

การผลิตลิโนเซลลูโลสเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อย ลำต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 *

Lignocellulosic ethanol production from hydrolysate of cassava stems via batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048

เสรี มหาวิชัย

เฉลิม เรืองวิริยะชัย**

บทคัดย่อ

ลำต้นมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณมากในประเทศไทย สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตลิโนเซลลูโลสเอทานอลได้ เนื่องจากลำต้นมันสำปะหลังประกอบด้วยเซลลูโลสในปริมาณสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตลิโนเซลลูโลสเอทานอลจากลำต้นมันสำปะหลังด้วยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง แล้วทำการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลกระทบของการปรับสภาพตัวอย่างโดยใช้สารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ด้วยวิธีการต่างๆ จากผลของการศึกษาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางโดยใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เท่ากับ 0.24 ± 0.03 และ 0.26 ± 0.02 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่ามีกลูโคสและไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลส เท่ากับ 0.19 ± 0.01 และ 0.20 ± 0.01 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และไซโลส เท่ากับ 0.02 ± 0.01 และ 0.04 ± 0.01 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ส่วนการหมักแบบกะของสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลส ให้ผลผลิตเป็นเอทานอล เท่ากับ 0.063 และ 0.070 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎี เท่ากับร้อยละ 68.0 และ 74.3 ตามลำดับ

* บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทฉบับที่ เรื่องการผลิต ลิโนเซลลูโลสเอทานอลจากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางโดยการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (Center of Excellence for Innovation in Chemistry, PERCH-CIC) มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ภายใต้คณบดีวิจัยน้ำมันเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยมี รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิม เรืองวิริยะชัย อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

** นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีวิเคราะห์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: sermah2004@hotmail.com และรองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิม เรืองวิริยะชัย อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: chal_ru@kku.ac.th

Abstract

Cassava (*Manihot esculenta*) stems can be used as an alternative raw material for lignocellulosic ethanol production and they have a large volume left as agricultural biomass wastes in Thailand. In addition, they also contain high cellulose. Therefore, this project studied the use of cassava stems the lignocellulosic ethanol production by an acid hydrolysis process with dilute sulfuric acid. Subsequently, the hydrolysed solution was fermented via batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048. The effect of pretreatment was examined by using sodium hydroxide at various pretreatment methods. As a result, the quantitative analyses of total sugar derived from raw cassava stems and holocellulose by spectrophotometric techniques were 0.24 ± 0.03 and 0.26 ± 0.02 g/g of dried sample, respectively. Qualitative and quantitative analysis of reducing sugars by gas chromatographic techniques were measured and the results showed that they contained glucose and xylose as major components. The yields of these sugars derived from raw cassava stems and holocellulose were 0.19 ± 0.01 and 0.20 ± 0.01 g/g of dried sample for glucose and were 0.02 ± 0.01 and 0.04 ± 0.01 g/g of dried sample for xylose, respectively. The batch fermentation resulted in an ethanol yield of 0.063 and 0.070 g/g of dried sample, corresponding to 68.0 and 74.3% when compared to theoretical ethanol yields for hydrolysed solution of raw cassava stems and holocellulose, respectively.

บทนำ

ปัจจุบัน โลกมีการขยายตัวทางด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และการคมนาคมขนส่งมากขึ้น ทำให้ความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงมีมากขึ้นตามไปด้วย ส่งผลให้ราคาของน้ำมันเชื้อเพลิงสูงขึ้น จนทำให้เกิดภาวะวิกฤติการณ์น้ำมันเชื้อเพลิง ดังนั้นหลายประเทศจึงมีการวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาและการใช้พลังงานอื่นๆ มาทดแทน เพื่อลดการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงจากฟอสซิล ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่มีความสำคัญกับพลังงานทดแทน โดยเฉพาะพลังงานจากเอทานอล เพราะพลังงานเอทานอลจัดได้ว่า เป็นพลังงานสะอาดที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงจากซากฟอสซิลได้เป็นอย่างดี ส่งผลดีต่อเศรษฐกิจภายในประเทศ และยังช่วยลดปัญหามลพิษด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่ไร้สารมลพิษ เช่น ซัลเฟอร์ และมีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก เมื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์จึงเกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่าเชื้อเพลิงทั่วไป ตัวอย่างเช่น การใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ E10 คือน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ที่ได้จากการผสมระหว่างน้ำมันเบนซินกับเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตรในอัตราส่วน 9:1 หรือ น้ำมันเบนซินร้อยละ 90 และเอทานอลร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นต้น (Papong and Malakul, 2010) ในปัจจุบัน ประเทศไทยมีการ

ผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบหลัก 2 ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อยและกากน้ำตาล เป็นต้น และวัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลังและข้าวโพด เป็นต้น จากปริมาณความต้องการเอทานอลที่สูงขึ้น อาจทำให้วัตถุดิบดังกล่าวมีไม่เพียงพอกับความต้องการ ทำให้ต้องหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ที่มีปริมาณมาก เช่น วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloses) ซึ่งได้จากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกมาเสริมในการผลิต เช่น ลำต้นมันสำปะหลังเพื่อมาทดแทนวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีแนวโน้มที่จะมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 3 ขั้นตอน (Yang และคณะ, 2009) ดังนี้ ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบหรือการปรับสภาพ (pretreatment) เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของวัตถุดิบ เพื่อให้สามารถย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น สามารถทำได้ทั้งวิธีการทางเคมีและทางกายภาพ ได้แก่ การปรับสภาพด้วยกรด (acid pretreatment) การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline pretreatment) และการระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion หรือ autohydrolysis) เป็นต้น (Binod และคณะ, 2010) ขั้นตอนที่สอง คือ ขั้นตอนการย่อยหรือการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว มี 2 วิธี คือ การใช้กรดและการใช้เอนไซม์ (Balat, 2011) และสุดท้ายคือขั้นตอนการหมัก (fermentation) ภายหลังจากวัตถุดิบถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสแล้ว สามารถหมักกลูโคสให้เป็นเอทานอลด้วยการใช้ยีสต์ เช่น ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น

ลำต้นมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) เป็นพืชเส้นใยอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากลำต้นมันสำปะหลังประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในปริมาณสูง คือประมาณร้อยละ 35.2 และ 24.3 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Han และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วประเทศโดยมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 7.5 ล้านไร่ โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการเพาะปลูกมากที่สุด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) โดยเหง้าและลำต้นมันสำปะหลังบางส่วนที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวผลผลิต จะกลายเป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีประมาณ 3.4 ล้านตันต่อปี (Energy for Environment Foundation, 2008) หากพิจารณาในแง่ของวัตถุดิบในการผลิตลิกโนเซลลูโลสเอทานอลแล้ว ลำต้นมันสำปะหลังน่าจะเป็นวัสดุทางเลือกที่มีความเหมาะสมและมีศักยภาพที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาล ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตลิกโนเซลลูโลสเอทานอลในอนาคตได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอีกทางหนึ่งด้วย

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ คือ ศึกษาวิธีการผลิตลิกโนเซลลูโลสเอทานอลจากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยกรด ซัลฟูริกเจือจาง แล้วทำการหมักสารละลายที่ได้ด้วยวิธีการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 นอกจากนี้ยังศึกษาผลกระทบของการปรับสภาพตัวอย่างโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยวิธีการต่างๆ ด้วย โดยที่ปริมาณของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ที่ได้จากการย่อยได้ตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริก และศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี โดยใช้วิธีไตรเมทิลซิลิลอีเทอร์ และตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีต่อไป

วิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

- 1.1 หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (autoclave) ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVA-110, ญี่ปุ่น
- 1.2 เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin-Elmer รุ่น Lambda 25, สหรัฐอเมริกา
- 1.3 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่ตรวจวัดด้วยเครื่องเฟลมไอออไนเซชัน (Gas chromatograph equipped with a flame ionization detector, GC-FID) ยี่ห้อ Thermo Finnigan รุ่น TraceGC, อิตาลี

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ดังนี้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดเกลี้ยงอะซิติก กรดซัลฟูริกเข้มข้น และแอนไฮดรัสเอทิลแอลกอฮอล์ (Merck, สาธารณรัฐเยอรมนี) เฮกซะเมทิลไดไซลาเซน (Fluka, สาธารณรัฐเยอรมนี) ฟีนอล บิวทานอล แมงกานีสซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต และโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Carlo Erba, อิตาลี) ไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ ไพรีดีน โซเดียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต (Ajax Finechem, ออสเตรเลีย) กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Sigma-Aldrich, สาธารณรัฐเยอรมนี) สารมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ ดี-กลูโคส (Merck, สาธารณรัฐเยอรมนี) ดี-ไซโลส ดี-กาแลคโตส ดี-แมนโนสและไมโอ-อินซิทอล (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) ทุกชนิดมีความบริสุทธิ์มากกว่า ร้อยละ 99 โดยน้ำหนัก มอลต์สกัดและยีสต์สกัด (Himedia, อินเดีย) เพปโตน (Oxoid, สหราชอาณาจักร)

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง (agar slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลัง

ตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษานี้ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz สายพันธุ์ห้วยบง 60 ที่ได้หลังจากการเก็บเกี่ยวในพื้นที่ของอำเภอน้ำโสม จังหวัดอุดรธานี ซึ่งเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่นิยมใช้เพาะปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

4. การเตรียมตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลัง

นำลำต้นมันสำปะหลังมาล้าง ให้ได้ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Mishima และคณะ, 2008) ในตู้อบไอร้อนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งมาบดให้ละเอียด ให้ได้ขนาดประมาณ 500 ไมโครเมตร แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและปิดให้มิดชิดเพื่อป้องกันความชื้นก่อนการนำไปใช้

5. การเตรียมไฮโดรคลอไรด์จากลำต้นมันสำปะหลัง

การเตรียมตัวอย่างไฮโดรคลอไรด์ด้วยการกำจัดลิกนินโดยวิธี acid-chlorite delignification ใช้ตามวิธีการของ Hubbell และ Ragauskas (2010) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ซึ่งตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังใส่ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 83.3 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวอย่าง จากนั้น

เติมโซเดียมคลอไรด์ในอัตราส่วน 0.666 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และกรดเกลเซียลอะซีติกในอัตราส่วน 0.666 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง นำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อนในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น เติมโซเดียมคลอไรด์และกรดเกลเซียลอะซีติกในอัตราส่วนเดิมอีก แล้วต้มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถ้าตะกอนตัวอย่างที่ได้ยังไม่ขาว ให้เติมโซเดียมคลอไรด์และกรดเกลเซียลอะซีติกในอัตราส่วนเดิมอีกรอบ แล้วต้มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (การเติมโซเดียมคลอไรด์และกรดเกลเซียลอะซีติกจะต้องไม่เกิน 3 รอบ) จากนั้นกรองและล้างตะกอนด้วยน้ำจนค่าพีเอชเป็นกลาง ผึ่งลม นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในตู้อบไอร้อน แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและปิดให้มิดชิดเพื่อป้องกันความชื้น

6. การศึกษาผลการปรับสภาพตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเจลลอสมาปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

6.1 วิธีการที่ 1 ปรับสภาพ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.2 วิธีการที่ 2 ปรับสภาพโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้อบไอร้อน เป็นเวลา 60 นาที (Zhang และ Cai, 2008)

6.3 วิธีการที่ 3 ปรับสภาพ โดยใช้หม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที (Akhtar, 2001)

จากนั้น จะมีการแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกและล้างตะกอนด้วยน้ำประปา จนน้ำล้างตะกอนมีค่าพีเอชเป็นกลาง ผึ่งลม นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในตู้อบไอร้อน แล้วย่อยตัวอย่างแห้งที่ได้จากทั้ง 3 วิธีการด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยปริมาตร ด้วยอัตราส่วนของตัวอย่างต่อปริมาตรกรดซัลฟูริกร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 90 นาที (Sun และ Cheng, 2005) จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากตัวอย่างทั้งหมด ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยใช้วิธี ฟีนอล-ซัลฟูริกต่อไป

7. การย่อยตัวอย่างด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง

เติมกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยปริมาตร ด้วยอัตราส่วนของตัวอย่างต่อปริมาตรกรดซัลฟูริกร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ลงในตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่าง ไฮโดรเจลลอส น้ำหนัก 10 20 และ 50 กรัม จากนั้นนำไปย่อยในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 90 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้น จากนั้นนำไปหมักแบบกะด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ต่อไป

8. การตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดโดย วิธีฟินอล-ซัลฟูริก

วิธีการศึกษาโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริกในครั้งนี้ ได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Dubois และคณะ (1995) และ Wang และคณะ (2009) ดังนี้ เติมน้ำตาลละลายฟินอล ความเข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 487 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

9. การศึกษาชนิดและตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวิธีไตรเมธิลซิลิลอีเทอร์

การศึกษานี้และปริมาณของน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวิธีไตรเมธิลซิลิลอีเทอร์ครั้งนี้ได้ใช้วิธี internal standard method โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Fuzfai และคณะ (2008) ดังนี้ ปิเปต สารละลายตัวอย่าง (หรือสารละลายมาตรฐานที่มีกลูโคส ไซโลส แมนโนส และกาแลคโตส) โดยใช้ไมโอ-อินซิทอล เป็น internal standard) ลงในขวดแก้วฝาเกลียว (screw capped vial) ขนาด 4 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสาร ลดความดันแบบหมุนที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 500 ไมโครลิตร สารละลายไพรีดีน (2.5 กรัม ไฮดรอกซีลามีไฮโดรคลอไรด์ในไพรีดีน 100 มิลลิลิตร) ให้ ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วปล่อยให้เย็น เติมน้ำ 900 ไมโครลิตร เฮกซะเมทิลไดซิลิลแซน (HMDS) และ 100 ไมโครลิตร กรดไตรฟลูออโร อะซิติก นำไปทำปฏิกิริยาต่อที่ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กรองด้วยแผ่นเยื่อกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไป วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID โดยใช้คอลัมน์แบบ DB-5 ขนาด 30 เมตร × 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของ ฟิล์ม ขนาด 0.25 ไมโครเมตร (J&W Scientific, สหรัฐอเมริกา) สภาวะที่ใช้ในการแยกเป็นระบบ Temperature programming โดยใช้สภาวะดังนี้ ใช้อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 160 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 170 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้น เพิ่มอัตราเป็น 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 310 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียสต่อนาที และให้คงที่ที่อุณหภูมิ 310 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งเป็นอุณหภูมิ สุดท้ายโดยใช้อุณหภูมิของระบบฉีดที่ 250 องศาเซลเซียส ใช้อุณหภูมิของระบบตรวจวัดที่ 320 องศา เซลเซียส ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพาด้วยอัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ปริมาตรของสารตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร โดยใช้ระบบ split ratio คือ 1:75

10. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในครั้งนี้ได้ดำเนินการตามขั้นตอน งานวิจัยของ Akarachanya และคณะ (2011) โดยการเพาะเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่เก็บ ไว้ในอาหารวุ้นแบบเอียง ลงในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast-Malt extract (ประกอบด้วย 0.15 กรัม มอลต์สกัด 0.15 กรัม ยีสต์สกัด 0.15 กรัม เพปโทน และ กลูโคส 0.50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ (inoculum) สำหรับการหมักกลีโคโนเซลลูโลสจากเอทานอลต่อไป

11. การหมักแบบกะด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048

ปรับค่าพีเอชสารละลายที่ได้จากการย่อยให้อยู่ในช่วง 3.5-5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จากนั้นเติมอาหารสังเคราะห์ (Synthetic media) ประกอบด้วย ยีสต์สกัดในอัตราส่วน 1 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตในอัตราส่วน 1 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วน 2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่อลิตร (Palmarola-Adrados และคณะ, 2005) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นแล้วนำมาเติมกล้ายีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ 10 มิลลิลิตรของสารละลายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที (Akaracharanya และคณะ, 2011) กรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และตรวจวัดปริมาณลิกลโนเซลลูโลสลิกลีเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง GC-FID ต่อไป

12. การตรวจวัดปริมาณลิกลโนเซลลูโลสลิกลีเอทานอลโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

การตรวจวัดปริมาณลิกลโนเซลลูโลสลิกลีเอทานอลด้วยเครื่อง GC-FID ครั้งนี้ใช้วิธี Internal standard method โดยใช้บิวทานอล เป็น internal standard ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้ ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักที่กรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วเติมบิวทานอล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยเมทานอล นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID โดยใช้คอลัมน์ชนิด DB-5 (ขนาด 30 เมตร × 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม ขนาด 0.25 ไมโครเมตร) สภาวะที่ใช้ในการแยกเป็นระบบ Temperature programming โดยใช้สภาวะดังนี้ ใช้อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 62 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 1.0 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มอัตราเป็น 50 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และให้คงที่ที่อุณหภูมินี้ 1 นาที ซึ่งเป็นอุณหภูมิสุดท้ายโดยใช้อุณหภูมิของระบบฉีดที่ 250 องศาเซลเซียส ใช้อุณหภูมิของระบบตรวจวัดที่ 250 องศาเซลเซียส ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพาด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ปริมาตรของสารตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร โดยใช้ระบบ split ratio เท่ากับ 1 ต่อ 95

13. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในแต่ละการทดลองได้ทำการศึกษา 3 ซ้ำ และข้อมูลที่ได้จากการทดลอง นำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) (กัลยา, 2552) โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS version 11.5 ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัยและอภิปราย

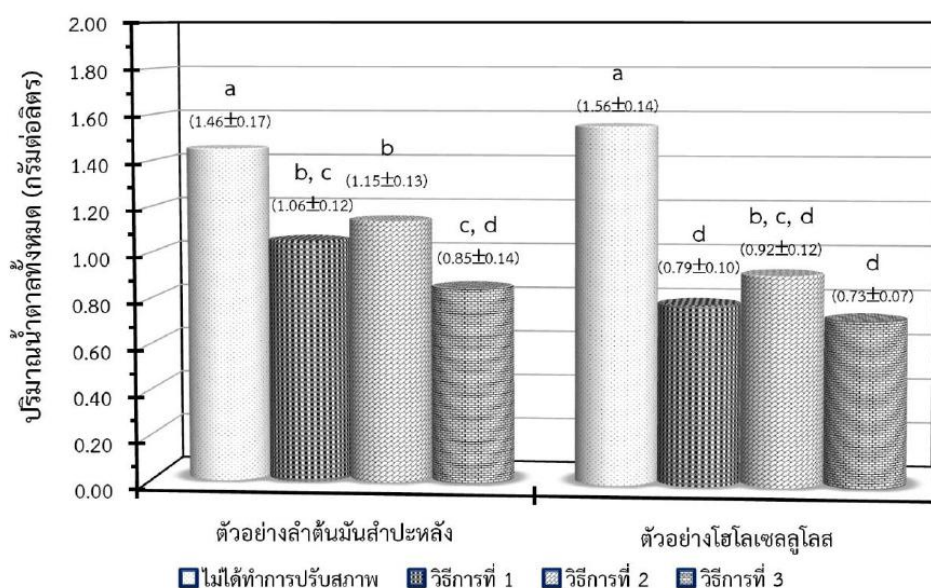
1. ผลการเตรียมไฮโดรเซลลูโลสจากลำต้นมันสำปะหลัง

จากการเตรียมไฮโดรเซลลูโลสจากลำต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีการกำจัดลิกนินโดยวิธี acid-chlorite delignification พบว่าตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังแห้งหนัก 1 กรัม สามารถเตรียมเป็นไฮโดร

เซลลูโลสได้ 0.687 กรัม คิดเป็นร้อยละ 68.7 โดยน้ำหนักแห้ง ดังนั้นแสดงว่า ลำต้นมันสำปะหลังจะมีไฮโดรเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบประมาณ ร้อยละ 68.7 โดยน้ำหนัก ซึ่งสอดคล้องกับค่าทางทฤษฎี โดยที่ Rowell (2005) กล่าวว่า โดยทั่วไปแล้ววัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจะมีไฮโดรเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบประมาณ ร้อยละ 65-70 โดยน้ำหนัก แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Han และคณะ (2010) ซึ่งได้รายงานไว้ว่า ในลำต้นมันสำปะหลังแห้งที่ศึกษาประกอบด้วยไฮโดรเซลลูโลสร้อยละ 59.5 โดยน้ำหนัก ลิกนินร้อยละ 33.8 โดยน้ำหนัก ซึ่งประกอบด้วยลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid-insoluble lignin) ร้อยละ 30.0 โดยน้ำหนัก และลิกนินที่ละลายในกรด (acid-soluble lignin) ร้อยละ 3.8 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

2. ผลการศึกษาการปรับสภาพตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

หลังจากปรับสภาพตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสด้วย 3 วิธีการที่กล่าวไป แล้วนำไปย่อยด้วยกรดซัลฟูริก และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เกิดจากตัวอย่างทั้งสองชนิด พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากตัวอย่างแต่ละชนิดและแต่ละวิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่า ตัวอย่างที่ไม่ได้ปรับสภาพจะให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างที่ปรับสภาพ โดยตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสที่ไม่ได้ปรับสภาพจะให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 1.56 ± 0.14 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 1) แต่อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นที่ไม่ได้ปรับสภาพจะให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เท่ากับ 1.46 ± 0.17 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ใกล้เคียงจากตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลส แต่หากพิจารณาในส่วนของวิธีการปรับสภาพแล้ว พบว่า ตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นจะให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสที่ปรับสภาพด้วยวิธีการเดียวกัน และวิธีการที่ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด ตามลำดับ กล่าวคือ ตัวอย่างที่ไม่ได้ปรับสภาพ > วิธีการที่ 2 ซึ่งปรับสภาพโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้อบไอร้อน เป็นเวลา 60 นาที > วิธีการที่ 1 ซึ่งปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง > วิธีการที่ 3 ซึ่งปรับสภาพโดยใช้หม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที ดังนั้นตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้น จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตน้ำตาลเพื่อหมักให้ได้ลิกโนเซลลูโลสเอทานอล เนื่องจากไม่จำเป็นต้องกำจัดลิกนินออกเพื่อเตรียมเป็นตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสก่อน และไม่จำเป็นต้องปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จึงทำให้สามารถลดขั้นตอนในการผลิตและเสียค่าใช้จ่ายน้อยลง รวมถึงลดการใช้สารเคมี ตลอดจนยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ลิกนินที่ยังไม่ได้ถูกกำจัดออกอาจถูกย่อยเกิดเป็นสารประกอบที่มีผลต่อการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลโดยใช้ยีสต์ เช่น สารประกอบอะโรมาติก พอลิอะโรมาติก ฟีนอลิก และอัลดีไฮด์ (Palmqvist และ Hahn-Hagerdal, 2000) เป็นต้น



รูปที่ 1 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังกับตัวอย่างโฮลเซลลูโลส โดยไม่มีการปรับสภาพและการปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ: a, b, c และ d แสดงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

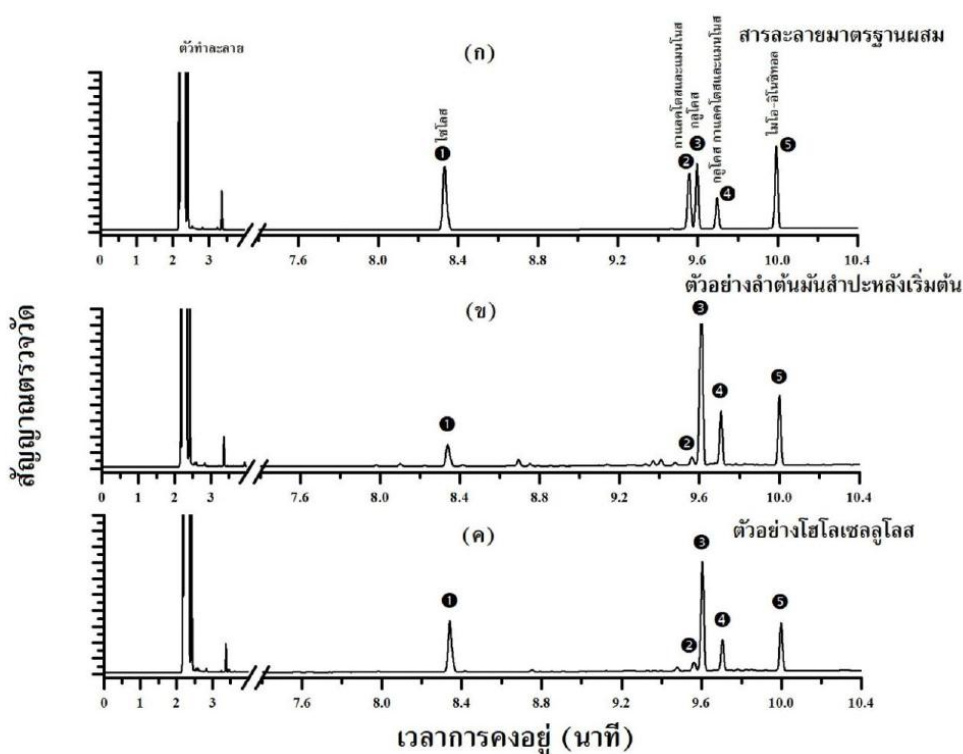
3. ผลการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลในสารละลายที่ได้จากการย่อย

จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างโฮลเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีฟินอล-ซัลฟูริกนั้น พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างโฮลเซลลูโลส เท่ากับ 0.24 ± 0.03 และ 0.26 ± 0.02 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และจากการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้วิธีไตรเมธิลซิลิลอีเทอร์ เมื่อเปรียบเทียบเวลาการคงอยู่จากแก๊ส โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างโฮลเซลลูโลสจากรูปที่ 2 (ข) และ (ค) กับแก๊สโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมในรูปที่ 2 (ก) พบว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยจะมีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Han และคณะ (2010) นอกจากนี้ยังตรวจพบว่าในสารละลายยังมีน้ำตาลกาแลคโตสและน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบรองที่มีปริมาณเล็กน้อย จากแก๊สโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม รูปที่ 2 (ก) พิกหมายเลข 2 ซึ่งเป็นพิกหลัก (major peak) ของกาแลคโตสและแมนโนส ส่วนพิกหมายเลข 4 ซึ่งเป็นพิกรอง (minor peak) ของกลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส จะเกิดการซ้อนทับกันจนไม่สามารถแยกได้ แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่า พิกหมายเลข 1 หมายเลข 3 และหมายเลข 5 จะเป็นพิกหลักของไซโลส กลูโคส และไมโอ-อินซิทอล ตามลำดับ สามารถแยกออกจากกันได้ดี โดยสอดคล้องกับการศึกษาการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีของ Garcia และคณะ

(2000) และ Rojas-Escudero และคณะ (2004) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสในตัวอย่างได้ และจากการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 0.19 ± 0.01 และ 0.20 ± 0.01 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 0.02 ± 0.01 และ 0.04 ± 0.01 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง สำหรับตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรไลเซลลูโลส ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่าง ไฮโดรไลเซลลูโลสด้วยการดซัลฟูริกเจือจาง

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง)		
	น้ำตาลทั้งหมด	กลูโคส	ไซโลส
ลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้น	0.24 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.02 ± 0.01
ไฮโดรไลเซลลูโลส	0.26 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.04 ± 0.01



รูปที่ 2 แก๊สโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์อนุพันธ์ไตรเมซิลิลออกซิมของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยตัวอย่าง (ก) สารละลายมาตรฐานผสม (ข) ลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้น (ค) ไฮโดรไลเซลลูโลส
หมายเหตุ ① ไซโลส ② กาแลคโตสและแมนโนส ③ กลูโคส ④ กลูโคส กาแลคโตสและแมนโนส ⑤ ไมโอ-อีโนซิทอล (internal standard)

4. ผลการผลิตลิโนเซลลูโลสจากเอทานอล

การหมักลิโนเซลลูโลสจากเอทานอลแบบกะด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ของสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลส หนัก 10, 20, และ 50 กรัมของตัวอย่างแห้ง ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที และตรวจวัดปริมาณลิโนเซลลูโลสจากเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง GC-FID ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 3 โดยผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎีของสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่าง คำนวณจากร้อยละของปริมาณการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอล ซึ่งสามารถคำนวณได้สมการข้างล่างดังนี้ (Yang และคณะ, 2009)

ร้อยละผลผลิตเอทานอลเทียบกับค่าในทางทฤษฎี

$$= \left[\frac{\text{ปริมาณเอทานอล(กรัม) / น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}{0.511 \times \text{ปริมาณกลูโคส (กรัม) / น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \right] \times 100$$

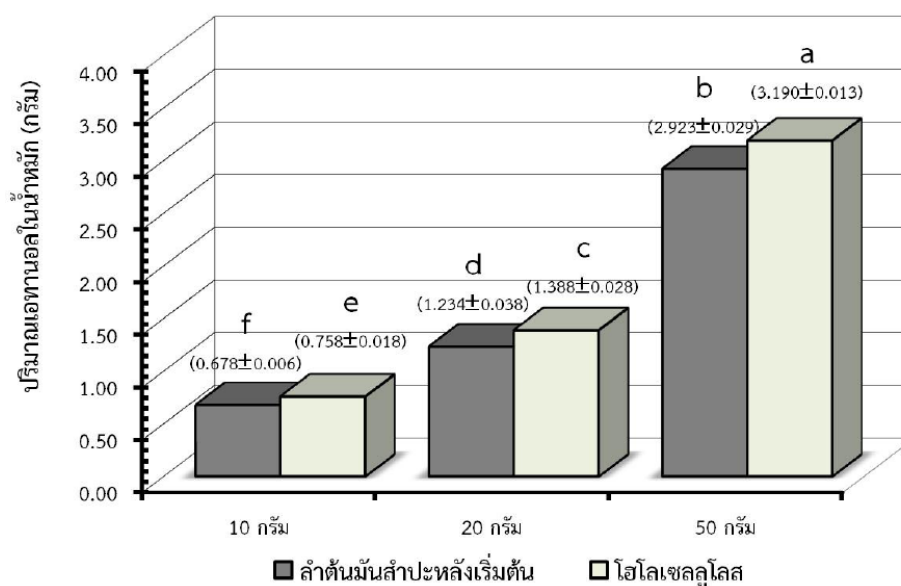
โดยที่ 0.511 คือปริมาณเอทานอลในทางทฤษฎีที่ได้จากการเปลี่ยนกลูโคส 1 กรัม เป็นเอทานอล 0.511 กรัม

ตารางที่ 2 ปริมาณลิโนเซลลูโลสจากเอทานอลจากการหมักแบบกะด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5048 ของสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาณกลูโคสใน สารละลายที่ได้ จากการย่อย (กรัม)	ปริมาณเอทานอล ในน้ำหมัก (กรัม)	ผลผลิต เอทานอล (กรัมต่อกรัม ตัวอย่าง)		ผลผลิตเอทานอล เมื่อเทียบกับ ค่าในทางทฤษฎี (ร้อยละ)	
				กรัม	เฉลี่ย	ร้อยละ	เฉลี่ย
ลำต้นมันสำปะหลัง	10	1.94±0.07 _c	0.678±0.006 _f	0.068	0.063	68.59	68.0
เริ่มต้น	20	3.55±0.02 _b	1.234±0.038 _d	0.062		68.24	
	50	8.55±0.09 _a	2.923±0.029 _b	0.058		67.04	
ไฮโดรเซลลูโลส	10	1.98±0.07 _c	0.758±0.018 _e	0.076	0.070	74.99	74.3
	20	3.63±0.09 _b	1.388±0.028 _c	0.069		74.94	
	50	8.59±0.10 _a	3.190±0.013 _a	0.064		72.80	

หมายเหตุ : a, b, c, a', b', c', d', e', และ f' แสดงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ p<0.05

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ผลผลิตเอทานอลที่ได้จากตัวอย่างหนัก 10, 20 และ 50 กรัม ของตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลส มีค่าอยู่ในช่วง 0.058-0.068 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และ 0.064-0.076 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ โดยในตารางที่ 2 จะสังเกตเห็นได้ว่า ถ้าใช้ปริมาณตัวอย่างเพิ่มขึ้นผลผลิตเอทานอลต่อกรัมตัวอย่างที่ได้ กลับมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากถ้ามีการเพิ่มปริมาณตัวอย่างเริ่มต้นอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซิสหรือความสามารถในการย่อยวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลกลูโคสลดลง และการเพิ่มปริมาณวัตถุดิบตั้งต้นอาจทำให้เกิดสารยับยั้งที่เกิดจากกระบวนการย่อยมีปริมาณเพิ่มขึ้น (Knauf และ Moniruzzaman, 2004) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลได้นั่นเอง เช่นเกิดสารเพอร์ฟูรัล, 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล (HMF) เป็นต้น (Campo และคณะ, 2006) และจะเห็นได้ว่า ตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสให้ผลผลิตเอทานอลต่อกรัมตัวอย่างสูงกว่าตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 3 อาจเป็นเพราะตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสสามารถถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลได้ง่ายกว่าตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้น เนื่องจากลิกนินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ถูกกำจัดออกในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยวิธี acid-chlorite delignification จึงย่อยได้ง่ายกว่า ในขณะที่ตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นมีลิกนินอยู่ จึงทำให้ย่อยได้ยากกว่า และสารประกอบของลิกนินที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการไฮโดรไลซิสอาจจะมีผลต่อกระบวนการหมักเอทานอลได้ เช่น สารฟิโนลิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีความเป็นพิษสูง ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตสูญเสียสมดุลและถูกทำลาย ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและทำให้ความสามารถของการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ลดลง (Palmqvist และ Hahn-Hagerdal, 2000) นอกจากนั้น ในตารางที่ 2 ยังพบว่า ผลผลิตเอทานอลที่ได้จากตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลส มีค่าเท่ากับ 0.063 และ 0.070 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ โดยผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎีจากการหมักแบบกะของสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 จะได้ร้อยละ 68.0 และ 74.3 ตามลำดับ



รูปที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณลิโนเซลลูโลสเอทานอลจากการหมักแบบกะด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5048 เมื่อใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างโฮลเซลลูโลส หนัก 10, 20 และ 50 กรัม ที่ย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง: a, b, c, d, e และ f แสดงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

เมื่อเปรียบเทียบผลการผลิตลิโนเซลลูโลสเอทานอลจากลำต้นมันสำปะหลังดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า งานวิจัยของ Han และคณะ (2010) ให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 7.55 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎีเท่ากับ ร้อยละ 89.6 ในขณะที่งานวิจัยนี้ให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 6.27 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎีเท่ากับ ร้อยละ 67.9 แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Han และคณะ (2010) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากลำต้นมันสำปะหลัง โดยใช้วิธีปรับสภาพด้วยกรดเจือจางและย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเบตากลูโคซิเดส แล้วหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ผลผลิตเอทานอลและผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎีสูงกว่า แต่เป็นการใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ซึ่งเอนไซม์นั้นมีราคาแพง และยังใช้ปริมาณมากด้วย อีกทั้งยังมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก จึงส่งผลให้เมื่อพิจารณาในด้านต้นทุนการผลิตจะค่อนข้างสูงกว่าการใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่าและมีขั้นตอนที่ง่ายกว่า แต่ได้ปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการผลิตลิกโนเซลลูโลสจากลำต้นมันสำปะหลัง

คณะผู้วิจัย	วิธีการปรับสภาพและการย่อยสลาย	วิธีการหมัก	ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)		ผลผลิตเอทานอล เมื่อเทียบกับค่า ในทางทฤษฎี (ร้อยละ)
			น้ำตาลกลูโคส	เอทานอล	
Han และคณะ (2010)	ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 177° เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เซลลูเลสและเบตากลูโคซิเดส ที่อุณหภูมิ 50° เซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที	หมักแบบกะ ด้วย <i>S. cerevisiae</i> CHY 1011 ที่อุณหภูมิ 32° เซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	15.5	7.55	89.6
งานวิจัยนี้	ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 121° เซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 90 นาที	หมักแบบกะ ด้วย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5048 ที่อุณหภูมิ 35° เซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	19.0	6.27	68.0

สรุป

จากการศึกษาการเตรียมไฮโดรเซลลูโลสจากลำต้นมันสำปะหลังโดยใช้วิธี acid-chlorite delignification พบว่า ตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังแห้งหนัก 1 กรัม สามารถนำมาเตรียมเป็นไฮโดรเซลลูโลสได้ 0.6866 ± 0.017 กรัม คิดเป็นร้อยละ 68.67 ของตัวอย่างแห้ง จากผลการศึกษาวิธีการปรับสภาพตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ลำดับของวิธีการปรับสภาพเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากมากไปหาน้อย คือ ตัวอย่างที่ไม่ได้ปรับสภาพ การปรับสภาพโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้อบไอร้อน เป็นเวลา 60 นาที การปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และการปรับสภาพโดยใช้หม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที ตามลำดับ ส่วนการผลิตน้ำตาลโดยใช้ตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลสที่ไม่ได้ปรับสภาพมาด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากทั้งสองตัวอย่าง เท่ากับ 0.24 ± 0.03 และ 0.26 ± 0.02 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค GC-FID พบว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง จะพบน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยผลผลิตของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 0.19 ± 0.01 และ 0.20 ± 0.01 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และผลผลิตของน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 0.02 ± 0.01 และ 0.04 ± 0.01 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง สำหรับตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลส ตามลำดับ สำหรับการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 นั้น จะให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.063 และ 0.070 กรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ซึ่งผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎีแล้ว จะเท่ากับร้อยละ 68.0 และ 74.3 สำหรับสารละลายที่ได้การย่อยตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังเริ่มต้นและตัวอย่างไฮโดรเซลลูโลส ตามลำดับ ผลผลิต

เอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎี สิ่งที่น่าสนใจก็คือ เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Han และคณะ (2010) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากลำต้นมันสำปะหลัง โดยใช้วิธีปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง และย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ โดยการใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลสและเบตากลูโคซิเดส แล้วหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ผลผลิตเอทานอลเมื่อเทียบกับค่าในทางทฤษฎี เท่ากับร้อยละ 83.6 ซึ่งได้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่า แต่เป็นการใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ซึ่งเอนไซม์นั้นมีราคาแพง และยังใช้ปริมาณมากด้วย จึงส่งผลให้เมื่อพิจารณาในด้านต้นทุนการผลิตจะค่อนข้างสูงกว่าการใช้กรดซัลฟิวริกเจือจาง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่า แต่ได้ปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกันมากนัก เพราะฉะนั้นลำต้นมันสำปะหลังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลในเซลล์เชื้อเพลิงเอทานอลในอนาคตได้ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (Center of Excellence for Innovation in Chemistry, PERCH-CIC) มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ภายใต้คณบดีมหาวิทยาลัยขอนแก่น เชื้อเพลิงชีวภาพ พร้อมทั้งขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 10 (ขอนแก่น) จ.ขอนแก่น ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์และความสะดวกในการใช้เครื่องมือบางเครื่อง

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กัลยา. การใช้ SPSS FOR WINDOWS ในการวิเคราะห์ข้อมูล. พิมพ์ครั้งที่ 15. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลัง ปี 2552-2553 [ออนไลน์]. อ้างเมื่อ 14 กันยายน 2553. เข้าถึงได้จาก <http://www.oae.go.th/download/prcai/Cassava10.xls>.

ภาษาต่างประเทศ

Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N., Srinorakutara, T., Kitpreechavanich, V. and Tolieng, V. "Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*." Ann Microbiol 61, 3 (October 2011): 431-436. 14

Akhtar, MS., Saleem, M. and Akhtar, MW. "Saccharification of lignocellulosic materials by the cellulases of *Bacillus subtilis*." Int. J. Agri. Biol, no 3 (2001): 199-202.

Balat, M. "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review." Energ Convers Manag, no. 52 (2011): 858-875.

- Balat, M. and Balat, H. "Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel." Appl. Energy, no. 86 (2009): 2273–2282.
- Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., et al. "Bioethanol production from rice straw: An overview." Bioresour. Technol, no. 101 (2010): 4767–4774.
- Campo, I., Alegria, I., Zazpe, M., Echeverria, M. and Echeverria, I. "Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production." Industrial Crops and Products, no. 24 (2006): 214–221.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." Anal. Chem, no. 28 (1956): 350–356.
- Energy for Environment Foundation (Thailand). Biomass clearing house. Biomass. Bangkok: Q Print Management Co., Ltd, 2008.
- Fuzfai, Z.S., Boldizar, I. and Molnar-Perl, I. "Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyl-oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry." J. Chromatogr. A, no 1177 (2008): 183–189.
- Garcia, J.L., Olano, A. and Corzo, N. "Determination of mono and disaccharide content of enteral formulations by gas chromatography." Chromatographia, no. 52 (2000): 211-224.
- Han, M., Kim, Y., Kim, Y., Chung, B. and Choi, G. "Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem." Korean J. Chem. Eng, no. 28 (2010): 119-125.
- Hubbell, C.A. and Ragauskas, A.J. "Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization." Bioresour. Technol, no. 101 (2010): 7410–7415.
- Knauf, M. and Moniruzzaman, M. "Lignocellulosic biomass processing: a perspective." International Sugar Journal, no. 106 (2004): 147–150.
- Mishima, D., Kuniki, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M. and Fujita, M. "Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistiastratiotes L.*)." Bioresour. Technol, no. 99 (2008): 2495–2500.
- Palmarola-Adrados, B., Choteborska, P., Galbe, M. and Zacchi, G. "Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran." Bioresour. Technol, no. 96 (2005): 843–850.

- Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition." *Bioresour. Technol*, no. 74 (2000): 25-33. 15
- Papong, S. and Malakul, P. "Life-cycle energy and environmental analysis of bioethanol production from cassava in Thailand." *Bioresour. Technol*, no. 101 (2010): S112–S118.
- Rojas-Escudero, E., Alarcon-Jimenez, A.L., Elizalde-Galvan, P. and Rojo-Callejas, F. "Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography." *J. Chromatogr. A*, no. 1027 (2004): 117–120.
- Rowell, RM. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. New York: CRC Press, 2005.
- Sun, Y. and Cheng, JJ. "Dilute acid pretreatment of rye straw and Bermuda grass for ethanol production." *Bioresour. Technol*, no 96 (2005): 1599–1606.
- Wang, C.C, Chang, S.C. and Chen, B.H. "Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum Linnaeus*." *Food Chem*, no. 116 (2009): 595–603.
- Yang, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C. and Cheng, J. "Saccharification and fermentation of dilute-acid-pretreated freeze-dried switchgrass." *Energy Fuels*, no. 23 (2009): 5626–5635.
- Zhang, Q. and Cai, W. "Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3." *Biomass Bioenergy*, no 32 (2008): 1130–1135.