21740

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

T096710

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง

(Ethanol Production from Cassava Rhizome)

จัดทำโดย

นางสาวแววตา	อินฉาย	รหัสนักศึกษา	46041073
นางสาวสวรรยาภรณ์	บำรุงธรรม	รหัสนักศึกษา	46041076
นางสาวสุรีพร	หงษาวดี	รหัสนักศึกษา	46041080

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

Faculty of Agricultural Industry

.b.11779226
.i.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพฯ 10520

King Mongkut's Institue of Technology
Ladkrabang
Bangkok 10520 Thailand

ปพ.
ว948ก
2549

เลขหมู่..................
เลขทะเบียน....96710....
วัน.เดือน.ปี....4 JUN 2009

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
Faculty of Agricultural Industry

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง
(Ethanol Production from Cassava Rhizome)

จัดทำโดย

นางสาวแววตา	อินฉาย	รหัสนักศึกษา	46041073
นางสาวสวรรยาภรณ์	บำรุงธรรม	รหัสนักศึกษา	46041076
นางสาวสุรีพร	หงษาวดี	รหัสนักศึกษา	46041080

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.... 22 / 3 / 50

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(อาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา)

การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง
(Ethanol Production from Cassava Rhizome)

จัดทำโดย

นางสาวแววตา	อินฉาย	รหัสนักศึกษา	46041073
นางสาวสวรรยาภรณ์	บำรุงธรรม	รหัสนักศึกษา	46041076
นางสาวสุรีพร	หงษาวดี	รหัสนักศึกษา	46041080

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2549

แววตา อินฉาย สวรรยาภรณ์ บำรุงธรรม และสุรีพร หงษาวดี. 255~~0~~1 : การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง สาขาวิชา เทคโนโลยีการหมัก ภาควิชา อุตสาหกรรมเกษตร
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา: 69 หน้า

บทคัดย่อ

เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในเหง้ามันสำปะหลัง ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล โดยปกติเซลลูโลสจะอยู่ร่วมกับส่วนประกอบอื่น ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็น ตัวขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาของเซลลูโลสกับเอนไซม์ในปฏิกิริยาการย่อย ดังนั้นในการผลิตจะต้องทำการแยกส่วนประกอบดังกล่าวออกจากโครงสร้างของเหง้ามันสำปะหลังในขั้นการปรับสภาพ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าในตะกอนเหง้ามันสำปะหลังมีปริมาณเซลลูโลสอยู่ 98.73 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เฮมิเซลลูโลส 0.24 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และลิกนิน 1.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากเหง้ามันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพซึ่งมีส่วนประกอบคือ เซลลูโลส 83.63 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เฮมิเซลลูโลส 7.96 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และลิกนิน 8.41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นำตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังเท่ากับ 3.348 หน่วย FPUต่อกรัมเหง้าสำปะหลัง ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าสภาพความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการย่อย 24 ชั่วโมง ที่สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 9.55 กรัมต่อลิตร นำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ และปรับค่าสภาพความเป็นกรด- ด่าง เท่ากับ 4.0 โดยเหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แล้วนำไปหมักที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นเวลา 10 วัน จะได้เอทานอล 3.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

แววตา อินฉาย
....

สวรรยาภรณ์ บำรุงธรรม
....

สุรีพร หงษาวดี
....

(คณะผู้จัดทำ)

....

(อาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา)

กิตติกรรมประกาศ

การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้นี้สำเร็จลุล่วง ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของอาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ในการให้คำแนะนำปรึกษาและแนะแนวทางต่าง ๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงต้องขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

ขอบคุณอาจารย์บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ที่ให้คำปรึกษาในเรื่องของเอนไซม์ ซึ่งเป็นสิ่งที่พวกเราไม่เคยทราบมาก่อน ขอบคุณพี่ตาล ที่ให้คำแนะนำในขั้นตอนของการทดลอง

ขอขอบคุณ พ่อ แม่ ของพวกเราที่เป็นทั้งกำลังใจ และกำลังทรัพย์ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและคอยช่วยเหลือเมื่อมีปัญหารวมทั้งให้ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทำให้ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ
10 มีนาคม 2550

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ก

กิตติกรรมประกาศ ข

สารบัญ ค

สารบัญตาราง ง

สารบัญรูปภาพ จ

บทที่ 1 บทนำ 1

- 1.1 ความสำคัญและที่มา 1
- 1.2 วัตถุประสงค์ 3

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร 4

- 2.1 เหง้ามันสำปะหลัง 4
- 2.2 ส่วนประกอบในเซลล์พืช 5
- 2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล 11

บทที่ 3 เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์ 18

- 3.1 เคมีภัณฑ์ 18
- 3.2 เอนไซม์ 19
- 3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 19
- 3.4 เชื้อจุลินทรีย์ 19
- 3.5 วัตถุดิบ 19

บทที่ 4 การทดลอง 20

- 4.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง 20
- 4.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ 21
- 4.3 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลังโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 22

บทที่ 5 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล 24

- 5.1 ผลการศึกษาการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง 24
- 5.2 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง 28
- 5.3 ผลการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ไดจากการย่อยเหง้ามันสำปะหลังโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 34

หน้า

บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 37
6.1 สรุปผลการทดลอง 37
6.2 ข้อเสนอแนะ 38
เอกสารอ้างอิง 39
ภาคผนวก ก 41
1. วิธีการวิเคราะห์ส่วนประกอบต่างในเหง้ามันสำปะหลัง 42
2. วิธีวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรองโดยวิธีของ Mendel และ Stemberry 45
3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS Method 46
4. วิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยวิธี ไดโครเมทออกซิเดชัน (Dichromate Oxidation) 47
5. วิธีการเตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อยีสต์ MY (MY Broth) 49
ภาคผนวก ข 50
ภาคผนวก ค 52
1. การวิเคราะห์หาปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ในเหง้ามันสำปะหลังก่อนการปรับสภาพทางเคมี 53
2. การวิเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆในเหง้ามันสำปะหลังหลังการปรับสภาพทางเคมี 56
3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 59
6. การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 68
ประวัติผู้เขียน 69

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 6

2.2 ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่างของพืช 8

5.1 แสดงส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพ โดยการบด แต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี 24

5.2 แสดงส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส 26

5.3 การเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในการทดลองนี้กับงานวิจัยอื่นๆ 33

5.4 การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการผลิตเอทานอลในการทดลองกับงานวิจัยอื่นๆ 36

ข.1 ผลค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความคลื่น 550 นาโนเมตร 51

ค.1 ผลการหาความเข้มข้นเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต 53

ค.2 ผลการหาปริมาณเซลลูโลส 54

ค.3 ผลการหาปริมาณแกมม่า – เซลลูโลส 55

ค.4 ผลการหาความเข้มข้นเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต 57

ค.5 ผลการหาปริมาณแอลฟา – เซลลูโลส (เซลลูโลส) 57

ค.6 ผลการหาปริมาณแกมม่า – เซลลูโลส 58

ค.7 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 60

ค.8 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 61

ค.9 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 61

ค.10 ค่าเฉลี่ยของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ 64

ค.11 ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 65

ค.12 ค่าเฉลี่ยของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ 67

ค.13 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 68

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แสดงลักษณะเหง้ามันสำปะหลัง 5
5.1 ส่วนประกอบต่างๆ ในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ 27
5.2 ผลของค่าความเป็นกรดด่างในการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 29
5.3 ผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนเซลลูบริกซ์ ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.8 30
5.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังแห้งในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 4.8 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 31
5.5 ผลของเวลาในการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 3.348 หน่วย FPUต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในซิเตรตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.8 ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 32
5.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลตามเวลา โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 9.55 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 35
ข.1 กราฟแสดงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ 550 นาโนเมตร 51

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัญหาการขาดแคลนพลังงานเป็นปัญหาที่ทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอย่างมาก ดังเห็นได้จากแนวโน้มการศึกษาเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนจากด้านต่างๆ เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานจากความร้อนใต้พิภพ ฯลฯ มาใช้แทนพลังงานจากน้ำมันดิบ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่ได้รับความสนใจจากวิทยาศาสตร์เนื่องจากหาได้ง่าย มีราคาถูก และยังมีสารอาหารบางอย่างเหลืออยู่ในปริมาณที่น่าจะนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก

เหง้ามันสำปะหลัง เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่มีมากถึง 6 ล้านตันต่อปี ในปัจจุบันได้นำเหง้ามันสำปะหลังเพียงบางส่วนเท่านั้นมาเผาเป็นเชื้อเพลิง แต่บางส่วนไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ใดๆ จึงกลายเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่ถ้านำมาวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบในเหง้ามันสำปะหลังจะพบว่ามีเซลลูโลสอยู่ในปริมาณมาก (Farooq *et .al*, 2001) ดังนั้นถ้าเราสามารถนำเหง้ามันสำปะหลังมาแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เช่น กลูโคส ก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ชนิดนี้ เนื่องจากกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น แอลกอฮอล์ กรดซิตริก ผงชูรส ซอร์บิทอล อุตสาหกรรมการผลิตยาต่างๆ และเป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมอุตสาหกรรมต่างๆจากต่างประเทศ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะนำเหง้ามันสำปะหลังมาผลิตเอทานอล

เอทานอล(ethanol) (ธีรภัทร, 2544) หรือเรียกอีกชื่อว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นสารอินทรีย์ที่มีสัญลักษณ์ทางเคมี คือ C_2H_5OH เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย ละลายในน้ำและสารอินทรีย์อื่นๆได้ดี ซึ่งเอทานอลยังมีประโยชน์อีกหลายประการ เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้ในการผลิตยา ใช้เป็นตัวทำละลายในการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อขับเคลื่อนเครื่องยนต์ และใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนให้แก่น้ำมันเบนซินสำหรับรถยนต์ เป็นต้น

การผลิตเอทานอลเพื่อใช้งานในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามวิธีการผลิต คือ synthetic ethanol เป็นเอทานอลที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้เอทิลีน (ethylene) เป็นวัตถุดิบ และ fermentation ethanol เป็นเอทานอลที่ผลิตโดยวิธีการหมักสารชีวมวล (คณะกรรมาธิการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545) แต่เดิมจะนิยมใช้วิธีการสังเคราะห์เอทานอล เพราะเป็นกระบวนการที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก แต่ต้องใช้สารเริ่มต้นที่เป็นผลผลิตจากปิโตรเลียม ซึ่งในปัจจุบันมีการขึ้นราคาน้ำมันปิโตรเลียมและเกิดภาวการณ์ขาดแคลนน้ำมันปิโตรเลียมจึงทำให้ผลผลิตสูงขึ้น ทำให้นักชีววิทยาเริ่มสนใจผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักสารชีวมวลมากขึ้นเพราะจะได้ต้นทุนที่ถูกกว่า และเอทานอลได้จากกระบวนการหมักนี้จะเรียกเอทานอลที่ผลิตขึ้นได้ว่า “ไบโอเอทานอล”

ไบโอเอทานอล (Bioethanol) คือ เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_5OH) ที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการหมักทางชีวภาพ ซึ่งทำการหมักคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากวัตถุดิบที่เป็นพืช เช่น ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง ฟางข้าว ต้นข้าวโพด เป็นต้น (คณะกรรมาธิการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545) เป็นโมเลกุลที่มีความบริสุทธิ์มาก แต่ก็มีความเป็นขั้วด้วยเนื่องมาจากมีพันธะไฮโดรเจน (O-H bond) เช่นเดียวกับน้ำ ซึ่งทำให้มีคุณสมบัติที่แปลกออกไป มีกลิ่นอ่อนและเป็นกลิ่นที่พึงประสงค์เช่นเดียวกับไวน์หรือวิสกี้และสามารถย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ โดยทันทีไม่ว่าจะเป็นในน้ำ อากาศ หรือในดิน มีความเป็นพิษต่ำและหากมีการหกหล่นจะมีผลต่อมลพิษทางสิ่งแวดล้อมเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การเผาไหม้เอทานอลจะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในด้านการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงนั้นมีการใช้ เอทานอลในการเติมผสมกับน้ำมันเบนซิน (อเมริกาเรียกว่า gasoline) หรือน้ำมันดีเซล อีกทั้งในต่างประเทศยังมีการใช้เอทานอลแทนน้ำมันเบนซินด้วย

การนำเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังนี้(ระวีวรรณ, 2538) คือ ขั้นตอนการปรับสภาพสารประกอบเซลลูโลส (pretreatment) โดยกำจัดสารประกอบอื่นๆ อันได้แก่ ลิกนิน (lignin) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสม และเพิ่มพื้นที่ในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส(hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ และขั้นตอนการหมัก (fermentation) เป็นการนำน้ำตาลรีดิวซ์มาใช้ในการผลิตเอทานอล ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด แต่ที่สำคัญที่สุดคือยีสต์โดยเฉพาะพวก *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาพที่ไม่มีอากาศ โดยเชื้อยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็น

เอทานอลได้ ซึ่งเชื้อยีสต์ที่หมักเป็นเอทานอลได้ดีจะสังเกตได้ จากการเขย่าขวดหมักดูจะเห็นฟองเกิดขึ้นจำนวนมาก

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์เซลลูบริกซ์
2. ศึกษาหาความสามารถของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 เหง้ามันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชในตระกูล Euphorbiaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Manihot esculentacrantz มีชื่อทางการค้าว่า cassava หรือ tapioca มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ทางทวีปอเมริกาใต้ ต่อมาได้ขยายไปสู่แหล่งอื่นๆ ของโลก สำหรับประเทศไทยมีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกที่ภาคใต้เป็นครั้งแรกเพื่อใช้ทำแป้งและสาคู ต่อมาได้ขยายพื้นที่ปลูกมายังภาคตะวันออก ได้แก่ ชลบุรี ระยอง และจังหวัดใกล้เคียง เนื่องจากมีสภาพดิน ฟ้า อากาศ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปลูก ดังนั้นจึงได้มีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างรวดเร็วไปสู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้กลายเป็นแหล่งปลูกที่สุดของประเทศไทย

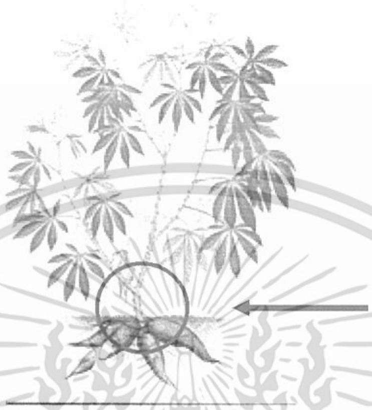
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพุ่มไม้ขนาดเล็กประกอบด้วยลำต้นที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-6 เซนติเมตร สูงประมาณ 1-4 เมตร สีของลำต้นจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์

ส่วนที่อยู่ใกล้ยอดมีสีเขียว ส่วนแก่ที่ต่ำลงมาอาจมีสีน้ำเงิน สีเหลือง หรือสีน้ำตาล ใบของต้นจะมีสีเขียวเข้มมีลักษณะเป็นแฉกๆ ตั้งแต่ 5-9 แฉก รากของลำต้นจะเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) รากเหล่านี้เป็นคลังสะสมอาหารมีลักษณะโตเรียกว่า “หัว” หัวของมันสำปะหลังนี้จะมีประมาณ 5-15 หัว มีความยาว 15-100 เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-15 เซนติเมตร โดยมีแป้งเป็นส่วนประกอบสำคัญ

เหง้ามันสำปะหลังเป็นส่วนที่อยู่เหนือรากของลำต้นมันสำปะหลัง โดยจะรวมถึงส่วนโคนของลำต้นมันสำปะหลังอีกประมาณ 30 เซนติเมตร ซึ่งคนและสัตว์กินไม่ได้ จึงต้องหั่นหรือสับเป็นชิ้นเล็กแล้วตากแดดให้แห้ง (cassava rhizome chip) นำไปเป็นเชื้อเพลิง แต่เนื่องจากในประเทศไทยมีเหง้ามันสำปะหลังในปริมาณมาก นำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงแค่บางส่วนเท่านั้น และ

ส่วนใหญ่ก็กลายเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ส่วนประกอบจะพบว่ามีเซลลูโลสอยู่ในปริมาณมาก ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเหง้ามันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เพื่อเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรให้มีมูลค่ามากขึ้น



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะเหง้ามันสำปะหลัง
ที่มา : www.ku.ac.th

2.2 ส่วนประกอบในเซลล์พืช

พืชเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติประเภทที่ใช้แล้วเกิดกลับมาใช้ใหม่ได้ในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นพืชจึงเป็นแหล่งสารประกอบอินทรีย์แหล่งใหญ่ที่สำคัญในอนาคต ส่วนประกอบหลักของพืช ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส(hemicellulose) และลิกนิน(lignin) ซึ่งมีปริมาณที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและภาวะที่เจริญเติบโตของพืชนั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 การนำส่วนประกอบของพืชชนิดต่างๆ มาใช้ให้เหมาะสมกับงานและเกิดประโยชน์สูงสุด จึงจำเป็นต้องทราบลักษณะโครงสร้างของพืชและปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ที่มีในพืชนั้นๆ ด้วย

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ชนิดของวัสดุเหลือทิ้ง ทางการเกษตร	**ส่วนประกอบทางเคมี (%)**			
	เซลลูโลส	**เฮมิเซลลูโลส**	**ลิกนิน**	**เถ้า**
เศษไม้ที่เหลือทิ้ง	45-56	10.25	18.30	-
ฟางข้าว	32.1	24	12.5	17.5
ฟางข้าวสาลี	30.5	28.4	18.0	2.4
ชานอ้อย	33.4	30	18.5	2.4
ซังข้าวโพด	45	35	14	-
ต้นมันสำปะหลัง	32.2	13.85	26.96	-

ที่มา : ปิยวรรณ และพัชรินทร์ (2538) ; Martin A.M. (1991)

2.2.1 เซลลูโลส (cellulose) (Kimball , J. W , 2003)

เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช พบตามผนังเซลล์ของพืชแต่ละชนิด มีหน้าที่ช่วยทำให้พืชมีโครงสร้างที่แข็งแรง ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระ แต่มักจะพบรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส กัม เพนโตซาน แทนนิน ไขมัน และสารเกิดสี เป็นต้น

2.2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลส (ระวีวรรณ, 2538 ; Joban *et al*, 2000)

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์(polysaccharide) ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของดี-กลูโคส (D-glucose) ในรูปเบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (ß-D-glucopyranose) หลายโมเลกุลเรียงต่อเป็นโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ แต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะ 1,4ไกลโคซิดิก (1,4-glycosidic bond) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 ของกลูโคสกับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสโมเลกุลถัดไป

รูปแบบ(conformation) ของการจัดเรียงตัวของหน่วยดี-กลูโคส จะอยู่ในลักษณะเป็นรูปเก้าอี้ (chair form) แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนาดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลดี-กลูโคสในอีกสายหนึ่ง การจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไปคือ $-(C_6H_{10}O_5)-_n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยของดี-กลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง

หน่วยย่อยของดี-กลูโคส ต่อ 1 โมเลกุลของเซลลูโลส (degree of polymerization) จะมีตั้งแต่ 15 หน่วยจนถึง 14,000 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลมีค่า 50,000-25,000 ดาลตัน (น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสเท่ากับ 180.16 ดาลตัน) ความยาวของหน่วยย่อยของ ดี-กลูโคส 0.515 ไมโครเมตร และความยาวทั้งหมดของโมเลกุลเซลลูโลสมีค่ามากกว่า 5 ไมโครเมตร

จากการจัดเรียงตัวเหล่านี้ทำให้สายเซลลูโลสเรียงตัวขนานซึ่งกันและกันอย่างมีระเบียบในลักษณะที่เรียกว่า คริสตัลไลน์ไมเซล (crystalline micelles) โดยแต่ละไมเซลประกอบด้วยแต่ละโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีรูปร่างเป็นแถบหนา ไมเซลประมาณ 10-20 ไมเซลจะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril)

ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะคือ (ปราณี, 2532)

1) ฟริงจ์ไมเซลล์ (fring micelles) คือ ไมโครไฟบริลที่เรียงตัวเป็นริ้วๆ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และอสัณฐาน (amorphous)

2) โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

3) โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิน และริบบินจะม้วนเป็นเกลียว (helix)

ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบๆ ไม่ติดกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน นอกจากนี้ยังมีโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ ที่ปะปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) โพลียูโรไนด์ (polyuronide) อะราแบน (araban) และกาแลคแตน (galactan) โดยมักพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส

เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ สารอินทรีย์ใดๆ และในสารละลายด่างอ่อน หรือกรดอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรดแก่หรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรดหรือด่างได้เป็น 3 ชนิด คือ (TAPPI, 2000-2001)

1) แอลฟา-เซลลูโลส (α - cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง

2) เบต้า-เซลลูโลส (ß - cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

3) แกมมา-เซลลูโลส (γ – cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง และละลายได้ในสารละลายกรดแต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

2.2.1.2 ปริมาณเซลลูโลสในพืชชนิดต่างๆ

ปริมาณเซลลูโลสในส่วนต่างของพืชนั้น จะมีมากน้อยแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับจะเป็นพืชชนิดใดและส่วนไหนของพืช ตัวอย่างปริมาณเซลลูโลสที่พบในพืชชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่างของพืช

ชนิดพืช	ส่วนต่างๆ ของพืช	ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ข้าว	แกลบ (hulls)	42
	ฟาง (straw)	30-42
ข้าวโอต	แกลบ (hulls)	51
	ฟาง (straw)	40
ข้าวบาร์เลย์	ฟาง (straw)	40
ข้าวโพด	ต้น (stover)	36-43
	ซัง (cobs)	28
ไม้สน	ลำต้น	41-44

ชนิดพืช	**ส่วนต่างๆ ของพืช**	**ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)**
ป่าน	เส้นใย	65
ฝ้าย	เปลือกหุ้มเมล็ด เส้นใย ลำต้น (stalks)	60 91 35
อ้อย	ต้นแก่ ชานอ้อย (bagasse)	42 48
ถั่วเหลือง	เปลือก	52
สับปะรด	กากแห้ง	25

ที่มา : พิสุทธิ์ (2539) ; James (1960)

2.2.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) (Okeke, 1995)

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองมาจากเซลลูโลส มีลักษณะเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) ซึ่งส่วนมากเป็นดี-ไซแลน (D-xylan) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส (xylose) หลายๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-1,4ไกลโคซิดิก สารโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเฮทเทอโรจีนัส (heterogenous) ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดปนกัน คือ

1) เพนโตซาน (pentosan) ส่วนใหญ่เป็นไซแลน และอะราแบน (araban) เมื่อนำไปย่อยจะได้ น้ำตาลไซโลส และอะราบิโนส (arabinose) ไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลส มากกว่าสารอื่น

2) เฮกโซแซน (hexosan) ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน(mannan) กาแลคแทน(galactan) และกลูแคน(glucan) เมื่อถูกย่อยจะได้น้ำตาลแมนโนส(mannose) กาแลคโตส(galactose) และกลูโคส(glucose)ตามลำดับ

3) โพลียูโรไนด์ (polyuronides) ส่วนมากเป็นสารประกอบกรดโพลียูโรนิค (polyuronic acid) และยังพบกรดยูรานิค (uranic acid)ปนอยู่ด้วย

ข้อแตกต่างของเฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลสคือ เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยกรดสารละลายเจือจางและสามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สายโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่า และมีความยาวของสายโพลีเมอร์สั้นกว่า โดยมีความยาวประมาณ 40 หน่วยกลูโคส (TAPPI, 2000-2001)

2.2.3 ลิกนิน (lignin) (Stephen , 1992)

ลิกนินเป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืชรองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบได้ในส่วนผนังเซลล์ชั้นที่สอง และ middle lamella ของพืชชั้นสูง โดยพืชที่อ่อนอยู่จะมีลิกนินเพียงเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อพืชอายุมากขึ้น ลิกนินถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการที่เรียกว่า lignification โดยโมเลกุลของลิกนินจะแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่าง cellulose fibrils และสายของเฮมิเซลลูโลส ลิกนินที่พบในส่วนของผนังเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ และป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยอีกด้วย

โครงสร้างของลิกนิน เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) โดยมีหน่วยฟีนิลโพรเพน (phenylpropane unit) เรียงต่อกันแบบสุ่ม (random) ที่หน่วยฟีนอล (phenol unit) อาจเป็นกัวอิเอซิล (guaiacyl) อาจเกิดการเชื่อมกันระว่างโมเลกุล ทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอล หรือเมทานอลที่ร้อน และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล (ระวีวรรณ, 2538)

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง โดยนำส่วนเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์ โดยมีกระบวนการสำคัญ คือ

2.3.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) (ระวีวรรณ, 2538 ; Rose, 1950)

เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอยู่ในรูปที่เป็นผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส แต่ส่วนที่นำมาใช้จริงคือส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ดังนั้นในขั้นแรกของการผลิตจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เพราะเป็นตัวลดพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ การมีลิกนินปริมาณมากจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมัก นอกจากนี้โครงสร้างเซลลูโลสที่เป็นผลึกยังทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ดีที่ควร ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการปรับสภาพ คือ เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ วิธีการปรับสภาพแบ่งออกเป็น 4 วิธีใหญ่ๆ คือ

2.3.1.1 วิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

1) การลดขนาดของสารโดยวิธีบดหรือโม่บด เป็นการบดผลึกของเส้นใยที่ประกอบด้วยไมโครไฟบริลจำนวนมากซึ่งในแต่ละไมโครไฟบริลนั้นประกอบด้วย ส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline region) ให้แตกออก เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้น รวมทั้งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น

2) การทำออกซิเดชั่นแบบเปียก (Wet Oxidation) เป็นการให้ความร้อนกับลิกโนเซลลูโลส โดยทำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในน้ำหรือที่ที่มีออกซิเจนภายใต้ความดันสูง

3) กระบวนการใช้ไอน้ำความดันสูง เป็นการทำให้วัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบนั้นอิ่มตัวด้วยไอน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูงแล้วลดความดันลงทันที ทำให้น้ำระเหยอย่างรวดเร็ว เป็นเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในลิกโนเซลลูโลส โดยการเสียสภาพของโครงสร้างของผนังเซลล์พืชไป ซึ่งจะทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน เป็นการเพิ่มขึ้นของพื้นผิวเฉพาะมากขึ้น และเป็นการลดองศาการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชั่นของเซลลูโลสไป ทำให้พันธะ

ที่เชื่อมระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินแตกออก และเป็นการปล่อยให้ลิกนิน ออกมาจากของเหลวในผนังเซลล์

2.3.1.2 วิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment)

1) การใช้กรด เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายกรดแก่ เช่น ซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา

2) การใช้ด่าง เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายด่าง เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะมีผลทำให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินละลายน้ำออกมา และยังทำให้เกิดการพองตัว เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ

3) การใช้สาร Oxidant สารเคมีที่ใช้ได้แก่ SO_2 , ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ที่สามารถกำจัดลิกนิน เช่น $NaCl_2$, KB_2O_2 , KIO_3 โดยจะมีผลต่อการละลายของลิกนิน

2.3.1.3 วิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-Chemical Pretreatment)

วิธีทางเคมีฟิสิกส์เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การบดร่วมกับวิธีทางกายภาพ

2.3.1.4 วิธีทางชีวภาพ (Biological Preatment)

วิธีทางชีวภาพเป็นการใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้เปลี่ยนอยู่ในรูปโซ่ตรง และช่วยลดความเป็นผลึก

2.3.2 การย่อย

เนื่องจากเหง้ามันสำปะหลังมีสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นโพลิแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้นเมื่อนำมาทำการย่อยสลายจะได้น้ำตาลออกมา โดยถ้าทำการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันคือกลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส และพวกโอลิโกแซคคาไรด์ ปนกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อ

ย่อยสลายจะได้น้ำตาลหลายชนิดปนกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส การย่อยสลายสามารถทำได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

2.3.2.1 การย่อยสลายด้วยสารเคมี (Chemical Hydrolysis) (Soto *et. al*, 1994)

เป็นการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง โดยจะไปทำลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน ส่วนใหญ่การย่อยสลายแบบนี้ต้องการสภาวะที่รุนแรง

1) การย่อยสลายด้วยกรด (Acid Hydrolysis) อาจแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการคือ

1.1) Homogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟิริกเข้มข้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่มีข้อเสียคือจะต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้และการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ รวมทั้งปัญหาการสูญเสียกรดไปกับส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย และการผุกร่อนของเครื่องมือจากการใช้กรดแก่

1.2) Heterogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดอ่อนแต่ต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส ผลของการย่อยคือ เซลลูโลสยังมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่ วิธีการนี้จะไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ แต่จะถูกทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว หรือแคลเซียมคาร์บอเนต

2) การย่อยสลายด้วยด่าง (Alkaline Hydrolysis)

สารเคมีที่นิยมใช้ คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทิลลีนไดอะมีน และแอมโมเนีย เป็นต้น จะมีผลทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง โดยปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งใช้ในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส

2.3.2.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis) (Acebal *et . al* , 1986.)

เป็นการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด โดยมากเป็นราและแบคทีเรีย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่สภาวะซึ่งไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกย่อยสลายต่อไป นอกจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อวัตถุดิบที่จะย่อยสลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดปัญหาการผุกร่อนของเครื่องมืออีกด้วย โดยเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารประกอบเซลลูโลสได้แก่

1) เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

เอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบเซลลูโลสคือ เซลลูเลส ปัจจุบันมีการวิจัยอย่างกว้างขวาง โดยเน้นถึงการพัฒนากระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสนี้ โดยมากจะมาจากจุลินทรีย์ซึ่งมีอยู่หลายชนิดที่นิยมนำมาใช้คือ เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma reessi*

เอนไซม์เซลลูเลสนี้มีคุณสมบัติเป็น multicomponent enzyme โดยมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกันดังนี้ (Shimada *et al*., 1990 อ้างถึงใน ลลิตา นิทัศนจารุกุล, 2541)

1.เอ็นโดกลูคาเนส(endoglucanase)หรือ Endo ß-1,4-glucan glucanohydrolase ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1,4 ภายในสายเซลลูโลสตรงบริเวณโครงสร้างอะมอร์ฟัส อย่างสุ่ม ทำให้เกิดปลายอิสระขึ้นทำให้ได้เซลลโลไบโอส , โอลิโกเซลลูโลส และกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก

2. เอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase) หรือ Exo ß 1,4-glucan cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยสลายโดยการตัดโมเลกุลของเซลลโลไบโอสออกจากปลายที่เป็นอิสระนั้นหรือการย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกเซลลูโลสไปเป็นเซลโลไบโอสนั่นเอง

3. เบต้า-กลูโคซิเดส (ß -glucosidase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคส ซึ่งเอนไซม์ ß - glucosidase จะเป็นตัวส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ทำให้ย่อยสลายได้กลูโคสมากขึ้น การย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ปริมาณกลูโคสมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในเซลลูเลสว่าจะมีมากหรือน้อย ดังนั้นเอนไซม์ตัวนี้จึงเป็นกุญแจตัวสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมากขึ้นดังนี้ คือ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของกลูโคสที่เพิ่มขึ้น และส่งผลยับยั้งอย่างเนื่อง คือทำให้ในระบบมีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น โดยที่เซลโลไบโอสจะเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์กลูคาเนสและเอนไซม์เอ็กโซกลูคาเนสต่อไป ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์น้อยลง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้าลงและหยุดในที่สุด

2) เอนไซม์เซลลูบริกซ์ (Cellubrix)

เป็นเอนไซม์ที่ผสมระหว่างเอนไซม์ 2 ชนิดด้วยกันคือ เอนไซม์เซลลูเลสกับเอนไซม์เซลโลไบโอส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้ดียิ่งขึ้น และในงานวิจัยนี้ได้ใช้เอนไซม์เซลลูบริกซ์ในการย่อยเซลลูโลส

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (บุญเทียม, 2548)

1. อุณหภูมิ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น 2 เท่า ทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส เมื่อเขียนกราฟระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับอุณหภูมิพบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะสูงที่สุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า “optimum temperature” เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าที่จุดนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะต่ำลง เนื่องจากเอนไซม์จะเกิดการเสียสภาพ หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส

2. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ค่าหนึ่ง ที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งมีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.8-5.5

3. ความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสับเสรตทสูงขึ้นและในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มอีก

4. ปริมาณเอนไซม์ เมื่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงจุดสูงสุด พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์

5. ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีประโยชน์ในการอธิบายกระบวนการทำงานของเอนไซม์

2.3.3 การผลิตเอทานอล (ระวีวรรณ, 2538 ; Rose, 1950)

การผลิตเอทนอล คือกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย โดยปกติจะเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน เรียกกระบวนการเปลี่ยนนี้ว่ากระบวนการหมัก การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลจำเป็นต้องพิจารณาถึง ปริมาณน้ำตาลที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ กระบวนการผลิต ปริมาณและ

ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การเปลี่ยนเป็นเอทานอลของน้ำตาล ตัวยับยั้งปฏิกิริยา และสภาวะของกระบวนการ

2.3.3.1 ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมัก

ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมักคือ จุลินทรีย์ อาหาร ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ อากาศ ปัจจัยทั้ง 5 นี้จะมีผลเกี่ยวเนื่องซึ่งกันและกัน การทำให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพจะต้องทำการปรับสภาวะให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดและประหยัดที่สุด

2.3.3.1.1 จุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องและรู้จักกันดีซึ่งใช้ในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันคือ ยีสต์ *Saccharomyces* sp. นอกจากยีสต์แล้วยังพบว่าแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบเชื้อทั้ง 2 ชนิดพบว่าแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้รวดเร็วกว่ายีสต์ *Saccharomyces* sp. 2 ถึง 3 เท่าและปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากแบคทีเรียนี้ก็มีปริมาณใกล้เคียงกัน สามารถทนอุณหภูมิได้สูงกว่าซึ่งเหมาะสำหรับประเทศไทยที่มีอากาศร้อน สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเป็นกรดสูง และใช้ต้นทุนการผลิตถูกกว่า (นริศและพรรณี, 2525)

2.3.3.1.2 อาหาร หมายถึง สารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งใช้ในการดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ สารอาหารที่จำเป็น ได้แก่

ก. คาร์บอน คาร์บอนเป็นสารอาหารหลักที่แบคทีเรียต้องได้รับเพียงพอ เพื่อการดำรงชีวิตและการขยายพันธุ์ ในการย่อยสลายได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนั้นยังมีกรดแลคติค และอะซีตาลดีไฮด์ เกิดขึ้นเล็กน้อย ในน้ำหมักที่มี yeast extract เกิดปฏิกิริยารีดัคชั่น (reduction) และถ้าหมักในน้ำหมักที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีในระยะ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและจะใช้น้ำตาลกลูโคสได้เกือบหมดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 2 วัน

ข. ไนโตรเจน ในน้ำหมักที่มี peptone หรือ yeast extract เชื้อ *Zymomonas mobilis* จะมี generation time ต่ำที่สุดและผลิตเอทานอลได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อพันธุ์นี้ในน้ำหมักที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแหล่งอื่น

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ค. เกลือแร่ วิตามินชนิดต่างๆ ชนิดของแร่ธาตุที่แบคทีเรียต้องการจะแตกต่างกันไปในแบคทีเรียแต่ละชนิด เช่น เชื้อ *Zymomonas mobilis* เจริญและผลิตเอทานอลได้ในน้ำหมักที่มีองค์ประกอบของ KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$ และ $MgSO_4$ 7H_2O โดย KH_2PO_4 ทำหน้าที่เป็นแหล่งฟอสเฟต ส่วน $(NH_4)_2SO_4$ จะมีผลต่อการย่อยสลายกลูโคส คือ ถ้ามีอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้การย่อยสลายกลูโคสเป็นไปด้วยดี และ $MgSO_4$ 7H_2O จะเกี่ยวข้องกับการทำงาน glucose-6-phosephate dehydrogenase

2.3.3.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของกระบวนการหมัก มีผลต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งอาจมีผลทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดชะงักลง การเลือกใช้สารละลายบัพเฟอร์ที่เหมาะสมในการหมัก จะช่วยควบคุมความเป็นกรด-ด่างของระบบไว้ได้อย่างดี

2.3.3.1.4 อุณหภูมิ มีผลโดยตรงกับการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ รวมทั้งจลนศาสตร์ของการหมัก ซึ่งอัตราการเจริญของแบคทีเรียจะสูงขึ้นตามอุณหภูมิจนถึงจุดหนึ่ง ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงเกินจุดนี้ไปแบคทีเรียจะเจริญได้ช้าลงและตายไปในที่สุด และกระบวนการหมักเป็นปฏิกิริยาคายความร้อนจึงมีการคายความร้อนออกมา ซึ่งถ้าให้มีการคายความร้อนออกมามากเกินอาจทำให้แบคทีเรียตายได้ ดังนั้นจึงต้องปรับให้ได้ตามความสารถของแบคทีเรีย นอกจากนี้พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการใช้น้ำตาล ซึ่งจะลดลงตามค่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น

2.3.3.1.5 การให้อากาศ การให้อากาศในเครื่องหมักมีความจำเป็นและสำคัญสำหรับการหมักแบบใต้พื้นผิวของจุลินทรีย์ที่ต้องใช้ออกซิเจน เพราะออกซิเจนจากอากาศที่ละลายในน้ำหมักมีน้อยมาก และมีเฉพาะที่บริเวณใกล้ๆ พื้นผิวสัมผัสของอากาศกับน้ำหมักเท่านั้น ส่วนใต้ผิวของน้ำหมักที่ลึกลงไปจะไม่มีออกซิเจนอยู่เลย

96710

บทที่ 3

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

3.1 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) ของบริษัท Merck , Germmany
2. โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต ($KnaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
3. โปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
4. กรดไดไนโตรสาลิไซลิก ($C_7H_4N_2O_7$) ของบริษัท Fluka chemical , Switzerland.
5. กรดซิตริก [$COOHCH_2C(OH)COOHCH_2 \cdot H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
6. โซเดียมซิเตรต ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
7. ฟีนานโธรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
8. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
9. เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 6H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
10. เฟอร์รัสซัลเฟต [$FeSO_4 7H_2O$]ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
11. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
12. กรดไฮโดรคลอริค(HCl) ของบริษัท Merck , Germmany
13. แอมโมเนียมซัลเฟต ($NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
14. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต (KH_2PO_4)ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
15. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท AJAX CHEMICAL , Australia.
16. สารสกัดยีสต์ (yeast extract)
17. เอการ์ (bacto-agar)

3.2 เอนไซม์

เซลลูบริกซ์ (Cellubrix) ของบริษัท อี๊สเอเชียติ๊ก ประเทศไทย จำกัด (มหาชน)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง

1. เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer / hot plate) รุ่น RCT basic ของบริษัท lka labortechnik, Germany.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KUBOTA 5100 ของบริษัท Kubotacorporation, Japan
3. เครื่องกวน (stirrer) รุ่น RW20ZM.n. ของบริษัท lka labortechnik, Germany.
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Julabo ของบริษัท Labortechnik GMBH, Germany.
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments, USA.
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digtis balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
7. เครื่องคัดขนาดอนุภาค (sieving)
8. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น BH – 2 ของบริษัท OLYMPUS , JAPAN.
9. หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น VS – 124 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation , Tokyo , Japan.
10. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler Toledo , Switzerland.
11. เครื่องต้มระเหยแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai,Japan.
12. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (hot air oven) รุ่น ULM500 ของบริษัท Memmert, Germany
13. เครื่องบดหยาบและเครื่องบดละเอียด
14. ตู้อบ (Tray dry)

3.4 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

3.5 วัตถุดิบ

เหง้ามันสำปะหลัง

บทที่ 4

การทดลอง

4.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง

4.1.1 การลดขนาดเหง้ามันสำปะหลังโดยวิธีการบด

นำเหง้ามันสำปะหลังล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาดตากแดดให้แห้งแล้วนำไปอบด้วยเครื่อง Tray dry เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดเล็กลงแล้วนำไปบดต่อด้วยเครื่องบดละเอียดที่มีขนาด sieve เล็กกว่า 0.25 มิลลิเมตร

4.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส , เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในเหง้ามันสำปะหลังโดยวิธี TAPPI , 2000 - 2001

4.1.2.1 นำเหง้าที่บดแล้วไปแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ 24 ชั่วโมง ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักเหง้ามันสำปะหลังต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 1 ต่อ 10 ที่อุณหภูมิห้อง

4.1.2.2 หลังแช่เหง้ามันสำปะหลังครบ 24 ชั่วโมง นำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กรองด้วยผ้ากรองแล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์อีกครั้งในอัตราส่วนเท่าเดิม นำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

4.1.2.3 นำเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว กรองด้วยผ้ากรองแล้วล้างด้วยน้ำปะปาหรือน้ำกลั่น จนน้ำล้างตะกอนมีสภาพเป็นกลาง (pH ประมาณ 7.0) โดยการทดสอบด้วยกระดาษลิตมัสซึ่งต้องไม่เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน นำตะกอนมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 8 - 12 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณส่วนประกอบต่าง ๆ ในเหง้ามันสำปะหลัง ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่เหลือโดยวิธี TAPPI, 2000 – 2001 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

4.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ

4.2.1 การหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูบริกซ์

การหาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง โดยใช้วิธี Mandel และ Stermbery (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก) โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ (FPU) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะทดลอง

4.2.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ

ชั่งตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วหนัก 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 , 4.4 , 4.8 , 5.2 , 5.6 และ 6.0 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูบริกซ์ และนำไปทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นลง ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

4.2.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2 แต่ใช้สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงสุด จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูบริกซ์และนำไปทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่โดยแปรผันค่าของอุณหภูมิในช่วง 30 , 40 , 50 , 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ผลิตได้จากการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

4.2.4 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ต่อการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2.3 แต่ใช้สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงสุด เติมเอนไซม์เซลลูบริกซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และนำไปทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิในระดับอุณหภูมิที่เหมาะจากข้อ 4.2.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

4.2.5 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2.4 เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูบริกซ์ในปริมาณเหมาะสมจากข้อ 4.2.4 นำไปทำปฏิกิริยาพร้อมกันในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.3 โดยควบคุมเวลาในการทำปฏิกิริยา ที่ 0 , 6 , 12 , 18 , 24 , 28 , 32 , 36 และ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างสารละลายแต่ละชั่วโมงดังกล่าวไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

4.3 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.1 การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นใส่หลอดทดลองฝาเกลียวประมาณ 12-14 หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่ในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อ 1 ลูปใส่ลงหลอดทดลองบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองลงในน้ำหมักในขวดรูปชมพู่ที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในตู้ปลอดเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นเชื้อหมักเริ่มต้น

4.3.2 การหมักเอทานอล

4.3.2.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์โดยการปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 และเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* นำสารละลายจากข้อ 4.3.2.1 ถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียวประมาณ 8-10 หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

4.3.2.2 ทำการหมักโดยถ่ายเชื้อหมักเริ่มต้น ลงในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 1 มิลลิลิตรในตู้ปลอดเชื้อ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทีละหลอดตามเวลา นำไปวิเคราะห์หา ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงด้วยวิธี DNS และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีไดโครเมท

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการนำเหง้ามันสำปะหลังที่เหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอล โดยนำเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังมาย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ แล้วทำการหมักเป็นเอทานอล ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน สามารถสรุปได้ดังนี้ คือ

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง

เมื่อนำเหง้ามันสำปะหลังมาปรับสภาพทางเคมีโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ละลายและแยกเฮมิเซลลูโลส และ ลิกนินออกมาได้มาก ส่งผลให้ได้ปริมาณเซลลูโลสมากกว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส คือ ได้เซลลูโลส 98.73 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 0.24 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 1.03 เปอร์เซ็นต์

6.1.2 การย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ เมื่อนำตะกอนเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพมาทำปฏิกิริยาในสารละลายซิเตรตบัพเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 3.348 FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 9.55 กรัมต่อลิตร และนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป

6.1.3 การผลิตเอทานอล

เมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลังมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเอทานอล ซึ่งจะใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยนำน้ำตาลรีดิวซ์มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 4.0 เติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ ทำการหมักเป็นเวลา 10 วัน พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดคือ 3.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ดังนั้นจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเหง้ามันสำปะหลังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เนื่องจากเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร และปัจจุบันนี้เกิดปัญหาการขาดแคลนเอทานอล ซึ่งนับเป็นแนวทางในการนำไปเพิ่มคุณค่าทางวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรในกลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีค่าสูงขึ้น

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เอนไซม์เซลลูบริกซ์ในการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีราคาแพง อาจมีผลทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลสูง ถ้าสามารถใช้เอนไซม์ที่ได้จากการผลิตขึ้นเอง หรือใช้เอนไซม์ที่มีราคาถูกลงกว่านี้อาจจะช่วยประหยัดต้นทุนได้ดีขึ้น

6.2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลังในครั้งนี้ได้ปริมาณน้อย เนื่องมา จากเป็นการผลิตในระดับการทดลองเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณมากขึ้นซึ่งส่งผลให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้นด้น

เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. **Introduction to Ethanol-Homegrown Energy : Developing Manitobas Ethanol Industry** [online]. Available at: http://www.gov.mb.ca/est/ mb. ca/est/energy /ethanol/introeth.html.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร. เชื้อเพลิงเอทานอล : ทฤษฎีเกี่ยวกับเอทานอล. **วารสารการวิจัยและพัฒนา,** 2544.

นริศ ธนัพประภัศร์ และ พรรณี จันทร์ปฐมพงศ์. **การศึกษาความเหมาะสมของการผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อพันธุ์ *Zymomonas mobilis*** . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2525.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. **ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์**. เอกสารประกอบการเรียนเทคโนโลยีเอนไซม์ , 2548.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. **การวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยวิธีไดโครเมท**. เอกสารประกอบการเรียนเคมีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หมัก, 2548.

ปราณี สถิรพิพัฒน์กุล. **การผลิตอะซิโตน-บิวทานอลจากผักตบชวาที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2532.

ปิยวรรณ สายมโนพันธ์ และ พัชรินทร์ ฉัตรประเสริฐ, **การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสจากขยะกระดาษโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย.** คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2538.

พิสุทธิ์ พวงนาค. **การกลายพันธุ์ของรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. **การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545.

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. **การผลิตเอทธานอลจากฟางข้าว.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชา**เคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2538.**

ลลิตา นิทัศนจารุกุล. **ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อ Cellulose Activity ในดินนาข้าว.** โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ บุญเทียม พันธุ์เพิ่ง และสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา. **เทคนิคเบื้องต้นสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร.** เอกสารประกอบการเรียนการปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร, 2548.

Acebal C., Castillon M.P., Estrada P., Mata I., Costa E., Aguado J., Romero D., Jimenez F., 1986. Enhanced cellulose production from *Trichoderma reesei* QM 9414 on physically treated wheat Straw **Appl Microbiol Biotechnol**.

Farooq Latif , Mohammad Ibrahim Rajoka . 2001. production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology** .

James P., Casey. 1960. **Pulp and paper chemistry and chemical technology**. USA : John Whiley & sons.

Johan Guillichsen, Carl-Joban Fogelbolm .2000 . **Chemical Pulping**. Finland : Fapet Jyvaskyla.

Kimball,J.W. 2003 [Online]. Available at : http://users.rcn.com.

Martin A.M . 1991.**Bioconversion of waste material to industrial products**. London : Elsevier applied Science.

Mats Larsson , Mats Galbe, Guuido zacchi , 1997. Recirculation of process water in the production of ethanol from softwood. **Bioresource technology**.

Okeke B.C. 1995 . Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases. **Bioresource technology**.

Rose Aiken Gortner. 1950. **Outlines of biochemistry**. USA : John Whiley & sons.

Soto M.L., Kominguez H., Nunez., M.J.,Lima J.M. 1994. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresource technology**.

Stephen Y.L., Carlton W.D. 1992 . **Methods in lignin chemistry**. Springer series in wood science.

TAPPI. 2000-2001.**Method for determination of alpha- , beta-, gramma- cellulose in pulp** Technical Association of Pulp and Paper Industry.

Wrolstad, R. E.2001. **Current Protocols In Food Analytical Chemistry.Vol I.** John Wiley and Son, Inc. New York.

[online]. Available at: http://www. ku.ac.th

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ส่วนประกอบ ในเหง้ามันสำปะหลัง

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (TAPPI , 2000-2001)

1.1 สารเคมีและวิธีเตรียม

1.1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีเตรียม : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 175 กรัม ในน้ำกลั่น และเจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.1.2 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต [$K_2Cr_2O_7$] เข้มข้น 0.5 นอร์มัล

วิธีเตรียม : สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 24.52 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

1.1.3 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐานเข้มข้น 0.100 นอร์มัล

วิธีเตรียม : สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 4.904 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

1.1.4 สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.100 นอร์มัล

วิธีเตรียม : สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต [$Fe(NH_4)(SO_4)$. $6H_2O$] หนัก 40.5 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้ โดยนำไปไตเตรทกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน

วิธีหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอน : ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐานปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 12 มิลลิลิตร ลงในขวด โดยเอียงขวดทำมุมปริมาตร 45 องศากับพื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หยดอินดิเคเตอร์ 2 ถึง 4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ต้องการทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

วิธีการคำนวณ :

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต, นอร์มัล

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต, นอร์มัล

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต, มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต, มิลลิลิตร

1.1.5 สารละลายอินดิเคเตอร์ (indicator)

วิธีเตรียม : ละลาย 1,10-ฟีนานโธลีนโมโนไฮเดรท ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) หนัก 1.5 กรัม กับเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 . H_2O$) 0.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการไตเตรท

1.1.6 กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ (ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.84)

1.1.7 สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 นอร์มัล

วิธีเตรียม : ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 83.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.2 วิธีวิเคราะห์

ชั่งเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการบด หนัก 1.5 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ลงในบีกเกอร์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา วางบนเครื่องกวนสาร จับเวลาเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที กรองสารละลายเพื่อแยกตะกอนฟางออกโดยทิ้งสารละลายใน 10 มิลลิลิตรแรก เก็บสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส (เซลลูโลส) (TAPPI , 2000-2001)

ปิเปตสารละลายที่กรองได้จากข้อ 1.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมทเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หยดอินดิเคเตอร์ 2- 4 หยด นำไปไตเตรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เตรียมสารละลายแบลงค์โดยปิเปตโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้ม 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง

วิธีการคำนวณ

$$\text{แอลฟา-เซลลูโลส (\%)} = 100 - [6.85 (V_2 - V_1) \times N \times 20 / A \times W]$$

เมื่อ

V_1 = **ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลาย**
ตัวอย่าง , มิลลิลิตร

V_2 = **ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลาย**
แบลงค์, มิลลิลิตร

N = **ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต, นอร์มัล**

A = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ , มิลลิลิตร

W = น้ำหนักฟางแห้ง , กรัม

6.85 = มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับ
เซลลูโลส

1.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ แกมม่า- เซลลูโลส (TAPPI , 2000-2001)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 1.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 นอร์มัล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 - 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2- 3 นาที กรองสารละลายใสแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส

วิธีการคำนวณ

$$\text{แกมม่า – เซลลูโลส} = [6.85\,(V_4 - V_3) \times N \times 20 / A \times W]$$

เมื่อ

V_3 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลาย
ตัวอย่าง , มิลลิลิตร

V_4 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลาย
แบลงค์, มิลลิลิตร

1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณ เบต้า – เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

วิธีการคำนวณ

เบต้า – เซลลูโลส = 100 – (แอลฟา – เซลลูโลส + แกมม่า – เซลลูโลส)

1.2.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน (TAPPI , 2000-2001)

ลิกนิน = 100 – เปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลส – เปอร์เซ็นต์ของเฮมิเซลลูโลส

2. วิธีวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรองโดยวิธีของ Mendel และ Stemberry (Wrolstad,.2001.)

2.1 สารเคมีและวิธีเตรียม

2.1.1 สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรดด่าง 4.8

วิธีเตรียม : สารละลายกรดซิตริก 2.1014 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร และละลายโซเดียมซิเตรต 4.4115 กรัมในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งสองส่วนมาผสมกัน และเก็บในตู้เย็น

2.1.2 สารละลายกรดไดไนโตรสาลิไซลิก

วิธีเตรียม : ละลายกรดไดไนโตรสาลิไซลิก 5 กรัมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และค่อยๆละลายโปแตสเซียมทาร์เทรตอีก 150 กรัม จนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร และเก็บในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง

2.2 วิธีวิเคราะห์

ตัดกระดาษกรองเบอร์ 1 ให้มีขนาดเล็กเท่ากัน จำนวน 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3

3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS Method (Wrolstad,.2001.)

3.1 การทำกราฟมาตรฐาน

1. อบกลูโคสที่อุณหภูมิ 105 – 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

หลอดที่	กลูโคส (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มก./มล.)
1	0	1.0	0
2	0.2	0.8	0.1
3	0.4	0.6	0.2
4	0.6	0.4	0.3
5	0.8	0.2	0.4
6	1.0	0	0.5

2. เติมสารละลายไดไนโตรสาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด และผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็น โดยย้ายมาวางในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา

3. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็นแบลงค์

4. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ แล้วหาความชัน

3.2 วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

2. เติมสารละลายไดไนโตรสาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด และผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็น โดยย้ายมาวางในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา

3. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็นแบลงค์

4. วิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยวิธี ไดโครเมทออกซิเดชัน (Dichromate Oxidation) (บุญเทียม , 2548)

4.1 สารเคมีและวิธีเตรียม

4.1.1 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$)

วิธีเตรียม : เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 325 มิลลิลิตร ลงในน้ำ 400 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร คนเบาๆ ทำให้เย็น อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เติมโพแทสเซียมไดโครเมต 33.768 กรัม (เป็น primary standard) คนให้ละลาย ทำให้เย็น ถ่ายใส่ขวดตวงปริมาตรขนาด 1 ลิตร ค่อยๆ เติมน้ำลงไปจนปริมาตรเกือบถึงขีด ทำให้เย็น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.1.2 สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต $[Fe(NH_2)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O]$

วิธีเตรียม : ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 135.5 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดตวงปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

4.1.3 สารละลาย 1,10-Phenanthroline indicator

วิธีเตรียม : ละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.695 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วเติม *o*-Phenanthroline indicator. H_2O 1.485 กรัม คนให้ละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

4.2 วิธีวิเคราะห์

4.2.1 การกลั่นตัวอย่างโดยใช้ Kjeldahl apparatus แบบอัตโนมัติที่ใช้ไฟฟ้า

ต้มน้ำใน steam generator ให้เดือด แล้วเปิดให้น้ำเย็นไหลผ่าน condenser ใส่สารละลาย โพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำมาวางรองรับที่ปลาย condenser โดยให้ปลาย condenser จุ่มอยู่ในสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ปิเปตตัวอยบ่าง 1 มิลลิลิตร เช็ดตัวอย่างที่เปื้อนอยู่ด้านนอกปิเปตให้แห้ง ถ่ายตัวอย่างลงในหลอดย่อยโปรตีน และใช้ขวดน้ำล้างฉีดรอบๆ ผิวด้านในหลอดกลั่นโปรตีนจนแน่ใจว่าไม่มีตัวอย่างติดค้าง

นำหลอดย่อยโปรตีนนี้ไปเสียบต่อเข้ากับเครื่องแล้วเปิดให้ไอน้ำไหลเข้ามาในหลอดย่อยโปรตีน กลั่นจนกระทั่งปริมาตรของสารละลายในขวดรูปกรวยที่มีโพแทสเซียมไดโครเมต ที่ใช้รองรับสารละลายที่กลั่นได้ มีปริมาตรเพิ่มเป็นประมาณ 40 มิลลิลิตร ให้เอาขวดรูปกรวยออก โดยใช้ขวดน้ำล้างฉีดที่ปลาย condenser ให้สารละลายที่ติดอยู่ไหลลงมาในขวดรูปกรวย ปิดจุกแล้วนำขวดรูปกรวยไปจุ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60±2 องศาเซลเซียส นาน 20-25 นาที เพื่อให้การออกซิเดชันสมบูรณ์

4.2.1 การไตเตรท

นำสารละลายที่ผ่านการให้ความร้อนเพื่อให้การออกซิเดชันสมบูรณ์แล้ว มาไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนได้สารละลายเขียวใสมรกต แล้วเติมสารละลาย o-Phenanthroline indicator 0.5 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทต่อไปจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงซึ่งเป็นจุดยุติ ให้ปริมาตรที่ไตเตรทได้เป็น V

ทำการไตเตรทแบลงค์ (blank) โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำมาไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตโดยตรง ให้ปริมาตรที่ไตเตรทที่ได้เป็น V' มิลลิลิตร

4.3 วิธีคำนวณ

ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร) = $[\,25-(25(V)/(V'))](0.7933)$

5. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ MY Broth (อดิศร และคณะ, 2548)

5.1 สูตรอาหาร

กลูโคส (Dextrose)	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Peptone	3 กรัม
Malt extract	3 กรัม

5.2 วิธีการเตรียม

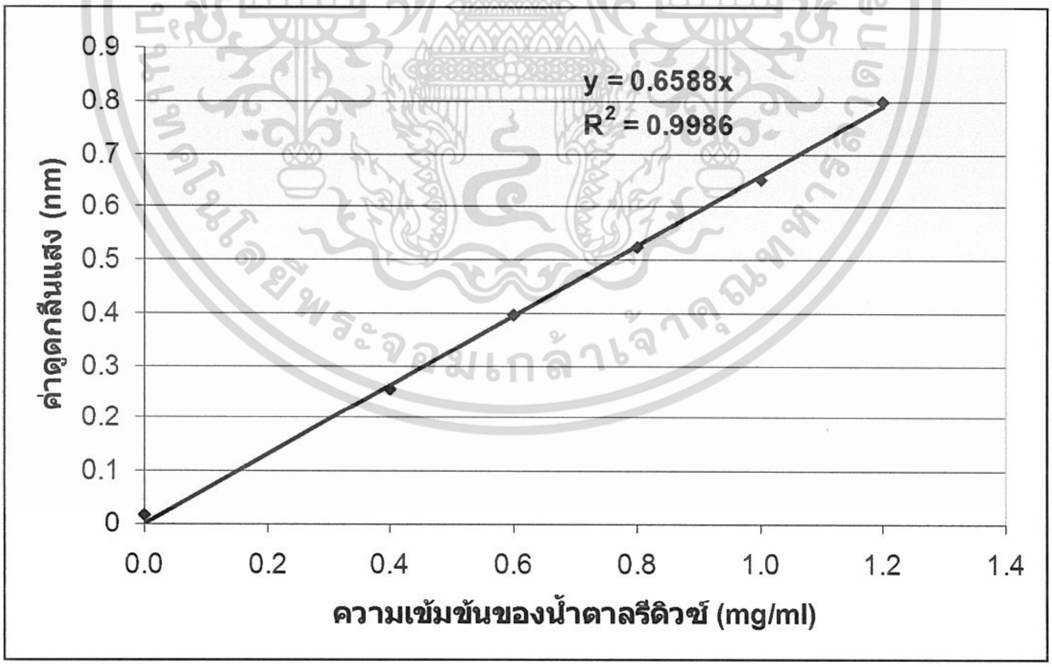
ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยมีการกวนตลอดเวลา ถ่ายใส่ขวดรูปชมพู่ปริมาตรประมาณ 100 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี เข้าฆ่าเชื้อในหม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ ข.1 ผลค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกลูโคส (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0.017	0.020	0.018	0.018
0.2	0.124	0.122	0.112	0.119
0.4	0.262	0.260	0.245	0.256
0.6	0.402	0.403	0.388	0.398
0.8	0.527	0.517	0.525	0.523
1.0	0.665	0.626	0.664	0.652
1.2	0.808	0.793	0.801	0.801
1.4	0.959	0.934	0.970	0.954



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ 550 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

1. การวิเคราะห์หาปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ในเหง้ามันสำปะหลังก่อนการปรับสภาพทางเคมี

1.1 การหาความเข้มข้นเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต

ตารางที่ ค.1 ผลการหาความเข้มข้นเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต

ครั้งที่	ปริมาณสารละลาย เฟอร์รัแอมโมเนียซัลเฟต (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลาย เฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต (นอร์มอล)
1	10.25	0.0979
2	10.45	0.0957
3	10.35	0.0966
เฉลี่ย	10.35	0.0966

สูตรการคำนวณ

$$N_2V_2 = N_1V_1$$

เมื่อ

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (นอร์มอล)

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มอล)

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ (ครั้งที่ 1)

$$N_2V_2 = N_1V_1$$

$$N_2 \times 10.14 = (0.1)(10)$$

$$N_2 = 0.0986$$

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในเหง้ามันสำปะหลังก่อนการปรับสภาพทางเคมี

1.2.1 การหาปริมาณเซลลูโลส

ตารางที่ ค.2 ผลการหาปริมาณเซลลูโลส

ครั้งที่	ปริมาณเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต (มิลลิลิตร)	ปริมาณเซลลูโลส (%)
blank	52.00	-
1	33.60	83.76
2	33.30	83.50
3	33.45	83.63
เฉลี่ย	33.45	83.63

สูตรการคำนวณ

แอลฟา – เซลลูโลส (เซลลูโลส) (%) = 100 – (6.85 ($V_1 - V_2$) x N x 20 / A x W)

เมื่อ

V_1 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต (นอร์มอล)

A = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักฟางแห้ง (กรัม)

6.85= มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

ตัวอย่างการคำนวณ (ครั้งที่ 1)

แอลฟา – เซลลูโลส (เซลลูโลส) (%) = 100 – (6.85 (52.00 – 33.60) x 0.0966 x 20 / 10 x 1.5)

= 83.76 %

1.2.2 การหาปริมาณแกมม่า – เซลลูโลส

ตารางที่ ค.3 ผลการหาปริมาณแกมม่า – เซลลูโลส

ครั้งที่	ปริมาณเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต (มิลลิลิตร)	ปริมาณแกมม่า - เซลลูโลส (%)
blank	52.00	-
1	42.40	8.56
2	42.60	8.29
3	42.50	8.38
เฉลี่ย	42.50	8.41

สูตรการคำนวณ

แกมม่า – เซลลูโลส (%) = (6.85 (V_1 – V_2) x N x 20 / A x W)

เมื่อ

V_3 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_4 = ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต (นอร์มอล)

A = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักฟางแห้ง (กรัม)

6.85= มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

ตัวอย่างการคำนวณ (ครั้งที่ 1)

แกมม่า – เซลลูโลส (%) = (6.85 (52.00 – 42.30) x 0.0966 x 20 / 10 x 1.5)

= 8.56 %

1.2.3 การหาปริมาณเบต้า – เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

สูตรการคำนวณ

เบต้า – เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส) (%) = 100 – (แอลฟา – เซลลูโลส + แกมม่า – เซลลูโลส)

= 100 - (83.63 + 8.41)

= 7.96 %

1.2.4 การหาปริมาณลิกนิน

สูตรการคำนวณ

ลิกนิน = 100 – (% เซลลูโลส - % เฮมิเซลลูโลส)

= 100 - (83.63 – 7.96)

= 8.41 %

2. การวิเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆ ในเหง้ามันสำปะหลังหลังการปรับสภาพทางเคมี

2.1 การหาความเข้มข้นเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต

ตารางที่ ค.4 ผลการหาความเข้มข้นเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต

ครั้งที่	**ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต (มิลลิลิตร)**	**ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต (นอร์มอล)**
1	10.14	0.0986
2	10.20	0.0980
3	10.12	0.0988
เฉลี่ย	10.15	0.0985

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในเหง้ามันสำปะหลังหลังการปรับสภาพทางเคมี

2.2.1 การหาปริมาณแอลฟา – เซลลูโลส (เซลลูโลส)

ตารางที่ ค. 5 ผลการหาปริมาณแอลฟา – เซลลูโลส (เซลลูโลส)

ครั้งที่	**ปริมาณเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต (มิลลิลิตร)**		**ปริมาณเซลลูโลส (%)**	
	50 °C	**70 °C**	**50 °C**	**70 °C**
blank	52.00		-	
1	50.80	49.30	98.90	97.57
2	50.80	50.50	98.90	98.65
3	50.20	50.70	98.40	98.83
เฉลี่ย	50.60	50.16	98.73	98.34

2.2.2 การหาปริมาณแกมม่า – เซลลูโลส

ตารางที่ ค. 6 ผลการหาปริมาณแกมม่า – เซลลูโลส

ครั้งที่	ปริมาณเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต (มิลลิลิตร)		ปริมาณแกมม่า – เซลลูโลส (%)	
	50 ° C	70 ° C	50 ° C	70 ° C
blank	52.00		-	
1	50.90	51.20	0.99	0.72
2	50.50	51.20	1.35	0.72
3	51.20	51.00	0.72	0.90
เฉลี่ย	50.86	51.13	1.03	0.78

2.2.3 การหาปริมาณเบต้า – เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

ที่อุณหภูมิ 50 ° C

สูตรการคำนวณ

เบต้า – เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส) (%) = 100 – (แอลฟา – เซลลูโลส + แกมม่า – เซลลูโลส)

= 100 - (98.73 + 1.03)

= 0.24 %

ที่อุณหภูมิ 70 ° C

สูตรการคำนวณ

เบต้า – เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส) (%) = 100 – (แอลฟา – เซลลูโลส + แกมม่า – เซลลูโลส)

= 100 - (98.34 + 0.78)

= 0.88 %

2.2.4 การหาปริมาณลิกนิน

ที่อุณหภูมิ 50 ° C

สูตรการคำนวณ

ลิกนิน = 100 – (% เซลลูโลส - % เฮมิเซลลูโลส)
= 100 - (98.74 – 0.24)
= 1.03 %

ที่อุณหภูมิ 70 ° C

สูตรการคำนวณ

ลิกนิน = 100 – (% เซลลูโลส - % เฮมิเซลลูโลส)
= 100 - (98.34 – 0.88)
= 0.78 %

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

3.1 การหาความสามารถในการย่อยของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ (Actvity)

การคำนวณหาหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (FPU) คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาทีที่ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

$$\boxed{\text{คำนวณได้จาก} \quad = \quad \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ได้ (กรัม)} \times 10^{6}}{180 \times 60}}$$

จากกราฟความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ 550 นาโนเมตร (ภาพที่ ข.1)

จะได้สมการเป็น $y = 0.6588x$

ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5000 ppm หรือคิดเป็น dilution เท่ากับ 1 : 200

แทนค่า $(0.595) = 0.6588x$

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ = 0.904 mg/ml

คูณ dilution = 0.904 x 200

= 180.8 mg/ml

ปริมาตรรวม 2 ml

(buffer 1.5 ml + enzyme 0.5 ml) = 180.2 x 2

= 361.6 mg/ml

ความสามารถในการย่อยกระดาษกรองของเอนไซม์ $= \dfrac{361.6 \times 10^{-3} \times 10^{6}}{180 \times 60}$

= 33.48 FPU/ml

3.2 ผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

ตารางที่ ค.7 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

pH	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ ± SD (มก./มล.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
4.0	0.444	0.496	0.469	0.470	0.610 ± 0.039509
4.4	0.543	0.531	0.536	0.537	0.678 ± 0.009018
4.8	0.564	0.562	0.567	0.564	0.816 ± 0.004041
5.2	0.528	0.520	0.526	0.525	0.658 ± 0.006245
5.6	0.487	0.418	0.403	0.436	0.569 ± 0.067870
6.0	0.394	0.328	0.406	0.376	0.407 ± 0.063571

3.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

ตารางที่ ค.8 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

อุณหภูมิ	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ ± SD (มก./มล.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
30	0.392	0.387	0.402	0.394	0.598 ± 0.011676
40	0.436	0.432	0.385	0.418	0.634 ± 0.043405
50	0.453	0.440	0.447	0.447	0.678 ± 0.010017
60	0.422	0.419	0.441	0.427	0.649 ± 0.017786
70	0.415	0.398	0.411	0.408	0.619 ± 0.013614

3.4 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ต่อปริมาณเหง้ามันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง

ตารางที่ ค.9 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง

ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ (FPU/กรัมเหง้ามันสำปะ หลัง)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร				dilution	น้ำตาลรีดิวซ์ ± SD (มก./มล.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
11.160	0.335	0.359	0.326	0.340	1 : 2	1.032 ± 0.007211
6.696	0.430	0.428	0.435	0.431	1 : 2	1.308 ± 0.005033
3.348	0.416	0.424	0.427	0.422	1 : 2	1.282 ± 0.010504
0.670	0.308	0.315	0.313	0.312	1 : 2	0.947 ± 0.007095
0.335	0.226	0.248	0.235	0.236	1 : 2	0.717 ± 0.005196

ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ (FPU/กรัมเหง้ามันสำปะ หลัง)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร				dilution	น้ำตาลรีดิวซ์ ± SD (มก./มล.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
0.067	0.385	0.398	0.393	0.392	-	0.595 ± 0.010149
0.034	0.360	0.354	0.354	0.356	-	0.540 ± 0.033710
0.017	0.334	0.331	0.325	0.330	-	0.501 ± 0.010817
0.011	0.312	0.305	0.319	0.312	-	0.474 ± 0.017059
0.008	0.264	0.268	0.271	0.268	-	0.406 ± 0.011372
0.007	0.256	0.250	0.247	0.251	-	0.381 ± 0.051733

SUGAR

			Subset for alpha = .05							
	CONC.EN	N	1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	.007	3	.38100							
	.008	3	.40633							
	.011	3		.47367						
	.017	3		.50067						
	.034	3			.54000					
	.067	3				.59500				
	.335	3					.71733			
	.670	3						.94700		
	11.160	3							1.03233	
	3.348	3								1.28200
	6.696	3								1.30833
	Sig.		.148	.125	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.134

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค.10 ค่าเฉลี่ยของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ (FPU/กรัมเหง้ามันสำปะหลัง)	**ค่าเฉลี่ย ***
11.160	1.03233^{g}
6.696	1.30833^{h}
3.348	1.28200^{h}
0.670	0.94700^{f}
0.335	0.71733^{e}
0.067	0.59500^{d}
0.034	0.54000^{c}
0.017	0.50067^{b}
0.011	0.47367^{b}
0.008	0.40633^{a}
0.007	0.38100^{a}

หมายเหตุ * คือ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2 ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

ตารางที่ ค.11 ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ ± SD (mg/ml)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.020	0.025	0.021	0.022	0.033 ± 0.004163
6	0.256	0.264	0.260	0.260	0.395 ± 0.006000
12	0.342	0.336	0.339	0.339	0.515 ± 0.004509
18	0.493	0.489	0.495	0.492	0.747 ± 0.004583
24	0.532	0.531	0.532	0.532	0.807 ± 0.001155
30	0.534	0.535	0.532	0.534	0.810 ± 0.002082
36	0.533	0.540	0.537	0.537	0.815 ± 0.005508
42	0.537	0.550	0.534	0.540	0.820 ± 0.012858
48	0.553	0.544	0.507	0.535	0.812 ± 0.036665

SUGAR

			Subset for alpha = .05				
	TIME	N	1	2	3	4	5
Duncan[a]	0	3	.03333				
	6	3		.39500			
	12	3			.51467		
	18	3				.74700	
	24	3					.80733
	30	3					.81033
	48	3					.81167
	36	3					.81467
	42	3					.82033
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.302

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค.12 ค่าเฉลี่ยของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา	**ค่าเฉลี่ย ***
0	0.03333^{a}
6	0.39500^{b}
12	0.51467^{c}
18	0.74700^{d}
24	0.80733^{e}
30	0.81033^{e}
36	0.81467^{e}
42	0.82033^{e}
48	0.81167^{e}

หมายเหตุ * คือ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ ***Saccharomyces cerevisiae***

ตารางที่ ค.13 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

วันที่	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)**	**pH**	**ปริมาณเอทานอล (%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)**
0	9.55	4.00	0
2	4.02	3.94	0.60
4	2.63	3.92	2.92
6	1.11	3.86	3.46
8	1.06	3.83	3.42
10	0.92	3.80	3.38

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณเอทานอลในวันที่ 2

จากสูตร

ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) $= [\,25 - \frac{25(v)}{v'}\,]$

เมื่อ v = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ไทเทรตตัวอย่าง

v' = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ไทเทรตแบลงค์

แทนค่า

ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) $= [\,25 - \frac{25(52.13)}{53.4}\,]$

$= 0.6$ %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ประวัติผู้เขียน

นางสาวแววตา อินฉาย เกิดวันที่ 24 กรกฎาคม 2527 จังหวัดระยอง สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนระยองวิทยาคม จังหวัดระยอง พ.ศ.2546 ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาเทคโนโลยีการหมัก)

นางสาวสุรีพร หงษาวดี เกิดวันที่ 22 เมษายน 2528 จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการ ศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสมเด็จพระปิยมหาราชรมณียเขต จังหวัดกาญจนบุรี พ.ศ. 2546 ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาเทคโนโลยีการหมัก)

นางสาวสวรรยาภรณ์ บำรุงธรรม เกิดวันที่ 17 พฤศจิกายน 2526 จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์ พ.ศ. 2546 ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาเทคโนโลยีการหมัก)

บทที่ 5

ผลและวิจารณ์การทดลอง

5.1 ผลจากการศึกษาการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง

5.1.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด

จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด พบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่ในเหง้ามันสำปะหลังเป็นเซลลูโลส 83.63 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่เหลือเป็นเฮมิเซลลูโลส 7.96 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และลิกนิน 8.41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบด แต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

ส่วนประกอบต่าง ๆ	**ปริมาณส่วนประกอบในตะกอนเหง้ามันสำปะหลัง (% น้ำหนักแห้ง)**
เซลลูโลส	83.63
เฮมิเซลลูโลส	7.96
ลิกนิน	8.41

ผลจากการวิเคราะห์ พบว่าเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่พบมากที่สุดในเหง้ามันสำปะหลังจึงเป็นแรงจูงใจที่จะทำการศึกษาและวิจัยเพื่อนำเหง้ามันสำปะหลังกลับมาใช้ประโยชน์ให้คุ้มค่าโดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกลูโคส เนื่องจากกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น แอลกอฮอล์ กรดซิตริก ผงชูรส ซอร์บิทอล อุตสาหกรรมการผลิตยาต่างๆ และเป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น (พรรณวิไล , 2545) การผลิตกลูโคสจากเหง้ามันสำปะหลังจึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทางหนึ่ง

เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย คือ เหง้ามันสำปะหลัง ซึ่งยังมีเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นส่วนประกอบอยู่ในโครงสร้าง และเป็นตัวขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้น ขั้นตอนต่อไปจึงต้องทำการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับการใช้ความร้อน เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากโครงสร้าง และปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

5.1.2 ผลการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส

จากงานวิจัยของพรรณวิไล (2545) ได้ศึกษาการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังที่บดแล้วในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30, 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงขึ้น สารละลายดังกล่าวจะเข้าไปทำปฏิกิริยาสลายพันธะของโครงสร้างระหว่างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ทำให้มีเฮมิเซลลูโลส และลิกนินสูญเสียไปในระหว่างการปรับสภาพสูงขึ้น และยังทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสมีขนาดเล็กลง ทำให้มีการสูญเสียเซลลูโลสไปในระหว่างการปรับสภาพซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงระหว่าง 10-16 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว ในการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะให้ผลได้ของปริมาณเซลลูโลส(% cellulose yield)สูงที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 2 โมลาร์ แต่ถ้าพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ลิกนิน กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ นั้นยังมีปริมาณลิกนินเหลืออยู่ในโครงสร้างสูง ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เนื่องจากที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์นี้เหลือปริมาณลิกนินอยู่น้อย และมีผลได้ของปริมาณเซลลูโลส (% cellulose yield) อยู่สูง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ในการปรับสภาพตะกอนเหง้ามันสำปะหลัง

เมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังของพรรณวิไล (2545) กับงานวิจัยของฟางข้าวของระวีวรรณ (2538) ที่ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิในระดับต่างๆ พบว่า

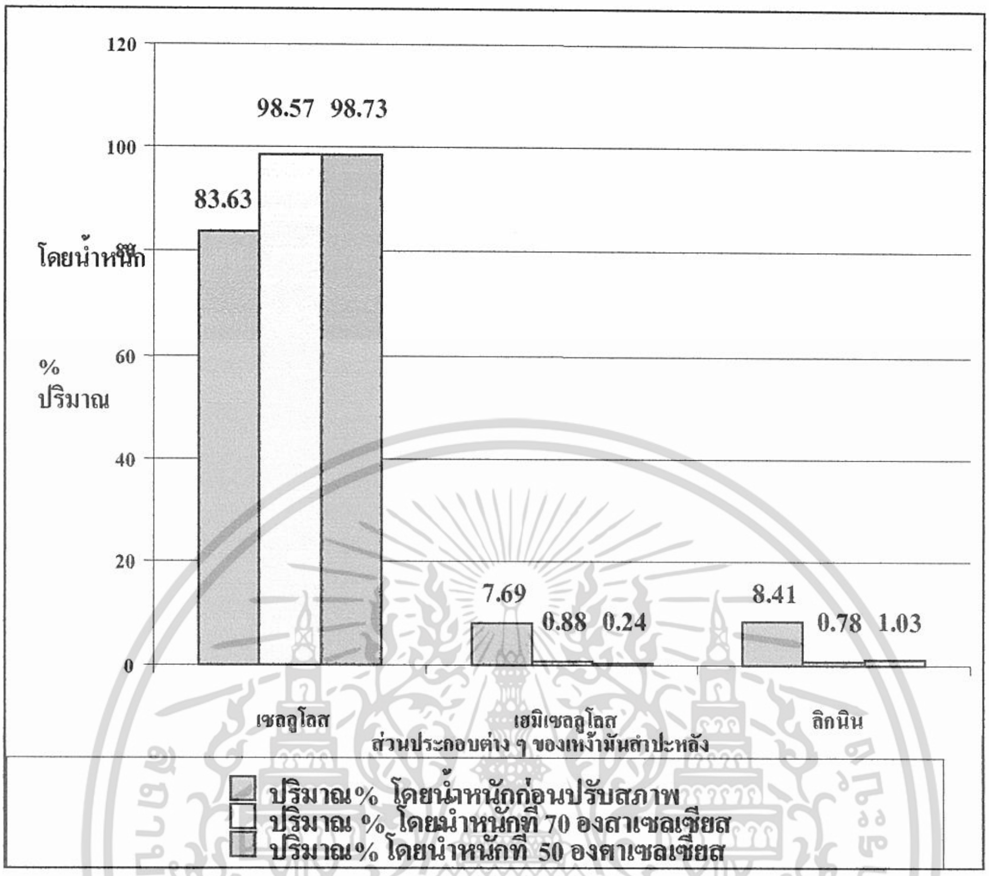
งานวิจัยการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังได้อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส และงานวิจัยฟางข้าวได้อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 70 องศาเซลเซียส ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงทำการทดลองเปรียบเทียบอุณหภูมิระหว่าง 50 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส

จากการทดลองโดยการแช่เหง้ามันสำปะหลังที่บดแล้ว ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเหง้ามันสำปะหลังต่อสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเหง้ามันสำปะหลังที่แช่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ไปต้มที่ความเข้มข้นและอัตราส่วนเดียวกับที่แช่ โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ 2 ระดับต่อการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังคือ 50 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.2 และภาพที่ 5.1

ตารางที่ 5.2 แสดงส่วนประกอบในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ	**ปริมาณส่วนประกอบในตะกอนเหง้ามันสำปะหลัง (% น้ำหนักแห้ง)**	
	50 องศาเซลเซียส	**70 องศาเซลเซียส**
เซลลูโลส	98.73	98.57
เฮมิเซลลูโลส	0.24	0.88
ลิกนิน	1.03	0.78

จากตารางที่ 5.2 พบว่าเมื่อนำเหง้ามันสำปะหลังมาปรับสภาพทางกายภาพโดยการบดจะมีปริมาณเซลลูโลสอยู่ 83.63 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาผ่านการปรับสภาพทางเคมีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซียลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าการแช่เหง้ามันสำปะหลังในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 98.73 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเหลืออยู่ 0.24 และ 1.03 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการแช่เหง้ามันสะหลังในสารละลายดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ใกล้เคียงกันกับเมื่อแช่เหง้ามันสำปะหลังในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 5.1 ส่วนประกอบต่างๆ ในเหง้ามันสำปะหลังก่อนการปรับสภาพและที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

จากภาพที่ 5.1 เป็นการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบต่าง ๆ ในเหง้ามันสำปะหลังหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ กับปริมาณเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้ความร้อนร่วมกับการใช้สารเคมีในการแช่เหง้ามันสำปะหลัง มีผลทำให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถแพร่เข้าไปในโครงสร้างของเซลลูโลสได้เร็วขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยาและเกิดการบวมตัวได้เร็วขึ้น จึงสามารถละลายและแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกมาได้มากขึ้น (Soto M.L. *et al.*, 1994)

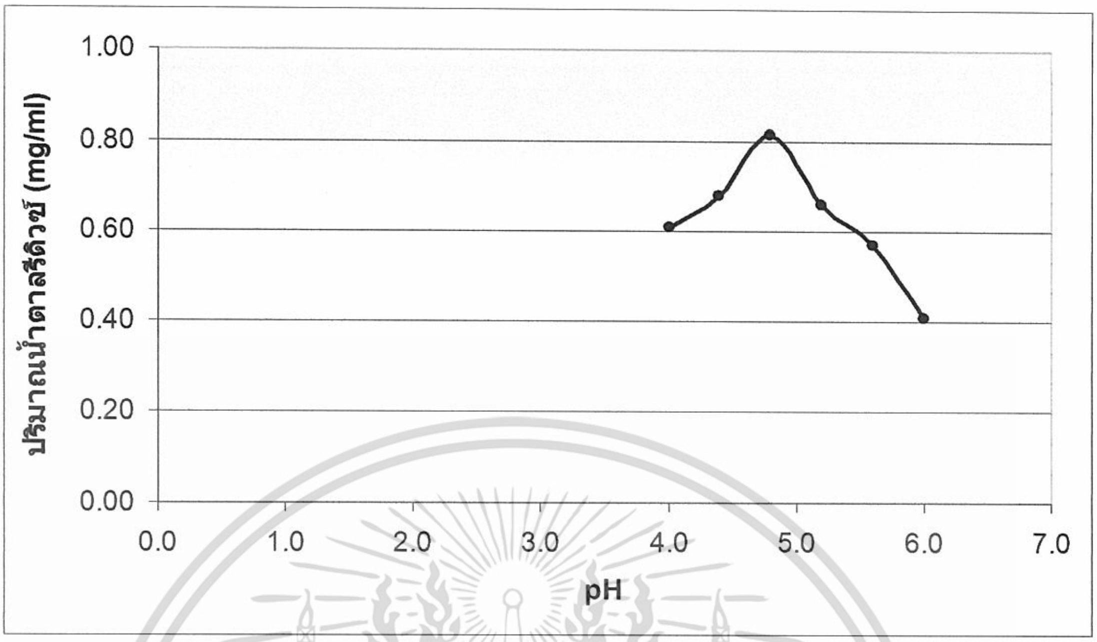
จากการทดลองการแช่เหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าตะกอนเหง้ามัน

และเหลือปริมาณเฮมิเซลลูโลสน้อยกว่านั้น อาจเนื่องมาจากการที่ใช้อุณหภูมิสูงขึ้นมีผลต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กับสับสเตรตที่เข้าทำปฏิกิริยากันและอาจมีผลต่อโครงสร้างของเซลลูโลส ทำให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าทำงานได้ไม่ดี แสดงว่าการเข้าทำปฏิกิริยาของสารละลายดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพสูงสุดที่อุณหภูมิที่เหมาะสม คืออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของพรรณวิไล (2545) ได้ทดลองปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 , 50 , 70 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส จะให้ผลได้ของปริมาณเซลลูโลสค่อนข้างสูงใกล้เคียงกัน แต่หากพิจารณาถึงปริมาณเซลลูโลสแล้ว ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลลูโลสสูงกว่า และเหลือเฮมิเซลลูโลสน้อยกว่า ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกับการทดลองนี้

5.2 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง

5.2.1 ผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

จากการทดลองโดยการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0 - 6.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์จะมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.8 โดยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.816 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 5.2



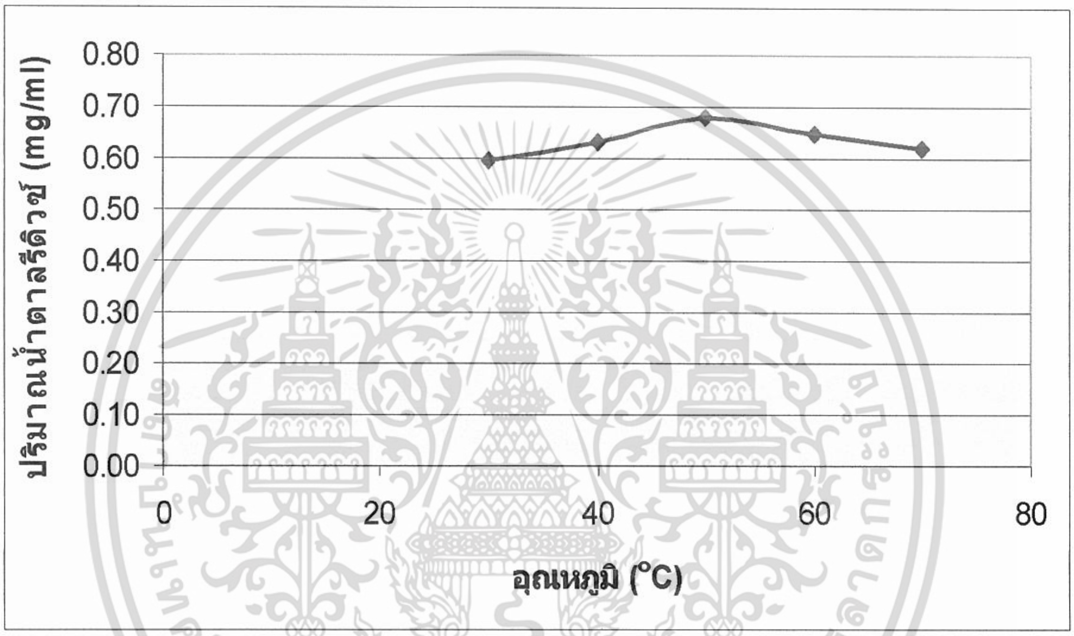
ภาพที่ 5.2 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

จากภาพที่ 5.2 พบว่าการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์จะมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.8 โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ซึ่งการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่าง เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างกันมีผลทำให้กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มีการแตกตัวของอิออน ให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการจับกันของเอนไซม์และสับเสตรตแตกต่างกัน (พรรณวิไล, 2545) ดังนั้นที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.8 มีผลให้เอนไซม์เซลลูบริกซ์อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง จึงได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างนี้

5.2.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์

จากการทดลองย่อยเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยใช้ค่าความเป็นกรดด่างของซิเตรตบัฟเฟอร์ที่ 4.8 และผันแปรอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตั้งแต่ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์เซลลูบริกซ์จะย่อยเหง้ามันสำปะหลังให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

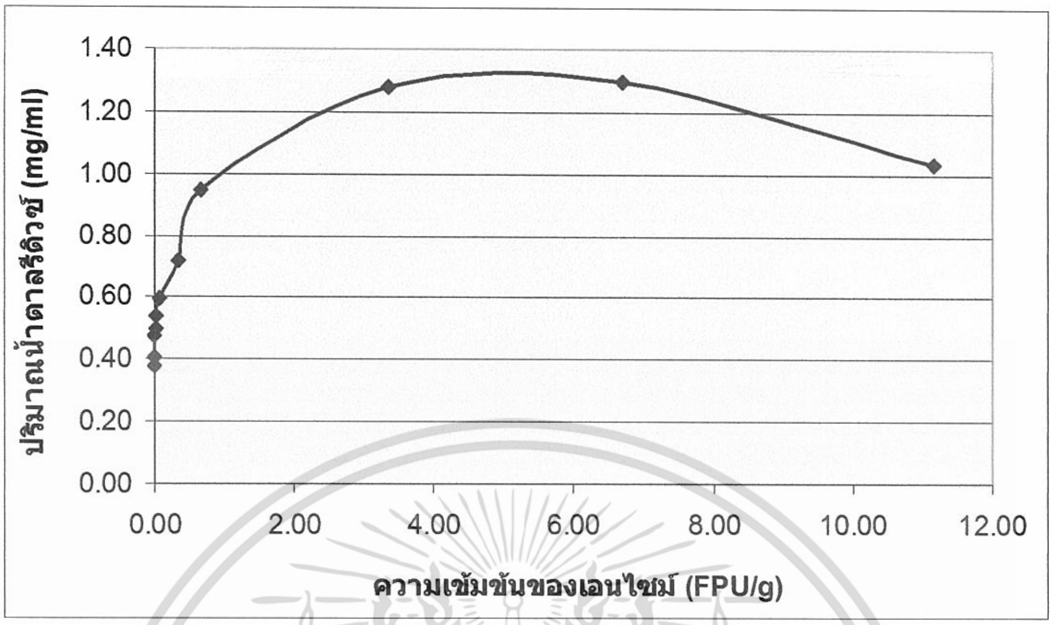
สูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงนี้มีผลทำให้ทั้งเอนไซม์และสับเสตรทเข้าทำปฏิกิริยากันมีพลังงานจลน์เพิ่มขึ้นแต่เมื่อให้อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เนื่องจากที่อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซียลเซียส จะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีหรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา (พรรณวิไล, 2545) ดังนั้นอุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับการย่อยเหง้ามันสำปะหลังคือที่ 50 องศาเซียลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 5.3



ภาพที่ 5.3 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.8

5.2.3 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูบริกซ์ต่อปริมาณเหง้ามันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เมื่อทดลองย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 กับข้อ 2.2 คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซียลเซียส ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.8 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการผันแปรปริมาณของเอนไซม์ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังตั้งแต่ 0.067 – 11.160 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ดังภาพที่ 5.4



ภาพที่ 5.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังแห้งในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 4.8 โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 0.067 ถึง 11.160 FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

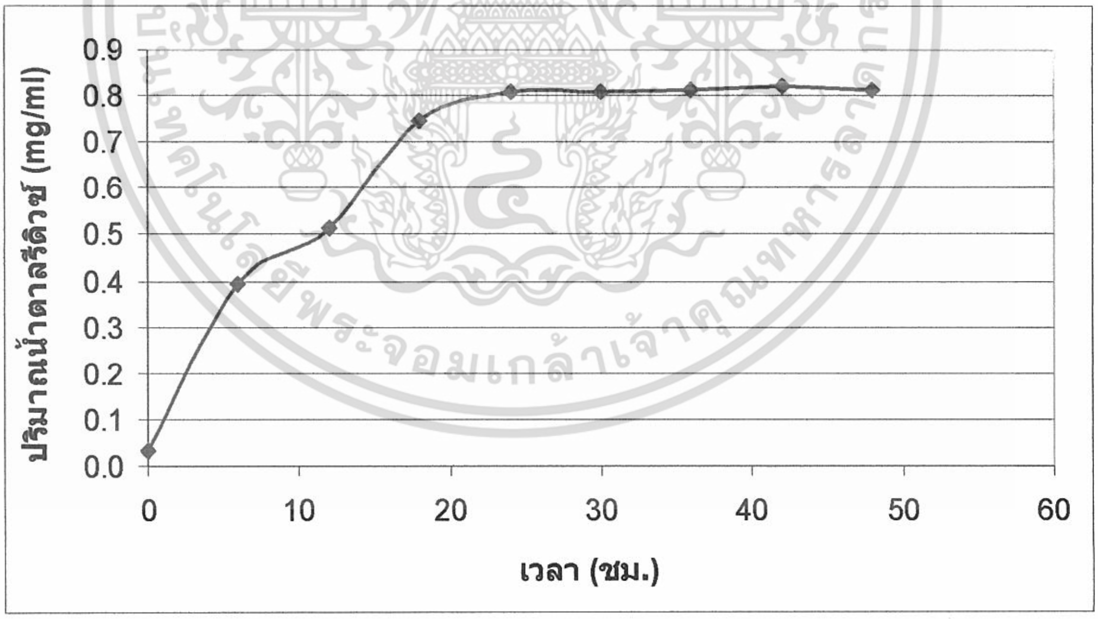
จากภาพที่ 5.4 พบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น การย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังก็มีค่าเพิ่มขึ้นทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นด้วย แต่หากปริมาณเอนไซม์สูงกว่า 6.696 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลังแล้วจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง

เมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณมากเกินไป จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จนกระทั่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ปฏิกิริยาจึงหยุด และไม่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอีก (พรรณวิไล, 2545) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 6.696 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 6.696 กับที่ 3.348 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ 6.696 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง สามารถย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลังแล้วให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 3.348 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งสองความเข้มข้นนี้ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ไม่แตกต่างทางสถิติหรือแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ ค.9 ดังนั้นในขั้นตอนการ

ย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์นี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 3.348 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง

5.2.3 ผลของการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลัง ด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ปริมาณ 3.348 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 ใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 3.348 หน่วย FPU ต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิการย่อยเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ พบว่าในช่วงแรกของการย่อย คือชั่วโมงที่ 0 ถึง 18 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และช้าลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากชั่วโมงที่ 24 ของการย่อย จะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ค่อนข้างคงที่ ไม่ว่าจะทำปฏิกิริยานานกว่า 24 ชั่วโมง เป็นเวลาเท่าใดก็ตาม จึงยุติปฏิกิริยาลงที่ชั่วโมงที่ 24 ของการย่อย และเลือกค่าดังกล่าวเป็นเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสจากเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ในการทดลองนี้



ภาพที่ 5.5 ผลของเวลาต่อการย่อยสลายเซลลูโลสในเหง้ามันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูบริกซ์ 3.348 หน่วย FPUต่อกรัมเหง้ามันสำปะหลัง ในซิเตรตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5.3 การเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในการทดลองนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

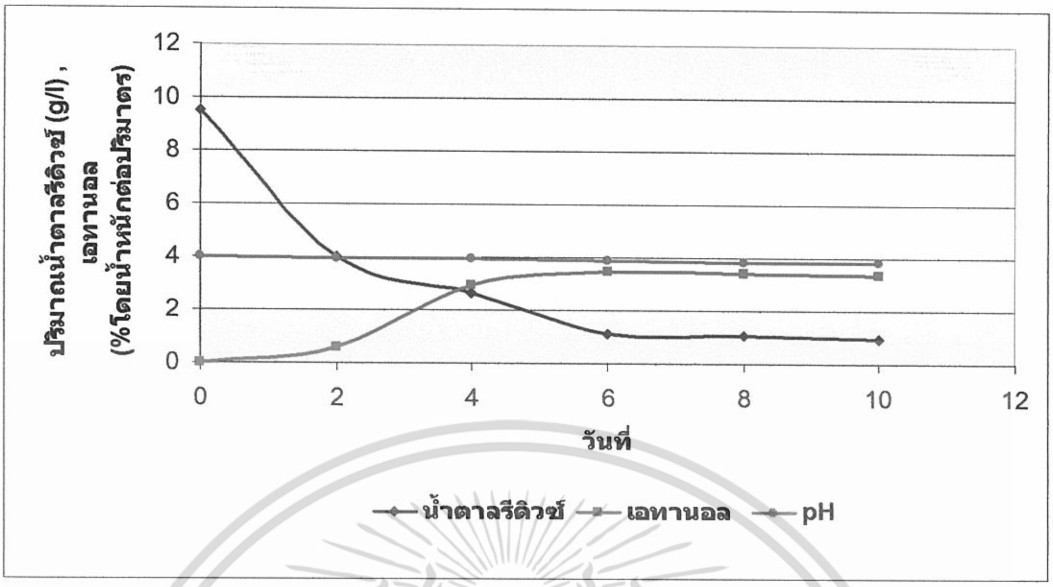
วัตถุดิบ	เอนไซม์		ชนิดของบัฟเฟอร์	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง			ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
	ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณเอนไซม์ FPU/g		ค่าพีเอช	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (hr.)		
เปลือกเมล็ดทานตะวัน	เซลลูเลส และเซลโลไบเอส	**25**	ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 M	**4.8**	**50**	**72**	น้ำตาลรีดิวซ์ 21 g/l	Soto M.L. และคณะ, 1994
ฟางข้าว	เซลลูเลส	40	ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	**4.5**	**50**	**48**	glucose yield **73%**	**Janusz Szczodark, 1897**
น้ำเสียจากวัสดุจำพวกรำข้าว ซังข้าวโพด (agro-waste materials)	เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากเชื้อ *Sporotrichum pruinosum* และ *Arthrograophis* sp.	-	ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	5.0	30	24	น้ำตาลกลูโคส 0.84-2.47 g/l และ glucose yield 12.5-28%	**Okeke B.C. และ Obi S.K.C. , 1995**
รำข้าว	เซลลูเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger*	0.1 g/l	ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 M	7.0	65	3	น้ำตาลกลูโคส 2.2 g/l	Sharma A. และ คณะ, 2001
ไม้อ่อน (softwood)	เซลลูเลส และ เบต้า-กลูโคซิเดส	12	-	4.8	40	96	น้ำตาลกลูโคส 26.2 g/l และ น้ำตาลแมนโนส 7.1 g/l	Mats Larsson และคณะ, 1997
กากสับปะรด	เซลลูเลส และ อะไมโลกลูโคซเดส	-	ฟอตเฟตบัฟเฟอร์	6.0	35	67	น้ำตาลรีดิวซ์ 58.63%	กาญจนา ทุมมานนท์ และคณะ, 2529
ฟางข้าว	เซลลูเลส	0.5 ml/g cellulose	โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	4.0	55	16	น้ำตาลรีดิวซ์ 557.07 mg/g	ระวีวรรณ แกล้วกล้า, 2537
ผักตบชวา	เซลลูเลส และ เบต้า-กลูโคซิเดส	30:30	โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	4.8	50	24	น้ำตาลกลูโคส 71.67 g/l	ปราณี สถิรพิพัฒน์กุล, 2532
เหง้ามันสำปะหลัง	เซลลูบริกซ์	3.348	ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M	4.8	50	24	น้ำตาลรีดิวซ์ 9.55 g/l	**งานวิจัยนี้**

จากตารางที่ 5.3 เป็นการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสในการทดลองนี้กับงานวิจัยอื่นๆ พบว่าสภาวะที่ใช้ทดลอง เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อุณหภูมิ และเวลา มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่นๆ

เมื่อเปรียบเทียบผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองนี้และงานวิจัยอื่นๆ พบว่าจากงานวิจัยของ Okeke B.C. และ Obi S.K.C. , 1995 ได้ย่อยน้ำเสียจากวัสดุจำพวกรำ ข้าว ซังข้าวโพดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซเซลลูเลสและเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสจากเชื้อ *Sporotrichum pruinosum* และ *Arthrograophis* sp. พบว่าได้น้ำตาลกลูโคส 0.84-2.47 g/l ที่เวลาและค่าความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกัน จะได้ผลน้อยกว่าการทดลองนี้คือเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งสองการทดลองแล้วพบว่าในการทดลองนี้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าประมาณ 3 เท่า

5.3 ผลการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเหง้ามันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

จากการทดลองการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเหง้ามันสำปะหลังปริมาณ 9.55 กรัมต่อลิตรโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า หลังจากวันที่ 2 ของการหมักปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และลดลงอย่างต่อเนื่องจนค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไป และในวันที่ 10 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่เพียงแค่ 0.92 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณเอทานอลค่อยๆเพิ่มขึ้นจนค่อนข้างคงที่ โดยทำการหมักทั้งหมด 10 วัน ได้ปริมาณเอทานอล 3.38 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งในวันที่ 6 ได้ปริมาณเอทานอลมากที่สุด 3.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยค่าความเป็นกรดด่างลดลงเล็กน้อยจากเริ่มต้น 4.0 เป็น 3.8 ดังภาพที่ 5.6



ภาพที่ 5.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 9.55 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 5.4 เป็นการเปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลที่ได้จากการทดลองนี้กับงานวิจัยอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบผลของการผลิตเอทานอลของการทดลองนี้กับงานวิจัยของระวีวรรณ (2538) ซึ่งเป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่างานวิจัยของระวีวรรณ (2538) ใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 2.7 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณเอทานอล 1.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดลองนี้ใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 9.55 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณเอทานอล 3.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่น้อยกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้เชื้อที่ต่างสายพันธุ์กัน ทำให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลต่างกัน การทดลองนี้จึงได้ปริมาณเอทานอลน้อยกว่าเล็กน้อย

ตารางที่ 5 4 การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการผลิตเอทานอลในการทดลองนี้กับงานวิจัยอื่น ๆ

แหล่งคาร์บอน	จุลินทรีย์	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง			ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (g/l)	ความเข้มข้นของเอทานอล (g/l)	เอกสารอ้างอิง
		พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (hr)			
น้ำตาลลูโคส	*Zymomonas mobilis* strain CP 4	5.0	30	-	60	55	Zhang และคณะ,1995 อ้างถึงใน Roger P.L และคณะ
ไม้แอสแพน	*Zymomonas mobilis* strain MSN 77	5.0	40	15	61.1	30	Kademl A. และ Baratti J., 1996
น้ำอ้อย	*Zymomonas mobilis* strain UQM 2716(ATCC 39767)	6.3	35	29	121	60.8	Horst W.D. และ Paul F G., 1985
ฟางข้าว	*Fusarium oxysporum* strain F3	5.5	30	72	40	8	Christahopoulos F. และคณะ,1991
ฟางข้าว	*Saccharomyces cerevisiae* strain TISTR 5013	5.0	30	96	2.7 กรัม	1.3056 กรัม หรือ 1.3 %	ระวีวรรณ แกล้วกล้า, 2538
น้ำตาลลูโคส	*Zymomonas mobilis* strain ATCC 10988	5.0-5.5	30	17.5	100	45	นริส ธนัพประภัศร์ และพรรณี จันทร์ปฐมพงศ์, 2525
น้ำตาลลูโคส	*Zymomonas mobilis* strain UQM 410 (ATCC10988)	5.0-6.0	30	48	150	53	สรวง อุดมวรภัณฑ์ และคณะ, 2525
เหง้ามันสำปะหลัง	*Saccharomyces cerevisiae*	4.0	30	144	9.55	3.46	งานวิจัยนี้