

สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื้อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก  
สำหรับการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390  
โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

OPTIMIZATION OF RUBBER WOOD SAWDUST HYDROLYSIS  
WITH PHOSPHORIC ACID FOR LACTIC ACID PRODUCTION  
BY *Lactobacillus casei* TISTR 390  
USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-008

สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก  
สำหรับการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390  
โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

OPTIMIZATION OF RUBBER WOOD SAWDUST HYDROLYSIS  
WITH PHOSPHORIC ACID FOR LACTIC ACID PRODUCTION  
BY *Lactobacillus casei* TISTR 390  
USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMIZATION OF RUBBER WOOD SAWDUST HYDROLYSIS  
WITH PHOSPHORIC ACID FOR LACTIC ACID PRODUCTION  
BY *Lactobacillus casei* TISTR 390  
USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2017-SC-M-020-008



COPYRIGHT 2017

FACULTY OF SCIENCE

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

“สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลีโยไม้อย่างพาราด้วย  
กรดฟอสฟอริกสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ  
*Lactobacillus casei* TISTR 390 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง”

“OPTIMIZATION OF RUBBER WOOD SAWDUST HYDROLYSIS  
WITH PHOSPHORIC ACID FOR LACTIC ACID PRODUCTION BY  
*Lactobacillus casei* TISTR 390 USING RESPONSE SURFACE  
METHODOLOGY”

ชื่อนักศึกษา

นางสาวณิชาภัทร ชื่นจิตร

รหัสประจำตัว

55651601

ปริญญา


วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.สุขใจ ชูจันทร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) ผศ.ดร.เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 เวลา 09.00 - 12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ตึกจุฬารามณ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนี รัตนบริพัตน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 23 เดือน 5 พ.ศ. 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสชี้เลี้ยงไมยงพาราด้วยกรดฟอสฟอริกสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 390 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณิชาภัทร ชื่นจิตร
รหัสประจำตัว	55651601
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

### บทคัดย่อ

จากการศึกษาการปรับสภาพชี้เลี้ยงไมยงพาราด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนชี้เลี้ยงไมยงพาราต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด รองลงมาคือเฮมิเซลล์ และลิกนินต่ำสุด เท่ากับร้อยละ 59.43, 22.49 และ 10.24 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังนั้น จึงเลือกกากชี้เลี้ยงไมยงพาราที่ผ่านการปรับสภาพโดยสภาวะนี้มาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสด้วยกรดฟอสฟอริก โดยออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร อัตราส่วนชี้เลี้ยงไมยงพาราต่อกรดฟอสฟอริก 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร และเวลาในการไฮโดรไลซิส 63 นาที สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 14.99 กรัมต่อลิตร และเมื่อศึกษาการจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสทชี้เลี้ยงไมยงพาราด้วยวิธี Overliming พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังกำจัดความเป็นพิษลดลงร้อยละ 13.55 จากนั้นศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทชี้เลี้ยงไมยงพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่ากรดแลกติกที่ได้จากอาหารไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษสูงกว่าในอาหารที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ โดยผลิตกรดแลกติกสูงสุด 8.85 และ 7.82 กรัมต่อลิตร ผลได้กรดแลกติก 0.94 และ 1.06 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.280 และ 0.243 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**คำสำคัญ :** กรดฟอสฟอริก กรดแลกติก ชี้้เลี้ยงไมยงพารา น้ำตาลรีดิวซ์ วิธีพื้นผิวตอบสนอง ไฮโดรไลซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis Title</b>	Optimization of rubber wood sawdust hydrolysis with phosphoric acid for lactic acid production by <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 390 using response surface methodology
<b>Student Name</b>	Miss Nitchapat Chuenchit
<b>Student ID</b>	55651601
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)
<b>Department</b>	Biology
<b>Year</b>	2017
<b>Thesis Advisor</b>	Associate Professor Sukjai Choojun

### Abstract

The optimum conditions for sodium hydroxide (NaOH) pretreatment of rubber wood sawdust pretreatment were 2% (w/v) NaOH, a solid loading rate of 10% (g/mL) and residence time of 40 minutes at 121°C in an autoclave. The results showed that after the pretreatment rubber wood sawdust composes of 59.43% cellulose, 22.49% hemicelluloses and 10.24% lignin (dry weight), which were significantly different ( $p \leq 0.05$ ). Then the study employed the Response Surface Methodology in Central Composite Design to optimize the hydrolysis conditions with phosphoric acid ( $H_3PO_4$ ) to obtain reducing sugar. The optimal conditions, which obtained the highest reducing sugar yield of 14.99 g/L, were performed at 1.05% (v/v)  $H_3PO_4$ , 1 g of rubber wood sawdust per 8.42 mL phosphoric acid and 63 minutes. Subsequently, The acidic rubber wood sawdust hydrolysate (liquid) was detoxified with Overliming method. The results showed that the loss of reducing sugar was 13.55%. The investigation of lactic acid production from *Lactobacillus casei* TISTR 390 in 5 liters fermenter was compared between detoxified and undetoxified hydrolysate medium. It has been found that from the fermentation in undetoxified and detoxified hydrolysate medium at 24 h the highest lactic acid concentration produced were 8.85 and 7.82 g/L, with yield of 0.94 and 1.06 g/g and productivity of 0.280 and 0.243 g/Lh, respectively, which were significantly different ( $p \leq 0.05$ ).

**Keywords :** phosphoric acid, lactic acid, rubber wood sawdust, reducing sugar, response surface methodology, hydrolysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหาในระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งกรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ผศ.ดร. เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์ และ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และความรู้ในการทำงานวิจัย รวมทั้งกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนส่งเสริมการศึกษา และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณสมจิตร์ วิเศษศรี และโรงงานแปรรูปไม้ยางพารา อ.เมือง จ.ระยอง ที่อนุเคราะห์จัดหาชิ้นเนื้อไม้ยางพาราซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ นายประสิทธิ์ แผ้วบาง นายวิทยา เขียวเขิน และนายสมิคร แสงจันทร์ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ

ขอขอบคุณ นายกิจสิทธิ์ พรหมสุทธิ สำหรับคำแนะนำและการแบ่งปันความรู้ ให้คำปรึกษา ทั้งยังช่วยแก้ไขปัญหาในการออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

ขอขอบคุณ นางสาวอัจฉราภรณ์ จงมีสุข นางสาวดวงกมล สิริประภาขจรกิจ และนางสาว จุฑามาศ วิเศษศรี สำหรับคำปรึกษาและความช่วยเหลือต่าง ๆ รวมถึงเพื่อน ๆ และน้อง ๆ นักศึกษาปริญญาตรีและโท ที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้เสมอมา ตลอดจนผู้ที่มีได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่ได้มีส่วนช่วยให้งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่องผู้จัดทำขออภัยไว้ทั้งหมด ส่วนคุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวณิชชาภัทร ชื่นจิตร

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 กรดแลกติก.....	4
2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก.....	6
2.2.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม.....	6
2.2.2 อุตสาหกรรมเภสัชกรรมและการแพทย์.....	6
2.2.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง.....	6
2.2.4 อุตสาหกรรมการเกษตร.....	7
2.2.5 อุตสาหกรรมเคมี.....	7
2.2.6 อุตสาหกรรมพอลิเมอร์.....	8
2.3 การผลิตกรดแลกติก.....	10
2.3.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี.....	10
2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	11
2.4 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติก.....	13
2.4.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา.....	16
2.5 กระบวนการหมักกรดแลกติก.....	17
2.5.1 วิธีการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติก.....	17
2.6 กระบวนการแยกกรดแลกติกและการทำให้บริสุทธิ์.....	22
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก.....	23
2.7.1 แหล่งคาร์บอน.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.7.2 แหล่งไนโตรเจน.....	23
2.7.3 แหล่งแร่ธาตุ.....	24
2.7.4 อุณหภูมิ.....	25
2.7.5 ค่าความเป็นกรดต่าง.....	25
2.7.6 การให้อากาศ.....	26
2.7.7 สารปรับสภาพให้เป็นกลาง.....	27
2.8 ยางพารา.....	27
2.8.1 ประวัติความเป็นมา.....	27
2.8.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	29
2.8.3 การแปรรูปไม้ยางพารา.....	30
2.8.3.1 ปีกไม้และเศษไม้.....	31
2.8.3.2 ขี้เลื่อย.....	31
2.9 องค์ประกอบที่สำคัญของลิกโนเซลลูโลส.....	33
2.9.1 เซลลูโลส.....	35
2.9.2 เฮมิเซลลูโลส.....	36
2.9.3 ลิกนิน.....	38
2.10 กระบวนการผลิตกรดแลคติกจากลิกโนเซลลูโลสโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย.....	39
2.11 การปรับสภาพวัตถุดิบ.....	43
2.11.1 การปรับสภาพวัตถุดิบทางกายภาพ.....	44
2.11.1.1 การลดขนาดวัตถุดิบโดยทางกล.....	44
2.11.1.2 การแยกสลายด้วยความร้อน.....	44
2.11.2 การปรับสภาพวัตถุดิบทางเคมี.....	44
2.11.2.1 การทำปฏิกิริยากับไอโซน.....	45
2.11.2.2 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยต่าง.....	45
2.11.2.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรด.....	46
2.11.2.4 การกำจัดลิกนินโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน.....	47
2.11.2.5 กระบวนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์.....	47
2.11.3 การปรับสภาพวัตถุดิบทางเคมี-ฟิสิกส์.....	47
2.11.3.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ.....	47
2.11.3.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.11.3.3 การใช้ความร้อนขึ้น.....	48
2.11.3.4 การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์.....	49
2.11.4 การปรับสภาพวัตถุบิทางชีวภาพ.....	49
2.12 การย่อยหรือการไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลส.....	52
2.12.1 การไฮโดรไลซ์ด้วยกรด.....	52
2.12.1.1 การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจาง.....	52
2.12.1.2 การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเข้มข้น.....	53
2.12.2 การไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง.....	56
2.13 สารพิษที่เกิดจากการไฮโดรไลซิส.....	56
2.13.1 อนุพันธ์ฟูแรน.....	57
2.13.2 กรดคาร์บอกซิลิก.....	58
2.13.3 อนุพันธ์ฟีนอลิก.....	58
2.13.4 ไอออนของโลหะหนัก.....	59
2.14 ผลของสารพิษต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก.....	59
2.15 วิธีการกำจัดสารพิษ.....	60
2.15.1 การกำจัดสารพิษทางกายภาพ.....	60
2.15.1.1 การระเหยแบบสูญญากาศ.....	60
2.15.1.2 การแยกสารพิษด้วยเยื่อแผ่น.....	61
2.15.2 การกำจัดสารพิษทางเคมี.....	61
2.15.2.1 การทำให้เป็นกลาง.....	61
2.15.2.2 การปรับด่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์.....	61
2.15.2.3 การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์.....	62
2.15.2.4 เรซินแลกเปลี่ยนประจุ.....	62
2.15.2.5 การสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์.....	62
2.15.3 การกำจัดสารพิษทางชีวภาพ.....	63
2.16 การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology).....	63
2.17 การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD).....	64
2.18 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	67
2.18.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลส.....	67
2.18.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเสทลิกโนเซลลูโลส.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.18.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทลิกโนเซลลูโลส.....	69
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>71</b>
3.1 อุปกรณ์การวิจัย.....	71
3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	71
3.1.2 สารเคมี.....	73
3.2 วัสดุดิบ.....	73
3.2.1 การเตรียมและเก็บรักษาวัสดุดิบ.....	73
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....	74
3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย.....	74
3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น.....	74
3.4 อาหารสำหรับผลิตกรดแลกติก.....	74
3.5 การศึกษาการปรับสภาพซีลี้อยู่ไม่ยงพารา ด้วยไซเตียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	75
3.5.1 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	75
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลี้อยู่ไม่ยงพารา ด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลอง แบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM).....	75
3.6.1 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	76
3.7 การศึกษาการกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสท ซีลี้อยู่ไม่ยงพาราด้วยวิธี Overliming.....	79
3.7.1 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	79
3.8 การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไฮโดรไลเสทซีลี้อยู่ไม่ยงพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ ด้วยวิธี Overliming ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	79
3.8.1 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	80
3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	80
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....</b>	<b>82</b>
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของซีลี้อยู่ไม่ยงพารา.....	82

# สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.2 การปรับสภาพขี้เลื่อยไม้ยางพารา ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	82
4.3 สันฐานรายละเอียดลักษณะพื้นผิวของกากขี้เลื่อยไม้ยางพารา.....	84
4.4 สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพารา ด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบ การทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี RSM.....	86
4.4.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมาะสมของแบบจำลอง.....	88
4.4.1.1 การสร้างสมการถดถอยและการวิเคราะห์นัยสำคัญ ของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ( $\beta$ ) ของตัวแบบจำลอง.....	89
4.4.1.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และนัยสำคัญของแบบจำลอง.....	90
4.4.2 ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	92
4.4.3 ผลการตรวจสอบและยืนยันสภาวะที่เหมาะสมจากแบบจำลอง.....	97
4.5 การกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสทขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยวิธี Overliming.....	97
4.6 การผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสท ขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ ด้วยวิธี Overliming ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	99
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>105</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	105
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	106
<b>บรรณานุกรม.....</b>	<b>107</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>129</b>
ภาคผนวก ก.....	130
ภาคผนวก ข.....	132
ภาคผนวก ค.....	143
ภาคผนวก ง.....	145
<b>ประวัติผู้เขียน.....</b>	<b>156</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก.....5
2.2	กรดแลกติกแบ่งตามกรดทางการค้า คุณสมบัติ และการประยุกต์ใช้.....9
2.3	ความแตกต่างระหว่างโฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรียและเฮเทอโรแลกติกแอซิดแบคทีเรีย.....15
2.4	การผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทดแทนทางการเกษตรโดยใช้กระบวนการหมักที่แตกต่างกัน.....18
2.5	แสดงข้อดีและข้อเสียของวิธีการหมักแบบต่าง ๆ.....21
2.6	องค์ประกอบทางเคมีของไม้ยางพารา.....30
2.7	ปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร.....33
2.8	ส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืชที่มีระบบท่อลำเลียง.....35
2.9	ข้อดีและข้อจำกัดของกระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการต่าง ๆ.....50
2.10	ข้อดีและข้อจำกัดของการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด.....54
2.11	ค่าแอลฟา ( $\alpha$ ) ที่ใช้ในการทดลอง.....65
3.1	ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับ สำหรับหาสถานะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพารา ด้วยกรดฟอสฟอริก ตามแผนการทดลองแบบ CCD.....77
3.2	สถานะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสถานะที่เหมาะสม ของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD.....78
4.1	องค์ประกอบทางเคมีของขี้เลื่อยไม้ยางพาราก่อนและหลังปรับสภาพ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....83
4.2	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสม ของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD.....87
4.3	ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยแต่ละตัวแปรจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสม ของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD.....88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.4	ผลการวิเคราะห์การถดถอยของตัวแปรอิสระ คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนซีลี้อยไม้ยางพารา ต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาในการไฮโดรไลซิส ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่มีต่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลี้อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95).....91
4.5	ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลี้อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์.....92
4.6	ผลการทำนายปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้จากสภาวะเหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลี้อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยตัวแปรจำเพาะต่าง ๆ ซึ่งได้จากกราฟพื้นผิวตอบสนอง.....96
4.7	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสทซีลี้อยไม้ยางพาราที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร อัตราส่วนซีลี้อยไม้ยางพารา ต่อกรดฟอสฟอริก 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 63 นาที ให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว.....98
4.8	ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติก ผลได้ อัตราการผลิต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....99
4.9	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่างการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17.....102

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ไอโซเมอร์ของกรดแลกติก.....4
2.2	กลไกของการเกิดกรดแลกติกจากกรดไพรูวิก.....5
2.3	สารเคมีสำคัญที่ผลิตจากกรดแลกติก.....7
2.4	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ.....8
2.5	กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้จากวัตถุดิบชีวมวล.....9
2.6	แผนภาพแสดงขั้นตอนการผลิตกรดแลกติก 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ.....12
2.7	วิธีของการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลที่ได้จากทรัพยากรทดแทน (กลูโคส, ไซโลส, เซลโลไบโอส, อะราบินอส, แมนโนส และกาแลกโทส) โดยแบคทีเรียแลกติก (LAB).....14
2.8	เชื้อแบคทีเรีย <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 390.....16
2.9	แผนภาพแสดงการหมักกรดแลกติกจากไฮโดรไลสของข้าวโพดแบบต่อเนื่อง.....17
2.10	แผนภาพแสดงกระบวนการแยกและการทำให้กรดแลกติกบริสุทธิ์จากน้ำหมัก.....22
2.11	ลักษณะของต้นยางพารา.....28
2.12	กระบวนการแปรรูปไม้ยางพารา.....31
2.13	ลักษณะของซีลีออยไมยางพารา.....32
2.14	การนำซีลีออยไมยางพาราไปใช้เป็นวัสดุสำหรับเพาะเห็ดฟางและทำรูป.....32
2.15	องค์ประกอบที่สำคัญของลิกโนเซลลูโลส.....33
2.16	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส.....36
2.17	โครงสร้างอย่างง่ายของเฮมิเซลลูโลส.....37
2.18	สารตั้งต้นโดยตรงของการสังเคราะห์ลิกนิน.....39
2.19	แผนภาพแสดงกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสแบบดั้งเดิม.....40
2.20	วิธีของการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลส (กลูโคส, ไซโลส และอะราบินอส) โดยแบคทีเรียแลกติก (LAB).....41
2.21	วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส.....42
2.22	แสดงบทบาทของการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส.....43
2.23	กระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสโดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด.....55
2.24	โครงสร้างของสารประกอบที่เป็นพียับยั้งกระบวนการหมัก ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด.....57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตัดฉีกอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.25 การกระจายของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design และ Central Composite Design.....	65
2.26 ตัวอย่างกราฟโครงร่าง (contour plot) และกราฟพื้นผิว (surface plot).....	66
2.27 รูปแบบของกราฟพื้นผิวที่มีลักษณะเฉพาะ.....	67
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของซีลีเนียมอย่างพารา ก่อนและหลังการปรับสภาพ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	84
4.2 ลักษณะโครงสร้างและพื้นผิวทางกายภาพของกากซีลีเนียมอย่างพารา เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 1,000 เท่า.....	85
4.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก กับอัตราส่วนซีลีเนียมอย่างพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	92
4.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก กับเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	94
4.5 อิทธิพลของอัตราส่วนซีลีเนียมอย่างพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก กับเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	95
4.6 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่ได้จากการผลิตกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลีเนียมอย่างพารา ที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	100
4.7 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่ได้จากการผลิตกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลีเนียมอย่างพารา ที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	100
4.8 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่ได้จากการผลิตกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลีเนียมอย่างพารา ที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	101

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีผลผลิตทางการเกษตรหลากหลายชนิด เช่น ข้าว น้ำตาล มันสำปะหลัง ยางพารา และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ผลผลิตบางส่วนมีเหลือเพียงพอที่จะส่งออกไปยังต่างประเทศ สร้างรายได้ให้แก่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท จึงถือว่าประเทศไทยเป็นครัวของโลก อย่างไรก็ตาม ระหว่างการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปผลิตผลการเกษตรเหล่านี้ก่อให้เกิดวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย กากมันสำปะหลัง ชี้อเลี้ยง-ไม่ยางพารา และทะลายปาล์มเปล่า เป็นต้น ซึ่งมีปริมาณมากและสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่าหลากหลายแนวทาง เพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบเหล่านี้ โดยหนึ่งในแนวทางนั้น คือ การนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนในการผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ (biological fermentation) (สุดาทิพย์ และคณะ, 2556)

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีการประยุกต์นำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเคมี และอุตสาหกรรมอาหาร (Dumbrepatil และคณะ, 2008) กรดแลคติกถูกนำมาใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพ (biopreservative) ตามธรรมชาติในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์มานานแล้ว อีกทั้งยังเป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นรสของอาหารและเครื่องดื่ม นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเสริมชีวณะ (probiotic) เพื่อช่วยปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ของคนและสัตว์ และยังสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพอลิแลคเตต (polylactate) ซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมด้วย (Panesar และคณะ, 2007)

กรดแลคติกสามารถผลิตได้โดยใช้กระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพโดยการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการผลิตทางเคมีนั้นจะให้กรดแลคติกที่อยู่ในรูปผสม (DL-lactic acid) ทำให้มีความยุ่งยากในการทำให้บริสุทธิ์และมีค่าใช้จ่ายสูง แต่การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพสามารถเลือกผลิตกรดแลคติกให้อยู่ในรูป D(-)Lactic acid หรือ L(+)-Lactic acid โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิต (Altaf และคณะ, 2005) ซึ่งปัจจุบันการผลิตกรดแลคติกสามารถผลิตโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดต้นทุนการผลิตโดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกหรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเป็นซับสเตรตในการผลิตกรดแลคติก เช่น ชี้อเลี้ยงไม่ยางพารา เว้ และกากน้ำตาล เป็นต้น (Kadam และคณะ, 2006)

ในกระบวนการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกระบวนการต่าง ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะสมบัติของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบที่นำมาใช้ เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส และเป็นการแตกพันธะที่เซลลูโลส จับกับสารประกอบอื่น ๆ เพื่อให้สารเคมี เอนไซม์ หรือจุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและย่อยวัตถุดิบได้ง่ายมากขึ้นในขั้นตอนการย่อยวัตถุดิบ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส เป็นต้น และขั้นตอนการหมักเป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ ให้เป็นกรดแลกติก จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการแยกกรดแลกติกออกจากน้ำหมักและขั้นตอนการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์ (Abdel-Rahman และคณะ, 2011)

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยรองจากข้าวและมันสำปะหลัง ปลูกมากทางภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื้อไม้มีสีขาวอมเหลือง เนื้อไม้ละเอียดปานกลาง แข็งเหนียว และบิดตัวง่าย ไม้ยางพาราเป็นพืชเพียงชนิดเดียวในตระกูลที่เป็นพืชเศรษฐกิจ ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญจากไม้ยางพารา คือ น้ำยาง ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ ไม้ยางพาราเพื่อเพิ่มผลผลิตของน้ำยางให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนที่เหลือไม้ยางพาราเป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพารา (sawn timber) เช่นเดียวกับปีกไม้และเศษไม้ คิดเป็นร้อยละ 19 ของไม้เหลือ (สมาคมธุรกิจไม้ยางพาราไทย, 2546) สำหรับการใช้อย่างประหยัดจากไม้ยางพาราสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ ใช้เป็นเชื้อเพลิง ซึ่งบางโรงงานจะใช้เป็นเชื้อเพลิงในการต้มน้ำ (boiler) เช่นเดียวกับปีกไม้และเศษไม้ที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพารา ส่วนที่เหลือไม้ยางพาราที่เหลือจะมีผู้มารับซื้อไปเพาะเห็ด ทำรูป ฯลฯ ปัจจุบันยังไม่มีผู้นำไม้ยางพาราไปใช้ประโยชน์เท่าที่ควรจึงมีความคิดนำไม้ยางพารามาเพิ่มมูลค่า โดยการนำไปเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ และใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติกในอนาคต

เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดปัญหาสิ่งแวดล้อม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำของเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้ยางพารา ได้แก่ ไม้ยางพารา มาผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดฟอสฟอริก ออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของไม้ยางพาราซึ่งเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้ยางพารา
2. เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมในขั้นตอนการปรับสภาพ (pretreatment) ไม้ยางพาราด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (NaOH) ที่ให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด

3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซีเลื่อยไม้ยางพารา ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกเจือจาง ( $H_3PO_4$ ) ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

4. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีเลื่อยไม้ยางพารา ที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. การศึกษาการใช้ประโยชน์จากซีเลื่อยไม้ยางพาราในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีการทางกายภาพและทางเคมี
2. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของซีเลื่อยไม้ยางพาราก่อนและหลังขั้นตอนการปรับสภาพ
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการปรับสภาพซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางที่ให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด
4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการไฮโดรไลซิสซีเลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกเจือจางเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง
5. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีเลื่อยไม้ยางพารา ที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการนำซีเลื่อยไม้ยางพาราที่เป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพารา มาใช้ประโยชน์ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดปัญหาสิ่งแวดล้อม
2. สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากวัสดุเหลือใช้หรือกากทางการเกษตร (agricultural residues) เพื่อใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทดแทนในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
3. สามารถผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้หรือกากทางการเกษตร โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ส่งผลให้กระบวนการผลิตมีต้นทุนต่ำ ได้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ และใช้ผลิตในเชิงพาณิชย์ได้
4. สามารถนำมาเป็นแนวทางในการศึกษาและประยุกต์ใช้สำหรับการขยายขนาดการผลิต ไปสู่ระดับอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตกรดแลกติกเชิงพาณิชย์

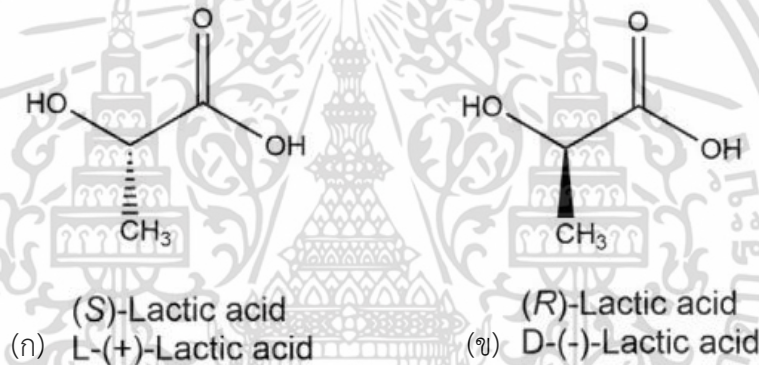
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 กรดแลกติก

กรดแลกติก (2-hydroxypropanoic acid,  $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$ ) เป็นกรดอินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติ มีการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางทั้งในด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเคมี และอุตสาหกรรมอาหาร (Oshiro และคณะ, 2009; Singhvi และคณะ, 2010; Tashiro และคณะ, 2011) กรดแลกติกมี 2 ไอโซเมอร์ (isomer) คือ L-(+)-lactic acid และ D-(-)-lactic acid แสดงดังรูปที่ 2.1 และคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติกแสดงดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ไอโซเมอร์ของกรดแลกติก

ที่มา : Castro-Aguirre และคณะ (2016)

การเปลี่ยนรูปของ L-(+)-lactic acid และ D-(-)-lactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริดจ์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่งและอะตอมที่สอง โดยเกิดทาโทเมอริกชิฟ (tautomeric shift) ของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) (Narayanan และคณะ, 2004)

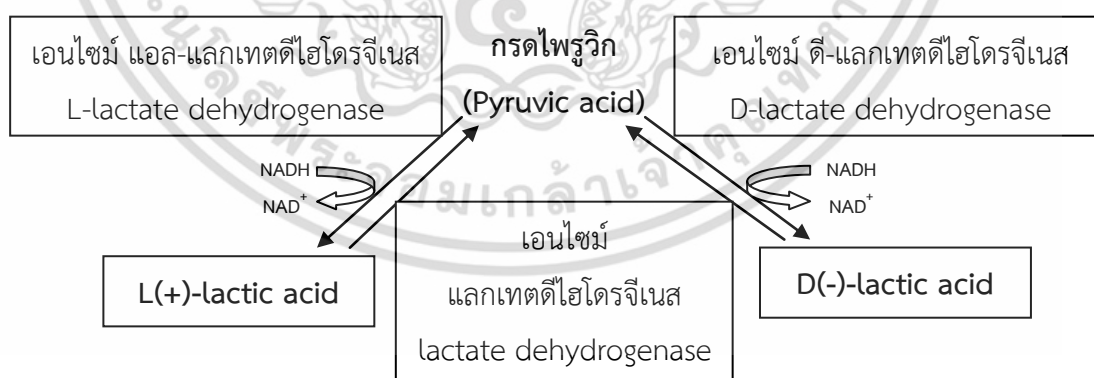
กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงอยู่ในรูปของผลึกสีขาว หรือของเหลวใส ไม่มีสี ไปจนถึงสีเหลืองอ่อน ๆ ไม่มีกลิ่น มีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ง่าย กรดแลกติกสามารถละลายน้ำได้ดี ให้รสเปรี้ยวปานกลาง นอกจากนี้ยังละลายได้ในแอลกอฮอล์ แอซีโตน อีเทอร์ แต่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม บีโตรเลียมอีเทอร์ และคาร์บอนไดซัลไฟด์ (สุขใจ, 2554)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพ	กรดแลกติก
น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)	90.08
จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 องศาเซลเซียส
จุดเดือด (Boiling point)	82 องศาเซลเซียส ที่ 0.5 มิลลิเมตรของปรอท 122 องศาเซลเซียส ที่ 14 มิลลิเมตรของปรอท
ค่าคงที่ของการแตกตัว ( $K_a$ ) ที่ 25 องศาเซลเซียส	$1.37 \times 10^{-4}$
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ ( $\Delta H_c$ )	1361 กิโลจูลต่อโมล
ค่าความร้อนจำเพาะ ( $C_p$ ) ที่ 20 องศาเซลเซียส	190 จูลต่อโมลต่อองศาเซลเซียส

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

มนุษย์และสัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากกรดแลกติกในรูปของ L(+)-lactic acid เท่านั้น เนื่องจากว่าภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์มีเอนไซม์ แอล - แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (L-lactate dehydrogenase) ดังนั้น มนุษย์และสัตว์จึงไม่สามารถใช้กรดแลกติกในรูปของ D(-)-lactic acid ได้ ซึ่งถ้าหากร่างกายมีการสะสมกรดแลกติกชนิด D(-)-lactic acid ในปริมาณมาก (เกิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัมต่อ 1 วัน) จะส่งผลให้มีการสะสมของกรดแลกติกดังกล่าวในเลือดสูงขึ้น ทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า hyperacidity (Akerberg และ Zacchi, 2000) กลไกของการเกิดกรดแลกติกจากกรดไพรูวิกแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กลไกของการเกิดกรดแลกติกจากกรดไพรูวิก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Li และคณะ (2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

การนำกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหาร มีความต้องการกรดแลกติกประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร (non-food industry) ได้แก่ เกษษกรรม เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมเคมีนั้นมีความต้องการประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (สุขใจ, 2554)

กรดแลกติกถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

### 2.2.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

การนำกรดแลกติกมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารและเครื่องดื่มเพื่อทำหน้าที่เป็นสารปรุงแต่งกลิ่น รส และเนื้อสัมผัส (flavour development) สารปรับสภาพความเป็นกรดในอาหาร และเครื่องดื่ม (acidulant) สารเพิ่มรสชาติ สารกันบูดเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหารและเครื่องดื่มที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ เนื่องจากกรดแลกติกเป็นกรดอ่อนจึงถูกใช้เป็นสารเพิ่มความเปรี้ยวในน้ำสลัด ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เครื่องดื่มและผัก ซึ่งกรดแลกติกที่ใช้ในสหรัฐอเมริกาได้รับการรับรองความปลอดภัย (the generally recognized as safe; GRAS) และมีการควบคุมโดย FDA (ติยะภรณ์, 2549) ปัจจุบันมีการใช้กรดแลกติกและเกลือของกรดแลกติกในเชิงพาณิชย์ในกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์ อุตสาหกรรมสัตว์ปีกและปลา โดยใช้ในรูปสารละลายเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา เพิ่มรสชาติ และควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น เชื้อ *Clostridium botulinum*

### 2.2.2 อุตสาหกรรมเภสัชกรรมและการแพทย์

การนำกรดแลกติกมาใช้ในด้านเภสัชกรรมและการแพทย์โดยทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) เช่น ใน Lactated Ringer's หรือ Hartmann's solution, CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis) solution เป็นต้น การใช้พอลิแลกติกแอซิด (poly lactic acid) ในการทำไหมเย็บแผลที่ละลายได้และเป็นสารตั้งต้นในการทำเฝือกอ่อน การใช้กรดแลกติกเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในอุตสาหกรรมการผลิตยา การใช้เอทิลแลกเตต (ethyl lactate) เป็นยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory drug) ใช้เป็นสารห้ามเลือดในระหว่างการถอนฟัน นอกจากนี้ยังใช้แคลเซียมแลกเตตไตรไฮเดรต (calcium lactate trihydrate) เพื่อเป็นแหล่งแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่มีภาวะขาดแคลเซียม (Dailey และคณะ, 2000)

### 2.2.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

การนำกรดแลกติกมาใช้เป็นตัวทำให้เกิดความชุ่มชื้น ช่วยควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง ๆ ยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ ช่วยทำให้ผิวขาวขึ้น โดยกรดแลกติกมีฤทธิ์ยับยั้งองค์ประกอบของ tyrosinase และเอทิลแลกเตต (ethyl lactate) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่รบกวนในการส่งเสริมกิจกรรมของสารประกอบที่ใช้ในการป้องกันผิว ดังนั้น กรดแลกติกและเกลือของกรดจึงเป็นส่วนประกอบที่มีความปลอดภัยสูง มีประโยชน์ในการเป็นส่วนผสมที่สำคัญในเครื่องสำอาง (สุขใจ, 2554)

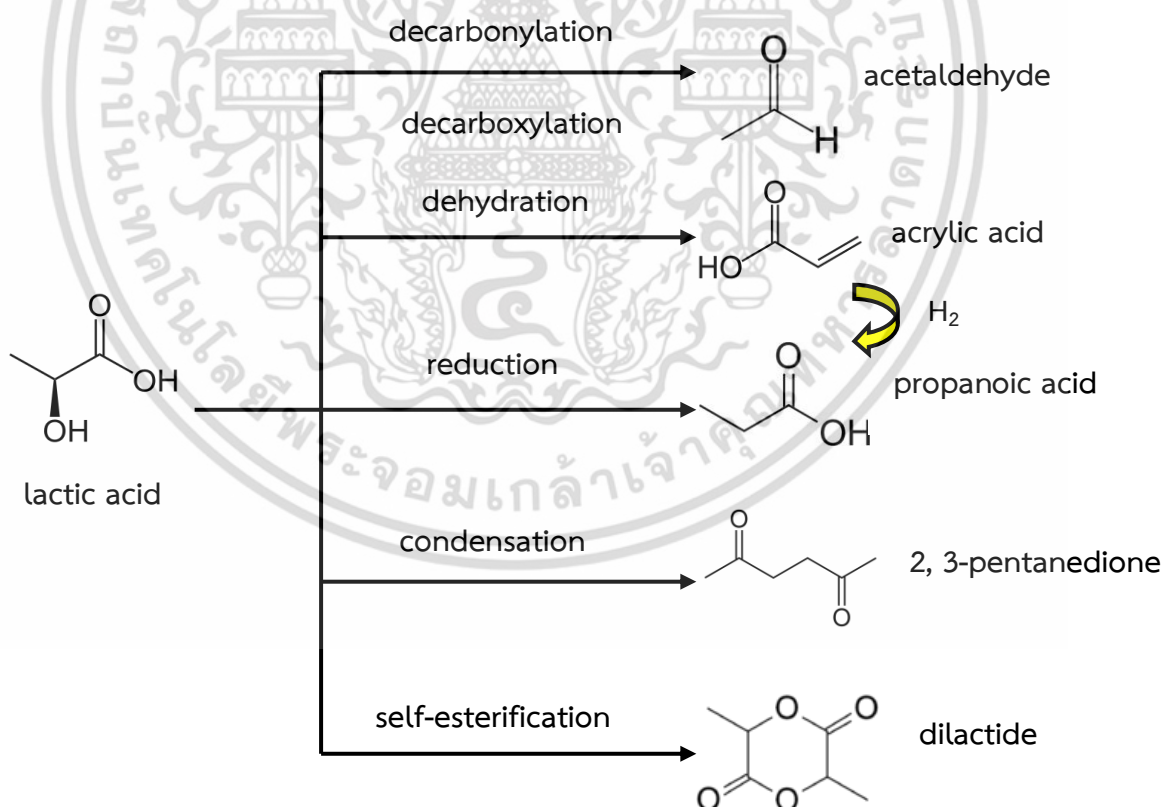
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.4 อุตสาหกรรมการเกษตร

การนำกรดแลกติกในรูปของแอมโมเนียมแลกเตต (ammonium lactate) มาใช้เป็น ส่วนผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์ การใช้แคลเซียมแลกเตตไตรไฮเดรตเพื่อยืดอายุผลผลิตทางการเกษตร การใช้ไอโซโพรพิลแลกเตต (isopropyl lactate) ในอุตสาหกรรมการผลิตยาฆ่าแมลง และยาปราบศัตรูพืช

## 2.2.5 อุตสาหกรรมเคมี

กรดแลกติกสามารถนำมาใช้เป็นมอนอเมอร์เพื่อทำปฏิกิริยาทางเคมีที่มีศักยภาพมากที่สุด เนื่องจากประกอบด้วยสาร 2 กลุ่มที่ทำปฏิกิริยาต่อกัน คือ กลุ่มคาร์บอกซิล และกลุ่มไฮดรอกซิล ทำให้ผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้หลากหลาย และได้ผลผลิตเป็นสารเคมีที่มีศักยภาพสูง ที่เป็นประโยชน์แสดงดังรูปที่ 2.3 ดังนั้น กรดแลกติกและเกลือของกรดจึงถูกนำมาใช้ในกระบวนการทางเคมีหลายประเภท เช่น กรดแลกติกมีความสามารถในการละลายสูง และเป็นสารที่สามารถจัดพอลิเมอร์และเรซินออกได้ นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิตเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ พรอพิลีนไกลคอล กรดอะคริลิก เอสเทอร์ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ (สุขใจ, 2554)



รูปที่ 2.3 สารเคมีสำคัญที่ผลิตจากกรดแลกติก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Xiaobo และคณะ (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.6 อุตสาหกรรมพอลิเมอร์

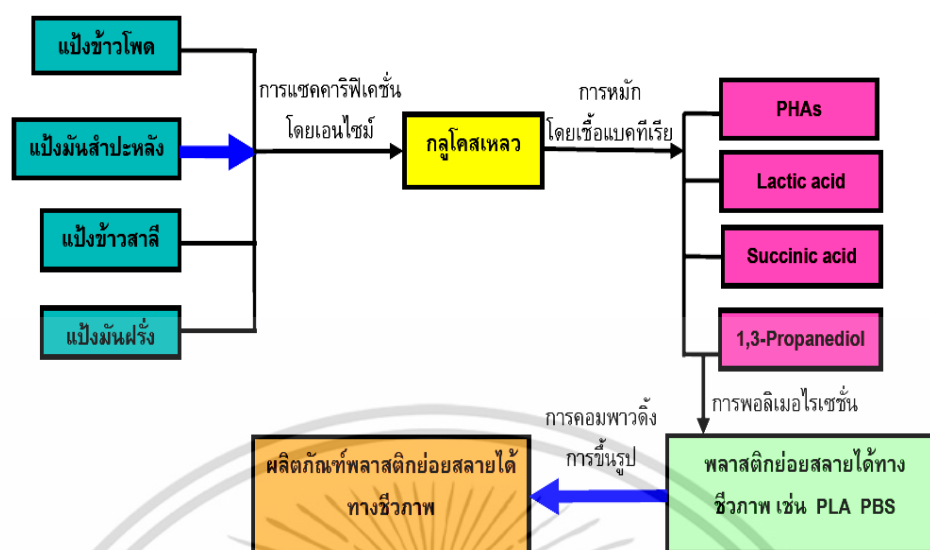
กรดแลกติกเป็นมอนอเมอร์ที่ใช้ในการผลิตพอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid; PLA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเด่นหลายประการ คือ แข็งแรงและทนต่อความร้อนสูง มีความยืดหยุ่น และทนทานต่อการพังอ มีความโปร่งแสงที่ดี สามารถขึ้นรูปและรองรับการพิมพ์ข้อความได้ และเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจึงมีการนำมาใช้แทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเพื่อเป็นการรักษาสภาพแวดล้อม (Adnan และ Tan, 2007) พอลิแลกติกแอซิดแบ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (สังเคราะห์โดยกระบวนการ step growth polymerization ของกรดแลกติก) และพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (สังเคราะห์โดยกระบวนการ ring-opening polymerization ของแลกไทด์ (lactide)) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ทำเสื้อเกราะ ผลิตภัณฑ์สำหรับบรรจุอาหาร แผ่นฟิล์มที่ใช้ห่อหุ้ม ภาชนะบรรจุที่มีรูปร่างคงตัว Shrink-wrap และถาด (ภาชนะบรรจุ) ที่มีอายุการใช้งานสั้น (สุขใจ, 2554) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ และกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้จากวัตถุดิบชีวมวล แสดงดังรูปที่ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ



รูปที่ 2.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ

ที่มา : <http://plastic.oie.go.th> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 25 เมษายน 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้จากวัตถุดิบชีวมวล  
ที่มา : สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ (2552)

กรดแลกติกที่ผลิตทางการค้ามีหลายเกรด โดยแบ่งตามคุณสมบัติและการนำไปประยุกต์ใช้  
ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 กรดแลกติกแบ่งตามเกรดทางการค้า คุณสมบัติ และการประยุกต์ใช้

คุณภาพ	คุณสมบัติ	การประยุกต์ใช้
เกรดในงานทางเทคนิค (technical grade)	สีน้ำตาลอ่อน ปราศจากเหล็ก มีความบริสุทธิ์ 20-80%	อุตสาหกรรมฟอกหนัง และสิ่งทอ การผลิตเอสเทอร์
เกรดอุตสาหกรรมอาหาร (food grade)	ใสและไม่มีสี มีความบริสุทธิ์มากกว่า 80%	สารปรุงแต่งในอาหาร สารให้ความเป็นกรด ผลิตแป้งที่มีรสเปรี้ยว และโด (dough)
เกรดอุตสาหกรรมยา (pharmacopoeia grade)	ใสและไม่มีสี มีความบริสุทธิ์มากกว่า 90% มีเถ้า (ash) น้อยกว่า 0.1%	รักษาอาการในลำไส้ ใช้ในการผลิตยา ใช้ในรูปไอออนของแลกเตต
เกรดอุตสาหกรรมพลาสติก (plastic grade)	ไม่มีสี มีเถ้า น้อยกว่า 0.01%	แลกเกอร์ น้ำมันเคลือบเงา พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ ทางชีวภาพ

ที่มา : สุขใจ (2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ การผลิตทางเคมี และวิธีการทางชีวภาพ ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งการผลิตด้วยวิธีทางเคมีนั้นจะใช้ปิโตรเลียมในกระบวนการสังเคราะห์ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารผสมของ DL-lactic acid (Hofvendahl และ Hahn-Hägerdal, 2000) แต่วิธีการหมักโดยจุลินทรีย์จะได้กรดแลกติกในรูปแบบ L(+)-lactic acid หรือ D(-)-lactic acid ที่บริสุทธิ์ เมื่อใช้จุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่สามารถผลิตโครงสร้างที่ต้องการเพียงโครงสร้างเดียว (Pandey และคณะ, 2001; Ilmen และคณะ, 2007) โดยพบว่าโครงสร้างที่บริสุทธิ์ของกรดแลกติกมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้มากกว่ารูปแบบสารผสม เนื่องจากแต่ละโครงสร้างจะมีความจำเพาะในการใช้ประโยชน์ในแต่ละอุตสาหกรรมที่แตกต่างกัน (Abdel-Rahman และคณะ, 2011) นอกจากนี้การหมักกรดแลกติกโดยจุลินทรีย์ยังมีประโยชน์อีกมากมาย ได้แก่ สามารถนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมัก ใช้อุณหภูมิและพลังงานในการผลิตต่ำ เป็นต้น

### 2.3.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี

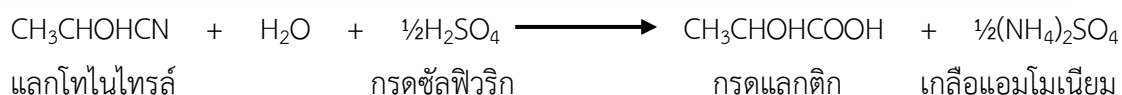
กระบวนการสังเคราะห์กรดแลกติกทางเคมีเพื่อการค้าแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้ (สุขใจ, 2554)

**ขั้นตอนที่ 1** เกิดจากไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ทำปฏิกิริยากับแอซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ในสภาวะความดันบรรยากาศได้เป็นแลกโทไนไทรล์ (lactonitrile) การเติมไฮโดรเจนไซยาไนด์ (addition of hydrogen cyanide)



**ขั้นตอนที่ 2** นำแลกโทไนไทรล์ (lactonitrile) มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟิวริกเข้มข้นได้เป็นกรดแลกติก (lactic acid) และเกลือแอมโมเนียม (ammonium salt) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้

ไฮโดรไลซิสโดยกรดซัลฟิวริก (hydrolysis by  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

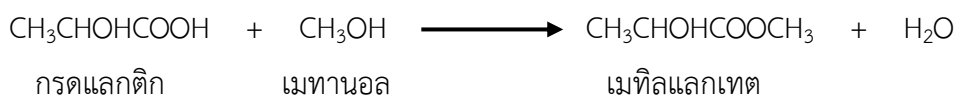


**ขั้นตอนที่ 3** กรดแลกติกหยาบ (crude lactic acid) ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) กับเมทานอล (methanol) ได้เมทิลแลกเตต (methyl lactate) แล้วถูกเก็บเกี่ยว และทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น และไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำที่มีสภาวะกรดเพื่อผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมทานอล ซึ่งจะได้กรดแลกติกในรูปแบบผสมของ DL-lactic acid (racemic lactic acid mixture)

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification)



ไฮโดรไลซิสโดยน้ำ (hydrolysis by H<sub>2</sub>O)

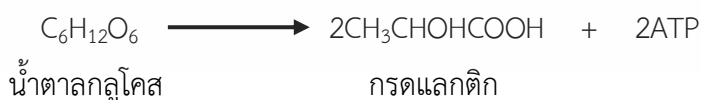


นอกจากนี้การผลิตกรดแลกติกโดยการสังเคราะห์ทางเคมีสามารถผลิตได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของโพรพิลีน (propylene) ด้วยกรดไนตริก ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกรดคลอโรโพรพีนิก (chloropropionic acid) และปฏิกิริยาออกซิเดชันของโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) แต่กระบวนการเหล่านี้ไม่สามารถผลิตเป็นการค้าได้

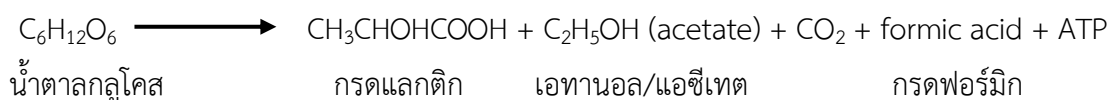
### 2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตกรดแลกติกทางชีวภาพประกอบด้วยขั้นตอนการหมัก การแยกหรือการเก็บเกี่ยวผลผลิต และการทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้บริสุทธิ์ แต่ละขั้นตอนของกระบวนการต้องเป็นขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าที่สุด (สุขใจ, 2554) ซึ่งการหมักโดยแบคทีเรียแลกติก (lactic acid bacteria; LAB) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ โฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (homolactic acid bacteria) และเฮเทอโรแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (heterolactic acid bacteria) ดังสมการต่อไปนี้ (Castillo Martinez, 2013)

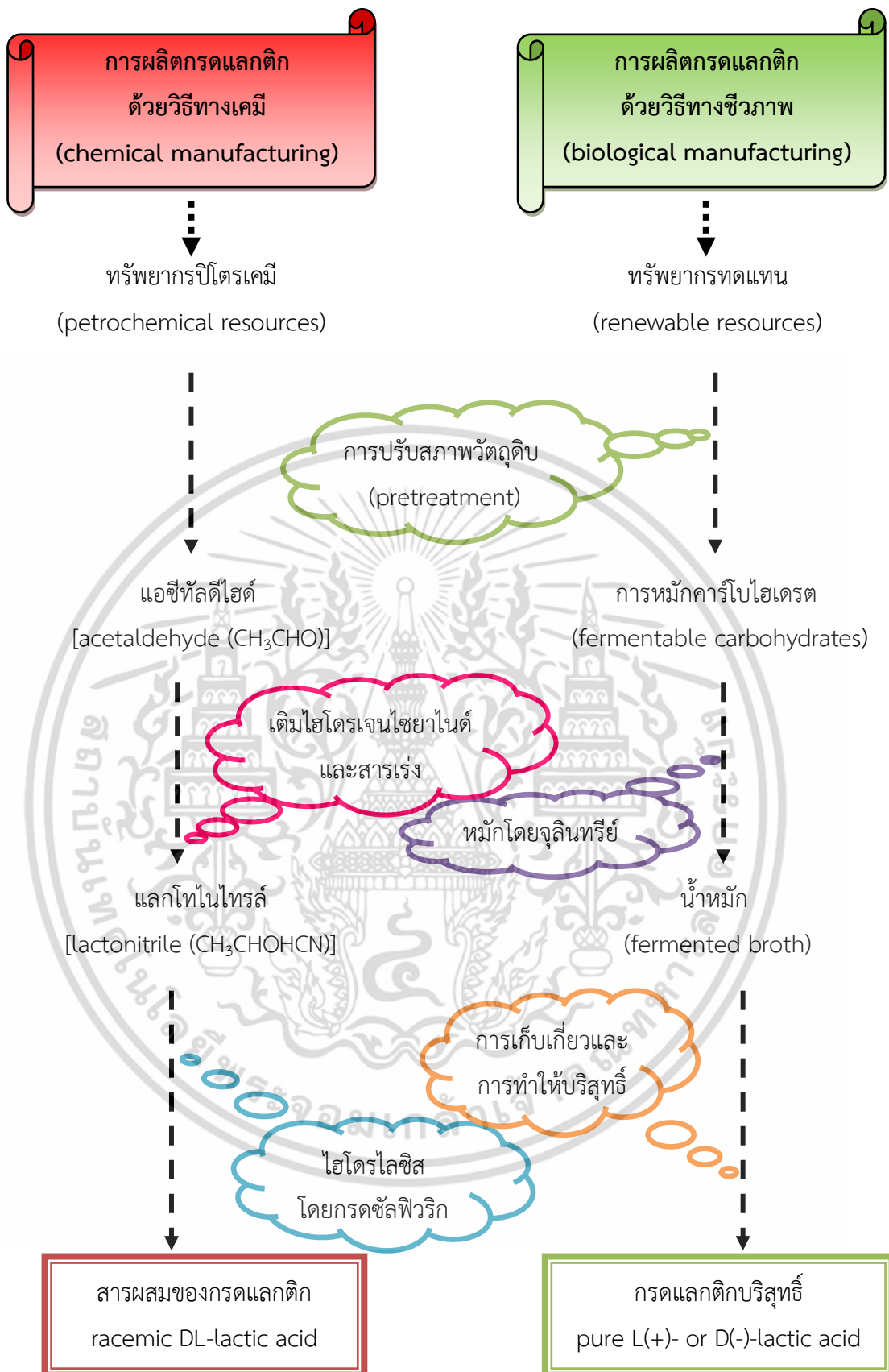
โฮโมแลกติกเฟอร์เมนเตชัน (homolactic fermentation)



เฮเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเตชัน (heterolactic fermentation)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 แผนภาพแสดงขั้นตอนการผลิตกรดแลกติก 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ  
ที่มา : ดัดแปลงจาก Irshad และคณะ (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติก

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรีย (lactic acid bacteria; LAB) และฟังไจ (สุขใจ, 2554)

แบคทีเรียแลกติก (LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) มีรูปร่างกลม (cocci) หรือแท่ง (rod) ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่ผลิตเอนไซม์ คตะเลส (catalase) ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน เติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 3.5-10.0 และอุณหภูมิในช่วง 5-45 องศาเซลเซียส (Abdel-Rahman, 2013) มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนและสมบูรณ์ เพราะแบคทีเรียแลกติกต้องการสารอาหารพวกกรดอะมิโนและวิตามินจำนวนมากในการเจริญเติบโต ส่วนใหญ่ต้องการสารอินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น ไม่สามารถสังเคราะห์ growth factor ได้ และไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน หรือเกลืออนินทรีย์ไนโตรเจนอย่างเดียวได้ (Narayanan, 2004) แหล่งที่สามารถพบแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมักดองต่าง ๆ เป็นต้น

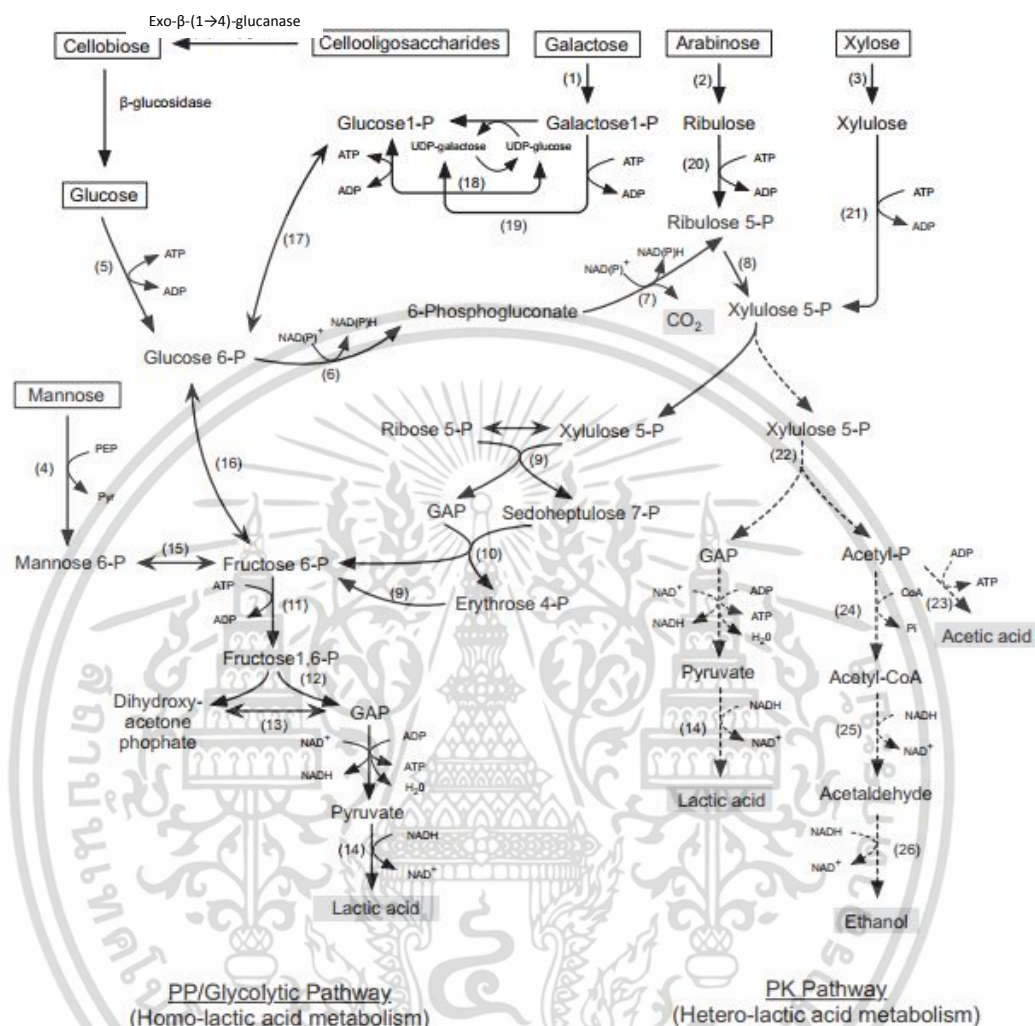
แบคทีเรียแลกติกสามารถแบ่งตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มโฮโมเฟอริเมนเตทีฟแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (homofermentative lactic acid bacteria) ซึ่งผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายทั้งหมด โดยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวต อาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วให้กรดแลกติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ผ่านวิถีไกลโคลิติก (glycolysis หรือ EMP pathway) ได้กรดแลกติก 2 โมล (โมลของกรดแลกติกต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และพลังงาน ATP 2 โมล (อัจฉรา, 2549; Abdel-Rahman, 2013) ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii*

2. กลุ่มเฮเทอโรเฟอริเมนเตทีฟแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (heterofermentative lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้ผลิตภัณฑ์มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะในการผลิต เช่น เอทานอล, ไดแอซีทิล (diacetyl), ฟอริเมต (formate), แอซีตอย (acetoin) หรือกรดแอซิดิก, คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดแลกติก โดยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติก และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) ได้กรดแลกติก 1 โมล (โมลของกรดแลกติกต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และพลังงาน ATP 1 โมล (อัจฉรา, 2549; Abdel-Rahman, 2013) ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus brevis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิถีของการผลิตกรดแลกติกและคุณลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม แสดงดังรูปที่ 2.7 และตารางที่ 2.3 ตามลำดับ ดังนี้



รูปที่ 2.7 วิถีของการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลที่ได้จากทรัพยากรทดแทน (กลูโคส, ไซโลส, เซลโลไบโอส, อะราบินอส, แมนโนส และกาแลกโทส) โดยแบคทีเรียแลกติก (LAB) (glyceraldehydes 3-phosphate; GAP, phosphoenolpyruvate; PEP, pyruvate; Pyr) เอนไซม์ในปฏิกิริยา :

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| (1) galactokinase                     | (14) lactate dehydrogenase                    |
| (2) arabinose isomerase               | (15) phosphomannose isomerase                 |
| (3) xylose isomerase                  | (16) phosphoglucose isomerase                 |
| (4) mannose phosphotransferase system | (17) phosphoglucomutase                       |
| (5) hexokinase                        | (18) galactose-1-phosphate uridyl transferase |
| (6) glucose-6-phosphate dehydrogenase | (19) glucosyltransferase                      |
| (7) 6-phosphogluconate dehydrogenase  | (20) ribulokinase                             |
| (8) ribulose-5-phosphate-3-epimerase  | (21) xylulokinase                             |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.7 วิธีของการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลที่ได้จากทรัพยากรทดแทน (กลูโคส, ไซโลส, เซลโลไบโอส, อะราบิโนส, แมนโนส และกาแลกโทส) โดยแบคทีเรียแลกติก (LAB) เอนไซม์ในปฏิกิริยา : (ต่อ)

- |                                     |                             |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| (9) transketolase                   | (22) phosphoketolase        |
| (10) transaldolase                  | (23) acetate kinase         |
| (11) 6-phosphofructokinase          | (24) phosphotransacetylase  |
| (12) fructose-bisphosphate aldolase | (25) aldehyde dehydrogenase |
| (13) triosephosphate isomerase      | (26) alcohol dehydrogenase  |

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wang และคณะ (2015)

ตารางที่ 2.3 ความแตกต่างระหว่างโฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรียและเฮเทอโรแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

คุณลักษณะ	โฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	เฮเทอโรแลกติกแอซิดแบคทีเรีย
ผลิตภัณฑ์	กรดแลกติก	กรดแลกติก, เอทานอล, ไดแอซีทิล, ฟอว์เมต, แอซิตอยหรือกรดแอซิดิก และคาร์บอนไดออกไซด์
วิธีเมแทบอลิซึม	<ul style="list-style-type: none"> <li>ใช้วิถีไกลคอลิติกในการหมักน้ำตาลเฮกโซส</li> <li>ใช้วิถีเพนโทสฟอสเฟตในการหมักน้ำตาลเพนโทส</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ใช้วิถีฟอสโฟกลูโคเนตและฟอสโฟคีโตเลสในการหมักน้ำตาลเฮกโซส</li> <li>ใช้วิถีฟอสโฟคีโตเลสในการหมักน้ำตาลเพนโทส</li> </ul>
ผลผลิตกรดแลกติกต่อปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ตามทฤษฎี	น้ำตาลเฮกโซส; 1.0 กรัมต่อกรัม (2.0 โมลต่อโมล) น้ำตาลเพนโทส; 1.0 กรัมต่อกรัม (1.67 โมลต่อโมล)	น้ำตาลเฮกโซส; 0.5 กรัมต่อกรัม (1.0 โมลต่อโมล) น้ำตาลเพนโทส; 0.6 กรัมต่อกรัม (1.0 โมลต่อโมล)
จุลินทรีย์	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> และ <i>Lactobacillus</i> บางสายพันธุ์	<i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> และ <i>Lactobacillus</i> บางสายพันธุ์
ประโยชน์ในการผลิตกรดแลกติกทางการค้า	สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เนื่องจากมีความจำเพาะสูง	ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ในปริมาณมาก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Abdel-Rahman และคณะ (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

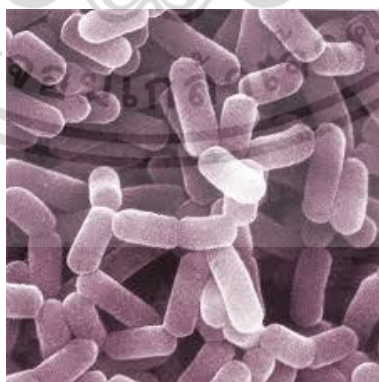
*Lactobacillus casei* TISTR 390 แสดงดังรูปที่ 2.8 เป็นเฮเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ (heterolactic fermentative) (Mack, 2004) จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic (Wang และคณะ, 2015) ใช้วิถีไกลคอลลิติกในการหมักน้ำตาลเฮกโซส มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase นอกจากสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสแล้วยังสามารถหมักน้ำตาลเพนโทส และบางครั้งสามารถหมักกลูโคเนต โดยในขณะที่มีกลูโคสนั้นเอนไซม์ของวิถีฟอสโฟกลูโคเนตจะถูกยับยั้ง (สุขใจ, 2554) สามารถผลิตกรดแลคติกในรูปของ L(+)-lactic acid ร้อยละ 95 (Nakazawa และ Hosono, 1992) เซลล์เป็นรูปท่อนขนาด  $0.7-1.1 \times 2.0-4.0$  ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสี่แกรมบวก และจะติดสี่แกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรด เป็นพวกที่ทนกรด (aciduric) ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 5.5-6.2 อัตราการเจริญลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือเป็นด่าง และเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างประมาณ 15-40 องศาเซลเซียส ไม่มีแฟลกเจลลา (flagella) จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ การสร้างสารสีพบได้น้อยมาก ถ้าพบก็จะมีสีเหลืองส้มจนถึงสีแดงอิฐ โคโลนีมีลักษณะผิวเรียบ มีสีขาวค่อนข้างโปร่งแสง ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไรโบฟลาวิน (riboflavin), กรดโฟลิก (folic acid), แคลเซียมแพนโททีเนต (calcium pantothenate) และไนอะซิน (niacin) (อัจฉรา, 2549) แยกได้จากนม ผลิตภัณฑ์นม เนย และมีบทบาทในการหมักยาคูลท์ (ชลลดา, 2551) แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ

*Lactobacillus casei* subsp. *casei*

*Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*

*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

*Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*



รูปที่ 2.8 เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 390

ที่มา : <https://www.linkedbiotics.com/lactobacillus-casei/>

(สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 19 สิงหาคม 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 กระบวนการหมักกรดแลกติก

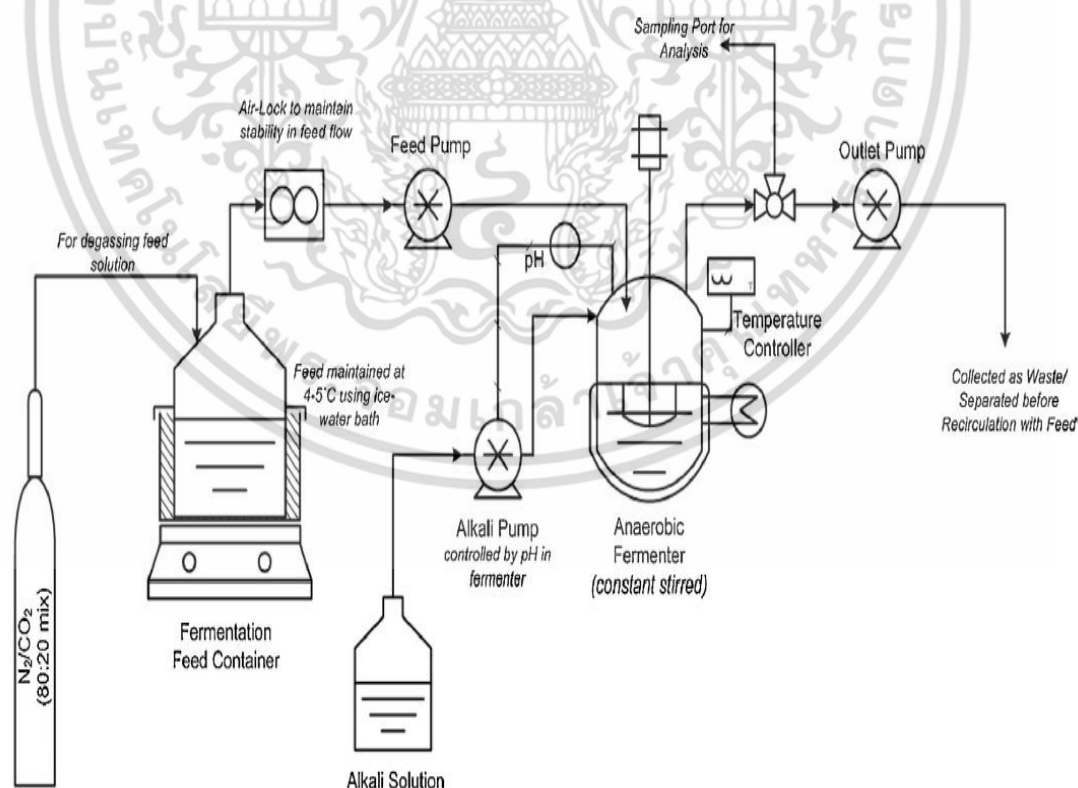
กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักกลูโคสของแบคทีเรียพวกที่สร้างกรดแลกติก ซึ่งกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสมี 2 แบบ คือ

1. โฮโมแลกติกเฟอร์เมนเตทีฟ (homolactic fermentative) เป็นกระบวนการหมักที่ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กรดแลกติก

2. เฮเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเตทีฟ (heterolactic fermentative) เป็นกระบวนการหมักที่ให้ผลิตภัณฑ์ คือ เอทานอล, ไดแอซีทิล (diacetyl), ฟอर्मेट (formate), แอซีตอย (acetoin) หรือ กรดแอซีติก, คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดแลกติก

### 2.5.1 วิธีการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติก

กระบวนการหมักแบบกะ (batch), กึ่งกะ (fed-batch), repeated batch และต่อเนื่อง (continuous) เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุดสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยการหมักแบบกะเป็นการหมักที่ให้ปริมาณกรดแลกติกที่มีความเข้มข้นสูงกว่า ขณะที่การหมักแบบกึ่งกะ และแบบต่อเนื่องให้ผลผลิตและอัตราการผลิตที่สูงกว่า (สาโรจน์ และคณะ, 2544; สุขใจ, 2554) ซึ่งการหมักกรดแลกติกจากไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดแบบต่อเนื่องแสดงดังรูปที่ 2.9 และการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทดแทนทางการเกษตรโดยใช้กระบวนการหมักที่แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 2.4 รวมถึงข้อดีและข้อเสียของวิธีการหมักแบบต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.5



รูปที่ 2.9 แผนภาพแสดงการหมักกรดแลกติกจากไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดแบบต่อเนื่อง

ที่มา : Ahring และคณะ (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทดแทนทางการเกษตรโดยใช้กระบวนการหมักที่แตกต่างกัน

จุลินทรีย์	ซับสเตรต	วิธีการหมัก	กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Bacillus</i> sp. strain XZL9	ซังข้าวโพด, กากน้ำตาล	fed-batch	74.7	0.38	Wang และคณะ (2010)
<i>Enterococcus faecium</i> No. 78	แป้งสาชู	batch	16.6 ± 0.8	1.105 ± 0.06	Shibata และคณะ (2007)
		continuous	10.4	1.56	
		continuous (with high cell density)	11.7	3.04	
<i>E. faecalis</i> RKY1	ไฮโดรไลเสทไม้	batch	93.0	1.7	Wee และคณะ (2004)
<i>Lactobacillus bifementans</i> DSM 20003 <sup>T</sup>	ไฮโดรไลเสท รำข้าวสาลี	batch	62.8	1.2	Givry และคณะ (2008)
		batch	39.1	0.81	Guo และคณะ (2010)
<i>L. brevis</i> S3F4	ซังข้าวโพด	batch	83.8	1.40	John และคณะ (2006)
<i>L. casei</i> NCIMB 3254	กากมันสำปะหลัง	SSF	141.5	4.7	Ge และคณะ (2010)
<i>L. casei</i> G-02	แก่นตะวัน	fed-batch, SSF	162.5	1.69	Li และคณะ (2006)
<i>L. casei</i> LA-04-1	กากถั่วเหลือง	fed-batch (fed with CSL)	180	2.14	
		fed-batch (fed with YE)			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทดแทนทางการเกษตรโดยใช้กระบวนการหมักที่แตกต่างกัน (ต่อ)

จุลินทรีย์	ซับสเตรต	วิธีการหมัก	กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>L. delbrueckii</i> NRRL B-445	อัลฟัลฟา	SSF	35.4	0.75	Sreenath และคณะ (2001)
<i>L. delbrueckii</i> mutant Uc-3	เซลโลไบโอส และเซลโลไตรโอส	batch	90.0	2.3	Adsul และคณะ (2007)
		batch	48.7	1.01	
<i>L. delbrueckii</i> ZU-S2	ซังข้าวโพด	continuous	44.2	5.7	Shen และ Xia (2006)
		batch	166	4.2	
<i>L. delbrueckii</i> mutant Uc-3	กากน้ำตาล	batch	166	4.2	Dumbrepatil และคณะ (2008)
		SSF	28.0	0.78	
<i>L. delbrueckii</i> IFO 3202	รำข้าว	SSF	28.0	0.78	Tanaka และคณะ (2006)
<i>L. paracasei</i> LA 104	สาหร่ายสีเขียว	SSF	37.11	1.03	Nguyen และคณะ (2012)
		batch	24.0	0.51	
<i>L. pentosus</i> CECT-4023T	เถาองุ่น	batch	24.0	0.51	Moldes และคณะ (2006)
		SSF	46.4	0.64	
<i>L. plantarum</i> 14431	อัลฟัลฟา	SSF	46.4	0.64	Sreenath และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทดแทนทางการเกษตรโดยใช้กระบวนการหมักที่แตกต่างกัน (ต่อ)

จุลินทรีย์	ซับสเตรต	วิธีการหมัก	กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>L. rhamnosus</i> HG 09	แป้งข้าวโพด	batch	57.61 ± 1.37	1.60 ± 0.12	Lu และคณะ (2010)
<i>Lactobacillus</i> sp. MKT-878 NCAIMB 02375	แป้งข้าวสาลี	SHF	118	1.71	Hetényi และคณะ (2011)
		SSF	97	1.74	
<i>Lactobacillus</i> sp. RKY2	รำข้าว และรำข้าวสาลี	batch	129	3.1	Yun และคณะ (2004)
		ไฮโดรไลเสท ลิกโนเซลลูโลส	27.0	6.7	Wee และ Ryu (2009)
<i>Lactococcus lactis</i> IO-1	ชานอ้อย	batch	10.9	0.17	Laopalboon และคณะ (2010)

หมายเหตุ SSF; simultaneous saccharification and fermentation

SHF; separate hydrolysis and fermentation

CSL; corn steep liquor

YE; yeast extract

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wang และคณะ (2015)

ตารางที่ 2.5 แสดงข้อดีและข้อเสียของวิธีการหมักแบบต่าง ๆ

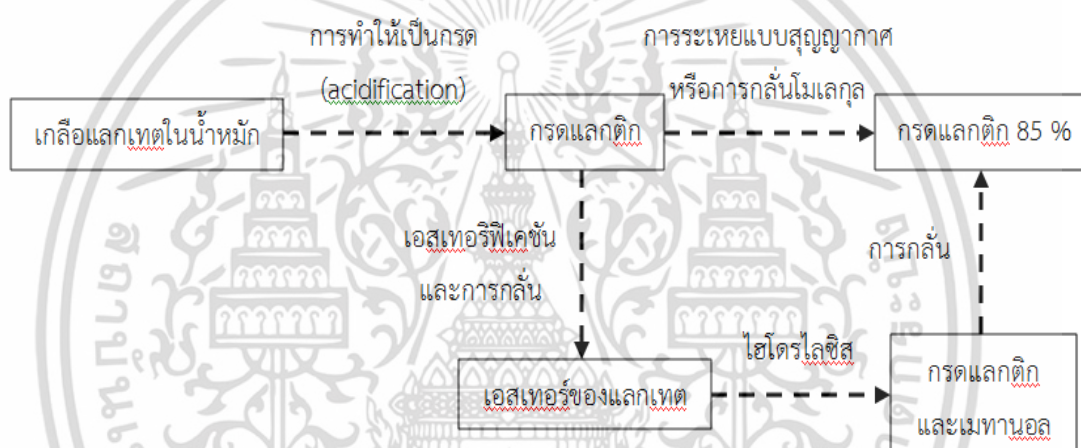
วิธีการหมัก	ข้อดี	ข้อเสีย
การหมักแบบกะ (batch fermentation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ควบคุมระบบการทำงานได้ง่ายไม่ซับซ้อน</li> <li>ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูง</li> <li>ลดความเสี่ยงในการปนเปื้อน</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ต่ำ</li> <li>เกิดการยับยั้งโดยซับสเตรต ความเข้มข้นสูง และ/หรือ โดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย</li> </ul>
การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>แก้ปัญหาการยับยั้งโดยซับสเตรตความเข้มข้นสูง</li> <li>ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูง</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>เกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย</li> <li>ควบคุมระบบการทำงานได้ยาก</li> </ul>
การหมักแบบกะซ้ำ (repeated fermentation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ประหยัดเวลาการทำงาน</li> <li>ประหยัดแรงงาน</li> <li>ลดเวลาในการเตรียมหัวเชื้อ</li> <li>จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตสูง</li> <li>ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงสั้น</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ หรือวิธีการเชื่อมต่อแบบพิเศษ เช่น การใช้อุปกรณ์แบบเส้นใยกลวง เป็นต้น ในการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์</li> </ul>
การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูง</li> <li>ควบคุมอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้</li> <li>ระบบสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่อง</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>จุลินทรีย์ใช้แหล่งคาร์บอนได้ไม่สมบูรณ์</li> </ul>

ที่มา : ดัดแปลงจาก Abdel-Rahman และคณะ (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 กระบวนการแยกกรดแลกติกและการทำให้บริสุทธิ์

การพัฒนาประสิทธิภาพวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตกรดแลกติกจากน้ำหมักเป็นปัจจัยสำคัญของกระบวนการหมักกรดแลกติกเพื่อให้เกิดความคุ้มค่า เนื่องจากขั้นตอนในกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์คิดเป็นราคาต้นทุนการผลิตประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่ากรดแลกติกและน้ำมีจุดเดือดแตกต่างกัน แต่ไม่สามารถทำให้เกิดกรดแลกติกบริสุทธิ์ได้ เพราะกรดแลกติกมีความชอบน้ำสูง ซึ่งจะทำให้เกิดรูปแบบแลกเทตไดเมอร์เมื่อกรดแลกติกมีความเข้มข้นสูง ผลิตภัณฑ์กรดแลกติกทางการค้าโดยทั่วไปอยู่ในรูปของเหลวที่ประกอบด้วยกรดแลกติก 85 เปอร์เซ็นต์ (สุขใจ, 2554) กระบวนการแยกและการทำให้กรดแลกติกบริสุทธิ์จากอาหารในกระบวนการหมักแสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แผนภาพแสดงกระบวนการแยกและการทำให้กรดแลกติกบริสุทธิ์จากน้ำหมัก  
ที่มา : สุขใจ (2554)

กระบวนการแยกกรดแลกติกโดยวิธีทางเคมีแบบดั้งเดิม เริ่มจากนำน้ำหมักมาปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตทำให้เกิดตะกอนของแคลเซียมแลกเทต จากนั้นสารละลายแคลเซียมแลกเทตจะตกผลึก และเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกโดยทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริก (Datta และ Henry, 2006) ในกระบวนการทางชีวภาพขั้นตอนของการสกัดจะทำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมซัลเฟต (ยิปซัม) จำนวนมาก ซึ่งทำให้เกิดของเสีย และสิ้นเปลืองกรดซัลฟิวริกปริมาณมาก (Qin และคณะ, 2010) ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีเกี่ยวกับการแยกกรดแลกติกโดยวิธีการต่าง ๆ เพื่อช่วยลดราคาต้นทุนในช่วงการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูง และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด เช่น reactive extraction, membrane separation, ion-exchange, electrodialysis, chemical reaction distillation และ reverse osmosis ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

### 2.7.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ, 2544) แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือ น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ และคาร์โบไฮเดรต แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ถ้าเป็นการเตรียมกล้าเชื้อจะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะไม่มีผลต่อความสามารถในการหมัก ส่วนใหญ่มักใช้กลูโคสบริสุทธิ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์กรดแลกติกที่บริสุทธิ์ซึ่งง่ายต่อการแยกและทำให้บริสุทธิ์ แต่ไม่เหมาะกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากกลูโคสบริสุทธิ์มีราคาแพง (Hofvendahl และ Hahn-Hägerdal, 2000) จึงได้มีการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น ชี้อ้อยไม้อย่างพาราซึ่งเป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปอ้อยเป็นน้ำตาล เป็นต้น

Dietz และคณะ (2016) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอัลฟัลฟา (alfalfa green juices) และน้ำใบโคลเวอร์ (clover green juices) โดยเชื้อ *Bacillus coagulans* AT107 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 พบว่าการหมักกรดแลกติกจากน้ำอัลฟัลฟาให้ผลผลิตกรดแลกติก 98.8 กรัมต่อลิตร หลังจากดำเนินการหมัก 30 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการหมักจากน้ำใบโคลเวอร์

Hu และคณะ (2016) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากซังข้าวโพด โดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* FL0421 พบว่าเมื่อทำการหมักไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนซังข้าวโพดต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:5 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แบบกึ่งกะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะให้ผลผลิตกรดแลกติก 92.30 กรัมต่อลิตร ผลได้กรดแลกติก 0.66 กรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิต 1.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

### 2.7.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห่งความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ โดยชนิดและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งจะต้องปรับสภาวะให้เหมาะสม จึงจะได้ผลผลิตที่สูงขึ้น (สมใจ, 2544) การศึกษาเกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมยีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญเติบโตและช่วยให้จุลินทรีย์ผลิตกรดแลกติกได้ดี (Kadam และคณะ, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอินทผลัมและอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทรีปทิกซอย ยูเรีย เปปโตน และเคซีน พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตร

Yu และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus casei* CGMCC โดยใช้ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแร่ธาตุต่าง ๆ ตามสูตรอาหารสำหรับหมักกรดแลกติก ดังนี้ กลูโคส 118.20 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาล 37.27 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำข้าวโพด 42.54 มิลลิลิตรต่อลิตร tween 80 1.52 มิลลิลิตรต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.30 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 115.12 กรัมต่อลิตร

Ogumbanwo และ Okanlawon (2009) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยโฮโมแลกติกแบคทีเรีย พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของยีสต์สกัดให้ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกสูงที่สุด ตามมาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเคซีน ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตกรดแลกติกต่ำ ซึ่งเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดเท่ากับ  $18.40 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะเห็นว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ผลิตกรดแลกติกได้เพียง  $0.09 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร

### 2.7.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแลกติกของจุลินทรีย์ ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ของธาตุโพแทสเซียม (โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.15-0.60 กรัมต่อลิตร), ฟอสฟอรัส, แมกนีเซียม (แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4$ ) 0.15-0.75 กรัมต่อลิตร) และแมงกานีส เป็นต้น (สุขใจ, 2554) นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น โคบอลต์, ทองแดง, เหล็ก (เฟอร์ริกซัลเฟต [ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ] และสังกะสี (ซิงก์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4$ ) 0.04-0.09 กรัมต่อลิตร) โดยทั่วไปมักจะพบแร่ธาตุเหล่านี้เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่าง ๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้น อาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการเลี้ยงเชื้อ (สมใจ, 2544)

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งและเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงงานอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* 18011 พบว่าเมื่อเติมธาตุแมงกานีสลงไปในการเลี้ยงเชื้อจะให้ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมงกานีส

Nancib และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทรีปทิกซอย ยูเรีย เปปโตน และเคซีน ในน้ำอินทผลัม

สำหรับผลิตภัณฑ์แลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* พบว่าเมื่อเติมวิตามินบี ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ปริมาณผลผลิตกรดแลคติกสูงขึ้น

Xu และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของวิตามิน (B1, B2, B5 และ B6) ต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401 พบว่าการเติมวิตามินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ปริมาณผลผลิตกรดแลคติกสูงกว่าการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมวิตามิน

#### 2.7.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดแลคติก เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแตกต่างกันไป นอกจากนี้อุณหภูมียังมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลคติกในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย แต่โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 37-45 องศาเซลเซียส (อรทัย, 2553)

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือใช้ของโรงงานผลิตน้ำสับปะรด โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าอุณหภูมิเหมาะสมที่จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส

John และคณะ (2006) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 พบว่าอุณหภูมิเหมาะสมที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ โดยเซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าที่อุณหภูมิช่วง 37-40 องศาเซลเซียสเหมาะสมสำหรับหมักกรดแลคติก ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 32.91 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลแลคโทสสูงสุดถึงร้อยละ 94.37

#### 2.7.5 ค่าความเป็นกรดต่าง

ค่าความเป็นกรดต่างเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด (ค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 4.5-6.5) ในการผลิตกรดแลคติกจำเป็นต้องควบคุมค่าความเป็นกรดต่างให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการหมักจึงจะได้ผลผลิตกรดปริมาณมาก โดยทั่วไปค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติกอยู่ในช่วง 5-6 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ การควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่ละลายน้ำ ถ้าค่าความเป็นกรดต่างลดลงคาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดต่างคงที่ประมาณ 7 หรืออาจควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมกรดหรือด่าง เช่น กรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น (สมใจ, 2544)

Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้ของโรงงานผลิตน้ำสับประรดโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงที่สุด

John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงที่สุด

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุดเท่ากับ 32.93 กรัมต่อลิตร

Mussatto และคณะ (2008) ศึกษาอิทธิพลของอาหารเสริมและค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากกากเบียร์แห้ง (brewer's spent grain) โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 35.54 กรัมต่อลิตร

#### 2.7.6 การให้อากาศ

ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญ และการผลิตสารเมแทบอไลต์ (สมใจ, 2544) โดยทั่วไปแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าออกซิเจนมีผลต่อรูปแบบของการหมักกรดแลกติกอีกด้วย (โฮโมแลกติกเฟอร์เมนเตชัน (homolactic fermentation), เฮเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเตชัน (heterolactic fermentation))

Condon (1987) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Leuconostoc* sp. ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบว่าจุลินทรีย์มีการผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนพบว่าจุลินทรีย์มีการสร้างกรดแอสติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

Tseng และ Montville (1993) รายงานว่าออกซิเจนมีผลต่อไพรูเวทเมแทบอลิซึมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งออกซิเจนจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแลกเทตไปเป็นแอสซิเตตและคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างกระบวนการหมัก

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าสภาวะการหมักที่มีการควบคุมการให้อากาศ โดยการกวนที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึงร้อยละ 98

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรราคาถูก โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าการหมักที่มีการให้อากาศโดยการกวนที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

### 2.7.7 สารปรับสภาพให้เป็นกลาง

อุตสาหกรรมที่ใช้กระบวนการทางชีวภาพผลิตกรดแลกติกจะมีการเติมสารปรับสภาพให้เป็นกลาง เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนีย เป็นต้น ลงในอาหารสำหรับหมักเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดต่างระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในน้ำหมัก เพื่อรักษาความเข้มข้นของกรดแลกติก และช่วยป้องกันการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอิสระจากผลิตภัณฑ์ โดยแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารที่ใช้มากในสภาวะพลาสก์เขย่า และในถังหมัก อย่างไรก็ตาม การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตและสารปรับสภาพให้เป็นกลางอื่น ๆ สำหรับควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของกรดแลกติก ซึ่งมีค่า pKa 3.86 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการสร้างเกลือแลกเตทแทนกรดแลกติก เป็นผลให้กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก และมีต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย (สุขใจ, 2554)

Altaf และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากอาหารแข็ง โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV 6 ซึ่งได้มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นบัฟเฟอร์ช่วยปรับค่าความเป็นกรดต่างระหว่างดำเนินการหมัก พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 3.8 กรัมต่อ 6 กรัมสารตั้งต้น

Ding และ Tan (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ซึ่งมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 กรัมต่อลิตร พบว่ากรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2361 สำหรับการผลิตกรดแลกติก พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

## 2.8 ยางพารา

### 2.8.1 ประวัติความเป็นมา

ยางพาราเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่มีอายุยืนยาวนานับร้อย ๆ ปี เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ อยู่ในสกุล (Genus) *Hevea* และวงศ์ (Family) *Euphorbiaceae* มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบกลุ่มเม่น้ำอเมซอน ประเทศบราซิล ทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งเป็นที่รู้จักของชาวพื้นเมืองในแถบนี้มานานแล้ว โดยชาวพื้นเมืองเรียกว่า “เกาซู” (cao tchu) แปลว่า ต้นไม้ร้องไห้ ในสมัยก่อนปี พ.ศ. 2000 ชาวอินเดียนแดงเผ่ามายันในอเมริกากลางได้รู้จักใช้ประโยชน์จากต้นยางโดยนำน้ำยางมาใช้ทำรองเท้า เมื่อเขาต้องการรองเท้าก็จะจุ่มเท้าลงไปในภาชนะบรรจุน้ำยางดิบซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนได้รองเท้าที่มีความหนาตามต้องการ นอกจากนี้ชาวอินเดียนแดงทั้งเผ่ามายันและเผ่าอื่น ๆ ยังนำยางไปใช้ประโยชน์ในการทำผ้ากันฝน ทำขวดปากแคบใส่น้ำ และทำลูกบอลสำหรับเล่นเกมต่าง ๆ เป็นต้น (มานะชัย, 2550)

ต่อมาเมื่อปี พ.ศ. 2036 ชาวยุโรปได้เริ่มรู้จักยางพาราเมื่อครั้งที่คริสโตเฟอร์โคลัมบัส ได้เดินทางไปสำรวจทวีปอเมริกาเป็นครั้งที่ 2 (พ.ศ. 2036-2039) และได้พบชาวพื้นเมืองของเกาะเฮติ (Haiti) ซึ่งเป็นชาวอินเดียนแดงกำลังเล่นลูกบอลยางโดยการให้กระทบลงพื้น เมื่อลูกบอลยางกระทบลงพื้นก็ใช้มือตีให้ลงกระทบพื้นอีก ทำให้โคลัมบัสและคณะประหลาดใจอย่างยิ่ง โดยคิดไปว่าชาวอินเดียนแดงเลี้ยงผีไว้ในวัดถุนั้น หลังจากนั้นความสนใจเกี่ยวกับเรื่องยางพาราของชาวยุโรปได้เพิ่มมากขึ้น จนถึงปี พ.ศ. 2313 (1770) โจเซฟ พรืสต์ลีย์ พบว่ายางสามารถนำมาลบลอยดำของดินสอได้ เรียกว่า ยางลบ หรือตัวลบ (rubber) ซึ่งเป็นศัพท์ใช้ในอังกฤษและเนเธอร์แลนด์เท่านั้น ศูนย์กลางของการเพาะปลูกและซื้อขายยางในอเมริกาใต้แต่ดั้งเดิมอยู่ที่รัฐปารา (Pará) ของบราซิล ยางชนิดนี้จึงมีชื่อเรียกว่า “ยางพารา” (สมาคมธุรกิจไม้ยางพาราไทย, 2546)

ยางพาราถูกนำมาปลูกครั้งแรกในประเทศไทยปี พ.ศ. 2443 โดยเจ้าพระยาเมืองตรัง จากนั้นได้ขยายพื้นที่ปลูกเรื่อยมาจวบจนปัจจุบันมีประมาณ 12 ล้านไร่ ส่วนใหญ่อยู่ที่ภาคใต้ของประเทศไทย ไม้ยางพาราถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่ให้ผลผลิตเป็นน้ำยางซึ่งสร้างรายได้ให้แก่ชาวสวนยางเกือบทุกวัน ไม้ยางพาราเมื่อมีอายุประมาณ 25-30 ปี จะให้ผลิตผลน้ำยางลดลง ต้องโค่นทิ้งและปลูกใหม่ซึ่งต้องรออีก 6-7 ปี จึงสามารถกรีดยางได้ ในอดีตเมื่อมีการโค่นต้นยางพาราจะสร้างปัญหาให้กับชาวสวนมาก เพราะไม่สามารถนำไม้ไปใช้ประโยชน์ได้นอกจากใช้เป็นฟืนและถ่าน สาเหตุคือ ไม้ยางพาราไม่ทนต่อการกัดแทะของแมลง และเชื้อราต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีตุ่มและตาอีกมากมาย ในเนื้อไม้ทำให้ดูไม่สวยงาม แต่ด้วยเทคโนโลยีสมัยใหม่ ปัจจุบันสามารถแปรรูปไม้ยางพาราให้เป็นเฟอร์นิเจอร์ที่สวยงาม ทนทาน และราคาไม่แพง (ศูนย์ส่งเสริมพลังงานชีวมวล, 2549) ลักษณะของต้นยางพาราแสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ลักษณะของต้นยางพารา

(ก) ต้นยางพารา (ข) เนื้อไม้ยางพารา

ที่มา : <http://www.herb-health.com>

(สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 23 สิงหาคม 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ในทางพฤกษศาสตร์ได้จัดอนุกรมวิธานของต้นยางพารา ดังนี้ (เอกชัย, 2547)

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Rosidae

Order : Euphorbiales

Family : Euphorbiaceae

Genus : *Hevea*

Species : *brasiliensis*

ชื่อภาษาอังกฤษ Para rubber

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hevea brasiliensis*

ราก ยางพาราเป็นพืชที่มีระบบรากเป็นรากแก้ว

ลำต้น มีลักษณะทรงกลม ขึ้นตั้งตรง สูงปานกลาง

**เนื้อไม้** จัดอยู่ในประเภทไม้เนื้ออ่อน เนื้อไม้มีสีขาวอมเหลือง เมื่อเป็นไม้สดจะมีเนื้อไม้สีขาวยอมเหลือง แต่เมื่อเนื้อไม้แห้งจะเปลี่ยนเป็นสีขาวยาง เป็นไม้ที่ไม่มีแก่น วงรอบปีไม่ชัดเจน เนื้อไม้มีลักษณะหยาบปานกลาง แข็งเหนียว บิดตัวง่าย และเสี้ยนตรง มองทางด้านหน้าตัดจะเห็นท่อน้ำยาง (latex vessel) ต่อกันเป็นวงตามแนวด้านสัมผัส ส่วนเรย์ (ray) มีขนาดเล็กมากและมีสีอ่อนกว่าเนื้อไม้ และพอร์ (pore) เป็นแบบ radial multiple ซึ่งการเรียงตัวจะตัดกันระหว่างเรย์กับเมตาทราเคียพาเรงคิมา (metatracheal parenchyma) ทำให้มองดูเนื้อไม้คล้ายตาข่าย

**เปลือกไม้** เปลือกสีเทาดำ ก่อนจะถึงเปลือกไม้จะมีเยื่อเจริญที่อยู่รอบต้น มีหน้าที่สร้างความเจริญทั้งในด้านความสูงและขนาดลำต้น ส่วนที่ถัดจากเยื่อเจริญเป็นเปลือกไม้ที่ห่อหุ้มเยื่อเจริญอยู่ด้านนอกสุดของลำต้น มีหน้าที่ป้องกันอันตราย

**ความสำคัญของเปลือก** เพราะเปลือกเป็นส่วนของท่อน้ำยางที่อยู่ติดกับเยื่อเจริญ และมีท่อน้ำยาง ซึ่งเป็นส่วนที่จะกรีดเป็นน้ำยางออกจากต้น

**ใบ** ใน 1 ก้านใบจะมีใบย่อยอยู่ 3 ใบ หรือเป็น 3 แฉก มีหน้าที่หลัก คือ ปรุงอาหาร หายใจ และคายน้ำ ใบยางพาราจะเจริญเติบโตเป็นชั้น ๆ เรียกว่า “ฉัตร” การแตกฉัตรตั้งแต่ใบฉัตรอ่อนจนเป็นใบฉัตรแก่ ใช้เวลา 2-3 เดือน แล้วแต่ความสมบูรณ์ของต้น

การผลัดใบของยางพารา

1. ถ้าเป็นยางต้นเล็กที่อายุไม่ถึง 3 ปี จะไม่ผลัดใบ
2. ถ้าเป็นต้นโตแล้วจะผลัดใบในฤดูแล้งของทุกปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ดอกยางพารา** ดอกมีลักษณะเป็นช่อยาวออกจากปลายกิ่ง เป็นดอกสมบูรณ์ เพราะมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในช่อเดียวกัน ดอกมีสีเหลือง ยางพาราจะออกดอกหลังจากผลัดใบแล้วแตกใบใหม่ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน

**ลูกยาง (ผล)** ผลมีลักษณะเหมือนผลแอปเปิ้ล แต่มีขนาดเล็กกว่า มีลักษณะเป็นพวงจำนวน 3 พู ในแต่ละพวงจะมีเมล็ดอยู่ข้างใน ผลอ่อนมีผิวสีเขียว เมื่อผลแก่มีผิวสีน้ำตาลและแข็ง

**เมล็ด** เมล็ดของยางพารามีความยาวและกว้างประมาณ  $2.00-2.25 \times 1.5-2.5$  เซนติเมตร มีน้ำหนักประมาณ 3-6 กรัมต่อเมล็ด สีของเมล็ดเป็นลาย มีพื้นเป็นสีขาว มีลายสีน้ำตาล เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเมื่อเก็บใหม่ ๆ ในอุณหภูมิปกติจะสูง ต่อมาเปอร์เซ็นต์ความงอกจะลดลงเรื่อย ๆ เพราะในเมล็ดมีน้ำมัน ซึ่งพืชที่มีน้ำมันในเมล็ดจะมีความงอกลดลงอย่างรวดเร็ว โดยปกติเมล็ดยางพาราจะรักษาความงอกได้ประมาณ 20 วัน ดังนั้น ผู้ที่จะเพาะเพื่อขยายพันธุ์จึงต้องรีบนำไปเพาะโดยเร็ว

**น้ำยาง** เมื่อกรีดยางแล้วจะได้น้ำยาง ซึ่งเป็นของเหลวมีสีขาวจนถึงสีขาวปนเหลือง มีลักษณะข้นและเหนียว โดยในน้ำยางจะมี 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยาง (เมื่อนำมาทำเป็นเนื้อยางแห้งแล้วจะมีเปอร์เซ็นต์ยางได้ 25-45 เปอร์เซ็นต์) และที่เหลือเป็นส่วนที่ไม่ใช่ยาง ซึ่งจะเป็นน้ำและสารอื่น ๆ

ไม้ยางพาราเป็นพืชเพียงชนิดเดียวในตระกูลที่เป็นพืชเศรษฐกิจ โดยแสดงองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 2.6 ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญจากไม้ยางพารา คือ น้ำยาง ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ไม้ยางพาราเพื่อเพิ่มผลผลิตของน้ำยางให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบทางเคมีของไม้ยางพารา

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละโดยปริมาตร
เซลลูโลส	49.41
เฮมิเซลลูโลส	17.17
ลิกนิน	18.06

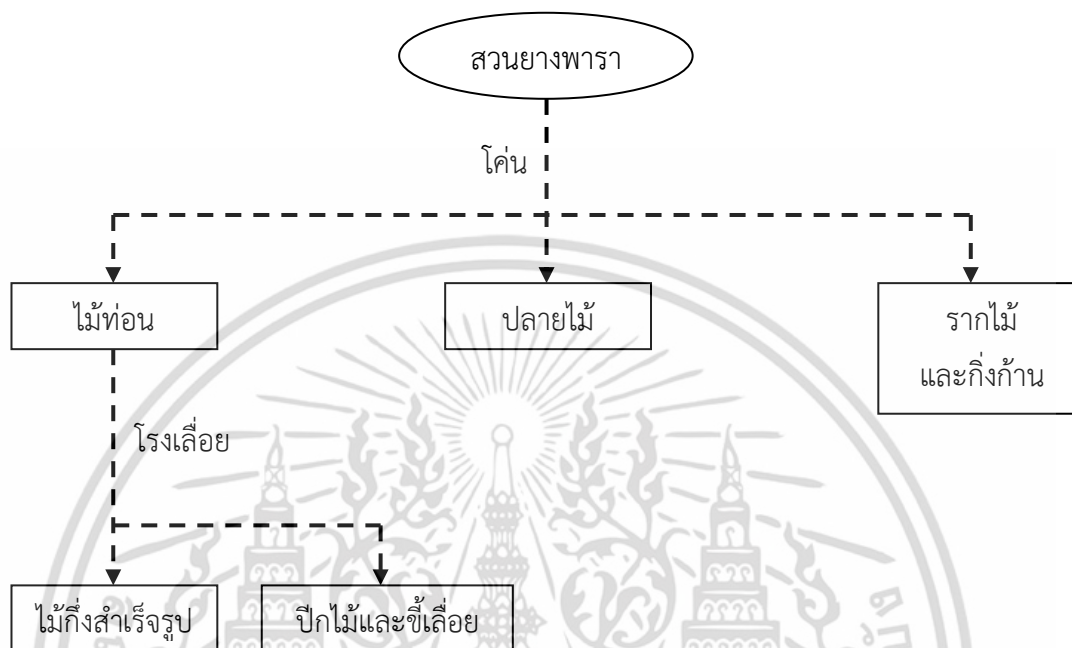
ที่มา : กรมป่าไม้ (2543)

### 2.8.3 การแปรรูปไม้ยางพารา

กระบวนการแปรรูปไม้ยางพาราเริ่มต้นจากการนำไม้ยางพาราที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่กำหนดมาทำการเลื่อยให้ได้ขนาดและคุณภาพตามที่ต้องการ ไม้ยางพาราถือเป็นไม้ที่มีการสูญเสียในระหว่างการแปรรูปมากกว่าไม้ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากมีตำหนิในเนื้อไม้ปริมาณมาก นอกจากนี้กระบวนการผลิตในการแปรรูปไม้ยางพาราทุกครั้งจะเกิดผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการแปรรูป ได้แก่ ปีกไม้ เศษไม้ และขี้เลื่อย จากข้อมูลของสมาคมธุรกิจไม้ยางพาราไทย (2546) รายงานว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการแปรรูปไม้ยางพาราทั่วไปโดยที่ไม่ระบุสายพันธุ์มีอัตราการแปรรูป (ไม้ดิบแปรรูป) ร้อยละ 35 ของไม้เลื่อย ส่วนที่เหลือเป็นปึกไม้และเศษไม้คิดเป็นร้อยละ 46 ของไม้เลื่อย และขี้เลื่อยคิดเป็นร้อยละ 19 ของไม้เลื่อย กระบวนการแปรรูปไม้ยางพาราแสดงดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 กระบวนการแปรรูปไม้ยางพารา  
ที่มา : ศูนย์ส่งเสริมพลังงานชีวมวล (2549)

**2.8.3.1 ปึกไม้และเศษไม้** เป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพาราคิดเป็นร้อยละ 46 ของไม้ที่เข้าสู่กระบวนการแปรรูป ปึกไม้เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตแผ่นขึ้นไม้อัด (particle board) ซึ่งเป็นไม้วิศวกรรมประเภทหนึ่งที่สร้างขึ้นจากการนำไม้ชิ้นเล็ก ๆ มาอัดติดกันโดยใช้สารเคมียึดเกาะ (urea formaldehyde resin) เป็นตัวเชื่อมโครงสร้างของแผ่นขึ้นไม้อัด ชั้นบนและชั้นล่างจะเป็นชั้นไม้ละเอียด ส่วนชั้นกลางจะเป็นชั้นไม้หยาบ ทำให้แผ่นขึ้นไม้อัดไม่เหมาะกับการยึดติดด้วยตะปู และไม่สามารถตกแต่งขอบ หรือทำลึนร่องบนผิวได้ นอกจากนี้ปึกไม้และเศษไม้ที่เหลือยังสามารถนำไปผลิตถ่านไม้ยางพารา หรือเป็นเชื้อเพลิงในการทำความร้อนในหม้อต้มน้ำ (boiler) เพื่อนำความร้อนจากไอน้ำไปเข้าเตาอบเพื่ออบไม้ในกระบวนการแปรรูปไม้ยางพาราต่อไป (มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 2557)

**2.8.3.2 ขี้เลื่อย** แสดงดังรูปที่ 2.13 เป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพารา เช่นเดียวกับปึกไม้และเศษไม้ สำหรับการใช้ประโยชน์จากขี้เลื่อยไม้ยางพาราสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ ใช้เป็นเชื้อเพลิง ซึ่งบางโรงงานจะใช้เป็นเชื้อเพลิงในการต้มไม้เช่นเดียวกับปึกไม้และ

เศษไม้ที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพารา ส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่เหลือจะมีผู้มารับซื้อไป  
เพาะเห็ด ทำรูป ฯลฯ (มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 2557) แสดงดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.13 ลักษณะของขี้เลื่อยไม้ยางพารา

(ก) ขี้เลื่อยไม้ยางพารา

(ข) ขี้เลื่อยไม้ยางพาราบรรจุถุงสำหรับเพาะเห็ด

ที่มา : <http://www.siamtimber.co.th> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 29 สิงหาคม 2559)



รูปที่ 2.14 การนำขี้เลื่อยไม้ยางพาราไปใช้เป็นวัสดุสำหรับเพาะเห็ดฟางและทำรูป

(ก),(ข) การเพาะเห็ดฟางจากขี้เลื่อยไม้ยางพาราในตะกร้า

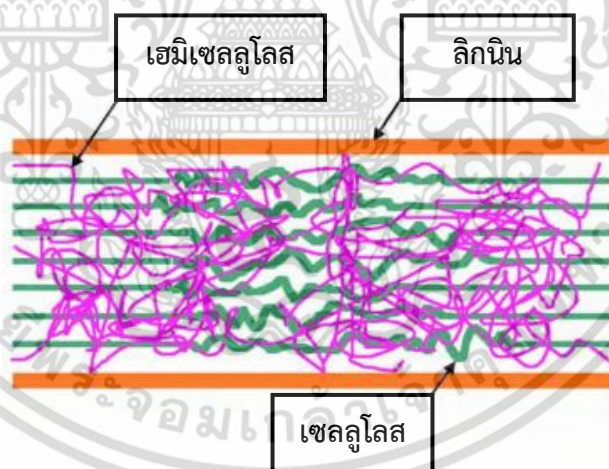
(ค),(ง) การทำรูปจากขี้เลื่อยไม้ยางพารา

ที่มา : <http://www.rakbankerd.com> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 29 มีนาคม 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.9 องค์ประกอบที่สำคัญของลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นสารประกอบชีวมวลที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก (Hsu และคณะ, 2010) แสดงดังรูปที่ 2.15 พบได้ทั่วไปในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร พืชจำพวกไม้เนื้อแข็ง และไม้เนื้ออ่อน องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสจะแตกต่างกันตามชนิดของพืช แต่โดยทั่วไปแล้ว ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และ ลิกนิน (lignin) (Hendriks และ Zeeman, 2009) ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร พอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดในแต่ละชนิดจะยึดกัน ด้วยแรงของพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอวาลส์ (van der waals) ทำให้ผนังเซลล์พืชมีความ แข็งแรง รวมกันเป็นลิกโนเซลลูโลสที่มีมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของเซลล์พืช ปริมาณของพอลิเมอร์แต่ละชนิดจะเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และส่วนต่าง ๆ ของพืช (สุขใจ, 2554) ซึ่งประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ของเซลล์พืช และพบว่าปริมาณของเฮมิเซลลูโลสมีมากเป็นอันดับสอง (Mckendry, 2002; Silva และคณะ, 2005; Prasad และคณะ, 2007) โดยทั่วไปในพืชไม้เนื้ออ่อน (softwood) มีลิกนิน เป็นส่วนประกอบมากกว่าไม้เนื้อแข็ง และในพืชตระกูลหญ้าพบเฮมิเซลลูโลสในปริมาณมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2.8



รูปที่ 2.15 องค์ประกอบที่สำคัญของลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kumar และคณะ (2009)

ตารางที่ 2.7 ปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

วัสดุลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)
สาหร่ายสีเขียว	20-40	20-50	NA
ไม้แอสเพน	51	29	16
ไม้เบิร์ช	40	39	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (ต่อ)

วัสดุลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)
เยื่อเคมี	60-80	20-30	2-10
หญ้าพันธุ์ Coastal Bermuda	25	35.7	6.4
ซังข้าวโพด	45	35	15
แกนฝักข้าวโพด	39-47	26-31	3-5
ใยเมล็ดฝ้าย	80-95	5-20	0
เมล็ดฝ้าย เมล็ดแฟลกซ์	80-95	5-20	NA
หญ้า	25-40	25-50	10-30
ไม้เนื้อแข็ง	45±2	30±5	20±4
เปลือกไม้เนื้อแข็ง	22-40	20-38	30-55
ลำต้นไม้เนื้อแข็ง	40-55	24-40	18-25
ใบไม้	15-20	80-85	0
กระดาษหนังสือพิมพ์	40-55	25-40	18-30
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
กระดาษ	85-99	0	0-15
ไม้สน	44	26	29
ของแข็งจากน้ำเสีย ขั้นแรก	8-15	NA	24-29
ไม้เนื้ออ่อน	42±2	27±2	28±3
เปลือกไม้เนื้ออ่อน	18-38	15-33	30-60
ลำต้นไม้เนื้ออ่อน	45-50	25-35	25-35
มูลวัว ควาย ปศุสัตว์	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
ขยะหรือเศษของ ที่ใช้แล้วแยกประเภท	60	20	20
ไม้สปรูส	43	26	29
ของเสียจาก โรงเลี้ยงหมู (มูลหมู)	6.0	28	NA
หญ้าพันธุ์ Switch	45	31.4	12.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (ต่อ)

วัสดุลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)
เศษกระดาษ จากเยื่อเคมี	60-70	10-20	5-10
ฟางข้าวสาลี	37-41	27-32	13-15
ไม้วิลโลว์	37	23	21

หมายเหตุ NA : ไม่มี

ที่มา : ดัดแปลงจาก Abdel-Rahman และคณะ (2011)

ตารางที่ 2.8 ส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืชที่มีระบบท่อลำเลียง

แหล่งลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)
หญ้า (grasses)	25-40	25-50	10-30
ไม้เนื้ออ่อน (softwoods)	45-50	25-35	25-35
ไม้เนื้อแข็ง (hardwoods)	45-55	24-40	18-25

ที่มา : สุขใจ (2554)

### 2.9.1 เซลลูโลส (cellulose)

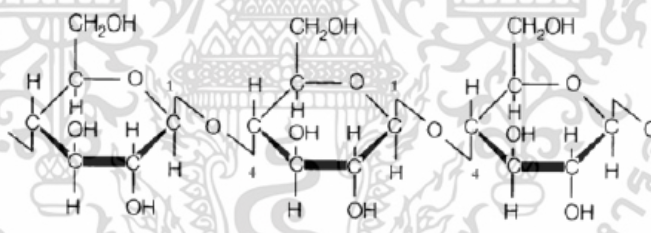
เซลลูโลส  $[C_6(H_2O)_5]_n$  คือ สารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณมากที่สุดบนโลก พบมากในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส มีการผลิตเซลลูโลสจากพืชมากกว่า  $10^{11}$  เมตริกตันต่อปี โดยพบในส่วนของผนังเซลล์ของพืชทุกชนิด มีหน้าที่ช่วยทำให้โครงสร้างพืชแข็งแรง ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักจะพบอยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน กัม เพนโตแซน แทนนิน ไขมัน และสารสี เป็นต้น (Kumar และคณะ, 2009) ปริมาณที่พบแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนโครงสร้างของพืช เช่น เนื้อไม้พบประมาณร้อยละ 40-50 และเส้นใยฝ้ายพบประมาณร้อยละ 98 (Goshadrou และคณะ, 2011)

เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) มีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน รูปร่างคล้ายริบบิ้น (ribbon type) ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ สายของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -(1,4)-glycosidic) หรือ เบต้า-(1,4)-กลูโคไพราโนซิล ( $\beta$ -(1,4)-glucopyranosyl) เกิดเป็นพอลิเมอร์กลูแคน (glucan) (Verardi และคณะ, 2012) มีระดับการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization; DP) ประมาณ 500-10,000 ขึ้นกับชนิดของพืช โดยมีหน่วยซ้ำ ๆ เรียกว่า เซลโลไบโอส (cellobiose) ทำหน้าที่เป็นหน่วยโครงสร้าง (building block) ของเซลลูโลส และทุก ๆ หน่วยที่สองของกลูโคสที่ต่อกันในโมเลกุลของเซลลูโลสหมุนได้ 180 องศา ทำให้สายเซลลูโลสมีความแข็งแรงและเสถียรเกิดจากพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่อยู่บนสาย พันธะไฮโดรเจนระหว่างสายที่อยู่ใกล้กันทำให้มีความแข็งแรง แต่ละสายมีการเรียงตัวคู่ขนานกันจำนวนมาก ซึ่งทุกสายจะมีคุณสมบัติของขั้วเหมือนกัน แต่ละสายเรียกว่า microfibrils ซึ่งมีความกว้าง 250 อังสตรอม และ microfibrils แต่ละสายจะเชื่อมกันเพื่อสร้างเป็น fibrils ขนาดใหญ่ ซึ่ง cellulose fibrils มีส่วนที่เป็นบริเวณเกิดผลึก (crystalline region) หรือบริเวณสร้าง micelles เป็นบริเวณที่มีโครงสร้างของส่วนที่เป็นระเบียบ (region of high order) และส่วนที่เป็น amorphous region เป็นบริเวณที่ไม่มีระเบียบ (region of less order) (สุขใจ, 2554)

โดยทั่วไปในธรรมชาติจะพบเซลลูโลส 2 แบบ คือ crystalline cellulose และ amorphous cellulose โดยส่วนของ crystalline cellulose จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ยากกว่า เนื่องจาก amorphous cellulose มีความไวกับสารเคมีและเอนไซม์มากกว่า ดังนั้น จึงเป็นส่วนที่ง่ายต่อการถูกย่อยด้วยปฏิกิริยาของกรด เบส หรือเอนไซม์ (รัชพล, 2558) การรวมกันของโครงสร้างที่เป็นผลึกเส้นใยมี 2 แบบ คือ  $I_\alpha$  และ  $I_\beta$  ซึ่ง  $I_\alpha$  พบในผนังเซลล์ของสาหร่ายบางชนิดและแบคทีเรีย  $I_\beta$  พบในฝ้าย ไม้ และป่าน โครงสร้างของผลึกแตกต่างกันตามแหล่งหรือวิถีทางวัสดุที่นำมาสร้าง เป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำและทนต่อการย่อยสลายมากกว่าพอลิเมอร์ของกลูโคสชนิดอื่น ๆ เช่น แป้ง เป็นต้น (สุขใจ, 2554) สำหรับโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสแสดงดังรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา : รัชพล (2558)

### 2.9.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส  $[C_5(H_2O)_4]_n$  หรือ  $[C_6(H_2O)_5]_n$  เป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในวัสดุประเภท ลิกโนเซลลูโลส พบในเนื้อเยื่อของพืชเป็นส่วนโครงสร้างผนังเซลล์ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความซับซ้อน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิด โดยน้ำตาลที่พบประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทส ได้แก่ ไซโลส (D-xylose) และอะราบินอส (L-arabinose) น้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ กาแล็กโทส (D-galactose, L-galactose), แมนโนส (D-mannose), แรมโนส (L-rhamnose) และฟิวโคส (L-fucose) และมีกรดยูโรนิก (uronic acid) ได้แก่ กรดกลูคูโรนิก (D-glucuronic) น้ำตาลเหล่านี้ จะเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาแอสีทิลเลชัน (acetylation) หรือเมทิลเลชัน (methylation) (สุขใจ, 2554) โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีทั้งแบบที่ประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทสหรือน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฮกโซสเพียงชนิดเดียว (โฮโมพอลิเมอร์) หรือประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทสและน้ำตาลเฮกโซสผสมกัน (เฮเทอโรพอลิเมอร์) ซึ่งน้ำตาลแต่ละโมเลกุลจะต่อกันด้วยพันธะเบต้า-(1,3)-ไกลโคซิดิก หรือพันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิก ขึ้นกับชนิดของลิแกนด์เซลลูโลส (Howard และคณะ, 2003; Girio และคณะ, 2010) โดยพบว่าดี-ไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิกมีปริมาณมากที่สุดคือ ร้อยละ 85-93 ส่วนองค์ประกอบอื่น เช่น กลูโคส กรดกลูคูโรนิก จะพบในปริมาณน้อย (Browning, 1963) โครงสร้างอย่างง่ายของเฮมิเซลลูโลส 3 ชนิด แสดงดังรูปที่ 2.17

เฮมิเซลลูโลสเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ไม่เป็นผลึก (noncrystalline) โดยธรรมชาติจะมีโครงสร้างเป็นแบบ amorphous (Abdel-Rahman และคณะ, 2011) และพบว่ามีโครงสร้างที่เหมือนกับเซลลูโลส คือ มีสายโซ่หลักต่อกันด้วยหน่วยของ 1,4- $\beta$ -D-pyranosyl แต่มีระดับการเกิดพอลิเมอร์ต่ำกว่าเซลลูโลสประมาณ 50-300 นอกจากนี้ความแตกต่างที่สำคัญระหว่างเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส คือ เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นสายกิ่งมาก จึงถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส ขณะที่เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์เส้นตรงซึ่งจะแตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละชนิด (Kumar และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.17 โครงสร้างอย่างง่ายของเฮมิเซลลูโลส

- (ก) โครงสร้างของกาลักโทกลูโคแมนแนนในไม้เนื้ออ่อน
- (ข) โครงสร้างของอะราบินอกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน
- (ค) โครงสร้างของกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง

ที่มา : สุขใจ (2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.9.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน ( $C_{10}H_{12}O_4$ )<sub>n</sub> เป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติก (aromatic polymer) ที่มีมากที่สุดในพื้นโลก มีโมเลกุลที่ซับซ้อนมาก รูปร่างเป็น amorphous พบในผนังเซลล์พืชชั้นสูงในปริมาณที่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (รัชพล, 2558) ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว พืชใบเลี้ยงคู่ เฟิร์น และ club moss มีปริมาณมากในส่วนของเนื้อเยื่อบริเวณท่อลำเลียงโดยเฉพาะส่วนที่มีการลำเลียงของเหลว แต่ไม่พบในมอส ไลเคนส์ และสาหร่าย ซึ่งไม่มีเทรคีด (tracheids) ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบ 3 มิติ ไม่ตกผลึก สร้างจากหน่วยของฟีนิลโพรเพน [phenylpropane ( $C_9$ )] หรือฟีนิลโพรพีนอิกแอลกอฮอล์ (phenylpropionic alcohol) เชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ (Abdel-Rahman และคณะ, 2011) ในธรรมชาติลิกนินทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันเซลล์ลอสไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (Taherzadeh และ Karimi, 2008) อีกทั้งเป็นตัวเชื่อมเพื่อยึดให้เส้นใยเซลลูโลสรวมกันทำให้แยกลิกนินได้ยากมาก นอกจากนี้ลิกนินยังทำให้เนื้อเยื่อไม้มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นโดยกระบวนการลิกนินิฟิเคชัน (lignifications) ซึ่งพบในต้นไม้ใหญ่ที่สูงหลายร้อยฟุต

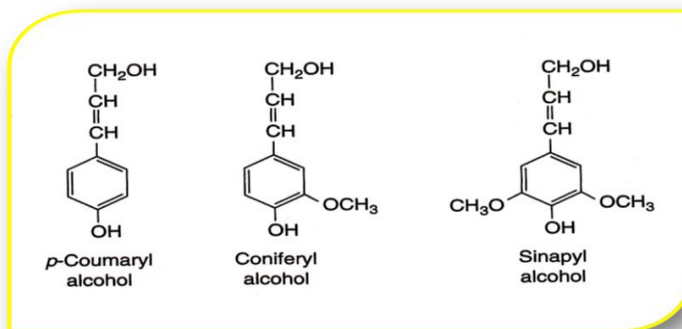
ลิกนินิฟิเคชัน คือ กระบวนการเจริญเพิ่มจำนวนลิกนินเพื่อเติมเต็มช่องว่างระหว่างเส้นใยเซลลูโลส และสายเฮมิเซลลูโลสของผนังเซลล์พืช

สารตั้งต้นโดยตรงของลิกนิน คือ แอลกอฮอล์ 3 ชนิด เรียกว่า mono-lignol ได้จากกรด *p*-hydroxycinnamic ประกอบด้วย coniferyl alcohol (guaiacyl propanol), *p*-coumaryl alcohol (*p*-hydroxyphenyl propanol) และ sinapyl alcohol (syringyl alcohol) ดังรูปที่ 2.18 โดยทั่วไปในพืชสมุนไพรหรือพืชลำต้นไม้อ่อน เช่น หญ้า มีลิกนินเป็นส่วนประกอบน้อยที่สุด ขณะที่ไม้เนื้ออ่อนมีลิกนินเป็นส่วนประกอบมากที่สุด (Kumar และคณะ, 2009)

ในไม้เนื้ออ่อน (พืชใบเลี้ยงเดี่ยว) ลิกนินประกอบด้วยหน่วยโครงสร้างหลักที่มาจาก coniferyl alcohol บางชนิดมาจาก *p*-coumaryl alcohol แต่ไม่มีมาจาก sinapyl alcohol

ในไม้เนื้อแข็ง (พืชใบเลี้ยงคู่) ลิกนินประกอบด้วยหน่วยของ coniferyl และ sinapyl alcohol แต่ละส่วนเท่า ๆ กัน ประมาณร้อยละ 46 และมีส่วนย่อย คือ *p*-hydroxyphenyl propanol ซึ่งได้จาก *p*-coumaryl alcohol มีประมาณร้อยละ 8

ลิกนินในพืชตระกูลหญ้าประกอบด้วยหน่วยของ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ *p*-hydroxyphenyl propanol กับ *p*-coumaric acid (ประมาณร้อยละ 5-10 ของลิกนิน) ส่วนใหญ่จะถูกเอสเทอร์ไฟด์ (esterified) ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่ส่วนปลายของ *p*-coumaryl alcohol ที่สายด้านข้าง (สุขใจ, 2554)



รูปที่ 2.18 สารตั้งต้นโดยตรงของการสังเคราะห์ลิกนิน  
ที่มา : สุขใจ (2554)

## 2.10 กระบวนการผลิตกรดแลคติกจากลิกโนเซลลูโลสโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (LAB)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีผลผลิตทางการเกษตรหลากหลายชนิด เช่น ข้าว น้ำตาล มันสำปะหลัง ยางพารา และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ผลผลิตบางส่วนมีเหลือเพียงพอที่จะส่งออกไปยังต่างประเทศ สร้างรายได้ให้แก่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท จึงถือว่าประเทศไทยเป็นครัวของโลก อย่างไรก็ตาม ระหว่างการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปผลผลิตการเกษตรเหล่านี้ก่อให้เกิดวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย กากมันสำปะหลัง ชี้เลี้ยง-ไม้ยางพารา และทะลายปาล์มเปล่า เป็นต้น ซึ่งมีปริมาณมากและสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่าหลากหลายแนวทาง เพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบเหล่านี้ โดยหนึ่งในแนวทางนั้น คือ การนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนในการผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ (biological fermentation) (สุดาทิพย์ และคณะ, 2556)

วัตถุดิบจัดเป็นปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิตกรดแลคติก ซึ่งวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแลคติก ได้แก่ กากน้ำตาล แต่เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นที่ต้องการอย่างมากในการนำไปเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานทดแทน ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้น ปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกรดแลคติกจึงให้ความสนใจในการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในรูปลิกโนเซลลูโลสมาผลิตกรดแลคติกมากยิ่งขึ้น เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก หาได้ง่าย ราคาถูก และเป็นวัสดุที่นำกลับมาใช้ใหม่ (renewable material) (รัชพล, 2558)

การเปลี่ยนวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสไปเป็นกรดแลคติกนั้นมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อนมากกว่าการใช้วัตถุดิบจำพวกน้ำตาลและแป้ง โดยประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)

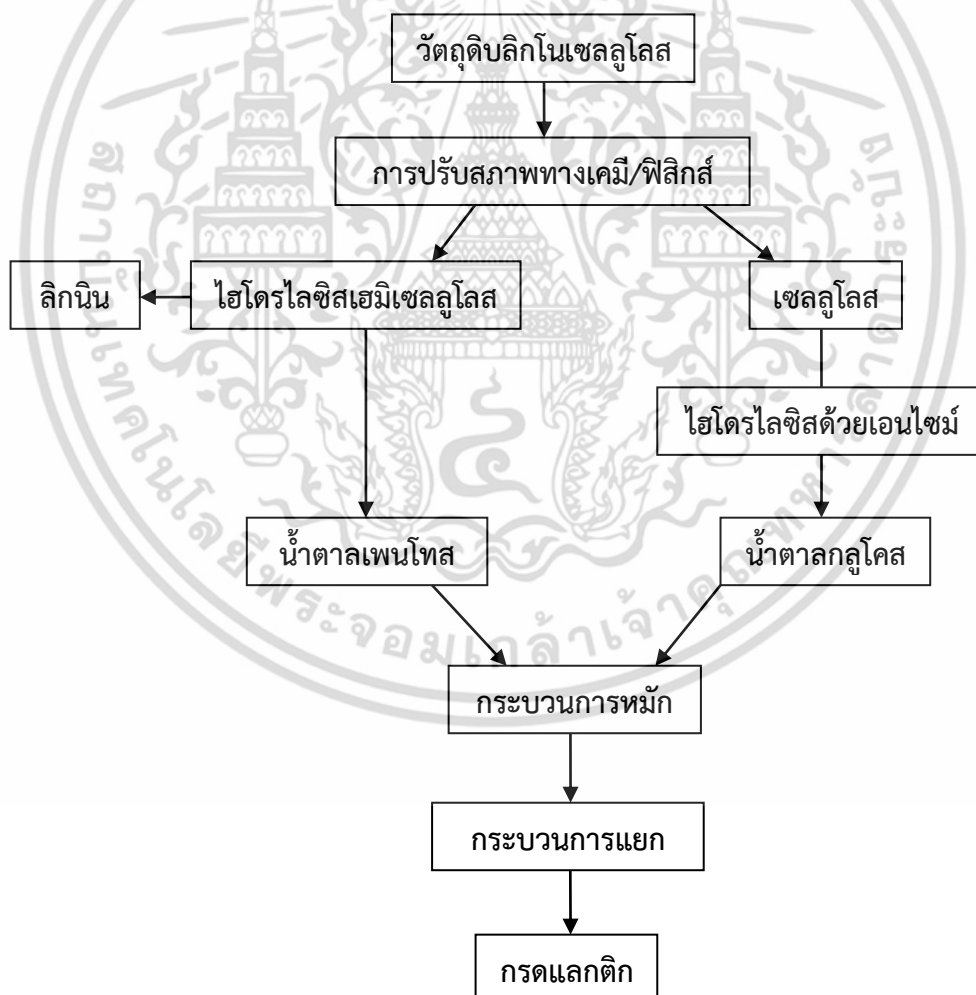
การย่อยวัตถุดิบ (hydrolysis)

การหมักกรดแลคติก (fermentation)

การแยกและทำให้บริสุทธิ์ (separation and purification)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

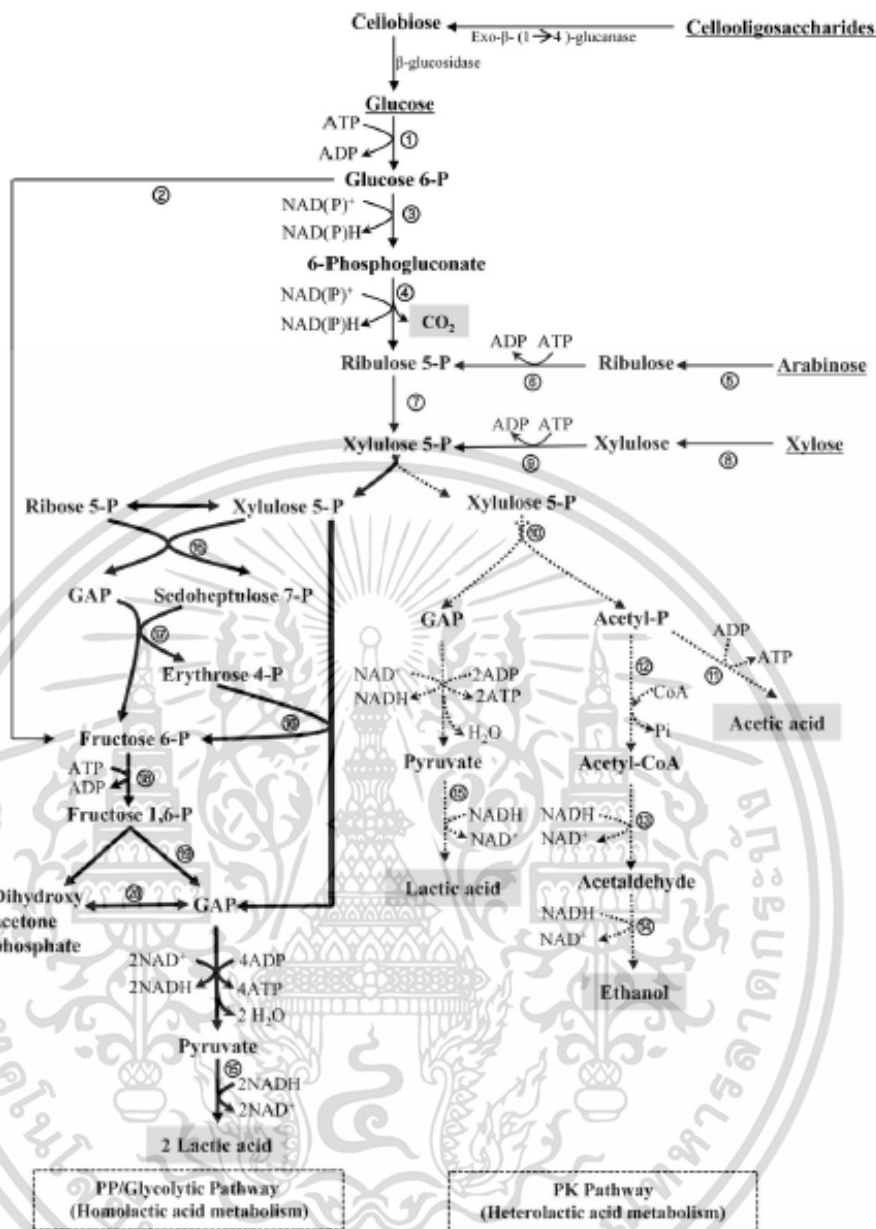
ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกระบวนการต่าง ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะสมบัติของ วัตถุดิบที่นำมาใช้ เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส และเป็นการแตกพันธะที่เซลลูโลส จับกับสารประกอบอื่น ๆ เพื่อให้สารเคมี เอนไซม์ หรือจุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและย่อยวัตถุดิบได้ง่าย มากขึ้นในขั้นตอนการย่อยวัตถุดิบ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส เป็นต้น และขั้นตอนการหมักเป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ ให้เป็นกรดแลกติก จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการแยกกรดแลกติกออกจากน้ำหมักและขั้นตอนการทำ กรดแลกติกให้บริสุทธิ์ (Abdel-Rahman และคณะ, 2011) ดังแผนภาพแสดงกระบวนการผลิตกรด แลกติกจากวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสแบบดั้งเดิม และวิธีการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลที่ได้จากการ ไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลสโดยแบคทีเรียแลกติก รวมถึงวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภท ลิกโนเซลลูโลส ในรูปที่ 2.19 2.20 และ 2.21 ตามลำดับ



รูปที่ 2.19 แผนภาพแสดงกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสแบบดั้งเดิม

ที่มา : ดัดแปลงจาก Abdel-Rahman และคณะ (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.20 วิธีของการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลส (กลูโคส, ไซโลส และอะราบินอส) โดยแบคทีเรียแลกติก (LAB) เอนไซม์ในปฏิกิริยา :

- |                                       |                             |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| (1) hexokinase                        | (11) acetate kinase         |
| (2) glucose-6-phosphate isomerase     | (12) phosphotransacetylase  |
| (3) glucose-6-phosphate dehydrogenase | (13) aldehyde dehydrogenase |
| (4) 6-phosphogluconate dehydrogenase  | (14) alcohol dehydrogenase  |
| (5) arabinose isomerase               | (15) lactate dehydrogenase  |
| (6) ribulokinase                      | (16) transketolase          |
| (7) ribulose-5-phosphate-3-epimerase  | (17) transaldolase          |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.20 วิธีของการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลส (กลูโคส, ไซโลส และอะราบินอส) โดยแบคทีเรียแลกติก (LAB) เอนไซม์ในปฏิกิริยา :

- (ต่อ)
- |                      |                                     |
|----------------------|-------------------------------------|
| (8) xylose isomerase | (18) 6-phosphofructokinase          |
| (9) xylulokinase     | (19) fructose-bisphosphate aldolase |
| (10) phosphoketolase | (20) triosephosphate isomerase      |

หมายเหตุ เส้นทึบแสดงวิธีของการหมักน้ำตาลแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homolactic fermentative pathway)

เส้นหนาทึบแสดงวิธีเพนโทสฟอสเฟต/ไกลคอลิติก (PP/glycolytic pathway)

เส้นประแสดงวิธีฟอสโฟคีโตเลส (PK pathway)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Abdel-Rahman และคณะ (2011)



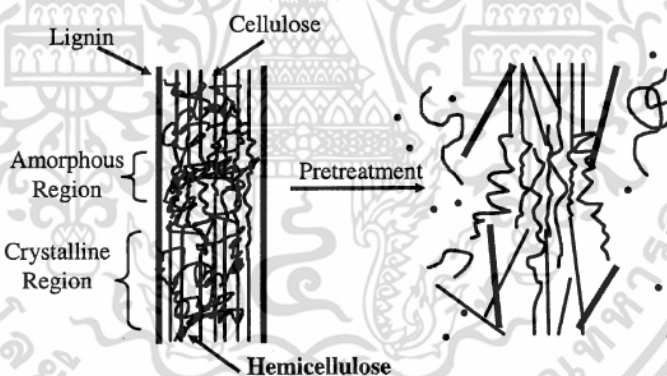
รูปที่ 2.21 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Irshad และคณะ (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.11 การปรับสภาพวัตถุดิบ

การนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบราคาถูกในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ ขั้นตอนแรกต้องผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน เพราะส่วนประกอบของวัตถุดิบเหล่านี้เป็นพอลิเมอร์ลิกโนเซลลูโลส ซึ่งจะสลายไปเป็นน้ำตาลที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ยาก ดังนั้น การปรับสภาพวัตถุดิบ หมายถึง การเปลี่ยนโครงสร้างของชีวมวลโดยการละลายและแยกส่วนประกอบของชีวมวล เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารสกัดอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.22 เพื่อทำให้ชีวมวลส่วนที่เป็นของแข็งที่เหลืออยู่ง่ายต่อการนำไปทำการย่อยหรือไฮโดรไลซ์ โดยทำลายพันธะไฮโดรเจนในเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสที่มีน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซสเป็นองค์ประกอบ (สุขใจ, 2554) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการปรับสภาพวัตถุดิบ ได้แก่ ผลึกของชีวมวล (biomass crystallinity) ระดับการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization) ช่องว่างระหว่างพื้นที่ผิวผลึกของเส้นใยเซลลูโลส (accessible surface area) และปริมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส (lignin and hemicelluloses contents) (Behera และคณะ, 2014) ข้อดีและข้อจำกัดของกระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.9



รูปที่ 2.22 แสดงบทบาทของการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : Kumar และคณะ (2009)

ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านกายภาพ คือ ทำให้ชั้นเมทริกซ์ของวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสถูกทำลาย ซึ่งมีผลทำให้ขั้นตอนการไฮโดรไลซิสมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และพบว่ากระบวนการปรับสภาพจะเป็นตัววัดความสำเร็จของเทคโนโลยีในการแปลงเซลลูโลส เนื่องจากเป็นตัวช่วยแสดงให้เห็นถึงความคุ้มค่าทางพาณิชย์ในการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้เป็นกรดแลคติกได้ (รัชพล, 2558) จุดประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบ คือ เป็นการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความพรุน

ของวัตถุดิบ (Kumar และคณะ, 2009; Zhang และคณะ, 2009; Behera และคณะ, 2014) สามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีหลัก ดังนี้

### 2.11.1 การปรับสภาพวัตถุดิบทางกายภาพ (physical pretreatment)

การปรับสภาพวัตถุดิบทางกายภาพเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยา และเพิ่มช่องว่าง (ความพรุน) ระหว่างโมเลกุลของวัตถุดิบ ทั้งยังช่วยลดขนาดผลึกของเซลลูโลสด้วย (Zhu และคณะ, 2010) ได้แก่ การลดขนาดวัตถุดิบโดยทางกล (mechanical comminution) เช่น การบด (grinding) การโม่ (milling) เป็นต้น และการแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis)

#### 2.11.1.1 การลดขนาดวัตถุดิบโดยทางกล

วิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กกลงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ การเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการลดผลึก (cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น (Harun และคณะ, 2011) ความต้องการพลังงานเพื่อใช้ในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัตถุดิบและคุณสมบัติของวัตถุดิบนั้น โดยทั่วไปควรลดขนาดวัตถุดิบหลังจากหั่นแล้วให้มีขนาดประมาณ 1-3 เซนติเมตร และให้มีขนาดของเศษวัตถุดิบประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร หลังการบดละเอียดแล้ว (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การโม่หรือบดแบบบอลเขย่า (vibratory ball milling) หรือการบดแบบลูกกลิ้ง (roller mill system) จะให้ผลดีกว่าการบดแบบบอล (ball milling)

#### 2.11.1.2 การแยกสลายด้วยความร้อน

การปรับสภาพวัตถุดิบโดยวิธีการแยกสลายด้วยความร้อนมีกระบวนการดังนี้ คือ เมื่อวัตถุดิบได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส เซลลูโลสจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วเพื่อให้ผลผลิตโดยเปลี่ยนเป็นแก๊ส และส่วนที่เหลือคือถ่าน (char) การสลายตัวจะเกิดช้าลงและผลิตภัณฑ์มีการระเหยเล็กน้อยเมื่อใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 300 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตของกระบวนการแยกสลายด้วยความร้อนได้ในที่มีออกซิเจน และเมื่อเติมซิงค์คลอไรด์ ( $ZnCl_2$ ) หรือโซเดียมคาร์บอเนต ( $Na_2CO_3$ ) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสบริสุทธิ์สามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิต่ำ (สุขใจ, 2554)

### 2.11.2 การปรับสภาพวัตถุดิบทางเคมี (chemical pretreatment)

การปรับสภาพวัตถุดิบทางเคมีเป็นหนึ่งในวิธีการปรับสภาพที่ดีที่สุดที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลส โดยการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส รวมถึงช่วยลดระดับการเกิดพอลิเมอร์ และลดขนาดผลึกของเซลลูโลสในวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส (Agbor และคณะ, 2011) ได้แก่ การทำปฏิกิริยากับโอโซน (ozonolysis) การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยด่าง (alkaline hydrolysis) การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรด (acid hydrolysis) การกำจัดลิกนินโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative delignification) และกระบวนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organosolv process)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.11.2.1 การทำปฏิกิริยากับโอโซน

การปรับสภาพด้วยโอโซนเป็นกระบวนการลดปริมาณลิกนินของวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส (Garcia-Cubero และคณะ, 2009) โดยใช้แก๊สโอโซนซึ่งเป็นตัวออกซิแดนท์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบพวกฟางข้าวสาลี ชานอ้อย หญ้าเฮย์ (hay) เปลือกถั่ว เปลือกเมล็ดฝ้าย ไม้สนหรือสับปะรด และขี้เลื่อยของต้นพ็อปลาร์ (poplar sawdust) วิธีนี้มีจุดเด่น คือ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินได้ดี ไม่มีสารพิษตกค้างที่จะไปยับยั้งการทำปฏิกิริยาในส่วนต่าง ๆ อีกทั้งยังสามารถดำเนินการได้ที่อุณหภูมิและความดันห้อง อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีความต้องการโอโซนจำนวนมากในการเตรียมตัวอย่างจึงทำให้กระบวนการนี้มีต้นทุนสูง (Sun และ Cheng, 2002)

### 2.11.2.2 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยด่าง

การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยด่างเป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรด (สุภาวดี, 2557) สารเคมีที่นิยมใช้ในกระบวนการปรับสภาพด้วยด่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น (Wang และคณะ, 2010; Wanitwattanarumlug และคณะ, 2012; Sharma และคณะ, 2013) ซึ่งวิธีการปรับสภาพด้วยด่างนี้สามารถไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสและลดระดับลิกนินได้ เซลลูโลสที่เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ได้ง่าย กลไกของการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยด่าง คือ การเกิดปฏิกิริยาแซพอนิฟิเคชัน (saponification) ของพันธะเอสเทอร์ระหว่างโมเลกุลของไซแลน เฮมิเซลลูโลส และส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น ลิกนิน ทำให้ช่องว่างของลิกโนเซลลูโลสเพิ่มขึ้น (สุขใจ, 2554)

สารละลายด่างที่นิยมใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบ ได้แก่

**โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)** เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบมากที่สุด สามารถกำจัดลิกนินได้ดี เนื่องจากโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเบสแก่ ซึ่งในบางครั้งโซเดียมไฮดรอกไซด์ไม่ได้กำจัดลิกนินออกไปเพียงอย่างเดียว แต่อาจทำลายเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสบางส่วนออกไปด้วย ดังนั้น การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับวัตถุดิบชนิดนั้น ๆ ผลผลิตที่ได้จึงจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด (Wang และคณะ, 2010)

**แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH<sub>4</sub>OH)** เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ไม่น้อยไปกว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่เนื่องจากแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นเบสอ่อนจึงต้องใช้เวลาในการกำจัดลิกนินนานกว่าเล็กน้อย ปัญหาที่พบจากการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ คือ กำจัดลิกนินออกไม่หมดและอาจมีกลิ่นของแก๊สแอมโมเนียที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายลิกนิน (Gupta และ Lee, 2010)

**โซเดียมซัลไฟต์ (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)** เป็นสารเคมีที่นิยมใช้น้อยที่สุด แต่กำจัดลิกนินได้ดีที่สุด เพราะโซเดียมซัลไฟต์มีความจำเพาะเจาะจงกับลิกนินเท่านั้น โดยจะไม่มีผลต่อเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส สาเหตุที่มีความนิยมใช้โซเดียมซัลไฟต์ค่อนข้างน้อย เนื่องจากกลิ่นของแก๊สโซเน่า

ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายลิกนิน อย่างไรก็ตามโซเดียมซัลไฟต์ยังคงใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่จำเป็นต้องกำจัดลิกนินออกเท่านั้น เช่น อุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ เป็นต้น

การใช้ต่างในกระบวนการปรับสภาพมีผลต่อวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส และผลของต่างที่ใช้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัตถุดิบนั้นด้วย (McMillan, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางเพื่อปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสทำให้เกิดการบวมน้ำนำไปสู่การเพิ่มพื้นที่ผิวภายใน ลดระดับการเกิดพอลิเมอร์ ลดความสามารถในการสร้างผลึก ช่วยแยกโครงสร้างที่เชื่อมกันระหว่างลิกนินกับคาร์โบไฮเดรต และทำลายโครงสร้างลิกนิน (Zheng และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามการใช้ต่างเพื่อปรับสภาพมักจะไม่มียผลต่อวัตถุดิบพวกไม้เนื้ออ่อนเท่าไม้เนื้อแข็ง (รัชพล, 2558) วิธีนี้ใช้ได้ดีกับฟางข้าวและชานอ้อย โดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่าการใช้กรดปรับสภาพ แต่ใช้เวลานานกว่า Kim และคณะ (2008) ได้ศึกษาการปรับสภาพข้าวบาร์เลย์ด้วยแอมโมเนีย พบว่าแอมโมเนียที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 24-72 ชั่วโมง สามารถสกัดแยกส่วนของลิกนินได้ร้อยละ 50-66

การพัฒนากระบวนการปรับสภาพด้วยต่างโดยการเติมสารออกซิแดนต์ (oxidant) เช่น ออกซิเจน หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่เป็นต่างจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายลิกนิน การไฮโดรไลซ์เอมิเซลลูโลส และได้ผลผลิตของเซลลูโลส ซึ่งตอบสนองต่อการไฮโดรไลซ์ของเอนไซม์ และกระบวนการหมักโดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ในแหล่งทรัพยากรชีวภาพพวกไม้

### 2.11.2.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรด

กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดนั้นมีจุดประสงค์ คือ เพื่อให้ได้น้ำตาลปริมาณมากจากวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส กรดที่นิยมนำมาใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบมีมากมายหลายประเภท ได้แก่ กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก และกรดฟอสฟอริก (Behera และคณะ, 2014) ในการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดมี 2 วิธี คือ การใช้กรดเข้มข้น และกรดเจือจางเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของกระบวนการไฮโดรไลซิส (Palmqvist และ Hahn-Hagerdal, 2002) โดยกระบวนการใช้กรดเจือจางจะถูกควบคุมภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็นวินาทีหรือนาที ส่วนกระบวนการใช้กรดเข้มข้นมักจะใช้อุณหภูมิไม่สูงนัก ใช้ความดันที่เกิดจากเครื่องปั๊ม และใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยานานกว่าการใช้กรดเจือจาง (สุขใจ, 2554) ในอดีตเคยนิยมใช้กรดเข้มข้นในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส เพราะมีข้อดี คือ มีศักยภาพในการผลิตน้ำตาลได้สูง (ได้น้ำตาลจากเซลลูโลสและเอมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 90) ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำ และสามารถนำกรดที่ใช้ในการปรับสภาพกลับมาใช้ใหม่ได้โดยการระเหยซ้ำหลาย ๆ ครั้ง แต่เนื่องจากกรดเข้มข้นเหล่านี้มีฤทธิ์กัดกร่อนภาชนะ มีความเป็นพิษ และเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องใช้ถึงปฏิกิริยาที่ทนทานต่อการกัดกร่อนของกรด และมีค่าใช้จ่ายในการคืนสภาพของกรดสูงมาก ดังนั้น ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบจึงให้ความสนใจศึกษาการใช้กรดเจือจาง

กันมากและแพร่หลายที่สุด (Mussatto และคณะ, 2005) เพราะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสได้

#### 2.11.2.4 การกำจัดลิกนินโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

กระบวนการกำจัดลิกนินโดยการย่อยสลายทางชีวภาพสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาในที่ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไปได้ Bjerre และคณะ (1996) ศึกษาการใช้ปฏิกิริยา wet oxidation และการไฮโดรไลซ์ฟางข้าวสาลีด้วยต่างในอัตราส่วน 20 กรัมฟางข้าวต่อลิตรที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที พบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสได้สูงถึงร้อยละ 85

#### 2.11.2.5 กระบวนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

กระบวนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หรือของผสมของตัวทำละลายอินทรีย์กับกรดอินทรีย์ (กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟิวริก) ทำลายพันธะภายในระหว่างลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส (สุขใจ, 2554; Zhao และคณะ, 2009) เพื่อเพิ่มความสามารถในการทำละลายของสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล แอซีโตน เอทิลีนไกลคอล ไทโรเอทิลีนไกลคอล กลีเซอรอล สารละลายฟีนอล และเทตระไฮโดรเฟอพิวโรล แอลกอฮอล์ เป็นต้น (Taherzadeh และ Karimi, 2008) แต่เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์มีราคาแพงจึงนิยมใช้เมทานอลและเอทานอลมากกว่าแอลกอฮอล์ที่มีจุดเดือดสูง เช่น เอทิลีนไกลคอล และเทตระไฮโดรเฟอพิวโรล แอลกอฮอล์ (Arato และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถนำกรดอินทรีย์ เช่น กรดออกซาลิก (oxalic acid) กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) กรดแอสีทิลซาลิไซลิก (acetylsalicylic acid) มาใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ได้อีกด้วย (Park และคณะ, 2010)

#### 2.11.3 การปรับสภาพวัตถุดิบทางเคมี-ฟิสิกส์ (physico-chemical pretreatment)

การปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้วิธีการทางเคมีร่วมกับวิธีการทางฟิสิกส์สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายโครงสร้างของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้ดีมากยิ่งขึ้น (Hendriks และ Zeeman, 2009) ได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion; autohydrolysis) การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion; AFEX) การใช้ความร้อนชื้น (liquid hot water) และการระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$  explosion)

##### 2.11.3.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ

วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Monavari และคณะ, 2009) วิธีนี้ใช้มวลที่ผ่านการหั่นและบดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จะถูกนำไปให้ความร้อนด้วยไอน้ำอิมพัลส์ที่ความดันสูง โดยส่วนใหญ่จะควบคุมอุณหภูมิที่ 160-260

องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 0.69-4.83 เมกะปาสกาล (MPa) ใช้เวลาประมาณ 3-8 นาที หลังจากนั้นจึงลดความดันลงให้เหลือเท่ากับความดันบรรยากาศอย่างรวดเร็ว (Linde และคณะ, 2007) ก่อนที่วัตถุดิบจะดันพุ่งออกมาข้างนอก ทำให้วัตถุดิบถูกย่อยสลายโดยเซลล์แตกกระเบิดออกมา (explosive decompression) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ฮีมิเซลลูโลสสลายตัว และลิกนินเกิดการเปลี่ยนแปลง เพื่อเป็นการเปิดโครงสร้างของเซลล์พืช เนื่องจากอุณหภูมิสูงและเป็นการเพิ่มศักยภาพของการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วย (สุขใจ, 2554; สุภาวดี, 2557)

ปัจจัยที่มีผลต่อการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีนี้ คือ เวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของวัตถุดิบ ตั้งต้นที่ใช้ และปริมาณความชื้นที่อยู่ในวัตถุดิบ (Jedvert และคณะ, 2012) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการละลายและไฮโดรไลซ์ฮีมิเซลลูโลส คือ สภาวะที่ใช้อุณหภูมิสูงและเวลาสั้น (อุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที) หรือสภาวะที่ใช้อุณหภูมิต่ำแต่ใช้เวลานาน (190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) (Bondesson และคณะ, 2013)

### 2.11.3.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย

การระเบิดด้วยแอมโมเนียเป็นวิธีการปรับสภาพวัตถุดิบทางเคมี-ฟิสิกส์ชนิดหนึ่ง ที่นำมาใช้กับวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยการทำให้วัตถุดิบสัมผัสกับแอมโมเนียเหลว ที่อุณหภูมิและความดันสูง ช่วงระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นจึงลดความดันลงอย่างรวดเร็ว (Murnen และคณะ, 2007; Isci และคณะ, 2008) ซึ่งแอมโมเนียจะทำให้ลิกโนเซลลูโลสเกิดการบวม น้ำ ทำลายโครงสร้างของเส้นใยชีวมวล ลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส และทำลายพันธะระหว่างลิกนินกับคาร์โบไฮเดรต (Kim และ Lee, 2005; Chundawat และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า กระบวนการระเบิดด้วยแอมโมเนียมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำอีกด้วย (Cheng, 2009)

โดยทั่วไปกระบวนการระเบิดด้วยแอมโมเนียจะใช้แอมโมเนียเหลว 1-2 กิโลกรัม ต่อน้ำหนักแห้งชีวมวล 1 กิโลกรัม ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ความดัน 1.72-2.06 เมกะปาสกาล เป็นเวลา 30 นาที (Kumar และคณะ, 2009) โดยมีปัจจัยสำคัญ 6 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีนี้ คือ ภาวะบรรจุแอมโมเนีย ภาวะบรรจุทุกน้ำ อุณหภูมิ ความดัน ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และปริมาณของวัตถุดิบที่จะปรับสภาพ (Teymourri และคณะ, 2004)

### 2.11.3.3 การใช้ความร้อนขึ้น

วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้ความร้อนขึ้นเป็นกระบวนการปรับสภาพที่คล้ายกับวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ แตกต่างกันตรงที่ใช้น้ำในสภาวะของเหลวแทนการใช้ไอน้ำเท่านั้น ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาจะอยู่ระหว่าง 160-240 องศาเซลเซียส การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลส กำจัดลิกนิน ย่อยสลายเซลลูโลสในชีวมวลได้ดียิ่งขึ้น และไม่ก่อให้เกิดสารประกอบที่จะไปยับยั้งกระบวนการอื่นในขั้นตอนต่อไป (Brandon และคณะ, 2008) วัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีนี้จะอยู่ในรูปแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยส่วนใหญ่ เซลลูโลสจะเป็นส่วนของแข็ง ฮีมิเซลลูโลสจะเป็นส่วนของเหลว และเกิดน้ำตาลบางส่วน (Mosier

และคณะ, 2005) การปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้ความร้อนชั้นมีข้อดี คือ ไม่ต้องการสารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ เกิดการสลายผลิตภัณฑ์สุดท้ายเพียงเล็กน้อย ไม่ต้องเพิ่มขั้นตอนการล้างวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพ และเป็นวิธีการที่มีต้นทุนการดำเนินงานต่ำเหมาะสำหรับใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Hu และคณะ, 2008; Kim และคณะ, 2009; Girio และคณะ, 2010)

Mosier และคณะ (2005) ศึกษาการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยใช้ความร้อนชั้นที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และมีการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างให้คงที่ตลอดการดำเนินปฏิกิริยา พบว่าสามารถเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ได้สูงถึงร้อยละ 90

#### 2.11.3.4 การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์

การปรับสภาพวัตถุดิบโดยการระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เป็นการพัฒนาเทคนิคการปรับสภาพตัวอย่างลิกโนเซลลูโลสซึ่งเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำ และค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีการระเบิดด้วยแอมโมเนีย แต่การปรับสภาพวิธีนี้ได้ผลผลิตน้อยกว่าการใช้ไอน้ำหรือแอมโมเนีย (รัชพล, 2558) โดยมีสมมติฐานว่าคาร์บอนไดออกไซด์จะสร้างกรดคาร์บอนิก (carbonic acid) เมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในน้ำ กรดคาร์บอนิกจะเพิ่มอัตราการไฮโดรไลซิส (hydrolysis rate) โดยคาร์บอนไดออกไซด์จะช่วยไฮโดรไลซิสเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (สุขใจ, 2554) การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีนี้นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมด้วย เช่น เอทานอล เป็นต้น เพื่อช่วยในการกำจัดสารประเภทลิกนิน

#### 2.11.4 การปรับสภาพวัตถุดิบทางชีวภาพ (biological pretreatment)

ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสทางชีวภาพ มีการใช้จุลินทรีย์จำพวก brown-rot fungi, white-rot fungi และ soft-rot fungi เพื่อย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุเหลือใช้ต่าง ๆ ส่วนเซลลูโลสถูกย่อยสลายน้อยมาก เนื่องจากเซลลูโลสมีความต้านทานต่อการถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้มากกว่าส่วนอื่น ๆ ของลิกโนเซลลูโลส (รัชพล, 2558) โดย brown-rot ทำลายเซลลูโลส ขณะที่ white-rot และ soft-rot ทำลายทั้งเซลลูโลสและลิกนิน

white-rot fungi ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Pycnoporus cinnabarinus* และ *Pleurotus ostreatus* เป็นฟังไจในคลาส *Basidiomycetes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Kumar และคณะ, 2011) เชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* เป็น white-rot fungi ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน คือ lignin peroxidases และสามารถผลิตเอนไซม์ manganese-dependent peroxidase ระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งตอบสนองต่อการจำกัดคาร์บอนหรือไนโตรเจน (สุขใจ, 2554) Dashtban และคณะ (2009) พบว่าเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ extracellular cellulolytic ได้เป็นจำนวนมาก ในขณะที่แบคทีเรียและราแบบไร้อากาศ 2-3 ชนิด สามารถผลิตเอนไซม์ cellulolytic ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายวัตถุดิบพวกกลีโคเซลลูโลสได้เป็นอย่างดี

**ตารางที่ 2.9** ข้อดีและข้อจำกัดของกระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภท ลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบ	ข้อดี	ข้อจำกัดและผลเสีย
<b>การลดขนาดทางกล</b> (mechanical comminution)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ลดการเกิดผลึกและขนาดของเซลลูโลส</li> <li>- เพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้พลังงานสูง</li> <li>- ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่น ๆ</li> </ul>
<b>การแยกสลายด้วยความร้อน</b> (pyrolysis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ผลิตแก๊สและผลิตภัณฑ์ของเหลว</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้อุณหภูมิสูง และผลิตเถ้า</li> </ul>
<b>ปฏิกิริยาโอโซน</b> (ozonolysis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ลดปริมาณลิกนิน</li> <li>- ไม่ผลิตสารพิษตกค้าง</li> <li>- ปฏิกิริยาเกิดภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีค่าใช้จ่ายสูง</li> </ul>
<b>การปรับสภาพด้วยด่าง</b> (alkaline hydrolysis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เป็นวิธีที่ง่ายและใช้พลังงานต่ำ</li> <li>- เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายชีวมวล</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางหลังจากผ่านการปรับสภาพ เพื่อไม่ให้ขัดขวางการทำงานของขั้นตอนต่อไป</li> </ul>
<b>การปรับสภาพด้วยกรดเข้มข้น</b> (concentrated acid hydrolysis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน</li> <li>- ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ ไซโลส และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ</li> <li>- ให้ผลผลิตกลูโคสสูง</li> <li>- เกิดปฏิกิริยาในสภาวะปกติ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ค่าใช้จ่ายสูง</li> <li>- เครื่องมืออุปกรณ์กัดกร่อน</li> <li>- สร้างสารพิษเจือปนสูง</li> </ul>
<b>การปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง</b> (dilute acid hydrolysis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน</li> <li>- ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ ไซโลส และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ</li> <li>- ลดปัญหาการกัดกร่อนเมื่อเทียบกับกรดเข้มข้น</li> <li>- สร้างสารประกอบที่เป็นพิษต่ำ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ผลผลิตค่อนข้างหลากหลาย</li> <li>- ให้ผลผลิตน้ำตาลต่ำ</li> </ul>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.9 ข้อดีและข้อจำกัดของกระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภท  
ลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการต่าง ๆ (ต่อ)

วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบ	ข้อดี	ข้อจำกัดและผลเสีย
ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative delignification)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายในขั้นตอนไฮโดรไลซิส</li> <li>- ปฏิกิริยาเกิดภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สารเคมีที่ใช้มีราคาสูง เช่น <math>H_2O_2</math></li> </ul>
การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organosolv process)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- การลงทุนสูง</li> <li>- การใช้สารละลายอินทรีย์ต้องมีการดูแลและการจัดการที่ดี</li> </ul>
การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion; autohydrolysis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลิกนิน และย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดี</li> <li>- คุ่มค่าการลงทุน</li> <li>- ให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสและเฮมิเซลลูโลสสูง</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ทำลายไซแลนบางส่วนและส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต-ลิกนินไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดสารประกอบที่ยับยั้งจุลินทรีย์</li> </ul>
การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion; AFEX)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- กำจัดลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส</li> <li>- เพิ่มการตอบสนองต่อพื้นที่ผิว</li> <li>- เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย</li> <li>- ไม่ผลิตสารยับยั้งสำหรับกระบวนการเก็บเกี่ยว</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่เหมาะสำหรับวัตถุดิบที่มีปริมาณลิกนินสูง</li> <li>- การลงทุนสูง</li> </ul>
การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ explosion)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เพิ่มการตอบสนองต่อพื้นที่ผิว</li> <li>- เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย</li> <li>- คุ่มค่าการลงทุน</li> <li>- ไม่ก่อให้เกิดสารที่เป็นพิษ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่มีผลต่อลิกนินและเฮมิเซลลูโลส</li> <li>- ระบบต้องใช้แรงดันสูง</li> </ul>
การปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส</li> <li>- ใช้พลังงานต่ำ</li> <li>- ไม่ใช้สารเคมี</li> <li>- จึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- อัตราการย่อยสลายช้ามาก</li> <li>- ใช้พื้นที่ในการผลิตมาก</li> </ul>

ที่มา : ดัดแปลงจาก Alvira และคณะ (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.12 การย่อยหรือการไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลส

การไฮโดรไลซิสเป็นกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิทซ์ เช่น กลูโคส เป็นต้น โดยสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ และการไฮโดรไลซิสด้วยสารเคมี ซึ่งการไฮโดรไลซิสด้วยสารเคมีแบ่งออกเป็นกรดและการไฮโดรไลซิสด้วยกรด และการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง ทำให้เกิดการทำให้พันธะไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน ถ้าการไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่ถ้าไม่สมบูรณ์จะได้เส้นใย ซึ่งข้อดีของการไฮโดรไลซิสด้วยกรด คือ ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้น มีศักยภาพในการผลิตน้ำตาลสูง และมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Nguyen และคณะ, 2014)

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลส คือ ความพรุน (porosity) หรือช่องว่างระหว่างชิ้นส่วนของวัสดุ หรือช่องว่างระหว่างพื้นที่ผิวผิวของเส้นใยเซลลูโลส และปริมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสมีผลทำให้ประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซิสลดลง ส่งผลให้ได้ปริมาณผลผลิตต่ำ การศึกษาของห้องปฏิบัติการพลังงานจากวัสดุชีวภาพทดแทนแห่งชาติ (National Renewable Energy Laboratory; NREL) ได้เสนอว่าลิกนินปริมาณต่ำอาจทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสง่ายขึ้น ดังนั้น การกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส การแยกเส้นใยเซลลูโลส การลดขนาดผลึกของเซลลูโลส และการเพิ่มช่องว่างระหว่างโมเลกุลของวัสดุชีวภาพในขั้นตอนการปรับปรุงวัสดุชีวภาพเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและพัฒนากระบวนการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญ (สุโขใจ, 2554)

### 2.12.1 การไฮโดรไลซิสด้วยกรด (acid hydrolysis)

กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดมี 2 วิธี คือ การใช้กรดเจือจางและการใช้กรดเข้มข้น กรดที่นำมาใช้ในการไฮโดรไลซิสวัสดุลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก และกรดฟอสฟอริก เป็นต้น (Galbe และ Zacchi, 2002) ซึ่งกรดจะทำลายพอลิเมอร์ของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสโดยทำให้พันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิกของกลูโคสในโครงสร้างแตกออกเกิดเป็นน้ำตาลสายโซ่สั้น ๆ ที่มีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนเดิม แต่ปลายของสายโซ่เซลลูโลสจะเป็นหมู่อัลดีไฮด์ที่มีสมบัติรีดิทซ์ (reducing) โดยพบว่าพันธะของเซลลูโลสจะไวต่อกรดและมีการตัดแบบสุ่ม (อัจฉราภรณ์, 2558) ตารางที่ 2.10 แสดงข้อดีและข้อจำกัดของการไฮโดรไลซิสด้วยกรด และกระบวนการย่อยสลายวัสดุชีวภาพลิกโนเซลลูโลสโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดแสดงดังรูปที่ 2.23

#### 2.12.1.1 การไฮโดรไลซิสด้วยกรดเจือจาง (dilute acid hydrolysis)

กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดเจือจางมีข้อดี คือ ใช้ปริมาณความเข้มข้นกรดน้อย (ร้อยละ 2-5) ทำให้เกิดการกัดกร่อนต่ำ แต่ต้องดำเนินการภายใต้สภาวะที่ใช้อุณหภูมิและความดันสูง และมีระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาเป็นวินาที หรือนาที เพื่อให้ได้ผลผลิตของการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสเป็นที่ยอมรับ วิธีนี้นับว่าเป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพและได้รับความนิยมสำหรับใช้ในการเปลี่ยนวัสดุชีวภาพลิกโนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ ด้วยการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และละลายส่วนของเซลลูโลสเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล โดยใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดฟอสฟอริก ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและความดันเหมาะสม (Silverstein และคณะ, 2007)

การใช้กรดเจือจางในการไฮโดรไลซ์พัฒนาโดย Scholler ก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเพื่อนำไปสู่การเพิ่มผลผลิต (yield) เช่น Purdue two stage process โดยใช้กรดเจือจางร่วมกับกรดเข้มข้น การใช้กรดเจือจางภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง สำหรับการย่อยสลายเอมิเซลลูโลสก่อนในขั้นตอนแรก จากนั้นจึงใช้กรดเข้มข้นเพื่อสกัดเซลลูโลส จากวัสดุเหลือใช้ลิกโนเซลลูโลสในขั้นตอนที่สอง การไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเจือจาง แบ่งเป็น 2 รูปแบบที่ใช้ คือ (1) ปริมาณสารตั้งต้นน้อย (ร้อยละ 5-10 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิสูงกว่า 160 องศาเซลเซียส และ (2) ปริมาณสารตั้งต้นมาก (ร้อยละ 10-40 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 160 องศาเซลเซียส

การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดฟอสฟอริกซึ่งเป็นกรดอ่อนมีข้อดีหลายประการ คือ มีความเป็นพิษและการกัดกร่อนต่ำ (López-Linares และคณะ, 2013) ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษ ในสภาวะกรดลดลง (Vasconcelos และคณะ, 2013) และกากที่เหลือจากการไฮโดรไลซ์สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยสำหรับเพาะปลูกได้ (Castro และคณะ, 2014) นอกจากนี้ เกลือโซเดียมฟอสเฟต ที่ได้จากการปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็นกลางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ยังสามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารสำหรับกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Vasconcelos และคณะ, 2013) ทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Gómez และคณะ, 2006) Jung และคณะ (2013) ศึกษา การปรับสภาพทะเลลายปาล์มเปล่าด้วยกรดฟอสฟอริกเจือจาง โดยใช้โมโครเวฟ พบว่าการปรับสภาพ ทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที มีประสิทธิผลมากที่สุด

### 2.12.1.2 การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเข้มข้น (concentrated acid hydrolysis)

โดยทั่วไปกระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเข้มข้นจะใช้ความเข้มข้นกรดประมาณร้อยละ 10-30 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิไม่สูงนัก ใช้ความดันที่เกิดจากเครื่องปั๊ม และใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยานานกว่าการใช้กรดเจือจาง (Verardi และคณะ, 2012) ข้อดีของการไฮโดรไลซ์วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส ด้วยกรดเข้มข้น คือ ปฏิกิริยาเกิดภายใต้สภาวะที่ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำ มีศักยภาพในการผลิต น้ำตาลได้สูง (ผลได้น้ำตาลกลูโคสประมาณร้อยละ 90) และสามารถนำกรดที่ใช้ในกระบวนการ ไฮโดรไลซ์กลับมาใช้ใหม่ได้โดยการระเหยซ้ำหลาย ๆ ครั้ง (Iranmahboob และคณะ, 2002) แต่เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้กรดความเข้มข้นสูงจึงทำให้เกิดปัญหาการกัดกร่อนภาชนะ มีความเป็นพิษ และเป็นอันตรายจึงต้องใช้ภาชนะที่ทนทานต่อการกัดกร่อนของกรด ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต ให้สูงขึ้น นอกจากนี้กรดความเข้มข้นสูงยังเพิ่มอัตราการย่อยสลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปเป็น สารประกอบที่เป็นพิษ ได้แก่ เฟอร์ฟิวรอล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล

(5-hydroxymethylfurfural; HMF) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์และขัดขวางกระบวนการหมักในขั้นตอนต่อไป (Kootstra และคณะ, 2009)

การไฮโดรไลซ์เศษเนื้อไม้ด้วยกรดเข้มข้น เช่น กรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริกทำได้โดยการใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 72 ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาฟาเรนไฮต์เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง เพื่อละลายส่วนของเซลลูโลสในวัตถุดิบให้เหลือลิกนินเป็นส่วนเหลือทิ้ง เซลลูโลสที่ละลายจะถูกแยกออกจากลิกนินและย่อยต่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางพร้อมทั้งให้ความร้อนเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล

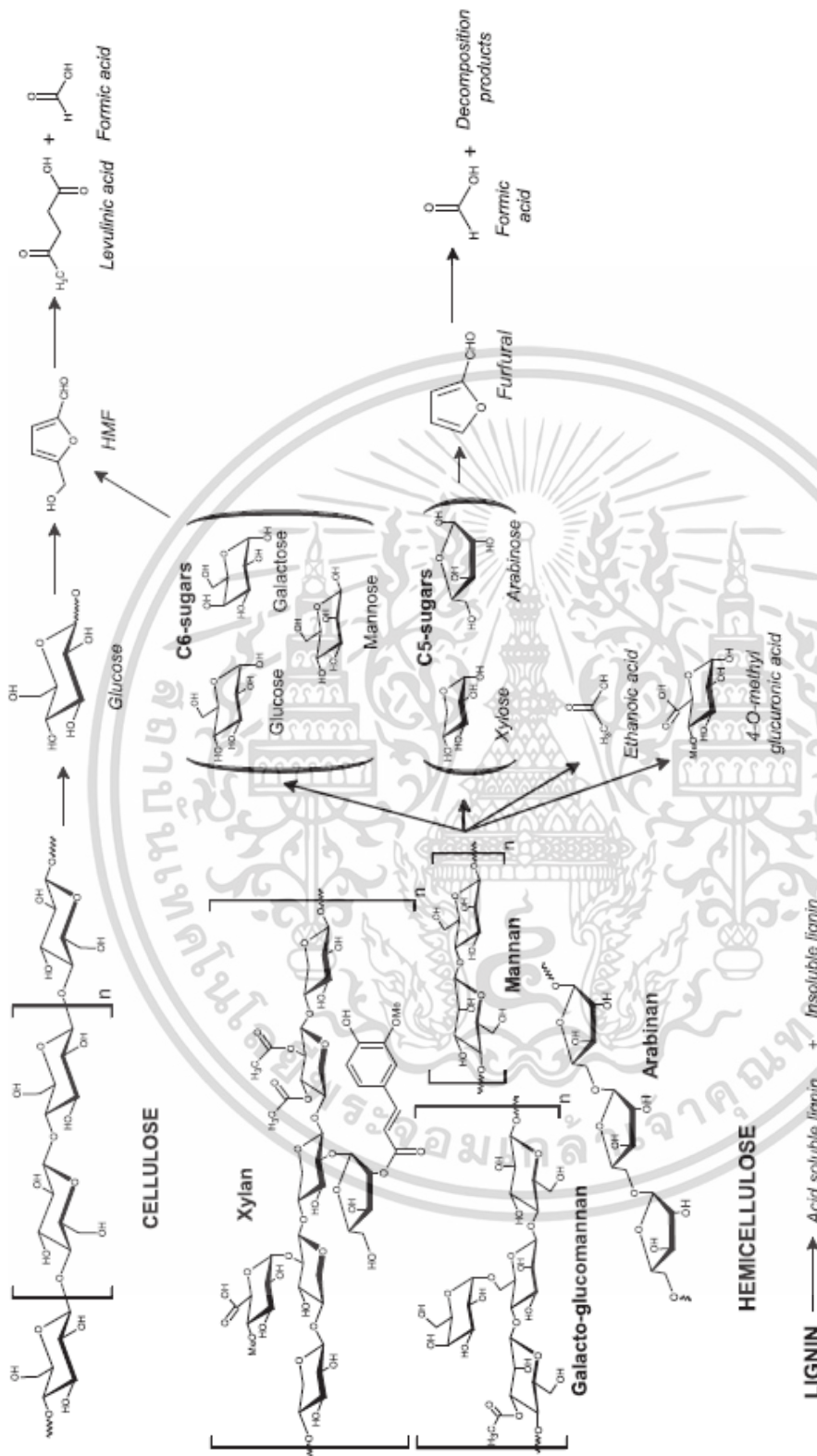
การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเข้มข้นอีกกระบวนการหนึ่ง คือ Bergius process โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 40 เพื่อละลายเซลลูโลส จากนั้นเจือจางด้วยน้ำ และให้ความร้อนเพื่อไฮโดรไลซ์เซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล ทางการค้าใช้วิธีนี้ในการย่อยลิกโนเซลลูโลสและทำให้เป็นกลางด้วยด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ กระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเข้มข้นให้ผลที่สมบูรณ์และรวดเร็วในการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลเฮกโซส (C6) และเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลเพนโทส (C5) โดยถูกทำลายเพียงเล็กน้อย (สุขใจ, 2554)

ตารางที่ 2.10 ข้อดีและข้อจำกัดของการไฮโดรไลซ์วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด

ข้อดี	ข้อจำกัด
<ul style="list-style-type: none"> <li>• วัตถุดิบไม่ต้องผ่านขั้นตอนการปรับสภาพก่อน</li> <li>• ปฏิกิริยาเกิดเร็ว ง่าย และใช้เวลาสั้น</li> <li>• ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้มีราคาถูก และหาง่าย</li> <li>• ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ (กรดเข้มข้น)</li> <li>• ให้ปริมาณผลผลิตสูง (กรดเข้มข้น)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบไม่เฉพาะเจาะจง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่บริสุทธิ์</li> <li>• น้ำตาลที่ได้ถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่เป็นพิษ เช่น เฟอร์ฟิวรอล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล เป็นต้น</li> <li>• ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ทนทานต่อการกัดกร่อนได้</li> </ul>

ที่มา : ระวีวรรณ (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.23 กระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบลิคไนในเซลล์ูโลสโดยการไฮโดรไลซ์ด้วยการด

ที่มา : Girisuta และคณะ (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.12.2 การไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง (alkaline hydrolysis)

การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยด่างเป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรด (สุภาวดี, 2557) สารเคมีที่นิยมใช้ในกระบวนการปรับสภาพด้วยด่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น (Wang และคณะ, 2010; Wanitwattananurmlug และคณะ, 2012; Sharma และคณะ, 2013) ซึ่งวิธีการปรับสภาพด้วยด่างนี้สามารถไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสและลดระดับลิกนินได้ เซลลูโลสที่เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ได้ง่าย กลไกของการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยด่าง คือ การเกิดปฏิกิริยาแซพอนิฟิเคชัน (saponification) ของพันธะเอสเทอร์ระหว่างโมเลกุลของไซแลน เฮมิเซลลูโลส และส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น ลิกนิน ทำให้ช่องว่างของลิกโนเซลลูโลสเพิ่มขึ้น (สุขใจ, 2554)

การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางเพื่อไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสทำให้เกิดการบวมน้ำนำไปสู่การเพิ่มพื้นที่ผิวภายใน ลดระดับการเกิดพอลิเมอร์ ลดความสามารถของการสร้างผลึก ช่วยแยกโครงสร้างที่เชื่อมกันระหว่างลิกนินกับคาร์โบไฮเดรตส่งผลให้สายพอลิแซ็กคาไรด์สั้นลงและทำลายโครงสร้างลิกนิน (สุขใจ, 2554) วิธีนี้ใช้ได้ดีกับฟางข้าวและขานอ้อย ซึ่งใช้อุณหภูมิต่ำกว่าการใช้กรดไฮโดรไลซ์ และใช้เวลานานกว่า แต่ไม่มีผลกับไม้เนื้ออ่อนที่มีลิกนินมากกว่าร้อยละ 26

การพัฒนากระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยด่างโดยการเติมสารออกซิแดนต์ เช่น ออกซิเจนหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายลิกนิน การไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลส และได้ผลผลิตของเซลลูโลส ซึ่งตอบสนองต่อการไฮโดรไลซ์ของเอนไซม์ และกระบวนการหมักโดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ในแหล่งทรัพยากรชีวภาพพวกไม้

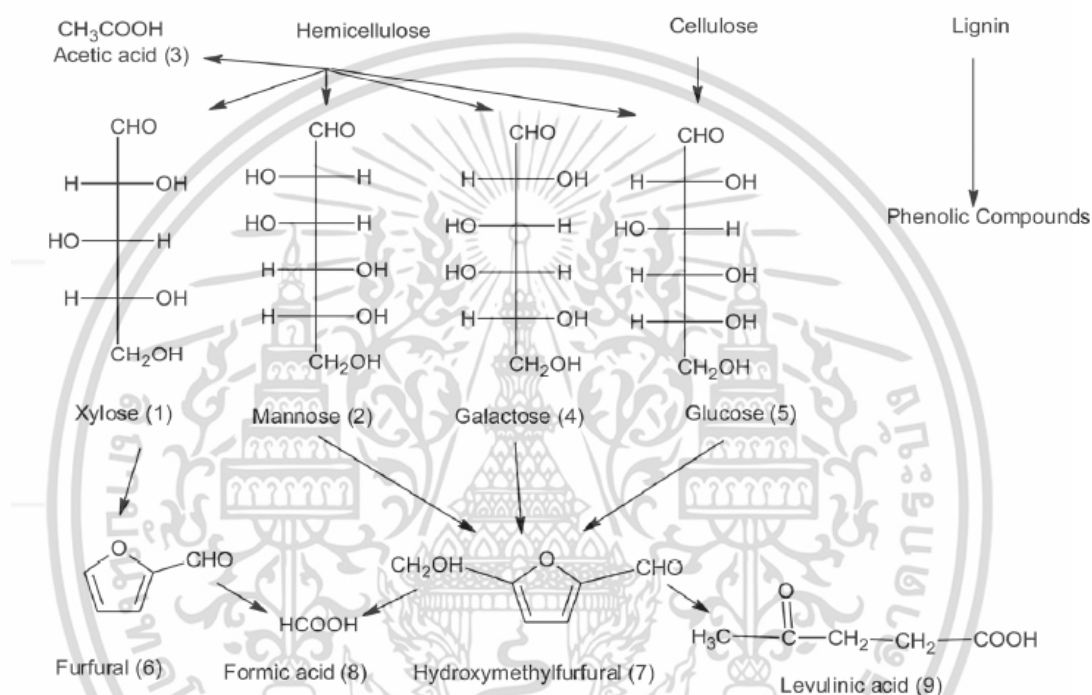
### 2.13 สารพิษที่เกิดจากการไฮโดรไลซิส

กระบวนการไฮโดรไลซิสวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยสารเคมีส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) (ลิกนิน) และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่พบในลิกโนเซลลูโลสเกิดเป็นสารประกอบที่เป็นพิษยับยั้งกระบวนการหมัก (Talebnia และคณะ, 2010) ซึ่งโครงสร้างและความเข้มข้นของสารพิษที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับประเภทของวัตถุดิบ วิธีการไฮโดรไลซ์ และสภาวะที่ใช้ ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา ความดัน และค่าความเป็นกรดต่าง เป็นต้น (Cardona และคณะ, 2010; Radding และคณะ, 2011)

การไฮโดรไลซ์วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งผลผลิตเหล่านี้มักเกิดจากการย่อยสลายของเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบสารพิษที่เกิดขึ้นระหว่างการไฮโดรไลซ์ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง รวมถึงการใช้กรดเข้มข้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ผลผลิตน้ำตาลที่ได้ถูกดึงน้ำออก (dehydration) เกิดเป็นผลผลิตพลอยได้ที่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์และยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมัก โดยกลูโคสและไซโลสจะถูกย่อยสลายเป็นอนุพันธ์ฟูแรน ได้แก่ เฟอร์ฟิวรอล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล (5-hydroxymethylfurfural; 5-HMF) ที่สามารถสลายตัวได้เป็นกรดฟอร์มิก และเมื่อไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอลสลายตัวแล้วจะได้กรดลิวลินิก (levulinic acid) สำหรับลิกนินเมื่อเกิดการไฮโดรไลซ์แล้วจะได้สารประกอบฟีนอลิกและกรดอื่น ๆ ดังรูปที่ 2.24 แสดงโครงสร้างของสารประกอบที่เป็นพิษยับยั้งกระบวนการหมักที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด



รูปที่ 2.24 โครงสร้างของสารประกอบที่เป็นพิษยับยั้งกระบวนการหมักที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด  
ที่มา : Palmqvist และ Hahn-Hagerdal (2000)

สารพิษที่เกิดจากการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ อนุพันธ์ฟูแรน (furan derivatives) กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) อนุพันธ์ฟีนอลิก (phenol derivatives) และไอออนของโลหะหนัก (heavy metal ions) ดังนี้

### 2.13.1 อนุพันธ์ฟูแรน

อนุพันธ์ฟูแรน ได้แก่ เฟอร์ฟิวรอล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล เป็นผลผลิตพลอยได้จากการสลายตัวของน้ำตาลเพนโทสและน้ำตาลเฮกโซสในระหว่างการไฮโดรไลซ์วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด (Almeida และคณะ, 2007) โดยน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมจะสลายตัวเป็นเฟอร์ฟิวรอล ละลายอยู่ในไฮโดรไลเสท และมักจะพบเฟอร์ฟิวรอลมากกว่าไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาวะการไฮโดรไลซ์ที่อุณหภูมิสูงเพอร์ฟิวรอลจะเกิดได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าเพอร์ฟิวรอลมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักรุนแรงกว่าสารพิษชนิดอื่น (Guo และคณะ, 2008) ซึ่งความเป็นพิษมักแปรผันตามความเข้มข้นของเพอร์ฟิวรอลและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตมวลเซลล์ได้ (Gorsich และคณะ, 2006)

ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอลเป็นสารพิษที่ได้จากการสลายตัวของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม แต่มีความเป็นพิษไม่รุนแรงเท่าเพอร์ฟิวรอล โดยจะทำให้จุลินทรีย์มีช่วงระยะเวลาปรับตัว (lag phase) นานขึ้น และลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลง (Makawi และคณะ, 2009)

### 2.13.2 กรดคาร์บอกซิลิก

กรดคาร์บอกซิลิกเป็นอนุพันธ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขององค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดสารพิษที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแอสติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก ซึ่งมักจะพบในไฮโดรไลสเสทกรดเหล่านี้ถูกปล่อยออกมาเนื่องจากการไฮโดรไลซ์หมู่แอสทิล (acetyl groups) ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาลหรือสายโซ่หลักของเฮมิเซลลูโลส (Xing และคณะ, 2011) กรดแอสติกเป็นผลผลิตพลอยได้ที่เกิดจากการไฮโดรไลซ์หมู่แอสทิลของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งปริมาณการเกิดกรดจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการจนกระทั่งเกิดการไฮโดรไลซ์หมู่แอสทิลอย่างสมบูรณ์ (Behera และคณะ, 2014) สารพิษที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 7.4 โดยกรดแอสติกจะแตกตัวและสะสมอยู่ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ในรูปของโปรตอน (proton) ทำให้ค่าความเป็นกรดต่างภายในเซลล์ต่ำลง และเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในเซลล์ตลอดจนเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายในที่สุด

### 2.13.3 อนุพันธ์ฟีนอลิก

อนุพันธ์ฟีนอลิกเป็นผลผลิตพลอยได้จากการสลายตัวของลิกนินในระหว่างการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด และพบว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารพิษที่มีผลต่อกระบวนการหมักมากที่สุด เนื่องจากมีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก (Nogueira และคณะ, 2008) และเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดความแข็งแรงและประสิทธิภาพในการเลือกสารผ่านเข้าออกลดลงส่งผลให้การเคลื่อนที่เข้าออกของเอนไซม์หรือสารจำเป็นอื่น ๆ เข้าสู่เซลล์ได้น้อยลงจนทำให้เกิดความผิดปกติในการดูดซึมน้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Campos และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์รุนแรงกว่าอนุพันธ์ฟูแรนแม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำกว่ก็ตาม สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ syringaldehyde และ vanillic acid มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cortez และ Roberto, 2010) และมีผลต่อการหมักเอทานอลของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Chandel และคณะ, 2011)

### 2.13.4 ไอออนของโลหะหนัก

ไอออนของโลหะหนัก ได้แก่ เหล็ก โครเมียม นิกเกิล และทองแดง เกิดจากการกักกรองของอุปกรณ์และภาชนะในระหว่างการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด ซึ่งปฏิกิริยาเกิดภายใต้สภาวะที่ใช้อุณหภูมิและความดันสูง (Mussatto และ Roberto, 2004; Behera และคณะ, 2014) ไอออนของโลหะหนักเหล่านี้จะมีความเป็นพิษต่อเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยพบว่าไอออนของเหล็กมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการใช้ไซโคลส

### 2.14 ผลของสารพิษต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

สารพิษที่ได้จากการไฮโดรไลซ์วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดจะมีผลยับยั้งกระบวนการหมักและขีดขวางการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ (Parawira และ Tekere, 2011; Westman และคณะ, 2012) ซึ่งความทนทานต่อสารพิษของจุลินทรีย์ไม่สามารถกำหนดเป็นความเข้มข้นที่แน่นอนได้เนื่องจากผลของการยับยั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารพิษ ชนิดของจุลินทรีย์ การปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารหมัก รูปแบบของกระบวนการหมัก และชนิดของสารพิษที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น โดยพบว่าสารพิษเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งส่งผลต่ออัตราการบริโภคน้ำตาลของเชื้อและทำลายผลผลิตที่ได้ นอกจากนี้สารพิษยังส่งผลต่อสรีรวิทยาระดับเซลล์ โดยรบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้จุลินทรีย์เจริญช้าแต่ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้นจึงได้ผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมน้อยลง (Chandel และคณะ, 2011) จากการศึกษาพบว่าสารพิษจะไปทำลายองค์ประกอบในเอนไซม์ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase; ADH) ไพรูเวตดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenase; PDH) และอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase; ALDH) ที่ผลิตโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และทำลายดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและอาร์เอ็นเอภายในเซลล์จุลินทรีย์อีกด้วย (Modig และคณะ, 2002)

จากการศึกษาของ Almeida และคณะ (2007) พบว่าอนุพันธ์ฟูแรนมีผลต่อการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารพิษในไฮโดรไลเสท (Liu และคณะ, 2004) และพบว่าเฟอร์ฟิวรอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis* ได้มากกว่าไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอลที่ความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งเฟอร์ฟิวรอลจะไปขัดขวางกระบวนการจำลองตัวเองของเซลล์ทำให้อัตราการเจริญและผลได้มวลเซลล์ลดลง Nigam (2001) พบว่าเฟอร์ฟิวรอลความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตรมีผลยับยั้งการหายใจและการเจริญของเชื้อ *Pichia stipitis*

อย่างไรก็ตามการเกิดความเป็นพิษโดยรวมของสารประกอบต่าง ๆ ได้แก่ อนุพันธ์ฟูแรน กรดคาร์บอกซิลิก อนุพันธ์ฟีนอลิก และไอออนของโลหะหนักทำให้เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโต การผลิตมวลเซลล์ของจุลินทรีย์ และปริมาณการผลิตที่ลดลง ดังนั้น หลังจากเสร็จสิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการไฮโดรไลซ์วัตถุดิบกลีโกล์แล้วจึงต้องดำเนินการลดสารพิษก่อนที่จะเข้าสู่ขั้นตอนการหมัก เพื่อช่วยให้จุลินทรีย์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

## 2.15 วิธีการกำจัดสารพิษ

การกำจัดสารพิษ (detoxification or removal of inhibitors) ในไฮโดรไลสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์วัตถุดิบกลีโกล์ด้วยกรดเป็นขั้นตอนที่สำคัญและจำเป็นต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (Zhang และคณะ, 2011) ประสิทธิภาพของวิธีการกำจัดสารพิษขึ้นอยู่กับชนิดของสารพิษที่พบในไฮโดรไลส และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (Yu และคณะ, 2011) การกำจัดสารพิษมีหลากหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะทำให้สารพิษเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ (inert materials) หรือช่วยลดความเข้มข้นของสารพิษลง ทั้งนี้ไฮโดรไลสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดแต่ละชนิดนั้นจะมีระดับของความเป็นพิษแตกต่างกัน ดังนั้น การเลือกใช้วิธีต่าง ๆ เพื่อกำจัดหรือลดปริมาณสารพิษจึงต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของไฮโดรไลสที่ได้ เพราะอาจแตกต่างกันตามประเภทของวัตถุดิบที่นำมาใช้ และสถานะของการไฮโดรไลซ์ รวมถึงจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Mussatto และ Roberto, 2004)

**2.15.1 การกำจัดสารพิษทางกายภาพ** ได้แก่ การระเหยแบบสูญญากาศ (evaporation) และการแยกสารพิษด้วยเยื่อแผ่น (membrane separations)

### 2.15.1.1 การระเหยแบบสูญญากาศ

การระเหยแบบสูญญากาศสามารถกำจัดสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น กรดแอสซิติค เพอร์ฟิวรอล และวานิลลินที่พบในไฮโดรไลสกลีโกล์ (Mussatto และ Roberto, 2004) แต่วิธีนี้ไม่สามารถกำจัดสารพิษที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ระเหยได้ เช่น สารแทรก (extractives) และอนุพันธ์ฟีนอลิก เป็นต้น ทำให้เกิดการยับยั้งการหมัก เพราะสารที่สกัดได้จากกลีโกล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น

Rodrigues และคณะ (2001) ศึกษาการกำจัดสารพิษของไฮโดรไลสชานอ้อยด้วยวิธีการระเหยแบบสูญญากาศร่วมกับวิธีการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ พบว่าสามารถกำจัดเพอร์ฟิวรอลได้ร้อยละ 89 และลดปริมาณกรดแอสซิติคได้บางส่วน

Zhu และคณะ (2011) ศึกษาการกำจัดสารพิษของไฮโดรไลสซังข้าวโพดด้วยวิธีการสกัดขั้นสูง โดยใช้สารสกัดหลายชนิดร่วมกัน (trialkylamine ร้อยละ 30, n-octanol ร้อยละ 50 และ kerosene ร้อยละ 20) พบว่าสามารถกำจัดกรดแอสซิติคได้ร้อยละ 73.3 กำจัดไฮดรอกซีเมทิล-เพอร์ฟิวรอลได้ร้อยละ 45.7 และกำจัดเพอร์ฟิวรอลได้ร้อยละ 100

### 2.15.1.2 การแยกสารพิษด้วยเยื่อแผ่น

เป็นการกำจัดสารพิษโดยใช้เยื่อแผ่นดูดซับรูพรุนขนาดเล็กแบบไมโครพอร์ (micropore) ที่มีหมู่ฟังก์ชันพื้นผิวเชื่อมติดกับรูพรุนภายในทำให้สามารถกำจัดสารพิษที่ได้จากการไฮโดรไลซ์องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดได้ ซึ่งจะทำให้การบ่มสารละลายไฮโดรไลสที่ต้องการกำจัดสารพิษผ่านรูพรุนของเยื่อแผ่นดูดซับที่อยู่ติดกับตัวละลายโดยการพาความร้อน วิธีนี้ช่วยลดระยะเวลาในขั้นตอนการกำจัดสารพิษ และลดแรงดันที่ใช้ในการอัดสารละลายไฮโดรไลสให้ไหลผ่านเยื่อแผ่นดูดซับเมื่อเทียบกับแพคเบด (packed bed)

Wickramasinghe และ Grzenia (2008) พบว่าการกำจัดสารพิษโดยใช้เยื่อแผ่นดูดซับสามารถกำจัดกรดแอสติกที่พบในไฮโดรไลสได้ดีกว่าการใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resins)

Grzenia และคณะ (2010) ศึกษาการกำจัดสารพิษที่ได้จากการไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสซึ่งข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริกโดยใช้เยื่อแผ่นดูดซับ พบว่าสามารถกำจัดกรดซัลฟิวริก กรดแอสติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอร์ฟอรอล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟอรอลได้เมื่อใช้ alamine 336, octanol และ oethyl alcohol เป็นสารละลายอินทรีย์

**2.15.2 การกำจัดสารพิษทางเคมี** ได้แก่ การทำให้เป็นกลาง (neutralization) การปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide over-liming) การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ (activated charcoal treatment) เรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resins) และการสกัดด้วยเอทิลแอสเตต (extraction with ethyl acetate)

#### 2.15.2.1 การทำให้เป็นกลาง

การทำให้สารละลายไฮโดรไลสลิกโนเซลลูโลสเป็นกลางนับได้ว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญสำหรับนำไฮโดรไลสมาใช้ในกระบวนการหมัก เพราะไฮโดรไลสที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดมีความเป็นกรดสูงมากจึงไม่เหมาะสมต่อการหมักของจุลินทรีย์ ซึ่งต่างที่นิยมใช้ในการทำให้เป็นกลาง ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 6.0-7.0) วิธีนี้สามารถกำจัดสารพิษพวกเฟอร์ฟอรอลและอนุพันธ์ฟีนอลิกได้ โดยจะทำให้ตกตะกอนในระหว่างดำเนินการปฏิบัติ

#### 2.15.2.2 การปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์

การปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ภายใต้สภาวะต่างแก่ที่อุณหภูมิสูงเป็นวิธีเก่าแก่ที่ใช้สำหรับกำจัดสารพิษในไฮโดรไลสลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริก เจือจาง (Martinez และคณะ, 2000; Chandel และคณะ, 2007) วิธีนี้สามารถกำจัดสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น เฟอร์ฟอรอล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟอรอลที่พบในไฮโดรไลส (Chandel และคณะ, 2011) การกำจัดสารยับยั้งการหมักมักจะนิยมใช้วิธีการปรับต่างเกิน ซึ่งประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการให้ความร้อน การเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ การแยกตะกอนยิปซัม (gypsum) ออกจากไฮโดรไลเสท และการเติมกรดเพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างของไฮโดรไลเสทให้เป็นกรดอ่อน วิธีการนี้มีข้อเสีย คือ เกิดการสูญเสียน้ำตาลบางส่วน (ประมาณร้อยละ 10) จากการดูดซับ และเกิดตะกอนของแคลเซียมซัลเฟตซึ่งเป็นของเสียของกระบวนการที่จำเป็นต้องกำจัด ทำให้ต้นทุนในกระบวนการผลิตสูงขึ้น (Huang และคณะ, 2011)

### 2.15.2.3 การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์

การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์เป็นวิธีกำจัดสารพิษในไฮโดรไลเสทเฮมิเซลลูโลสที่คุ้มค่า การลงทุนวิธีหนึ่ง เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการซึมซับสารพิษสูง และไม่ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ (Canilha และคณะ, 2008) ประสิทธิภาพของการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง ระยะเวลาสัมผัส อุณหภูมิ และอัตราส่วนของถ่านกัมมันต์กับปริมาตรสารละลายไฮโดรไลเสท (Prakasham และคณะ, 2009)

### 2.15.2.4 เรซินแลกเปลี่ยนประจุ

การใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุสามารถกำจัดสารพิษจำพวกอนุพันธ์ฟีนอลิก กรดแอสติก และเฟอร์พิวรอลที่พบในไฮโดรไลเสทได้ แต่วิธีการนี้อาจจะไม่คุ้มค่าการลงทุน (Lee และคณะ, 1999) และพบว่าการใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุกำจัดสารพิษจะมีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างของไฮโดรไลเสทให้เท่ากับ 10 (Ranjan และคณะ, 2009)

Villarreal และคณะ (2006) ศึกษาผลการกำจัดสารพิษที่พบในไฮโดรไลเสทไม้ยูคาลิปตัสด้วยวิธีเรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ประจุบวกและประจุลบ) สำหรับใช้ในการผลิตไซลิทอล โดยเชื้อ *Candida guilliermondii* พบว่า การใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุในการกำจัดสารพิษที่พบในไฮโดรไลเสทไม้ยูคาลิปตัสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก ทำให้ได้ผลผลิตไซลิทอล 32.7 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.57 กรัมต่อกรัม

### 2.15.2.5 การสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

การกำจัดสารพิษที่ยับยั้งการหมักโดยวิธีการสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์สามารถช่วยเพิ่มผลได้เอทานอลที่หมักโดยเชื้อ *Pichia stipitidis* ได้มากถึงร้อยละ 93 (Wilson และคณะ, 1989) วิธีการนี้สามารถใช้กำจัดกรดแอสติก (ร้อยละ 56) เฟอร์พิวรอล วานิลลิน และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์พิวรอล อีกทั้งยังกำจัดอนุพันธ์ฟีนอลิกที่พบในไฮโดรไลเสทไม้ยูคาลิปตัสได้ร้อยละ 84 (Cruz และคณะ, 1999)

Pasha และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเอทานอล โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จากไฮโดรไลเสทกระถินทางกระรอก (*Prosopis juliflora*) ที่ผ่านการกำจัดสารพิษ โดยวิธีการปรับค่าความเป็นกรดด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ พบว่าให้ผลได้เอทานอล  $0.459 \pm 0.012$  กรัมต่อกรัม อัตราการผลิต  $0.67 \pm 0.015$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีประสิทธิภาพของกระบวนการหมักสูงถึงร้อยละ 90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.15.3 การกำจัดสารพิษทางชีวภาพ

การกำจัดสารพิษด้วยวิธีทางชีวภาพโดยส่วนใหญ่จะใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงมาแก้ไขเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารพิษที่พบในสารละลายไฮโดรไลสเซลลิวโลสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด ซึ่งนิยมใช้เอนไซม์ Laccase และ Peroxidase ที่ได้จากเชื้อรา เช่น *Trametes versicolor*, *Aspergillus nidulas* และ *Trichoderma resei* (Behera และคณะ, 2014) ในการลดปริมาณสารพิษ โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟพอลิเมอร์ไรเซชัน (oxidative polymerization) กับสารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลต่ำ นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์นับว่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดปริมาณสารพิษ โดยสามารถลดความเข้มข้นของกรดแอสติกในอาหารหมักลงทำให้ได้ผลผลิตจากกระบวนการหมักมากขึ้น การกำจัดสารพิษด้วยวิธีทางชีวภาพมีข้อดี คือ มีความเป็นไปได้อย่างสูง เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีผลข้างเคียงต่ำ และใช้พลังงานน้อย (Parawira และ Tekere, 2011) แต่ใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยานาน และเกิดการสูญเสียน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ทำให้วิธีทางชีวภาพนี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยม (Yang และ Wyman, 2008) วิธีการกำจัดสารพิษทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้จุลินทรีย์ (microbial pretreatment of lignocellulosics) การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ (microbial acclimatization) การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในไฮโดรไลสเซลลูโลสที่ปนเปื้อนสารพิษ (in-situ microbial detoxification) การดัดแปลงสภาวะหมัก (alterations in fermentation conditions) และการใช้เอนไซม์ (enzymatic clarification) เป็นต้น

### 2.16 การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology)

การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) เป็นเทคนิคทางสถิติเพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลลัพธ์ (response variable) หรือตัวแปรตาม (dependent variable) และเซตของปัจจัยหรือตัวแปรอิสระ (independent variable) ที่เป็นตัวแปรเชิงปริมาณ วิธีนี้จะนำมาใช้หลังจากที่ผู้ทดลองทราบแล้วว่าปัจจัยใดบ้างที่มีความสำคัญในกระบวนการผลิต และต้องการทราบว่าระดับของปัจจัยเหล่านี้ระดับใดที่จะทำให้ผลผลิตสูงสุด หรือในระดับที่น่าพอใจ แผนการทดลองนี้ใช้เมื่อผู้ทดลองคาดว่ารูปแบบความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นโค้ง (มาริษา, 2549)

#### วัตถุประสงค์ในการใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง

1. เพื่อหาระดับของปัจจัยที่ทำให้ได้ผลผลิตสูงสุด
2. เพื่อหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมกับข้อกำหนดของกระบวนการผลิต
3. เพื่อหาเงื่อนไขของการผลิตใหม่ที่สามารถใช้ในการพัฒนาคุณภาพของการผลิตจากระดับเดิม
4. เพื่อหาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเชิงปริมาณและผลผลิต

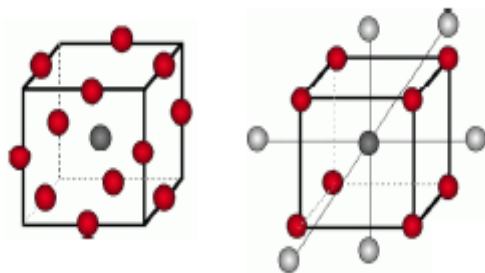
### ขั้นตอนของวิธีพื้นผิวตอบสนอง

1. เลือกแผนการทดลองพื้นผิวตอบสนองสำหรับการทดลอง เช่น Central Composite Design หรือ Box-Behnken Design
2. สร้างแผนการทดลอง
3. ทำการทดลองตามแผนที่สร้างไว้
4. สร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและผลลัพธ์ และวิเคราะห์ความเหมาะสมของสมการ
5. สร้างกราฟพื้นผิว (surface plot) และกราฟโครงร่าง (contour plot) เพื่อดูจุดที่ดีที่สุดของผลลัพธ์
6. หาค่าระดับของปัจจัยที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด

### 2.17 การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

การออกแบบการทดลอง (design and analysis of experiment; DOE) เป็นเทคนิคทางสถิติขั้นสูงที่ใช้ในการปรับค่าสภาวะของกระบวนการ เพื่อให้ได้ผลตอบสนองเป็นไปตามที่เราต้องการ ซึ่งความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดระหว่างวิธีการโดยทั่วไปกับเทคนิคของการออกแบบการทดลอง คือวิธีการโดยทั่วไปมักเป็นการทดลองแบบลองผิดลองถูก หรือใช้การทดลองปรับตั้งค่ากระบวนการทีละค่า (one-factor-at-a-time; OFAT) จะให้ผลตอบสนองเข้าสู่จุดมุ่งหมายที่ต้องการได้ช้ามาก และสิ้นเปลืองทรัพยากรในการวิเคราะห์ รวมถึงต้องเก็บข้อมูลมาก และยังไม่เหมาะสมอย่างยิ่งกับกระบวนการที่มีอันตรกิริยาระหว่างตัวแปรของกระบวนการด้วยตัวเอง

การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Full Fractional Factorial โดยอาศัยค่ากลางของข้อมูลจากระดับปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงสุด ในอันดับต้นๆ ที่ได้รับความนิยมมีอยู่ 2 วิธี คือ Central Composite Design (CCD) และ Box-Behnken Design (BBD) โดยใช้การกระจายระดับของข้อมูลออกสู่ศูนย์กลางเพื่อศึกษาอันดับของปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงสุด ลักษณะการวางตำแหน่งการกระจายระดับของปัจจัยแสดงดังรูปที่ 2.25 จะเห็นได้ว่าการออกแบบการทดลองแบบ BBD จะเน้นที่จุดรอบ ๆ ค่ากลาง โดยไม่รวมค่าการกระจายในระดับแกน (axial point) และค่าที่มุม (factorial point) ทำให้ค่าที่ได้ไม่ครอบคลุมปลายสุดของระดับปัจจัย ดังนั้น การออกแบบการทดลองแบบ CCD จึงได้รับความนิยมมากกว่า (Montgomery, 2001)



**รูปที่ 2.25** การกระจายของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ  
Box-Behnken Design (ซ้าย) และ Central Composite Design (ขวา)  
ที่มา : Draper (1988)

การกำหนดค่ารหัส (code value) ของระดับปัจจัยให้ 0 แทนค่ากลาง (center point) ซึ่งในการทดลองทั่วไปนิยมทำค่ากลางไว้หลายจุดเพื่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดลอง ในการประมวลผลทางสถิติที่น้อยที่สุด ถ้าการทดลองที่ 2 ปัจจัยจะมีจำนวนการทดลองเท่ากับ  $2^k$  คือ 4 ในแต่ละชนิดของปัจจัยค่ามุม (factorial point) จะมีอยู่ 4 จุด ให้ค่าเป็น +1 สำหรับค่าสูง และ -1 สำหรับค่าต่ำ และค่าแกน (axial point) จะมีอยู่ 4 จุด ให้ค่าเป็น  $+\alpha$  และ  $-\alpha$  แทนค่าสูงและต่ำ ตามลำดับ โดยค่า  $\alpha$  สามารถหาได้จากรากที่ 4 ของ  $2^k$  เมื่อ k คือ จำนวนปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 2.11 ซึ่งค่า  $\alpha$  ที่ได้จะต้องนำไปคูณกับค่าคงที่ของความกว้างช่วงการแปรผันของระดับปัจจัย ดังนั้น การออกแบบการทดลองแบบ CCD จึงมี 5 ระดับ คือ  $+\alpha$ , +1, 0, -1 และ  $-\alpha$  ตามลำดับจากมากไปน้อย

**ตารางที่ 2.11** ค่าแอลฟา ( $\alpha$ ) ที่ใช้ในการทดลอง

จำนวนปัจจัย ที่ใช้ในการทดลอง (k)	2	3	4	5	6
ค่า $\alpha$	1.414	1.682	2.000	2.378	2.828

ที่มา : Draper (1988)

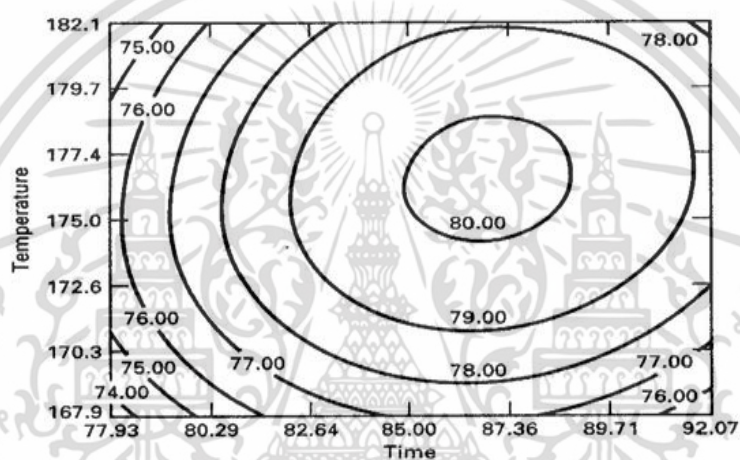
การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่จะศึกษาที่ค่าตอบสนองที่สนใจสำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิต โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Multiple regression analysis ซึ่งหากตัวแปรใดที่มีผลต่อค่าตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ตัวแปรนั้นจะปรากฏในสมการอันดับสอง (second order model) ดังสมการที่ (2.1) มีลักษณะเส้นกราฟเป็นเส้นโค้ง (Montgomery, 2001) ทำการประมวลผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สร้างกราฟโครงร่าง (contour plot) และกราฟพื้นผิว

(surface plot) ดังแสดงในรูปที่ 2.26 เพื่อช่วยในการประมวลผลระหว่างปัจจัยร่วม

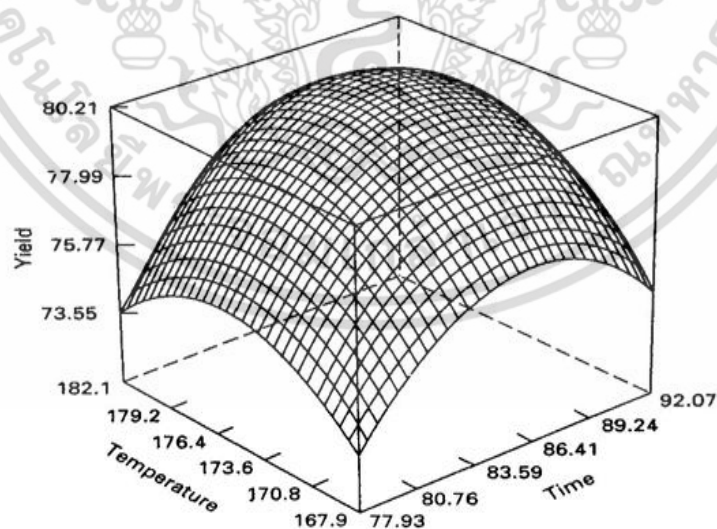
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \dots \dots \dots (2.1)$$

กำหนดให้  $Y$  = ค่าตอบสนอง  
 $\beta$  = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย  
 $X$  = ชนิดของปัจจัย  
 $\epsilon$  = ค่าผิดพลาดจากปัจจัยภายนอก  
 $k$  = จำนวนปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง  
 $i, j$  = จำนวนเต็มใด ๆ



(ก) The contour plot



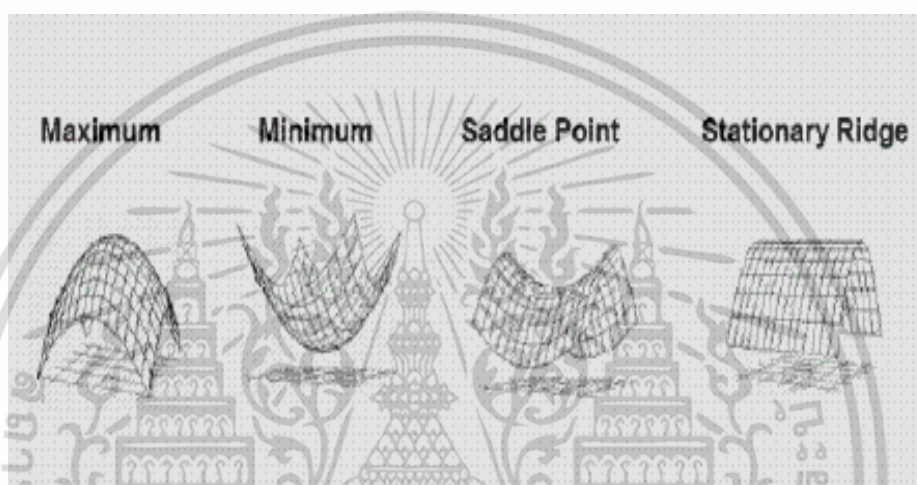
(ข) The response surface plot

รูปที่ 2.26 ตัวอย่างกราฟโครงร่าง (contour plot) (ก) และกราฟพื้นผิว (surface plot) (ข)

ที่มา : Montgomery (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 2.26 จะเห็นได้ว่าที่จุดศูนย์กลางวงกลมของกราฟโครงสร้างเป็นตำแหน่งที่ให้ผลค่าตอบสนองสูงสุด โดยอ้างอิงแกนระดับปัจจัยของอุณหภูมิ 177.4 องศาฟาเรนไฮต์ และเวลาประมาณ 87.36 นาที แต่เมื่อพิจารณากราฟพื้นผิวพบว่าที่จุดเนินเขาสูงสุดจะให้ผลค่าตอบสนองสูงสุดที่ปริมาณผลได้ (yield) ร้อยละ 80.21 บนแกนตั้ง และระดับที่ส่งผลต่อค่าผลได้บนแกนนอนด้านข้าง คือ อุณหภูมิ และเวลา รูปที่ 2.27 แสดงรูปแบบของกราฟพื้นผิวที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ค่าสูงสุด (maximum) ค่าต่ำสุด (minimum) แบบอานม้า (saddle point) และแบบระดับปัจจัยหนึ่งคงที่ (stationary ridge) (อรัทัย, 2553)



รูปที่ 2.27 รูปแบบของกราฟพื้นผิวที่มีลักษณะเฉพาะ  
ที่มา : Montgomery (2001)

## 2.18 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.18.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลส

นันทิกา และคณะ (2554) ศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากขางข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด พบว่าหลังจากปรับสภาพขางข้าวฟ่างหวานด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก แล้วนำขางข้าวฟ่างหวานมาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ออกแบบการทดลองด้วยวิธี BBD พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 21.44 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนขางข้าวฟ่างหวานต่อกรดซัลฟิวริก 1:19.3 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72.34 นาที จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 34.97 กรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

อัปดุลลาตีฟ และ สินีนาฏ (2557) ศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกกล้วยด้วยสารละลาย น้ำส้มสายชู โดยทำการปรับสภาพเปลือกกล้วยด้วยสารละลายเกลือแกง (โซเดียมคลอไรด์) ในอัตราส่วนเกลือ 0.09 กิโลกรัมต่อเปลือกกล้วย 1 กิโลกรัม ต่อ น้ำ 3 ลิตร เพื่อขจัดยางกล้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำเปลือกกล้วยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายน้ำส้มสายชู และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซ์ด้วยวิธี RSM พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ปริมาณน้ำส้มสายชูร้อยละ 0.74 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์สูงถึง 7.043 กรัมต่อลิตร

Kim และคณะ (2012) ศึกษาการปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าหลังจากปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มเปล่าด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที สามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้ร้อยละ 90 และกำจัดลิกนินได้ร้อยละ 32 จากนั้นทำการปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มเปล่าโดยการแช่ไว้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถกำจัดลิกนินได้ร้อยละ 70 และยังพบว่าเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการปรับสภาพทั้ง 2 ขั้นตอนแล้วจะได้ปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 82 เหลือเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเพียงร้อยละ 1 และ 30 ตามลำดับ

Zhang และคณะ (2012) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการไฮโดรไลซ์ทะเลลายปาล์มเปล่าด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส พบว่าการใช้กรดซัลฟิวริกพร้อมกับกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นต่ำกว่าร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในการไฮโดรไลซ์ทะเลลายปาล์มเปล่าให้ผลได้น้ำตาลไซโลสสูงถึงร้อยละ 91.3 ภายใต้สภาวะไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนสารละลายกรดต่อทะเลลายปาล์มเปล่า 20 มิลลิลิตรต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

### 2.18.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลสเททริกโนเซลลูโลส

Cui และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลสเททริกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยเชื้อผสมของ *Lactobacillus rhamnosus* และ *Lactobacillus brevis* พบว่าการใช้เชื้อผสมทั้งสองสายพันธุ์นี้ในการหมักน้ำตาลที่ได้จากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของซังข้าวโพดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักโดยให้ผลได้กรดแลกติก 0.70 กรัมต่อกรัม ซึ่งให้ผลผลิตดีกว่าการหมักกรดแลกติกโดยเชื้อเดี่ยวของ *Lactobacillus rhamnosus* และ *Lactobacillus brevis* ที่ให้ผลผลิตกรดแลกติกเพียงร้อยละ 18.6 และ 29.6 ตามลำดับ

Nguyen และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลสเททริกโนเซลลูโลสที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 4.91 ที่อุณหภูมิ 122.68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที โดยเชื้อ *Lactobacillus paracasei* LA 104 และ *Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600 ออกแบบการทดลองแบบ CCD พบว่าการไฮโดรไลซ์เททริกโนเซลลูโลสภายใต้สภาวะนี้จะให้ผลได้น้ำตาลรีดิวิซ์สูงถึง 144 กรัมต่อลิตร และทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษเพียงเล็กน้อย คือ เฟอร์-

ฟิวรอล 0.79 กรัมต่อลิตร และไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอล 2.59 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการหมักกรดแลกติกโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยไม่ผ่านขั้นตอนการกำจัดสารพิษทำให้ได้ผลผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) 115.36 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 2.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ร้อยละ 64 อีกทั้งยังให้ผลผลิตกรดแลกติกชนิด D(-) 113.92 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 2.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ร้อยละ 63.29

Hu และคณะ (2016) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากซังข้าวโพด โดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* FL0421 พบว่าการหมักไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนซังข้าวโพดต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:5 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แบบกึ่งกะ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะให้ผลผลิตกรดแลกติก 92.30 กรัมต่อลิตร ผลได้กรดแลกติก 0.66 กรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิต 1.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Reddy และคณะ (2016) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมผลิตกลูโคส กากถั่วเหลืองที่ได้จากโรงงานผลิตเต้าหู้ และกากมอลต์ โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าเมื่อนำไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลืองและกากมอลต์ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหมักกรดแลกติก โดยมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังนี้ คือ ของเสียจากอุตสาหกรรมผลิตกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลือง 150 กรัมต่อลิตร ไฮโดรไลเสทกากมอลต์ 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากการทดลองที่สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตกรดแลกติกสูงสุด 95.6 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 42 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารพิษที่เกิดจากการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด พบว่ามีเพอร์ฟิวรอลและไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอลในไฮโดรไลเสทกากมอลต์เพียงเล็กน้อย 12.3 และ 75.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่พบในไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลือง และไม่พบกรดแอสติกในไฮโดรไลเสททั้งสองชนิด ส่วนสารประกอบฟีนอลิกพบในไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลืองและกากมอลต์เพียง 32.4 และ 135.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารพิษที่พบในไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลืองและกากมอลต์ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต และขัดขวางกระบวนการหมักกรดแลกติกของเชื้อจุลินทรีย์ เพราะมีความเข้มข้นต่ำ

### 2.18.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทลิกโนเซลลูโลส

Kumar และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทผักตบชวาที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร โดยเชื้อ *Pichia stipitis* พบว่าหลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำจัดสารพิษที่พบในไฮโดรไลเสทผักตบชวาด้วยวิธี Overliming ทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลไซโลส ร้อยละ 72.83 และหลังจากผ่านขั้นตอนการหมักน้ำตาลไซโลสจะให้ผลได้เอทานอล 0.425 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิต 0.176 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Singh และ Bishnoi (2013) ศึกษาวิธีการปรับสภาพผักตบชวาสำหรับผลิตเอทานอล โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* และเชื้อผสมทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ปรับสภาพผักตบชวาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนผักตบชวาต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* แล้วเข้าสู่กระบวนการหมัก ซึ่งให้ผลผลิตเอทานอล 4.3, 6.2 และ 9.8 กรัมต่อลิตร จากการหมักโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* และเชื้อผสมทั้ง 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ

Prasertwasu และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสทต้นหญ้าขจรจบดอกเล็ก (*Pennisetum polystachion*) โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 พบว่าเมื่อปรับสภาพต้นหญ้าขจรจบดอกเล็กด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อต้นหญ้า 15 มิลลิลิตรต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร อัตราส่วนกรดซัลฟิวริกต่อต้นหญ้า 15 มิลลิลิตรต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการกำจัดสารพิษโดยวิธี Overliming ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 10 ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงถึง 16 กรัมต่อลิตร หลังจากหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์การวิจัย

##### 3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กรวยแก้ว

กระดาษกรอง whatman filter paper NO.1

กระดาษไขเคลือบซิลิโคน บริษัท Aro, Thailand

กระบอกตวง (cylinder) บริษัท Pyrex, Germany

กระดาษวัดค่าความเป็นกรดต่าง บริษัท Darmstadt, Germany

กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) รุ่น EVO<sup>®</sup> HD บริษัท Carl Zeiss, Germany

ขวดดูแรน (laboratory bottle) บริษัท Lab valley, Thailand

ขวดปรับปริมาตร (volumn metric flask) บริษัท Schott, West Germany

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) บริษัท Pyrex, Germany

คิวเวต (cuvette) บริษัท Starna, Australia

เครื่องกลั่นระเหยสารสูญญากาศ (rotary evaporator) บริษัท Heidolph, Germany

เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) บริษัท Barnstead-Thermolyne, USA

เครื่องเขย่า (shaker) บริษัท Gallenkamp

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น LIBROR EB-40000 H บริษัท SHIMADZU, Japan

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น Adventurer บริษัท OHAUS, USA

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) บริษัท Hirayama, Japan

เครื่องบด บริษัท Shel lab, USA

เครื่องบด รุ่น SK100 บริษัท Retsh, Germany

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องผสมสารละลาย (vortex) บริษัท VELP scientific, Italy

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-2800A บริษัท Unico, USA

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Helios Gamma, Germany

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น Model 215 บริษัท Denver Instrument

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น C-R7 Ae plus

บริษัท SHIMADZU, Japan

จานเพาะเชื้อ (petri dish) บริษัท Lab valley, Thailand

จุกยาง

ชุดกรองสุญญากาศ บริษัท Pyrex, Germany

ซ็อนตักสาร

ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack)

ตะแกรงร่อน บริษัท Laboratory test sieve, UK

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) รุ่น BVT 123 บริษัท ISSCO

ตู้ดูดควัน (hood)

ตู้อบเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท Gallenkamp

ตู้อบอุณหภูมิสูง บริษัท Catabolite furnaces, UK

ตู้อบอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท SANYO

ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บริษัท Contherm Scientifica,  
New Zealand

ตู้อบลมร้อน 105 องศาเซลเซียส รุ่น ED 53 บริษัท Contherm Scientifica,  
New Zealand

ตู้อบ 180 องศาเซลเซียส รุ่น Design series oven บริษัท Contherm Scientifica,  
New Zealand

เตาแก๊ส รุ่น Dual burners IG 623 บริษัท Imarflex, Thailand

ถังหมักขนาด 5 ลิตร (fermentor) รุ่น BIOSTAT® B Single, Germany

โถดูดความชื้น (desiccator) บริษัท Brand, Western-Germany

แท่งแก้ว

ปิกเกอร์ (beaker) บริษัท Pyrex, Germany

ปรอทวัดอุณหภูมิ บริษัท R.O.C, Taiwan

ปิเปต (pipette) บริษัท Precicolor, Germany

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) บริษัท Lab valley, Thailand

ลูกยาง (dropper bulb) บริษัท Gammaco, Thailand

หลอดทดลอง (test tube) บริษัท Pyrex, Germany

หลอดหยด (dropper) บริษัท Lab valley, Thailand

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Becthai, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.2 สารเคมี

กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 98 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) บริษัท JT-Baker, China  
 กรดฟอสฟอริกเข้มข้นร้อยละ 85 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )  
 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)  
 กลูโคส ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) บริษัท Univa, Australia  
 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) บริษัท Carlo Erba, Italy  
 โซเดียมซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) บริษัท Univa, Australia  
 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) บริษัท Univa, Australia  
 โซเดียมอะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )  
 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Univa, Australia  
 ดีเอ็นเอส (3,5-Dinitrosalicylic acid; ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ )) บริษัท Sigma, USA  
 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) บริษัท Sigma-Aldrich, USA  
 ไตรแอมโมเนียมอะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COONH}_3$ )  
 เนื้อสกัด (meat extract)  
 เปปโตน (peptone)  
 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) บริษัท Univa, Australia  
 ฟีนอล ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ) บริษัท PS Panreac, E.U.  
 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )  
 แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )  
 ยีสต์สกัด (yeast extract)  
 วุ้น (agar)  
 เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95  
 Tween 80

## 3.2 วัตถุดิบ

ขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่นำมาศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณสมจิตร วิเศษศรี และโรงงานแปรรูปไม้ยางพารา อ.เมือง จ.ระยอง

### 3.2.1 การเตรียมและเก็บรักษาวัตถุดิบ

การเตรียมวัตถุดิบทำโดยนำขี้เลื่อยไม้ยางพารามาอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 500 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่มีขนาดน้อยกว่า 500 ไมโครเมตร (น้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร) (กาญจนา และคณะ, 2557) ไว้ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาใช้ และทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของขี้เลื่อยไม้ยางพารา ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยวิธี Forage Fiber Analysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Goering และ Van Soest, 1970) (ภาคผนวก ข) ทำการวิเคราะห์ ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พร้อมทั้งวิเคราะห์สัณฐานรายละเอียดลักษณะพื้นผิวของซีลีออยไมยางพาราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) (EVO<sup>®</sup> HD, Carl Zeiss, Germany) ณ วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการข้อมูล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 390 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

#### 3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 390 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 2 สัปดาห์ (จงกมล, 2550)

#### 3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 390 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 หลบ ลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างอาหารเหลวที่บ่มไว้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Mussatto และคณะ, 2008) ปรับความขุ่นของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะได้เชื้อเริ่มต้นสำหรับใช้ในการหมักกรดแลกติก

### 3.4 อาหารสำหรับผลิตกรดแลกติก

เตรียมอาหารที่ใช้หมักกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตร 2,500 มิลลิลิตร (ร้อยละ 50) (Nancib และคณะ, 2001) โดยนำไฮโดรไลสเสทซีลีออยไมยางพาราที่เตรียมได้จากการไฮโดรไลส์ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกจากการศึกษาข้อที่ 3.6 มาเติมอีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร ไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.10 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 (ศิริประภา, 2550) จากนั้นนำอาหารมาเทลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่ง-ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที

### 3.5 การศึกษาการปรับสภาพซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ดัดแปลงจากวิธีของ Singh และ Bishnoi, 2013)

ศึกษาการปรับสภาพซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยนำซีเลื่อยไม้ยางพาราที่มีขนาดน้อยกว่า 500 ไมโครเมตร (น้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร) มาปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนซีเลื่อยไม้ยางพาราสู่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง นำสารละลายซีเลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนกากของแข็งออกจากของเหลว นำกากซีเลื่อยไม้ยางพารามาล้างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเท่ากับ 7 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำกากซีเลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพมาวิเคราะห์ผลการทดลอง ดังนี้

#### 3.5.1 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

- วิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยในซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยวิธี Forage Fiber Analysis (Goering และ Van Soest, 1970) (ภาคผนวก ข) ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วิเคราะห์สัณฐานรายละเอียดลักษณะพื้นผิวของซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) (EVO<sup>®</sup>HD, Carl Zeiss, Germany) (ภาคผนวก ข) ณ วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการข้อมูล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะพื้นผิวของซีเลื่อยไม้ยางพาราก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

### 3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยนำกากซีเลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพและให้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุดมาผสมกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเพื่อทำการย่อยในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (หุ้มปากฟลาสก์ 3 ชั้นด้วยจุกสำลี กระจดาช และอลูมิเนียมฟอยล์) ออกแบบการทดลองแบบ CCD โดยตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกร้อยละ 0.5, 1.0 และ 1.5 โดยปริมาตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราส่วนซีลี้อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก 1:5, 1:10 และ 1:15 กรัมต่อมิลลิลิตร และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสเท่ากับ 30, 60 และ 90 นาที นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่ง-ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Avci และคณะ, 2013) ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกส่วนกากของแข็งออกจากของเหลว และนำไฮโดรไลเสทซีลี้อยไม้ยางพาราส่วนของเหลวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์มาวิเคราะห์ผลการทดลอง ดังนี้

### 3.6.1 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (3,5-dinitrosalicylic acid method; DNS method) (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างตัวแปรที่ศึกษาทั้ง 3 ตัวแปร ในแต่ละการทดลอง เพื่อสร้างสมการถดถอยสำหรับทำนายปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วยโปรแกรม SPSS version 17
- วิเคราะห์ผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RSM โดยสร้างกราฟสามมิติ (3D surface) และกราฟเส้นโครงร่างพื้นผิวตอบสนอง (contour plot) ด้วยโปรแกรม STATISTICA 7
- ตรวจสอบและยืนยันผลการทำนายของแบบจำลองโดยแทนค่ารหัสของปัจจัย (coded value) ที่ได้จากกราฟพื้นผิวตอบสนองในสมการถดถอย เพื่อทำนายค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พร้อมทั้งทำการทดลองซ้ำอีกครั้งในระดับปัจจัยนั้น
- ทำการเปรียบเทียบผลโดยนำค่าที่ได้จากสมการทางคณิตศาสตร์มาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลี้อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี RSM จะมีการออกแบบในทุกสภาวะความเหมาะสมของแต่ละปัจจัย และมีการทำซ้ำที่จุดกลางของการทดลอง จากนั้นจึงกำหนดระดับของปัจจัยที่ศึกษา ซึ่งประกอบด้วยจุดมุม (factorial point) จุดขอบ (axial point) และจุดกึ่งกลาง (center point) โดยมีค่าตอบสนอง (response; Y) คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตัวแปรที่ศึกษามีจำนวน 3 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนซีลี้อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาในการไฮโดรไลซิส โดยแปรผันระดับของตัวแปรในแต่ละปัจจัยเป็น 5 ระดับ คือ ระดับสูงสุด ( $+\alpha$ ) ระดับสูง (+) ระดับกลาง (0) ระดับต่ำ (-) และระดับต่ำสุด ( $-\alpha$ ) สามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 20 การทดลอง ประกอบด้วย จุดกึ่งกลางจำนวน 6 จุด จุดขอบจำนวน 6 จุด และจุดมุมจำนวน 8 จุด ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และการออกแบบการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการออกแบบแผนการทดลองแบบ CCD สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (independent variable) คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ดังสมการ (3.1)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \dots\dots (3.1)$$

โดยที่

$Y$  = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

$X_1$  = ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)

$X_2$  = อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก (กรัมต่อมิลลิลิตร)

$X_3$  = เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส (นาที)

$\beta_0$  = ค่าคงที่

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$  = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficients)

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$  = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ interaction term

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$  = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ quadratic term

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับ สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก ตามแผนการทดลองแบบ CCD

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	รหัส (code factor)				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก	$X_1$	0.159	0.5	1.0	1.5	1.841
อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก	$X_2$	1.59	5	10	15	18.41
เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส	$X_3$	9.54	30	60	90	110.46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้-  
 ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์ โดยออกแบบการทดลอง  
 แบบ CCD

การทดลองที่ (treatment)	รหัสของปัจจัย (coded value)			ระดับของปัจจัย (actual value)		
	C (X <sub>1</sub> )	R (X <sub>2</sub> )	T (X <sub>3</sub> )	C (X <sub>1</sub> )	R (X <sub>2</sub> )	T (X <sub>3</sub> )
1	-1	-1	-1	0.5	5	30
2	-1	-1	+1	0.5	5	90
3	-1	+1	-1	0.5	15	30
4	-1	+1	+1	0.5	15	90
5	+1	-1	-1	1.5	5	30
6	+1	-1	+1	1.5	5	90
7	+1	+1	-1	1.5	15	30
8	+1	+1	+1	1.5	15	90
9	-1.682	0	0	0.159	10	60
10	+1.682	0	0	1.841	10	60
11	0	-1.682	0	1.0	1.59	60
12	0	+1.682	0	1.0	18.41	60
13	0	0	-1.682	1.0	10	9.54
14	0	0	+1.682	1.0	10	110.46
15	0	0	0	1.0	10	60
16	0	0	0	1.0	10	60
17	0	0	0	1.0	10	60
18	0	0	0	1.0	10	60
19	0	0	0	1.0	10	60
20	0	0	0	1.0	10	60

หมายเหตุ C = ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)

R = อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก (กรัมต่อมิลลิลิตร)

T = เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส (นาที)

การทดลองที่ 13 ใช้เวลาในการไฮโดรไลซิสจริงเท่ากับ 10 นาที

การทดลองที่ 14 ใช้เวลาในการไฮโดรไลซิสจริงเท่ากับ 110 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.7 การศึกษาการกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเซทซ์เลื่อยไม้ยางพาราด้วยวิธี Overliming (ดัดแปลงจากวิธีของ Nigam, 2002; Kumar และคณะ, 2009)

ศึกษาการกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเซทซ์เลื่อยไม้ยางพาราด้วยวิธี Overliming โดยนำส่วนเหลวใสของไฮโดรไลเซทซ์เลื่อยไม้ยางพาราที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลาย กรดฟอสฟอริกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มาให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อลดความเข้มข้นของสารประกอบที่ระเหยได้ จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นร้อนเพื่อ ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตรดังเดิม แล้วเติมโซเดียมซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) ปริมาณ 1 กรัม (ร้อยละ 0.1) เพื่อตกตะกอนไอออนของโลหะหนัก พร้อมกับเติมสารแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) เพื่อลดความเข้มข้นของกรดชนิดต่าง ๆ เช่น กรดแอสซิติค กรดฟอร์มิก และกรดลิวูลินิก เป็นต้น คนให้ เข้ากันจนกระทั่งค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเท่ากับ 10 จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง โดยใช้ suction pump แยกส่วนตะกอนทิ้ง ส่วนใสที่ได้จะนำไปปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ  $6.0 \pm 0.2$  ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล และนำของเหลวที่ได้ไปวิเคราะห์ผลการทดลอง ดังนี้

#### 3.7.1 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

➤ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (3,5-dinitrosalicylic acid method; DNS method) (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)

### 3.8 การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเซทซ์เลื่อย ไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร

ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเซทซ์เลื่อย ไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยนำไฮโดรไลเซทซ์เลื่อยไม้ยางพาราที่เตรียมได้จากการ ไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อที่ 3.6 ทั้งที่ ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษมาเติมสารอาหารต่าง ๆ ตามที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.4 แล้วปรับ ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 (ศิริประภา, 2550) จากนั้นนำอาหารสำหรับหมักกรดแลกติก ที่เตรียมไว้ปริมาตร 2,500 มิลลิลิตร (ร้อยละ 50) มาเทลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหิวเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ทำการ หมักในถังหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 6.5 กวนด้วยใบพัดที่ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที (อรทัย, 2553) ไม่พ่นอากาศ เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Pejin และคณะ, 2015) นำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์ผลการทดลอง ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.8.1 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

- วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี Standard Plate Count (SPC) (A.O.A.C.2000) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (3, 5-dinitrosalicylic acid method; DNS method) (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) ใช้คอลัมน์ Shim-pack Inertsil C8-3 (4.6x250 mm., 5  $\mu$ m; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) โดยมีกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (อรรถัย, 2553) (ภาคผนวก ข)
- คำนวณค่าจลนพลศาสตร์ของกรดแลกติก (ภาคผนวก ข)

ผลได้ (Yield;  $Y_{P/S}$ )

$$Y_{P/S} = \Delta_p / \Delta_s$$

กำหนดให้

$\Delta_p$

คือ

ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

$\Delta_s$

คือ

ปริมาณซับสเตรตที่ถูกใช้ไป

อัตราการผลิตของผลิตภัณฑ์ ( $Q_p$ )

$$Q_p = \Delta_p / t$$

กำหนดให้

$\Delta_p$

คือ

ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

t

คือ

เวลาที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์

- ทำการเปรียบเทียบผลการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อย่างพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

### 3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยหัวข้อ 3.5 วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิจัยหัวข้อ 3.6 วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ทำการทดลอง 3 ชั้น วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างตัวแปรที่ศึกษาโดยสร้างสมการถดถอย และสร้างกราฟ 3 มิติ โดยใช้โปรแกรม STATISTICA 7 เพื่อหาจุดสูงสุดของกราฟในการทำนายสถานะที่เหมาะสมต่อการทดลอง

การวิจัยหัวข้อ 3.8 วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ทำการทดลอง 3 ชั้น และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี T-test ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

# ผลการวิจัยและวิจารณ์

### 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของซีเลื่อยไม้ยางพารา

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของซีเลื่อยไม้ยางพาราก่อนการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยวิธี Forage Fiber Analysis (Goering และ Van Soest, 1970) พบว่ามีปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนินร้อยละ 51.80, 16.27 และ 16.55 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าซีเลื่อยไม้ยางพารามีความเหมาะสมที่จะนำไปเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ (Sonomoto และคณะ, 2011) เพราะประกอบด้วยลิกนินเซลลูโลสที่สามารถนำมาผ่านขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความพรุนของวัตถุดิบ (Kumar และคณะ, 2009; Zhang และคณะ, 2009; Behera และคณะ, 2014) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซ์เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งมีปริมาณมากให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลกลูโคส เป็นต้น และสามารถนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร

### 4.2 การปรับสภาพซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการศึกษาการปรับสภาพซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนซีเลื่อยไม้ยางพาราสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที กรองสารละลายซีเลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนกากของแข็งออกจากของเหลว นำกากซีเลื่อยไม้ยางพารามาล้างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำกากซีเลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Forage Fiber Analysis (Goering และ Van Soest, 1970) และวิเคราะห์สัณฐานรายละเอียดลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนซีเลื่อยไม้ยางพาราสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นสูงที่สุดร้อยละ 59.43 โดยน้ำหนักแห้ง คิดเป็นร้อยละ 15 ในขณะที่ปริมาณลิกนินลดลงมากที่สุดเหลือเพียงร้อยละ 10.24 โดยน้ำหนัก

แห้ง คิดเป็นร้อยละ 38 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เนื่องจากการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

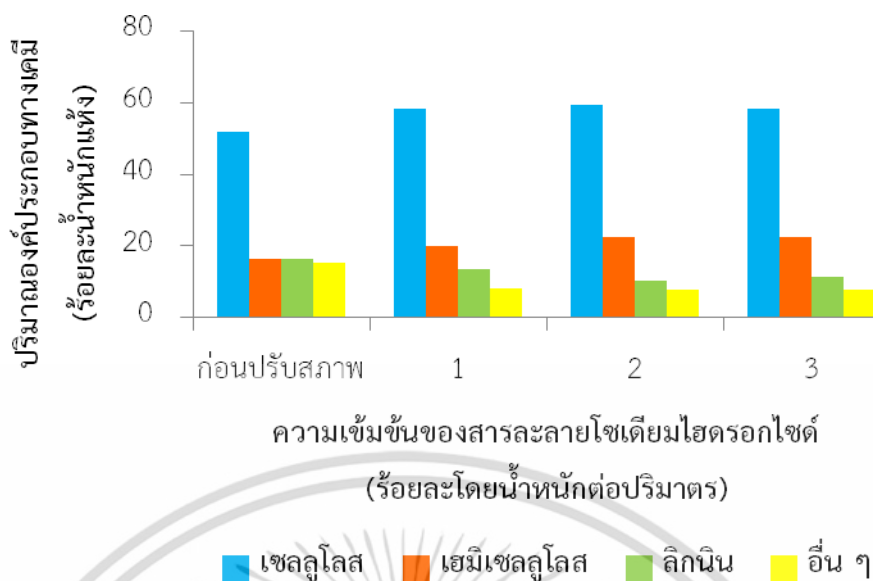
ในการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสจะทำให้เกิดการบวมน้ำและช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวภายใน ช่วยแยกโครงสร้างที่เชื่อมระหว่างลิกนินกับคาร์โบไฮเดรต ลดระดับการเกิดพอลิเมอร์ ลดความสามารถในการสร้างผลึก และกำจัดลิกนินโดยทำลายพันธะเอสเทอร์ (Kang และคณะ, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Singh และ Bishnoi (2013) ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพผักตบชวาสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอล พบว่าการปรับสภาพผักตบชวาศวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนผักตบชวาต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ช่วยให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นสูงสุดร้อยละ 32.4 โดยน้ำหนักแห้ง คิดเป็นร้อยละ 68 และกำจัดลิกนินได้มากที่สุดเหลือเพียงร้อยละ 2.1 โดยน้ำหนักแห้ง คิดเป็นร้อยละ 56

เมื่อนำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 พบว่าการปรับสภาพขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 58.25, 59.43 และ 58.31 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และลดปริมาณลิกนินเหลือเพียงร้อยละ 13.71, 10.24 และ 11.36 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 จึงสามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้มีความเหมาะสมต่อการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของขี้เลื่อยไม้ยางพาราก่อนและหลังปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

องค์ประกอบ (ร้อยละ น้ำหนักแห้ง)	ก่อนปรับสภาพ	ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)		
		1	2	3
เซลลูโลส	51.80±0.04 <sup>c</sup>	58.25±0.23 <sup>b</sup>	59.43±0.03 <sup>a</sup>	58.31±0.31 <sup>b</sup>
เฮมิเซลลูโลส	16.27±0.12 <sup>c</sup>	19.97±0.16 <sup>b</sup>	22.49±0.21 <sup>a</sup>	22.41±0.20 <sup>a</sup>
ลิกนิน	16.55±0.21 <sup>a</sup>	13.71±0.04 <sup>b</sup>	10.24±0.22 <sup>d</sup>	11.36±0.21 <sup>c</sup>
อื่น ๆ	15.38±0.12 <sup>a</sup>	8.07±0.04 <sup>b</sup>	7.84±0.15 <sup>b</sup>	7.92±0.14 <sup>b</sup>
หมายเหตุ	ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแถวเดียวกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



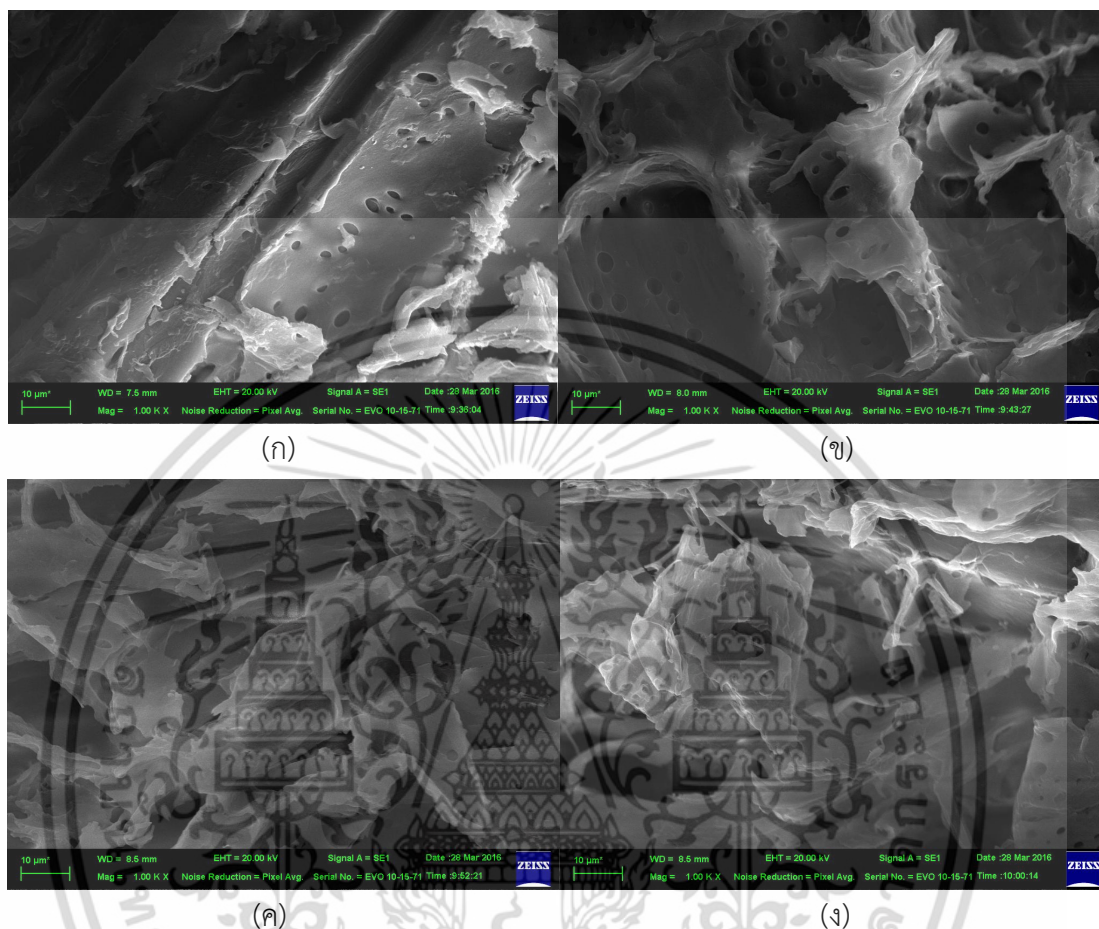
รูปที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของขี้เลื่อยไม้ยางพารา ก่อนและหลังการปรับสภาพ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ดังนั้น จึงเลือกกากขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ไปใช้ในกระบวนการไฮโดรไลซิส ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก เนื่องจากให้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุด

#### 4.3 สัณฐานรายละเอียดลักษณะพื้นผิวของกากขี้เลื่อยไม้ยางพารา

จากการศึกษาสัณฐานรายละเอียดลักษณะพื้นผิวของกากขี้เลื่อยไม้ยางพารา ก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยนำขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที กรองสารละลายขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนกากของแข็งออกจากของเหลว นำกากขี้เลื่อยไม้ยางพารา มาล้างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำกากขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพมาวิเคราะห์ สัณฐานรายละเอียดลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (EVO® HD,

Carl Zeiss, Germany) ณ วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการข้อมูล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า-  
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ลักษณะโครงสร้างและพื้นผิวทางกายภาพของกากซีลี้อยไม้ยางพารา

เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 1,000 เท่า

- (ก) กากซีลี้อยไม้ยางพาราก่อนปรับสภาพ
- (ข) กากซีลี้อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- (ค) กากซีลี้อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- (ง) กากซีลี้อยไม้ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

จากรูปที่ 4.2 (ก) จะเห็นว่าพื้นผิวของกากซีลี้อยไม้ยางพารามีลักษณะเรียบ มีโครงสร้างที่เรียงตัวอย่างซับซ้อนและแข็งแรง แต่เมื่อพิจารณารูปที่ 4.2 (ข), (ค) และ (ง) จะเห็นว่าพื้นผิวกากซีลี้อยไม้ยางพารามีลักษณะบวม เปื่อยยุ่ย และฉีกขาด โครงสร้างเริ่มจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ซึ่งสอดคล้องเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับการทดลองของ Ganguly และคณะ (2012) พบว่าการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้วัตถุดิบเกิดการบวม เพิ่มพื้นที่ผิวภายในทำให้โมเลกุลของน้ำเข้าไปทำลายพันธะระหว่างลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดผลึกของเซลลูโลสและทำลายโครงสร้างของลิกนินทำให้ลิกนินลดลง เนื่องจากลิกนินละลายในสารละลายต่าง ซึ่งการปรับสภาพด้วยต่างเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ (Binod และคณะ, 2010)

#### 4.4 สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื้อยไม่ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื้อยไม่ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี RSM โดยมีตัวแปรอิสระที่เลือกศึกษา 3 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก ( $X_1$ ) อัตราส่วนซีเลื้อยไม่ยางพาราสู่สารละลายกรดฟอสฟอริก ( $X_2$ ) และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส ( $X_3$ ) ซึ่งมีตัวแปรตามหรือค่าตอบสนอง (response;  $Y$ ) คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกร้อยละ 0.5, 1.0 และ 1.5 โดยปริมาตร อัตราส่วนซีเลื้อยไม่ยางพาราสู่สารละลายกรดฟอสฟอริก 1:5, 1:10 และ 1:15 กรัมต่อมิลลิลิตร และเวลาในการไฮโดรไลซิสเท่ากับ 30, 60 และ 90 นาที นำกากซีเลื้อยไม่ยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพและให้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุดมาทำการทดลองตามสภาวะที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ CCD ทั้ง 20 การทดลอง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกส่วนกากของแข็งออกจากของเหลว และนำไฮโดรไลเสทซีเลื้อยไม่ยางพาราส่วนของเหลวที่ผ่านการไฮโดรไลซิสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) (Miller, 1959) ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื้อย-ไม่ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD

การ ทดลอง ที่	รหัสของปัจจัย (coded value)			ระดับของปัจจัย (actual value)			ค่า ตอบสนอง
	C	R	T	C	R	T	ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์*
	(X <sub>1</sub> )	(X <sub>2</sub> )	(X <sub>3</sub> )	(X <sub>1</sub> )	(X <sub>2</sub> )	(X <sub>3</sub> )	
1	-1	-1	-1	0.5	5	30	3.06±0.09
2	-1	-1	+1	0.5	5	90	6.67±0.59
3	-1	+1	-1	0.5	15	30	2.06±0.02
4	-1	+1	+1	0.5	15	90	3.32±0.08
5	+1	-1	-1	1.5	5	30	4.72±0.09
6	+1	-1	+1	1.5	5	90	8.78±0.16
7	+1	+1	-1	1.5	15	30	2.42±0.04
8	+1	+1	+1	1.5	15	90	3.93±0.07
9	-1.682	0	0	0.159	10	60	2.32±0.03
10	+1.682	0	0	1.841	10	60	4.50±0.10
11	0	-1.682	0	1.0	1.59	60	8.80±0.06
12	0	+1.682	0	1.0	18.41	60	2.57±0.03
13	0	0	-1.682	1.0	10	9.54	1.86±0.06
14	0	0	+1.682	1.0	10	110.46	5.23±0.25
15	0	0	0	1.0	10	60	14.88±0.07
16	0	0	0	1.0	10	60	15.01±0.05
17	0	0	0	1.0	10	60	14.94±0.23
18	0	0	0	1.0	10	60	14.71±0.13
19	0	0	0	1.0	10	60	14.97±0.21
20	0	0	0	1.0	10	60	14.97±0.07

หมายเหตุ \* กรัมต่อลิตร

C = ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)

R = อัตราส่วนซีเลื้อยไม่ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก (กรัมต่อมิลลิลิตร)

T = เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส (นาที)

การทดลองที่ 13 ใช้เวลาในการไฮโดรไลซิสจริงเท่ากับ 10 นาที

การทดลองที่ 14 ใช้เวลาในการไฮโดรไลซิสจริงเท่ากับ 110 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมาะสมของแบบจำลอง

นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้และรหัสของปัจจัยที่ศึกษามาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 17 (statistics package for the social sciences) เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส โดยสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (regression linear) เพื่อทำนายค่าตอบสนองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยพิจารณาค่าความน่าจะเป็น หรือ p-value ของสัมประสิทธิ์แต่ละตัวแปร ซึ่งพจน์ที่มีความสำคัญต่อค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ต้องมีค่า  $p \leq 0.05$  ตัวแปรนั้นจึงจะปรากฏในสมการ และตัดตัวแปรที่ไม่มีความสำคัญออก (พิรุฬห์พร, 2552) ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยแต่ละตัวแปรจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสกากขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD แสดงดังตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.3** ค่าสัมประสิทธิ์สมการถดถอยแต่ละตัวแปรจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD

Factors	Code	Coefficients	Unstandardized coefficients		T value	P value
			$\beta$	Standard error		
Constant	Constant	$\beta_0$	14.886	0.130	114.322	0.000*
Conc	$X_1$	$\beta_1$	0.762	0.086	8.819	0.000*
Ratio	$X_2$	$\beta_2$	-1.608	0.086	-18.618	0.000*
Time	$X_3$	$\beta_3$	1.033	0.086	11.961	0.000*
Conc×Ratio	$X_1X_2$	$\beta_{12}$	-0.349	0.113	-3.093	0.003*
Conc×Time	$X_1X_3$	$\beta_{13}$	0.088	0.113	0.775	0.442
Ratio×Time	$X_2X_3$	$\beta_{23}$	-0.612	0.113	-5.426	0.000*
Conc <sup>2</sup>	$X_1^2$	$\beta_{11}$	-3.849	0.084	-45.768	0.000*
Ratio <sup>2</sup>	$X_2^2$	$\beta_{22}$	-3.092	0.084	-36.773	0.000*
Time <sup>2</sup>	$X_3^2$	$\beta_{33}$	-3.897	0.084	-46.350	0.000*

หมายเหตุ \* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.4.1.1 การสร้างสมการถดถอยและการวิเคราะห์นัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

##### (β<sub>i</sub>) ของตัวแบบจำลอง

การทดลอง full quadratic model สามารถสร้างสมการแบบการทดลองได้ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 \dots (4.1)$$

การสร้างสมการถดถอยเพื่ออธิบายความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับตัวแปรอิสระต่าง ๆ เพื่อทำนายค่าตอบสนอง (ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สามารถทำได้โดยนำค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β<sub>i</sub>) ของแต่ละตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 17 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ไปแทนค่าในสมการที่ (4.1) จะได้สมการถดถอยจากการทดลองตามสมการที่ (4.2) ดังนี้

$$Y = 14.886 + 0.762X_1 - 1.608X_2 + 1.033X_3 - 0.349X_1X_2 + 0.088X_1X_3 - 0.612X_2X_3 - 3.849X_1^2 - 3.092X_2^2 - 3.897X_3^2 \dots (4.2)$$

จากสมการที่ (4.2) เมื่อพิจารณาในส่วนของ Linear Terms พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงของตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสเท่ากับ 0.762, -1.608 และ 1.033 ตามลำดับ และมีค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.000, 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สามารถนำไปใช้ทำนายในสมการถดถอยได้

เมื่อพิจารณาในส่วนของ Interaction Terms พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกกับอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกกับเวลาในการไฮโดรไลซิส และอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกกับเวลาในการไฮโดรไลซิสเท่ากับ -0.349, 0.088 และ -0.612 ตามลำดับ และมีค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.003, 0.442 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกกับอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกกับเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สามารถนำไปใช้ทำนายในสมการถดถอยได้ แต่ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกกับเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) จึงไม่สามารถนำไปใช้ทำนายในสมการถดถอยได้

เมื่อพิจารณาในส่วนของ Quadratic Terms พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้งระหว่างตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) จึงไม่สามารถนำไปใช้ทำนายในสมการถดถอยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซีเลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาในการไฮโดรไลซิสเท่ากับ -3.849, -3.092 และ -3.897 ตามลำดับ และมีค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.000, 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) สามารถนำไปใช้ทำนายในสมการถดถอยได้

และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าความน่าจะเป็น (p-value) ของแต่ละตัวแปรที่มีอิทธิพลหรือความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษากับค่าตอบสนอง และตัดตัวแปรที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ครบทุกส่วนแล้วสามารถเขียนสมการถดถอยที่ใช้ในการทำนายสถานะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้ดังสมการที่ (4.3) ดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์} = 14.886 + 0.762X_1 - 1.608X_2 + 1.033X_3 - 0.349X_1X_2 - 0.612X_2X_3 - 3.849X_1^2 - 3.092X_2^2 - 3.897X_3^2 \dots (4.3)$$

กำหนดให้  $Y$  = ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์

$X_1$  = ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)

$X_2$  = อัตราส่วนซีเลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก (กรัมต่อมิลลิลิตร)

$X_3$  = เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส (นาที)

$\beta_0$  = ค่าคงที่

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$  = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficients)

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$  = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ interaction term

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$  = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ quadratic term

#### 4.4.1.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และนัยสำคัญของแบบจำลอง

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์การถดถอยของตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร และความสัมพัทธ์ระหว่างตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์ พบว่าทุกตัวแปรที่มีค่าความน่าจะเป็นที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) แสดงดังตารางที่ 4.4 ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนซีเลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสมีผลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์

**ตารางที่ 4.4** ผลการวิเคราะห์การถดถอยของตัวแปรอิสระ คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนซีลีเนียมอย่างพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาในการไฮโดรไลซิส ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่มีต่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลีเนียมอย่างพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F value	P value
Model	1631.662 <sup>a</sup>	13	125.512	4072.796	0.000*
X <sub>1</sub>	25.481	2	12.740	413.418	0.000*
X <sub>2</sub>	107.689	2	53.844	1747.211	0.000*
X <sub>3</sub>	48.053	2	24.027	779.651	0.000*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	2.926	1	2.926	94.947	0.000*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.184	1	0.184	5.963	0.019*
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	9.004	1	9.004	292.166	0.000*
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.000	0	-	-	-
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.000	0	-	-	-
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.000	0	-	-	-

หมายเหตุ \* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยและความแปรปรวน ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าค่าแจกแจงปกติ (F-value) ของแบบจำลองมีค่าเท่ากับ 587.821 ( $p \leq 0.05$ ) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับร้อยละ 99.1 และค่าปรับปรุงสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจหรือสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของแบบจำลอง (Adjusted  $R^2$ ) เท่ากับร้อยละ 98.9 แสดงถึง การเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามเมื่อได้รับอิทธิพลจากตัวแปรอิสระร้อยละ 98.9 (หากมีค่าใกล้เคียงร้อยละ 100 จะทำให้สมการถดถอยมีความเหมาะสมมากยิ่งขึ้นและควรมีค่ามากกว่าร้อยละ 75) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสมการถดถอยที่ได้นั้นมีความเหมาะสม แต่นิยมใช้ค่าปรับปรุงสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจมากกว่าค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจเป็นการประมาณที่เกินความเป็นจริง (goodness of fit) (มาริษา, 2549) และเมื่อทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลอง (Lack of fit) พบว่ามีค่าน่าจะเป็นเท่ากับ 0.506 ( $p > 0.05$ ) ดังนั้น แสดงว่าแบบจำลองการถดถอยที่ได้มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวแบบในการอธิบายผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลีเนียมอย่างพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

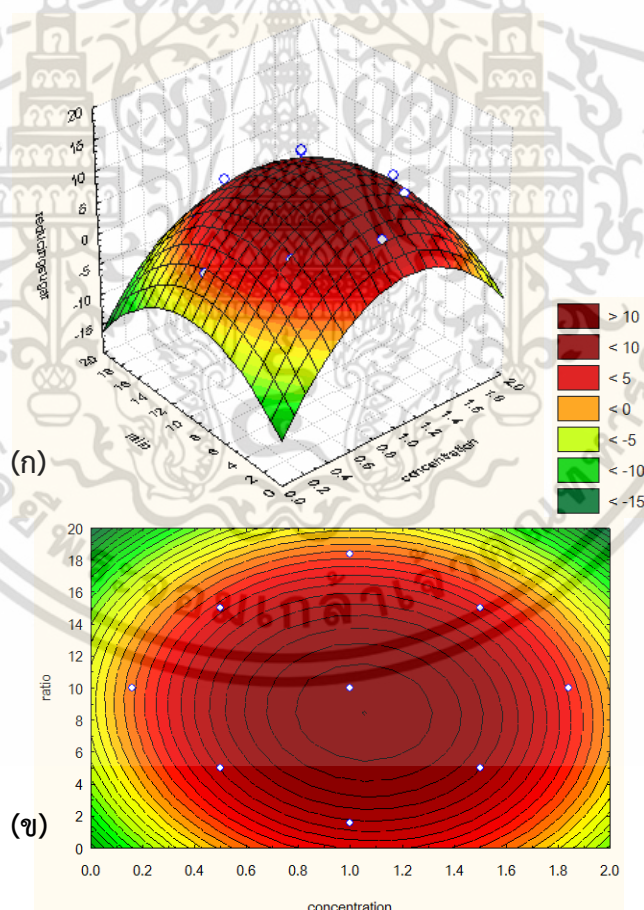
ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยที่ได้จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดร-ไลซิสซีลี้อยู่ไม่ยั้งพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F value	P value
Regression	1617.790	9	179.754	587.821	0.000 <sup>a</sup>
Residual	15.290	50	0.306		
Lack of fit	0.014	1	0.014	0.449	0.506

หมายเหตุ  $R^2 =$  ร้อยละ 99.1 และ Adjusted  $R^2 =$  ร้อยละ 98.9

#### 4.4.2 ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์อิทธิพลและความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สามารถทำได้โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองและระดับของตัวแปรอิสระที่ศึกษา มาสร้างกราฟ 3 มิติของพื้นผิวตอบสนองในรูปของกราฟพื้นผิว (3 มิติ) และกราฟโครงร่าง (2 มิติ) ด้วยโปรแกรม STATISTICA 7 ดังนี้

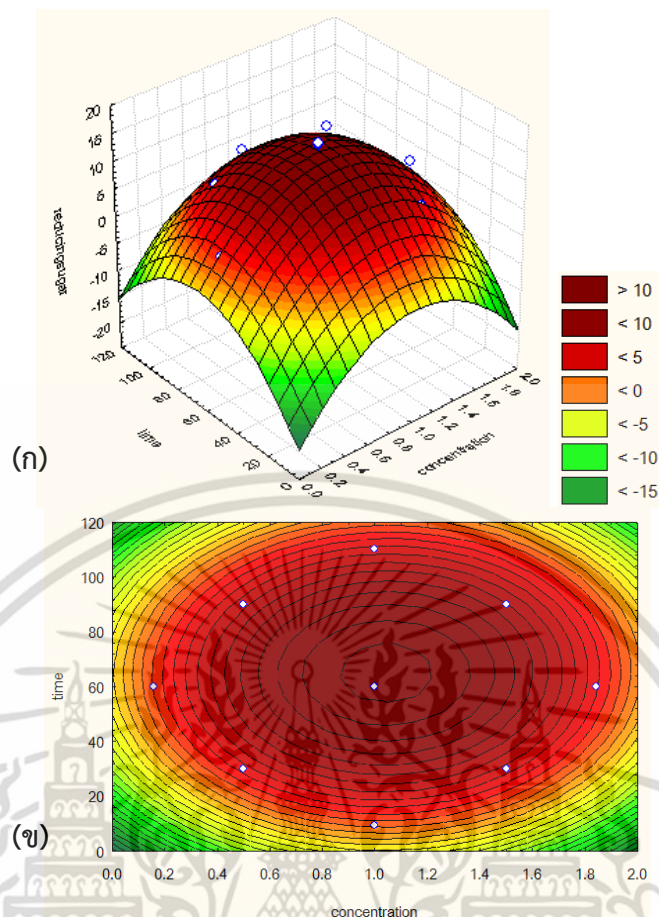


รูปที่ 4.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกกับอัตราส่วนซีลี้อยู่ไม่ยั้งพารา ต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์  
(ก) กราฟพื้นผิว 3 มิติ (ข) กราฟโครงร่าง 2 มิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 เป็นกราฟพื้นผิวตอบสนองแสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกกับอัตราส่วนซีลีเนียมยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งจุดสูงสุดของกราฟมีค่าเท่ากับร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร, 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 12.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากกราฟ (ก) และ (ข) จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นสารละลายกรดฟอสฟอริกมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด เช่น กรดฟอสฟอริก ซึ่งเป็นกรดอ่อนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและได้รับความนิยมสำหรับนำมาใช้เปลี่ยนชีวมวลเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาล โดยจะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส และละลายเซลลูโลสของวัตถุดิบเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล ซึ่งวิธีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดนี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และมีศักยภาพในการผลิตน้ำตาลสูง โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.5 ถึง 1.05 โดยปริมาตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกมากกว่าร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของกรดที่มากเกินไปจะไปทำลายโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์เกิดเป็นสารประกอบที่เป็นพิษ เช่น อนุพันธ์ฟูแรน เพอร์ฟิวรอล (ได้จากการสลายตัวของน้ำตาลเพนโทส) ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอล (ได้จากการสลายตัวของน้ำตาลเฮกซอส) และสารประกอบฟีนอลิก (นันทิกา และคณะ, 2554) โดยดึงโมเลกุลของไฮโดรเจนและออกซิเจนออกจากโมเลกุลของน้ำตาลจึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง (Boonmanumsin และคณะ, 2012) ซึ่งสารพิษเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตและการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นตอนกระบวนการหมักกรดแลกติก นอกจากนี้ การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเข้มข้นยังทำให้เกิดการกักกร่อนภาชนะจึงต้องใช้ภาชนะที่ทนต่อการกัดกร่อนของกรดซึ่งมีราคาแพง มีความเป็นพิษ และเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

การไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดฟอสฟอริกเจือจางมีข้อดีหลายประการ คือ มีความเป็นพิษและการกัดกร่อนต่ำ (López-Linares และคณะ, 2013) ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษในสภาวะกรดลดลง (Vasconcelos และคณะ, 2013) และกากที่เหลือจากการไฮโดรไลซิสสามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยสำหรับเพาะปลูก (Castro และคณะ, 2014) นอกจากนี้ เกลือโซเดียม-ฟอสเฟตที่ได้จากการปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็นกลางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ยังสามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารสำหรับกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ (Vasconcelos และคณะ, 2013) ทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Gámez และคณะ, 2006)

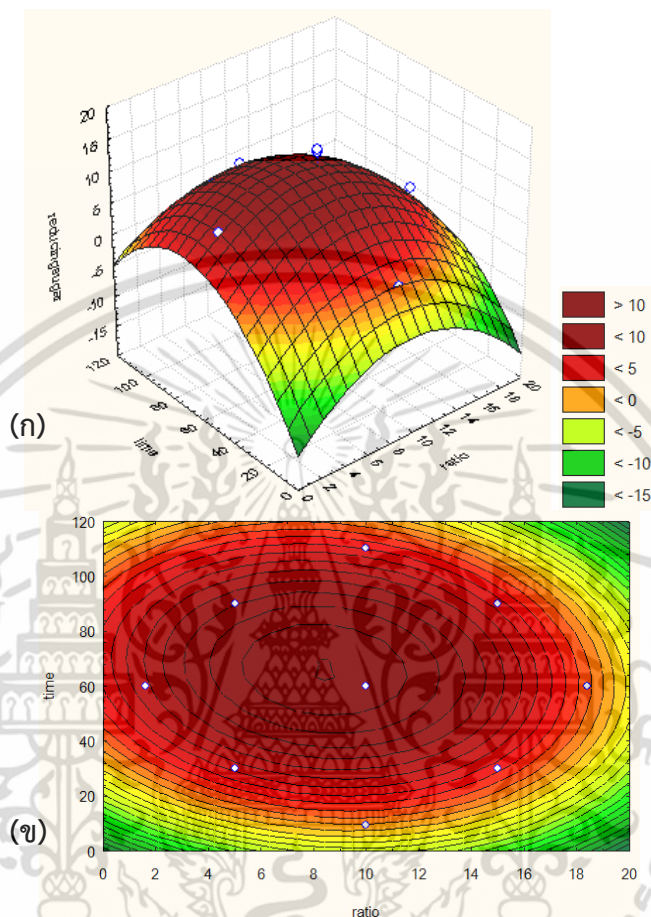


รูปที่ 4.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก  
กับเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์  
(ก) กราฟพื้นผิว 3 มิติ (ข) กราฟโครงร่าง 2 มิติ

รูปที่ 4.4 เป็นกราฟพื้นผิวตอบสนองแสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกกับเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งจุดสูงสุดของกราฟมีค่าเท่ากับร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร, 63.16 นาที และ 12.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากกราฟ (ก) และ (ข) จะเห็นได้ว่าเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายได้เป็นน้ำตาลเพนโทสในสภาวะที่เป็นกรดได้ง่ายกว่าเซลลูโลส ดังนั้น เมื่อเพิ่มเวลาในการไฮโดรไลซิสจาก 30 ถึง 65 นาที ส่งผลให้เซลลูโลสถูกย่อยสลายได้เป็นน้ำตาลเฮกโซสทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้น (Wang และคณะ, 2010) แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการไฮโดรไลซิสมากกว่า 65 นาที จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เพราะน้ำตาลรีดิวซ์เกิดการสลายตัวไปเป็นสารประกอบที่เป็นพิษ คือ เฟอร์ฟิวรอล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล โดยปริมาณของสารประกอบดังกล่าวจะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการไฮโดรไลซิส (Demirbas, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bujang และคณะ (2013) ศึกษาผลของการไฮโดรไลซิสกากมะพร้าวด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางต่อคุณสมบัติทางเคมีและอนุภาพ พบว่าการไฮโดรไลซิสกากมะพร้าวด้วยสารละลายกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการไฮโดรไลซิสมากกว่า 60 นาที จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง



รูปที่ 4.5 อิทธิพลของอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดซัลฟิวริก กับเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์  
(ก) กราฟพื้นผิว 3 มิติ (ข) กราฟโครงร่าง 2 มิติ

รูปที่ 4.5 เป็นกราฟพื้นผิวตอบสนองแสดงอิทธิพลของอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดซัลฟิวริกกับเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งจุดสูงสุดของกราฟมีค่าเท่ากับ 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร, 63.16 นาที และ 12.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากกราฟ (ก) และ (ข) จะเห็นได้ว่าอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดซัลฟิวริกมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยพบว่าเมื่ออัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดซัลฟิวริกเพิ่มขึ้นจาก 1:5 ถึง 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดซัลฟิวริกมากกว่า 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Boonmanumsin และคณะ (2012) ศึกษาการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลรีดิวซ์จากหญ้าไม้กวาด (*Miscanthus sinensis*) โดยวิธีการปรับสภาพด้วยแอมโมเนียและกรดฟอสฟอริกกับการใช้ไมโครเวฟ พบว่าการปรับสภาพหญ้าไม้กวาดด้วยแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนหญ้าไม้กวาดต่อแอมโมเนียเท่ากับ 1:15 ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 2.9 กรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนหญ้าไม้กวาดต่อแอมโมเนียเป็น 1:30 ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองและระดับของตัวแปรอิสระที่ศึกษามาสร้างกราฟ 3 มิติของพื้นผิวตอบสนองในรูปของกราฟพื้นผิวและกราฟโครงร่างแล้วจึงนำค่าตัวแปรทั้ง 3 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสที่ได้จากจุดสูงสุดของกราฟตามรูปที่ 4.3, 4.4 และ 4.5 ซึ่งทำนายค่า (predict value) ด้วยโปรแกรม STATISTICA 7 มาคำนวณค่ารหัสของปัจจัย (coded value) จากนั้นนำค่ารหัสที่ได้ไปแทนค่าในสมการถดถอยสมการที่ (4.3) เพื่อทำนายค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทำนายปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยตัวแปรจำเพาะต่าง ๆ ซึ่งได้จากกราฟพื้นผิวตอบสนอง

การทดลองที่	ระดับของปัจจัย (actual value)			รหัสของปัจจัย (coded value)			ค่าตอบสนอง
	C (X <sub>1</sub> )	R (X <sub>2</sub> )	T (X <sub>3</sub> )	C (X <sub>1</sub> )	R (X <sub>2</sub> )	T (X <sub>3</sub> )	
1	0.84	1:8.42	63.16	-0.320	-0.316	0.105	14.50
2	0.95	1:8.42	63.16	-0.100	-0.316	0.105	15.05
3	1.05	1:8.42	63.16	0.100	-0.316	0.105	15.22
4	1.16	1:8.42	63.16	0.320	-0.316	0.105	15.06

หมายเหตุ \* กรัมต่อลิตร

C = ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)

R = อัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก (กรัมต่อมิลลิลิตร)

T = เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส (นาที)

การทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 ใช้เวลาในการไฮโดรไลซิสจริงเท่ากับ 63 นาที

#### 4.4.3 ผลการตรวจสอบและยืนยันสถานะที่เหมาะสมจากแบบจำลอง

จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื้อยไมยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี RSM พบว่าสถานะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร อัตราส่วนซีเลื้อยไมยางพาราสารละลายกรดฟอสฟอริกเท่ากับ 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร และเวลาในการไฮโดรไลซิส 63.16 นาที (ใช้เวลาในการไฮโดรไลซิสจริงเท่ากับ 63 นาที) จะสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 15.22 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการคำนวณตามสมการที่ (4.3) แต่เมื่อทำการทดลองตามสถานะเหมาะสมดังกล่าวเพื่อพิสูจน์ผลของการทำนายโดยแบบจำลองที่สร้างขึ้น พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 14.99 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองมีความใกล้เคียงกับแบบจำลอง โดยคำนวณค่าความคลาดเคลื่อนได้เท่ากับร้อยละ 1.51 ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ไม่ควรมากเกินร้อยละ 5 (นันทิกา และคณะ, 2554) ดังนั้น สรุปได้ว่าสมการตัวแบบจำลองนี้สามารถนำมาใช้ในการทำนายสถานะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื้อยไมยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเลือกนำสถานะนี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

#### 4.5 การกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเซตซีเลื้อยไมยางพาราด้วยวิธี Overliming

การไฮโดรไลเซตซีเลื้อยไมยางพาราด้วยกรดส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิก (ลิกนิน) และทำให้ผลผลิตน้ำตาลที่ได้ถูกดองน้ำออก (dehydration) เกิดเป็นผลผลิตพลอยได้ที่ยับยั้งกระบวนการหมัก (Talebnia และคณะ, 2010) โดยกลูโคสและไซโลสจะถูกย่อยสลายเป็นเฟอร์ฟูรอล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (5-HMF) ที่สามารถสลายตัวได้เป็นกรดฟอร์มิก และเมื่อไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลสลายตัวแล้วจะได้กรดลิวลินิก สำหรับลิกนินเมื่อเกิดการไฮโดรไลซ์แล้วจะได้สารประกอบฟีนอลิกและกรดอื่น ๆ ซึ่งสารพิษเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ระหว่างทำการหมัก โดยจะยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีน ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ ดังนั้น ก่อนการหมักจึงต้องผ่านการกำจัดสารพิษโดยการต้มและปรับค่าความเป็นกรดต่าง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเซตซีเลื้อยไมยางพาราตามวิธีการของ Kumar และคณะ (2009) โดยนำไฮโดรไลเซตส่วนของเหลวที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร อัตราส่วนซีเลื้อยไมยางพาราสารละลายกรดฟอสฟอริก 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เวลาในการไฮโดรไลซิส 63 นาที ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มาให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อลดความเข้มข้นของสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น เฟอร์ฟูรอลและฟีนอล จะระเหยไประหว่างการต้ม จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นร้อนเพื่อปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตรดังเดิม แล้วเติมโซเดียมซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) ปริมาณ 1 กรัม (ร้อยละ 0.1) เพื่อตกตะกอนไอออนของโลหะหนัก

พร้อมกับเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) คนให้เข้ากันจนกระทั่งค่าความเป็นกรดต่างของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเท่ากับ 10 ซึ่งการปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะช่วยลดความเข้มข้นของสารพิษที่เป็นกรด เช่น กรดแอสติก และกรดแทนนิค เป็นต้น นอกจากนี้การปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 10 จะทำให้สารพิษพวกโลหะหนัก เช่น โครเมียม นิกเกิล และทองแดงเกิดการตกตะกอนได้ดีอีกด้วย จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้ suction pump แยกส่วนตะกอนทิ้ง ส่วนใสที่ได้จะนำไปปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ  $6.0 \pm 0.2$  ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 นอร์มอล นำของเหลวใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) (Miller, 1959)

จากการศึกษาการกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลสที่เลี้ยงไมยารพารา พบว่าไฮโดรไลสที่เลี้ยงของเหลวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร อัตราส่วนที่เลี้ยงไมยารพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเท่ากับ 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร และเวลาในการไฮโดรไลซิส 63 นาที นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ก่อนกำจัดความเป็นพิษมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 14.32 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากกำจัดความเป็นพิษพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 12.38 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากกำจัดความเป็นพิษลดลงร้อยละ 13.55 ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ganguly และคณะ (2012) พบว่าการกำจัดสารพิษโดยการปรับสภาพด้วยด่างมีข้อเสีย คือ ทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของน้ำตาลส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลลดลง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2009) ที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของไฮโดรไลสผักตบชวาเพื่อผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Pichia stipitis* ซึ่งพบว่าไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 3.0 หลังจากกำจัดความเป็นพิษมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงร้อยละ 10

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลสที่เลี้ยงไมยารพาราที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร อัตราส่วนที่เลี้ยงไมยารพาราต่อกรดฟอสฟอริก 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 63 นาที ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ไฮโดรไลสที่เลี้ยงไมยารพารา	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
ก่อนกำจัดความเป็นพิษ	14.32±0.10
หลังกำจัดความเป็นพิษ	12.38±0.13

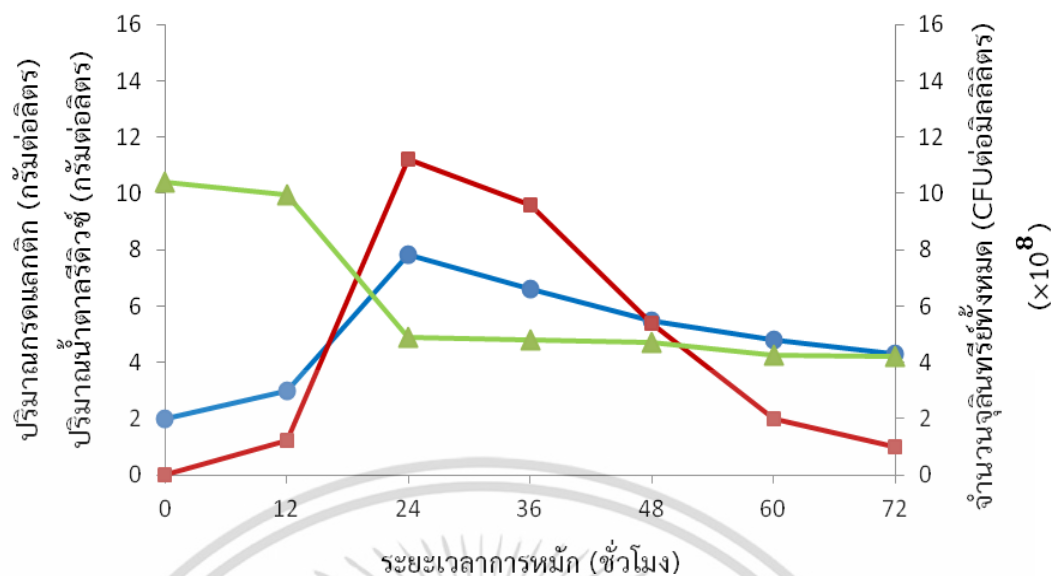
#### 4.6 การผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลื้อยไมยงพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 หมักในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลื้อยไมยงพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming ปริมาตร 2,500 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เติมหิวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 กวนด้วยใบพัดที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที (อรทัย, 2553) ไม่พ่นอากาศ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Pejin และคณะ, 2015) นำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี Standard Plate Count (SPC) (A.O.A.C.2000) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) (Miller, 1959) และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Shim-pack Inertsil C8-3 (4.6×250 mm., 5 µm; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) โดยมีกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (อรทัย, 2553) พร้อมทั้งคำนวณค่าจลนพลศาสตร์ของกรดแลกติก ได้แก่ ผลได้ (Yield;  $Y_{P/S}$ ) และอัตราการ-ผลิตของผลิตภัณฑ์ ( $Q_p$ ) แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.8 รูปที่ 4.6 4.7 และ 4.8 ดังนี้

**ตารางที่ 4.8** ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติก ผลได้ อัตราการผลิต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ และ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลื้อยไมยงพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

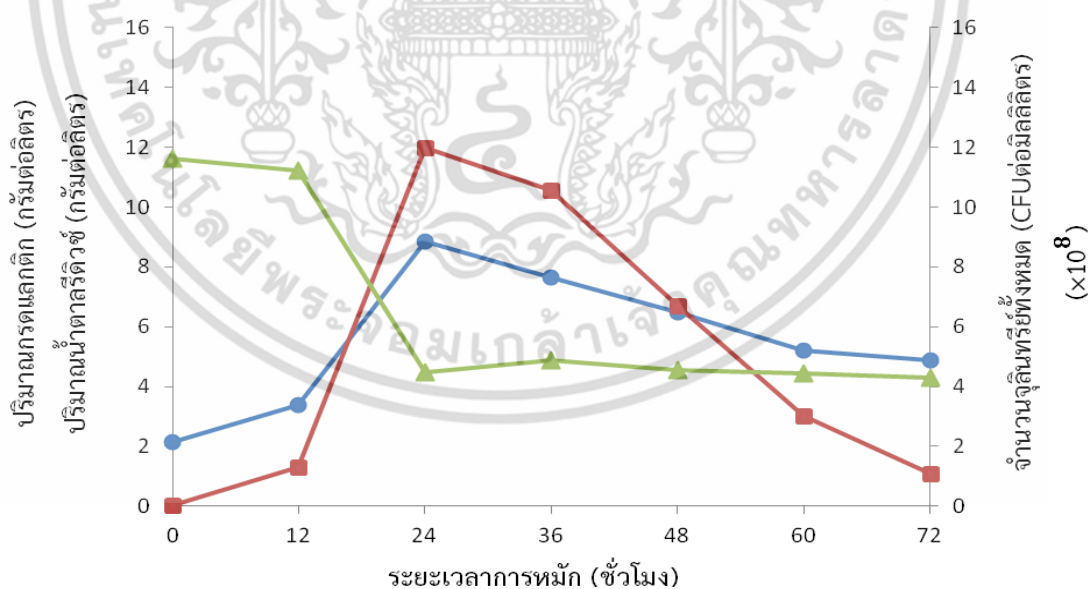
สถานะการผลิตกรดแลกติก	ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้กรดแลกติก (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิตกรดแลกติก (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (ร้อยละ)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อมิลลิลิตร)
กำจัดความเป็นพิษ	24	7.82±0.29	1.06±0.06	0.243±0.01	53.13±0.82	1.1×10 <sup>9</sup> ±0.62×10 <sup>8</sup>
ไม่กำจัดความเป็นพิษ	24	8.85±0.21	0.94±0.03	0.280±0.01	61.38±1.37	1.2×10 <sup>9</sup> ±0.62×10 <sup>8</sup>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



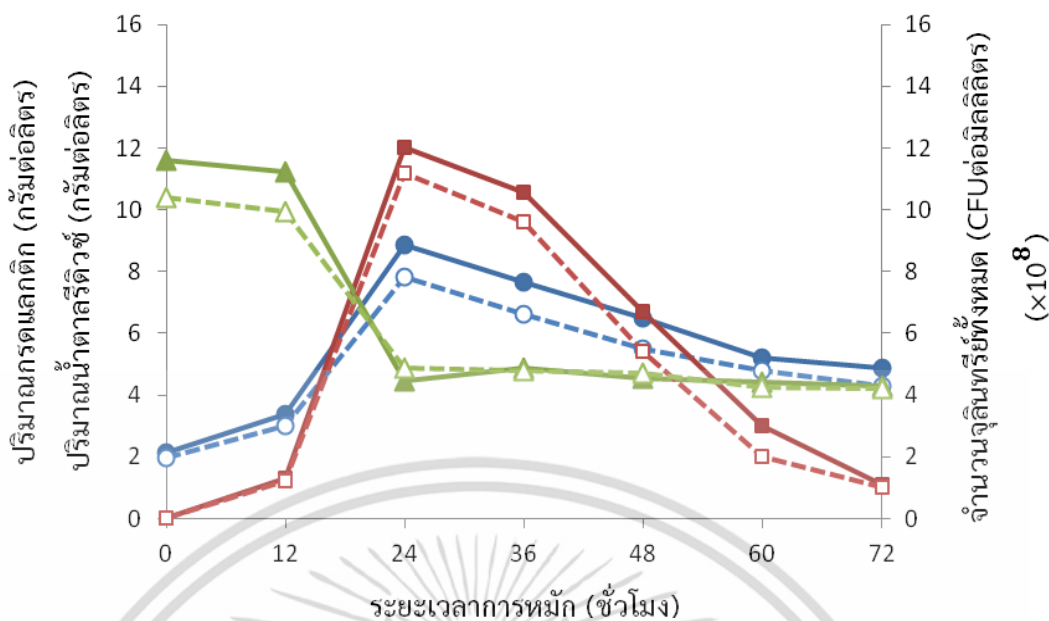
● กรดแลกติก ▲ น้ำตาลรีดิวซ์ ■ เซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390

รูปที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อยู่ไม่ยั้งพาราที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



● กรดแลกติก ▲ น้ำตาลรีดิวซ์ ■ เซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390

รูปที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อยู่ไม่ยั้งพาราที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลื้อยไม่ย่างพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากตารางที่ 4.8 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลื้อยไม่ย่างพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าผลผลิตกรดแลกติกที่ได้จากการหมักในอาหารไฮโดรไลเสทซีลื้อยไม่ย่างพาราที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษสูงกว่าการหมักในอาหารไฮโดรไลเสทซีลื้อยไม่ย่างพาราที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 8.85 และ 7.82 กรัมต่อลิตร ผลได้กรดแลกติก 0.94 และ 1.06 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตกรดแลกติก 0.280 และ 0.243 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด  $1.2 \times 10^9$  และ  $1.1 \times 10^9$  CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.9

**ตารางที่ 4.9** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่างการผลิตกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซี่เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
<b>(lactic)</b>	Equal variances assumed	.200	.678	-4.983	4	.008
	Equal variances not assumed			-4.983	3.645	.010
<b>(yield)</b>	Equal variances assumed	.795	.423	3.222	4	.032
	Equal variances not assumed			3.222	3.091	.047
<b>(productivity)</b>	Equal variances assumed	.160	.710	-4.272	4	.013
	Equal variances not assumed			-4.272	3.709	.015
<b>(reducing sugar)</b>	Equal variances assumed	1.407	.301	-8.938	4	.001
	Equal variances not assumed			-8.938	3.279	.002
<b>(cell)</b>	Equal variances assumed	.000	1.000	-1.569	4	.192
	Equal variances not assumed			-1.569	4.000	.192

จากตารางที่ 4.9 เมื่อพิจารณาผลการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างการผลิตกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซี่เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะเห็นได้ว่าปริมาณกรดแลคติกสูงสุดที่ผลิตได้จากการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซี่เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษเท่ากับ 7.82 และ 8.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 24 เมื่อวิเคราะห์ค่า F-test ซึ่งเป็นการทดสอบว่าความแปรปรวนของข้อมูลผลการทดลอง 2 กลุ่มเท่ากันหรือไม่ ผลการวิเคราะห์ได้ค่าความน่าจะเป็น (p-value) เท่ากับ 0.678 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของปริมาณกรดแลคติกทั้ง 2 ค่าเท่ากัน (equal variances assumed) และเมื่อวิเคราะห์ค่า T-test โดยดูปริมาณกรดแลคติกส่วนของ Equal variances assumed พบว่าค่า t เท่ากับ -4.983 และค่าความน่าจะเป็น (2-tailed) เท่ากับ 0.008 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จาก

อาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อย่างพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เมื่อพิจารณาผลได้กรดแลกติก จากการวิเคราะห์ค่า F-test ได้ค่าความน่าจะเป็น (p-value) เท่ากับ 0.423 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของผลได้กรดแลกติกทั้ง 2 ค่าเท่ากัน และเมื่อวิเคราะห์ค่า T-test พบว่าค่า t เท่ากับ 3.222 และค่าความน่าจะเป็น (2-tailed) เท่ากับ 0.032 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าผลได้กรดแลกติกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดแลกติก จากการวิเคราะห์ค่า F-test ได้ค่าความน่าจะเป็น (p-value) เท่ากับ 0.710 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของอัตราการผลิตกรดแลกติกทั้ง 2 ค่าเท่ากัน และเมื่อวิเคราะห์ค่า T-test พบว่าค่า t เท่ากับ -4.272 และค่าความน่าจะเป็น (2-tailed) เท่ากับ 0.013 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ จากการวิเคราะห์ค่า F-test ได้ค่าความน่าจะเป็น (p-value) เท่ากับ 0.301 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ทั้ง 2 ค่าเท่ากัน และเมื่อวิเคราะห์ค่า T-test พบว่าค่า t เท่ากับ -8.938 และค่าความน่าจะเป็น (2-tailed) เท่ากับ 0.001 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จากการวิเคราะห์ค่า F-test ได้ค่าความน่าจะเป็น (p-value) เท่ากับ 1.000 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดทั้ง 2 ค่าเท่ากัน และเมื่อวิเคราะห์ค่า T-test พบว่าค่า t เท่ากับ -1.569 และค่าความน่าจะเป็น (2-tailed) เท่ากับ 0.192 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อย่างพาราที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming ให้ปริมาณกรดแลกติก อัตราการผลิตกรดแลกติก และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำกว่าการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ เนื่องจากไฮโดรไลเสทซีลี้อย่างพาราที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยกว่าในไฮโดรไลเสทซีลี้อย่างพาราที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ ซึ่งอาจจะเกิดจากโครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลรีดิวซ์ถูกทำลายด้วยด่าง (แคลเซียมไฮดรอกไซด์) ภายใต้อุณหภูมิสูงในขั้นตอนการกำจัดความเป็นพิษ (Kumar และคณะ, 2009; Ganguly และคณะ, 2012) นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและดำเนินการหมักกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อย่างพาราทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษได้เหมือนกัน อาจเป็นเพราะไฮโดรไลเสทซีลี้อย่างพาราที่นำมาใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งผ่านขั้นตอนการไฮโดรไลซ์ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร อัตราส่วนซีลี้อย่างพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 63 นาที ให้ความร้อนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ไม่ทำให้เกิดสารพิษที่ยับยั้งการเจริญเติบโตและขัดขวางกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ หรือเกิดในปริมาณต่ำจึงไม่กระทบต่อการหมัก (Mussatto และคณะ, 2012; Ye และคณะ, 2014) นอกจากนี้ เกลือโซเดียมฟอสเฟตที่ได้จากการปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็นกลางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ยังสามารถใช้เป็นสารอาหารสำหรับกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Vasconcelos และคณะ, 2013) ทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Gómez และคณะ, 2006)

ซึ่งพบว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Reddy และคณะ (2016) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมผลิตกลูโคส กากถั่วเหลืองที่ได้จากโรงงานผลิตเต้าหู้ และกากมอลต์ โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าเมื่อนำกากถั่วเหลืองและกากมอลต์มาผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองแยกไฮโดรไลเสทส่วนเหลวใสแล้วนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหมักกรดแลกติก โดยมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังนี้ คือ ของเสียจากอุตสาหกรรมผลิตกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลือง 150 กรัมต่อลิตร ไฮโดรไลเสทกากมอลต์ 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที จากการทดลองที่สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 95.6 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 42 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารพิษที่เกิดจากการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและขัดขวางกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจพบในไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลืองและกากมอลต์ พบว่ามีเฟอร์ฟิวรอลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอลในไฮโดรไลเสทกากมอลต์เพียง 12.3 และ 75.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่พบในไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลือง และไม่พบกรดแอสติกในไฮโดรไลเสททั้งสองชนิด ส่วนสารประกอบฟีนอลิกพบในไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลืองและกากมอลต์เพียง 32.4 และ 135.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารพิษที่พบในไฮโดรไลเสทกากถั่วเหลืองและกากมอลต์ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญและขัดขวางกระบวนการหมักกรดแลกติกของเชื้อจุลินทรีย์ เพราะมีความเข้มข้นต่ำ

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของซีลี้อยไม้ยางพารา ก่อนการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยวิธี Forage Fiber Analysis พบว่ามีปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนินร้อยละ 51.80, 16.27 และ 16.55 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

เมื่อศึกษาการปรับสภาพซีลี้อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนซีลี้อยไม้ยางพาราต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นสูงสุดร้อยละ 59.43 โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ปริมาณลิกนินลดลงมากที่สุดเหลือเพียงร้อยละ 10.24 โดยน้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาสัณฐานรายละเอียดลักษณะพื้นผิวของกากซีลี้อยไม้ยางพารา ก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (EVO<sup>®</sup> HD, Carl Zeiss, Germany) จะเห็นได้ว่าพื้นผิวของกากซีลี้อยไม้ยางพารา ก่อนปรับสภาพมีลักษณะเรียบ มีโครงสร้างที่เรียงตัวอย่างซับซ้อนและแข็งแรง และพบว่าพื้นผิวของกากซีลี้อยไม้ยางพารา หลังการปรับสภาพมีลักษณะบวม เปื่อยยุ่ย และฉีกขาด โครงสร้างเริ่มจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีลี้อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกสำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี RSM พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟอสฟอริกร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร อัตราส่วนซีลี้อยไม้ยางพาราต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเท่ากับ 1:8.42 กรัมต่อมิลลิลิตร และเวลาในการไฮโดรไลซิส 63 นาที สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 14.99 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสทซีลี้อยไม้ยางพาราด้วยวิธี Overliming พบว่าไฮโดรไลเสทส่วนของเหลวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ CCD ก่อนกำจัดความเป็นพิษมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 14.32 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากกำจัดความเป็นพิษพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 12.38 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังกำจัดความเป็นพิษลดลงร้อยละ 13.55

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลี้อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการหมักในอาหารไฮโดรไลเสทซีเลื่อยไม้ยางพาราที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษสูงกว่าการหมักในอาหารไฮโดรไลเสทซีเลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 8.85 และ 7.82 กรัมต่อลิตร ผลได้กรดแลกติก 0.94 และ 1.06 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตกรดแลกติก 0.280 และ 0.243 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด  $1.2 \times 10^9$  และ  $1.1 \times 10^9$  CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าซีเลื่อยไม้ยางพาราซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพารา (sawn timber) สามารถนำมาเพิ่มมูลค่าโดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในขั้นตอนการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์ และควรรำกรดแลกติกที่ผลิตได้มาทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ พร้อมทั้งศึกษาผลกระทบจากสารพิษที่เกิดจากการไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดที่อาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในขั้นตอนการเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติก เพื่อลดต้นทุนการผลิตกรดแลกติกเชิงพาณิชย์ ได้แก่ การประยุกต์ใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกเพื่อป้องกันตัวเซลล์จากน้ำหมัก ทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้

## บรรณานุกรม

- กรมป่าไม้. 2543. รายงานการสำรวจสภาพพื้นที่ปลูกยาง กิจกรรมกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ไม้ยางพาราที่จังหวัดระยอง สงขลา ภาคเหนือ และการตลาดไม้ยางพาราของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กาญจนา คมกิจ, กานต์ธิดา วรเดชากุล และนรินทิพย์ สีคำพา. 2557. “กระบวนการไฮโดรไลซิสวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ดนางฟ้าและเห็ดขอนขาวด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์.” โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จกมล จริยกุล. 2550. “การผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชลลดา ศิริเสตสุวรรณ. 2551. “การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ติยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์. 2549. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ *Lactococcus lactis* IO-1 โดยวิธี Taguchi.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นันทิกา คล้ายชม, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และอนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. 2554. “การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากขางข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด.” วิศวกรรมสาร มก. 24: 91-102.
- พิรุฬห์พร ศรีมงคล. 2552. “การคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเซลล์ูเลสและไซลานเนส.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 2557. โครงการพัฒนาความร่วมมือด้านอุตสาหกรรมกับประเทศเพื่อนบ้าน. กรุงเทพฯ: ศูนย์ศึกษาการค้าระหว่างประเทศ คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.
- มานะชัย สังข์วาทิน. 2550. คู่มือการทำสวนยางพารา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์
- มาริษา ไชยโอสถ. 2549. “การสกัดเพคตินจากของเหลือทิ้งของขนุน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ระวีวรรณ แก้วเกล้า. 2537. “การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2558. “กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส.” วารสารวิชาการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2(1): 143-157.
- วรพงษ์ สุริยภัทร. 2535. **เยื่อใยในอาหารสัตว์**. เอกสารประกอบการสอน. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- ศิริประภา มั่นตรง. 2550. “การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ศูนย์ส่งเสริมพลังงานชีวมวล. 2549. **ชีวมวล (Biomass)**. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมพลังงานชีวมวล.
- สมใจ ศิริโชค. 2544. **จุลชีวอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. 2552. **อุตสาหกรรมไบโอพลาสติก**. สุขใจ ชูจันทร์. 2554. **การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดาทิพย์ จันทร, พิชามณชู แดงพราหม และสุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2556. “อิทธิพลของชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1.” วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 36(1): 73-84.
- สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. “การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล.” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(5): 641-649.
- อรทัย วิไลวัลย์. 2553. “การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) เพื่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อัจฉรา เพิ่ม. 2549. **แบคทีเรียแลคติก**. กรุงเทพฯ: ภาพพิมพ์.
- อัจฉราภรณ์ จงมีสุข. 2558. “การปรับสภาพผักตบชวาและการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตไบโอเอทานอล.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อับดุลลาตีฟ ดอรรอแม และสินินาฏ จงคง. 2557. “การผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์จากเปลือกกล้วยด้วยสารละลายน้ำส้มสายชู.” วิศวกรรมลาดกระบัง ปีที่ 31. 1: 31-36.
- เอกชัย พลภักษ์อำไพ. 2547. **คู่มืออย่างพารา**. กรุงเทพฯ: เทพพิทักษ์.
- A.O.A.C. 2000. **Official Method of Analysis of A.O.A.C. International**. 17<sup>th</sup> edition. A.O.A.C. International : USA.
- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. 2011. “Lactic Acid Production from Lignocellulose-Derived Sugars Using Lactic Acid Bacteria: Overview and Limits.” **Journal of Biotechnology**. 156: 286-301.
- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. 2013. “Recent Advances in Lactic Acid Production by Microbial Fermentation Processes.” **Biotechnology Advances**. 31: 877-902.
- Adnan, A.F.M. and Tan, I.K.P. 2007. “Isolation of Lactic Acid Bacteria from Malaysian Foods and Assessment of the Isolates for Industrial Potential.” **Bioresource Technology**. 98: 1380-1385.
- Adsul, M., Khire, J., Bastawde, K. and Gokhale, D. 2007. “Production of Lactic Acid from Cellobiose and Cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* Mutant Uc-3.” **Applied and Environmental Microbiology**. 73: 5055-5057.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D.B. 2011. “Biomass Pretreatment: Fundamentals toward Application.” **Biotechnology Advances**. 29:675-685.
- Ahring, B.K., Traverso, J.J., Murali, N. and Srinivas, K. 2016. “Continuous Fermentation of Clarified Corn Stover Hydrolysate for the Production of Lactic Acid at High Yield and Productivity.” **Biochemical Engineering Journal**. 109: 162-169.
- Akerberg, C. and Zacchi, G. 2000. “An Economic Evaluation of the Fermentative Production of Lactic Acid from Wheat Flour.” **Bioresouce Technology**. 75: 119-126.
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hagerdal, B., Liden, G. and Gorwa-Grauslund, M.F. 2007. “Increased Tolerance and Conversion of Inhibitors in Lignocellulosic Hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*.” **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 82: 340-349.
- Altaf, M., Naveena, B.J. and Reddy, G. 2005. “Screening of Inexpensive Nitrogen Source for Production of L(+) Lactic Acid from Starch by Amylopectin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Lactobacillus amylophilus* GV6 in Single Step Fermentation.” **Food Technology and Biotechnology**. 43(3): 235-239.

Altaf, M.D., Naveena, B.F., Venkateshwan, M., Kumar, E.V. and Reddy, G. 2006. “Single Step Fermentation of Starch to L(+) Lactic Acid by *Lactobacillus amylophilus* GV 6 in SSF Using Inexpensive Nitrogen Sources to Replace Peptone and Yeast Extract.” **Process Biochemistry**. 41: 465-472.

Alvira, P.E., Tomas, P., Ballesteros, M. and Nergro, M.J. 2010. “Pretreatment Technology for an Efficient Bioethanol Production Process based on Enzymatic Hydrolysis: a Review.” **Bioresource Technology**. 101: 4851-4861.

Arato, C., Pye, E.K. and Gjennestad, G. 2005. “The Lignol Approach to Biorefining of Woody Biomass to Produce Ethanol and Chemicals.” **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 123: 871-882.

Avci, A., Saha, B.C., Dien, B.S., Kennedy, G.J. and Cotta, M.A. 2013. “Response Surface Optimization of Corn Stover Pretreatment Using Dilute Phosphoric Acid for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Production.” **Bioresource Technology**. 130: 603-612.

Behera, S., Kumar, S., Arora, R. and Nandhagopal, N. 2014. “Importance of Chemical Pretreatment for Bioconversion of Lignocellulosic Biomass.” **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 36: 91-106.

Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R.K. and Pandey, A. 2010. “Bioethanol Production from Rice Straw.” **Bioresource Technology**. 101: 4767-4774.

Bjerre, A.B., Olesen, A.B. and Fernqvist, T. 1996. “Pretreatment of Wheat Straw Using Combined Wet Oxidation and Alkaline Hydrolysis Resulting in Convertible Cellulose and Hemicelluloses.” **Biotechnology and Bioengineering**. 49: 568-577.

Bondesson, P.M., Galbe, M. and Zacchi, G. 2013. “Ethanol and Biogas Production after Steam Pretreatment of Corn Stover with or without the Addition of Sulphuric Acid.” **Biotechnology for Biofuels**. 6: 11-18.

Boonmanumsin, P., Treeboobpha, S., Jeamjumnunja, K., Luengnaruemitchai, A., Chaisuwan, T. and Wongkasemjit, S. 2012. “Release of Monomeric Sugars from *Miscanthus sinensis* by Microwave-Assisted Ammonia and Phosphoric Acid Treatments.” **Bioresource Technology**. 103: 425-431.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Brandon, S.K., Eiteman, M.A., Patel, K., Richbourg, M.M., Miller, D.J. and Anderson, W.F. 2008. "Hydrolysis of Tifton 85 Bermudagrass in a Pressurized Batch Hot Water Reactor." **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 83: 505-512.
- Browing, B.L. 1963. **Method in wood chemistry**. New York: Interscience Publishers.
- Campos, F.M., Figueiredo, A.R., Hogg, T.A. and Couto, J.A. 2009. "Effect of Phenolic Acids on Glucose and Organic Acid Metabolism by Lactic Acid Bacteria from Wine." **Wine Microbiology**. 26: 409-414.
- Canilha, L., Carvalho, W., Felipe, M.G.A. and Silva, J.B.A. 2008. "Xylitol Production from Wheat Straw Hemicellulosic Hydrolysate: Hydrolysate Detoxification and Carbon Source Used for Inoculums Preparation." **Brazilian Journal of Microbiology**. 39: 333-336.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A. and Paz, I.C. 2010. "Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives." **Bioresource Technology**. 101: 4754-4766.
- Carvalho, F. and Duarte, L.C. 2008. "Hemicellulose Biorefineries: a Review on Biomass Pretreatments." **Journal of Scientific and Industrial Research**. 67: 849-864.
- Castillo Martínez, F.A., Marcos Balciunas, E., Salgado, J.M., Domínguez González, J.M., Converti, A. and Souza Oliveira, R.P. 2013. "Lactic Acid Properties, Applications and Production: a Review." **Trends in Food Science and Technology**. 30: 70-83.
- Castro, E., Nieves, I.U., Mullinnix, M.T., Sagues, W.J., Hoffman, R.W., Fernández-Sandoval, M.T., Tian, Z., Rockwood, D.L., Tamang, B. and Ingram, L.O. 2014. "Optimization of Dilute-Phosphoric-Acid Steam Pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for Biofuel Production." **Applied Energy**. 125: 76-83.
- Castro-Aguirre, E., Iñiguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X. and Auras, R. 2016. "Poly(Lactic Acid) – Mass Production, Processing, Industrial Applications, and End of Life." **Advanced Drug Delivery Reviews**. ARTICLE IN PRESS.
- Chandel, A.K., Chandrasekhar, G., Radhika, K., Ravinder, R. and Ravindra, P. 2011. "Bioconversion of Pentose Sugars into Ethanol: View and Future Directions." **Bioresource Technology**. 6: 8-20.

- Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A. and Kuhad, R.C. 2007. "Detoxification of Sugarcane Bagasse Hydrolysate Improves Ethanol Production by *Candida shehatae* NCIM 3501." **Bioresource Technology**. 98: 1947-1950.
- Chandel, A.K., Silva, S.S. and Singh, O.V. 2011. "Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production." 225-247. in Santos Bernardes, M.A. (Ed.). **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. InTech.
- Chen, Y., Li, X., Zhao, S., Chen, H., Zheng, X., Luo, J. and Liu, Y. 2015. "Efficient Production of Optically Pure L-Lactic Acid from Food Waste at Ambient Temperature by Regulating Key Enzyme Activity." **Water Research**. 70: 148-157.
- Cheng, J. 2009. **Biomass to renewable energy processes**. New York : Taylor and Francis Group.
- Chosdu, R., Hilmy, N., Erlinda, T.B. and Abbas, B. 1993. "Radiation and Chemical Pretreatment of Cellulosic Waste." **Radiation Physics and Chemistry**. 42: 695-698.
- Chundawat, S.P., Venkatesh, B. and Dale, B.E. 2007. "Effect of Particle Size Based Separation of Milled Corn Stover on AFEX Pretreatment and Enzymatic Digestibility." **Biotechnology and Bioengineering**. 96: 219-231.
- Condon, S. 1987. "Responses of Lactic Acid Bacteria to Oxygen." **FEMS Microbiology Review**. 46: 269-280.
- Cortez, D.V. and Roberto, I.C. 2010. "Individual and Interaction Effects of Vanillin and Syringaldehyde on the Xylitol Formation by *Candida guilliermondii*." **Bioresource Technology**. 101: 58-65.
- Cruz, J.M., Dominguez, J.M., Dominguez, H. and Parajo, J.C. 1999. "Solvent Extraction of Hemicellulose Wood Hydrolysates: a Procedure Useful for Obtaining Both Detoxified Fermentation Media and Polyphenols with Antioxidant Activity." **Food Chemistry**. 67: 147-153.
- Cui, F., Li, Y. and Wan, C. 2011. "Lactic Acid Production from Corn Stover Using Mixed Cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*." **Bioresource Technology**. 102: 1831-1836.
- Dailey, O.D., Dowd, M.K. and Mayorga, J.C. 2000. "Influences of Lactic Acid on the Solubilization of Protein during Steeping." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48: 1352-1357.

- Dashtban, M., Schraft, H. and Qin, W. 2009. "Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities and Perspectives." **International Journal of Biological Sciences**. 5: 578-595.
- Datta, R. and Henry, M. 2006. "Lactic Acid: Recent Advances in Products, Processes and Technologies - a Review." **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 81: 1119-1129.
- Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H. and Frank, J.R. 1995. "Technological and Economic Potential of Poly (Lactic Acid) and Lactic Acid Derivatives." **FEMS Microbiology Reviews**. 16: 221-231.
- Demirbas, A. 2008. "Products from Lignocellulosic Materials via Degradation Processes." **Energy Sources**. 30: 27-37.
- Dietz, D., Schneider, R., Papendiek, F. and Venus, J. 2016. "Leguminose Green Juice as an Efficient Nutrient for L(+)-Lactic Acid Production." **Journal of Biotechnology**. 236: 26-34.
- Ding, S.F. and Tan, T. 2006. "L-Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei* Fermentation Using Different Fed-Batch Feeding Strategies." **Process Biochemistry**. 58: 1451-1454.
- Djukić-Vuković, A., Mojović, L., Vukašinović-Sekulić, M., Rakin, M., Nikolić, S. and Pejin, J. 2012. "Effect of Different Fermentation Parameters on L-Lactic Acid Production from Liquid Distillery Stillage." **Food Chemistry**. 134: 1038-1043.
- Dobois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." **Analytical Chemistry**. 28(3): 350-356.
- Draper, N.R. 1988. "Plackett Burman Designs." **Encyclopedia of Statistical Sciences**, 6<sup>th</sup> ed., Wiley press. 356-385.
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. and Gokhale, D. 2008. "Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation." **Applied and Environmental Microbiology**. 74: 333-335.
- Eggeman, T. and Elander, R.T. 2005. "Process and Economic Analysis of Pretreatment Technologies." **Bioresource Technology**. 96: 2019-2025.
- Galbe, M. and Zacchi, G. 2002. "A Review of the Production of Ethanol from Softwood." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59: 618-628.

- Gámez, S., González-Cabriales, J.J., Ramírez, J.A., Garrote, G. and Vázquez, M. 2006. "Study of the Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse Using Phosphoric Acid." **Journal of Food Engineering**. 74: 78-88.
- Ganguly, A., Chatterjee, P.K. and Dey, A. 2012. "Studies on Ethanol Production from Water Hyacinth: a Review." **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 16: 966-972.
- Garcia-Cubero, M.T., Gonzalez-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M. and Bolado, S. 2009. "Effect of Ozonolysis Pretreatment on Enzymatic Digestibility of Wheat and Rye Straw." **Bioresource Technology**. 100: 1608-1613.
- Ge, X.Y., Qian, H. and Zhang, W.G. 2010. "Enhancement of L-Lactic Acid Production in *Lactobacillus casei* from Jerusalem Artichoke Tubers by Kinetic Optimization and Citrate Metabolism." **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 20: 101-109.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. and Bogel-Lukasik, R. 2010. "Hemicelluloses for Fuel Ethanol: a Review." **Bioresource Technology**. 101: 4775-4800.
- Girisuta, B., Dussan, K., Haverty, D., Leahy, J.J. and Hayes, M.H.B. 2013. "A Kinetic Study of Acid Catalysed Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse to Levulinic Acid." **Chemical Engineering Journal**. 217: 61-70.
- Givry, S., Prevot, V. and Duchiron, F. 2008. "Lactic Acid Production from Hemicellulosic Hydrolysate by Cells of *Lactobacillus bifementans* Immobilized in Ca-Alginate Using Response Surface Methodology." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24: 745-752.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. **Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Application)**. No. 379. Agricultural Handbook. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture.
- González, M.I., Álvarez, S., Riera, F.A. and Álvarez, R. 2006. "Purification of Lactic Acid from Fermentation Broths by Ion-Exchange Resins." **Industrial and Engineering Chemistry Research**. 45(9): 3243-3247.
- Gorsich, S.W., Dien, B.S., Nichols, N.N., Slininger, P.J., Liu, Z.L. and Skory, C.D. 2006. "Tolerance to Furfural-Induced Stress is Associated with Pentose Phosphate Pathway Genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 71: 339-349.

- Goshadrou, A., Karimi, K. and Taherzadeh, M.J. 2011. "Bioethanol Production from Sweet Sorghum Bagasse by *Mucor hiemalis*." **Industrial Crops and Products**. 34: 1219-1225.
- Grzenia, D.L. Schell, D.J. and Wickramasinghe, S.R. 2010. "Detoxification of Biomass Hydrolysates by Reactive Membrane Extraction." **Journal of Membrane Science**. 348: 6-12.
- Gullon, B., Yanez, R., Alonso, J.L. and Parajo, J.C. 2008. "L-Lactic Acid Production from Apple Pomace by Sequential Hydrolysis and Fermentation." **Bioresource Technology**. 99: 308-319.
- Guo, G.L., Chen, W.H., Men, L.C. and Hwang, W.S. 2008. "Characterization of Dilute Acid Pretreatment of Silvergrass for Ethanol Production." **Bioresource Technology**. 99: 6046-6053.
- Guo, W., Jia, W., Li, Y. and Chen, S. 2010. "Performances of *Lactobacillus brevis* for Producing Lactic Acid from Hydrolysate of Lignocellulosics." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 161: 124-136.
- Gupta, R. and Lee, Y.Y. 2010. "Investigation of Biomass Degradation Mechanism in Pretreatment of Switchgrass by Aqueous Ammonia and Sodium Hydroxide." **Bioresource Technology**. 101: 8185-8191.
- Hamelinck, C.N., Van Hooijdonk, G. and Faaij, A.P. 2005. "Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic Performance in Short, Middle, and Long Term." **Biomass and Bioenergy**. 28(4): 384-410.
- Harun, M.Y., Radiah, A.B.D., Abidin, Z.Z. and Yunus, R. 2011. "Effect of Physical Pretreatment on Dilute Acid Hydrolysis of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*)." **Bioresource Technology**. 102: 5193-5199.
- Hendriks, A. and Zeeman, G. 2009. "Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass." **Bioresource Technology**. 100: 10-18.
- Hetényi, K., Németh, Á. and Sevela, B. 2011. "Investigation and Modeling of Lactic Acid Fermentation on Wheat Starch via SSF, CHF and SHF Technology." **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**. 55: 11-16.
- Hofvendahl, K. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. "Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources." **Enzyme and Microbial Technology**. 26: 87-107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L. and Howard, S. 2003. "Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production." **African Journal of Biotechnology**. 2: 602-619.
- Hsu, T., Guo, G., Chen, W. and Hwang, W. 2010. "Effect of Dilute Acid Pretreatment of Rice Straw on Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis." **Bioresource Technology**. 101: 4907-4913.
- Hu, G., Heitmann, J.A. and Rajas, O.J. 2008. "Feedstock Pretreatment Strategies for Producing Ethanol from Wood, Bark and Forest Residues." **Bioresource Technology**. 3: 270-294.
- Hu, J., Lin, Y., Zhang, Z., Xiang, T., Mei, Y., Zhao, S., Liang, Y. and Peng, N. 2016. "High-Titer Lactic Acid Production by *Lactobacillus pentosus* FL0421 from Corn Stover Using Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation." **Bioresource Technology**. 214: 74-80.
- Huang, C.F., Jiang, Y.F., Guo, G.L. and Hwang, W.S. 2011. "Development of a Yeast Strain for Xylitol Production without Hydrolysate Detoxification as part of the Integration of Co-Product Generation within the Lignocellulosic Ethanol Process." **Bioresource Technology**. 102(3): 3322-3329.
- Idris, A. and Suzana, W. 2006. "Effect of Sodium Alginate Concentration, Bead Diameter, Initial pH and Temperature on Lactic Acid Production from Pineapple Waste Using Immobilized *Lactobacillus delbrueckii*." **Process Biochemistry**. 41: 1117-1123.
- Ilmen, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P. and Penttila, M. 2007. "Efficient Production of L-Lactic Acid from Xylose by *Pichia stipitis*." **Applied and Environmental Microbiology**. 73: 117-123.
- Iranmahboob, J., Nadim, F. and Monemi, S. 2002. "Optimizing Acid-Hydrolysis: a Critical Step for Production of Ethanol from Mixed Wood Chips." **Biomass and Bioenergy**. 22(5): 401-404.
- Irshad, M., Ghaffar, T., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N. and Mehmood, S. 2014. "Recent Trends in Lactic Acid Biotechnology: a Brief Review on Production to Purification." **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. 7: 222-229.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Isici, A., Himmelsbach, J.N., Pometto, A.L., Raman, D.R. and Anex, R.P. 2008. "Aqueous Ammonia Soaking of Switchgrass Followed by Simultaneous Saccharification and Fermentation." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 144: 69-77.
- Jedvert, K., Saltberg, A., Lindstrom, M.E. and Theliander, H. 2012. "Mild Steam Explosion and Chemical Pre-Treatment of Norway Spruce." **Bioresource Technology**. 7: 2051-2074.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cassava Bagasse for L-(+)-Lactic Acid Production Using *Lactobacilli*." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 134: 263-272.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. "Solid State Fermentation for L-Lactic Acid Production from Agro Wastes Using *Lactobacillus delbrueckii*." **Process Biochemistry**. 41: 759-763.
- Jung, Y.H., Kim, I.J., Kim, H.K. and Kim, K.H. 2013. "Dilute Acid Pretreatment of Lignocelluloses for Whole Slurry Ethanol Fermentation." **Bioresource Technology**. 132: 109-114.
- Kadam, S.R., Patil, S.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M. and Gokhale, D.V. 2006. "Strain Improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for Lactic Acid Production." **Process Biochemistry**. 41: 120-126.
- Kang, K., Rahman, M.A.A. and Tashiro, Y. 2011. "Lactic Acid Production from Lignocelluloses-Derived Sugars Using Lactic Acid Bacteria: Overview and Limits." **Journal of Biotechnology**. 156: 286-301.
- Kang, K.E., Jeong, G.T. and Park, D.H. 2012. "Pretreatment of Rapeseed Straw by Sodium Hydroxide." **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 35: 705-713.
- Kim, S., Park, J.M., Seo, J.W. and Kim, C.H. 2012. "Sequential Acid-/Alkali-Pretreatment of Empty Palm Fruit Bunch Fiber." **Bioresource Technology**. 109: 229-233.
- Kim, T.H. and Lee, Y.Y. 2005. "Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 121: 1119-1132.
- Kim, T.H., Taylor, F. and Hicks, K.B. 2008. "Bioethanol Production from Barley Hull Using SSA (Soaking in Aqueous Ammonia) Pretreatment." **Bioresource Technology**. 99: 5694-5702.
- Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N.S. and Ladisch, M.R. 2009. "Liquid Hot Water Pretreatment of Cellulosic Biomass." **Methods in Molecular Biology**. 581: 93-102.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kootstra, A.M.J., Beeftink, H.H., Scott, E.L. and Sanders, J.P.M. 2009. "Comparison of Dilute Mineral and Organic Acid Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw." **Biochemical Engineering Journal**. 46(2): 126-131.
- Kristiani, A., Abimanyu, H., Setiawan, A.H., Sudiarmanto. and Aulia, F. 2013. "Effect of Pretreatment Process by Using Diluted Acid to Characteristic of Oil Palm's Frond." **Energy procedia**. 32: 183-189.
- Kumar, A., Singh, L.K. and Ghosh, S. 2009. "Bioconversion of Lignocellulosic Fraction of Water-Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Hemicelluloses Acid Hydrolysate to Ethanol by *Pichia stipitis*." **Bioresource Technology**. 100: 3293-3297.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P. 2009. "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production." **Industrial and Engineering Chemistry Research**. 48: 3713-3729.
- Kumar, S., Singh, S.P., Mishra, I.M. and Adhikari, D.K. 2011. "Continuous Ethanol Production by *Kluyveromyces* sp. IPE453 Immobilized on Bagasse Chips in Packed Bed Reactor." **Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels**. 2(1): 1-6.
- Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V. and Laopaiboon, L. 2010. "Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse for Lactic Acid Production." **Bioresource Technology**. 101: 1036-1043.
- Lee, W.G., Lee, J.S., Shin, C.S., Park, S.C., Chang, H.N. and Chang, Y.K. 1999. "Ethanol Production Using Concentrated Oak Wood Hydrolysates and Methods to Detoxify." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 77-79: 547-559.
- Li, Z., Ding, S.F., Li, Z.P. and Tan, T.W. 2006. "L-Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei* Fermentation with Corn Steep Liquor-Supplemented Acid-Hydrolysate of Soybean Meal." **Biotechnology Journal**. 1: 1453-1458.
- Linde, M., Jakobsson, E.L., Galbe, M. and Zacchi, G. 2007. "Steam Pretreatment of Dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Impregnated Wheat Straw and SSF with Low Yeast and Enzyme Loadings for Bioethanol Production." **Biomass Bioenergy**. 32: 326-332.
- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P. and Gorsich, S.W. 2004. "Adaptive Response of Yeasts to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural and New Chemical Evidence for HMF Conversion to 2,5-bis-Hydroxymethylfuran." **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 31: 345-352.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- López-Linares, J.C., Cara, C., Moya, M., Ruiz, E., Castro, E. and Romero, I. 2013. "Fermentable Sugar Production from Rapeseed Straw by Dilute Phosphoric Acid Pretreatment." **Industrial Crops and Products**. 50: 525-531.
- Lu, Z.H., He, F., Shi, Y., Lu, M.B. and Yu, L.J. 2010. "Fermentative Production of L-(+)-Lactic Acid Using Hydrolysate a Corn Starch, Persimmon Juice and Wheat Bran Hydrolysate as Nutrients." **Bioresource Technology**. 101: 3642-3648.
- Mack, D.R. 2004. "D(-)-Lactic Acid-Producing Probiotics, D(-)-Lactic Acidosis and Infants." **Canadian Journal of Gastroenterology**. 18: 671-675.
- Makawi, S.Z.A., Taha, M.I., Zakaria, B.A., Siddig, B., Mahmud, H., Elhoussein, A.R.M. and Kariem, E.A.G. 2009. "Identification and Quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in Some Sugar-Containing Food Products by HPLC." **Pakistan Journal of Nutrition**. 8: 1391-1396.
- Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F. and Ingram, L.O. 2000. "Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> Treatments ("Overliming") on the Composition and Toxicity of Bagasse Hemicelluloses Hydrolysates." **Bioresource Technology**. 69: 526-536.
- Mckendry, P. 2002. "Energy production from biomass: overview of biomass." **Bioresource Technology**. 83: 37-43.
- McMillan, J.D. 1994. "Pretreatment of Lignocellulosic Biomass." In:Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.). "Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production." **American Chemical Society**. Washington, DC. 292-324.
- Miller, G.L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." **Analitical Chemistry**. 31: 426-428.
- Min, D.J., Choi, K.H., Chang, Y.K. and Kim, J.H. 2011. "Effect of Operating Parameters on Precipitation for Recovery of Lactic Acid from Calcium Lactate Fermentation Broth." **Korean Journal of Chemical Engineering**. 28(10): 1969-1974.
- Modig, T., Lidén, G. and Taherzadeh, M.J. 2002. "Inhibition Effects of Furfural on Alcohol Dehydrogenase, Aldehyde Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase." **Biochemical Journal**. 363: 769-776.
- Moldes, A.B., Torrado, A., Converti, A. and Dominguez, J.M. 2006. "Complete Bioconversion of Hemicellulosic Sugars from Agricultural Residues into Lactic Acid by *Lactobacillus pentosus*." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 135: 219-227.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Monavari, S., Gable, M. and Zacchi, G. 2009. "Impact of Impregnation Time and Chip Size on Sugar Yield in Pretreatment of Softwood for Ethanol Production." **Bioresource Technology**. 100: 6312-6316.
- Montgomery, D.C. 2001. "Experimental Design for Fitting Response Surfaces." **Design and Analysis of Experiments**, 5<sup>th</sup> ed., John Wiley and Son. 455-492.
- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M. and Ladisch, M.R. 2005. "Optimization of pH Controlled Liquid Hot Water Pretreatment of Corn Stover." **Bioresource Technology**. 96: 1986-1993.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. 2005. "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass." **Bioresource Technology**. 96: 673-686.
- Murnen, H.K., Balan, V., Chundawat, S.P., Bals, B., Sousa, L.C. and Dale, B.E. 2007. "Optimization of Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of *Miscanthus giganteus* to Fermentable Sugars." **Biotechnology Progress**. 23: 846-850.
- Mussatto, S.I. and Roberto, I.C. 2004. "Alternatives for Detoxification of Diluted-Acid Lignocellulosic Hydrolyzates for Use in Fermentative Processes: a Review." **Bioresource Technology**. 93: 1-10.
- Mussatto, S.I., Dragone, G. and Roberto, I.C. 2005. "Influence of the Toxic Compounds Present in Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate on Xylose-to-Xylitol Bioconversion by *Candida guilliermondii*." **Process Biochemistry**. 40: 3801-3806.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Mancilha, I.M. and Roberto, I.C. 2008. "Effects of Medium Supplementation and pH Control on Lactic Acid Production from Brewer's Spent Grain." **Biochemical Engineering Journal**. 40(3): 437-444.
- Mussatto, S.I., Machado, E.M.S., Carneiro, L.M. and Teixeira, J.A. 2012. "Sugars Metabolism and Ethanol Production by Different Yeast Strains from Coffee Industry Wastes Hydrolyzates." **Applied Energy**. 92: 763-768.
- Nakazawa, Y. and Hosono, A. 1992. **Functions of fermented milk**. Great Britain: University Press.
- Nancib, A., Nancib, N., Mezian, K., Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M. and Boudrant, J. 2005. "Joint Effect on Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*." **Bioresources Technology**. 96: 63-67.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. 2001. "The Effect of Supplementation by Different Nitrogen Sources on the Production of Lactic Acid from Date Juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*." **Bioresource Technology**. 78: 149-153.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. 2007. "The Effect of Supplementation by Different Nitrogen Sources on the Production of Lactic Acid from Date Juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*." **Bioresource Technology**. 78: 149-153.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. "L(+) Lactic Acid Fermentation and Its Product Polymerization." **Electronic Journal of Biotechnology**. 7(2): 167-179.
- Nguyen, C.M., Kim, J.S., Hwang, H.J., Park, M.S., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S. and Kim, J.C. 2012. "Production of L-Lactic Acid from a Green Microalga (*Hydrodictyon reticulum*) by *Lactobacillus paracasei* LA 104 Isolated from the Traditional Korean Food." **Bioresource Technology**. 110: 552-559.
- Nguyen, C.M., Nguyen, T.N., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Park, Y.J. and Kim, J.C. 2014. "Acid Hydrolysis of *Curcuma longa* Residue for Ethanol and Lactic Acid Fermentation." **Bioresource Technology**. 151: 227-235.
- Nigam, J.N. 2001. "Ethanol Production from Wheat Straw Hemicelluloses Hydrolysate by *Pichia stipitis*." **Journal of Biotechnology**. 87: 17-27.
- Nigam, J.N. 2002. "Bioconversion of Water-Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Hemicelluloses Acid Hydrolysate to Motor Fuel Ethanol by Xylose-Fermenting Yeast." **Journal of Biotechnology**. 97: 107-116.
- Nogueira, A., Guyot, S., Marnet, N., Lequere, J.M., Drilleau, J.F. and Wosiacki, G. 2008. "Effect of Alcoholic Fermentation in the Content of Phenolic Compounds in Cider Processing." **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 51: 1025-1032.
- Ogumbanwo, S.T. and Okanlawon, B.M. 2009. "Influence of Nutrients Utilization and Cultivation Condition on the Production of Lactic Acid by Homolactic Fermenters." **Biotechnology**. 8(1): 107-113.
- Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S. and Ryu, H.W. 2005. "Lactic Acid Production from Agricultural Resources as Cheap Raw Materials." **Bioresource Technology**. 96: 1492-1498.

- Ohkouchi, Y. and Inoue, Y. 2006. "Direct Production of L(+)Lactic Acid from Starch and Food Wastes Using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011." **Bioresource Technology**. 97: 1554-1562.
- Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, I., Gonzalez, A., Negro, M.J., Manzanares, P. and Ballesteros, M. 2003. "Effect of Lignocellulosic Degradation Compounds from Steam Explosion Pretreatment on Ethanol Fermentation by Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 105: 141-154.
- Oshiro, M., Shinto, H., Tashiro, Y., Miwa, N., Sekiguchi, T., Okamoto, M., Ishizaki, A. and Sonomoto, K. 2009. "Kinetic Modeling and Sensitivity Analysis of Xylose Metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1." **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 108: 376-384.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. 2000. "Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysate.II: Inhibitors and Mechanism of Inhibition: Review." **Bioresource Technology**. 74: 25-33.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. 2002. "Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates: Inhibition and Detoxification." **Bioresource Technology**. 74: 17-24.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. and Nigam, P. 2001. "Production of Organic Acids by Solid State." 127. in Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. **Asiatech Publishers**. New Delhi.
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Knill, C.J. and Kosseva, M.R. 2007. "Applicability of Pectate Entrapped *Lactobacillus casei* Cells for L(+) Lactic Acid Production from Whey." **Applied and Microbiology Biotechnology**. 74: 35-42.
- Parawira, W. and Tekere, M. 2011. "Biotechnological Strategies to Overcome Inhibitors in Lignocelluloses Hydrolysates for Ethanol Production: Review." **Critical Reviews in Biotechnology**. 31: 20-31.
- Park, N., Kim, H.Y., Koo, B.W., Yeo, H. and Choi, I.G. 2010. "Organosolv Pretreatment with Various Catalysts for Enhancing Enzymatic Hydrolysis of Pith Pine (*Pinus rigida*)." **Bioresource Technology**. 101: 7046-7053.

- Pasha, C., Kuhad, R.C. and Rao, L.V. 2007. "Strain Improvement of Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS<sub>3</sub> Strain for Better Utilization of Lignocellulosic Substrates." **Journal of Applied Microbiology**. 103: 1480-1489.
- Pejin, J., Radosavljević, M., Mojović, L., Kocić-Tanackov, S. and Djukić-Vuković, A. 2015. "The influence of Calcium-Carbonate and Yeast Extract Addition on Lactic Acid Fermentation of Brewer's Spent Grain Hydrolysate." **Food Research International**. 73: 31-37.
- Prakasham, R.S., Rao, R.S. and Hobbs, P.J. 2009. "Current Trends in Biotechnological Production of Xylitol and Future Prospects." **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**. 3: 8-36.
- Prasertwasu, S., Khumsupan, D., Komolwanich, T., Chaisuwan, T., Luengnaruemitchai, A. and Wongkasemjit, S. 2014. "Efficient Process for Ethanol Production from Thai Mission Grass (*Pennisetum polystachion*)." **Bioresource Technology**. 163: 152-159.
- Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H.C. 2007. "Ethanol as an Alternative Fuel from Agricultural, Industrial and Urban Residues." **Resource Conserve and Recycle**. 50: 1-39.
- Qin, J., Wang, X., Zheng, Z., Ma, C., Tang, H. and Xu, P. 2010. "Production of L-Lactic Acid by a Thermophilic *Bacillus* mutant Using Sodium Hydroxide as Neutralizing Agent." **Bioresource Technology**. 101: 7570-7576.
- Ranjan, R., Thust, S., Gounaris, C.E., Woo, M., Floudas, C.A., Keitz, M., Valentas, K.J., Wei, J. and Tsapatsis, M. 2009. "Adsorption of Fermentation Inhibitors from Lignocellulosic Biomass Hydrolysates for Improved Ethanol Yield and Value Added Product Recovery." **Microporous and Mesoporous Materials**. 122: 143-148.
- Redding, A.P., Wang, Z., Keshwani, D.R. and Cheng, J.J. 2011. "High Temperature Dilute Acid Pretreatment of Coastal Bermuda Grass for Enzymatic Hydrolysis." **Bioresource Technology**. 102: 1415-1424.
- Reddy, L.V., Kim, Y.M., Yun, J.S., Ryu, H.W. and Wee, Y.J. 2016. "L-Lactic Acid Production by Combined Utilization of Agricultural Bioresources as Renewable and Economical Substrates Through Batch and Repeated-Batch Fermentation of *Enterococcus faecalis* RYK1." **Bioresource Technology**. 209: 187-194.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rodrigues, R.C.L.B., Felipe, M.G.A., Almeida e Silva, J.B., Vitolo, M. and Villa, P.V. 2001. "The Influence of pH, Temperature and Hydrolysate Concentration on the Removal of Volatile and non-Volatile Compounds from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate Treated with Activated Charcoal before or after Vacuum Evaporation." **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 18: 299-311.
- Schmidt, A.S. and Thomsen, A.B. 1998. "Optimization of Wet Oxidation Pretreatment of Wheat Straw." **Bioresource Technology**. 64: 139-151.
- Senthuran, A., Senthuran, V., Kaul, R.H. and Mattiasson, B. 1999. "Lactic Acid Production by Immobilized *Lactobacillus casei* in Recycle Batch Reactor : a Step towards Optimization." **Journal of biotechnology**. 73: 61-70.
- Sharma, R., Palled, V., Sharma-Shivappa, R.R. and Osborne, J. 2013. "Potential of Potassium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Fermentable Sugar Production." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 169: 761-772.
- Shen, X.L. and Xia, L.M. 2006. "Lactic Acid Production from Cellulosic Material by Synergetic Hydrolysis and Fermentation." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 133: 251-262.
- Shibata, K., Flores, D.M., Kobayashi, G. and Sonomoto, K. 2007. "Direct L-Lactic Acid Fermentation with Sago Starch by a Novel Amylolytic Lactic Acid Bacterium (*Enterococcus faecium*)." **Enzyme and Microbial Technology**. 41: 149-155.
- Silva, R.D., Lago, E.S., Merheb, C.W., Macchione, M.M., Park, Y.K. and Gomes, E. 2005. "Production of Xylanase and CMCCase on Solid State Fermentation in Different Residue by *Thermoascus aurantiacus* Mieh." **Brazilian Journal of Microbiology**. 36: 235-241.
- Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D. and Osborne, J. 2007. "A Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Improving Saccharification of Cotton Stalks." **Bioresource Technology**. 98: 3000-3011.
- Singh, A. and Bishnoi, N.R. 2013. "Comparative Study of Various Pretreatment Techniques for Ethanol Production from Water Hyacinth." **Industrial Crops and Products**. 44: 283-289.
- Singhvi, M., Joshi, D., Adsul, M., Varma, A. and Gokhale, D. 2010. "D(-)-Lactic Acid Production from Cellobiose and Cellulose by *Lactobacillus lactis* Mutant RM2-24." **Green Chemistry**. 12: 1106-1109.

- Sreenath, H.K., Moldes, A.B., Koegel, R.G. and Straub, R.J. 2001. "Lactic Acid Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Alfalfa Fiber." **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 92: 518-523.
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Bioethanol Production: Review." **Bioresource Technology**. 83: 1-11.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. 2008. "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: a Review." **International Journal of Molecular Sciences**. 9: 1621-1651.
- Talebnia, F., Karakashev, D. and Angelidakil, P. 2010. "Production of Bioethanol from Wheat Straw: an Over View on Pretreatment Hydrolysis and Fermentation." **Bioresource Technology**. 101: 44-53.
- Tanaka, T., Hoshina, M., Tanabe, S., Sakai, K., Ohtsubo, S. and Taniguchi, M. 2006. "Production of D-Lactic Acid from Defatted Rice Bran by Simultaneous Saccharification and Fermentation." **Bioresource Technology**. 97: 211-217.
- Tashiro, Y., Kaneko, W., Sun, Y., Shibata, K., Inokuma, K., Zendo, T. and Sonomoto, K. 2011. "Continuous D-Lactic Acid Production by a Novel Thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 89: 1741-1750.
- Teymouri, F., Laureano-Perez, L., Alizadeh, H. and Dale, B.E. 2004. "Ammonia Fiber Explosion Treatment of Corn Stover." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 113: 951-963.
- Tokuhiro, K., Ishida, N., Kondo, A. and Takahashi, H. 2008. "Lactic Fermentation of Cellobiose by a Yeast Strain Displaying  $\beta$ -Glucosidase on the Cell Surface." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 79: 481-488.
- Tseng, C.P. and Montville, T.J. 1993. "Metabolic Regulation of End Product Distribution in *Lactobacilli* : Causes and Consequences." **Biotechnology Progress**. 9: 113-121.
- Vasconcelos, S.M., Santos, A.M.P., Rocha, G.J.M. and Souto-Maior, A.M. 2013. "Diluted Phosphoric Acid Pretreatment for Production of Fermentable Sugars in a Sugarcane-Based Biorefinery." **Bioresource Technology**. 135: 46-52.
- Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E. and Calabrò, V. 2012. "Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives." 95-122. in Pinheiro Lima, M.A. (Ed.). **Bioethanol**. InTech.

- Villarreal, M.L.M., Prata, A.M.R., Felipe, M.G.A., Almeida, E. and Silva, J.B. 2006. "Detoxification Procedures of Eucalyptus Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida guilliermondii*." **Enzyme and Microbial Technology**. 40: 17-24.
- Wang, B., Wang, X. and Feng, H. 2010. "Deconstructing Recalcitrant *Miscanthus* with Alkaline Peroxide and Electrolyzed Water." **Bioresource Technology**. 101: 752-760.
- Wang, L., Zhao, B., Liu, B., Yu, B., Ma, C., Su, F., Hua, D.L., Li, Q.G., Ma, Y.H. and Xu, P. 2010. "Efficient Production of L-Lactic Acid from Corncob Molasses, a Waste by-Product in Xylitol Production, by a Newly Isolated Xylose Utilizing *Bacillus* sp. Strain." **Bioresource Technology**. 101: 7908-7915.
- Wang, Y., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. 2015. "Fermentative Production of Lactic Acid from Renewable Materials: Recent Achievements, Prospects, and Limits." **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 119(1): 10-18.
- Wang, Z., Keshwani, D.R., Redding, A.P. and Cheng, J.J. 2010. "Sodium Hydroxide Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Coastal Bermuda Grass." **Bioresource Technology**. 101: 3583-3585.
- Wanitwattananurmlug, B., Luengnaruemitchai, A. and Wongkasemjit, S. 2012. "Characterization of Corn Cobs from Microwave and Potassium Hydroxide Pretreatment." **International Journal of Chemical and Biological Sciences**. 6: 354-358.
- Wee, Y.J. and Ryu, H.W. 2009. "Lactic Acid Production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a Cell-Recycle Continuous Fermentation Using Lignocellulosic Hydrolysates as Inexpensive Raw Materials." **Bioresource Technology**. 100: 4262-4270.
- Wee, Y.J., Yun, J.S., Park, D.H. and Ryu, H.W. 2004. "Biotechnological Production of L-(+)-Lactic Acid from Wood Hydrolysate by Batch Fermentation of *Enterococcus faecalis*." **Biotechnology Letters**. 26: 71-74.
- Westman, J.O., Taherzadeh, M.J. and Franzen, C.J. 2012. "Inhibitor Tolerance and Flocculation of a Yeast Strain Suitable for Second Generation Bioethanol Production." **Electronic Journal of Biotechnology**. 15: 1-14.
- Whitmore, R.E. and Atalla, R.H. 1985. "Factors Influencing the Regeneration of Cellulose I from Phosphoric Acid." **International Journal of Biology Macromolecules**. 7: 182-185.

- Wickramasinghe, S.R. and Grzenia, D.L. 2008. "Adsorptive Membranes and Resins for Acetic Acid Removal from Biomass Hydrolysates." **Desalination**. 234: 144-151.
- Wilson, J.J., Deschatelets, L. and Nishikawa, N.K. 1989. "Comparative Fermentability of Enzymatic and Acid Hydrolysates of Steam Pretreated Aspen Wood Hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 31: 592-596.
- Xiaobo, X., Jianping, L. and Peilin, C. 2006. "Advances in the Research and Development of Acrylic Acid Production from Biomass." **Chinese Journal of Chemical Engineering**. 14(4): 419-427.
- Xing, R., Qi, W. and Huber, G.W. 2011. "Production of Furfural and Carboxylic Acids from Waste Aqueous Hemicelluloses Solutions from the Pulp and Paper and Cellulosic Ethanol Industries." **Energy and Environmental Science**. 4: 2193-2205.
- Xu, G.Q., Chu, J., Zhuang, Y.P., Wang, Y.H. and Zhang, S.L. 2007. "Effects of Vitamins on the Lactic Acid Biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401." **Biochemical Engineering Journal**. 38(2): 189-197.
- Yang, B. and Wyman, C.E. 2008. "Pretreatment: the Key to Unlocking Low-Cost Cellulosic Ethanol." **Biofuels Bioproducts and Biorefining**. 2: 26-40.
- Ye, L., Hudari, M.S.B., Li, Z. and Wu, J.C. 2014. "Simultaneous Detoxification, Saccharification and co-Fermentation of Oil Palm Empty Fruit Bunch Hydrolysate for L-Lactic Acid Production by *Bacillus coagulans* J12." **Biochemical Engineering Journal**. 83: 16-21.
- Yu, Y., Feng, Y., Xu, C., Liu, J. and Li, D. 2011. "Onsite Bio-Detoxification of Steam-Exploded Corn Stover for Cellulosic Ethanol Production." **Bioresource Technology**. 102: 5123-5128.
- Yun, J.S., Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. 2004. "Fermentative Production of DL-Lactic Acid from Amylase Treated Rice and Wheat Brans Hydrolysate by a Novel Lactic Acid Bacterium (*Lactobacillus* sp.)." **Biotechnology Letters**. 26: 1613-1616.
- Zhang, D., Ong, Y.L., Li, Z. and Wu, J.C. 2012. "Optimization of Dilute Acid-Catalyzed Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch for High Yield Production of Xylose." **Chemical Engineering Journal**. 181-182: 636-642.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhang, K., Agrawal, M., Harper, J., Chen, R. and Koros, W.J. 2011. "Removal of the Fermentation Inhibitor, Furfural, Using Activated Cellulosic-Ethanol Production." **Industrial and Engineering Chemistry Research**. 50: 14054-14060.

Zhang, Y.H., Berson, E., Sarkanen, S. and Dale, B.E. 2009. "Pretreatment and Biomass Recalcitrance: Fundamentals and Progress." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 153: 80-93.

Zhao, X., Cheng, K. and Liu, D. 2009. "Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enzymatic Hydrolysis." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 82: 815-827.

Zheng, Y., Pan, Z. and Zhang, R. 2009. "Overview of Biomass Pretreatment for Cellulosic Ethanol Production." **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**. 2: 51-68.

Zhu, J., Yong, Q., Xu, Y. and Yu, S. 2011. "Detoxification of Corn Stover Prehydrolyzate by Trialkylamine Extraction to Improve the Ethanol Production with *Pichia stipitis* CBS 5776." **Bioresource Technology**. 102: 1663-1668.

Zhu, W., Zhu, J.Y., Gleisner, R. and Pan, X.J. 2010. "On Energy Consumption for Size-Reduction and Yields from Subsequent Enzymatic Saccharification of Pretreated Lodgepole Pine." **Bioresource Technology**. 101: 2782-2792.

สมาคมธุรกิจไม้ยางพาราไทย. 2546. **อุตสาหกรรมไม้ยางพาราและผลิตภัณฑ์**.

[Online]. Available : [www.tpa-rubberwood.org/news\\_detail.php?news=4](http://www.tpa-rubberwood.org/news_detail.php?news=4)

(สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 20 พฤศจิกายน 2558)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 2555. **โครงการศึกษาแนวทางบริหารจัดการเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงและลดการเกิดหมอกควัน**.

[Online]. Available : <http://webkc.go.th> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 24 มกราคม 2560)

สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. 2554. **รายงานประจำปี 2554**.

[Online]. Available : <http://www.oie.go.th> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2559)

Plastics Institute of Thailand. 2013. **Bioplastics: polymer of the future**.

[Online]. Available : <http://plastic.oie.go.th> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 25 เมษายน 2559)

[Online]. Available : <https://www.linkedbiotics.com/lactobacillus-casei/> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 19 สิงหาคม 2559)

[Online]. Available : <http://www.herb-health.com> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 23 สิงหาคม 2559)

[Online]. Available : <http://www.siamtimber.co.th> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 29 สิงหาคม 2559)

[Online]. Available : <http://www.rakbankerd.com> (สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 29 มีนาคม 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

#### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

##### 1.1 อาหารเหลว MRS

###### ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตท ( $CH_3COONa$ )	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมอะซิเตท ( $CH_3COONH_3$ )	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ )	0.05	กรัม

###### วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบอาหารเหลว MRS ทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 6.5 (Senthuran และคณะ, 1999; Nancib และคณะ, 2001) นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

##### 1.2 อาหารแข็ง MRS

###### ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตท ( $CH_3COONa$ )	5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไตรแอมโมเนียมอะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COONH}_3$ )	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

### วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบอาหารแข็ง MRS ทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 6.5 (Senthuran และคณะ, 1999; Nancib และคณะ, 2001) นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 1.3 อาหารไฮโดรไลเสทซีลี้อยไม้่างพาราสำหรับผลิตกรดแลกติก

#### ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.25	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.10	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.03	กรัม

#### วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบอาหารทั้งหมดแล้วนำมาละลายในไฮโดรไลเสทซีลี้อยไม้่างพาราปรับปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 6.5 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### วิธีวิเคราะห์

#### 1. การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยในชี้เลี้ยงม้าอย่างพาราด้วยวิธี Forage Fiber Analysis (Goering และ Van Soest, 1970)

การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธี detergent method หรือที่เรียกว่าวิธีการวิเคราะห์แบบ forage fiber analysis พัฒนาขึ้นโดย Goering และ Van Soest ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการแยกแยะปริมาณองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช วิธีการวิเคราะห์นี้เป็นที่ยอมรับและนิยมมากกว่าการวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยโดยวิธี proximate analysis เนื่องจากมีจุดอ่อน คือ ส่วนที่เป็นโครงสร้างของพืช เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส และลิกนินบางส่วนอาจละลายมาอยู่ในส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ง่าย (nitrogen free extract; NFE) ทำให้ได้ค่าที่ไม่ถูกต้อง นอกจากนี้ยังไม่สามารถแยกองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชได้อีกด้วย (วรพงษ์, 2535)

วิธีการวิเคราะห์แบบ detergent method แบ่งวัตถุแห้งของอาหารสัตว์ออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. cell content หรือ neutral detergent soluble (NDS) คือ ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์พืชทั้งหมด สามารถละลายได้ในสารละลาย detergent ที่เป็นกลาง ประกอบด้วยกรดอะมิโน ไขมัน แป้ง น้ำตาล เพคติน soluble protein และ non-protein nitrogen วัตถุแห้งส่วนนี้สัตว์ทุกชนิดสามารถใช้ประโยชน์ได้เกือบทั้งหมด

2. cell wall constituents หรือ neutral detergent fiber (NDF) คือ ส่วนประกอบของผนังเซลล์ซึ่งไม่สามารถละลายในสารละลาย detergent ที่เป็นกลางได้ ประกอบด้วยพวกเยื่อใยทั้งหมด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน คิวติน ซิลิกา และเคราติน วัตถุแห้งส่วนนี้เป็นประโยชน์ต่อสัตว์เคี้ยวเอื้องเท่านั้น เพราะในกระเพาะรูเมน (rumen) ของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้

NDF แบ่งได้เป็น 2 พวก ได้แก่

2.1 เยื่อใยพวก acid detergent soluble (ADS) คือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ เป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในกรดอ่อน และต่างอ่อน พืชตระกูลหญ้าจะมีเฮมิเซลลูโลสสูงกว่าพืชตระกูลถั่ว และจะพบเฮมิเซลลูโลสมากที่ส่วนใบของพืช พืชที่กำลังงอกจะใช้เฮมิเซลลูโลสที่มีในเมล็ดเป็นอาหาร และพบว่าเฮมิเซลลูโลสจะอยู่ร่วมกับลิกนินในพืชอาหารสัตว์จึงทำให้การย่อยได้ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากลิกนินเป็นตัวขัดขวางการย่อยได้ของเฮมิเซลลูโลสทำให้ย่อยได้ไม่หมด

2.2 เยื่อใยพวก acid detergent fiber (ADF) ประกอบด้วย

เซลลูโลส (cellulose) คือ เยื่อใยที่จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตพวกที่ไม่ละลายน้ำ น้ำย่อยของสัตว์ทุกชนิดไม่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ แต่จุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะรูเมนของสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารทรัพย์สินทางปัญญาของกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หากมีการนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากกรมปศุสัตว์ ถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคี้ยวเอื้อง และลำไส้ส่วน Caecum ของม้าและกระต่ายสามารถย่อยเซลลูโลสได้ ดังนั้น สัตว์เคี้ยวเอื้อง ม้า และกระต่ายจึงสามารถใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสได้ แต่การย่อยได้ของเซลลูโลสจะมากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณลิกนิน

ลิกนิน (lignin) คือ ส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช ทำให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรง เป็นส่วนประกอบของเปลือก ชัง หรือส่วนที่เป็นเยื่อใยของราก ลำต้น และจะถูกสร้างจากส่วนโคนต้นไปสู่ยอด เมื่อพืชมีอายุมากขึ้นปริมาณลิกนินจะเพิ่มมากขึ้นด้วย ในขณะที่เดียวกันการที่ลิกนินอยู่ร่วมกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสทำให้การย่อยได้ของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสลดลง เนื่องจากการที่ลิกนินเป็นสารที่ไม่มีสัตว์ชนิดใดใช้ประโยชน์ได้เลย ดังนั้น ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินมีความสำคัญต่อการประเมินคุณภาพของพืชอาหารสัตว์ที่ใช้สำหรับเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง ม้า และกระต่าย

คิวติน (cutin) คือ สารที่เคลือบผิวด้านนอกของผนังเซลล์พืช ส่วนใหญ่จะพบบนผิวของเมล็ด มีลักษณะคล้ายขี้ผึ้ง คิวตินย่อยไม่ได้ และถ้ามีปริมาณคิวตินมากอาจจะลดการย่อยได้ของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash; AIA) คือ สารประกอบอนินทรีย์ที่ประกอบด้วยซิลิกา (silica) ซึ่งส่วนใหญ่ร่างกายสัตว์ไม่สามารถจะย่อยหรือดูดซึมได้ และยังทำให้การย่อยได้ของอาหารลดลงด้วย

การวิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี detergent analysis จะทำให้ทราบปริมาณสารที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นโภชนะที่ย่อยได้ง่าย และองค์ประกอบของผนังเซลล์ส่วนต่าง ๆ คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ทำให้สามารถประเมินคุณค่าทางอาหารโคนมโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารหย่าได้แม่นยำยิ่งขึ้น

สูตรคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละ)

$$\text{เซลลูโลส (ร้อยละ)} = \text{ADF (ร้อยละ)} - \text{ADL (ร้อยละ)}$$

สูตรคำนวณหาปริมาณเฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ)

$$\text{เฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ)} = \text{NDF (ร้อยละ)} - \text{ADF (ร้อยละ)}$$

## 1.1 การวิเคราะห์หาเยื่อใยที่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลาง (neutral-detergent fiber; NDF)

เป็นการต้มตัวอย่างในสารฟอกที่เป็นกลาง ซึ่งส่วนประกอบภายในเซลล์จะถูกละลายออกมาอยู่ในสารละลาย แต่ส่วนที่เป็นเยื่อใย (cell wall) จะไม่ถูกย่อยละลายได้ ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า NDF ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

### 1.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องย่อย (heating mantle apparatus) เปิดเครื่องและเปิดน้ำให้ไหลเวียน

2. ขวดก้นกลม (round bottom flask)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. gooch crucible (อบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก)
4. เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump)

### 1.1.2 สารเคมี

1. สารละลาย neutral-detergent (neutral detergent solution) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

sodium lauryl sulphate

disogium ethylene diamine-tetraacetate (EDTA) dehydrate crystal

sodium borate decahydrate (borax) ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )

disodium hydrogen phosphate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

triethylene glycol หรือ 2-ethoxy ethanol

### วิธีเตรียม

ใส่ EDTA (18.61 กรัม) และ  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  6.81 กรัม ลงในบีกเกอร์แล้วผสมน้ำกลั่นเล็กน้อย ละลายสารเคมีโดยใช้ความร้อนจนกระทั่งสารเคมีละลายหมด แล้วเติม sodium lauryl sulphate 30 กรัม และ triethylene glycol 10 มิลลิลิตร หรือ 2-ethoxy ethanol 10 กรัม หลังจากนั้นเติม  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.56 กรัม ลงในบีกเกอร์แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

### 1.1.3 วิธีการ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) ใส่ขวดก้นกลม

↓  
เติม NDF solution 100 มิลลิลิตร

↓  
ต้มให้เดือดภายใน 10-15 นาที

↓  
ลดความร้อนให้มีความเดือดเพียงเล็กน้อย

↓  
ล้างเศษตัวอย่างที่ติดตามขอบขวดด้วยน้ำกลั่น แล้วต้มต่อนาน 1 ชั่วโมง

↓  
เอาออกแล้วกรองด้วย gooch crucible โดยใช้เครื่อง vacuum pump  
ขณะกรองล้างด้วยน้ำร้อนและล้างด้วย acetone เป็นครั้งสุดท้ายในปริมาณจำกัด

↓  
อบ crucible + เศษที่เหลือที่อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ตลอดคืน

↓  
เอาออกใส่โถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{การคำนวณ NDF (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{เยื่อใย NDF}) - \text{น้ำหนัก crucible} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

## 1.2 การวิเคราะห์หาเยื่อใยที่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด (acid-detergent fiber; ADF)

เป็นการย่อย NDF ออกโดยเอมิเซลลูโลสจะละลายอยู่ในสารฟอกที่เป็นกรด ส่วนที่เหลือที่ไม่ละลาย ได้แก่ โปรตีน เซลลูโลส ลิกนิน และ bond nitrogen

### 1.2.1 อุปกรณ์

1. เครื่องย่อย (heating mantle apparatus)
2. ขวดก้นกลม (round bottom flask)
3. gooch crucible
4. เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump)

### 1.2.2 สารเคมี

การเตรียม acid detergent solution (10 ลิตร)

1. ชั่ง CTAB น้ำหนัก 200 กรัม ลงในบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
2. เติมน้ำกลั่น 1.725 ลิตร แล้วนำเข้าสู่ตู้ดูดควันแล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกปริมาตร 275 มิลลิลิตร (ซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 96)
3. เติมน้ำกลั่น 6.7 ลิตร ลงในถังเก็บสาร แล้วจึงเติมสารที่เตรียมในข้อ 1 และข้อ 2 ตามลำดับ จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

### 1.2.3 วิธีการ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) ใส่ขวดก้นกลม

↓  
เติม ADF solution 100 มิลลิลิตร

↓  
ต้มให้เดือดภายใน 10-15 นาที

↓  
ลดความร้อนให้มีความเดือดเพียงเล็กน้อย

↓  
ล้างเศษตัวอย่างที่ติดตามขอบขวดด้วยน้ำกลั่น แล้วต้มต่อนาน 1 ชั่วโมง

↓  
เอาออกแล้วกรองด้วย gooch crucible โดยใช้เครื่อง vacuum pump  
ขณะกรองล้างด้วยน้ำร้อนและล้างด้วย acetone เป็นครั้งสุดท้ายในปริมาณจำกัด

↓  
อบ crucible + เศษที่เหลือที่อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ตลอดคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บ gooch crucible พร้อมตัวอย่างที่เหลือไว้เพื่อหา ADL ต่อไป

$$\text{การคำนวณ ADF (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{เยื่อใย ADF}) - \text{น้ำหนัก crucible}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

### 1.3 การวิเคราะห์หาลิกนิน (acid-detergent lignin, ADL)

การหาปริมาณลิกนินใน ADF โดยใช้กรดซัลฟิวริกละลายเซลลูโลสออกจากลิกนิน แต่อาจมี คิวทิน และ bond nitrogen (เกิดจาก milard reaction) รวมถึงปริมาณซิลิกา

#### 1.3.1 อุปกรณ์

1. crucible ที่มีตัวอย่างจาก ADF
2. เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump)
3. แท่งแก้ว
4. ปีกเกอร์
5. ถาดน้ำเย็น
6. เตาเผา (500 องศาเซลเซียส)

#### 1.3.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 72

#### 1.3.3 วิธีการ

เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 72 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงใน gooch crucible ที่มีปีกเกอร์

↓  
ใช้แท่งแก้วคนเป็นครั้งคราวให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ 3-4 ชั่วโมง

นำมารองโดยใช้ความร้อนล้างและล้างครั้งสุดท้ายด้วย acetone

↓  
อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ตลอดคืน

↓  
ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่ง และบันทึกน้ำหนัก

↓  
เผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ตลอดคืน

↓  
เอาออกใส่โถดูดความชื้น ชั่ง และบันทึกน้ำหนัก

$$\text{การคำนวณ ADL (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนักแห้งลิกนิน}) - (\text{น้ำหนัก crucible} + \text{ถ้ำ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส

(3,5-dinitrosalicylic acid method; DNS method) (Miller, 1959)

### 2.1 อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. คิวเวต (cuvette)
3. ปิเปต (pipette)

### 2.2 สารเคมี

1. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ร้อยละ 1.0

เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ละลาย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมดนำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Rochelle salt;  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

**หมายเหตุ** อาจเติมโซเดียมซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) อีกร้อยละ 0.05 ก่อนนำสารละลายดีเอ็นเอสไปใช้

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

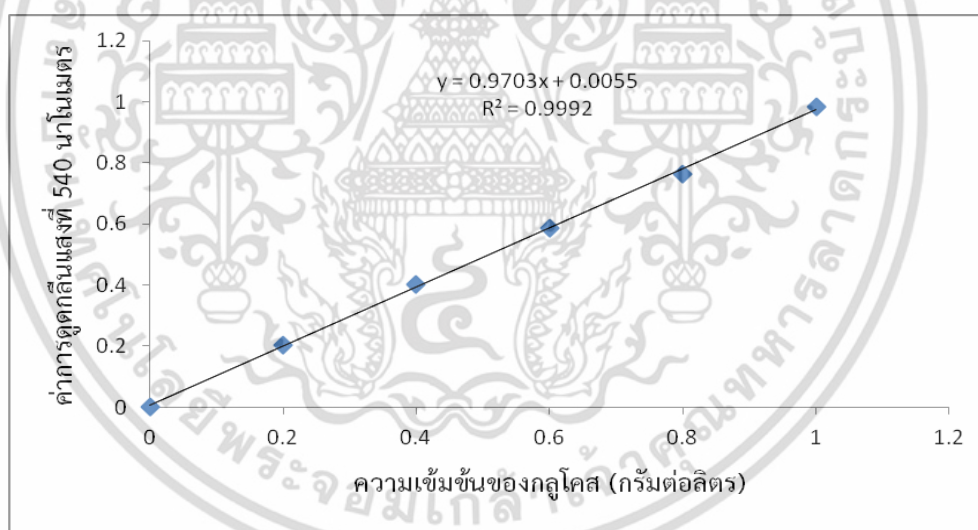
หลอดที่	สารละลายกลูโคส (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลาย กลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.0	1.00	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3 วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกแล้ว) หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0–1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร
3. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
4. แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที
5. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ข-1) เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี Standard Plate Count (SPC) (A.O.A.C. 2000)

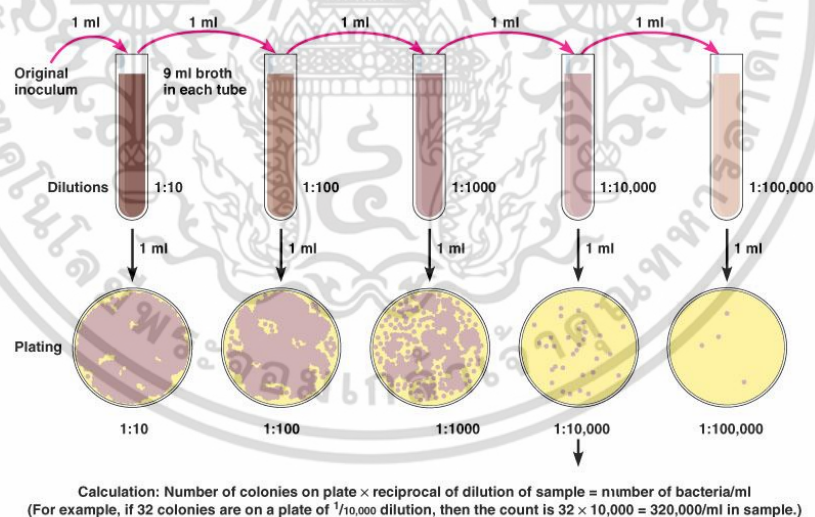
การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดสามารถทำได้หลายวิธี อาจตรวจนับจำนวนเซลล์โดยตรงจากตัวอย่าง หรืออาจตรวจหามวลเซลล์ทั้งหมดซึ่งผันแปรโดยตรงกับจำนวนเซลล์ สำหรับเทคนิคพื้นฐานที่นิยมใช้กันมาก คือ Standard Plate Count (SPC) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในอาหาร วิธีนี้จะต้องเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยอาศัยหลักการที่ว่าจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนเห็นเป็นโคโลนี แล้วจึงตรวจนับจำนวนโคโลนีหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธีนี้ทำได้ง่าย และสามารถนับจำนวนได้ดีแม้ว่าจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ (sensitive) จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารมีความสำคัญ คือต้องมีจำนวนไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยทั่วไปจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์เท่านั้น ดังนั้น ก่อนที่จะตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารควรทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นหลาย ๆ ครั้ง โดยทั่วไปจะทำการเป็นลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial dilution) (รูปที่ ข-2)

เมื่อทำการเจือจางตัวอย่างลงระดับละ 10 เท่า จากนั้นเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่ระดับการเจือจางเหมาะสม ในกรณีที่ใช้เทคนิค pour plate จะต้องปิเปตตัวอย่างลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพล่าที่ปราศจากเชื้อ (sterile petri dish) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ 44-46 องศาเซลเซียส ลงไปประมาณ 12-15 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวจึงนำไปบ่ม เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหารแล้วทำการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ โดยกลุ่มของเซลล์ที่ทำให้เกิด 1 โคโลนี เรียกว่า Colony Forming Unit (CFU) ซึ่งใช้เป็นหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวนโคโลนีนี้จะคำนวณในรูปของ CFU ต่อมิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง ขึ้นอยู่กับว่าตัวอย่างเริ่มต้นที่นำมาวิเคราะห์เป็นของแข็งหรือของเหลว



รูปที่ ข-2 ขั้นตอนการเจือจางเชื้อเริ่มต้นก่อนเพาะเลี้ยง (serial dilution)

การคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตรของอาหาร)

**Dilution Factor** = ระดับความเจือจางเริ่มต้น  $\times$  ระดับความเจือจางต่อมา  $\times$  ปริมาณตัวอย่างที่เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = ส่วนกลับของ Dilution Factor × จำนวนโคโลนีที่นับได้

#### 4. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกด้วย HPLC

(high performance liquid chromatography)

##### 4.1 สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก

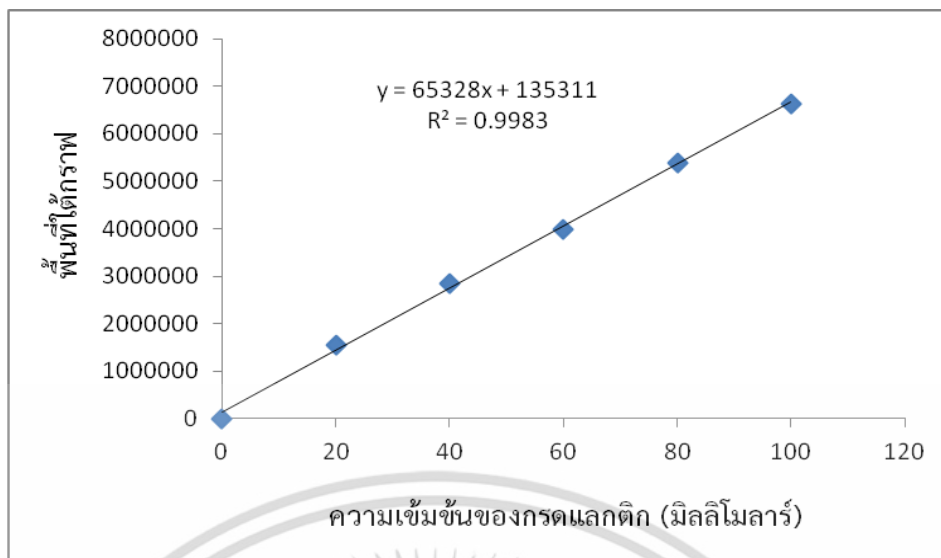
คอลัมน์ : Inertsil C8-3  
 เฟสเคลื่อนที่ : กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.001 โมลาร์  
 อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที  
 อุณหภูมิ : 40 องศาเซลเซียส  
 เครื่องตรวจสอบ : ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร  
 ปริมาตรตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ : 20 ไมโครลิตร  
 เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง : 30 นาที  
 การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ : ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนใสที่ได้ผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

##### 4.2 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.001 โมลาร์)

ปิเปตกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 0.056 มิลลิลิตร ลงในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายกรดซัลฟิวริกผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ใส่ภาชนะออกด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic cleaner) เป็นเวลา 30 นาที

##### 4.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแลกติก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลกติกความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของกรดแลกติก (รูปที่ ข-3) โดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแลกติกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์ เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานกรดแลกติกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่างโครมาโตแกรมของกรดแลกติก



รูปที่ ข-4 โครมาโตแกรมของกรดแลกติกมาตรฐาน

## 5. การคำนวณค่าจลนพลศาสตร์

### 5.1 ผลได้ (Yield; $Y_{P/S}$ )

$$Y_{P/S} = \Delta p / \Delta s$$

กำหนดให้

- $\Delta p$  คือ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
- $\Delta s$  คือ ปริมาณซับสเตรตที่ถูกใช้ไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 อัตราการผลิตของผลิตภัณฑ์ ( $Q_p$ )

$$Q_p = \Delta_p / t$$

กำหนดให้

$\Delta_p$	คือ	ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
$t$	คือ	เวลาที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### ข้อมูลการทดลอง

1. สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

ตารางที่ 1.1 ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสกากซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD

การทดลอง ที่	ความเข้มข้น กรดฟอสฟอริก (% v/v) ( $X_1$ )	อัตราส่วนซีเลื่อย ต่อกรดฟอสฟอริก (g/mL) ( $X_2$ )	เวลาไฮโดรไลซิส (min) ( $X_3$ )	ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)
1	0.5	5	30	3.06
2	0.5	5	90	6.67
3	0.5	15	30	2.06
4	0.5	15	90	3.32
5	1.5	5	30	4.72
6	1.5	5	90	8.78
7	1.5	15	30	2.42
8	1.5	15	90	3.94
9	0.159	10	60	2.32
10	1.841	10	60	4.50
11	1.0	1.59	60	8.80
12	1.0	18.41	60	2.57
13	1.0	10	9.54	1.86
14	1.0	10	110.46	5.23
15	1.0	10	60	14.88
16	1.0	10	60	15.01
17	1.0	10	60	14.94
18	1.0	10	60	14.71
19	1.0	10	60	14.97
20	1.0	10	60	14.97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลื้อยไม้่างพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 2.1 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลื้อยไม้่างพาราที่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมัก 5 ลิตร

ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณ กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนจุลินทรีย์ ทั้งหมด (CFU ต่อมิลลิลิตร)
0	1.98	10.39	$2.5 \times 10^6$
12	2.99	9.94	$1.2 \times 10^8$
24	7.82	4.87	$1.1 \times 10^9$
36	6.63	4.80	$9.6 \times 10^8$
48	5.50	4.72	$5.4 \times 10^8$
60	4.80	4.27	$2.0 \times 10^8$
72	4.31	4.22	$1.0 \times 10^8$

ตารางที่ 2.2 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซีลื้อยไม้่างพาราที่ไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมัก 5 ลิตร

ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณ กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนจุลินทรีย์ ทั้งหมด (CFU ต่อมิลลิลิตร)
0	2.13	11.60	$2.8 \times 10^6$
12	3.38	11.22	$1.3 \times 10^8$
24	8.85	4.48	$1.2 \times 10^9$
36	7.64	4.87	$1.0 \times 10^9$
48	6.48	4.56	$6.7 \times 10^8$
60	5.21	4.42	$3.0 \times 10^8$
72	4.89	4.29	$1.1 \times 10^8$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวก ง**  
**ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ**

1. การปรับสภาพขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
cellulose	Between Groups	108.816	3	36.272	976.368	.000
	Within Groups	.297	8	.037		
	Total	109.113	11			
hemicellulose	Between Groups	76.711	3	25.570	863.134	.000
	Within Groups	.237	8	.030		
	Total	76.948	11			
lignin	Between Groups	70.298	3	23.433	688.525	.000
	Within Groups	.272	8	.034		
	Total	70.571	11			
etc	Between Groups	124.516	3	41.505	2907.550	.000
	Within Groups	.114	8	.014		
	Total	124.630	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## cellulose

Duncan<sup>a</sup>

NaOH	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0%	3	51.7967		
1%	3		58.2533	
3%	3		58.3100	
2%	3			59.4333
Sig.		1.000	.728	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan<sup>a</sup>

NaOH	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0%	3	16.2700		
1%	3		19.9667	
3%	3			22.4067
2%	3			22.4867
Sig.		1.000	1.000	.585

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## lignin

Duncan<sup>a</sup>

NaOH	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
2%	3	10.2400			
3%	3		11.3600		
1%	3			13.7100	
0%	3				16.5533
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan<sup>a</sup>

NaOH	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2%	3	7.8400	
3%	3	7.9200	
1%	3	8.0700	
0%	3		15.3800
Sig.		.054	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสซีเลื่อยไม้ยางพาราด้วยกรดฟอสฟอริก สำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

Model Summary<sup>b</sup>

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics				
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	0.995 <sup>a</sup>	0.991	0.989	0.55299	0.991	587.821	9	50	0.000

a. Predictors: (Constant), time\_time, ratio\_time, con\_time, con\_ratio, time\_ratio, concentration\_ratio\_ratio, con\_con

b. Dependent Variable: reducing\_sugar

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1617.790	9	179.754	587.821	.000 <sup>a</sup>
	Residual	15.290	50	.306		
	Total	1633.080	59			

a. Predictors: (Constant), time\_time, ratio\_time, con\_time, con\_ratio, time\_ratio, concentration\_ratio\_ratio, con\_con

b. Dependent Variable: reducing\_sugar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Coefficients<sup>a</sup>

Model	Unstandardized Coefficients		Std. Error	Standardized Coefficients	t	Sig.	95.0% Confidence Interval for B	
	B	Std. Error					Lower Bound	Upper Bound
(Constant)	14.886	.130		114.322	.000	14.625	15.148	
concentration	.762	.086	.121	8.819	.000	.588	.935	
ratio	-1.608	.086	-.255	-18.618	.000	-1.782	-1.435	
time	1.033	.086	.164	11.961	.000	.860	1.207	
con_ratio	-.349	.113	-.042	-3.093	.003	-.576	-.122	
con_time	.088	.113	.011	.775	.442	-.139	.314	
ratio_time	-.613	.113	-.074	-5.426	.000	-.839	-.386	
con_con	-3.849	.084	-.632	-45.768	.000	-4.017	-3.680	
ratio_ratio	-3.092	.084	-.508	-36.773	.000	-3.261	-2.923	
time_time	-3.897	.084	-.640	-46.350	.000	-4.066	-3.729	

a. Dependent Variable: reducing\_sugar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: reducing sugar

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1631.662 <sup>a</sup>	13	125.512	4072.796	.000
Intercept	1.725	1	1.725	55.966	.000
concentration	25.481	2	12.740	413.418	.000
ratio	107.689	2	53.844	1747.211	.000
time	48.053	2	24.027	779.651	.000
con_ratio	2.926	1	2.926	94.947	.000
con_time	.184	1	.184	5.963	.019
ratio_time	9.004	1	9.004	292.166	.000
con_con	.000	0	.	.	.
ratio_ratio	.000	0	.	.	.
time_time	.000	0	.	.	.
Error	1.418	46	.031		
Total	4994.593	60			
Corrected Total	1633.080	59			

a. R Squared = 0.999 (Adjusted R Squared = 0.999)

## Lack of Fit Tests

Dependent Variable: reducing sugar

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lack of Fit	.014	1	.014	.449	.506
Pure Error	1.404	45	.031		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทซี่เลื่อยไม้ยางพาราที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดความเป็นพิษด้วยวิธี Overliming โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

lactic acid

Group Statistics					
	1,detox:2,undetox	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
lactic	1	3	7.8200	.29000	.16743
	2	3	8.8500	.21000	.12124

Independent Samples Test					
Levene's Test for Equality of Variances			t-test for Equality of Means		
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	.200	.678	-4.983	4	.008
lactic Equal variances not assumed			-4.983	3.645	.010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

yield

## Group Statistics

	1,detox:2,undetox	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
yield	1	3	1.0567	.05508	.03180
	2	3	.9400	.03000	.01732

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
yield	Equal variances assumed	.795	.423	3.222	4	.032
	Equal variances not assumed			3.222	3.091	.047

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## productivity

## Group Statistics

	1,detox:2,undetox	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
productivity	1	3	.2430	.01200	.00693
	2	3	.2800	.00900	.00520

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
productivity	Equal variances assumed	.160	.710	-4.272	4	.013
	Equal variances not assumed			-4.272	3.709	.015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## reducing sugar

## Group Statistics

	1,detox:2,undetox	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
reducing sugar	1	3	53.1267	.82397	.47572
	2	3	61.3767	1.37012	.79104

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)
reducing sugar	Equal variances assumed	1.407	.301	-8.938	4	.001
	Equal variances not assumed			-8.938	3.279	.002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cell

## Group Statistics

	1,detox:2,undetox	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
cell	1	3	1.1200	.06245	.03606
	2	3	1.2000	.06245	.03606

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
cell	Equal variances assumed	.000	1.000	-1.569	4	.192
	Equal variances not assumed			-1.569	4.000	.192

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณิชชาภัทร ชื่นจิตร
วัน เดือน ปีเกิด	25 ธันวาคม 2531
ที่อยู่ปัจจุบัน	134/32 หมู่ 2 ตำบลสุรศักดิ์ อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชลบุรี 20110
ประวัติการศึกษา	(2554) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ เกรตเฉลี่ย 3.22 (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) (2560) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ เกรตเฉลี่ย 3.5 (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
ผลงานทางวิชาการ	1. ณิชชาภัทร ชื่นจิตร และ สุขใจ ชูจันทร์ เรื่องสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยไม้ยางพาราสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์. การประชุมวิชาการระดับชาติ “วลัยลักษณ์วิจัย” ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 7-8 กรกฎาคม 2559 ณ อาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีและพัฒนานวัตกรรม มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้