รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* โดยใช้ชานอ้อย

PRODUCT SYNTHESIS FROM *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* USING SUGARCANE BAGASSE

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย
จากทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* โดยใช้ชานอ้อย

PRODUCT SYNTHESIS FROM *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* USING SUGARCANE BAGASSE

T145350

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

EResearch
สชหมู่.....
เลขทะเบียน 145350
วัน.เดือน.ปี 14 ก.พ. 2560
b. 00265732
i.....

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย
จากทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การสร้างผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* โดยใช้ชานอ้อย
แหล่งเงิน ทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินรายได้คณะ
ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2559 ถึงกันยายน 2560
ชื่อ-สกุล นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดย *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในงานวิจัยนี้ได้ทำการปรับสภาพชานอ้อยก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ และการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ทำการปรับสภาพชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก เบส โซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ส่วนที่เป็นของแข็งจะนำมาล้างน้ำกลั่นพีเอช 7 จากนั้นวัดปริมาตรน้ำที่ใช้ล้าง โดยอัตราส่วนของตัวอย่างต่อปริมาตรน้ำล้างคือ 5 : 100 (กรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าตะกอนของแข็งที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกใช้น้ำล้างมากที่สุด รองลงมาคือของแข็งที่ปรับสภาพด้วยเบส โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยการใช้น้ำรวมที่ 1,100 มิลลิกรัม จึงทำการทดลองโดยการล้างน้ำสลับกรดกับเบส พบว่าใช้ปริมาณน้ำที่ใช้ล้างรวมกันลดลง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 900 มิลลิลิตร ทำการตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนที่เป็นของเหลวหลังการปรับสภาพด้วยกรด เบส น้ำกลั่น พบว่าชานอ้อยมีการสูญเสียน้ำตาลไปกับของเหลวที่ปรับสภาพด้วยกรดมากที่สุด

จากนั้น ทำการหาความเข้มข้นของกรดและเบสที่ใช้ปรับสภาพตัวอย่างที่เหมาะสมในช่วง 0.2 - 1.0 โมลาร์ พบว่าการปรับสภาพด้วยเบสที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด คือ 1.09 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักชานอ้อยก่อนการปรับสภาพ โดยทำการทดลองควบคู่ไปกับการหาค่าอัตราส่วนของเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อย ซึ่งจากการทดลองพบว่าอัตราส่วนเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม เวลาในการบ่มเป็น 36 ชั่วโมง ให้ค่าความเข้มข้นน้ำตาล 1.13 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักชานอ้อย ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลที่ต้องการคือ 50 กรัมต่อลิตร นำน้ำตาลที่ได้จากชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นเพื่อไปเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะเดียวกัน คือ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* สามารถใช้น้ำตาลที่ย่อยจากชานอ้อยในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ที่พบในกลุ่มของกรดอินทรีย์คือ กรดอะซิติก (21.13 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง) และกรดแลกติก (26.46 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมง) ส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ที่พบคือ อะซิโตน (1.55 กรัมต่อลิตร ที่ 84 ชั่วโมง) และเอทานอล (3.35 กรัมต่อลิตร ที่ 94 ชั่วโมง) เมื่อเทียบกับชุดควมคุม ผลิตภัณฑ์ที่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกลุ่มของกรดอินทรีย์พบเพียงกรดอะซิติกมีความเข้มข้นสูงสุดชั่วโมงที่ 84 มีค่าเท่ากับ 1.31 กรัมต่อลิตร และในส่วนตัวทำละลายอินทรีย์พบเพียงเอทานอล เท่านั้น ซึ่งมีความเข้มข้นสูงสุดชั่วโมงที่ 120 มีค่าเท่ากับ 2.72 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : ชานอ้อย *Clostridium acetobutylicum* การผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ บิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Product Synthesis from *Clostridium acetobutylicum* using sugarcane bagasse

Researcher: Miss Vorapat Sanguanchaipaiwong

Faculty: Science Department: Biology

ABSTRACT

The purpose of this research was to study the possibility of using sugarcane bagasse as a carbon source for the production of organic solvents; acetone, butanol and ethanol, by *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. This research was conducted on the pretreatment and the enzymatic hydrolysis of raw materials for the highest concentration of reducing sugars. The pretreatment was carried on using sulfuric acid, sodium hydroxide and distilled water. Consequently, the solid was washed to pH 7 by distilled water. Afterwards, the volume of water used for washing was measured. The ratio of the sample to water was 5:100 (g/L). It has been found that the pretreatment with sulfuric acid generated the highest waste water, followed by the pretreatment with sodium hydroxide. The volume of water directly washing both acid and base on pretreated bagasse was 1100 mL, while the amount of washing water switching between acid and base pretreated bagasse decreased to 900 mL. The quantitation of reducing sugar concentration in the filtrate after the pretreatment showed that the reducing sugars in acid pretreated sugarcane bagasse were highest lost.

Subsequently, the experiment of acid and base concentration (0.2-1.0 M) used on pretreatment of sample was found that Pretratment with 1.0 M NaOH yielded the highest volume of sugar of 1.09 g per g sugarcane. The experiment was conducted along with the control of ratio of enzyme, and resulted that the ratio of 0.8 mL enzyme per g pretreated sample with 36 hours produced sugar concentration of 1.13 g/g sugarcane. The equivalent reducing sugar concentration of 50 g/L utilized as the carbon source. *Clostridium acetobutylicum* DSM792 was cultivated, compared

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

with the control with 50 g/L glucose under anaerobic condition at 37°C. It revealed that *Clostridium acetobutylicum* DSM792 was able to efficiently use more sugar to produce organic solvent than that of glucose. Acetic acid and lactic acid were found in the concentration of 21.13 and 26.46 g/L at 36, and 120 hours, respectively. Organic solvents including acetone and ethanol were found with the highest concentration of 1.56 and 3.36 g/L, respectively. Compared with the control, the only organic acid (1.31 g/L acetic acid) was produced at 84 hours, and the only organic solvent (2.72 g/L ethanol) was produced at 120 hours.

Keywords : sugar cane bagasse, *Clostridium. acetobutylicum*, the manufacture of organic solvents, butanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 และสำเร็จได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ชีววิทยา ที่ให้ความกรุณา ในการเบิกอุปกรณ์ ดูแลความเรียบร้อย อีกทั้งเป็นธุระในการติดต่อใช้ห้องปฏิบัติการนอกเวลาราชการ นักศึกษาโครงงานพิเศษที่มีส่วนร่วมทำงานงานวิจัยชิ้นนี้ โดยเฉพาะนายนฤวัตร บูรศิริรักษ์ นางสาวพรกันยา ม้าวิไล นางสาวสุวิชา ประกอบแสง และนายอธิศักดิ์ พรหมอินทร์

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์องค์ประกอบวัตถุดิบ

ขอขอบพระคุณ คุณสิริธร ธีระเวทย์ จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์ในเก็บรักษาและฝากเชื้อ

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิจัย ขอขอบพระคุณบุพการีที่ได้อบรมเลี้ยงดู และคอยเป็นกำลังใจ ให้การสนับสนุน และให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งเสมอมา

ผู้จัดทำรายงานวิจัย
นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูป ..... ญ

คำย่อและสัญลักษณ์ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 อ้อย 5

2.1.1 ชานอ้อย (Bagasse) 6

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของชานอ้อย 6

2.2 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) 8

2.2.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment) 8

2.2.2 การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี (physicochemical pretreatment) 8

2.2.3 การปรับสภาพทางเคมี 9

2.2.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ 10

2.3 บิวทานอล 12

2.3.1 ข้อมูลทั่วไป 12

2.3.2 คุณสมบัติทั่วไป 12

2.3.3 ประวัติของการผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการชีวภาพ 14

2.3.4 ประโยชน์ของบิวทานอล 14

2.3.5 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก 15

2.3.6 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก 17

2.3.7 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation) 18

2.4 *Clostridium acetobutylicum* 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1 อนุกรมวิธาน 21
2.5 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) 22
2.5.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส 22
2.5.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 24
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 26
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 26
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ 26
3.1.2 สารเคมี 26
3.1.3 อุปกรณ์ 26
3.1.4 ชานอ้อย 27
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 27
3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM) 27
3.2.2 อาหาร glucose–yeast extract–casein–cysteine (GYCC) 28
3.3 วัตถุดิบ 28
3.3.1 การเตรียมชานอ้อย 28
3.4 กระบวนการปรับสภาพชานอ้อย 28
3.4.1 การปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น 28
3.4.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 29
3.4.3 การปรับสภาพด้วยสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ 29
3.5 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง หลังการปรับสภาพ 29
3.5.1 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแบบปกติ 29
3.5.2 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแบบประหยัดน้ำ 29
3.6 การย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 30
3.7 การผลิตบิวทานอล 30
3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ 30
3.7.2 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ 30
3.8 การวิเคราะห์ตัวอย่าง 31
3.8.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (proximate analysis) 31
3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8.3 การวิเคราะห์ทางเคมี 36
3.8.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ 38
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 39
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของชานอ้อย 39
4.2 การปรับสภาพชานอ้อยก่อนการย่อย 40
4.2.1 ผลของสารละลายกรดและเบสต่อการปรับสภาพชานอ้อย 40
4.2.2 การศึกษาการปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนการย่อยให้ประหยัดน้ำ 42
4.3 การย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 44
4.3.1 การเปรียบเทียบอัตราส่วนเอนไซม์ต่อชานอ้อย 44
4.3.2 ผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 48
4.3.3 ผลของความเข้มข้นสารละลายกรดและเบสที่ใช้ในการปรับสภาพต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 50
4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* 53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 60
5.1 สรุปผลวิจัย 60
5.2 ข้อเสนอแนะ 62
เอกสารอ้างอิง 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของชานอ้อย 7

2.2 ข้อดีและข้อจำกัดของการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการต่างๆ 11

2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล 13

2.4 ชื่อเรียกและสูตรโมเลกุลของบิวทานอล 14

2.5 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 23

2.6 การย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส 24

2.7 ปฏิกิริยาการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 24

4.1 ส่วนประกอบของชานอ้อยที่ใช้ในการทดลอง 40

4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน 41

4.3 ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้ล้างตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และน้ำกลั่น พร้อมค่าความเป็นกรดด่างที่ได้ 43

4.4 ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้ในการล้างสลับระหว่างตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และสารละลายเบสโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ พร้อมค่าความเป็นกรดด่างที่ได้ 44

4.5 ตารางเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์กับเวลาของกรดซัลฟิวริก โซเดียม-ไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ในปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 47

4.6 ผลการใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE 1500 ที่สภาวะ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 49

4.7 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELERASE 1500 ย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารลายกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นที่ 0.2 - 1 โมลาร์ 50

4.8 ชนิดและความเข้มของน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่น และการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELERASE 1500 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจน และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ..... 53

4.10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ที่พบในอาหาร GYCC ที่มีชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ..... 57

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะของต้นอ้อย.....5

2.2 ลักษณะของชานอ้อย.....

Error! Bookmark not defined.

2.3 สูตรโครงสร้างของบิวทานอล..... 12

2.4 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก.....16

2.5 วิถีการสร้างอะซีโตนบิวทานอลเอทานอลของ *Clostridium* sp. ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังนี้ : HYDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase), PTA แทน ฟอสโฟทรานส-อะซีทีเลส(phosphotransacetylase) AK แทนอะซีเตทไคเนส (acetate kinase), THL แทน ไทโอเลส (thiolase), CoAT แทน อะซีโตอะซีติล-โคเอ:อะซีเตต-บิวทิเรต: โคเอทรานสเฟอเรส (acetoacetate-CoA:acetate-butyrate:CoA transferase), AADC แทนอะซีโตอะซิเตต ดีคาร์บอกซิเลส(acetoacetate decarboxylase), BHBD แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyryl-CoAdehydro-genase), CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทีริว-โคเอดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase), PTB แทน ฟอสโฟทรานสบิวทิเรส (phosphor-transbutylase), BK แทนบิวทิเรท ไคเนส (butyrate kinase), AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde/alcohol dehydrogenase), BDHA&BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนสบี (butanol dehy-drogenase A & butanol dehydrogenase B) 20

2.6 รูปร่างลักษณะของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*..... 21

2.7 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส..... 25

4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนชานอ้อยหลังผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นดังนี้ (■) 0.2 โมลาร์, (■) 0.4 โมลาร์, (■) 0.6 โมลาร์, (■) 0.8 โมลาร์, (■) 1.0 โมลาร์..... 42

4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่นด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE 1500 อัตราส่วนต่างๆกันที่ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ดังนี้ (—●—) 0.0 ml, (—●—) 0.1 45

4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE 1500 ย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ดังนี้ (■) ไม่ใช้บัฟเฟอร์, (■) ใช้บัฟเฟอร์..... 49

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.4 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELERASE 1500 ย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นที่ 0.2 – 1 โมลาร์ (ก) สารละลายกรดซัลฟิวริก (ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์..... 51

4.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง ที่พบในอาหารเลี้ยง เชื้อ GYCC ที่มีกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ (—●—) น้ำหนักเซลล์แห้ง, (—●—) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์, (—●—) ค่าความเป็นกรด-เบส..... 53

4.6 ชนิดและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่พบในอาหารเลี้ยง เชื้อ GYCC ที่มีกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจน และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ (—●—) กรดอะซิติก, (—●—) เอทานอล..... 55

4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่างที่พบในอาหาร GYCC ที่มีชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ (—●—) น้ำหนักเซลล์แห้ง, (—●—) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์, (—●—) ค่าความเป็นกรด-เบส..... 56

4.8 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากชานอ้อยที่ปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์เข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่ง ไม่มีออกซิเจน ที่เวลาต่างๆ (—●—) กรดอะซิติก, (—●—) เอทานอล, (···●···) กรดแลคติก และ (●) อะซิโตน..... 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

ABE	=	Acetone-butanol-ethanol
ATP	=	Adenosine 5'-tri-phosphate
CoA	=	Coenzyme A
NAD	=	Nicotinamide adenine dinucleotide (Oxidized form)
NADH	=	Reduced form of Nicotinamide adenine dinucleotide
MPa	=	MegaPascal
pH	=	Positive Potential of the Hydrogen ions
% (w/v)	=	Percentage weight by volume
M	=	Molar
GYCC	=	Glucose-Yeast-Extract-Casein-Cysteine
C4H9OH	=	Butabol
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
DNS	=	3,5dinitrosalicylic acid
Emp	=	Embden-Meyerhof-Glycollytic Pathway
C5	=	Pentose
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
DNS	=	3,5dinitrosalicylic acid
ADF	=	Cellulose + Lignin
ADL	=	Lignin
NDF	=	Cellulose + Hemicellulose + Lignin
N.F.E.	=	Nitrogen Free Extract Crude Fiber
AFEX	=	Ammonia Fiber Explosion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในพจนานุกรมของราชบัณฑิตยสถานได้ระบุความหมายชีวมวลไว้ ชีวมวลแปลมาจากศัพท์ภาษาอังกฤษว่า "Biomass" ประกอบด้วยคำสองคำคือชีวและมวล ชีว คือ สิ่งมีชีวิต เช่น มนุษย์ พืช และสัตว์ มวล คือ วัตถุสิ่งของต่างๆดังนั้น ชีวมวลหมายถึง วัตถุหรือสสารที่ได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น ข้าวสาร รำ แกลบและฟางข้าวที่ได้จากต้นข้าวและมูลสุกรได้จากการเลี้ยงสุกร เป็นต้น (พชรและคณะ, 2554)

ชานอ้อย เป็นของเหลือใช้ทางการเกษตร หมายถึง ส่วนของลำต้นอ้อยที่หีบเอาน้ำอ้อย หรือน้ำตาลออกแล้ว มีส่วนประกอบอย่างหยาบๆ คิดเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักของชานอ้อยเปียก (ความชื้นร้อยละ 48) คือ ชานอ้อย หรือไฟเบอร์ (fiber) ร้อยละ 48.5 น้ำ 48.0% น้ำตาลร้อยละ 3.0 และสารประกอบอื่นๆ นอกจากที่กล่าวแล้ว อีกร้อยละ 0.5 ชานอ้อยใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง ในด้านการใช้เป็นเชื้อเพลิง ชานอ้อยสามารถใช้แทนน้ำมันเชื้อเพลิง (fuel oil) ได้ดี ชานอ้อยที่มีความชื้นร้อยละ 50 หนัก 3 ตัน เมื่อเผา ให้พลังงานไล่เลี่ยกับน้ำมันเชื้อเพลิงหนัก 1 ตัน (เกษม, 2538)

นอกจากนี้ ในปัจจุบัน การเพิ่มขึ้นของประชากรส่งผลให้ความต้องการพลังงานเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ปัญหาที่ตามมา คือ การลดลงอย่างต่อเนื่องของแหล่งน้ำมันปิโตรเลียมและราคาที่สูงขึ้น ดังนั้น การหาแหล่งพลังงานใหม่หรือการผลิตเชื้อเพลิงขึ้นมาทดแทน จึงได้รับความสนใจมากขึ้น ทำให้พลังงานทางเลือกใหม่ เช่น ไบโอก๊าซ ไบโอดีเซล และไบโอแอลกอฮอล์ ถูกพัฒนาขึ้นอย่างกว้างขวาง แต่ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจบิวทานอลเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีข้อดีกว่าเอทานอล คือ การที่มีค่าออกเทน ใกล้เคียงน้ำมันทำให้ผสมกับน้ำมันได้ดีกว่า ค่าพลังงาน และจุดเดือดสูงกว่า สามารถขนส่งตามท่อส่งน้ำมันและไม่มีปัญหากับเครื่องยนต์เนื่องจากไม่มีการกัดกร่อน การผลิตไบโอแอลกอฮอล์สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลายประเภท ได้แก่ เซลลูโลส แป้ง และน้ำตาล โดยการผลิตจากวัตถุดิบ ลิกโนเซลลูโลสต้องผ่านขั้นตอนการปรับสภาพและการย่อยก่อนจึงเข้าสู่ขั้นตอนกระบวนการหมักของแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia (ชนิกาและคณะ, 2555) ทั้งนี้ *Clostridium* sp. ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ที่สามารถสร้างสปอร์และเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยสภาพธรรมชาติแล้วแบคทีเรียกลุ่มนี้ มีวิถีในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ คือ แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ได้ถูกจำแนกออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ เป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตบิวทานอล (สุนทรและอภิชัย, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะหาแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ๆเพื่อแก้ปัญหาทางด้านพลังงานในปัจจุบัน ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวนมากจึงมีแนวคิดที่จะใช้สิ่งเหล่านั้นมาผลิตเป็นบิวทานอลจึงทำให้ลดต้นทุนของสารตั้งต้นลดการเหลือทิ้งของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้อีกด้วย ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงนำชานอ้อยมาปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์และนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการบำบัดก่อนการย่อยชานอ้อยด้วยสารละลายกรดและสารละลายด่าง แล้วจึงนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
2. เพื่อหากระบวนการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีราคาถูกอย่างชานอ้อยมาใช้ประโยชน์ โดยกระบวนการมีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและประหยัดการใช้น้ำ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตบิวทานอลจากชานอ้อยปรับสภาพโดยการนำชานอ้อยมาทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เบสโซเดียมไฮดรอกไซม์ (NaOH) และน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากนั้นนำชานอ้อยที่ปรับสภาพ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ทำการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC โดยการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายชานอ้อยมาเลี้ยงเชื้อ*Clostridium acetobutylicum* เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสในการเพาะเลี้ยงที่ใช้เป็นชุดในการควบคุมและใช้อาหาร glucose–yeast extract–casein–cysteine (GYCC) ในสภาวะนิ่งและไร้ออกซิเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ
2. ได้ทราบถึงกระบวนการการปรับสภาพชานอ้อยที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำมาเลี้ยงด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792
3. ได้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแบบประหยัดน้ำในขั้นตอนการล้างของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อ้อย

อ้อยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* L.มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย โดยเชื่อกันว่าคำว่า *Saccharum* อาจมาจากภาษาสันสกฤตว่า สาคารา (Sarkara) และแพร่กระจายจากเอเชียไปยังหมู่เกาะเมลานีเซีย (Melanesia) ตะวันออกกลาง และแอฟริกาเหนือ อ้อยเป็นพืชล้มลุกที่เจริญได้ดีในเขตดินปนทรายและร้อนแห้งแล้ง ลำต้นเป็นปล้องๆ มีน้ำหวานอยู่ในเปลือกแข็งที่หุ้มปล้อง มีน้ำตาลสูง มีรสหวาน มีไขสีขาวปกคลุม ไม่แตกกิ่งก้าน มีใบสีเขียว ที่ใบมีลักษณะหยาบ ขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ หรือปักชำ (วัชรา, 2549) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้นอ้อย
ที่มา : http://www.thailandindustry.com/news/view.php?id=9171&section3&rcount=Y (วันที่สืบค้น 15 ธันวาคม 2557)

2.1.1 ชานอ้อย (Bagasse)

ชานอ้อย (Bagasse) หมายถึง ส่วนเส้นใยของลำต้นอ้อยหลังจากผ่านกระบวนการบีบสกัดน้ำออกแล้ว ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำตาล ในปีหนึ่งๆมีชานอ้อยที่เหลือจากการหีบอ้อยไม่ต่ำกว่า 40-60 ล้านตัน ซึ่งร้อยละ 30 ของชานอ้อยเหล่านี้ใช้ในการผลิตพลังงานความร้อนในโรงงานน้ำตาล อีกประมาณร้อยละ 15 ได้ถูกนำมาเป็นวัตถุดิบที่ให้เส้นใยทดแทนไม้ธรรมชาติในการผลิตเยื่อกระดาษ ทำให้มีชานอ้อยเหลือทิ้งอีกประมาณร้อยละ 55 ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแผ่นไม้ประกอบเช่น แผ่น เอ็ม.ดี.เอฟ. ได้แก่ บริษัทขอนแก่น เอ็ม.ดี.เอฟ. บอร์ด จำกัด เริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 กำลังผลิต 72,500 ลูกบาศก์เมตร/ปี บริษัท เม พี ปาติเกิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บอร์ด จำกัด และบริษัท จี แผ่นปาร์ติเกิลบอร์ด ซึ่งกำลังผลิตของทั้ง 3 โรงงานรวมประมาณ 4 แสนตันหรือประมาณร้อยละ 5 ของชานอ้อยที่เหลือทิ้ง ชานอ้อยจึงเป็นวัสดุธรรมชาติที่มีเหลืออยู่อย่างมากมาย (อรรถพล, 2553)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของชานอ้อย

ที่มา : https://www.l3nr.org/posts/541411 (วันที่สืบค้น 10 ธันวาคม 2557)

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของชานอ้อย

ชานอ้อยเป็นผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาล โดยประเทศไทยผลิตชานอ้อยปีละไม่ต่ำกว่า 4 ล้านตัน ซึ่งร้อยละ 30 ใช้ในการผลิตพลังงานความร้อนในโรงงานน้ำตาล อีกประมาณร้อยละ 15 ได้ถูกนำมาเป็นวัตถุดิบที่ให้เส้นใยทดแทนไม้ธรรมชาติในการผลิตเยื่อกระดาษ ทำให้เหลือชานอ้อยอีกประมาณร้อยละ55 ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

จากการศึกษาชานอ้อยทั้งในและต่างประเทศพบว่าชานอ้อยมีองค์ประกอบโดยคำนวณตามร้อยละของน้ำหนักเป็นดังนี้ เส้นใยทั้งหมด (Truefiber) 55 เปอร์เซ็นต์ Vessel 20 เปอร์เซ็นต์ แก่นไม้ (Pith) 20 เปอร์เซ็นต์ และส่วนอื่นๆที่ไม่ใช่เส้นใย 5 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาแน่น 160 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ใช้วิธีวิเคราะห์ของ Technical Association of thePulp and Paper Industry Standard โดยชานอ้อยที่จะนำมาวิเคราะห์จะถูกบดจนป่นและเลือกเอาขนาด 40-60 mesh ผลการวิเคราะห์ที่ได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 2.1 (ฉวีวรรณ, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของชานอ้อย

องค์ประกอบ	สัดส่วน (คิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก)
เซลลูโลส	47.0
ลิกนิน	19.5
เพนโตแซน (เฮมิเซลลูโลส)	25.1
เถ้า	1.4
SiO_2	0.65
Fe_2O_3	0.031
CaO	0.046
MgO	0.016
ความชื้น	6.257

ที่มา: ฉวีวรรณ (2552)

จากการพิจารณาสมบัติของชานอ้อยพบว่า ลำต้นอ้อยประกอบไปด้วยข้อและปล้องเป็นระยะสั้นๆสลับกัน ภายในลำต้นอ้อยประกอบไปด้วย เนื้อเยื่อ 3 ประเภท คือ เนื้อเยื่อที่อยู่รอบนอก ได้แก่ Epidermis Cortex และ Pericycle เนื้อเยื่อประเภทท่อลำเลียง ได้แก่ Vascular Fiber และ Bundles และเนื้อเยื่อประเภทสะสมอาหาร ได้แก่ Parenchyma เมื่ออ้อยเข้าสู่โรงงานจะถูกสกัดเอาน้ำอ้อยออกส่วนที่เหลือคือ ชานอ้อย ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย น้ำ ไฟเบอร์ และมีสารที่ละลายน้ำได้ (Soluble Solid) ปนอยู่เล็กน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของอ้อย การตัด และประสิทธิภาพของโรงงาน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยดังนี้ ความชื้น (Moisture) 46.52เปอร์เซ็นต์ ไฟเบอร์ (Fiber)3-52 เปอร์เซ็นต์ Soluble Solid(ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล)2-6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประกอบที่เป็นไฟเบอร์จะไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วย Cellulose Pentosana และ Lignin ขนาดของไฟเบอร์และพาเรนคิมาจะแตกต่างกันไปตามแหล่งของอ้อยขึ้นอยู่กับสายพันธ์ ค่าเฉลี่ยของความยาวไฟเบอร์อยู่ระหว่าง 1.2 ถึง 1.7 มิลลิเมตร ส่วนความยาวของพาเรนคิมา มีค่าประมาณ 0.2-0.4 มิลลิเมตร (สมศักดิ์, 2552)

2.2 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) (สุภาวดี, 2557)

การปรับสภาพวัตถุดิบมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินซึ่งมีสมบัติไปห่อหุ้มหรือเคลือบโครงสร้างของ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินจึงเป็นเหมือนผนังป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัตถุดิบและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่ายขึ้นอีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายสำหรับใช้เอนไซม์ในการย่อยเซลลูโลส เนื่องจากหากใช้เอนไซม์ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนจะมีค่าใช้จ่ายสำหรับเอนไซม์ถึง 25% ของต้นทุนการผลิตเอทานอลทั้งหมด กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งออก เป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ การปรับสภาพทางกายภาพ การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี การปรับสภาพทางเคมี และการปรับสภาพทางชีวภาพ และตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการปรับสภาพแต่ละแบบ

2.2.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment)

การใช้เครื่องมือหรือเครื่องจักรในการหั่น สับ และบด (mechanical comminution) เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวและลดขนาดอนุภาคของลิกโนเซลลูโลส นอกจากนี้ยังเป็นการลดผลึกของเซลลูโลสด้วย โดยทั่วไปควรลดขนาดวัตถุดิบหลังจากหั่นแล้วให้มีขนาดประมาณ 1-3 เซนติเมตร และให้มีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร หลังจากการบดละเอียดแล้วพลังงานที่ต้องใช้ในการบดวัตถุดิบขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของชีวมวลที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่วิธีการปรับสภาพทางกายภาพ จะใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่นๆด้วย

2.2.2 การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี (physicochemical pretreatment)

2.2.2.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (stream explosion)

ชีวมวลที่ผ่านการหั่นและบดแล้วจะถูกปรับสภาพต่อด้วยไอน้ำอิ่มตัวที่ความดันสูง หลังจากนั้นจึงลดความดันลงโดยส่วนใหญ่จะควบคุมอุณหภูมิที่ 160-260 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.69-4.83 เมกะพาสคาล (MPa) ไว้ระยะหนึ่งหลังจากนั้นจึงลดความดันลงให้เหลือเท่ากับความดันบรรยากาศซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและการเปลี่ยนรูปลิกนิน เนื่องจากอุณหภูมิสูงและเป็นการเพิ่มศักยภาพในการย่อยเซลลูโลสด้วย ปัจจัยที่มีผลต่อการระเบิดด้วยไอน้ำ ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ และขนาดของชิ้นชีวมวล ข้อดีของการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ ใช้พลังงานต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการบดด้วยเครื่องจักรเพียงอย่างเดียวอย่างเดียว มีความคุ้มค่าเมื่อใช้ในการปรับสภาพไม้เนื้อแข็งและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่มีประสิทธิผลน้อยเมื่อใช้กับไม้เนื้ออ่อน ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ การทำลายส่วนประกอบของไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่พบอยู่ในผนังเซลล์ของพืชและก่อให้เกิดสารองค์ประกอบที่อาจไปขัดขวางการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการต่อจากนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อจำกัดของการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการต่างๆ

วิธีการปรับสภาพ	ข้อดี	ข้อจำกัด
1. ทางกายภาพ	เป็นการปรับสภาพเบื้องต้นโดยการลดขนาดวัตถุดิบเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ	ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่น ๆ
2. ทางกายภาพร่วมกับเคมี		
2.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ	ใช้พลังงานต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการบดด้วยเครื่องจักรอย่างเดียวมีความคุ้มค่าเมื่อใช้ในการปรับสภาพไม้เนื้อแข็งและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	มีประสิทธิผลน้อยเมื่อใช้กับไม้เนื้ออ่อน ทำลายส่วนประกอบของไซแลน (xylan) และก่อให้เกิดสารองค์ประกอบที่อาจไปขัดขวางการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการต่อไป
2.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย	ช่วยเพิ่มอัตราการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล	มีประสิทธิผลน้อยเมื่อใช้ในการปรับสภาพชีวมวลที่มีองค์ประกอบของลิก นินสูง เช่น หนังสือพิมพ์ เศษไม้ และมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำ
3. ทางเคมี		
3.1การปรับสภาพด้วยโอโซน	มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน ไม่ผลิตสารตกค้างที่เป็นพิษต่อกระบวนการต่อไปและปฏิกิริยาสามารถดำเนินได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง	ต้องใช้โอโซนปริมาณมากในกระบวนการปรับสภาพทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง
3.2การปรับสภาพด้วยกรด	สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้	มีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมีและจำเป็นต้องปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนหลังจากปรับสภาพเพื่อไม่ให้ขัดขวางการทำงานของกระบวนการในขั้นต่อไป
3.3การปรับสภาพด้วยด่าง	เป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพใน การย่อยสลายชีวมวล	จำเป็นต้องทำการปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนหลังจากทำการปรับสภาพเพื่อไม่ให้ขัดขวางการทำงานของกระบวนการในขั้นต่อไป
3.4 การออกซิเดชัน	สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไปได้ และปฏิกิริยา สามารถดำเนินได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ และความดันห้อง	สารเคมีที่ใช้มีราคาสูง เช่น H_2O_2
4. ทางชีวภาพ	ใช้พลังงานน้อยไม่ใช้สารเคมีในกระบวนการทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม	อัตราการย่อยสลายที่เกิดขึ้นค่อนข้างต่ำทำให้ต้องใช้เวลานานในการย่อยสลายและใช้พื้นที่ในการผลิตมาก

ที่มา: สุภาวดี (2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX)

การทำให้ชีวมวลสัมผัส กับแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิและความดันสูงในระยะ เวลาหนึ่ง หลังจากนั้นจึงลดความดันลง โดยมีตัวแปร 4 ตัวสำคัญ ในการปรับสภาวะของกระบวนการนี้ให้มีประสิทธิผล ได้แก่ ภาระบรรทุกแอมโมเนีย ภาระบรรทุกน้ำอุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปกระบวนการ AFEX จะใช้แอมโมเนียเหลว ปริมาณ 1-2 กิโลกรัมแอมโมเนียต่อกิโลกรัมชีวมวลแห้ง ที่อุณหภูมิ 60-120 องศาเซลเซียส และความดัน 1.72-2.06 เมกะพาสคาล เป็นเวลา 30นาที กระบวนการนี้สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเปลี่ยนแป้ง เป็นน้ำตาล อย่างไรก็ตาม กระบวนการนี้มีประสิทธิผล น้อยเมื่อใช้ปรับสภาพชีวมวลที่มีองค์ประกอบของลิกนินสูง เช่น หนังสือพิมพ์ (มีลิกนิน 18-30 %) เศษไม้ (มีลิกนิน 25-35 %) นอกจากนี้พบว่ากระบวนการ AFEX มีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำ

2.2.3 การปรับสภาพทางเคมี

2.2.3.1 การปรับสภาพด้วยโอโซน (ozonolysis)

โอโซนสามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ในวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสได้เช่น ฟางข้าวสาลี ชานอ้อย หญ้า พืชถั่ว ไม้สน ก๊าซโอโซนเป็นสาร ออกซิแดนท์ที่ดีสามารถละลายน้ำได้ สามารถเข้าไป แตกโครงสร้างของลิกนินและปลดปล่อยสารประกอบที่ ละลายน้ำได้และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เช่น กรดอะซิติก กรดฟลอมิก ประสิทธิภาพการย่อยสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น เมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยโอโซน ข้อดีของการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ คือ มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน, ไม่ผลิตสารตกค้างที่เป็นพิษต่อกระบวนการต่อไป และปฏิกิริยาสามารถดำเนินได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง อย่างไรก็ตาม ต้องใช้โอโซนปริมาณมากในกระบวนการปรับสภาพทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง

2.2.3.2 การปรับสภาพด้วยกรด (acid hydrolysis)

กรดที่นิยมใช้ได้แก่ กรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริกซึ่งเดิมเคยใช้กรดเข้มข้นในการย่อยลิกโนเซลลูโลส แต่เนื่องจากกรดเข้มข้นเหล่านี้มีฤทธิ์กัดกร่อน มีความเป็นพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องใช้ถังปฏิกิริยาที่ทนทานต่อการกัดกร่อนและมีค่าใช้จ่ายในการคืนสภาพของกรดนั้นสูงมาก ดังนั้นจึงใช้การเจือจางกรดในการปรับสภาพและพบว่ามีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ การย่อยเซลลูโลสได้ การปรับสภาพด้วยการเจือจาง กรดแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ การเจือจางกรดที่อุณหภูมิสูง (>160 องศาเซลเซียส) และการเจือจางกรดที่อุณหภูมิต่ำ (<160 องศาเซลเซียส) ได้ศึกษาการปรับสภาพทลายปาล์มเปล่าด้วยวิธีการเจือจางกรดพบว่าวิธีการนี้มีประสิทธิผลมากโดยใช้กรดซัลฟิวริก 1 % (w/v) ทำปฏิกิริยาภายในเวลา 3 นาทีที่ อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส และทำการย่อยในไมโครเวฟ ถึงแม้ว่าการปรับสภาพด้วยกรดจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้ แต่ถ้าพิจารณาในเรื่องค่าใช้จ่ายพบว่ามีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการปรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพทางกายภาพร่วมกับเคมีนอกจากนี้จำเป็น ต้องปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนหลังจากทำการปรับสภาพ เพื่อไม่ให้ขัดขวางการทำงานของกระบวนการในขั้นต่อไป

2.2.3.3 การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline hydrolysis)

โซเดียมไฮดรอกไซด์และปูนขาวเป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในกระบวนการปรับสภาพด้วยด่าง ซึ่งด่างเหล่านี้สามารถแตกโครงสร้างของลิกนินและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส การปรับสภาพด้วยด่างเป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด รายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ โซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ปริมาณของเซลลูโลสเพื่อขึ้นในขณะที่ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลงนอกจากนี้พบว่า 70% ของเฮมิเซลลูโลสถูกกำจัดภายใน 4 สัปดาห์ ภายใต้การปรับสภาพด้วยด่างที่สภาวะอุณหภูมิห้องและการใช้เอนไซม์ชนิดผสมหลังจากการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยด่างแล้วสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีวมวลได้อย่างมีนัยสำคัญ

2.2.3.4 การกำจัดลิกนินโดยการออกซิเดชัน (oxidative delignification)

การปรับสภาพด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไปได้พบว่าปฏิกิริยาเฟนตัน [ปฏิกิริยาระหว่างเหล็ก(Fe) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เกิดเป็นไฮดรอกซิลเรดิคอล (OH) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ เนื่องจากปฏิกิริยาเฟนตันสามารถย่อยสลายสารประกอบที่เป็นพิษที่เกิดขึ้นได้เช่น ฟูแรน (furan) ฟินอลิก (phenolic) Jain และ Vigneshwaran (2012) ได้ศึกษาผลของการปรับสภาพเซลลูโลสด้วยสารละลาย เฟนตัน พบว่าปฏิกิริยาเฟนตันที่เกิดขึ้นมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพวัตถุดิบให้มีสภาพที่เอนไซม์สามารถเข้าถึงและย่อยสลายได้ดี นอกจากนี้ Sinnaraprasat และ Fongsatitkul (2011) พบว่า ปฏิกิริยาเฟนตันภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ที่อัตราส่วนระหว่าง H_2O_2 : Fe^{2+} เท่ากับ 20 และ COD : H_2O_2 เท่ากับ 130 สามารถย่อยสลายน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มดิบซึ่งมีองค์ประกอบของพวกคาร์โบไฮเดรตและให้ปริมาณน้ำตาลที่สามารถนำไปหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุด

2.2.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ

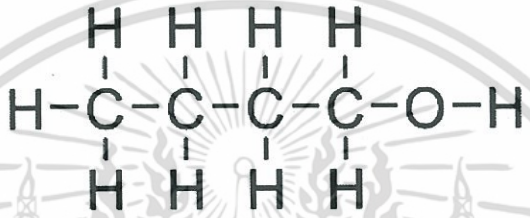
เป็นการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส เช่น brown- fungi, white-fungi, และ soft-rot fungi โดย Dashtban และคณะ (2009) พบว่ารา เช่น *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ extracellular cellulolytic เป็นจำนวนมากในขณะที่แบคทีเรียและราแบบไร้อากาศ 2-3 ชนิด สามารถผลิตเอนไซม์ cellulolytic ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสได้เป็นอย่างดี ข้อดีของกระบวนการนี้คือใช้พลังงานน้อย ไม่ใช้สารเคมีในกระบวนการทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม อัตราการย่อยสลายที่เกิดขึ้นค่อนข้างต่ำทำให้ต้องใช้เวลานานในการย่อยสลายและใช้พื้นที่ในการผลิตมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 บิวทานอล

2.3.1 ข้อมูลทั่วไป

บิวทานอล (IUPAC Nomenclature, 1-butanol; CAS no. 71-36-3) หรือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol) มีองค์ประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 คาร์บอนอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ (4-carbon Aliphatic Alcohol) สายตรง มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น C_4H_9OH น้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล เป็นเชื้อเพลิงชนิดหนึ่ง ถ้าเรียกว่า biobutanol แสดงว่าได้มาจากกระบวนการหมักทางชีวภาพ มีโครงสร้างตามรูปที่ 2.3 (มัณฑนาและคณะ, 2555)



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของบิวทานอล

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/N-Butanol (วันที่สืบค้น 7 ธันวาคม 2557)

2.3.2 คุณสมบัติทั่วไป

บิวทานอลไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำเล็กน้อย (Slightly Hydrophobic Liquid) มีกลิ่นคล้ายคลึงกับกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์รุนแรง ระคายเคืองต่อตาและผิวหนัง มีคุณสมบัติสามารถรวมกับสารทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ แต่สามารถแยกออกจากน้ำ,สารเคมีอื่นๆ ที่เป็นแอลกอฮอล์กลุ่มเดียวกัน คือ เมทานอล (คาร์บอน 1 คาร์บอนเป็นองค์ประกอบ) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (ชนิกาและคณะ, 2555) มีการละลายอย่างจำกัดในน้ำ (มีความสามารถในการละลายน้ำร้อยละ 6.3) เป็นสารประกอบที่มีค่าการหักเหของแสงสูง บิวทานอลประกอบด้วยออกซิเจนประมาณร้อยละ 22 มีความเป็นพิษมากกว่าเมทานอลและเอทานอล มีจุดเดือด 118 องศาเซลเซียส มีจุดหลอมเหลว -89 องศาเซลเซียส มีความหนาแน่น 0.81 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าเมทานอล และเอทานอล แต่น้อยกว่าน้ำ (มัณฑนาและคณะ, 2555)

2.3.2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล

บิวทานอลมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังแสดงตามตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล

คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
สถานะ	ของเหลวใส
สี	ใส ไม่มีสี
กลิ่น-รส	คล้ายเอทานอล
น้ำหนักโมเลกุล	74.12
จุดเดือด	117 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	-89.5 องศาเซลเซียส
ความดันไอ	7.3 มิลลิปรอท ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	0.810 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	0.809-0.812 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่นของไอ	2.6
ความสามารถในการละลายน้ำ	7.7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส
อัตราการระเหย	0.5

ที่มา: วรรณิศาและคณะ (2553)

2.3.2.2 คุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล

บิวทานอลมีชื่อเรียกทั่วไปและทางเคมี ดังแสดงตามตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ชื่อเรียกและสูตรโมเลกุลของบิวทานอล

ชื่อ IUPAC	1-บิวทานอล (1-Butanol)
ชื่อทั่วไป	เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) เอ็นบีเอ (NBA), บิวทิว แอลกอฮอล์ (Butyl alcohol)
ชื่อพ้องอื่นๆ	บิวทาน-1-ออล (Butan-1-ol)
สูตรโมเลกุล	C_4H_9OH

ที่มา: วรรณิศาและคณะ (2553)

2.3.3 ประวัติของการผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการชีวภาพ

การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1861 โดยหลุยส์พาสเตอร์ ต่อมา Schardinger ได้ค้นพบอะซิโตนจากกระบวนการเดียวกันกับหลุยส์พาสเตอร์ ในปี ค.ศ.1905 กระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อันได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยกระบวนการหมักนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเนื่องมาจากปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของการผลิต บีตาไดอีน ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตยางสังเคราะห์ ส่วนอะซิโตนนั้นมีความสำคัญในการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตวัตถุระเบิดในสงครามโลกครั้งที่ 1 ภายหลังสงครามยุติ ความต้องการอะซิโตนจึงลดน้อยลง แต่กลับมีความต้องการอะซิโตนมากขึ้นในอุตสาหกรรมผลิตรถยนต์และอุตสาหกรรมสี

ความสำคัญของกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าว โดยกระบวนการหมักเริ่มลดลงภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่กลับมาเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นในปี ค.ศ.1973 และปี ค.ศ. 1979 เป็นต้นมา เนื่องจากราคาน้ำมันดิบของโลกเริ่มมีราคาสูงขึ้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามกระบวนการหมักดังกล่าวก็ยังมีต้นทุนในการผลิตที่ค่อนข้างสูงอยู่เมื่อเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (สุนทรและอภิชัย, 2555)

2.3.4 ประโยชน์ของบิวทานอล (มัณฑนาและคณะ, 2555)

ไบโอบิวทานอลเป็นบิวทานอลที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นและกระบวนการผลิตทางชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์ได้ในอนาคตอันใกล้ ถึงแม้ว่าในขณะนี้ด้วยเหตุผลหลายประการ เอทานอลยังคงเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่นิยมในปัจจุบันมากกว่าก็ตาม อย่างไรก็ตามบิวทานอลจัดเป็นสารที่มีข้อดีกว่าเอทานอลหลายประการ เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีรวมถึงคุณสมบัติทางระดับพลังงานที่ดีกว่าเอทานอล กล่าวคือไบโอบิวทานอลมีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับ ก๊าซโซลีน (น้ำมันเบนซิน) มากกว่าเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากันเครื่องยนต์จะใช้เอทานอลหมดเร็วกว่าบิวทานอล นอกจากนี้ บิวทานอลมีความเป็นขั้วต่ำกว่าจึงสามารถผสมกับก๊าซโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ การใช้บิวทานอลไม่ต้องปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์มีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนก๊าซโซลีนพบว่าเครื่องยนต์เดินได้ตามปกติ โดยที่มีการใช้บิวทานอลสูงกว่าก๊าซโซลีน 9 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่ารถยนต์ใช้บิวทานอลในปริมาณที่สูงกว่าก๊าซโซลีน แต่พบว่าการใช้ไบโอบิวทานอลมีการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์, ไฮโดรคาร์บอน และการปล่อยสารพิษไนโตรเจนออกไซด์ลดลงมากซึ่งเป็นเรื่องสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมของโลก

นอกจากการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงเหลวใช้กับเครื่องยนต์แล้วบิวทานอลยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีมากมาย บิวทานอลส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ (Ester Derivative) เช่น บิวทิล อะครีเลท (Butyl Acrylate) ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมีเป็นสารเคลือบผิวและเป็นสารผสมในสีนอกจากนี้บิวทานอลยังเป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเป็น ตัวทำละลายสำหรับสารเคลือบไม้และวัสดุต่างๆในอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ (Acid curable lacquers และ Baking finish)

การใช้ประโยชน์จากบิวทานอลและสารประกอบอื่นๆ คือ เป็นทินเนอร์สำหรับผสมสี (Paint thinner) เป็นตัวทำละลายในสี (Solvent for dyes) เช่น หมึกพริ้นท์และเป็นสารสกัดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการผลิตยาและสารธรรมชาติ เช่น ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic), ฮอร์โมน (Hormones) และวิตามิน (Vitamins) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการใช้บิวทานอลในประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น กระจกนิรภัย (Safety Glass) สารทำ ความสะอาด (Detergents), อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น สารตกแต่งตา (Eye Makeup) ยาทาเล็บ, สารในผลิตภัณฑ์การโกนหนวด, ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพอนามัย นอกจากนี้เป็นสารสำหรับการสกัด และอุตสาหกรรมอาหารและกลิ่น

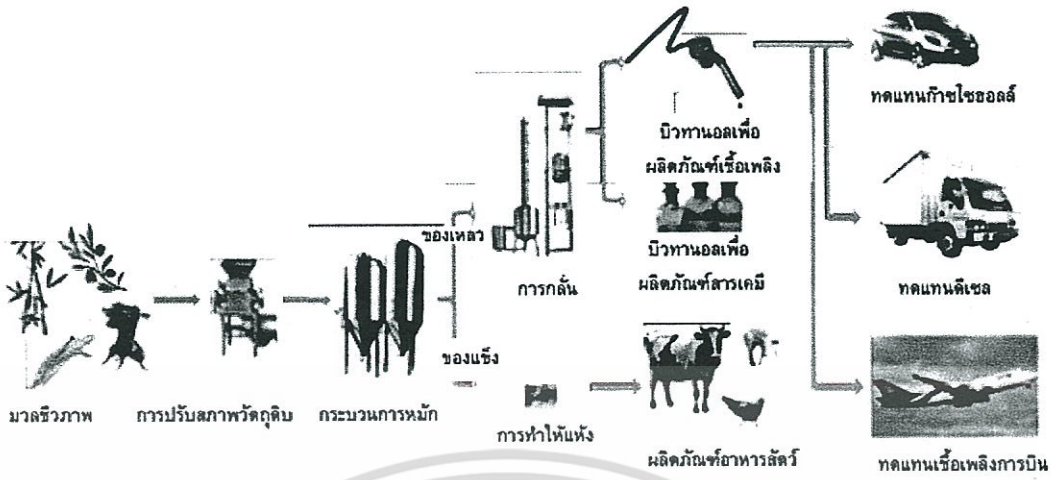
2.3.5 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผ่านกระบวนการที่เรียกว่า อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (acetone-butanol-ethanol, ABE fermentation) ซึ่งใช้แบคทีเรียในการสารดังกล่าวจากสารชีวมวล ทั้งนี้ ABE เป็นกระบวนการที่รู้จักกันดีและเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตอะซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่สอง ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยให้ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในอัตราส่วน 3:6:1 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ในการผลิตโดยเฉพาะ *C. acetobutylicum* ที่เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด รวมทั้งสายพันธุ์ *C. beijerinckii* ก็ถูกใช้ในกระบวนการหมักแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งให้ผลผลิตที่ดีเช่นกัน (สุนทรและอภิชัย, 2555)

Clostridium spp. จัดเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลในภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe) ซึ่งส่งผลดีต่อกระบวนการหมักโดยลดต้นทุนในการใช้ใบพัดเพื่อให้อากาศ แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งกลม และรี สามารถพบได้ในรูปสปอร์กระจายทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ของเสีย ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลสแป้งและน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยเฉพาะบิวทานอล กระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp. พบว่า นอกจากบิวทานอลแล้ว แบคทีเรียยังมีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายอื่น คือ อะซิโตนและเอทานอลเกิดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมบิวทานอล (มัณฑนาและคณะ, 2555)

โดยทั่วไปผลผลิตรวม ABE ของ *Clostridium* spp. มีตั้งแต่ 0.9 จนถึงสูงสุด 20 กรัมต่อลิตร และความสามารถในการผลิต คือ 0.04 จนถึง 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความสามารถในการผลิต ABE ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชีวมวลที่ใช้ อุณหภูมิ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นต้น ความสามารถในการผลิตสารทำละลายต่างๆ ยังอยู่ในปริมาณจำกัด เนื่องจากโดยหลักการแล้วความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจนถึง จุดที่เกิดความเป็นพิษและเมื่อเซลล์มีการสะสมสารพิษเหล่านั้นจนมากพอ เซลล์จะหยุดการเจริญและตายในที่สุด (ชนิกาและคณะ, 2555) กระบวนการผลิตบิวทานอลเป็นไปตามรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

ที่มา: ชนิกาและคณะ (2557)

2.3.6 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก (วรรณิศาและคณะ, 2553)

เพื่อให้มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดและได้ปริมาณบิวทานอลสูง จำเป็นต้องมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในการหมักบิวทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นปัจจัยสำคัญและองค์ประกอบด้านสภาพแวดล้อมอื่นๆ

2.3.6.1 สารตั้งต้น

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักจะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนของ *Clostridium* spp. วัสดุที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลและสารคาร์โบไฮเดรตในรูปต่างๆ ทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและโพลิเมอร์ ซึ่งอาจจำแนกได้ดังนี้ ประเภทที่หนึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวจ้าว ข้าวเหนียว ข้าวโพด มันสำปะหลัง และมันเทศ เป็นต้น ประเภทที่สองเป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ กากน้ำตาล หางนม เป็นต้น และประเภทที่สามเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าวและซังข้าวโพด เป็นต้น

2.3.6.2 ความเข้มข้นของสารอาหาร

ในการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล มีรายงานว่า การกำจัดปริมาณคาร์บอนเป็นอันตรายต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ภายใต้การกำจัดปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณกรดในขั้นตอนสุดท้ายที่เกิดขึ้นจะไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้

2.3.6.3 อุณหภูมิ

Mccutchanhickey (1954) ทำการศึกษาอุณหภูมิในการหมักที่มีผลต่อการผลิตตัวทำละลานอินทรีย์ อัตราผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหมัก มีรายงานว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ผลอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงระหว่าง 30 องศาเซลเซียสและ 33 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส แต่การผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งการทดลองคล้ายกับการทดลองการหมักในอาหารสังเคราะห์ (synthesis medium)

2.3.6.4 ออกซิเจน

O' Brienmorris (1971) ศึกษา *C. acetobutylicum* ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน การเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นในน้ำหนักที่มีความต่างศักย์รีดอกซ์ ในช่วงระหว่าง -250 ถึง -400 มิลลิโวล์ท การสัมผัสกับออกซิเจนในการหมักแบบไร้ออกซเจนไม่เป็นอันตรายถ้าเกิดขึ้นเพียงระยะสั้นๆ อย่างไรก็ตามถ้าน้ำหมักสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณมากๆ (40-60ไมโครโมลาร์) การใช้น้ำตาลกลูโคสของจุลินทรีย์จะลดลง อัตราการเจริญ การสังเคราะห์ดีเอ็นเออาร์เอ็นเอและโปรตีนจะหยุดชะงักภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) จุลินทรีย์จะมีการผลิตบิวทาเรตแต่ไม่ผลิตอะซีเตทหรือมีการผลิตลดลง รวมถึงมีการลดลงของ ATP ในเซลล์ด้วย ซึ่งผลของออกซิเจน คือมีการย้อนกลับของปฏิกิริยาทั้งหมดการเจริญและเมทาบอลิซึม (Metabolism) จะกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อเข้าสู่สภาวะไร้อากาศอีก

2.3.6.5 ระดับความเป็นกรดด่าง (pH)

ในน้ำหมักระดับความเป็นกรดด่างจะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาล หากรักษาค่าระดับความเป็นกรดด่างของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูงๆ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นกรด ในทางตรงกันข้ามถ้ารักษาค่าระดับความเป็นกรดด่างไว้ที่ค่าต่ำๆผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามช่วงของความเป็นกรดด่างที่จะทำให้มีการผลิตตัวสารละลายอยู่ในช่วงกว้าง ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะของการหมักด้วย ช่วงของการหมักที่มีการสร้างตัวทำละลายมักอยู่ในช่วงระดับความเป็นกรดด่าง 3.8 ถึง 5.5

2.3.6.6 วิตามิน

ไบโอติน (biotin) และกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid) มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างอะซีโตน-บิวทานอลซึ่งสารอาหารเหล่านี้มีอยู่ในสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) หรือวัตถุดิบที่ประกอบไปด้วยวิตามินที่จำเป็น (essential vitamin)

2.3.6.7 การกลายพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium* spp.

กลไกการเกิดความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ บ่งชี้ได้จากการสร้างกรดที่มากเกินพอระหว่างการเจริญในช่วงการเติบโตแบบทวีการ (exponential phase) ซึ่ง Eva และคณะ (1995) ได้รายงานว่า *C. beijerinckii* NCIMV 8052 มีการใช้กลูโคสในการหมักซึ่งจะได้กรดอะซิติกและกรดบิวทาริก ในอัตราที่มากกว่าการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ความเป็นกรดด่างลดลงและเซลล์ ไม่สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในช่วงของการผลิตตัวทำละลาย (solventogenesis phase) ได้และมีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

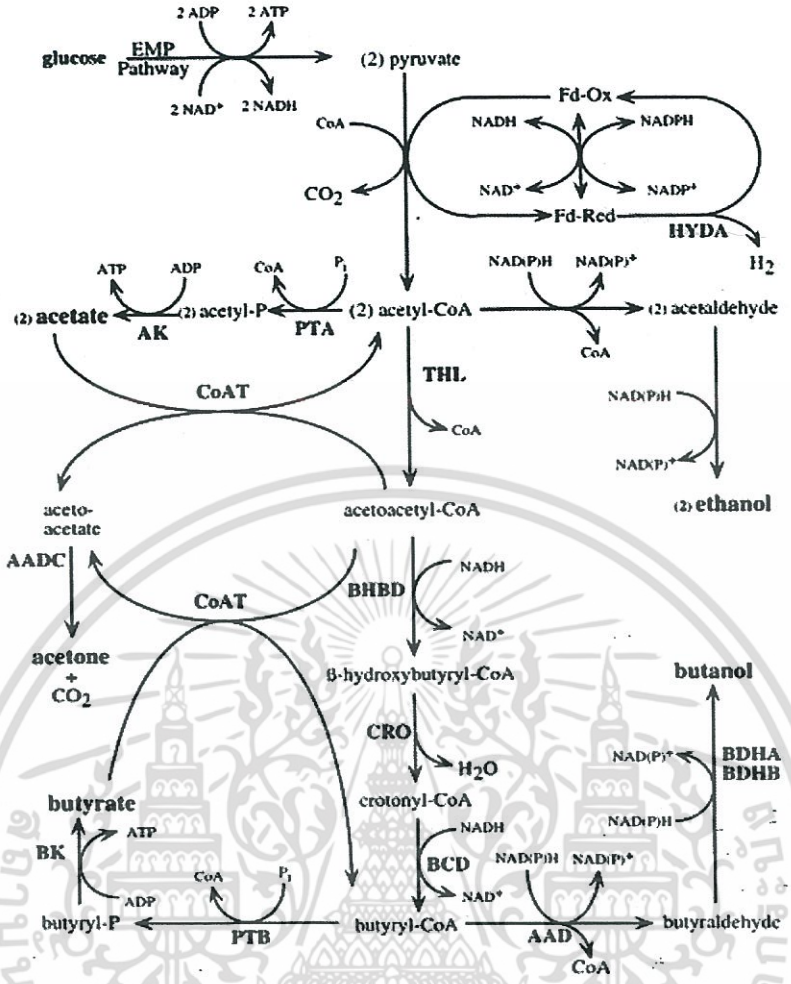
Hughchen ในปี 1995 ได้คัดแยกสายพันธุ์กลายของ *C. beijerinckii* NCIMV 8052 ซึ่งมีความทนทานต่อความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ มีการคาดคะเนว่ายีนควบคุมของ *C. beijerinckii* ที่มีการสูญเสียสภาพแล้วไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ในการเพาะเลี้ยงแบบคีโมสแตท (chemostat) และเซลล์ที่เสียสภาพจะแบ่งตัวอย่างต่อเนื่องในการหมักแบบต่อเนื่องขณะที่เซลล์ที่ไม่เสียสภาพจะหยุดแบ่งตัวแล้วเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอนโดสปอร์

2.3.7 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation)

รูปแบบของการหมักแบบกะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ดังได้กล่าวไปแล้วนั้น วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้ง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนด้วย ทั้งนี้น้ำตาลในกลุ่ม Hexose (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ดังรูปที่ 2.5 ในระหว่างเกิดเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกโดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ NADH + H^+ จำนวน 2 โมเลกุลด้วย ส่วนน้ำตาล Pentose (C5) จะถูก metabolized ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glycoceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์ และ Reduce feredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvate ferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของทุกการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมักโดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริกโดยจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วยซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่กลับไม่ได้ ทั้งนี้กลไกการผลิตแอซิโตนนั้นเพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษและช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ ด้วย ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD^+ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยาโดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.5 วิถีการสร้างอะซีโตนบิวทานอลเอทานอล ของ *Clostridium* sp. ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ ดังนี้ : YDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase), PTA แทนฟอสโฟทรานสอะซีทีเลส phosphotransacetylase) AK แทนอะซีเตทไคเนส (acetate kinase) THL แทนไทโอเลส (thiolase), CoAT แทนอะซีโตอะซีติล-โคเอ:อะซีเตต-บิวทิเรต:โคเอทรานสเฟอเรส (acetoacetate-CoA:acetate-butyrate:CoA transferase) AADC แทนอะซีโตอะซิเตต ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) BHBD แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyryl-CoAdehydrogenase) CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทีริว-โคเอดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase) PTB แทนฟอสโฟทรานสบิวทิเรส (phosphotransbutylase) BK แทนบิวทิเรท ไคเนส (butyrate kinase) AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde/alcohol dehydrogenase) BDHA&BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนสบี (butanol dehydrogenase A & butanol dehydrogenase B)

ที่มา : Ruchirและคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

145350

ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ NADH + H^+ ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD^+ (สุนทรและอภิชัย, 2555) การเปลี่ยนแปลงจากระยะการสร้างกรดไปยังการสร้างสารละลายอินทรีย์เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีน (ศุภลักษณ์ และคณะ 2011)

2.4 *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium sp. มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ พบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน ตามพืชผักต่างๆ บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงรูปด้วยนม และมีเพียง 2-3 สปีชีส์ในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Clostridium botulinum* เป็นสาเหตุสำคัญของโบทูลิซึม (botulism) *Clostridium tetani* ทำให้เกิดโรคบาดทะยัก (Tetanus) และ *Clostridium perfringens* ทำให้เกิดแก๊สแกงกรีน (Gas Gangerene) ลักษณะสำคัญของ *Clostridium* แต่ละสปีชีส์ คือ ความสามารถในการหมักน้ำตาลต่างชนิดกันได้รูปร่างลักษณะของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* แสดงดังรูปที่ 2.6

(ก) (ข)

รูปที่ 2.6 รูปร่างลักษณะของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ก) แบบส่องกราด และ (ข) แบบใช้แสง

ที่มา: http: kodomo.cmm.msu.ru/~ramil.mintaev/projects/C.acetobutylicum/index.php (วันที่สืบค้น 1 ธันวาคม 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Bacteria
Division	:	Firmicutes
Class	:	Clostridia
Order	:	Clostridiales
Family	:	Clostridiaceae
Genus	:	*Clostridium*
Species	:	*Clostridium acetobutylicum*

Clostridium เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน สร้างสปอร์ได้ เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 ไมโครเมตรและกว้าง 0.4-1.2 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้ pertrichous flagella บางโอกาสไม่เคลื่อนที่ สปอร์มีรูปร่างป้อมแบบรูปไข่ บ้างก็เป็นทรงกลม สปอร์ทนความร้อนได้ดีสามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียสได้นานถึง 10-15 นาที การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาพไร้ออกซิเจน บางชนิดเป็นพวกที่ย่อยแป้ง บางชนิดย่อยโปรตีน หรือบางชนิดอาจเป็นทั้งสองอย่างหรือไม่เป็นเลย สามารถหมักน้ำตาลต่างๆ โพลีแอลกอฮอล์ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ พิวรีน และสารอินทรีย์อื่นๆ บางชนิดตรึงแก๊สไนโตรเจนได้ ไม่รีดิวซ์ซัลเฟต ส่วนใหญ่เป็นพวก strictly anaerobic ปกติไม่สร้าง catalase พบทั่วไปในดินตะกอนน้ำจืด และน้ำทะเล และในทางเดินอาหารของคนและสัตว์

2.5 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลส คือ เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ผลิตได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เช่น ข้าวมอลต์ข้าวบาร์เลย์ ใบยาสูบ ไส้เดือนดิน ปลวก หอยทาก แบคทีเรีย และรา เป็นต้น (ตารางที่ 2.5) (Klyosov, 1990) เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) จัดเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุดเนื่องจากสะดวกต่อการสกัดสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ต้นทุนการผลิตต่ำ ทั้งนี้พบว่าสภาพการเพาะเลี้ยงมีผลต่อชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่สร้างขึ้น เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ชนิดและปริมาณของเซลลูโลสที่ใช้ปริมาณเกลือของโลหะต่างๆ สภาพความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและออกซิเจนเป็นต้น (Alexander, 1967)

2.5.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลส ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzyme) ที่ทำงานรวมกัน คือ

2.5.1.1 เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase

ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง เพื่อเป็นสารตั้งต้นของเซลลูเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 เอนไซม์ C_x หรือ β-1, 4 glucanase

เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้กลุ่มนี้มี 3 ชนิดคือ

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

แบคทีเรีย	แอคติโนไมซิส	รา
Clostridium thermocellum	*Streptomyces* sp.	*Acremonium cellulolyticus*
Ruminococcus albus	*Thermoactinomyces* sp.	*Aspergillus acculeatus*
Streptomyces sp.	*Thermononospora curvata*	*Aspergillus fumigatus*
		Aspergillus niger
		Fusarium solani
		Irpex lacteus
		Myrothecium verrucaria
		Penicillium funiculosum
		Phanerochaete sp.
		Trichoderma harzianum
		Trichoderma pseudokonigii

ที่มา : สมรักษ์ (2535)

Endo-β-glucanase (β-D-glucan glucanohydrolase, EC.3.2.1.4) จะทำหน้าที่ย่อย β-1, 4-glycosidic linkage แบบสุ่ม ผลจากการย่อยทำให้สายโมเลกุลของเซลลูโลสสั้นลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่หมู่รีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ได้ผลผลิต คือ กลูโคส และ cellotriose เอนไซม์นี้ไม่ย่อย cellobiose แต่ย่อย cellodextrin, เซลลูโลสที่เกิดการพองตัว (swollen cellulose), carboxymethylcellulose (CMC) และ hydroxyl-ethyl cellulose (HEC) ได้และปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อสายโมเลกุลเซลลูโลสสั้นลง ในการตรวจสอบเอนไซม์นี้จะใช้ CMC และ HEC เป็นสารตั้งต้น

Exo-β-glucanase(1, 4-β-D-glucan cellobiohydrolase EC.3.2.3.91) หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end เอนไซม์นี้สามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึก (crystalline cellulose) หรือเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble cellulose) ได้ผลิตภัณฑ์ เป็น cellodextrin และ cellobiose สามารถตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยการใช้ฝ้ายอวิเซล (avicel) และ amorphous cellulose เป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อขนาดของสารตั้งต้นสั้นลง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อย crystalline cellobiose ได้และจะเกิดปฏิกิริยาต้านการทำงานเมื่อมี endoglucanase ผสมอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

β-glucosidase (β-D-glucohydrolase EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย cellobiose และ cello-oligosaccharide ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสหรือ cellodextrin ได้ ทดสอบเอนไซม์นี้โดยใช้ cellobiose, p-nitrophynyl-β-d-glucoside หรือ salicin เป็นสารตั้งต้น การย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลสแสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 การย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส

ชนิดของเอนไซม์	ชนิดของสารตั้งต้น				
	Crystalline cellulose	CMC	Amorphous cellulose	Cellotetraose	Cellobiose
Endo-β-glucanase	-	+	+	+	-
Exo-β-glucanase	+	-	+	+	-
β-glucosidase	-	-	-	+	+

หมายเหตุ : + ; ย่อยสลายได้ , - ; ย่อยสลายไม่ได้

ที่มา: สมรักษ์ (2535)

2.5.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan และคณะ, 1987)

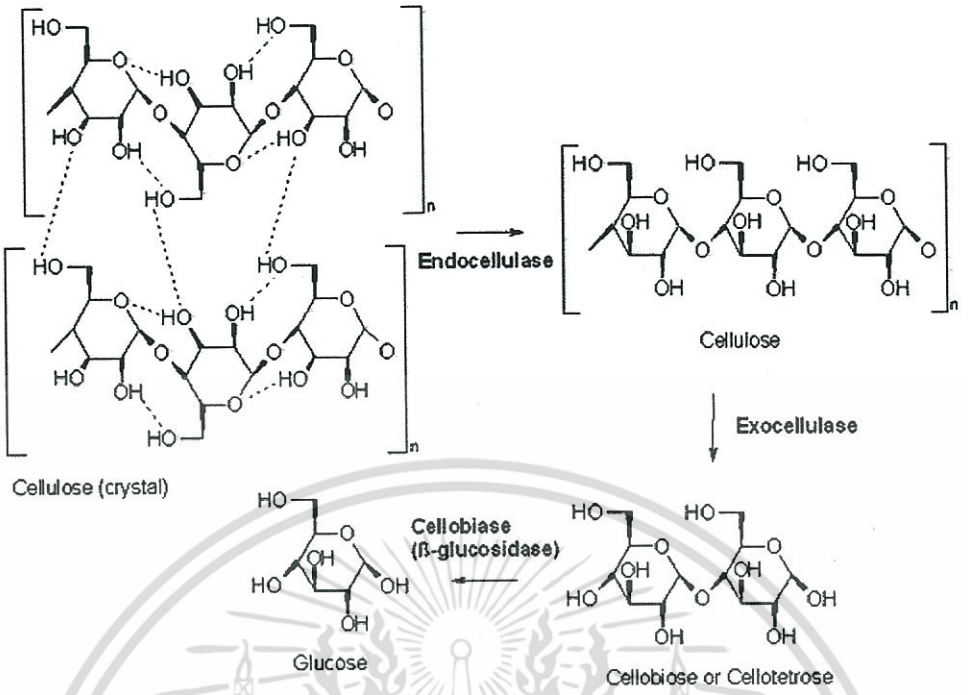
กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็น prohydrolytic step คือสายโซ่anhydroglucose จะถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นที่สอง เกิด hydrolytic cleavage ของสายโพลีเมอร์กลไกการทำงานเริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดบวมตัว (swelling) พร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระ ส่วน exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลายซึ่งถูกย่อยสลายต่อไปโดย β-glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระแสดงในตารางที่ 2.7 และรูปที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ปฏิกิริยาการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ขั้นตอนที่	ปฏิกิริยา
1	Native cellulose $\xrightarrow{\text{Endo}-\beta-\text{glucanase}}$ cellulose
2	Cellulose $\xrightarrow{\text{Exo - }\beta\text{-glucanase}}$ cellobiose
3	Cellobiose $\xrightarrow{\text{Cellobiase}}$ 2 glucose

ที่มา: สมรักษ์ (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase#mediaviewer/File:Types_of_Cellulase2.png (วันที่สืบค้นวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2558)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2013 Alok และคณะรายงานว่า การหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล แบบดั้งเดิมมีข้อจำกัดอย่างมากโดยให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายและอัตราการผลิตต่ำ คณะวิจัยจึงทำการวิจัยที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum* ให้มีความสามารถในการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอลเพิ่มขึ้น ตามมาด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอลให้สูงขึ้นโดยนำ *C. acetobutylicum* PJC4BK ที่กลายพันธุ์แบบสุ่มมาตรวจคัดกรองเซลล์บน plates ที่มี fluoroacetate เพื่อแยกสายพันธุ์กลาย BKM19 ซึ่งแสดงความสามารถในการผลิตตัวทำละลายสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 30.5% สายพันธุ์ BKM19 ผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล 32.5 กรัมต่อลิตร (บิวทานอล 17.6 กรัมต่อลิตร เอทานอล 10.5 กรัมต่อลิตร และอะซิโตน 4.4 กรัมต่อลิตร) จากกลูโคส 85.2 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบแบช แล้วจึงทำการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล อย่างต่อเนื่องด้วยความหนาแน่นเซลล์สูงของ BKM19 ในถังหมักแบบมีการนำเซลล์กลับมาแขวนลอยใหม่เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตตัวทำละลายได้มีการตรวจสอบอัตราการเจือจางที่แตกต่างกันเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมให้ผลิตบิวทานอล และอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล ได้สูงสุด โดยได้อัตราการผลิตบิวทานอลสูงสุดคือ 9.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอะซิโตน-บิวทานอล-เอทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอล 20.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง พบได้จากการใช้อัตราการเจือจางที่ 0.85 ต่อชั่วโมง นอกจากนี้การทดลองนำเซลล์กลับมาแขวนลอยใหม่ ถูกดำเนินการพร้อมกับการปล่อยเซลล์ออกโดยใช้อัตราการปล่อยเซลล์ออกที่แตกต่างกัน 2 อัตรา พบอัตราการผลิตตัวทำละลายสูงสุด จากการใช้อัตราการเจือจางที่ 0.86 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการปล่อยเซลล์ออกที่ 0.04 ต่อชั่วโมงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถผลิต บิวทานอลได้ 10.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล 21.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้ของบิวทานอล 0.17 กรัมต่อกรัม และมีค่าผลได้ของ ABE 0.34 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตบิวทานอลและ ABE ที่ได้รับเป็นอัตราการผลิตที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบจากรายงานที่มีการรายงานมา

Bo (2014) ในการศึกษานี้จะนำเสนอเทคนิคการตรึงเซลล์แบบใหม่ เซลล์ของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 จะสร้างการรวมวัสดุที่มีรูพรุนสูงด้วยวิธีการบ่มที่อุณหภูมิต่ำ (Cryogelation)ที่มีการเชื่อมขวางไปด้วยกับโพลีเอทิลีนเอมีน (polyethyleneimine (PEI)) และ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (poly(vinyl alcohol) (PVA))ที่ผ่านการกระตุ้น เซลล์ไครโอเจล(cryogel)จะแสดงถึงการมีโครงสร้างรูพรุนสูง ยืดหยุ่นและมีผนังที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ถูกเชื่อมโมเลกุลและมีความแน่นหนาสูง กระบวนการตรึงจะรักษาความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเซลล์เกิดใหม่ที่ถูกพบในอาหารเหลวที่บ่มด้วยเม็ดเจล กลูโคสจะถูกใช้และพบการผลิตตัวทำละลาย การผลิตตัวทำละลายถูกปรับปรุงให้ดีขึ้น 2.7 เท่าในเซลล์ตรึงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำเม็ดเจลกลับมาใช้ใหม่ 3-5 ครั้ง ในอาหารบางส่วนหรืออาหารใหม่ทั้งหมด จนได้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงสุดในส่วนที่เป็นของหลว 18.2 กรัมต่อลิตรและค่าผลได้ 0.41 (กรัมต่อกรัม) ในการทดลองหนึ่งรอบ การใช้เซลล์ไครโอเจลอาจจะเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการปรับปรุงกระบวนการผลิตของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (ABE) เมื่อเซลล์ถูกตรึงในโครงสร้างวัสดุที่มีรูพรุนสูงที่มีข้อจำกัดในการถ่ายโอนมวลต่ำและมีศักยภาพในการผลิตที่ให้ค่าผลได้สูง

Yen (2011) ได้ทำการทดลองพัฒนากระบวนการหมักบิวทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ตรึงของ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการแข่งขันทางด้านเศรษฐกิจได้โดยใช้ก้อนอิฐขนาด 0.15-2.4 มิลลิเมตร ที่ทำการตรึงในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด หลังจากนั้นทำการหมักด้วยกัน 6 ครั้ง โดยการหมักแบบแบชทำให้ได้อัตราการผลิตบิวทานอลเฉลี่ย 8.71±6.09 กรัมต่อลิตร และเฉลี่ยที่เวลา 300 นาที จะได้ 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากอัตราการเจือจาง 0.054 ต่อชั่วโมง แต่อัตราการผลิตจะเพิ่มขึ้น 0.108 ต่อชั่วโมง ปริมาณบิวทานอลจะลดลงเหลือ 6.95±0.53 กรัมต่อลิตร จากอัตราการผลิตจะเพิ่มขึ้น 0.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ายิ่งอัตราการเจือจางสูงจะยิ่งทำให้ได้ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ต่ำแต่สามารถสร้างบิวทานอลที่ต้องการในปริมาณที่สูงได้ ซึ่งมีผลต่อทางด้านเศรษฐกิจเนื่องจากการใช้เวลาในการผลิตน้อยลงรวมถึงแรงงานที่ใช้ในการผลิตนี้ด้วยซึ่งการนำอิฐมาใช้ในการตรึงเซลล์ถือเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการผลิตนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Survase และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยของเหลวที่ใช้จากต้นสนในกระบวนการการผลิตกระดาษด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*DSM 792 ทั้งในการหมักแบบกะและการหมักแบบต่อเนื่องเปรียบเทียบการเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 15,25 และ 35 กรัมต่อลิตรซึ่งในการเติมน้ำตาลกลูโคส 35 กรัมต่อลิตรได้ความเข้มข้นสูงสุดของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล คือ 8.79 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปศึกษาในถังปฏิกรณ์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการตรึงเซลล์ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ด้วยการใช้เยื่อไม้ พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลจาก 0.21 เป็น 0.64 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตสารละลายจะเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังสามารถเติมส่วนประกอบของอาหารจากกระบวนการอย่างต่อเนื่อง และน้ำตาลกลูโคสอีก 25 กรัมต่อลิตร ลงในน้ำหมักที่เหลือ แล้วนำไปหมักแบบแบทช์จะทำให้ได้สารละลาย อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล อีกครั้งด้วย

Efremenko (2012) ศึกษาเป็นไปได้ในการปรับสภาพชีวมวลของสาหร่ายต่างๆและไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับการหมักอะซิโตน บิวทาน เอทานอล โดยนำ *Clostridium acetobutylicum* ตรึงเซลล์ไว้กับโพลี (ไวนิลแอลกอฮอล์) ไครโอเจล ด้วยเหตุนี้จึงศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะต่างๆ เทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการปรับสภาพชีวมวลของสาหร่ายสำหรับการเปลี่ยนเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่จะสลายที่ ความร้อน 108 องศาเซลเซียส เป็นครั้งแรกที่มีการผลิตสูงสุดของการหมักอะซิโตน บิวทาน เอทานอล ในแง่ของไฮโดรเจน (8.5 มิลลิโมลต่อวัน) จากการใช้การปรับสภาพชีวมวลของ *Nannochloropsis* sp. อัตราการผลิตของบิวทานอลและเอทานอลสูงสุดที่ทำการทดลองโดยใช้ชีวมวล *Arthrospira platensis* เป็นสารตั้งต้น การตรึงเซลล์ *Clostridium* ได้แสดงให้เห็นถึงการเหมาะที่จะนำมาใช้ซ้ำหลายๆรอบ (อย่างน้อยห้ารอบ) ในการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล สำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากการปรับสภาพชีวมวลของสาหร่าย

เหมือนเดือน และจิรกานต์ (2546) ได้ศึกษากระบวนการหมักบิวทานอลแบบแบช โดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*ATCC824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 4.5-4.8 ใช้มันสำปะหลังสดเป็นวัตถุดิบ ที่ค่าน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ให้บิวทานอลสูงสุด 11.1-11.3 กรัมต่อลิตร การเพิ่มผลผลิตสามารถทำโดยการพัฒนากระบวนการผลิตจากการทดลองหมักอะซิโตน บิวทานอล โดยใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายมันสำปะหลัง กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนกลับของเซลล์ สามารถให้อัตราการผลิตมากกว่า 28 เท่าของแบบแบช พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนกลับของเซลล์ คือ ความเข้มข้นน้ำตาลที่ 52 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.4 ต่อชั่วโมง จะให้อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม 6.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นตัวทำละลายรวม 17.36 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยบิวทานอล 9.89 กรัมต่อลิตร โดยค่าการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นตัวทำละลายรวม 36%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุนธร และคณะ (2555) ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ แอซิโตน บิวทานอลและเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบแบช โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 การทดลองได้ทำการศึกษาผลของการควบคุมค่า pH ที่แตกต่างกันในช่วง pH 4.5-6.5 รวมทั้งทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งมันสาปะหลังในช่วง 20-80 กรัมต่อลิตร ตลอดจนศึกษาผลของการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกันที่มีต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งมันสาปะหลังก่อนนำไปทำการหมักทำให้ได้น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นนั้นไม่ได้มีผลช่วยให้การผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการหมักที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ ขณะที่การย่อยด้วยกรดก่อนนำไปทำการหมักพบว่าให้ผลผลิตที่น้อยกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ 19.48% ส่วนการทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ในช่วงที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) พบว่าที่ pH 5.5 มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด 20.08 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการควบคุมค่า pH ที่สูงกว่า 6.0 ขึ้นไปจะมีการผลิตกรดอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ และมีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และยังพบว่าการควบคุมค่า pH ที่ 5.25 มีการผลิต อะซิโตนสูงสุดถึง 6.78 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้การทดลองที่มีการควบคุม pH ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายอินทรีย์สูงกว่าที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ประมาณ 1.5 เท่า จากผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองในช่วง 20-80 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 60 กรัมต่อลิตร มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด คือ 14.33 กรัมต่อลิตร การใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังที่ต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการผลิตกรดอินทรีย์มากกว่าการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ สาหรับผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันที่มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ 18.46 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกันกับการหมักที่ใช้ยีสต์สกัดทางการค้า ซึ่งผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 20.86 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ คือ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยเก็บกล้าเชื้อในอาหาร Difco™ Reinforced Clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์

3.1.2 สารเคมี

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)
เปปโตน
กรดอะมิโนซิสเทอีน-กรดไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
โซเดียมอะซีเตต (Sodium acetate)
ผงวุ้น (Agar)
น้ำตาลกลูโคส
เคซีน ไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
เรซาซูลิน (Resazurin)
อะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer)
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.1.3 อุปกรณ์

กระบอกตวง
ขวดน้ำกลั่น
ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
ขวดเก็บตัวอย่าง
แอนแอโรบิก จาร์ (Anaerobic jar)
เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
โถดูดความชื้น
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดรูปชมพู่	ตู้เย็น
บีกเกอร์	ตู้อบลมร้อน
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ	ตู้ปลอดเชื้อ
ตะเกียงแอลกอฮอล์	Anaerobic chamber
ลวดเขี่ยเชื้อ	เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)
ช้อนตักสาร	เครื่องปั่นเหวี่ยง
แท่งแก้วคนสาร	เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง
หลอดทดลอง	ถังก๊าซไนโตรเจนและก๊าซผสม
ปิเปต	เครื่องบดอุตสาหกรรม
ลูกยางดูดสาร	หม้อนึ่งอัดไอน้ำ
หลอดปั่นเหวี่ยง	แผ่นดูดออกซิเจน (Anaerobic cult)
จุกสำลี	ออโต้ปิเปตต์
ตระแกรงร่อน เบอร์ 50	คิวเวต

เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography)

3.1.4 ชานอ้อย

สารตั้งต้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้รับความอนุเคราะห์ชานอ้อยจากร้านขายน้ำอ้อย ตลาดเกตุทวีรุ่งเรือง (สาขา1) เขตบึงกุ่มจังหวัดกรุงเทพมหานคร

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร Difco™ Reinforced Clostridial (RCM) เป็นอาหารที่ใช้เก็บรักษาหัวเชื้อของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10.0	กรัมต่อลิตร
กรดอะมิโนซิสเทอีน-กรดไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซีเตต (Sodium acetate)	3.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	0.5	กรัมต่อลิตร

โดยละลายส่วนผสมปริมาณ 38 กรัม เข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และทำการปรับปริมาตรของอาหาร RCM ให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 อาหารกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน (Glucose Yeast extract Casein Cysteine ; GYCC) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจาก Badr และคณะ (2000) ซึ่งมีส่วนผสม ดังต่อไปนี้

น้ำตาลกลูโคส	50.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5.0	กรัมต่อลิตร
เคซีน ไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate)	15.0	กรัมต่อลิตร
กรดอะมิโนซิสเทอีน-ไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.5	กรัมต่อลิตร
เรซาซูลิน (Resazurin)	0.001	กรัมต่อลิตร

โดยละลายส่วนผสมเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรของอาหาร GYCC ให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลแยกสารส่วนประกอบอาหารอื่นๆ และหากใช้ชานอ้อยเป็นสารตั้งต้น จะใช้สารที่ได้จากการย่อยชานอ้อยแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

ทำชุดควบคุมโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่งและไม่มีออกซิเจน ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 50 กรัมต่อลิตร

3.3 การเตรียมชานอ้อย

เตรียมโดยนำชานอ้อยมาตากแดดให้แห้งเป็นเวลา 1 วัน ทำให้มีขนาดเล็กลงโดยการใช้กรรไกรตัดจากนั้นนำไปทำการบดละเอียดต่อด้วยเครื่องบดอุตสาหกรรม แล้วนำชานอ้อยที่ผ่านการบดแล้วมาร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร

3.4 การปรับสภาพชานอ้อย

3.4.1 การปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น

นำตัวอย่างชานอ้อยมาทำการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปกรองต่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนของเหลวที่กรองได้นั้น หลังจากที่กรองเป็นสารละลายใส นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid Method (DNS) (หัวข้อ 3.8.3.1)

3.4.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด

นำตัวอย่างชานอ้อยมาทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปกรองต่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ หลังจากที่กรองเป็นสารละลายใส นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid Method (DNS) (หัวข้อ 3.8.3.1)

3.4.3 การปรับสภาพด้วยสารละลายเบส

นำตัวอย่างมาทำการปรับสภาพด้วยสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซม์ โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปกรองต่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

ส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสโซเดียมไฮดรอกไซม์ ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ หลังจากที่กรองเป็นสารละลายใส นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid Method (DNS) (หัวข้อ 3.8.3.1)

3.5 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง หลังการปรับสภาพ

3.5.1 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแบบปกติ

นำของแข็งชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพไปปรับพีเอชโดยล้างด้วยน้ำกลั่นพีเอช 7 รอบละ 100 มิลลิลิตรต่อ 5 กรัมของของแข็งเริ่มต้น วัดพีเอชทุกรอบจนพีเอชน้ำล้างเท่ากับ 7 จากนั้นบันทึกปริมาตรน้ำที่ใช้

3.5.2 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแบบประหยัดน้ำ

ล้างของแข็งชานอ้อยที่ปรับสภาพจากเบสสลับกรดเพื่อปรับพีเอช โดยล้างด้วยน้ำล้างของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตรต่อ 5 กรัมของของแข็งเริ่มต้น วัดพีเอชทุกรอบ จากนั้นล้างน้ำกลั่นพีเอช 7 ต่อ จนพีเอชน้ำล้างเท่ากับ 7 จากนั้นบันทึกปริมาตรน้ำที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำตัวอย่างของแข็งชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งและบันทึกน้ำหนักของแข็งชานอ้อย

จากนั้นเติมเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ลงในตัวอย่างของแข็งชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยเบส กรด น้ำ ตามลำดับ เติมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 M ที่พีเอช 5.0 ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างของแข็งที่แห้ง 1 กรัม บ่มใน water bath 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS และวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโดยใช้เครื่อง HPLC

3.7 การผลิตบิวทานอล

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อโดยทำการถ่ายเชื้อ *Clostriduim acetobutylicum* DSM 792 ที่เก็บในอาหารเหลว Reinforced clostridial ที่อุณหภูมิ 8องศาเซลเซียสมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว Reinforced clostridial ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยบ่มในแอนแอโรบิกจาร์ (Anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร นำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ซึ่งอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร ที่ได้ต่อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.7.2 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ

ทำการถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 3.7.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในขวดรูปชมพู่อาหาร GYCC ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร(ได้จากขั้นตอนการย่อยของแข็งด้วยเอนไซม์) ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 โดยแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงมาปิเปตใส่หลอดปั่นเหวี่ยง 3 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ความเป็นกรด – ด่าง ด้วยกระดาษวัด pH (pH-indicator strips) หลังจากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงทั้ง 3 หลอดไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และส่วนใสนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS วิเคราะห์หาปริมาณ บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริกด้วยเครื่องHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยนำไปเทียบกับชุดควบคุมที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร

หลังจากทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เสร็จแล้วเติมอาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยเติมอาหารใส่ลงในขวดรูปชมพู่ทั้ง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 มิลลิลิตร เพื่อปรับให้ปริมาตรอาหารเท่าเดิม

3.8.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (proximate analysis)

3.8.1.1 วิเคราะห์หาความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

นำถ้วยอบตัวอย่างชานอ้อยพร้อมฝาอบเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำออกใส่โถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยอบ บันทึกน้ำหนัก ปิดฝาถ้วย นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ขณะอบเปิดฝาถ้วยออก เมื่อครบกำหนดเวลา นำถ้วยออกใส่ในโถดูดความชื้นและปิดฝาถ้วย ปล่อยให้เย็น ชั่งและบันทึกน้ำหนัก นำไปคำนวณร้อยละความชื้น ตามสูตรต่อไปนี้

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{(W_1-W_2)}{W_3} \times 100$$

W_1 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

W_3 คือ น้ำหนักตัวอย่าง

3.8.1.2 วิเคราะห์หาโปรตีน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

การย่อยตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างมา 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย (digestion tube) เติมคะตะลิสต์ลงไป 1 เม็ด และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 20-25 มิลลิลิตร ขึ้นกับปริมาณตัวอย่างที่ใช้ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาจนไม่รุนแรง ตั้งหลอดย่อยใน stand ปิด heat shield สวม exhaust manifold ลงบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนบนของหลอดย่อย ตั้ง stand หลอดย่อย และexhaust ลงบนเครื่องย่อย ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส ย่อยในตู้ดูดควันทำการย่อยจนสารละลายใสมีสีเขียวอ่อนหรือฟ้า ยก stand พร้อมหลอดย่อยตัวอย่างออกปล่อยให้เย็นเพื่อรอนำไปกลั่น

การกลั่น

เปิด Power เครื่องหล่อเย็น จากนั้นเปิดเครื่องกลั่นแล้วตั้งระบบการทำงานของเครื่องกลั่นทำการล้างระบบด้วยน้ำกลั่น ตวงสารละลายบอริกร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมหยดอินดิเคเตอร์ นำหลอดย่อยประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น และวางขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายกรดบอริกไว้บริเวณ Platefrom ให้แท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้กรดบอริก ปิด Safety door ทำการกลั่นเป็นเวลา 4 นาที เมื่อกลั่นเสร็จแล้ว เอาขวดรูปชมพู่ และหลอดย่อยออกจากเครื่อง

ขั้นตอนการไตเตรท

นำสารละลายในขวดขวดรูปชมพู่ไปไตเตรทกับสารละลายซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 N จนได้สารละลายเป็นสีชมพูอ่อน

คำนวณผลการวิเคราะห์ดังนี้

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจน} = \frac{\left(\text{ปริมาตรของ}H_2SO_4\text{ที่ใช้ไตเตรต} - \text{ปริมาตรของ}H_2SO_4\text{ที่ใช้ไตเตรทBlank}\right) \times 0.1 \times 0.014}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ร้อยละโปรตีน = %ไนโตรเจน x 6.25 (conversion factor)

3.8.1.3 วิเคราะห์หาไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

นำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างมา 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงในทิมเบิ้ล เปิดเครื่องสกัดและเครื่องทำความเย็นนำทิมเบิ้ลที่มีตัวอย่างวางลงในที่ใส่ทิมเบิ้ล จากนั้นนำเข้าเครื่องสกัดไขมัน ตวงปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตรเกินพอ ทำการสกัด ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ในฟลาสก์สกัดไขมันที่เหลือใส่บีกเกอร์ที่อบและชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เพื่อระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์เหลือแต่ไขมันที่สกัดได้ นำออกมาใส่โถดูดความชื้นรอจนเย็นจากนั้น นำบีกเกอร์ไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก จากนั้นนำไปคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรคำนวณ

$$\text{ร้อยละไขมัน} = \frac{(W_3-W_2)}{W_1} \times 100$$

W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง

W_2 = น้ำหนักบีกเกอร์

W_3 = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมัน

3.8.1.4 วิเคราะห์หาเยื่อใยหยาบ (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

นำครูซิเบิ้ลแก้วสำหรับวิเคราะห์เยื่อใยไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นแล้วทิ้งให้เย็น ชั่งแล้วบันทึกน้ำหนักไว้ นำตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ความชื้นและสกัดไขมันแล้วใส่ลงไปในครูซิเบิ้ลที่ชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก ประมาณ 1 กรัม วางครูซิเบิ้ลแก้วลงในหลุมที่อยู่บนตัวเครื่องมือสกัดเส้นใยเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.01 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนไว้ก่อนแล้วเทลงในท่อแก้วคอนเดนเซอร์ไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นาน 30 นาที กรองเอาสารละลายออก ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร (ในการล้างแต่ละครั้งให้เปิดลิ้นไปที่ pressure เพื่อให้อากาศผ่านฐานของถ้วยแก้วทำให้ส่วนผสมของถ้วยแก้วคลุกเคล้ากันโดยตลอด) เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.23 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนลงไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นาน 30 นาที กรองเอาสารละลายด่างออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยอะซิโตนอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำกากที่ได้ไปอบต่อที่อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งและบันทึกน้ำหนัก แล้วนำไปคำนวณองค์ประกอบเยื่อใยหยาบตามสูตร ดังนี้

สูตรคำนวณ

$$\text{ร้อยละเยื่อใยหยาบ} = \frac{(F_1-F_2)}{F_3} \times 100$$

F_1 = น้ำหนักของเยื่อใยหยาบรวมกับน้ำหนักเถ้า

F_2= น้ำหนักที่ได้จะเป็นน้ำหนักเถ้า

F_3 = น้ำหนักตัวอย่าง

3.8.1.5 วิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์เยื่อใยหยาบแล้วนำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง รออุณหภูมิลดจนเหลือต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้ถ้วยสัมผัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับอากาศเย็นกะทันหันซึ่งอาจทำให้ถ้วยแตกได้ นำครูซิเบิ้ลออกใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นนำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก แล้วคำนวณปริมาณเถ้าตามสมการต่อไปนี้

สูตรคำนวณ

$$\text{ร้อยละของเถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักครูซิเบิ้ลพร้อมตัวอย่างหลังเผา} - \text{น้ำหนักครูซิเบิ้ล}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (ดัดแปลงจากวิธีของ Van Soest และคณะ, 1991)

3.8.2.1 ปริมาณเฮมิเซลลูโลส

การวิเคราะห์หาปริมาณเฮมิเซลลูโลส สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลาย Neutral detergent กับตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลาย Acid detergent

โดยทำการทดลองโดยทำการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลาย Neutral detergent เพื่อหาร้อยละ NDF (Neutral Detergent Fibers) เริ่มทำการทดลองโดยชั่งตัวอย่างซังข้าวโพดที่แห้งประมาณ 1 กรัม ทำการเติมสารละลาย Neutral detergent 100 มิลลิลิตร โซเดียมซัลเฟต 0.5 กรัม และ ดีคาไฮโดรแนฟทาลีน 2 มิลลิลิตร นำไปต้ม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วไปกรอง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อน 3 – 4 ครั้ง แล้วล้างด้วยอะซิโตน 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) จนแห้งจากนั้นนำตัวอย่างใส่ถ้วยเผาไปอบที่ 100 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำถ้วยเผาออกมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือ ปริมาณ Neutral detergent (NDF)

จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลาย Acid Detergent เพื่อวิเคราะห์หาร้อยละเฮมิเซลลูโลส นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วย Neutral detergent มาทำการต้มด้วย Acid Detergent โดยเติม Acid Detergent 20 มิลลิลิตร และ ดีคาไฮโดรแนฟทาลีน 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเดือด ทำการกรอง แล้วล้างด้วยน้ำร้อน 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย เอทานอล ร้อยละ 80 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำตัวอย่างใส่ถ้วยเผา ไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปวางในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้คือ น้ำหนักของ Acid Detergent fiber (ADF) โดยน้ำหนักที่แตกต่างระหว่าง NDF กับ ADF คือ น้ำหนักเฮมิเซลลูโลส

3.8.2.2 ปริมาณเซลลูโลส

สามารถคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส โดยวิธีวิเคราะห์หา Acid Detergent Lignin (ADL) ทำได้โดยนำครูซิเบิล ที่มีตัวอย่างซึ่งวิเคราะห์หา ADF แล้วมาเติมสารละลาย กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 72 ที่เย็น (อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส) ลงไป ประมาณครึ่งครูซิเบิล จากนั้นนำไปวางลงในถาดสเตนเลส ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่วเพื่อให้ตัวอย่างแยกจากกันไม่จับกันเป็นก้อน โดยมีน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อยู่ในถาดสเตนเลสระดับที่ต่ำกว่าระดับของแผ่นแก้วบอกปริมาตร รักษาอุณหภูมิของครูซิเบิลในถาดสเตนเลสที่ 20 - 23 องศาเซลเซียส คอยเติมสารละลาย กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น72เปอร์เซ็นต์ เมื่อสารละลายในครูซิเบิลแห้ง คนเป็นระยะๆ ใช้เวลาย่อยนาน 3 ชั่วโมงจากนั้นล้างสารละลายกรดออกแล้วล้างด้วยน้ำร้อน โดยใช้น้ำร้อนปริมาณ 1,400 มิลลิลิตร หรือจนหมดกรด จากนั้นใช้ขวดฉีดน้ำร้อน ไล่ตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างครูซิเบิลให้ลงไปใน ครูซิเบิลให้หมด แล้วฉีดล้างครูซิเบิลอีกหนึ่งครั้ง นำครูซิเบิล พร้อมตัวอย่างที่ย่อยแล้ว ไปอบในตู้อบแห้ง (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง และนำออกใส่โถดูดความชื้น (dessicator) ปล่อยให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักและบันทึกไว้ และสามารถคำนวณหาร้อยละเซลลูโลสได้จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละเซลลูโลส} = \frac{(\text{น้ำหนักขั้นตอน ADF และครูซิเบิล} - \text{น้ำหนักครูซิเบิลพร้อมตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.8.2.3 ปริมาณลิกนิน

สามาถรถคำนวณหาปริมาณลิกนินได้โดยการนำครูซิเบิล ที่มีตัวอย่างซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสแล้ว นำไปเผา (ignite) ในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงจากนั้นเอาออกใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักหาลิกนิน

$$\text{ร้อยละลิกนิน} = \frac{(\text{น้ำหนักครูซิเบิลพร้อมตัวอย่างหลังอบ} - \text{น้ำหนักครูซิเบิลพร้อมตัวอย่างก่อนอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.8.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.8.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (Millers, 1959)

นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละการเจือจางมา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้สารละลายกลูโคส

3.8.3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกระดาษวัดpH (pH-indicator strips) ยี่ห้อ McolorpHast™

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.3.3 การวัดความเข้มข้นของน้ำหนักแห้ง

ทำการอบแห้งหลอดปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นใน เดซิเคเตอร์ (desicator) จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักหลอดและปิเปตตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักมาปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมลงไปและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desicator) ทำการชั่งน้ำหนักหลอดและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นหน่วยกรัมน้ำหนักต่อลิตร

3.8.3.4 การวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังปรับสภาพโดยใช้เครื่อง HPLC

นำส่วนใสของตัวอย่างจากหัวข้อ 3.7 ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาทีนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยใช้เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยใช้กลีเซอรอลร้อยละ 5 สำหรับเป็น Internal standard แล้วกรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มี รูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาล ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้ คือ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5mM อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้า

3.8.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลและสารอินทรีย์อื่นๆ

นำส่วนใสของตัวอย่างจากหัวข้อ 3.7 ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที นำมาเจือจางด้วยน้ำ DI ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริกโดยใช้เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยใช้สารละลายกรดซิตริกร้อยละ 2 สำหรับเป็น Internal standard แล้วกรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitorเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้ คือ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5mMอัตราการไหล1.0มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 37องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้วหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งอยู่ในภาคผนวก ข

3.8.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้จากวิธี DNS ค่าพีเอช ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ตรวจได้จากเครื่อง HPLC มาวิเคราะห์เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับสภาพชานอ้อยให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองย่อยวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพชานอ้อยก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ และการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 จากนั้นนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสเป็นชุดควบคุม ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ทำในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซีสเทอีน (Glucose-yeast extract-caseine-cysteine, GYCC) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของชานอ้อย

การวิเคราะห์องค์ประกอบของชานอ้อย ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใยหยาบ และเถ้า ได้ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จาก AOAC (2000) และ ISO 6865 Semi-automatic method พบว่าความชื้นที่ร้อยละ 9.48 และพบมีความชื้นร้อยละ 9.48 มีส่วนประกอบของเยื่อใยหยาบมากที่สุดคือร้อยละ 25.01 รองลงมาคือเถ้า และไขมันคือร้อยละ 2.35 และ 0.80 ตามลำดับ ไม่พบโปรตีน ส่วนที่เป็นลิกโนเซลลูโลส ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์มาจากวิธีของ Van Soest, P.J. และคณะ (1991) ซึ่งพบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลสมากที่สุดคือร้อยละ 26.92 รองลงมาคือเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 18.03 และ 2.90 ตามลำดับ ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของชานอ้อยที่ใช้ในการทดลอง

องค์ประกอบ	สัดส่วน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ความชื้น	9.48
โปรตีน	0.00
ไขมัน	0.80
เยื่อใยหยาบ	25.01
เถ้า	2.35
เซลลูโลส	26.92
เฮมิเซลลูโลส	18.03
ลิกนิน	2.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเซลลูโลสคือส่วนที่สามารถนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ จากตารางที่ 4.1 พบว่าตัวอย่างชานอ้อยที่นำมาทำการทดลองมีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลสเพียงร้อยละ 26.92 เท่านั้น โดยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่หาองค์ประกอบชานอ้อยของ ฉวีวรรณ (2552) พบว่ามีองค์ประกอบที่คิดเป็นสัดส่วนร้อยละโดยน้ำหนัก เซลลูโลสเท่ากับ 47.0 ลิกนินเท่ากับ 19.5 เฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 25.1 แต่ในส่วนประกอบอื่นๆ มีค่าสัดส่วนขององค์ประกอบใกล้เคียงกันกับตัวอย่างที่นำมาทดลอง ซึ่งผลการวิเคราะห์องค์ประกอบที่ได้อาจคาดเคลื่อนเนื่องจากปริมาณเซลลูโลสในต้นพืชมีความแตกต่างตามอายุของต้นพืช การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์พืช และสายพันธุ์ของพืช

มีรายงานว่าแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ไม่มีความสามารถในการย่อยวัตถุดิบที่มีปริมาณเส้นใยสูงๆได้ เนื่องจากไม่มีความสามารถในสร้างเอนไซม์จำพวกเซลลูเลสที่ใช้ย่อยวัตถุดิบที่เป็นเส้นใยได้ จากการศึกษาของ Madihahและคณะ (2008) พบว่าแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยแป้งได้ เช่น Amylase, Glucoamylase และ Pullulanase อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของเอนไซม์ในแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* นั้น จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตลอดจนความสามารถในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ด้วย (สุทร , 2555) ดังนั้น ชานอ้อยซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสอยู่ประมาณร้อยละ 26.92 โดยน้ำหนัก ดังตารางที่ 4.1 ถูกพิจารณานำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เพื่อใช้ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ แต่เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ ไม่สามารถใช้วัตถุดิบที่เป็นเส้นใยได้ ต้องทำการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อให้ได้น้ำตาล ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป

4.2 การปรับสภาพชานอ้อยก่อนการย่อย

การปรับสภาพวัตถุดิบมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินซึ่งมีสมบัติไปห่อหุ้มหรือเคลือบโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินจึงเป็นเหมือนผนังป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสและ เฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัตถุดิบและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (สุภาวดี , 2557)

4.2.1 ผลของสารละลายกรดและเบสต่อการปรับสภาพชานอ้อย

เพื่อศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ออกมาพร้อมกับของเหลวหลังการปรับสภาพชานอ้อยทำการทดลองโดยนำส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ และส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ผลแสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน

ความเข้มข้น (โมลาร์)	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนชานอ้อย (กรัมต่อลิตร)		
	สารละลายกรด (H_2SO_4)	สารละลายเบส (NaOH)	น้ำกลั่น
0.0	-	-	16.98 ±0.61
0.2	45.91 ±2.84	1.64 ±0.19	-
0.4	41.79 ±0.47	2.37 ±0.08	-
0.6	47.45 ±0.57	1.22 ±0.04	-
0.8	43.34 ±0.49	1.07 ±0.06	-
1.0	49.48 ±1.27	1.35 ±0.58	-

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

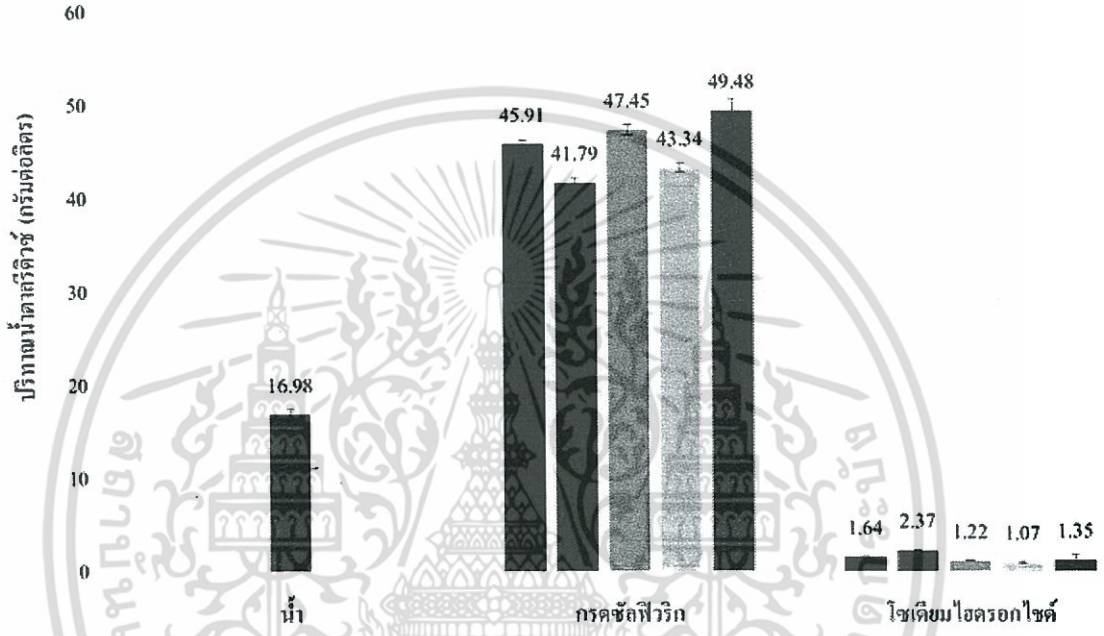
จากตารางที่ 4.2 พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใสของตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกพบว่ามีปริมาณน้ำตาลมากที่สุดเมื่อใช้กรดความเข้มข้นกรด 1 โมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 49.48 (กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใสของตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นมีค่าเท่ากับ 16.98 (กรัมต่อลิตร) และพบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดคือส่วนใสของตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่ามีปริมาณน้ำตาลมากที่สุดเมื่อใช้เบสความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.37 (กรัมต่อลิตร) ซึ่งเมื่อนำความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใสที่ผ่านการปรับสภาพของทั้งกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่นมาเปรียบเทียบกัน ก็จะพบว่าปริมาณน้ำตาลที่ออกมากับในส่วนใสของกรดซัลฟิวริกมีมากกว่า โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่นในทุกๆความเข้มข้น และออกมาในปริมาณที่สูง ซึ่งหมายความว่าตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดสูญเสียน้ำตาลรีดิวซ์ไปกับขั้นตอนการปรับสภาพสูงมากที่สุด รองลงมาคือน้ำกลั่นและ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ตามลำดับ เพราะสารละลายกรดซัลฟิวริกสามารถย่อยลิกโนเซลลูโลสได้ทำให้มีน้ำตาลรีดิวซ์ออกมากับส่วนที่เป็นส่วนใสมากที่สุด แต่ถ้าหากปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะเป็นเพียงการแตกโครงสร้างของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสเท่านั้น จึงทำให้มีน้ำตาลรีดิวซ์ออกมากับส่วนใสน้อยที่สุด

ดังนั้นจากตารางที่ 4.2 กรดซัลฟิวริกนั้นย่อยส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสไปบางส่วน ซึ่งส่งผลให้ส่วนที่เป็นตะกอนของชานอ้อยจะพบเซลลูโลสน้อยลง เมื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การศึกษาการปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนการย่อยให้ประหยัดน้ำ

ในการศึกษาจะนำตัวอย่างมาทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของแข็งกรดและด่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นพีเอช 7 หาปริมาตรน้ำล้างที่ใช้ ผลแสดงดังตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนชานอ้อยหลังผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นดังนี้ (■) 0.2 โมลาร์ (■) 0.4 โมลาร์ (■) 0.6 โมลาร์ (■) 0.8 โมลาร์ (■) 1.0 โมลาร์

จากตารางที่ 4.3 พบว่าตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ใช้ปริมาณน้ำล้างมากที่สุดคือ 700 มิลลิลิตร รองลงมาคือตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ มีค่าเท่ากับ 400 มิลลิลิตร และตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นใช้ปริมาตรน้ำล้างน้อยที่สุดคือ 350 มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าน้ำล้างตะกอนของแข็งกรดและเบสใช้ประมาณน้ำล้างรวมกันเฉลี่ยที่ 1,100 มิลลิลิตร ผู้ทำการทดลองจึงทำการทดลองเปรียบเทียบกับวิธีล้างน้ำเบสสลับกรดเพื่อหาวิธีที่ประหยัดน้ำล้างตะกอนของแข็งมากที่สุด

เมื่อนำตะกอนของแข็งชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ มาล้างน้ำกลั่นพีเอชเท่ากับ 7 ใน 2รอบแรก นำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำล้างที่ได้มาผสมกัน แล้วนำไปล้างแบบสลับ ทำการวัดพีเอชน้ำล้างทุกรอบจนน้ำล้างตะกอนของแข็งกรดและเบสมีพีเอชเท่ากับ 7 บันทึกปริมาตรน้ำที่ใช้ ผลดังตารางที่ 4.4

จากการทดลองนำตะกอนของแข็งชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกและสารละลายโซเดียมไฮดอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ มาล้างแบบเบสสลับกรดในครั้งที่1 โดยล้างน้ำกลั่นพีเอช7 ใน 2 รอบแรก นำน้ำล้างของกรดและเบสในรอบที่ 2 มาผสมกันได้พีเอชน้ำล้างผสมที่มีพีเอชเท่ากับ3 จากนั้นนำน้ำล้างผสมพีเอช3 นี้ ไปล้างตะกอนของแข็งเบสในรอบที่ 3 ได้พีเอชน้ำล้างเท่ากับ 3 ล้างตะกอนของแข็งเบสต่อด้วยน้ำกลั่นพีเอช7 อีก ในรอบที่4 และ 5 ทำให้ได้พีเอชน้ำล้างเท่ากับ 7 จากนั้นนำน้ำล้างพีเอชเท่ากับ 7 นี้กลับไปล้างของแข็งกรดในรอบที่3 ทำให้ได้พีเอชน้ำล้างเท่ากับ 5 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นพีเอช 7 อีกในรอบที่ 4, 5 และ 6 จนได้พีเอชเท่ากับ 7 บันทึกปริมาตรน้ำล้างที่ใช้ในครั้งที่ 1 พบว่าปริมาตรน้ำล้างที่ใช้รวมทั้งหมดเท่ากับ 900 มิลลิลิตร ในครั้งที่ 2 ทำเช่นเดียวกันนี้อีกกับข้างต้นที่กล่าว พบว่าปริมาตรน้ำล้างที่ใช้รวมทั้งหมดเท่ากับ 900 มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.3 ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้ล้างตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และน้ำกลั่น พร้อมค่าความเป็นกรดด่างที่ได้

พีเอชของแข็งที่ปรับสภาพด้วย / ล้างรอบที่	กรดซัลฟิวริก		โซเดียมไฮดรอกไซด์		น้ำกลั่น	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	1.5	1.8	12.1	12	5	5.8
2	2.4	2.5	11.19	10	5	6.3
3	4.0	4.5	8.6	9	6	7
4	5.0	5.2	7	7	7	-
5	5.8	6.0	-	-	-	-
6	5.9	7.0	-	-	-	-
7	6.0	-	-	-	-	-
8	7.0	-	-	-	-	-
ปริมาตรน้ำที่ใช้รวม (มิลลิลิตร)	800	600	400	400	400	300
ปริมาตรน้ำเฉลี่ย (มิลลิลิตร)	700		400		350	

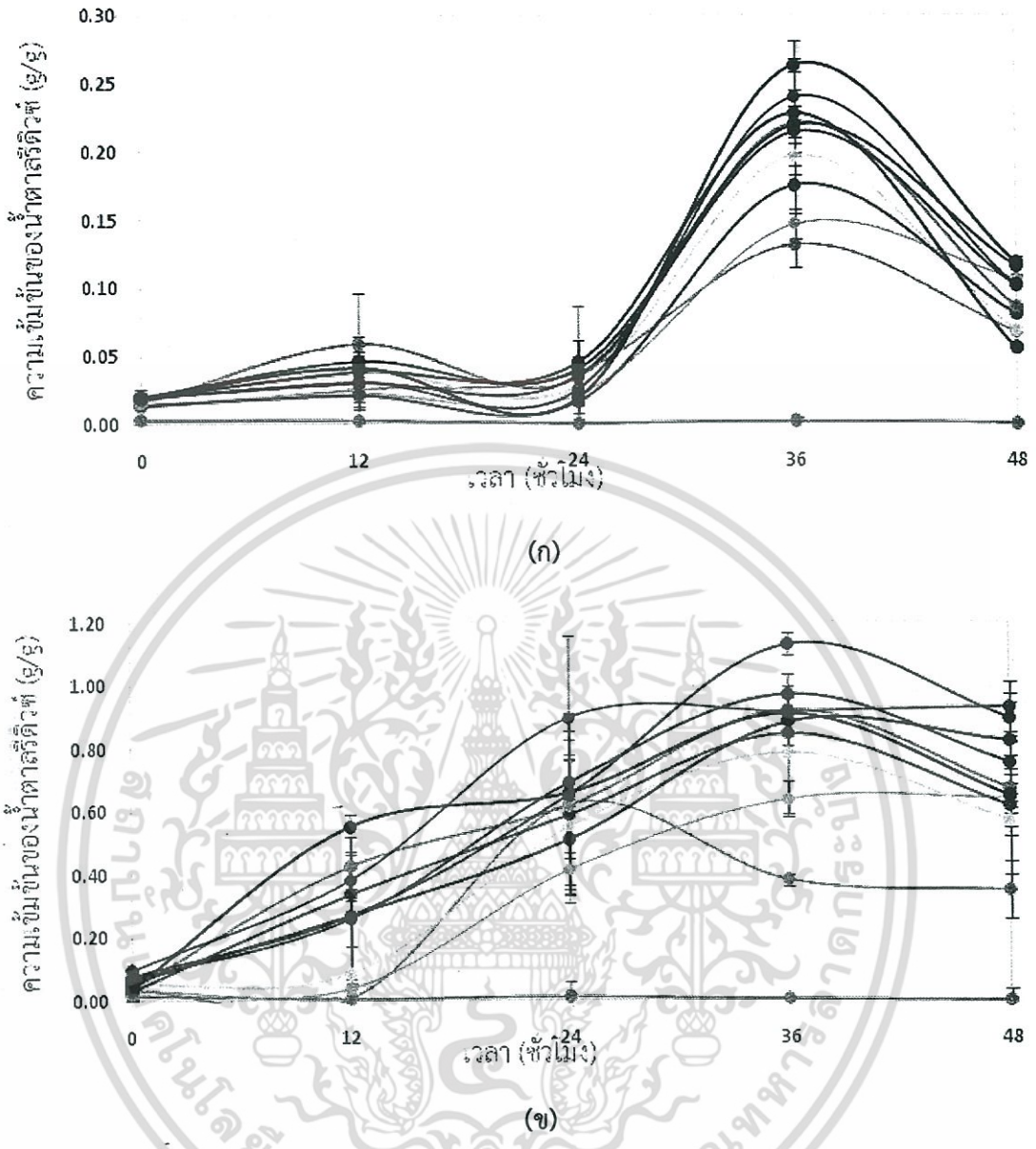
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้ในการล้างสลับระหว่างตะกอนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ พร้อมค่าความเป็นกรดด่างที่ได้

รอบ	ครั้งที่ 1			ปริมาตรน้ำล้างรวม (มิลลิลิตร)	ครั้งที่ 2			ปริมาตรน้ำล้างรวม (มิลลิลิตร)
	pH น้ำล้างของแข็งกรด	pH น้ำล้างของแข็งเบส	pH น้ำล้างผสม		pH น้ำล้างของแข็งกรด	pH น้ำล้างของแข็งเบส	pH น้ำล้างผสม	
1	1	12	2	200	1	12	2	200
2	2	10	3	200	2	10	3	200
3	5	3	-	-	5	5	-	-
4	5	5	-	200	6	5	-	200
5	6	7	-	200	6	7	-	200
6	7	-	-	100	7	-	-	100
ปริมาตรน้ำที่ใช้รวมทั้งหมด	900				900			

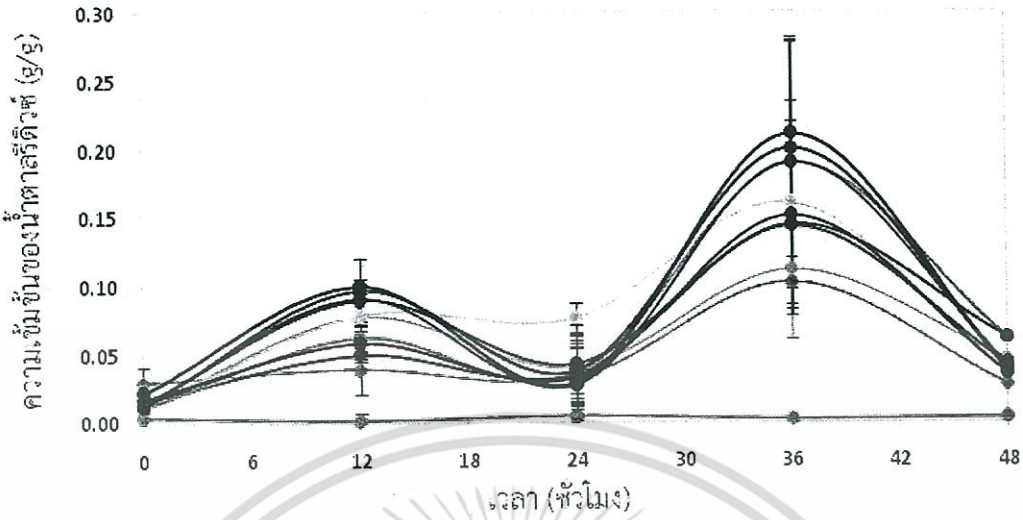
ดังนั้นจากตารางที่ 4.4 พบว่าสามารถประหยัดน้ำที่ใช้ตะกอนของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ได้ถึง 200 มิลลิลิตรเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำล้างแบบปกติในตารางที่ 4.3 แต่เนื่องด้วยการล้างแบบเบสสลับกรดมีความยุ่งยากในการดำเนินการและใช้เวลามากกว่าแบบปกติ ผู้ทำการทดลองจึงเลือกใช้วิธีการล้างตะกอนของแข็งชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการแบบปกติเพื่อลดปัญหาดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วย (ก) สารละลายกรดซัลฟิวริก (ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ (ค) น้ำกลั่นด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE 1500 อัตราส่วนต่างๆกันที่ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ต่อชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัมดังนี้ (—●—) 0.0 มิลลิลิตร (—●—) 0.1 มิลลิลิตร (—●—) 0.2 มิลลิลิตร (—●—) 0.3 มิลลิลิตร (—●—) 0.4 มิลลิลิตร (—●—) 0.5 มิลลิลิตร (—●—) 0.6 มิลลิลิตร (—●—) 0.7 มิลลิลิตร (—●—) 0.8 มิลลิลิตร (—●—) 0.9 มิลลิลิตร (—●—) 1.0 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)

รูปที่ 4.2 (ต่อ) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วย (ก) สารละลายกรดซัลฟิวริก (ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ (ค) น้ำกลั่นด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE 1500 อัตราส่วนต่างๆกันที่ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ต่อชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัมดังนี้ (—●—) 0.0 มิลลิลิตร (—●—) 0.1 มิลลิลิตร (—●—) 0.2 มิลลิลิตร (—●—) 0.3 มิลลิลิตร (—●—) 0.4 มิลลิลิตร (—●—) 0.5 มิลลิลิตร (—●—) 0.6 มิลลิลิตร (—●—) 0.7 มิลลิลิตร (—●—) 0.8 มิลลิลิตร (—●—) 0.9 มิลลิลิตร (—●—) 1.0 มิลลิลิตร

4.3 การย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.3.1 การเปรียบเทียบอัตราส่วนเอนไซม์ต่อชานอ้อย

หลังจากทำการปรับสภาพตัวอย่างชานอ้อยแล้ว ผู้ทำการทดลองเลือกนำตะกอนของแข็งชานอ้อยไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ โดยนำของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเติมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 5.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างของแข็งแห้ง 1 กรัม เติมเอนไซม์ ACCELLERASE1500 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนเอนไซม์โดยปริมาตรต่อกรัมน้ำหนักแห้ง 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม พร้อมกับปรับปริมาตรของอะซิเตตบัฟเฟอร์ให้ครบตามปริมาตรเอนไซม์

นอกจากนั้นจากการทดลองพบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนทำการย่อย จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกในการปรับสภาพ ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากส่วนของเหลว โดยของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดนั้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าของเหลวที่ผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปรับสภาพด้วยสารละลายเบส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายกรดนั้นย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดได้มากกว่าสารละลายเบส จึงทำให้เหลือองค์ประกอบในส่วนตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดน้อยกว่าตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส เมื่อนำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจึงได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดน้อยกว่าตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสที่ใส่ลงไป นำไปผสมและบ่มใน water bath 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลด้วย HPLC ผลเป็นตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.2

ผลของการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพชานอ้อยด้วยอัตราส่วนเอนไซม์ที่แตกต่างกันพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก พบค่ามากที่สุดเมื่อใช้ปริมาตรเอนไซม์เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร ในขณะที่พบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยชานอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์มากที่สุดเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นมีมากที่สุดเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.2 และค่าดังตารางที่ 4.8

ปริมาณเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตร เวลา 36 ชั่วโมงมากที่สุด รองลงมากรดซัลฟิวริก และน้ำกลั่นให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.2627 และ 0.2111 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร เวลา 36 ชั่วโมง มากที่สุดเช่นเดียวกัน

จากผลงานวิจัยของกระทรวงพลังงาน (2552) พบว่าเซลลูโลสจะถูกสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลสให้ได้เป็นเซลโลไบโอส แล้วต่อมาเซลโลไบโอสจะถูกสลายโดยเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสให้ได้เป็นกลูโคส แต่ปัญหาของการย่อยสลายเซลลูโลสคือ การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสถูกยับยั้งเมื่อมีเซลโลไบโอสสะสมอยู่มากๆ ดังนั้น การที่ตัวอย่างที่ย่อยได้ดีที่สุดเมื่อเวลาบ่มเท่ากับ 36 ชั่วโมง จากนั้นน้ำตาลลดลงในชั่วโมงที่ 48 นั้นเพราะอาจเกิดจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ (Product inhibition) และการใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ตารางเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์กับเวลาของ กรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ในปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

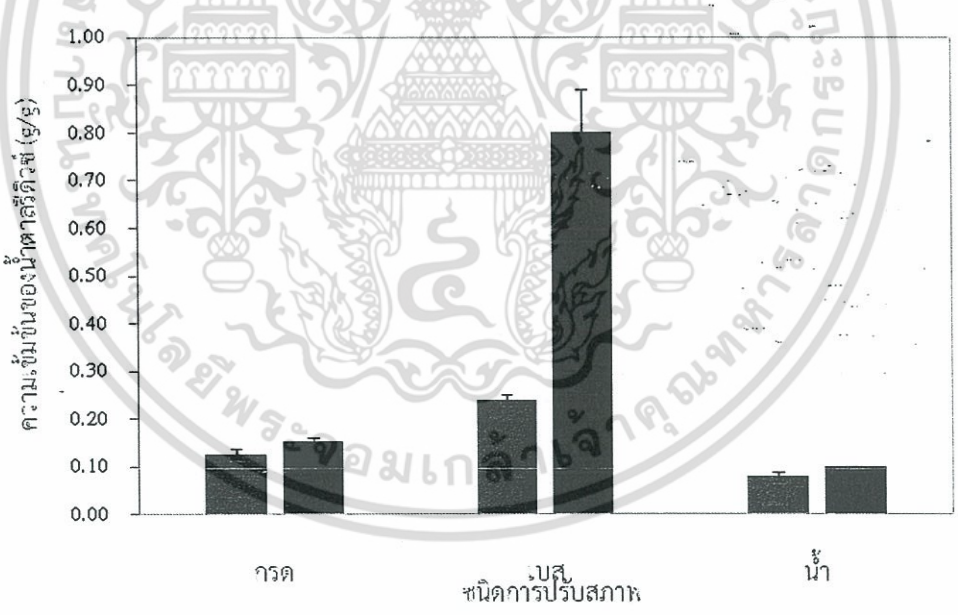
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอนไซม์ (mL) / การปรับสภาพ	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์(กรัม/กรัม)										
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
0	H_2SO_4	0.0035^{a}	0.0132^{b}	0.0145^{b}	0.0170^{bcd}	0.0147^{b}	0.0157^{bc}	0.0202^{d}	0.0205^{d}	0.0195^{cd}	0.0196^{cd}	0.0199^{cd}
	NaOH	0.0202^{a}	0.0363^{bc}	0.0337^{ab}	0.0516^{cd}	0.0334^{ab}	0.0408^{bc}	0.0594^{de}	0.0682^{fg}	0.0773^{g}	0.0978^{h}	0.0417^{bc}
	น้ำกลั่น	0.0039^{a}	0.0204^{cd}	0.0117^{b}	0.0130^{b}	0.0149^{bc}	0.0142^{bc}	0.0138^{bc}	0.0171^{bcd}	0.0177^{bcd}	0.0156^{bc}	0.0230^{d}
12	H_2SO_4	0.0029^{a}	0.0255^{ab}	0.0221^{ab}	0.0399^{bc}	0.0213^{ab}	0.0590^{c}	0.0389^{bc}	0.0462^{bc}	0.0302^{b}	0.0309^{b}	0.0419^{bc}
	NaOH	0.0086^{a}	0.0060^{a}	0.0395^{a}	0.0874^{ab}	0.3386^{c}	0.4262^{bc}	0.2708^{bc}	0.2593^{bc}	0.2685^{bc}	0.3822^{cd}	0.5529^{d}
	น้ำกลั่น	0.0054^{a}	0.0390^{b}	0.0776^{cd}	0.0788^{cd}	0.0501^{b}	0.0624^{bc}	0.0967^{d}	0.0582^{bc}	0.0896^{d}	0.0911^{d}	0.1005^{d}
24	H_2SO_4	0.0000^{a}	0.0375^{bc}	0.0205^{abc}	0.0272^{bc}	0.0162^{ab}	0.0333^{bc}	0.0450^{c}	0.0397^{bc}	0.0350^{bc}	0.0250^{abc}	0.0188^{abc}
	NaOH	0.0138^{a}	0.4226^{b}	0.4140^{b}	0.5497^{bcd}	0.5902^{bcd}	0.6185^{bcd}	0.5117^{bc}	0.6896^{cd}	0.6521^{cd}	0.7454^{d}	0.6585^{cd}
	น้ำกลั่น	0.0048^{a}	0.0323^{ab}	0.0403^{b}	0.0769^{c}	0.0360^{ab}	0.0349^{ab}	0.0374^{ab}	0.0329^{ab}	0.0428^{b}	0.0274^{ab}	0.0296^{ab}
36	H_2SO_4	0.0020^{a}	0.1309^{b}	0.1465^{b}	0.1961^{cd}	0.1748^{c}	0.2209^{de}	0.2279^{e}	0.2186^{de}	0.2143^{de}	0.2398^{ef}	0.2627^{g}
	NaOH	0.0049^{a}	0.3816^{b}	0.6368^{c}	0.7846^{d}	0.8465^{de}	0.9198^{ef}	0.8846^{def}	0.9700^{f}	1.1299^{g}	0.9154^{ef}	0.9092^{ef}
	น้ำกลั่น	0.0020^{a}	0.1023^{b}	0.1118^{bc}	0.1608^{bcd}	0.1436^{bc}	0.1794^{bcd}	0.1598^{bcd}	0.1514^{bcd}	0.1448^{bc}	0.1904^{cd}	0.2311^{d}
48	H_2SO_4	0.0001^{a}	0.0675^{c}	0.1068^{g}	0.0687^{c}	0.0807^{d}	0.0857^{e}	0.0558^{b}	0.1158^{h}	0.1015^{f}	0.1017^{f}	0.1187^{h}
	NaOH	0.0000^{a}	0.3482^{b}	0.6396^{cd}	0.5706^{c}	0.6176^{cd}	0.6715^{cd}	0.8251^{ef}	0.7536^{de}	0.8959^{ef}	0.9298^{f}	0.6488^{cd}
	น้ำกลั่น	0.0032^{a}	0.0273^{b}	0.0459^{g}	0.0353^{c}	0.0429^{f}	0.0620^{h}	0.0409^{e}	0.0359^{c}	0.0620^{h}	0.0423^{f}	0.0383^{d}

หมายเหตุ : a, b, c, d, e, f, g, h, i, j ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3.2 ผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เพื่อทดสอบการส่งผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยผู้ทำการทดลองเลือกใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอชที่พีเอช 5.0 เปรียบเทียบกับการไม่ใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ เติมลงในตัวอย่างของแข็งแห้ง 1 กรัม เติมเอนไซม์ ACCELLERASE1500 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในตะกอนของแข็งที่ผ่านปรับสภาพด้วยกรดและน้ำกลั่น และเติมเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักแห้งในตะกอนของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส ปรับปริมาตรให้ครบตามปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ไป นำไปผสมและบ่มใน water bath 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ผลแสดงดังรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.6

เป็นกราฟแสดงความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELERASE 1500 ที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซค์และน้ำกลั่น จะเห็นได้ว่าการใช้บัฟเฟอร์นั้นมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการไม่ใช้บัฟเฟอร์ โดยการปรับสภาพด้วยเบสให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.80 กรัมต่อกรัม ส่วนการปรับสภาพด้วยกรดให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.15 กรัมต่อกรัม และการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.10 กรัมต่อกรัมซึ่งจะเห็นได้ว่าการปรับสภาพด้วยเบสนั้นมีประสิทธิภาพดีสุด ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE 1500 ย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น โดย (■) ไม่ใช้บัฟเฟอร์ และ (■) ใช้บัฟเฟอร์ ร่วมกับเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE 1500 ที่สภาวะ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัม)		
	กรดซัลฟิวริก (1 M)	โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 M)	น้ำกลั่น
บัฟเฟอร์	0.15 ± 0.01^{b}	0.80 ± 0.09^{b}	0.10 ± 0.00^{b}
ไม่ใช้บัฟเฟอร์	0.13 ± 0.01^{a}	0.24 ± 0.01^{a}	0.08 ± 0.01^{a}

หมายเหตุ : a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3.3 ผลของความเข้มข้นสารละลายกรดและเบสที่ใช้ในการปรับสภาพต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ เซลลูเลส

เมื่อทราบอัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ เวลาที่เหมาะสมในการย่อยชานอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE 1500 อัตราส่วนต่างๆกันที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อทดสอบว่าหาความเข้มข้นที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ผลแสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELERASE 1500 ย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารลายกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นที่ 0.2 - 1 โมลาร์

ความเข้มข้น (โมลาร์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/กรัม)	
	กรดซัลฟิวริก	โซเดียมไฮดรอกไซด์
0.2	0.24 ± 0.01^{b}	0.52 ± 0.01^{a}
0.4	0.30 ± 0.02^{c}	0.82 ± 0.00^{b}
0.6	0.26 ± 0.02^{b}	0.95 ± 0.01^{bc}
0.8	0.20 ± 0.04^{a}	0.87 ± 0.00^{b}
1.0	0.18 ± 0.01^{a}	1.09 ± 0.20^{c}

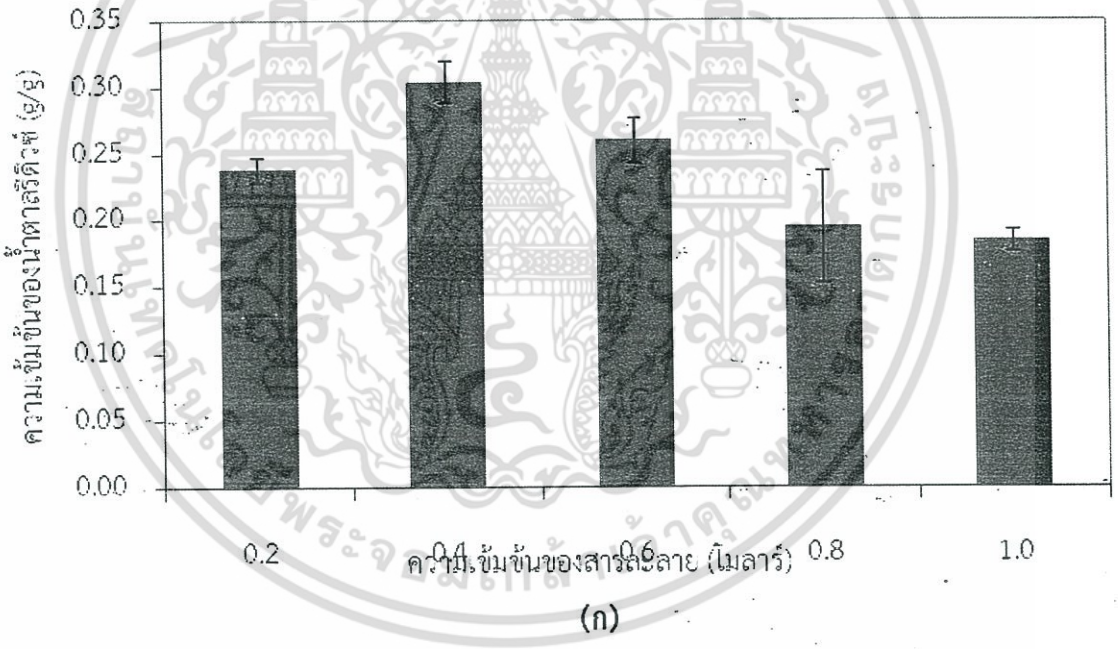
หมายเหตุ : a, b, c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากรูปที่ 4.4 (ก) จะพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่มากที่สุดที่ปรับสภาพชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกแล้วย่อยด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้นที่ 0.4 โมลาร์มากที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้นที่ 0.6, 0.2, 0.8 และ 1 โมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.30, 0.26, 0.24 ,0.20, 0.18 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รูปที่ 4.3 (ข) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่มากที่สุดที่ปรับสภาพชานอ้อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้นที่ 1 โมลาร์มากที่สุด รองลงมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

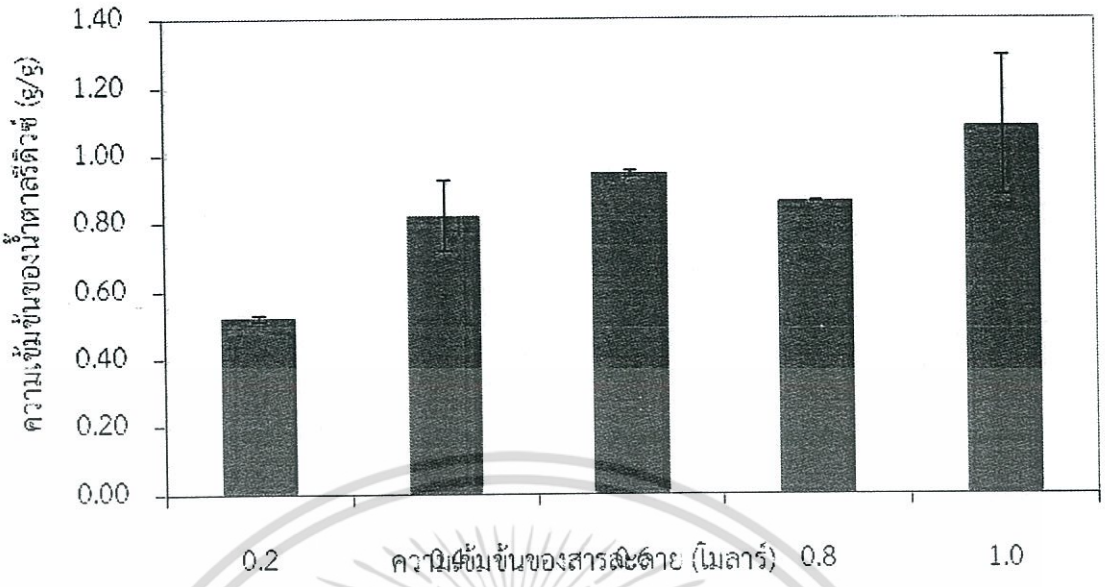
คือความเข้มข้นที่ 0.6, 0.8, 0.4 และ 0.2 โมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.09, 0.95, 0.87, 0.82 และ 0.52 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

ดังนั้นผู้ทำการทดลองเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพชานอ้อยด้วยน้ำกลั่นแล้วย่อยด้วยเอนไซม์ อัตราส่วนเอนไซม์ 1.0 ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยเติมอะซิเตตบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมพีเอช ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.26 กรัมต่อกรัม ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกแล้วย่อยด้วยเอนไซม์ อัตราส่วนเอนไซม์ 1.0 ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยเติมอะซิเตตบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมพีเอช ที่ความเข้มข้นสารลายกรดซัลฟิวริก 0.4 โมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.30 กรัมต่อกรัม และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพชานอ้อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ อัตราส่วนเอนไซม์ 0.8 ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยเติมอะซิเตตบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมพีเอช ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.09 กรัมต่อกรัม



รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELERASE 1500 ย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นที่ 0.2 – 1 โมลาร์ **(ก)** สารละลายกรดซัลฟิวริก **(ข)** สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ 4.2 (ต่อ) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELERASE 1500 ย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นที่ 0.2 – 1 โมลาร์ **(ก)** สารละลายกรดซัลฟิวริก **(ข)** สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

จากนั้นทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังปรับสภาพโดยใช้เครื่อง HPLC นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยใช้เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) ผลแสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ชนิดและความเข้มของน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างชานอ้อยที่ผ่านการปับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่น และการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELERASE 1500

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		
	กรดซัลฟิวริก	โซเดียมไฮดรอกไซด์	น้ำกลั่น
Glucose	13.99 ± 0.43	23.25 ± 0.59	4.26 ± 0.24
Xylose	-	4.07 ± 0.23	0.96 ± 0.06
Cellubiose	-	-	-

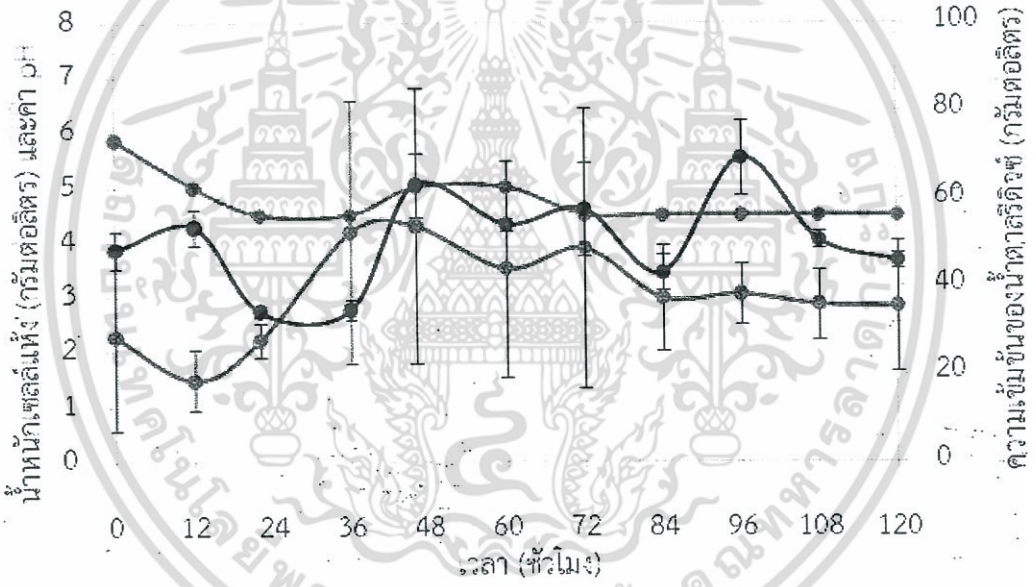
หมายเหตุ : ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดและเบสที่ใช้ในการปรับสภาพต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โดยความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ของสารละลายกรดซัลฟิวริกให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 0.30 กรัมต่อกรัม ความเข้มข้นสาร 0.4 โมลาร์ และ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์นั้นจะให้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 1.09 กรัมต่อกรัม ความเข้มข้นสาร 1.0 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

จากการทดลองการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ การเลือกใช้ตะกอนของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อัตราส่วนเอนไซม์โดยปริมาตรต่อกรัมน้ำหนักแห้ง 0.8 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และชั่วโมงที่ 36 โดยใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.09 กรัมต่อกรัม ซึ่งชุดควบคุมจะทำการทดลองโดยใช้อาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจน และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ จากนั้นทำการวิเคราะห์การเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธีวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง ชนิดสารอินทรีย์และปริมาณผลิตภัณฑ์ของสารอินทรีย์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC เปรียบเทียบกับเวลา ผลแสดงดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.9



รูปที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง ที่พบในอาหารเลี้ยง เชื้อ GYCC ที่มีกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ (—●—) น้ำหนักเซลล์แห้ง (—●—) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (—●—) ค่าความเป็นกรดด่าง

จากรูปที่ 4.5 ใช้อาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจน และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ซึ่งเป็นชุดควบคุม พบว่า ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของกราฟน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีแนวโน้มลดลงจาก 2.29 เป็น1.49 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นกราฟน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

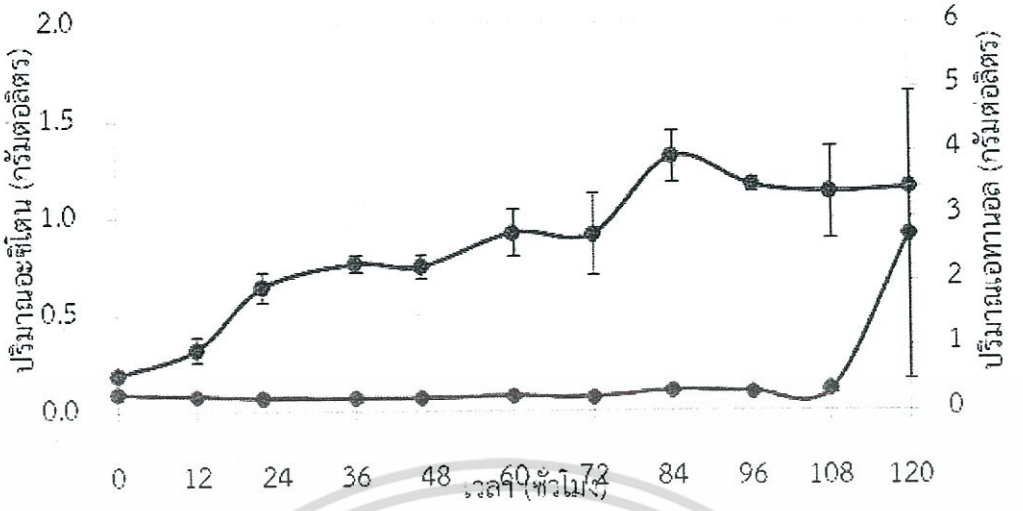
เซลล์แห้งจะมีลักษณะเพิ่มสูงขึ้น การวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ และน้ำหนักเซลล์แห้งของชุดควบคุมจะมีค่าสูงสุดชั่วโมงที่ 48 มีค่าเท่ากับ 4.31 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ คือ ชั่วโมงที่ 24 , 36 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.35 และ 34.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 0, 12, 48, 60, 70, 84, 94, 108 และ 120 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 48.33, 53.57, 63.17, 54.11, 57.61, 43.11, 69.21, 50.61, 45.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะพบว่ามีค่าการเพิ่มขึ้นและลดลงไม่คงที่ เนื่องจากมีเติมอาหารทุกครั้งที่การเก็บตัวอย่าง จากกราฟการแสดงค่าความเป็นกรดเบสของน้ำหมักช่วง 24 ชั่วโมงแรกจะมีค่าลดลงจาก pH 5.9 เป็น 4.5 เนื่องจากมีการสร้างกรดอินทรีย์ จากงานวิจัยของสุนทร (2555) พบว่าในระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* TISTR 1462 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงของระยะการสร้างกรดอินทรีย์ ไปเป็นระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์อย่างชัดเจน ทั้งนี้ระยะที่มีการ สร้างกรดอินทรีย์นั้นจะเกิดขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ โดยจะมีการสร้างกรดอินทรีย์ จำพวกกรดบิวทิริกและกรดอะซิติก ซึ่งเป็นสาเหตุให้ค่าความเป็นกรดเบสของน้ำหมักลดลง

ตารางที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร)	
				กรดอะซิติก	เอทานอล
0	2.29±1.70^{a}	48.33±4.32^{bcd}	5.9±0.06	0.19±0.01^{a}	0.27±0.01^{a}
12	1.49±0.55^{a}	53.57±4.10^{cde}	5.0±0.00	0.32±0.07^{a}	0.23±0.06^{a}
24	2.22±0.31^{a}	34.35±1.34^{a}	4.5±0.00	0.64±0.08^{b}	0.21±0.07^{a}
36	4.20±2.40^{a}	34.69±2.45^{a}	4.5±0.00	0.76±0.04^{bc}	0.20±0.05^{a}
48	4.31±2.51^{a}	63.17±7.28^{ef}	5.0±0.00	0.75±0.06^{bc}	0.20±0.03^{a}
60	3.53±1.97^{a}	54.11±1.47^{cde}	5.0±0.00	0.92±0.12^{c}	0.23±0.02^{a}
70	3.90±2.55^{a}	57.61±10.80^{de}	4.5±0.00	0.91±0.21^{c}	0.21±0.05^{a}
84	2.99±0.96^{a}	43.11±4.07^{ab}	4.5±0.00	1.31±0.13^{d}	0.31±0.02^{a}
94	3.06±0.56^{a}	69.21±8.59^{f}	4.5±0.00	1.17±0.04^{d}	0.29±0.01^{a}
108	2.87±0.64^{a}	50.61±1.92^{bcd}	4.5±0.00	1.13±0.24^{d}	0.32±0.05^{a}
120	2.84±1.19^{a}	45.81±1.79^{bc}	4.5±0.00	1.15±0.01^{d}	2.72±0.94^{b}

หมายเหตุ : a, b, c, d, e, f ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

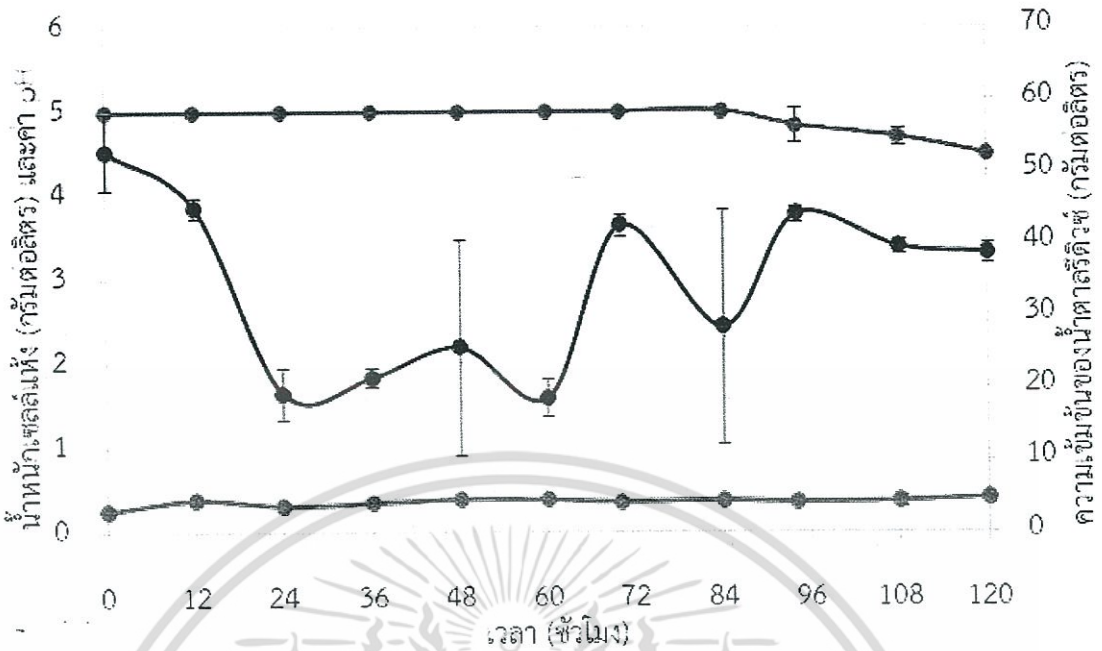


รูปที่ 4.3 ชนิดและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่พบในอาหารเลี้ยง เชื้อ GYCC ที่มีกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ โดยผลิตภัณฑ์คือ (—●—) กรดอะซิติก (—●—) เอทานอล

ผลการทดลองรูปที่ 4.6 พบชนิดและปริมาณผลผลิตสารอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักของชุดควบคุมในเวลาต่างๆกัน พบว่าผลิตภัณฑ์หลักที่เชื้อผลิต คือ กรดอะซิติกและเอทานอล ซึ่งเอทานอลเป็นสารผลิตภัณฑ์หลักที่พบตามวิถีเมตาบอลิซึมที่ประกอบไปด้วย อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งในชั่วโมงที่ 0 ของกระบวนการหมักจะพบกรดอะซิติกและเอทานอลในปริมาณที่เล็กน้อย คือ 0.19 กรัมต่อลิตร และ 0.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณกรดอะซิติกและเอทานอลจะค่อยๆเพิ่มมากขึ้น โดยมีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดชั่วโมงที่ 84 ซึ่งมีกรดอะซิติกเข้มข้น 1.31 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณของกรดอะซิติกจะค่อยๆลดลง ส่วนเอทานอลจะมีปริมาณสูงสุดชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีความเข้มข้น 2.72 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ในอาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากการย่อยชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ในสภาวะเดียวกับชุดควบคุม ที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์การเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธีวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง ชนิดสารอินทรีย์ และปริมาณผลิตภัณฑ์ของสารอินทรีย์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC เปรียบเทียบกับเวลา ผลแสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่างที่พบในอาหาร GYCC ที่มีซานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ (—●—) น้ำหนักเซลล์แห้ง (—●—) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (—●—) ค่าความเป็นกรดด่าง

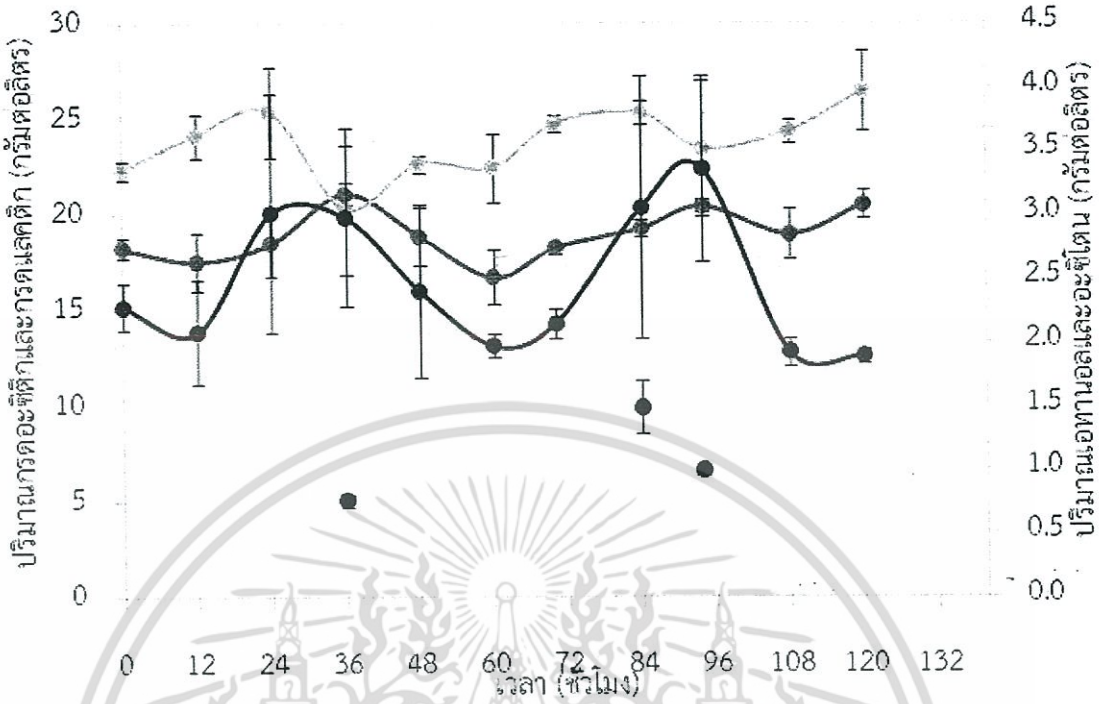
จากผลการทดลองรูปที่ 4.7 พบว่า จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญกราฟน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นกราฟจะมีลักษณะคงที่และจะมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 มีค่าเท่ากับ 0.41 กรัมต่อลิตร ส่วนกราฟความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยซานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพจะมีลักษณะเดียวกับชุดควบคุม เนื่องจากในการทดลองนี้ มีการเติมอาหารเพื่อทดแทนอาหารที่สูญเสียไปกับการเก็บตัวอย่าง โดยความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 18.65 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ที่พบในอาหาร GYCC ที่มีชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM792 ที่สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร)			
				กรดอะซิติก	เอทานอล	กรดแลคติก	อะซิโตน
0	0.24 ± 0.03^{a}	52.85 ± 5.40^{d}	5.0±0.00	18.29 ± 0.55^{ab}	2.28 ± 0.18^{abcd}	22.34 ± 0.52^{ab}	-
12	0.39 ± 0.06^{c}	44.97 ± 1.42^{cd}	5.0±0.00	17.59 ± 1.49^{ab}	2.08 ± 0.41^{abc}	24.18 ± 1.15^{bc}	-
24	0.31 ± 0.01^{ab}	19.25 ± 3.65^{a}	5.0±0.00	18.53 ± 1.76^{abc}	3.02 ± 0.94^{bcd}	25.39 ± 2.36^{bc}	-
36	0.34 ± 0.02^{bc}	21.44 ± 1.31^{a}	5.0±0.00	21.13 ± 0.57^{d}	2.98 ± 0.70^{abcd}	20.30 ± 3.40^{a}	0.07±0.75
48	0.39 ± 0.04^{c}	25.66 ± 14.99^{a}	5.0±0.00	18.91 ± 1.52^{bc}	2.41 ± 0.68^{abcd}	22.66 ± 0.44^{ab}	-
60	0.38 ± 0.01^{bc}	18.65 ± 2.55^{a}	5.0±0.00	16.73 ± 1.43^{a}	1.97 ± 0.09^{abc}	22.45 ± 1.81^{ab}	-
70	0.36 ± 0.02^{bc}	42.54 ± 1.52^{cd}	5.0±0.00	18.29 ± 0.33^{ab}	2.15 ± 0.12^{abc}	24.75 ± 0.43^{bc}	-
84	0.37 ± 0.03^{bc}	28.47 ± 16.25^{ab}	5.0±0.00	19.30 ± 0.44^{bcd}	3.06 ± 1.03^{cd}	25.34 ± 0.64^{bc}	1.56±0.25
94	0.35 ± 0.02^{bc}	44.05 ± 1.13^{cd}	4.8±0.20	20.45 ± 0.32^{cd}	3.36 ± 0.73^{d}	23.46 ± 3.53^{abc}	0.98±0.24
108	0.36 ± 0.07^{bc}	39.56 ± 1.00^{bc}	4.7±0.10	19.00 ± 1.31^{bc}	1.92 ± 0.11^{ab}	24.36 ± 0.63^{bc}	-
120	0.41 ± 0.06^{c}	38.74 ± 1.38^{bc}	4.5±0.00	20.55 ± 0.73^{cd}	1.89 ± 0.06^{a}	26.46 ± 2.07^{c}	-

หมายเหตุ : a, b, c, d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.5 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากชานอ้อยที่ปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์เข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่ง ไม่มีออกซิเจน ที่เวลาต่างๆ (—●—) กรดอะซิติก (—●—) เอทานอล (—●—) กรดแลคติก(●) อะซิโตน

ส่วนชนิดและปริมาณผลผลิตสารอินทรีย์จากกระบวนการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยในเวลาต่างๆกัน ในรูปที่ 4.8 พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ผลิต คือ กรดอะซิติก เอทานอล กรดแลคติก อะซิโตน ซึ่งเอทานอลและอะซิโตนเป็นสารผลิตภัณฑ์หลักที่พบตามวิถีเมตาบอลิซึมที่ประกอบไปด้วย อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในช่วงแรกของกระบวนการหมักจะพบกรดอะซิติก เอทานอล และกรดแลคติก เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC มีการใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ควบคุมความเป็นกรดด่าง จึงเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งที่ 2 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลในวิถีเมตาบอลิซึม จึงพบเอทานอลในชั่วโมงแรก โดยปริมาณของกรดอะซิติก เอทานอล และกรดแลคติก จะมีความเข้มข้นสูงสุดชั่วโมงที่ 120, 94, 120 มีค่าเท่ากับ 20.55, 3.36 และ 26.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านจนถึงชั่วโมงที่ 36 จะพบอะซิโตนมีความเข้มข้น 0.07 กรัมต่อลิตร และพบอะซิโตนสูงสุดชั่วโมงที่ 84 ซึ่งมีความเข้มข้น 1.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการวิเคราะห์ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่เป็นบิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการปรับสภาพชานอ้อยให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ได้ทำการทดลองปรับสภาพวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีทั้งหมด 2 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพชานอ้อยก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยนำตัวอย่างชานอ้อยมาทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่น ซึ่งจะได้ส่วนที่เป็นของแข็งและส่วนของเหลว หลังจากนั้นนำของแข็งมาล้างน้ำกลั่นพีเอช 7 พบว่าการล้างของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์จะใช้ปริมาตรน้ำโดยรวมเท่ากับ 1,100 มิลิลิตร และการล้างน้ำแบบสลับระหว่างของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดและของแข็งปรับสภาพด้วยเบส พบว่าใช้น้ำกลั่นในการล้างของแข็งที่ผ่านปรับสภาพเฉลี่ย 900 มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าการล้างของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นอย่างเดียวถึง 200 มิลลิลิตร

เมื่อนำส่วนที่เป็นส่วนใสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 49.48 กรัมต่อลิตร ส่วนใสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 2.37 กรัมต่อลิตร และส่วนใสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 16.98 กรัมต่อลิตร เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์ เปรียบเทียบเวลาและปริมาณของเอนไซม์ต่อตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่น ให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 ทั้งหมด โดยกรดซัลฟิวริกและน้ำกลั่นใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ 1 กรัม พบน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.26 และ 0.23 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ 1 กรัม พบน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.13 กรัมต่อกรัม ทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้บัฟเฟอร์กับไม่ใช้บัฟเฟอร์ในกระบวนการย่อยตัวอย่างชานอ้อยด้วยเอนไซม์ พบว่าการใช้บัฟเฟอร์ในการย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์ของตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 0.80 กรัมต่อกรัม

จากนั้น ทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพที่ความเข้มข้นต่างๆของกรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก คือ ความเข้มข้นที่ 0.4 โมลาร์ มีค่าเท่ากับ 0.30 กรัมต่อกรัม และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยความเข้มข้นที่ 1.0 โมลาร์ มีค่าเท่ากับ 1.09 กรัมต่อกรัม เมื่อนำมาวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่อง HPLC พบน้ำตาลกลูโคส ในการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟิวริก และน้ำกลั่น และพบน้ำตาลไซโลส ในการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น แต่ไม่พบน้ำตาลเซลโลไบโอส แสดงให้เห็นว่า การย่อยเซลลูโลสในตัวอย่างด้วยเอนไซม์ กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสเป็นไปอย่างสมบูรณ์ แต่ที่พบน้ำตาลไซโลสอาจเนื่องมาจากขั้นตอนการปรับสภาพส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสยังถูกย่อยไม่สมบูรณ์

นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยมาทำให้เข้มข้นขึ้น เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นชุดควบคุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซีสเทอีน (Glucose-yeast extract-caseine-cysteine, GYCC) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลดังกล่าวเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่งและไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ในชุดควบคุมชั่วโมงที่ 48 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเฉลี่ย 4.31 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำหนักของเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในน้ำตาลรีดิวซ์รีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยสูงสุด คือ ชั่วโมงที่ 120 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย 0.40 กรัมต่อลิตร การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS ในชุดควบคุม พบว่าปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุดชั่วโมงที่ 24 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.35 และ 34.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงความเป็นกรดเบสที่ 4.5 ซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ว่าหากปริมาณน้ำตาลลดลง ค่าพีเอชลดลงด้วย เนื่องจากเป็นระยะที่มีการสร้างกรดอินทรีย์ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญเติบโตของเชื้อ การทดลองที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งได้จากการย่อยชานอ้อย พบว่าปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุดที่ชั่วโมงที่ 60 มีค่า 18.65 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 19.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเป็นกรดเบสที่ 5.0 จะเห็นว่ามีการใช้น้ำตาลลดลงแต่ค่าพีเอชไม่ลด

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากการหมักด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณสารอินทรีย์ในชุดควบคุมที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ในเวลาต่างๆ กัน พบว่ามีการผลิตกรดอะซิติกและเอทานอล โดยเอทานอลเป็นสารผลิตภัณฑ์หลักที่พบตามวิถีเมตาบอลิซึมที่ประกอบไปด้วย อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งกรดอะซิติกมีความเข้มข้นสูงสุดชั่วโมงที่ 84 มีค่าเท่ากับ 1.3139 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณของกรดอะซิติกจะค่อยๆลดลง ส่วนเอทานอลจะมีความเข้มข้นสูงสุดชั่วโมงที่ 120 มีค่าเท่ากับ 2.7221 กรัมต่อลิตร แต่ไม่พบบิวทานอล ส่วนปริมาณสารอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เชื้อ *C. acetobutylicum* DSM 792 ผลิตคือ กรดอะซิติก เอทานอล กรดแลคติก และอะซิโตน ซึ่งเอทานอลและอะซิโตนเป็นสารผลิตภัณฑ์หลักที่พบตามวิถีเมตาบอลิซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาถึงการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยวิธีการตรึงเซลล์ (Immobilized) ในแบบต่างๆ เพื่อให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์และได้ผลผลิต ABE ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยวิธีการตรึงเซลล์ (Immobilized) จึงเป็นทางเลือกที่ดีในการปรับปรุงกระบวนการผลิต ABE

2. ศึกษาสภาวะในการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสของน้ำหมักในระยะต่างๆ ของการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ทั้งระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

3. ต่อยอดงานวิจัยออกไปโดยศึกษาหาสภาวะการใช้กรดบิวทิริกและวิตามินต่างๆ เพื่อช่วยเร่งและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต ABE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกษม สุขสถาน. 2538. อ้อย. **สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน** แล่มที่ 5 (2538): 65-107.

จิราภรณ์ ปิงเมือง, จุฬารัตน์ จุมังมอ และ ดวงแก้ว พรมพงษ์. 2555. **การศึกษาแหล่งคาร์บอนราคาถูก เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1462.** โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ฉวีวรรณ ลีลาธนาพิพัฒน์. 2552. **การศึกษาการระเบิดเยื่อด้วยไอน้ำของชานอ้อย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

ชัชนันท์ นิวาสวงษ์ และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลลูโลซิกเอทานอลในประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 40(4): 1073-1088.

ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูนุช วิรุณานนท์ และวรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2555. ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล. **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ** 22 (3): 703-709.

ณัฐพร นากรุงศรี. 2552. **การทำปุ๋ยหมักจากมูลฝอยตลาดสดโดยใช้ชานอ้อยเป็น Bulking Agent.** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ธนพร วิชัย และ วรรัตน์ ปัตรประกร. 2554. การผลิตกรดแอล(+)-แลคติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว, น.(fb101-1)-(fb101-5). *ใน* **การประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21**. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต), ปทุมธานี

ปรียชาติ จันทโชติ. 2548. **การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการแยกบิวทานอลจากน้ำหมัก โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการแยกด้วยเมมเบรน.** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พชร พัชรพจนากรณ์, พิพัฒน์พงศ์ ดินเด็ม, วรพงษ์ วุฒิการณ์ และวราวุธ เวชมะโน. 2554. **การศึกษาและออกแบบโรงไฟฟ้าชีวมวลแบบเผาไหม้โดยตรงโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นเชื้อเพลิงหลัก.** ปริญญานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรวิภา ทองมิตร, วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และ อรทัย ชวาลภาฤทธิ์. 2555. การเพิ่มผลผลิตน้ำตาลจากชานอ้อยโดยการย่อยสลายด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับกรดอะซิติก, *ใน* **การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. น. 89-96.

วัชรา หงษ์เวียง และ สุภัตรา สิงห์ชนะ. 2546. **การผลิตเอธานอลจากชานอ้อยและผักตบชวา.** โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏมหาสารคาม.

วิทยา ปั้นสุวรรณ, ศิริพร เสนียุทธ, เสาวภาคย์ สาริมาน และ กุลธิดา อินทรัต. 2544. การผลิตเยื่อที่มีแอลฟาเซลลูโลสสูง และไซโลสจากชานอ้อยโดยวิธีระเบิดด้วยไอน้ำ. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; กระทรวงศึกษาธิการ; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม; ทบวงมหาวิทยาลัย, กรุงเพทมหานคร. น. 79-86.

ศิริลักษณ์ ธีระดากร. 2555. **กระบวนการการแปรสภาพและย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอล.** รายงานวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุนทร กาญจนทวี และอภิชัย สาวิสิทธิ์. 2555. **การศึกษาการผลิตแอซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลังโดยกระบวนการหมัก.** รายงานวิจัยสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสาหรับการผลิตเอทานอล. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 22 (5): 641-649

เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ และ จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์. 2546. การประยุคใช้กระบวนการไมโครฟิวเตชันเพื่อเพิ่มผลผลิตในกระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล แบบต่อเนื่อง. **วิศวกรรมสาร ม.ข.** 301: 37-48.

อภิชัย สาวิสิทธิ์. 2553. **การผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลังและกลีเซอรอลด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*.** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อรรถพล มาลัย. 2553. **การใช้หินฝุ่นแทนทรายในงานคอนกรีตผสมเถ้าชานอ้อย.** รายงานวิจัย มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์.

อรุณศรี ฝางคำ. 2549. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญของ *Clostridium beijerinckii* เพื่อผลิตพลังงาน ชีวมวลใหม่คือบิวทานอลโดยการหมักแบบกะ.** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัญฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chou, CP, and Scharer, JM and Moo-Young, M and Gheshlaghi, R. 2009. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. **Biotechnology Advances** 27: 764–781.

Dupont. 2011. **ACCELLERASE® 1500**. Available Source: http://accellerase.dupont.com/fileadmin/user_upload/live/accellerase/documents/DUP-00413_ProdSheet_1500_ web.pdf. (accessed 14 May 2015)

Efremenko, EN, Nikolskaya, AB, Lyagin, IV, Senko. OV, Makhlis and Stepanov, NA. 2012. Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells. **Bioresource Technology** 2012(114): 342–348.

Bahl, H, Andersch, W and Gottschalk, G. 1982. Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. **Microbiology and Biotechnology.** 15: 201-205.

Yen, HW, Li, RJ and Ma, TW. 2011. The development process for a continuous acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by immobilized *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** 42 (2011): 902–907.

Alok, M, Yup, LS and Jang, Y-S. 2013. Acetone–Butanol–Ethanol Production With High Productivity Using *Clostridium acetobutylicum* BKM19. **Biotechnology and Bioengineering.** 110 (6): 1646-1653.

Survase, SA, van Heiningen, A. and Granström, T. 2012. Continuous bio-catalytic conversion of sugar mixture to acetone–butanol–ethanol by immobilized *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 93: 2309–2316.

Thailandindustry. 2010. **เชื่ออนาคตอุตฯอ้อย-น้ำตาลสดใสยาวจี้รัฐชัดเจนหนุนใช้เอทานอล.** แหล่งที่มา: http://www.thailandindustry.com/news/view.php?id=9171&section=3& rcount=Y (15 ธันวาคม 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้