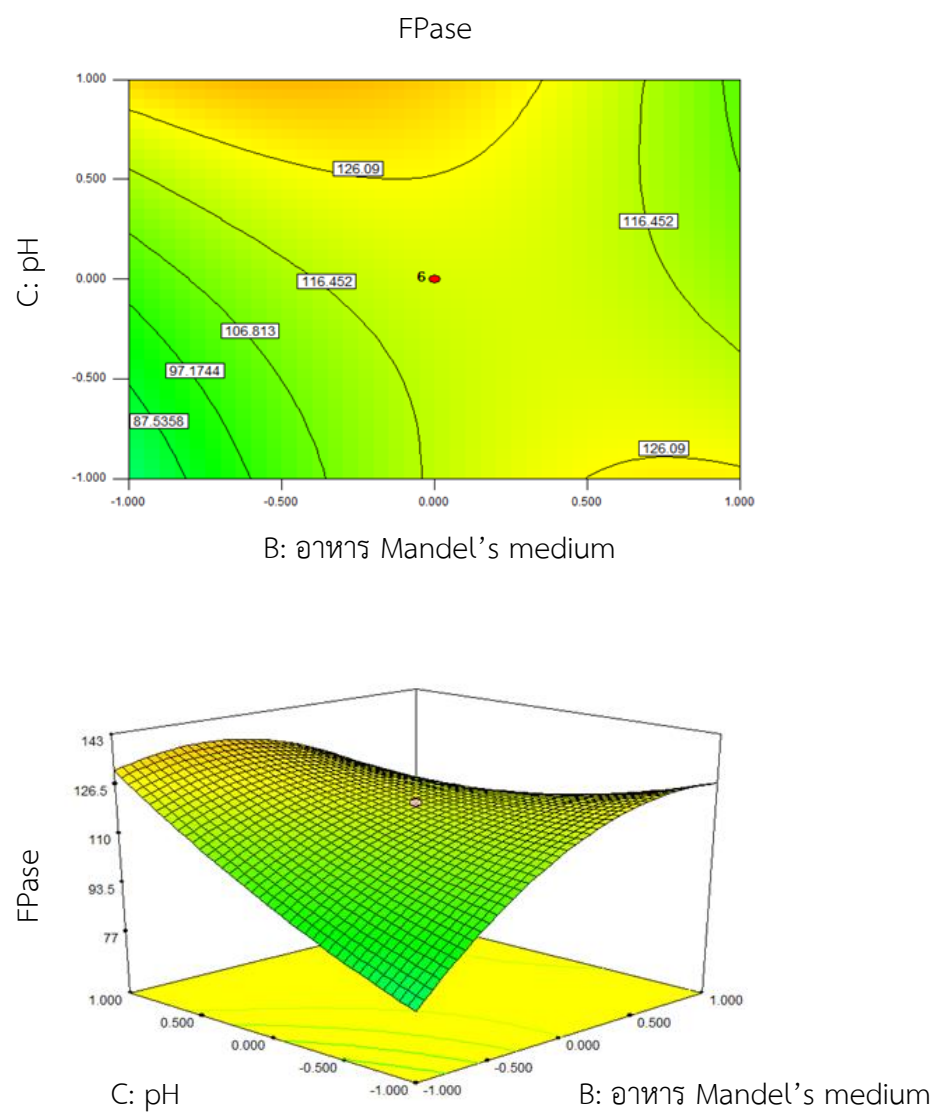
B: อาหาร Mandel's medium

A: เศษยอดและใบอ้อย

ภาพที่ 4.4 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่างเศษยอดและใบอ้อย (A) และ Mandel's medium (B)



ภาพที่ 4.5 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่างเศษยอดและใบอ้อย (A) และ pH (C)



ภาพที่ 4.6 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และ กราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่าง Mandels' medium (B) และ pH (C)

ตารางที่ 4.13 ค่าสูงสุดของกิจกรรมของเอนไซม์ FPase จากสมการถดถอยกำลังสองในการพยากรณ์โดยมีปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย

ปัจจัย	เศษยอดและ ใบอ้อย A,(g)	Mandel's medium B, (ml)	%ความชื้น	pH C	ค่าพยากรณ์	ค่าจริง
	14.1	33	61.50	6.68	191.33	190.74

หลังจากโปรแกรมสร้างสมการถดถอยกำลังสองและทำการประมวลผล จะแสดงสถานะที่เหมาะสมที่สุด (stationary point) ในการผลิตเอนไซม์ FPase ให้ค่ากิจกรรมมากที่สุดในรูปแบบกราฟสามมิติ ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.4 และ 4.5 และ 4.6 จากกราฟสามมิติพบว่า สถานะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ FPase คือใช้เศษยอดและใบอ้อยปริมาณ 14.1 กรัม ผสมกับ Mandels' medium ปริมาตร 33 มิลลิลิตร และ pH 6.68 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ได้ค่ากิจกรรมของ FPase เท่ากับ 191.33 IU/g solid เมื่อนำสถานะที่ได้จากการประมวลผลของโปรแกรมมาทำการทดลองเพื่อทดสอบซ้ำพบว่าได้ค่ากิจกรรมของ FPase จากการทดลองเพื่อทดสอบซ้ำ มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการประมวลผลด้วยโปรแกรมคือ 190.74 IU/g solid ดังแสดงในตารางที่ 4.13

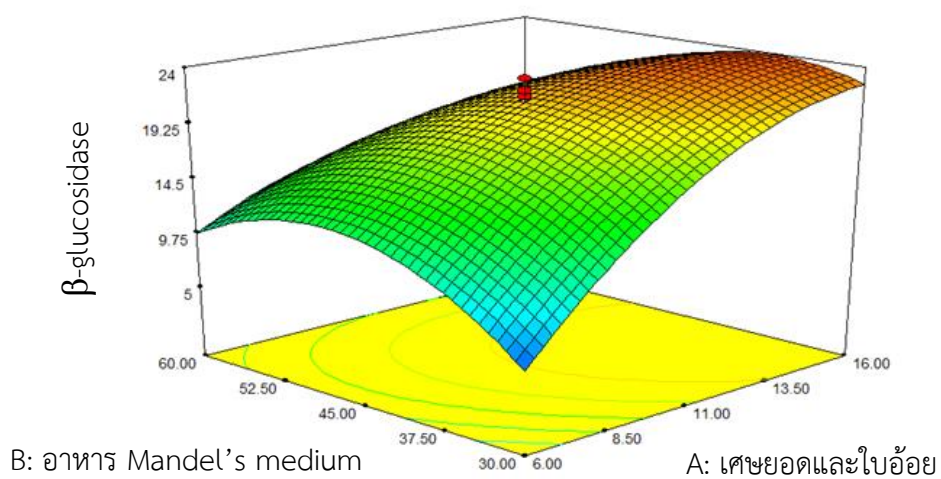
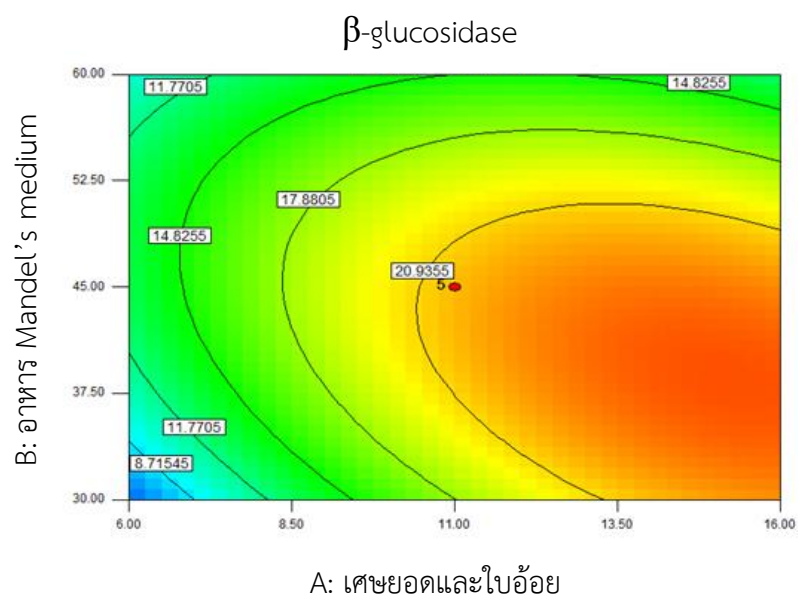
ตารางที่ 4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สำหรับสมการถดถอยในรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase

Source	SS	df	F-value	p-value	
Model	1013.28	9	14.75	0.0002	significant
A-Sugar	326.74	1	42.80	0.0001	
B-Buf	31.52	1	4.13	0.0727	
C-pH	39.26	1	5.14	0.0495	
AB	102.44	1	13.42	0.0052	
AC	1.29	1	0.17	0.6901	
BC	5.67	1	0.74	0.4111	
A ²	188.23	1	24.66	0.0008	
B ²	363.06	1	47.56	< 0.0001	
C ²	0.24	1	0.031	0.8640	
Residual	68.71	9			
Lack of Fit	61.14	5	6.46	0.0474	
Cor Total	1081.99	18			

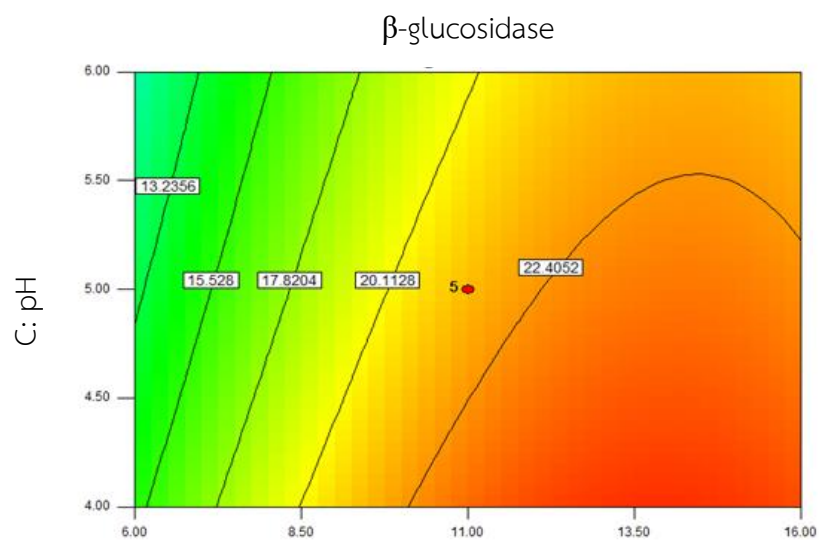
$$R^2 = 0.9365$$

สำหรับสมการถดถอยรูปแบบกำลังสองของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase โดยใช้ ค่าของรหัสทั้ง 3 ปัจจัย คือ เศษยอดและใบอ้อย (A), Mendel's medium (B) และ pH (C) ในการพยากรณ์ ดังนี้

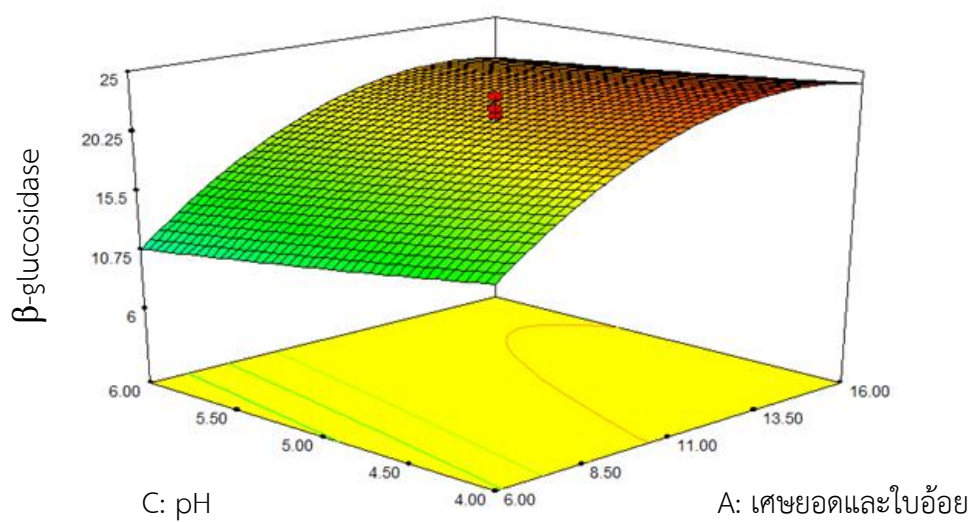
$$\beta\text{-glucosidase} = 21.51 + 4.89 \times A - 1.52 \times B - 1.70 \times C - 3.58 \times AB + 0.40 \times AC - 0.84 \times BC - 3.71 \times A^2 - 5.19 \times B^2 + 0.13 \times C^2$$



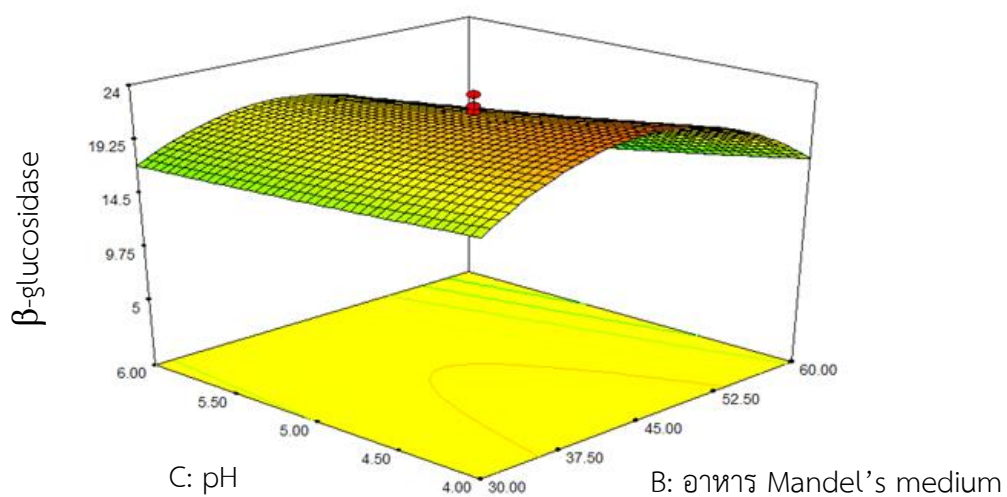
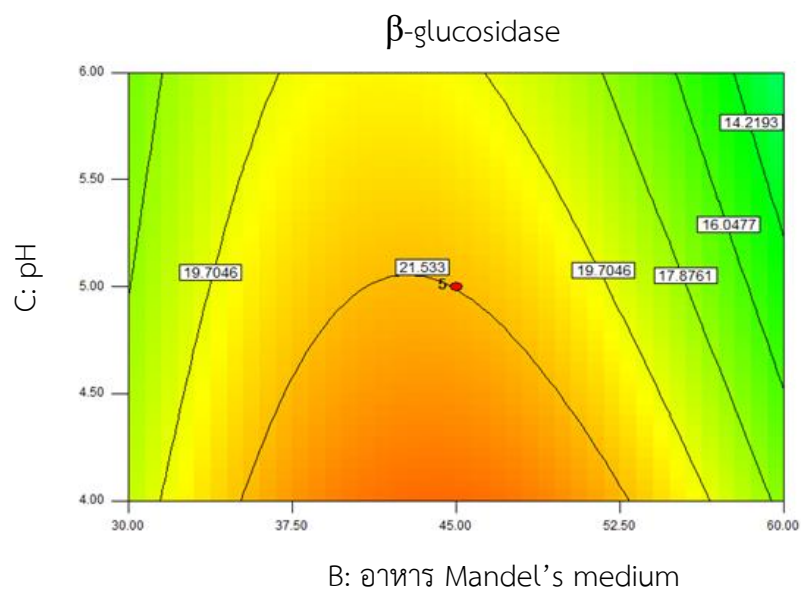
ภาพที่ 4.7 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และ กราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่างเศษยอดและใบอ้อย (A) และ Mandels' medium (B)



A: เศษยอดและใบอ้อย



ภาพที่ 4.8 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลร่วมระหว่างเศษยอดและใบอ้อย (A) และ pH (C)



ภาพที่ 4.9 ผลของพื้นผิวตอบสนอง (Response surface) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ของอิทธิพลระหว่าง Mandel's medium (B) และ pH (C)

ตารางที่ 4.15 ค่าสูงสุดของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase จากสมการถดถอยกำลังสองในการพยากรณ์โดยมีปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย

ปัจจัย	เศษยอดและ ใบอ้อย A,(g)	Mandel's medium B, (ml)	% ความชื้น	pH C	ค่าพยากรณ์	ค่าจริง
	14.82	40.05	65.02	4.00	25.16	27.14

หลังจากโปรแกรมสร้างสมการถดถอยกำลังสองและทำการประมวลผล จะแสดงสถานะที่เหมาะสมที่สุด (stationary point) ในการผลิตเอนไซม์ β -glucosidase ให้ค่ากิจกรรมมากที่สุดในรูปแบบกราฟสามมิติ ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.7 และ 4.8 และ 4.9 จากกราฟสามมิติพบว่า สถานะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ β -glucosidase คือใช้เศษยอดและใบอ้อยปริมาณ 14.82 กรัมผสมกับ Mandel's medium ปริมาตร 40.05 มิลลิลิตร และ pH 4.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ได้ค่ากิจกรรมของ β -glucosidase เท่ากับ 25.16 IU/g solid เมื่อนำสถานะที่ได้จากการประมวลผลของโปรแกรมมาทำการทดลองเพื่อทดสอบซ้ำพบว่าได้ค่ากิจกรรมของ β -glucosidase จากการทดลองเพื่อทดสอบซ้ำ มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการประมวลผลด้วยโปรแกรมคือ 27.14 IU/g solid ดังแสดงในตารางที่ 4.15

จากผลการออกแบบการทดลองทางสถิติพื้นผิวตอบสนองของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทำให้ได้สถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสไดกลีเคอนไซม์และเลือกสถานะที่เหมาะสมของ FPase ซึ่งใช้เศษยอดและใบอ้อยปริมาณ 14.1 กรัม ผสมกับรำข้าวสาลี 5.9 กรัม และ Mandel's medium ปริมาตร 33 มิลลิลิตร pH 6.68 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วันในการทดลองต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vu *et al.* (2011) ได้ศึกษาการหาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสไดกลีเคอนไซม์ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. SU-M15 ที่กลายพันธุ์ภายใต้สภาวะการหมักแบบแข็ง พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยรำข้าวสาลี แกลบ และซีลี้อย พบว่าเมื่อใช้แกลบและซีลี้อยเป็นแหล่งคาร์บอนจะไม่ส่งเสริมการผลิตเซลลูโลสไดกลีเคอนไซม์ ในขณะที่ใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนจะส่งผลต่อการเจริญของ *Aspergillus* sp. SU-M15 ทำให้มีกิจกรรมของเซลลูโลสไดกลีเคอนไซม์ที่สูง และ Liu *et al.* (2011) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูโลสไดกลีเคอนไซม์ของเชื้อรา *A. fumigatus* Z5 ภายใต้สภาวะการหมักแบบแข็งและประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยมีฟางข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อบ่มเชื้อรา *A. fumigatus* Z5 ในฟางข้าวเป็นระยะเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 50°C ส่งผลให้มีกิจกรรมเอนไซม์ FPase และ CMCase สูงขึ้น ในขณะที่หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 7 วันส่งผลให้กิจกรรมเซลลูโลสไดกลีเคอนไซม์ลดลงและ Narra *et al.* (2012) ที่ใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรทในการผลิตเซลลูโลสไดกลีเคอนไซม์โดยเชื้อรา

Aspergillus terreus โดยการหมักแบบ Solid State Fermentation ให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์ FPase เท่ากับ 10.96 U/g

4.4 ผลการศึกษาความคงตัวของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์

การศึกษาความคงตัวของกิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ (CMCase FPase และ β -glucosidase) โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20, 4, 30 และ 45°C จากนั้นวัดค่ากิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ในแต่ละชุดการทดลอง และบันทึกผล โดยผลหลังจากเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20°C แล้วเก็บตัวอย่างมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase, FPase และ β -glucosidase ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 17 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 17 สัปดาห์ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase มีความคงตัวสูงถึง 97.41% ในขณะที่ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase และ FPase มีค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 88.50% และ 81.45% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.16) โดยที่ค่าความคงตัวของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์มีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงแต่ยังมีความคงตัวมากกว่า 80% เมื่อเวลาผ่านไป 17 สัปดาห์

ตารางที่ 4.16 ค่าความคงทนของกิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 17 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (%)		
	β -glucosidase	CMCase	FPase
0	100.00	100.00	100.00
1	100.00	99.63	98.58
3	94.96	93.53	85.26
5	92.06	93.72	88.11
7	95.31	93.90	89.06
9	94.66	93.72	85.26
11	88.62	94.46	81.93
13	89.68	96.67	84.31
15	87.62	96.86	83.36
17	88.50	97.41	81.45

หลังจากเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 13 สัปดาห์ แล้วเก็บตัวอย่างมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase, FPase และ β -glucosidase ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 13 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 13 สัปดาห์ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase มีความคงตัวสูงถึง 93.99% ในขณะที่ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase และ FPase มีค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเป็น 85.69% และ 80.87% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.17) โดยที่ค่าความคงตัวของเซลลูโลสติกเอนไซม์มีแนวโน้มค่อยๆลดลงแต่ยังมีความคงตัวมากกว่า 80% เมื่อเวลาผ่านไป 13 สัปดาห์

ตารางที่ 4.17 ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเซลลูโลสติกเอนไซม์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 13 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (%)		
	β -glucosidase	CMCase	FPase
0	100.0	100.00	100.00
1	98.45	99.31	98.22
2	99.01	98.28	93.43
3	99.26	95.88	92.83
4	97.40	94.85	90.44
5	97.21	94.50	88.05
6	96.16	94.50	83.26
7	84.57	95.19	84.46
8	85.69	95.36	83.26
9	86.31	95.02	85.65
10	86.00	93.99	85.06
11	87.55	93.30	84.46
12	85.69	93.99	80.87
13	83.58	91.58	70.70

หลังจากเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 11 วัน แล้วเก็บตัวอย่างมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase, FPase และ β -glucosidase โดยเก็บตัวอย่างวันเว้นวันเป็นเวลา 11 วัน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 11 วันค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase มีความคงตัวสูงถึง 94.10% ในขณะที่ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase และ FPase มีค่าความคงตัวเป็น 89.63% และ 93.11% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.18) โดยที่ค่าความคงตัวของเซลล์ไลติกเอนไซม์มีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงแต่ยังมีความคงตัวมากกว่า 80% เมื่อเวลาผ่านไป 11 วัน

ตารางที่ 4.18 ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเซลล์ไลติกเอนไซม์ เก็บที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 11 วัน

วันที่	ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (%)		
	β -glucosidase	CMCase	FPase
0	100.00	100.00	99.31
1	97.72	97.22	100.00
3	98.20	96.53	97.25
5	98.32	96.18	97.93
7	92.09	95.49	91.74
9	94.72	94.10	92.42
11	89.63	94.10	93.11

หลังจากเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase, FPase และ β -glucosidase โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase มีความคงตัวสูงถึง 96.37% ในขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase มีค่าความคงตัวเป็น 94.48% และ 86.38% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.19) โดยที่ค่าความคงตัวของเซลล์ไลติกเอนไซม์มีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงแต่ยังมีความคงตัวมากกว่า 80% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.19 ค่าความคงตัวของกิจกรรมของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ เก็บที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (%)		
	β -glucosidase	CMCase	FPase
0	100.00	100.00	100.00
6	99.58	98.79	100.00
12	98.63	97.76	92.87
18	95.83	96.37	83.79
24	96.37	94.48	86.38

จากการทดลองศึกษาความคงตัวของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ในอุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันพบว่าอุณหภูมิที่ต่างกันในการเก็บรักษาเอนไซม์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่อุณหภูมิต่างๆมีความคงตัวมากกว่า 90% และค่าความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase และ FPase ที่อุณหภูมิต่างๆมีความคงตัวมากกว่า 80% เมื่อเทียบกับระยะเวลาเริ่มต้นในการเก็บรักษา ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 โดยใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นสับสเตรทมีความคงตัวสูงเหมาะแก่การนำไปใช้งานในสถานะที่อุณหภูมิแตกต่างกันและการเก็บรักษาเอนไซม์สามารถเก็บรักษาไว้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างโดยที่เอนไซม์ไม่เสียสภาพ

4.5 การขยายขนาดการผลิตเซลล์ูโลลิติกเอนไซม์

การขยายขนาดสำหรับการผลิตเอนไซม์ในระดับที่สูงขึ้นโดยทำการทดลองเหมือนกับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบ Solid State Fermentation ในถุงพลาสติกขนาดรวม 20 กรัม โดยเลือกสูตรอาหารที่ผลิตเอนไซม์ FPase ได้สูง จากนั้นขยาย scale โดยเพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก 24 x 40 นิ้ว โดยขนาดปริมาณรวมในการผลิตจะมีปริมาณ 200, 500 และ 1,000 กรัม (10, 25, 50 เท่า) จากนั้นผลิตเอนไซม์ให้มีปริมาณมากใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์เซลล์ูเลสที่ผลิตในระดับขนาดเล็ก (20 กรัม) และขนาดใหญ่พบว่าการผลิตเอนไซม์ CMCase และ FPase ในระดับขนาดเล็กและขนาดใหญ่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามการผลิตในระดับการผลิตขนาดใหญ่ (1000 กรัม) มีค่าน้อยกว่าระดับขนาดเล็กมาก อาจมีผลเนื่องมาจากการใช้ถุงหมักขนาดเท่ากันแต่ขนาดการผลิตเอนไซม์แตกต่างกันทำให้ปริมาณวัสดุในถุงหมักมีมากเกินไป ส่งผลถึงระบบการถ่ายเทอากาศและการเจริญของเชื้อราไม่ทั่วถึง ซึ่งควรปรับขนาดในการผลิตให้มีวัสดุหมักน้อยกว่าเดิมหรือเพิ่มขนาดถุงหมักให้มีความเหมาะสมต่อปริมาณวัสดุหมักอาจจะส่งผลให้ผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปผู้วิจัยจึงปรับปริมาณของวัสดุหมักลงให้เหลือ 500 กรัม เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แล้วพบว่ากิจกรรมยังไม่สูงเท่าที่ควร จากนั้นผู้วิจัยได้ปรับปริมาณของวัสดุหมักลงให้เหลือ 200 กรัม พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกับขนาดการผลิตเริ่มต้น (20 กรัม) ให้ค่ากิจกรรมของเซลล์ูโลลิติกเอนไซม์ CMCase, FPase และ β -glucosidase มีค่าเป็น 4764.44, 207.01 และ 27.91 IU/g solid ตามลำดับ (ตารางที่ 4.20) ดังนั้นในการขยายขนาดการผลิตเซลล์ูโลลิติกเอนไซม์นักวิจัยจึงผลิตเอนไซม์โดยขนาดการผลิตโดยใช้วัสดุหมักรวม 200 กรัม (10 เท่า)

ตารางที่ 4.20 กิจกรรมของเซลล์ูโลลิติกเอนไซม์ที่ผลิตในระดับขนาดการผลิตแบบเล็กและขยายขนาดการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น

ระดับ scale การผลิตเอนไซม์	กิจกรรมของเอนไซม์ (IU/g solid)		
	CMCase	FPase	β -glucosidase
20 g	5682.75	190.72	27.91
200 g (10 เท่า)	4764.44	207.01	31.71
500 g (25 เท่า)	4336.67	191.39	18.92
1000 g (50 เท่า)	531.481	74.07	3.32

4.6 การย่อยสลายเศษต้นอ้อยใบอ้อยด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์

ในการผลิตเอทานอลโดยใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นแหล่งน้ำตาลโดยวิธีการ Pretreatment ด้วย 1% NaOH และ 2% NaOH ตามด้วย 1% H₂SO₄ และ 2% H₂SO₄ และใช้ความร้อนที่ 121 °C เป็นเวลา 60 นาที เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเศษยอดและใบอ้อยและเป็นการทำให้โครงสร้างผลึกของเซลลูโลสมีขนาดเล็กที่เรียกว่า Oligosaccharide ทำให้การเข้าจับของเอนไซม์มีประสิทธิภาพทำงานได้ดีขึ้นจากนั้นย่อยสลายเศษยอดและใบอ้อยโดยใช้เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ที่ผลิตจากเศษยอดและใบอ้อย โดยใช้อัตราส่วน 1:5 และ 1:10 g/mL (กิจกรรมเริ่มต้นของเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 23,822 , 47,644 IU/g solid, FPase เท่ากับ 1,035 , 2,070 IU/g solid, และ β - glucosidase เท่ากับ 158 , 317 IU/g solid) บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับเศษยอดและใบอ้อย และเก็บผลทุกๆ 6 ชั่วโมง พบว่าผลการย่อยสลายเศษยอดและใบอ้อยด้วย 1% NaOH ตามด้วย 1% H₂SO₄ และย่อยสลายโดยใช้เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ในอัตราส่วน 1:5 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเป็น 14.6 g/L (ตารางที่ 4.21) และเมื่อวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบทางเคมีของเศษยอดและใบอ้อยหลังกระบวนการ Pretreatment พบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจาก 49.73% (w/w) เป็น 63.90% (w/w) ในขณะที่เฮมิเซลลูโลส และลิกนินมีค่าลดลงจาก 22.13 และ 2.22 % (w/w) เป็น 8.70 และ 0.70 % (w/w) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.22) ในการทดลองต่อไป เพื่อเป็นการลดปริมาณความเข้มข้นของ NaOH และ H₂SO₄ จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 1% และใช้อัตราส่วนของเศษยอดและใบอ้อย 1 ส่วน ต่อปริมาตรเอนไซม์ 5 ส่วน (1:5) บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rocha *et al.* (2012) ที่ได้ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของอ้อยที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน 20 สายพันธุ์ โดยพบว่ามีเซลลูโลสเฉลี่ยอยู่ที่ 43.1% (w/w) และหลังการปรับสภาพด้วย 1% NaOH โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เซลลูโลสมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 57.5% (w/w) Roberto (2013) ได้ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของชานอ้อยก่อนผ่านการปรับสภาพพบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็น 34.1% (w/w) และเมื่อปรับสภาพด้วย 4% NaOH พบว่าองค์ประกอบของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 68.0% (w/w)

มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการปรับสภาพที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย เช่น Rocha *et al.* (2012) ได้ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของอ้อยที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน 20 สายพันธุ์ โดยพบว่ามีเซลลูโลสเฉลี่ยอยู่ที่ 43.1% (w/w) และหลังการปรับสภาพด้วย 1% NaOH โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เซลลูโลสมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 57.5% (w/w) Roberto (2013) ได้ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของชานอ้อยก่อนผ่านการปรับสภาพพบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็น 34.1% (w/w) และเมื่อปรับสภาพด้วย 4% NaOH พบว่าองค์ประกอบของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 68.0% (w/w)

ตารางที่ 4.21 น้ำตาลรีตีวซ์หลังจากปรับสภาพเศษยอดและใบอ้อยด้วย 1% NaOH, 1% H₂SO₄ และ 1% NaOH, 2% H₂SO₄ บ่มร่วมกับเซลล์ูโลไลติกเอนไซม์ในอัตราส่วน 1:5 และ 1:10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของต่าง-กรด	ปริมาณน้ำตาลรีตีวซ์ (g/L)		
	ชั่วโมงที่	1:5 (g/mL)	1:10 (g/mL)
1% NaOH, 1% H ₂ SO ₄	6	5.30	0.95
	12	8.65	0.75
	18	11.30	9.90
	24	14.60	12.90
1% NaOH, 2% H ₂ SO ₄	6	0.80	3.30
	12	6.50	4.60
	18	8.10	6.40
	24	9.90	7.41

ตารางที่ 4.22 น้ำตาลรีตีวซ์หลังจากปรับสภาพเศษยอดและใบอ้อยด้วย 2% NaOH, 1% H₂SO₄ และ 2 % NaOH, 2% H₂SO₄ บ่มร่วมกับเซลล์ูโลไลติกเอนไซม์ในอัตราส่วน 1:5 และ 1:10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของต่าง-กรด	ปริมาณน้ำตาลรีตีวซ์ (g/L)		
	ชั่วโมงที่	1:5 (g/mL)	1:10 (g/mL)
2% NaOH, 1% H ₂ SO ₄	6	8.60	6.00
	12	10.70	9.55
	18	12.00	12.30
	24	14.20	14.25
2% NaOH, 2% H ₂ SO ₄	6	5.60	5.00
	12	8.40	7.15
	18	9.35	8.00
	24	13.55	11.15

ตารางที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเศษยอดและใบอ้อยหลังจาก

กระบวนการ Pretreatment ด้วยวิธี TG/DTA

ตัวอย่าง	ร้อยละโดยน้ำหนัก (%)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ก่อน Pretreatment	49.73	22.13	2.22
1% NaOH	63.90	8.70	0.70
2% NaOH	68.00	14.30	5.50
1% NaOH + 1% H ₂ SO ₄	74.70	7.20	3.60
1% NaOH + 2% H ₂ SO ₄	74.4	7.10	1.20
2% NaOH + 1% H ₂ SO ₄	79.00	5.70	3.40
2% NaOH + 2% H ₂ SO ₄	72.90	5.80	3.50

4.7 การผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อย

ในการผลิตเอทานอลจะใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นแหล่งน้ำตาลโดยผ่านกระบวนการ pretreatment ด้วย 1% NaOH และตามด้วย 1% H₂SO₄ และใช้เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ที่ผลิตได้ร่วมในกระบวนการย่อยสลายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย จากนั้นการหมักเอทานอลจะใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลาย ผลการทดลองพบว่าการใช้เศษยอดและใบอ้อย 10 กรัม ผ่านกระบวนการ pretreatment จากนั้นเติมเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ลงในวัสดุหมักในอัตราส่วน 1:5 บ่มที่ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมอาหาร Ethanol production ที่มี pH 5 ลงไปในปริมาตร 100, 200 และ 300 มิลลิลิตร แล้วจึงเริ่มหมักเอทานอลโดยยีสต์ *saccharomyces cerevisae* TISTR 5339 ที่เลี้ยงในอาหาร YPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดังตารางที่ 4.24) ให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 , 10^7 และ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเติมลงไป 10% inoculums ของวัสดุหมัก บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บผลทุกๆ ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, และ 72 เพื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS และเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)

ตารางที่ 4.24 ชื่อที่ใช้แสดงแทนตัวอย่างในการหมักเอทานอล

ตัวอย่าง	ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ (mL)	จำนวนเชื้อที่เติม (10% inoculums) (Cell/mL)
A1	100	10^6
A2	100	10^7
A3	100	10^8
B1	200	10^6
B2	200	10^7
B3	200	10^8
C1	300	10^6
C2	300	10^7
C3	300	10^8

การผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการ Pretreatment เศษยอดและใบอ้อยด้วย เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ และหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จากนั้นวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ พบว่าหลังจากกระบวนการหมักเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 12 ของการหมัก ในขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกเนื่องจากต้องใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตและลดลงอย่างช้าๆตามระยะเวลาการหมักเพื่อผลิตเอทานอล (ตารางที่ 4.25) ส่วนเอทานอลที่ผลิตจากน้ำตาลที่ย่อยด้วยเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. tubingensis* HS1-5 มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 5.17 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 24 ของการหมักเอทานอล และลดลงตามระยะเวลาของการหมักเอทานอล (ตารางที่ 4.26)

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมนี้จึงเลือกสภาวะการผลิตเอทานอลโดยใช้เศษยอดและใบอ้อย 10 กรัม ผ่านกระบวนการ pretreatment เสร็จแล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลสลงในวัสดุหมักในอัตราส่วน 1:5 บ่มที่ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมอาหาร Ethanol production ที่มี pH 5 ลงไปในปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเริ่มหมักเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 (ที่เลี้ยงในอาหาร YPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเติมลงไป 10% inoculums ของวัสดุหมัก บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.25 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกระบวนการหมักเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อย
เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

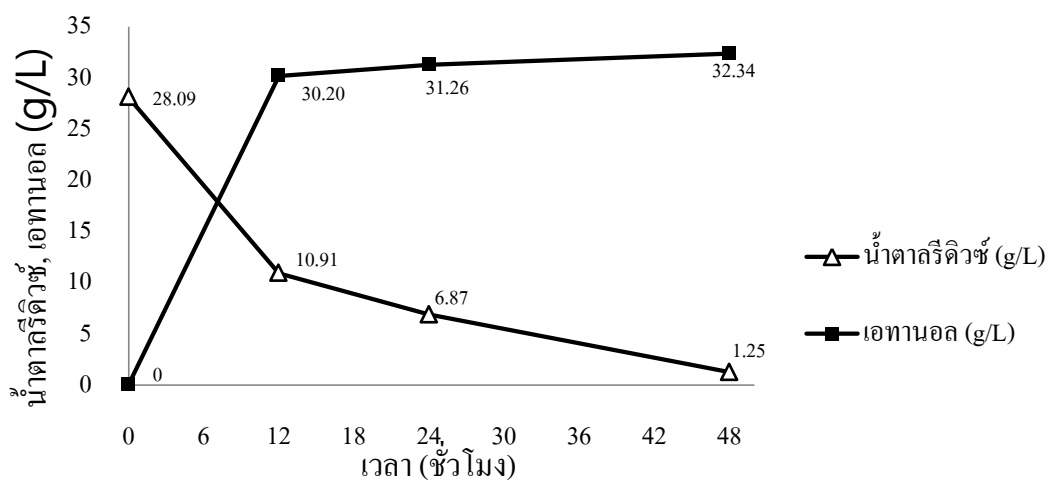
ตัวอย่าง	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)					
	เวลาในการหมักเอทานอล (ชั่วโมง)					
	0	12	24	36	48	72
A1	21.15	11.90	6.83	6.46	6.53	6.35
A2	17.61	6.44	6.55	6.28	6.52	6.07
A3	27.32	7.65	7.10	6.46	6.43	6.31
B1	12.23	8.36	4.72	4.58	4.80	4.32
B2	11.73	4.78	4.66	4.58	4.65	4.23
B3	12.86	6.03	4.71	4.77	4.88	4.06
C1	10.73	6.03	3.65	3.47	3.63	3.35
C2	13.07	5.69	3.63	3.59	3.55	3.48
C3	11.44	3.90	3.78	3.64	3.82	3.16

ตารางที่ 4.26 ปริมาณเอทานอลจากกระบวนการหมักเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อย
เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ปริมาณเอทานอล (g/L)								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
12	4.26	2.56	4.79	2.02	2.93	3.44	1.48	2.27	2.78
24	4.37	4.33	5.17	3.78	3.07	3.59	2.18	2.36	2.79
48	4.37	4.31	4.98	2.97	3.03	3.57	2.3	2.35	2.87

4.8 การขยายขนาดการผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อย

ในการขยายขนาดการผลิตเอทานอลโดยใช้วัสดุหมักคือเศษยอดและใบอ้อยที่ผ่านกระบวนการ Pretreatment ด้วย 1% NaOH และตามด้วย 1% H_2SO_4 ปริมาณ 200 กรัม บ่มร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ $45^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Ethanol production medium ลงในปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร แล้วจึงเริ่มหมักเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 (ที่เลี้ยงในอาหาร YPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเติมลงไป 10% inoculums ของวัสดุหมักบ่มที่ $30^{\circ}C$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อที่ 0, 12, 24, 36, และ 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และศึกษาหาปริมาณเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)



ภาพที่ 4.10 ผลการผลิตเอทานอลจากการขยายขนาดการหมักเอทานอลเป็น 20 เท่า โดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ที่อุณหภูมิ $30^{\circ}C$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากการขยายขนาดการผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยด้วยเซลล์ูโลไลติกเอนไซม์ และหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จากนั้นวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ พบว่า หลังจากกระบวนการหมักเกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 10.91 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.13) และลดลงอย่างช้าๆตามระยะเวลาการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ส่วน เอทานอลที่ผลิตจากน้ำตาลที่ย่อยด้วยเซลล์ูโลไลติกเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. tubingensis* HS1-5 มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เป็น 32.34 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก เอทานอลได้ปริมาณเอทานอล 31.26 กรัมต่อลิตร ตารางที่ 4.16

มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลโดย Liu *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายซังข้าวโพดโดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *A. fumigatus* Z5 พบว่า การใช้ซังข้าวโพด 1 กรัม ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 0.45g/gds และเมื่อหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* BY4741WT ให้ปริมาณเอทานอล 11.20 g/L หลังจากหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมง Yu *et al.* (2008) พบปริมาณเอทานอล 0.46 g ethanol/g sugar ที่ผลิตได้จากการปรับสภาพข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อนในการหมักเอทานอล และ Lima *et al.* (2013) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ป่านครนารายณ์ที่ปรับสภาพโดย 3% H_2SO_4 จากนั้นเริ่มหมักเอทานอลโดยใช้ *S. cerevisiae* พบว่าได้ปริมาณเอทานอลมีค่าเป็น 0.47 g ethanol/g sugar

4.9 ผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์

ตารางที่ 4.27 ผลการศึกษาองค์ประกอบของกากหมักภายหลังจากการหมักเอทานอลเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ที่ขนาด 20 กรัม และ 200 กรัม

รายการวิเคราะห์	กากหมักจากการหมักเอทานอลที่ขนาดต่างกัน	
	20 กรัม	200 กรัม
ความชื้น, %	6.67±0.11	6.39±0.27
เถ้า (Ash), %	9.73±0.44	6.40±0.40
โปรตีน (CP), %	9.32±1.17	17.29±0.43
ไขมัน (EE), %	2.51±0.12	3.17±0.30
เยื่อใยหยาบ (CF), %	39.28±1.93	35.11±0.53
คาร์โบไฮเดรต (NFE), %	32.50±2.90	31.64±0.94
ผนังเซลล์ (NDF), %	67.39±1.30	56.33±1.23
ลิกโนเซลลูโลส (ADF), %	55.21±0.57	53.58±2.61
ลิกนิน (ADL), %	10.90±2.38	24.71±1.06

จากการทดลองศึกษาองค์ประกอบของกากหมักภายหลังจากการหมักเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยด้วยเชลลูโลสไลติกเอนไซม์ และหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ขนาดการหมัก 20 กรัม พบว่า กากเอทานอลมีความชื้น 6.67%, เถ้า 9.73%, โปรตีน 9.32%, ไขมัน 2.51%, เยื่อใยหยาบ (Crude fiber) 39.28%, คาร์โบไฮเดรต 32.50%, ผนังเซลล์ 67.39%, ลิกโนเซลลูโลส 55.21% และ ลิกนิน 10.90% (ตารางที่ 4.27)

เมื่อขยายขนาดการหมักเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยด้วยเชลลูโลสไลติกเอนไซม์ และหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จากขนาด 20 กรัม เป็น 200 กรัม พบว่า กากเอทานอลมีความชื้น 6.39%, เถ้า 6.40%, โปรตีน 17.29%, ไขมัน 3.17%, เยื่อใยหยาบ (Crude fiber) 35.11%, คาร์โบไฮเดรต 31.64%, ผนังเซลล์ 56.33%, ลิกโนเซลลูโลส 53.58% และ ลิกนิน 24.71% (ตารางที่ 4.27)

จากการศึกษาการขยายขนาดการหมักเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยด้วยเชลลูโลสไลติกเอนไซม์ และหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จาก 20 กรัม เป็น 200 กรัม พบว่าสามารถเพิ่มระดับโปรตีนจาก 9.32 เปอร์เซ็นต์ ได้สูงถึง 17.29 เปอร์เซ็นต์โปรตีนต่อวัตถุดิบแห้ง มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ วรวงศ์และฉลอง (2557) ที่พบว่าสามารถเพิ่มระดับโปรตีนได้ 26 เปอร์เซ็นต์โปรตีน นอกจากนี้ ศุภกิจและคณะ (2556) พบว่าการหมักกากเอทานอลจากมัน

สำปะหลังหมักยีสต์สามารถเพิ่มระดับโปรตีนได้ 22 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ยังส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อใย NDF และ ADF ให้มีระดับสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่เหมาะสมของเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด (Acid Detergent Fiber, NDF) และเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง (Acid Detergent Fiber, ADF) ในสูตรอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องควรในช่วง 30-35% และ 20-25% ตามลำดับ จะส่งผลต่อการย่อยได้ในกระเพาะรูเมนได้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และสามารถรักษาสสมดุลความเป็นกรด-ด่าง ในกระเพาะรูเมนให้คงที่ได้ (ฉลอง, 2541) ซึ่งค่า ADF และ NDF จะ สอดคล้องกับรายงานของ ศุภกิจและคณะ (2556) ที่รายงานว่าสามารถใช้กากเอทานอลสดหมักยีสต์ในสูตรอาหารผสมสำเร็จที่มีหญ้าสดเป็นแหล่งอาหารหยาบในโคนมระยะให้นมได้สูงถึง 25% โดยไม่มีผลต่อปริมาณการกินได้ ปริมาณการกินได้เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณการเจริญเติบโตของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งปริมาณการกินได้ของโคนมยังมีผลมาจากปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ลักษณะของอาหาร รสชาติ กลิ่น ความน่ากินของอาหาร ความสัมพันธ์ของพลังงานในอาหาร ความสามารถในการย่อยได้ และน้ำหนักตัว เป็นต้น (ฉลอง, 2541)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากตัวอย่างเศษยอดและใบอ้อยจากไร่อ้อยพุลสวัสดิ์ถาวร บ้านพาดโปแดง อ.บ้านแฮด จ.ขอนแก่น นำมาหาค่าประกอบทางเคมีประเภทลิกโนเซลลูโลส พบว่า มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ 49.14 % (w/w) ในขณะที่ เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เถ้า และความชื้น มีองค์ประกอบเป็น 26.72, 12.10, 7.49 และ 4.63% (w/w) ตามลำดับ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จะใช้วิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methods) ด้วยวิธี Central Composite Design (CCD) เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสม โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสไดคเอนไซม์คือใช้เศษยอดและใบอ้อยปริมาณ 14.1 กรัม ผสมกับ Mendel's medium ปริมาตร 33 มิลลิลิตร และ pH 6.68 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ได้ค่ากิจกรรมของ FPase เท่ากับ 191.33 IU/g solid เมื่อนำสภาวะที่ได้จากการประมวลผลของโปรแกรมมาทำการทดลองเพื่อทดสอบซ้ำพบว่าได้ค่ากิจกรรมของ FPase จากการทดลองเพื่อทดสอบซ้ำ มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการประมวลผลด้วยโปรแกรมคือ 190.74 IU/g solid

เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เหมาะสมจากการผลิตเซลลูโลสไดคเอนไซม์จากเศษยอดและใบอ้อยในวันที่ 3 เหมือนกัน โดยใช้รูปถ่ายเป็นสับสเตรท พบว่า ถึงแม้ว่ารูปถ่ายจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงแต่แนวโน้มการผลิตต้องใช้ระยะเวลายาวนานกว่าการใช้เศษยอดและใบอ้อยจึงเป็นข้อจำกัดในการที่จะนำรูปถ่ายมาใช้เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตเซลลูโลสไดคเอนไซม์ ขยายขนาดการผลิตเซลลูโลสไดคเอนไซม์จากสภาวะที่เหมาะสมข้างต้นโดยขนาดการผลิตที่เหมาะสมคือ ผลิตในขนาด 10 เท่า ให้กิจกรรมของเซลลูโลสไดคเอนไซม์ใกล้เคียงกับการผลิตในขนาดเล็ก ซึ่งกิจกรรมของ CMCase FPase และ β -glucosidase เป็น 4764.44, 207.01 และ 31.71 IU/g solid ตามลำดับ

ทดสอบประสิทธิภาพในการปรับสภาพเศษยอดและใบอ้อยโดยใช้กรด-ด่างย่อยสลายร่วมกับเซลลูโลสไดคพบว่า การใช้ 1% NaOH และตามด้วย 1% H₂SO₄ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ร่วมกับการใช้เซลลูโลสไดคเอนไซม์ผลิตโดย *A. tubingensis* HS1-5 ในอัตราส่วนเศษยอดและใบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 1 กรัมต่อเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดถึง 14.6 กรัมต่อลิตร นำมาผลิตเอทานอล โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ Ethanol production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หมักเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5339 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีการผลิตเอทานอลสูงถึง 5.17 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 และเมื่อขยาย

การผลิตเอทานอลเป็นขนาด 20 เท่า ของอัตราส่วนเดิม พบว่ามีการผลิตเอทานอลสูงถึง 31.26 กรัม ต่อลิตร

การทดสอบประสิทธิภาพความคงทนของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20, 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ FPase CMCase และ β -glucosidase เป็นเวลา 17 สัปดาห์, 13 สัปดาห์, 11 วัน และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าเซลลูโลสไลติกเอนไซม์มีความคงทนมากกว่า 80% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ดังนั้น การนำเศษยอดและใบอ้อยที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสที่สูงเมื่อถูกย่อยสลายจะได้ น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการนำไปใช้มาเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์และการผลิตไบโอเอทานอล ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญและมีมูลค่าสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังเป็น การเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรอีกทางหนึ่งด้วย

จากการศึกษาจากการศึกษาการขยายขนาดการหมักเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยด้วยเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ และหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จาก 20 กรัมเป็น 200 กรัม พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนจาก จาก 9.32% ได้สูงถึง 17.29% แต่มีค่า ADF และ NDF อยู่ในปริมาณที่สูงกว่าค่าที่เหมาะสมคือ 53.58% และ 56.33% ตามลำดับ ซึ่งจะส่งผลเสียต่อปริมาณการกินได้เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณการเจริญเติบโตของสัตว์เคี้ยวเอื้องเมื่อนำกากหมักไปผสมในอาหารให้โคกิน

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวทางว่าควรมีการปรับปรุงขั้นตอนการย่อยสลายเศษยอดและใบอ้อยด้วยกรด-ด่างที่เหมาะสม ก่อนที่จะนำมาเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลต่อไปเพื่อส่งเสริมให้ได้ปริมาณน้ำตาล และเอทานอลให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น และสามารถนำกากหมักมาพัฒนาเป็นอาหารสัตว์ จะได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ฉลอง วชิราภากร. 2541. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- วรารัณญา แดนสีแก้ว และฉลอง วชิราภากร. 2557. ผลของการใช้กากเอทานอลหมักด้วยยีสต์ (*Saccharomyce cerevisiae*) และเชื้อรา (*Aspergillus niger*) ในสูตรอาหารผสมสำเร็จต่อการย่อยได้และजनพลศาสตร์ของการผลิตแก๊ส. น. 585-593. ใน: Graduate research conference 2014 15th 28 March 2014. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- ศุภกิจ สุนาโท, วิโรจน์ ภัทรจินดา, พรชัย ล้อวิลัย, และงามนิจ นนทโส. 2556. การใช้กากมันสำปะหลังจากการผลิตเอทานอลหมักยีสต์เพื่อเป็นอาหารในโครีดนม. แก่นเกษตร. 41: 87-91.
- Das S, Bhattacharya A, Halder S, Ganguly A, Sai Gu, Y, Ting P, Chatterjee PK. Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: Comparison between artificial neural network and response surface methodology. **Sustainable Materials and Technologies** 2015; 3: 17–28.
- Lima CSS, Conceição MM, Silva FLH, Lima EE, Conrado LS, Leão DAS. Characterization of acid hydrolysis of sisal. **Applied Energy** 2013; 102: 254-259.
- Lotong, N, Suwanarit P. Production of spore inoculums of soy source koji mold in plastic bags. **Applied and Environ** 1983; 46: 1224-1226.
- Liu D, Zhang R, Yang X, Wu H, Xu D, Tang Z. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation** 2011; 65(1): 717-725.
- Mandels M. Microbial Sources of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering symposium** 1975; 5: 81-105.
- Narra M, Dixit G, Divecha J, Madamwar D, Shah AR, Production of cellulose by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali treated rice straw. **Bioresource Technology** 2012; 121: 355-361.

- Narra M. Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces* sp. for ethanol production. **Bioresource Technology** 2016; 179: 331–338.
- Raud M. N₂ explosive decompression pretreatment of biomass for lignocellulosic ethanol production. **Biomass and Bioenergy** 2016; 90: 1–6.
- Roberto NM, Carolina AB, Lidia MM, Nei PJ. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnolgy** 2013; 163: 38-44.
- Rocha GJM, Gonçalves AR, Oliveira BR, Olivares EG, Rossell CEV. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products** 2012; 35: 274-279
- Shazia S, Rukhsana B. Sobiya S. Cellulase biosynthesis by selected *Trichoderma species*. **Pak.J.Bot.** 2009; 41(2): 907-916.
- Sigh R, Bishnoi K, Bishnoi RN. Optimization of synergistic parameter for thermostable cellulose activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal** 2009; 48: 28-35.
- Swangkeaw J, Vichitphan S, Vichitphan K. Production and characterization of extracellular beta-glucosidase from *Pichai anomala* MDD24 for enhancing wine aroma. **J Biotech** 2008; S296.
- Swangkeaw J, Vichitphan S, Vichitphan K. Production and characterization of extracellular beta-glucosidase from *Pichai anomala* MDD24 for enhancing wine aroma. **J Biotech** 2008; S296.
- Vu VH, Pham TA, Kim1 K. Improvement of Fungal Cellulase production by Mutation and Optimization of solid state fermentation. **The Korean Society of Mycology** 2011; 39(1): 20-25
- Yejun H. Hongzhang C. Characterization of beta-glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology** 2008; 99: 6081-6087.

Yurayard K, Mahakhan P, Vichitphan K, Vichitphan S, Kamprasert D, Swangkaew J. Carboxy- methyl cellulose production by *Pennicillium oxalicum* HS1-3 isolated from soil in Chaiyaphum province. **KKU Science Journal** 2012; 40: 75-82.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว

- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
- หลอดทดลอง (test tube) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองฝาเกลียว (test tube Screw Cap) ปริมาตร 11 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร
- ขวดแลบฝาเกลียว (duran) ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- เบเกอร์ (beaker) ขนาด 150 และ 250 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 50, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์ (slide and cover slide)
- ปิเปตต์แบบใช้ตวง (measuring pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod) ขนาด 10 นิ้ว
- glass cuvette

2. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ

- เข็มเย็บเชื้อ (needle) แบบปลายตรงและปลายงอ
- ลูป (loop)
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)
- ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) เบอร์ 2 และเบอร์ 5
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ปากคีบ (forceps)

3. เครื่องมือ

- เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter), Lab pH meter, PL-600
- ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave), model NO. 1941x, USA
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave), Kokusan, biomed group, model H88LLD
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำแก๊ส (autoclave)
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow), microtech, serial No. 0474
- ตู้อบเชื้อ (incubator), Termaks, KBP 6000
- ตู้อบเชื้อ (incubator), Hotpack, model 352602

- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (shaker incubator), JSR, JSSL-100C
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven), Memmert, UFE 600, Germany
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer), UV7504
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath), LWB-222A, Lab Tech
- เครื่องเขย่าผสม (vortex mixture), moder NO.541, Heidolph, Germany
- เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (analytical balance), Huajie, HJ-series
- เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (analytical balance), AND, GR-200
- กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ (compound microscope), Olympus-digital camera

DP11

- เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (refrigerated centrifuge), Hitachi, CR20B2

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อและบัฟเฟอร์

1. Mandel's mineral salt medium (pH 5.0)

Urea	0.3	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4	g
KH ₂ PO ₄	2.0	g
CaCl ₂	0.3	g
MgSO ₄	0.3	g
Yeast extract	0.25	g
Peptone	0.75	g
น้ำกลั่น	1.0	L

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C, 15 นาที

2. Potato dextrose agar (PDA) slant

Commercial PDA	39.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C, 15 นาที

3. Yeast extract peptone dextrose (YPD) broth, pH 5.0

Glucose	20.0	g
Yeast extract	20.0	g
Peptone	10.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C, 15 นาที

4. Yeast extract peptone extrose (YPD) agar, pH 5.0

Glucose	20.0	g
Yeast extract	20.0	g
Peptone	10.0	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C, 15 นาที

5. Ethanol production medium, pH 5.0

KH_2PO_4	20.0	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10.0	g
MgSO_4	10.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
MnSO_4	1.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C , 15 นาที

6. Citrate phosphate buffer (CP buffer), pH 5.0

Stock solution

A: 0.1 M Citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g ละลายในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร)

B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 : 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 g ละลายในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร)

Solution A (mL)	Solution B (mL)	pH
42.2	7.8	2.8
39.3	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.1	6.6

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C , 15 นาที

ภาคผนวก ค
สารเคมี

1. 1% Carboxymethylcellulose

Carboxymethylcellulose	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

2. DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) reagent

DNS 2.5 กรัม ละลายใน 2 N NaOH 50 mL เติม Sodium potassium ttrate (Rochelle salt) 75 กรัม คนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 250 mL เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3. 0.002 M p-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside (pNPG)

ชั่ง p-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside (pNPG) 0.0602 กรัม ละลายใน 0.05 M Citrate phosphate buffer 100 มิลลิลิตร, pH 5.0 เก็บในขวดสีชา

4. 0.25 M Na₂CO₃

ชั่ง Na₂CO₃ 26.45 กรัม ละลายใน 0.05 M Citrate phosphate buffer 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 1000 µM p-Nitrophenol

ชั่ง p-Nitrophenol 0.0139 กรัม ละลายใน 0.05 M Citrate phosphate buffer 100 มิลลิลิตร, pH 5.0 เก็บในขวดสีชา

ภาคผนวก ง
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

การเตรียมสารละลาย DNS

ชั่ง DNS 2.5 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม Sodium potassium tartrate (Rochelle salt) 75 กรัม และคนจนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานใส่ในหลอดทดลอง เจือจางด้วย CP buffer, pH 5 ให้ได้ระดับความเข้มข้นระหว่าง 100-1000 $\mu\text{g/ml}$ ปิเปตสารละลายกลูโคสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตารางภาคผนวกที่ ง 1

ตารางภาคผนวกที่ ง 1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายกลูโคส มาตรฐาน (ไมโครลิตร)	ปริมาตร CP buffer, pH 5.0
0	0	1000
100	100	900
200	200	800
300	300	700
400	400	600
500	500	500
800	800	200

3. เติมสารละลาย DNS ที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วต้มในหม้อน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที

4. ทำให้เย็นลงทันทีโดยการนำหลอดทดลองแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

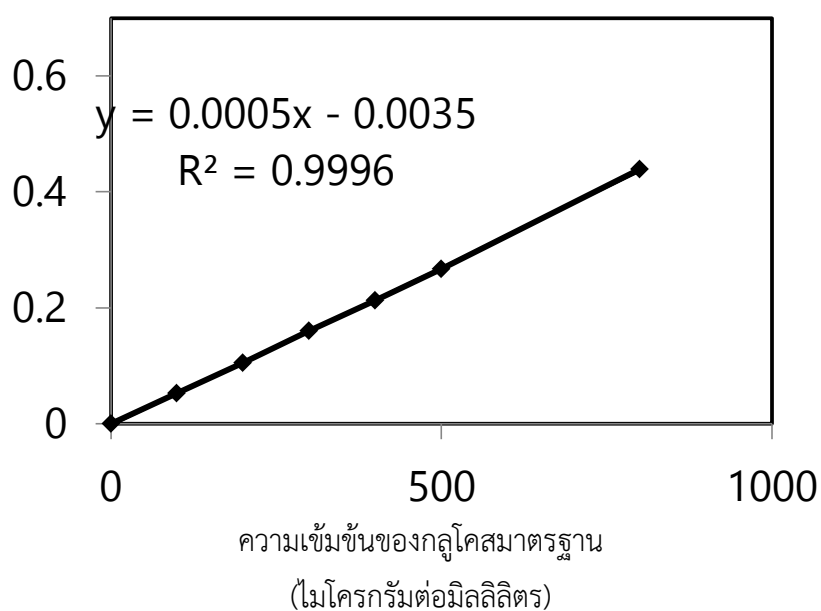
5. วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ด้วยความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การสร้างกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาค่าความชัน (Slope)

ตารางภาคผนวกที่ ง 2 ค่าดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐานที่ 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	A 540 นาโนเมตร
0	0
100	0.052
200	0.105
300	0.160
400	0.213
500	0.267
800	0.439



ภาพภาคผนวกที่ ง 1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่วัดโดยวิธี DNS

2. การวิเคราะห์กิจกรรม β -glucosidase

การเตรียมสารละลาย

1. 0.002 M *p*-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside (pNPG) ชั่งมา 0.0602 กรัม ละลาย ใน 0.05 M Citrate phosphate buffer 100 มิลลิลิตร, pH 5.0
2. 0.25 M Na_2CO_3 (26.45 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)
3. 1000 μM *p*-Nitrophenol (0.0139 กรัม ละลายใน 0.05 M Citrate phosphate buffer 100 มิลลิลิตร, pH 5.0

วิธีการวิเคราะห์

1. ปิเปต 0.002 M *p*-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside (pNPG) 0.2 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
2. ปิเปต 0.25 M Na_2CO_3 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol ที่ความยาว คลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้ *p*-nitrophenol ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครโมลาร์ และคำนวณหากิจกรรม

เตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol

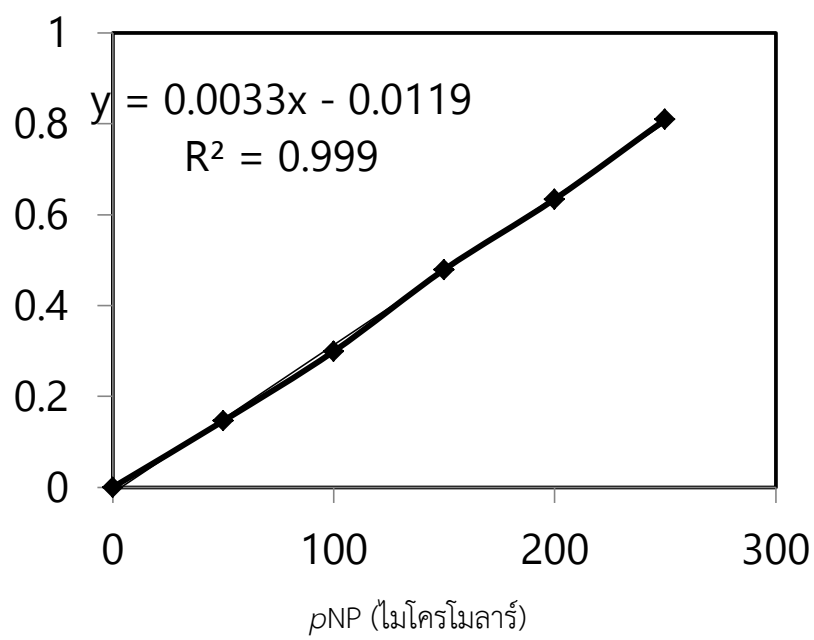
1. เตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol เข้มข้น 1000 μM
2. ปิเปตสารละลาย *p*-nitrophenol ใส่ในหลอดทดลอง เจือจางด้วย 0.05 M Citrate phosphate buffer, pH 5.0 ให้ได้ระดับความเข้มข้นระหว่าง 100-1000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย *p*-nitrophenol ลงในหลอดทดลอง ดังตารางภาคผนวก ที่ ง 3

ตารางภาคผนวกที่ ง 3 การเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol

<i>p</i> -nitrophenol (ไมโครโมลาร์)	<i>p</i> -nitrophenol (ไมโครลิตร)	ปริมาตร CP buffer, pH 5.0
0	0	1000
50	50	950
100	100	900
150	150	850
200	200	800
250	250	750

ตารางภาคผนวกที่ ง 4 ค่าการดูดกลืนแสง *p*-nitrophenol ที่ A 405 นาโนเมตร

pNP (ไมโครโมลาร์)	A 405 (นาโนเมตร)
0	0
50	0.146
100	0.299
150	0.479
200	0.634
250	0.809



ภาพภาคผนวกที่ ง 2 กราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol

3. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

3.1 Betaglucosidase activity (IU/g solid)

$$1 \text{ IU} = \left[\frac{(\text{pNP} \times 0.3 \times 10 \times \text{dilution}) / (30 \times 1000)}{20} \right] \times 30$$

3.2 CMCase activity (IU/g solid)

$$1 \text{ IU} = \left[\frac{(\text{reducing sugar} \times 2 \times 1000 \times \text{dilution}) / (30 \times 180)}{20} \right] \times 30$$

3.3 FPase activity (IU/g solid)

$$1 \text{ IU} = \left[\frac{(\text{reducing sugar} \times 2 \times 1000 \times \text{dilution}) / (240 \times 180)}{20} \right] \times 30$$

4. การวิเคราะห์เอทานอลโดยวิธี Gas Chromatography (GC) (ดัดแปลง Yu *et al.*, (2008))

ใช้ Agilent 7890A (USA) แก๊ส chromatography (GC) ร่วมกับ DB-wax column (30 m × 0.25 μm) ในการตรวจจับเปลวไฟไอออนไนซ์ (FID) ใช้อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเท่ากับ 2.0 mL/นาที อุณหภูมิของเครื่องตรวจจับ FID และพอร์ตฉีดถูกกำหนดไว้ที่ 190°C

ภาคผนวก จ
บทความสำหรับการเผยแพร่

1. การเพิ่มมูลค่าอ้อยโดยใช้ประโยชน์จากการย่อยสลายเศษยอดและใบอ้อยเพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลและอาหารสัตว์. ในงานสัมมนาเชิงวิชาการ “งานวิจัยอ้อยและน้ำตาล” Thailand Cane and Sugar Seminar 2015, 22 กรกฎาคม 2558 ณ ห้องแกรนด์บอลรูม 1 โรงแรมรามาร์คเด้นส์ กรุงเทพฯ (Poster presentation)



การเพิ่มมูลค่าอ้อยโดยใช้ประโยชน์จากการย่อยสลายเศษยอดและใบอ้อย เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลและอาหารสัตว์

¹จุฑาพร แสงแก้ว*, ¹ณัฐพร หนูพราหมณ์, ¹ชวีวรรณ ทรัพย์สำราญ, ¹พลสันต์ มหาพันธ์,
²ปานพัย บัวศรี, ^{3,4}คณิต วิจิตพันธ์, ^{3,4}สุกานดา วิจิตพันธ์

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002; ²ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002;
³ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002; ⁴ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002; อีเมล: jgutap@kku.ac.th



บทนำ



อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย กระบวนการผลิตอ้อยปัจจุบันเมื่อถึงระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ผู้ผลิตนิยมใช้ไฟเผาต้นอ้อยเพื่อให้เก็บเกี่ยวได้ง่าย แต่การกระทำดังกล่าวจะทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้น้อยลง จึงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมทางวิชาการ แต่เนื่องจากจะไม่สะดวกกับผู้เก็บเกี่ยวจึงยังกระทำอยู่ในทุกที่ของประเทศ การใช้วิธีเผาดังกล่าวนอกจากทำให้ผลผลิตน้ำตาลที่ได้น้อยลงแล้วยังก่อให้เกิดมลภาวะ และอาจก่อให้เกิดโรคภัยไข้เจ็บได้อีกด้วย จากปัญหาดังกล่าว จึงมีแนวทางการวิจัยที่จะนำเศษต้นอ้อย ได้แก่ ส่วนยอดและใบของต้นอ้อย ที่ไม่มีประโยชน์ในขณะนี้ แต่ที่จริงแล้ว ส่วนใบของต้นอ้อยนั้นประกอบไปด้วยองค์ประกอบของเซลลูโลสในปริมาณมากกว่าร้อยละ 40 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งวัสดุเซลลูโลสดังกล่าวเมื่อถูกย่อยสลายแล้วจะได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญและมีมูลค่าสูง ประกอบกับผลพลอยได้ที่เกิดภายหลังกระบวนการหมักเอทานอลด้วยวิธี solid state fermentation ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นอาหารสัตว์ได้เนื่องจากมีปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมโดยเฉพาะแหล่งโปรตีนที่ได้จากเชื้อยีสต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางที่จะทำให้เกิดประโยชน์หลายด้านต่อเกษตรกรและประเทศชาติอย่างยิ่ง รวมทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของทั้งทางการเกษตรของประเทศไทยให้มีค่ามากยิ่งขึ้น



วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตเซลลูโลสไดกลีเคอนโซมแบบ solid-state fermentation ด้วยเชื้อรา *Aspergillus tubingensis* HS1-5 โดยใช้เศษยอดและใบอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน
2. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเศษต้นยอดและใบอ้อยด้วยสารเคมีและเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *A. tubingensis* HS1-5
3. เพื่อผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยด้วยระบบการหมักที่เหมาะสม
4. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกากที่ได้หลังการหมักเอทานอลสำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาเป็นอาหารสัตว์



ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างอ้อยจะเก็บส่วนยอดอ้อยที่ขาวไร้ยอดตัดทิ้ง โดยส่วนยอดมีขนาดเฉลี่ย 5 นิ้ว และมีใบอ้อยเฉลี่ย จำนวน 7 ใบ โดยผลการนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของยอดและใบอ้อย พบว่าประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน น้ำ และความชื้น ร้อยละ 49.14, 26.72, 12.10, 7.49 และ 4.63 ตามลำดับ




รูปที่ 1 การเก็บตัวอย่างยอดและใบอ้อยจากไร่อ้อยฟูลสว่าดเพื่อการหมักบ้านพาดปองแดง อำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus tubingensis* HS1-5 โดยออกแบบการทดลองทางสถิติที่ผืนผืนทดสอบของผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเฉพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต CMCase คือ เศษยอดและใบอ้อย 19.41 กรัม, Mendel's medium 43.2 มิลลิลิตร พิเอช 4.34 ต่อการผลิต FPase คือ เศษยอดและใบอ้อย 14.1 กรัม, Mendel's medium 33 มิลลิลิตร พิเอช 6.68 และต่อการผลิต β -glucosidase คือ เศษยอดและใบอ้อย 13.55 กรัม, Mendel's medium 43.05 มิลลิลิตร พิเอช 3.32 จากนั้นนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาย่อยสลายเศษยอดและใบอ้อย การผลิตเอทานอลจากเศษยอดและใบอ้อยโดยวิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation และ การศึกษาองค์ประกอบของกากภายหลังการเก็บเกี่ยวเอทานอลเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษา




ภาพที่ 2 การขยาย scale การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้ใหญ่ขึ้น



การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถผลิตเอทานอล และนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต ตลอดจนเป็นพลังงานที่สะอาด นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ผลิตพลังงานทดแทนหรือสามารถนำไปใช้ในแหล่งชุมชนได้ นอกจากนี้หากเหลือจากกระบวนการหมักซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงจากยีสต์ ยังสามารถนำไปพัฒนาเพื่อผลิตเป็นอาหารสัตว์ได้

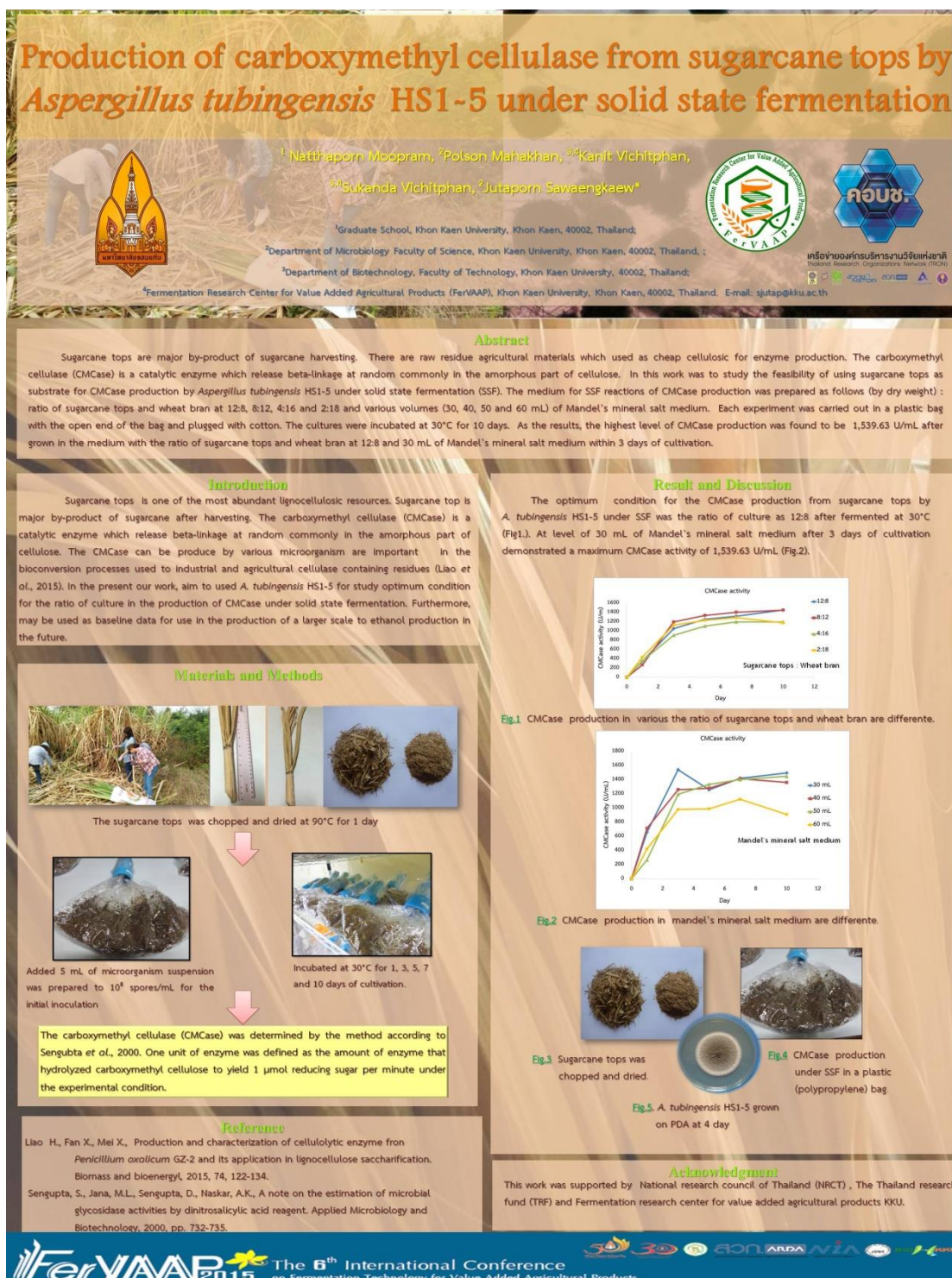
นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้การผลิตอ้อย โดยทำให้เศษยอดและใบอ้อยมีคุณค่าเพิ่มขึ้น ลดการเผาอ้อยขณะเก็บเกี่ยวเป็นการลดมลภาวะ และทำให้ได้น้ำตาลจากการไม่เผาอ้อยเพิ่มขึ้น การเพิ่มคุณค่าเศษต้นอ้อยเหลือทิ้งไปผลิตพลังงาน เป็นการลดการสูญเสียการนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศ อีกทั้งพลังงานที่ได้เป็นพลังงานสะอาดทำให้เป็นการลดมลภาวะให้กับประเทศอีกด้วย



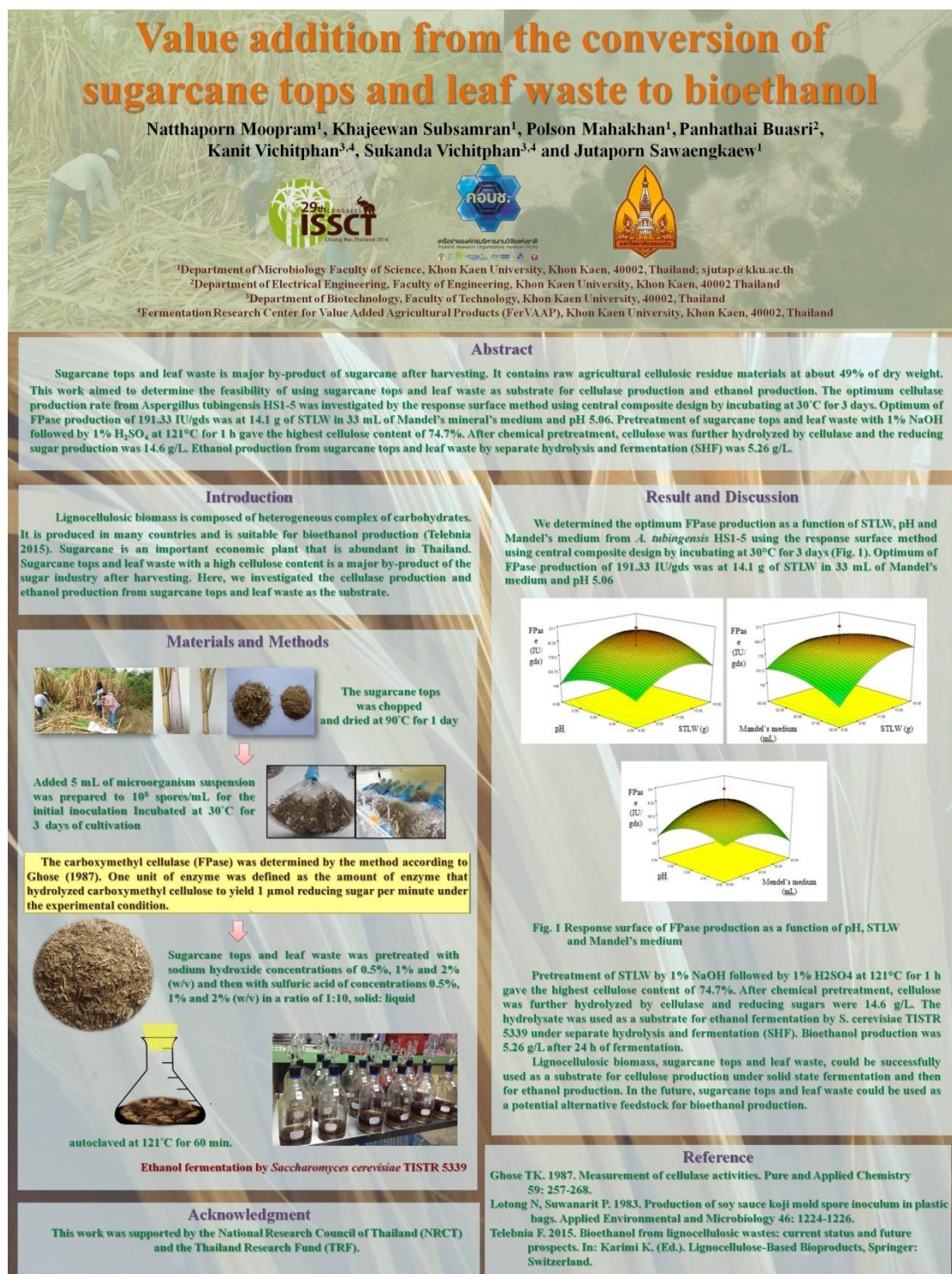
กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

2. Production of carboxymethyl cellulase from sugarcane tops by *Aspergillus tubingensis* HS1-5 under solid state fermentation. Abstract in The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, 29 - 31 July 2015 Centara Hotel & Convention Center, Khon Kaen, Thailand. (Poster presentation)



3. Value addition from the conversion of sugarcane tops and leaf waste to bioethanol. Proceeding in The 29th International Society of Sugar Cane Technologists ((ISSCT), volume 29, 2-11 December 2016 Chiang Mai International Conventional and Exhibition Center, Thailand. (Poster presentation)





ภาพภาคผนวกที่ จ 1 การขยายขนาดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถุงหมักขนาด 200 กรัม



ภาพภาคผนวกที่ จ 2 เอนไซม์เซลลูเลส



ภาพภาคผนวกที่ จ 3 การขยายขนาดการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 200 กรัม



ภาพภาคผนวกที่ จ 4 กระบวนการกลั่นเอทานอล



ภาพภาคผนวกที่ จ 5 เอทานอล



ภาพภาคผนวกที่ จ 6 กากหมักเอทานอลที่นำไปวิเคราะห์อาหารสัตว์