อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ประจำปี 2556

ชื่อโครงการวิจัย

การนำมวลชีวภาพของพืชเส้นใยมาใช้ประโยชน์ทางด้านพลังงานชีวภาพ

Utilization of Fiber Crops Biomass as Bioenergy

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต

รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต

มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทร 055-963342

E-mail : siripongp@nu.ac.th

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 31 ส.ค. 2558
เลขทะเบียน 1 6824043
เลขเรียกหนังสือ ว TP
339
ศ462ร
2556

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการอุดหนุนการวิจัยจาก งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2556

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อนำชีวมวลของพืชเส้นใยไปใช้ผลิตไบโอเอทานอล พืชที่นำมาศึกษามีสี่ชนิด คือ ปอคิวบา, (*Hibiscus cannabinus* L) ปอแก้ว (*H. subdariffa* L.) ปอกระเจา (*Cochrorus capsularis* L.) และปอสา (*Broussonetia papyrifera* L) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักทางเคมี ได้แก่ กลูแคน ไซแลน กาแลคแตน ลิกนิน เถ้าและค่าของแข็งทั้งหมด พบว่าทุกพืชตัวอย่างมีกลูแคนเป็นองค์ประกอบ 54.18 - 66.75 % โดยค่าต่ำสุดพบในปอแก้วและค่าสูงสุดพบในปอสา ปริมาณไซแลนในพืชตัวอย่างมีค่าระหว่าง 6.48-11.89 % ค่าลิกนินทั้งหมด 15.2-18.17%. มีเถ้า 2.75-5.58% และของแข็งทั้งหมด 90.82-91.71% ตามลำดับ จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้นต่างๆ ของกรดฟอสฟอริก (0, 70, 75, and 80%) ต่อการปรับสภาพของพืชเส้นใยที่นำมาศึกษา โดยทดลองที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C และเวลาบ่ม 1 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าการปรับสภาพพืชเส้นใยด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น (80%) ให้ค่าการกำจัดลิกนินสูงถึง 80-86% จากนั้นนำเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพมาเข้าสู่ขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากค่าผลผลิตคอนเวอร์ชัน ค่าแซคคาริฟิเคชันและกลูโคสของกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพคือใช้กรดฟอสฟอริก 75% อุณหภูมิ 60 ^{o}C และเวลาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 72 ชั่วโมง ปอคิวบาให้ค่าผลผลิตคอนเวอร์ชัน 97.26% แซคคาริฟิเคชัน 88.27% และกลูโคส 0.88 g/l

คำสำคัญ: ปอคิวบา ปอแก้ว ปอกระเจา ปอสา กรดฟอสฟอริก การปรับสภาพ

Abstract

Phosphoric acid pretreatment of four fiber plant species, *Hibiscus cannabinus* L., *H. subdariffa* L.,*Cochrorus capsularis* L., *Broussonetia papyrifera* L., were studied for bioethanol application. Major chemical compositions, glucan, xylan, galactan, lignin, ash, and total solid were determined. All species had glucan range from 54.18 to 66.75 %. The lowest was found in *H. subdariffa* the highest amount was obtained from *B. papyrifera* and. Xylan was presented in amounts of 6.48-11.89 %. Galactan was detected as trace (0.76-1.95%). Total lignin was 15.2-18.17%. Ash and total solid were 2.75-5.58, 90.82-91.71% , respectively. Effect of various concentrations of phosphoric acid (0, 70, 75, and 80%) on the fiber plants pretreatment were examined at 60 $^{\circ}$C for 1 hour. Results of pretreatment demonstrated that at high concentration of phosphoric acid (80%) enable lignin to remove at maximum value (80-86%). Based on conversion, saccharification, and glucose yields after enzymatic hydrolysis, an optimum phosphoric acid pretreatment condition were, 75 % phosphoric acid, at 60 $^{\circ}$C for hydrolysis time at 72 hours. The maximum conversion (97.26%), saccharification (88.27%) , and glucose yields(0.88 g/l) were obtained from *C. capsularis* L.

Keywords : *Hibiscus Cannabinus* L. , *Hibiscus sabdariffa* L. , *Corchorus capsularis* L. , *Broussonetia papyrifera* L. , Phosphoric acid , Pretreatment

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	I
บทคัดย่อ	II
Abstrac	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	8
3.1 การดำเนินการวิจัย	8
3.1.1) การเตรียมตัวอย่าง	8
3.1.2) การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างเบื้องต้นก่อนการปรับสภาพ	8
3.1.3) การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid pretreatment)	10
3.1.4) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Enzymatic hydrolysis)	11
3.1.5) การวางแผนการทดลอง	11

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 12

4.1 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพืชเส้นใย 12

4.2 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบการปรับสภาพของพืชเส้นใย 12

4.3 ผลของพืชเส้นใยที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 16

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 21

บรรณานุกรม 22

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของพืชเส้นใย	13
ตารางที่ 2 การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกของปอคิวบา	14
ตารางที่ 3 การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกของปอแก้ว	14
ตารางที่ 4 การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกของปอกระเจา	15
ตารางที่ 5 การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกของปอสา	15

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ผลผลิตกลูโคส saccharification และ conversion yields ที่ระยะเวลาต่างๆของปอคิวบา 17

ภาพที่ 2 ผลผลิตกลูโคส saccharification และ conversion yields ที่ระยะเวลาต่างๆของปอแก้ว 18

ภาพที่ 3 ผลผลิตกลูโคส saccharification และ conversion yields ที่ระยะเวลาต่างๆของปอกระเจา 19

ภาพที่ 4 ผลผลิตกลูโคส saccharification และ conversion yields ที่ระยะเวลาต่างๆของปอสา 20

บทที่ 1

บทนำ

1.1ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จากปัญหาราคาน้ำมันดิบ (fossil fuel) ในตลาดโลกที่สูงขึ้น และน้ำมันดิบมีปริมาณลดลง ส่งผลให้เกิดสภาวะการขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิง ยิ่งไปกว่านั้นก๊าซที่เกิดจากการเผาไหม้น้ำมันดิบ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ยังเป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะโลกร้อน (Global warming) ในปัจจุบัน ทำให้ในหลายประเทศมีการป้องกันและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น (Baños et al, 2011) พลังงานทดแทน (renewable energy) เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าว เนื่องจากพลังงานทดแทน คือ พลังงานที่ได้จากธรรมชาติและมีอยู่อย่างไม่จำกัดและพลังงานชีวภาพ (Bioenergy) คือพลังงานทดแทนอีกประเภทหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิลได้ดี เช่น เอทานอล (Bioethanol) เป็นต้น (Nigam and Singh, 2011) แหล่งพลังงานชีวภาพคือชีวมวล (Biomass) ซึ่งเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลที่สามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนได้เนื่องจากชีวมวล มีสารประกอบลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic Biomass) ที่มีองค์ประกอบหลักคือเซลลูโลส (Cellulose), เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) ส่วนของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส คือโพลิเมอร์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monopolysaccharide) ที่สามารถนำไปผ่านการย่อยแล้วนำไปหมักเอทานอล (Hendriks and Zeeman, 2009; Volynets and Dahman, 2011) แหล่งของสารประกอบลิกโนเซลลูโลสมีหลายชนิด เช่น ขยะจากการเกษตร (agricultural waste), ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมกระดาษ (byproduct) และพืชทุกชนิดเช่น อ้อย (sugar cane) , ข้าวโพด (corn), มันสำปะหลัง (cassava), วัชพืช (weed) และพืชเส้นใย (fiber crops) เช่น ปอคิวบา ปอแก้ว ปอกระเจา และปอสา เป็นต้น แม้ว่าแหล่งของสารประกอบลิกโนเซลลูโลสจะมีอยู่มากมาย แต่การเลือกใช้ต้องคำนึงถึงความเหมาะสม เนื่องจากพืชบางชนิดเป็นพืชที่สามารถนำไปบริโภคได้ หากนำพืชเหล่านี้มาผลิตเป็นพลังงานจะก่อให้เกิดภาวการณ์การแข่งขันทางด้านอาหารเกิดขึ้น (Sun and Cheng, 2002) ปอ คือวัตถุดิบที่น่าสนใจในการนำมาผลิตเป็นพลังงานชนิดหนึ่ง เนื่องจากปอไม่ใช่พืชอาหาร (Non food plant) สามารถเจริญได้ดีในดินที่มีคุณภาพต่ำ ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี และมีผลผลิตเส้นใยแห้งสูงถึง 190 -403 กิโลกรัมต่อไร่ (จิระศักดิ์ และคณะ, 2543) ยิ่งกว่านั้นปอยังมีองค์ประกอบของเซลลูโลสสูง ปอสา (paper mulberry), ปอแก้ว (Roselle), ปอกระเจา (Jute.) และปอคิวบา (Kenaf) มีปริมาณเท่ากับ 60.90 , 78.0 , 63.0 และ 66.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Khristova and Tissot, 1995; Ibrahim, 2010; Amaducci, 2000) ดังนั้นจึงจัดได้ว่าปอเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอล แต่การนำปอไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ต้องนำไปผ่านขั้นตอนการผลิตที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ การปรับสภาพ (pretreatment), การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis), และการหมัก (Fermentation) ตามลำดับ (Murphy et al, 2007; Ooi et al, 2011) ซึ่งขั้นตอนการปรับสภาพ (pretreatment) คือขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในการนำวัตถุดิบที่เป็น

สารประกอบลิกโนเซลลูโลสมาผลิตเป็นเอทานอล (Wyman et al, 2005) เนื่องจากการปรับสภาพ (Pretreatment) คือการลดปริมาณหรือกำจัดส่วนที่เป็นลิกนิน (Delignification) ออกไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้เอนไซม์สามารถย่อยเซลลูโลสในขั้นตอนการย่อย (Enzymatic hydrolysis) ได้ดีขึ้นและยังลดปริมาณการใช้เอนไซม์ที่มีราคาแพงได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้นขั้นตอนการปรับสภาพที่มีประสิทธิภาพจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ (Xu et al, 2001) การปรับสภาพ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment) , การปรับสภาพด้วยสารเคมี (Chemical pretreatment), และการปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment) ซึ่งพบว่าวิธีที่นิยมและมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีอื่นคือวิธีการปรับสภาพด้วยสารเคมี (Chemical pretreatment) เนื่องจากการปรับสภาพด้วยสารเคมีสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การปรับสภาพด้วยกรด (Acid pretreatment) และการปรับสภาพด้วยด่าง (Alkaline pretreatment) (Volynets et al, 2011) การปรับสภาพด้วยสารเคมีเพื่อให้มีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของพืช, ชนิดของสารเคมี, ความเข้มข้นของสารเคมี, ความดัน, เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพ (Mosier et al, 2005)

จากรายชื่อพืชที่มีหนังสือพันธุ์พืชขึ้นทะเบียนของกรมวิชาการเกษตรพบว่า ปอ เป็นพืชเส้นใย (Fiber crops) ที่มีการปลูกในประเทศไทย คือปอคิวบา (*Hibiscus Cannabinus* L.) , ปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* L.) , ปอกระเจา (*Corchorus capsularis* L.) , และปอสา (*Broussonetia papyrifera* L.) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการปลูกเพื่อการนำเส้นใยไปใช้ในอุตสาหกรรมทอกระสอบ และผลิตภัณฑ์ปอ เช่น เชือก ด้าย ผ้ากระสอบ เพื่อจำหน่ายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ (จิระศักดิ์ และคณะ , 2543) จากการศึกษาพบว่าปอเป็นพืชที่มีปริมาณเซลลูโลสสูง และจากที่กล่าวไว้ในข้างต้นว่าการนำวัตถุดิบที่เป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสมาผลิตเป็นเอทานอลนั้น ขั้นตอนการปรับสภาพเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลโดยใช้ปอเป็นวัตถุดิบในการผลิต การวิจัยครั้งนี้จึงได้คัดเลือกปอโดยใช้พันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย มาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล โดยนำปอที่คัดเลือกมาหาองค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition) แล้วนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพ (Optimization of Chemical pretreatment) เพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตในการผลิตเอทานอลสูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1) เพื่อค้นคว้าหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพปอคิวบา ปอแก้ว ปอกระเจา และปอสา
1.2.2) เพื่อตรวจหาปริมาณคาร์โบไฮเดรท และลิกนิน ของพืชเส้นใยดังกล่าว
1.2.3) เพื่อปรับสภาพพืชเส้นใย 4 ชนิด ด้วยวิธีการปรับสภาพทางเคมีด้วยกรดฟอสฟอริก
1.2.4) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพของพืชเส้นใยแต่ละชนิด
1.2.5) เพื่อทำการย่อยสลายเอนไซม์ของพืชเส้นใยที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการปรับสภาพพืชเส้นใยด้วยกรดฟอสฟอริกและย่อยสลายด้วยเอนไซม์

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ปอ คือพืชเส้นใย (Fiber crop) ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นชีวมวล (Biomass) ที่มีสารประกอบลิกโนเซลลูโลสในปริมาณสูง คือปอสา (paper mulberry), ปอแก้ว (Rosselle), ปอกระเจา (Jute.) และปอคิวบา (Kenaf) มีปริมาณเท่ากับ 60.90 , 78.0 , 63.0 และ 66.8 เปอร์เซ็นต์ (Khristova and Tissot, 1995; Ibrahim, 2010; Amaducci, 2000) ซึ่งเซลลูโลส (cellulose) เป็นโพลีเมอร์ (unbranched, homopolymer) ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เรียกว่าน้ำตาลกลูโคส (Glucose) ที่เชื่อมกันอยู่ด้วยพันธะ β-(1,4)-glycosidic bonds เมื่อนำเซลลูโลสไปย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคสแล้วนำไปหมักด้วยยีสต์บางชนิด เช่น *Saccharomyces* sp. จะได้ผลผลิตคือ เอทานอล (Bioethanol) ที่สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ แต่ในธรรมชาติพบว่าเซลลูโลสไม่ได้อยู่ในรูปแบบที่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรง แต่เซลลูโลสจะอยู่รวมกันเป็นมัดที่เรียกว่า microfibrils และมีเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) ของน้ำตาลชนิดอื่นๆล้อมรอบอยู่อย่างแน่นหนา สารประกอบทั้งสองชนิดนี้จะไปขัดขวางไม่ให้เซลลูโลสถูกย่อยได้โดยง่าย การปรับสภาพ (Pretreatment) เพื่อกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกไปจึงจำเป็นอย่างยิ่ง แต่อย่างไรก็ตามการปรับสภาพเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดต้องขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างดังที่กล่าวไว้แล้วในข้างต้น โดยเฉพาะพืชแต่ละชนิดมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ปริมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้นๆ และดังนั้นการนำปอมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้นั้น ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดคือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพ (Optimization) เพื่อให้ได้ผลผลิตคือน้ำตาลกลูโคสในปริมาณสูงสุด (Nigam et al, 2011; Volynets et al, 2011; Wyman et al, 2005; Kumar et al, 2009; Kahraman et al, 2008)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1) ผลจากการศึกษาวิจัยทำให้ได้เทคโนโลยีการปรับสภาพที่เหมาะสมกับพืชเส้นใย

1.5.2) สามารถนำพืชเส้นใยมาต่อยอดและพัฒนาวิธีการที่จะนำไปใช้ได้จริง ในการผลิตเอทานอลเพื่อนำไปเป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงฟอสซิล

1.5.3) สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับพืชเส้นใยและยังเป็นการส่งเสริมการเพาะปลูกปอ ทำให้เกษตรกรมีรายได้จากการขายพืชเส้นใยที่มากขึ้นอย่างต่อเนื่องและมั่นคง ซึ่งส่งผลให้พื้นที่ชนบทกลายเป็นชุมชนสีเขียว

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาทางเศรษฐกิจและสังคมที่เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีความต้องการใช้พลังงานมากขึ้น และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะแหล่งพลังงานจากน้ำมันดิบ (fossil fuel) ซึ่งเป็นทรัพยากรที่กำลังจะหมดไป จึงส่งผลให้มีการขาดแคลนส่งผลให้ราคาของน้ำมันดิบในตลาดโลกเพิ่มขึ้นมากกว่าเท่าตัว ยิ่งไปกว่านั้นก๊าซที่ปลดปล่อยจากการเผาไหม้จากแหล่งพลังงานที่มาจากน้ำมันดิบยังสะสมในชั้นบรรยากาศเกิดก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas) ที่เป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน จากปัญหาดังกล่าวทำให้หลายประเทศตื่นตัวมากขึ้นในการแก้ปัญหา ซึ่งมีข้อสรุปโดยรวมคือการรณรงค์ให้มีการประหยัดพลังงานโดยเฉพาะการออกแบบเครื่องจักรในโรงงานอุตสาหกรรมให้ประหยัดพลังงาน มากขึ้น แต่สิ่งที่สำคัญยิ่งกว่าคือการหาพลังงานทดแทน ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานหลักที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (Kahraman et al, 2008) จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำวัตถุดิบจากแหล่งต่างๆที่เป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสมาศึกษาเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในอนาคต

จากการศึกษานี้เป็นการศึกษาการปรับสภาพปอคิวบา ปอแก้ว ปอกระเจา และปอสา เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านพลังงาน ซึ่งการปรับสภาพเป็นการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสได้มากขึ้น เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่นำไปใช้ในกระบวนการหมักต่อไป โดยมีจุดประสงค์เพื่อทำให้โครงสร้างที่เป็นผลึก หรือโครงสร้างระเบียบ (crystalline) ของเซลลูโลส และลิกนินที่ติดอยู่แยกออกจากกันและเป็นขั้นตอนการกำจัดเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนของลิกโนเซลลูโลส (Alvira et al.,2010) โดยข้อดีของการปรับสภาพวัตถุดิบคือ ช่วยปรับปรุงโครงสร้างของน้ำตาล หรือเพิ่มความสามารถในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรตหรือปริมาณน้ำตาลเพื่อใช้ในขั้นตอนการหมัก ลดการเกิดผลิตภัณฑ์อื่น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และในขั้นตอนการหมัก และช่วยลดต้นทุนในการผลิต (Mosier et al., 2005)

วิธีการปรับสภาพแบ่งออกเป็น 5 วิธีคือ

2.1 กระบวนการปรับสภาพเชิงกล (Mechanical pretreatment) คือวิธีการที่ทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลง โดยการหั่น สับ หรือทุบ เพื่อให้วัตถุดิบมีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและยังช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์ ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานาน แต่มีข้อดีคือต้นทุนต่ำ

2.2 กระบวนการปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment) คือวิธีการที่ใช้การเพิ่มอุณหภูมิและการแผ่รังสี ซึ่งในขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิจะเป็นการเพิ่มอุณหภูมิ 1100 เคลวิน ภายใต้สภาวะทั้งที่มีก๊าซเฉื่อยและตัวออกซิแดนท์สามารถทำให้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินย่อยสลายได้ดี (Thermogravimeric treatment) ส่วนวิธีการเผาแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Pyrolysis) เป็นการนำเปลือกถั่วชนิดต่างๆ ฟางข้าว หรือพวกขี้เลื่อย ที่เพิ่มอุณหภูมิ 600-1200 เคลวิน จะให้ผลิตภัณฑ์ จำพวกถ่าน ของเหลว และก๊าซมากกว่าวิธีธรรมดาทั่วไปประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแผ่รังสีด้วยคลื่นไมโครเวฟที่ 700 วัตต์ (W) ด้วยเวลานานต่างๆกัน พบว่ามีการสูญเสียน้ำหนักของวัตถุดิบไปบ้างเนื่องจากมีการสลายตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน แต่ทำให้อัตราการย่อยสลายโดยใช้ด่างร่วมด้วยเพิ่มขึ้นมาก นอกจากนี้การใช้รังสีแกมม่าขนาด 500

กิโลเกรย์ (kGy) ทำให้โครงสร้างของฟางข้าวสาลีที่ป่นเป็นผงขนาด 140 mesh แตกตัวให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นอีก 13.40 เปอร์เซ็นต์

2.3 กระบวนการปรับสภาพทางชีวเคมี (Physicochemical pretreatment) คือการรวมกันระหว่างวิธีทางเคมีและทางกายภาพ มีส่วนสำคัญในการละลายน้ำของเฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่ถูกแปลงโครงสร้างแล้วเป็นผลทำให้การแตกตัวของเซลลูโลสในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น เช่น วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) , การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fibre explosion) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ระหว่าง160-260 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 0.69-4.83 MPa ที่มีไอน้ำอิ่มตัวเป็นเวลาหลายวินาที หรือ2-3 นาทีก่อนที่จะปรับลดลงมาอยู่ที่ความดันปกติ วิธีการปรับสภาพแบบเปียก (wet oxidation pretreatment) ใช้อุณหภูมิระหว่าง 200-210 องศาเซลเซียส และมีการเติมด่าง หรือ Na_2CO_3 ร่วมด้วยซึ่งจะช่วยการละลายของวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส และยังทำให้การใช้เอนไซม์ต่างๆให้ผลดีขึ้น ส่วนวิธีการปรับสภาพด้วยน้ำร้อน (Liquid hot water pretreatment,LHW) โดยการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 170-230 องศาเซลเซียส ความดัน 5 MPa นานหลายนาทีจึงปรับคืนสู่ความดันปกติ วิธีนี้ทำให้เฮมิเซลลูโลสในพวกชานอ้อย , เส้นใยข้าวโพด , และพวกฟางข้าวต่างๆแตกตัวเป็นไซโลสได้ถึง 45-65 เปอร์เซ็นต์

2.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment) เป็นการปรับสภาพที่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เชื้อราทั้งชนิดที่เป็น white-rot , brown-rod และชนิดที่เป็น soft-rot สามารถย่อยสลายเซลลูโลสเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้โดย brown-rod มีบทบาทสำคัญในการย่อยพวกเซลลูโลส ในขณะที่ white-rot และ soft-rot จะเข้าย่อยสลายพวกลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เชื้อราและแบคทีเรียเหล่านี้ได้แก่ *Aspergillus terreus, Trichoderma spp, Cyathus stercoreus, Penicillium camemberti, Phanerochaete chrysosporium, Streptomyces griseus* เป็นต้น

2.5 การปรับสภาพด้วยสารเคมี (Chemical pretreatment)

2.5.1 การปรับสภาพด้วยด่าง (Alkaline pretreatment) มีหลายวิธี เช่น การปรับสภาพโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 25เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ หรือ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ความร้อนจากไมโครเวฟ (Microwave-assisted and alkaline pretreatment) หลังจากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อ *Trichoderma ressii* พบว่าการปรับสภาพด้วยด่างที่ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ความร้อนจากไมโครเวฟมีผลต่อการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลของเอนไซม์มากที่สุดเมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ ยิ่งกว่านั้นการปรับสภาพด้วยด่างยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด

2.5.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด (Acid pretreatment) เป็นการปรับสภาพที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และยังสามารถละลายโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบออก การปรับสภาพด้วยกรดเจือจางจะใช้ความเข้มข้นกรดต่ำและอุณหภูมิสูง เช่น กรดซัลฟิวริก เป็นการปรับสภาพที่กำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเพื่อเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล แต่ในกระบวนการนี้สามารถกำจัดลิกนินได้เพียงเล็กน้อย ส่วนการปรับสภาพด้วยกรดเข้มข้นจะใช้ความเข้มข้นกรดสูงประมาณ 30-80 เปอร์เซ็นต์ และใช้อุณหภูมิต่ำ 40-60 องศาเซลเซียส เช่น กรดฟอสฟอริก สามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และทำลายโครงสร้างที่เป็นผลึกของเซลลูโลสได้ ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสและเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างรวดเร็ว ข้อดีของการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก คือไม่เป็นพิษ ไม่กัดกร่อนน้อย ปลอดภัย และมีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอนินทรีย์ตัวอื่น (Zhang et al.,2010) ฟอสฟอริกทำให้โครงสร้างที่เป็นผลึก

(crystalline) ของเซลลูโลส และลิกนินแยกออกจากกัน (Zhang et al., 2009) ในปฏิกิริยาของกรดฟอสฟอริกเกิดเป็นสารเอสเทอร์ในรูปของเซลลูโลสฟอสเฟต (Cellulose-O-PO3H2) และภายในปฏิกิริยายังเหลือหมู่ไฮดรอกซิลบนสายโซ่ของเซลลูโลส ไฮโดรเจนไอออนและน้ำ จะจับกันกลายเป็นพันธะไฮโดรเจน จากนั้นเซลลูโลสฟอสเฟตจะกลายมาเป็นกรดฟอสฟอริกอิสระและเซลลูโลสรูปร่างไม่คงที่ (amorphous cellulose) โดยไม่เกิดเป็นสารประกอบหรือการเกิดผลึกซ้ำ (Zhang et al., 2010) เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพราะว่าฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของของแข็ง สามารถใช้เป็นปุ๋ยได้ (Geddes et al., 2010) และฟอสฟอรัสยังเป็นสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก (Romero et al., 2007) ทั้งนี้ยังพบว่าการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น (มากกว่า83 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลให้โครงสร้างที่เป็นผลึกของเซลลูโลสแยกออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้มากขึ้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก

Um et al (2003) ได้ทำการปรับสภาพฟางข้าวโพด (corn stover) ด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส (saccharification yield) เท่ากับ 56.0 เปอร์เซ็นต์

Kim and Mazza (2008) ได้ทำการปรับสภาพฟางของทริทิเคลี (tricale straw) , ไม้สน (pine wood) และ ไม้ป๊อปล่า (poplar wood) ด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 86.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ที่ย่อยได้ (digestibility) เท่ากับ 98.2 ,74.8 , 95.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Kim and Mazza (2008) ได้ทำการปรับสภาพป่านลินิน (flax shives) ด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 86.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เท่ากับ 91.5 เปอร์เซ็นต์

Li et al (2009) ได้ทำการปรับสภาพต้นกก (reed) , ฟางเรฟซีด (rapeseed) , และหญ้าเบอร์มิวดา (bermudagrass) ด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เท่ากับ 67.7 ,67.9 และ 72.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Geddes et al (2010) ศึกษาความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่มีผลต่อการผลิตอาหารสัตว์ พบว่าในฟางหญ้าไรย์นั้น กรดฟอสฟอริกสามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูง เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตของยีสต์

Sandra et al (2010) ศึกษากระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของชานอ้อย (sugar cane bagasse) ด้วยการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.5 – 3.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 180 นาที จากผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเท่ากับ 404.5 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมตัวอย่าง

Goshadroua et al (2011) ได้ทำการปรับสภาพชานต้นข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum bagasse) ด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เท่ากับ 79 เปอร์เซ็นต์

Vasconcelos et al (2013) ได้ทำการปรับสภาพชานอ้อย (sugar cane bagasse) ด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 186 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เท่ากับ 56.4 เปอร์เซ็นต์

Linares et al (2013) ได้ทำการปรับสภาพชานต้นข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum bagasse) ด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เท่ากับ 93.9 เปอร์เซ็นต์

การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลสซึ่งเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-Glucosidic linkage ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เชิงซ้อน 3 ส่วน ดังนี้

Endoglucanase (EG; 1, 4- β -D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย β-1,4-glucosidic linkage โดยจะตัดแบบสุ่มภายในสายจะได้ cello-oligosaccharide, glucose, cellobiose

Exoglucanases (CBH;1,4-β-D glucancellobiohydrolase;EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ร่วมกับ Endoglucanase ในการย่อยเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducingผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ cellobiose

β-glucosidase (β -D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย cellobiose และ cellooligosaccharide ได้เป็นกลูโคส เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีนที่มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีนเท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ หรือโลหะอื่นในการเร่ง โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน 50 องศาเซลเซียส แต่อาจจะต่ำกว่าหรือสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเนื่องจากโครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยโครงสร้างผลึก หรือส่วนที่เป็นระเบียบ(crystalline region) และส่วนที่ไม่มีระเบียบ (amorphous region)เอนไซม์ endoglucanase จะเข้าไปย่อยสลายส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ ทำให้เส้นใยเซลลูโลสขาดเป็นช่วง ๆ เอนไซม์ exoglucanase เข้าไปย่อยส่วนปลายของเส้นใย ที่ขาดออกมา จากนั้นโมเลกุลของเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลที่สั้นลงโดยเอนไซม์ exoglucanase และโมเลกุลที่สั้นลงนั้นถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β-glucosidase ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส

จากผลการศึกษาจึงสามารถสรุปได้ว่าการปรับสภาพด้วยสารเคมี (Chemical Pretreatment) มีผลต่อปริมาณผลผลิตอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบจากผลผลิตที่ได้จากวัตถุดิบ และพบว่าวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพแล้วหลังจากนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ ผลผลิตมีค่าสูงขึ้นมากเมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ ดังนั้นการปรับสภาพ (Pretreatment) จึงมีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิตรวมทั้งสามารถลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในขั้นตอนการย่อย (Enzymatic hydrolysis) เพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสอย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินวิจัย

3.1 การดำเนินงานวิจัย

3.1.1) การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างปอ 4 ชนิดคือ ปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* L.) ปอคิวบา (*Hibiscus cannabinus* L.) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ปอกระเจา (*Corchous olitorius* L.) จากจังหวัดจันทบุรี และปอสา (*Broussonetia papyrifera* L.) จากอำเภอภูชาง จังหวัดพะเยา นำมาตากในที่ร่มจนแห้ง บดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืชที่มีตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างมาร่อนโดยใช้ตะแกรงร่อน (test sieve) ให้มีขนาด 250-425 ไมโครเมตร เก็บไว้ในที่แห้งเพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

3.1.2) การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างเบื้องต้นก่อนการปรับสภาพ

3.1.2.1) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid), ปริมาณความชื้น (Moisture)

ชั่งตัวอย่างปริมาณ 1 กรัมลงในขวดชั่งน้ำหนักที่ทราบน้ำหนักคงที่แล้ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปคำนวณดังสมการที่ 1 และ 2

ปริมาณของแข็งทั้งหมด (%) = (น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ g / น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ g) x 100 g (1)

ปริมาณความชื้น (%) = 100 - ปริมาณของแข็งทั้งหมด % (2)

3.1.2.2) การย่อยตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลิกนินที่ละลายด้วยกรด ลิกนินที่ไม่ละลายด้วยกรด และ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาณ 0.3 กรัม เติมกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้น 72% (w/w) ปริมาณ 3 มิลลิลิตรแล้วคนด้วยแท่งแก้วคนสารจนทั่ว แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และคนของผสมด้วยแท่งแก้วคนสารทุก 10 นาที จากนั้นถ่ายของผสมลงในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเจือจางกรดให้เหลือ 4 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ด้วยการเติมน้ำกลั่นปริมาณ 84 มิลลิลิตรในขณะเดียวกันต้องชะตัวอย่างออกจากหลอดทดลองให้หมด นำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็งจนตัวอย่างมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปแยกส่วนด้วย centrifuge method ด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลว (liquid fraction) ไปวิเคราะห์ปริมาณลิกนินที่ละลายในกรด (Acid Soluble Lignin: ASL) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และนำส่วนของแข็ง (solid fraction) ไปวิเคราะห์ปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (Acid Insoluble Lignin: AIL)

3.1.2.3) การวิเคราะห์ปริมาณลิกนินที่ละลายในกรด

นำส่วนของเหลวจากการย่อยตัวอย่างในข้อ 2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ค่าความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณลิกนินที่ละลายในกรดดังสมการที่ 3

ลิกนินที่ละลายในกรด (%) = (absorbance x 87 ml x ค่าเจือจาง/110 x ปริมาณของแข็งทั้งหมด g x ความกว้างของเซลล์ cm) x 100 (3)

3.1.2.4) การหาปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด

นำส่วนของแข็งของตัวอย่างจากการย่อยตัวอย่างในข้อ 2 ไปล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนจนมีค่า pH เป็นกลางด้วย centrifuge method ด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนของแข็งของตัวอย่างที่มีค่าเป็นกลางไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ จากนั้นนำตัวอย่างที่อบและชั่งน้ำหนักแล้ว ไปเผาที่อุณหภูมิ 575 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด ดังสมการที่ 4

ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (%) = ((น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ g – น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา g) / ปริมาณของแข็งทั้งหมด g)) x 100 (4)

3.1.2.5) การหาปริมาณลิกนินทั้งหมด (total lignin)

ปริมาณลิกนินทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 5

ปริมาณลิกนินทั้งหมด = ลิกนินที่ละลายในกรด (%)+ ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (%) (5)

3.1.2.6) การหาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide)

นำส่วนของเหลวของตัวอย่างจากการย่อยตัวอย่างในข้อ 2 ปริมาณ 5 มิลลิลิตรมาทำให้เจือจางด้วยการเติมน้ำกลั่นปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นกลางด้วยการเติมสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) ที่มีความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยบันทึกปริมาตรของสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าเจือจาง จากนั้นนำตัวอย่างไปแยกส่วนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างส่วนใส (supernatant) ไปกรองด้วยชุดกรองสำหรับกระบอกฉีดยา (syringe filter) ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่อง HPLC Shimadzu รุ่น LC 20 AD ด้วยสภาวะ

Aminex HPX 87P	7.8 x 300	mm
Flow rate	0.6	ml/min
Column temperature	80	°C
RI Detector temperature	55	°C

3.1.2.6) การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

ชั่งตัวอย่างปริมาณ 1 กรัมลงในครูซิเบิ้ลที่ทราบน้ำหนักคงที่แล้ว จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 575 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักแล้วนำไปคำนวณดังสมการ

ปริมาณเถ้า (%) = (น้ำหนักเถ้า g /น้ำหนักตัวอย่าง g) x 100 (6)

3.1.2.7) การวิเคราะห์ปริมาณโฮโลเซลลูโลส อัลฟาเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส

ปริมาณโฮโลเซลลูโลส (holocellulose) อัลฟาเซลลูโลส(α-cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Adilson et al (2005)

การวิเคราะห์ปริมาณโฮโลเซลลูโลส

ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2.5 กรัมลงในฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 150 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดอะซิติกปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และ โซเดียมคลอไรต์ 1 กรัม แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง โดยเติมกรดอะซิติกปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และ โซเดียมคลอไรต์ปริมาณ 1 กรัม ทุก 1 ชั่วโมงจนครบชั่วโมงที่ 3 หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วกรองโฮโลเซลลูโลสด้วยถ้วยกรองแก้ว (glass filtering crucible) จากนั้นล้างของแข็งที่เหลืออยู่ (solid residue) ด้วยน้ำกลั่นร้อนจนมีค่า pH เป็นกลาง แล้วนำตัวอย่างที่มีค่า pH เป็นกลางไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณโฮโลเซลลูโลสดังสมการที่ 7

โฮโลเซลลูโลส (%) = (น้ำหนักโฮโลเซลลูโลสหลังอบ g / น้ำหนักตัวอย่าง g) x 100 (7)

การวิเคราะห์ปริมาณอัลฟาเซลลูโลส

ชั่งโฮโลเซลลูโลสปริมาณ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ลงในฟลาสก์ขนาด 150 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสแล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 17 เปอร์เซ็นต์w/v ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วนำออกมาตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาณ 25 มิลลิลิตรคนเบาๆ แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที กรองด้วย filtering crucible No.2 ล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนจนค่า pH เป็นกลางแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง นำค่าน้ำหนักที่ได้ไปคำนวณดังสมการ

$$\text{อัลฟาเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักอัลฟาเซลลูโลสหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100 \quad (8)$$

การหาปริมาณเฮมิเซลลูโลส

การหาปริมาณเฮมิเซลลูโลสสามารถคำนวณได้ดังสมการ

เฮมิเซลลูโลส(เปอร์เซ็นต์) = โฮโลเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) –อัลฟาเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) (9)

3.1.3) การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid pretreatment)

ชั่งตัวอย่าง 3 กรัมลงหลอดเซนตริฟิวจ์พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดฟอสฟอริกที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 70 75 และ 80 โดยปริมาตร ตามลำดับ ด้วยอัตราส่วนตัวอย่าง 1 กรัมต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก 8 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นเติมอะซีโตนปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วนำไปแยกส่วน

ด้วยวิธี Centrifugation method ด้วยความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ล้างส่วนของแข็ง (solid fraction) ด้วยน้ำกลั่นร้อนจนค่า pH เป็นกลาง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (glucose) ไซโลส(xylose) กาแลคโตส (galactose) อะราบิโนส (arabinose) และ แมนโนส (mannose)

3.1.4) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Enzymatic hydrolysis)

ชั่งตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก และตัวอย่างที่ไม่ผ่านการพรีทรีต (untreated biomass) ปริมาณ 1 กรัม น้ำหนักแห้ง ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมอาไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวล เอนไซม์ Cellic CTec2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 96 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่ 12 , 24 , 48 , 72 และ 96 ชั่วโมงเพื่อนำไปวัดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี HPLC method

3.1.5) การวางแผนการทดลอง

การทดลองทั้งหมดวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Compleately Randomized Design: CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 วิเคราะห์ผลแบบ one way anova แล้วเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพืชเส้นใย

จากผลการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบทางเคมี (ตารางที่ 1) พบว่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solids) อยู่ระหว่าง 90-92 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 7-9 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าปริมาณของแข็งทั้งหมด จะต้องมีเปอร์เซ็นต์สูง และปริมาณค่าความชื้นต่ำ (Palmqvist, 2000) ส่วนเปลือกปอสามีปริมาณเถ้ามากที่สุดคือ 5.57±0.91 เปอร์เซ็นต์ และเปลือกปอคิวบามีปริมาณต่ำที่สุด คือ 2.75±0.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าถ้าค่าของเถ้ามีปริมาณสูงมากกว่าปกติอาจมีการปลอมปนสารอื่นเข้ามาในตัวอย่างนั้น เนื่องจากเถ้าที่ได้มีส่วนประกอบของแร่ธาตุไม่เหมือนเดิมทุกอย่าง เนื่องจากแร่ธาตุบางอย่างอาจระเหยไประหว่างเวลาการเผา จึงทำให้ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์) มีค่าแตกต่างกัน ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจะประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูแคนอยู่ระหว่าง 54-66 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไซแลนและกาแลกแตน พบมากรองลงมาตามลำดับ และปริมาณลิกนินอยู่ในช่วง 15-18 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากค่าลิกนินหาได้จากปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (AIL) และลิกนินละลายในกรด (ASL) รวมกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าลิกนินที่ไม่ละลายในกรด แล้วพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 9-16 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ดังนั้นปริมาณลิกนินที่มีอยู่จึงเป็นส่วนของลิกนินที่ละลายในกรด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างชนิดอื่นเช่น พืชทนเค็ม (Saline crops) จำพวก ต้นสนยูคาลิปตัส และหญ้าไรย์ พบว่ามีน้ำตาลกลูแคนอยู่ในช่วง 31-49 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด อยู่ในช่วง17-32 เปอร์เซ็นต์ และลิกนินละลายในกรด อยู่ระหว่าง 2-4 เปอร์เซ็นต์ (Hendriks et al, 2009) จึงชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างปอทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณเซลลูโลสสูงกว่าพืชทนเค็ม จากการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า ปอสามีปริมาณเซลลูโลส 66.75±0.31 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าพืชชนิดอื่น ในขณะที่ปริมาณเฮมิเซลลูโลสปอแก้ว 11.89±0.13 สูงที่สุด และปอกระเจามีปริมาณลิกนิน 18.17±0.43 เปอร์เซ็นต์

4.2 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบการปรับสภาพของพืชเส้นใย

ตัวอย่างที่ได้จากการหาองค์ประกอบทางเคมี แล้วนำไปปรับสภาพตัวอย่างด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกที่มีความเข้มข้น 70,75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที (ตารางที่ 2-5) พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากตัวอย่างแต่ละชนิด มีความแตกต่างกัน เนื่องจากกรดฟอสฟอริกทำปฏิกิริยากับตัวอย่างโดยไปทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของเซลลูโลส เป็นการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่เป็นตัวขัดขวางกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ (Bienkowski, 1984) การทดลองดังกล่าวส่งผลให้ปริมาณของแข็งที่อยู่ในตัวอย่างหายไป (solid loss) อย่างไรก็ตามเมื่อตัวอย่างถูกปรับสภาพด้วยกรดความเข้มข้นสูง จะทำให้ปริมาณของแข็งหายไปด้วย เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่ไม่ได้ปรับสภาพปรากฏว่าตัวอย่างที่มีน้ำตาลสูงกว่าปอชนิดอื่น คือ เปลือกปอสาเท่ากับ 61.50±0.16 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ปริมาณน้ำตาลจากการปรับสภาพสูงที่สุดในการเปรียบเทียบจากทั้ง 3 ความเข้มข้น คือ กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 70 , 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลสูงที่สุดคือเปลือกปอคิวบาเท่ากับ 59.49±0.15 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเปลือกปอแก้ว เปลือกปอสา และเปลือกปอกระเจา ตามลำดับ ในขณะที่เปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นของปอทั้ง 4 ชนิด ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่ความเข้มข้น 70เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่า ปอแต่ละชนิดให้ปริมาณน้ำตาลที่ต่างกัน เนื่องจากความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับตัวอย่างมากเกินไป จนส่งผลให้ปริมาณของแข็งที่อยู่ในตัวอย่างหายไปสูง เมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างลดลง ซึ่งแปรผันตรงกับปริมาณ

ตัวอย่างที่หายไป เนื่องจากเมื่อปรับสภาพด้วยสภาวะที่กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสลดลงมากที่สุด (จากตารางที่ 2-5) ยิ่งไปกว่านั้นคาดว่าจากการปรับสภาพด้วยสภาวะดังกล่าวส่งผลให้ความเป็นผลึกของเซลลูโลสลดลงและความเป็นรูพรุนของตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มากที่สุด (Mosier et al., 2005)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของพืชเส้นใย

องค์ประกอบ	ร้อยละขององค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์)			
	เปลือกปอคิวบา	เปลือกปอแก้ว	เปลือกปอกระเจา	เปลือกปอสา
กลูแคน	62.49±0.11	54.18±0.12	57.64±0.24	66.75±0.31
ไซแลน	11.46±0.21	11.89±0.13	9.03±0.14	6.48±0.52
กาแลกแตน	0.76±0.09	1.19±0.07	0.94±0.02	1.95±0.19
ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด	11.93±0.39	9.32±0.03	16.31±0.42	14.73±0.63
ลิกนินที่ละลายในกรด	3.27±0.13	0.06±7.64	1.86±0.01	1.91±0.00
ลิกนินทั้งหมด	15.2±0.4	17.77±0.32	18.17±0.43	16.64±0.64
เถ้า	2.75±0.08	3.59±0.06	5.26±0.13	5.58±0.29
ของแข็งทั้งหมด	91.15±0.14	91.47±0.05	90.82±0.02	91.71±0.25
สารแทรก	8.85±0.14	8.53±0.05	9.18±0.02	8.29±0.25

ค่าที่แสดงในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย, n=3, ± SD, $P \leq 0.05$

ตารางที่ 2 การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกของเปลือกปอคิวบา

สภาวะ	กรดฟอสฟอริก (%)	ของแข็ง (%)	กลูแคน (%)	ไซแลน (%)	ลิกนิน (%)
ไม่ปรับสภาพ	N/A	100	62.37±0.12	11.46±0.21	15.20±0.4
	70	70.89±0.86 ^{a}(29.11%)	59.49±0.15^{a}(4.62%)	2.39±0.15^{a}(98.08%)	9.19±0.12^{a}(39.51%)
	75	58.14±0.29^{b}(41.86%)	54.98±0.32^{b}(11.85%)	ND	3.54±0.06^{b}(76.73%)
	80	40.08±0.81^{c}(59.92%)	24.16±0.84^{c}(61.27%)	ND	2.08±0.05^{c}(86.31%)

ค่าที่แสดงในตาราง คือค่าเฉลี่ย, n=3, ± SD, P≤ 0.05 และ (น้ำหนักที่หายไป)

ตารางที่ 3 การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกของเปลือกปอแก้ว

สภาวะ	กรดฟอสฟอริก (%)	ของแข็ง (%)	กลูแคน (%)	ไซแลน (%)	ลิกนิน (%)
ไม่ปรับสภาพ	N/A	100	54.18±0.14	11.89±0.13	17.77±0.32
	70	62.29±0.77^{a}(37.71%)	59.27±0.51^{a}(3.52%)	3.34±0.04^{a}(71.95%)	10.84±0.14^{a}(38.97%)
	75	53.89±0.73^{b}(46.11%)	48.88±0.80^{b}(9.78%)	ND	4.28±0.04^{b}(75.90%)
	80	38.01±1.49^{c}(61.99%)	28.67±1.01^{c}(47.09%)	ND	2.71±0.04^{c}(84.74%)

ค่าที่แสดงในตาราง คือค่าเฉลี่ย, n=3, ± SD, P≤ 0.05 และ (น้ำหนักที่หายไป)

สำนักหอสมุด
1 6824043
31 ส.ค. 2558

ตารางที่ 4 การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกของเปลือกปอกระเจา

สภาวะ	กรดฟอสฟอริก (%)	ของแข็ง (%)	กลูแคน (%)	ไซแลน (%)	ลิกนิน (%)
ไม่ปรับสภาพ	N/A	100	57.64±0.21	9.03±0.14	19±0.45
	70	66.35±0.65 [a](33.65%)	52.44±0.26 [a](9.03%)	0.16±0.0 [a](98.23%)	10.67±0.07 [a](43.84%)
	75	64.91±0.31 [b](33.09%)	51.61±0.66 [b](10.40%)	ND	5.48±0.12 [b] (71.17%)
	80	41.22±1.45 [c](58.78%)	29.67±1.3 [b](48.53%)	ND	2.84±0.08 [c] (85.04%)

ค่าที่แสดงในตาราง คือค่าเฉลี่ย, n=3, ± SD, P≤ 0.05 และ (น้ำหนักที่หายไป)

ตารางที่ 5 การปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกของเปลือกปอสา

สภาวะ	กรดฟอสฟอริก(%)	ของแข็ง (%)	กลูแคน (%)	ไซแลน (%)	ลิกนิน (%)
ไม่ปรับสภาพ	N/A	100	66.75±0.31	6.48±0.52	18.09±0.54
	70	64.16±0.90 [a](35.84%)	53.90±0.43 [a](19.25%)	ND	10.81±0.06 [a](40.28%)
	75	56.03±0.59 [b](43.97%)	41.55±0.46 [b](23.31%)	ND	5.46±0.09 [b](69.83%)
	80	39.72±0.78 [c](60.28%)	20.35±0.53 [c](62.45%)	ND	3.02±0.07 [c](83.29%)

ค่าที่แสดงในตาราง คือค่าเฉลี่ย, n=3, ± SD, P≤ 0.05 และ (น้ำหนักที่หายไป)

4.3 ผลของพืชเส้นใยที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

4.3.1 ผลการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของเปลือกปอคิวบา

จากการนำตัวอย่างที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 70 , 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ากลูโคสที่ปลดปล่อยออกมาเพิ่มสูงขึ้น ที่เวลา 12 ชั่วโมง และเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนคงที่ เมื่อบ่มที่ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 1) เมื่อปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ค่า saccharification yield จะสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการปรับสภาพจาก 17.71±0.52 เป็น 93.02±0.44 เปอร์เซ็นต์ และ ค่า conversion yield 28.40±0.83 เพิ่มขึ้นเป็น 78.17±0.37 โดยคิดเป็น 5 และ 3 เท่า ตามลำดับ จากกราฟจะสังเกตได้ว่า เมื่อปรับสภาพด้วยความเข้มข้นกรดสูงขึ้น ปริมาณค่า saccharification yield และ conversion yield จะลดลง เนื่องจากประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ลดลง

4.3.2 ผลการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของเปลือกปอแก้ว

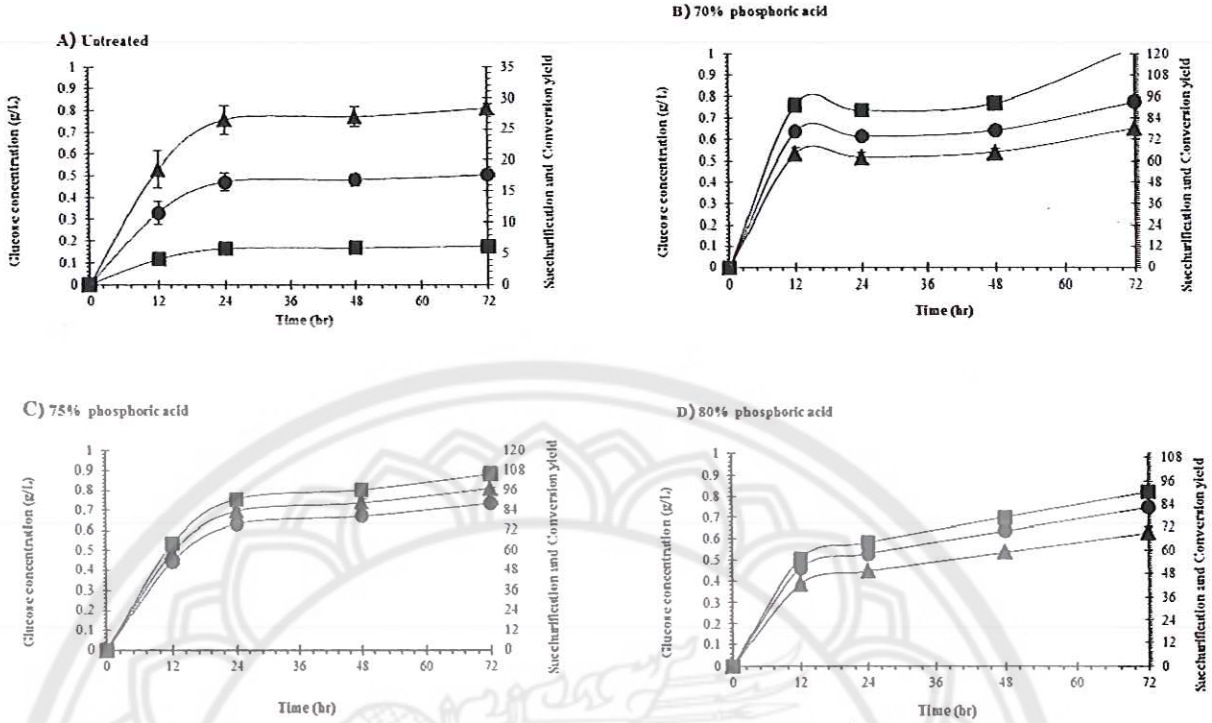
เมื่อนำตัวอย่างที่ไม่ผ่านการปรับสภาพไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่า มีค่า saccharification yield และ conversion yield ต่ำสุด เท่ากับ 20.60±0.61 และ 38.03±1.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) แต่เมื่อปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 70 , 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคส saccharification yield และ conversion yield สูงที่สุด ที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง คือ 90.54±0.29 และ 76.03±0.24 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเหมาะสมในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ ซึ่งพืชในแต่ละสายพันธุ์ มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ความเข้มข้นกรดที่ 80 เปอร์เซ็นต์เข้าไปกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ได้ดีกว่ามีความรุนแรงในการทำปฏิกิริยามากกว่าความเข้มข้นที่ 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์

4.3.3 ผลการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของเปลือกปอกระเจา

จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่า ตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคส ค่า saccharification yield และ ค่า conversion yield สูงที่สุด เท่ากับ 97 79±0.39, 77.61±0.31 ,96.72± 0.53 และ 69.58±0.38 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปอกระเจา เมื่อนำมาย่อยแล้ว ค่า saccharification yield ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปรับสภาพด้วยกรดความเข้มข้น 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์

4.3.4 ผลการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของเปลือกปอสา

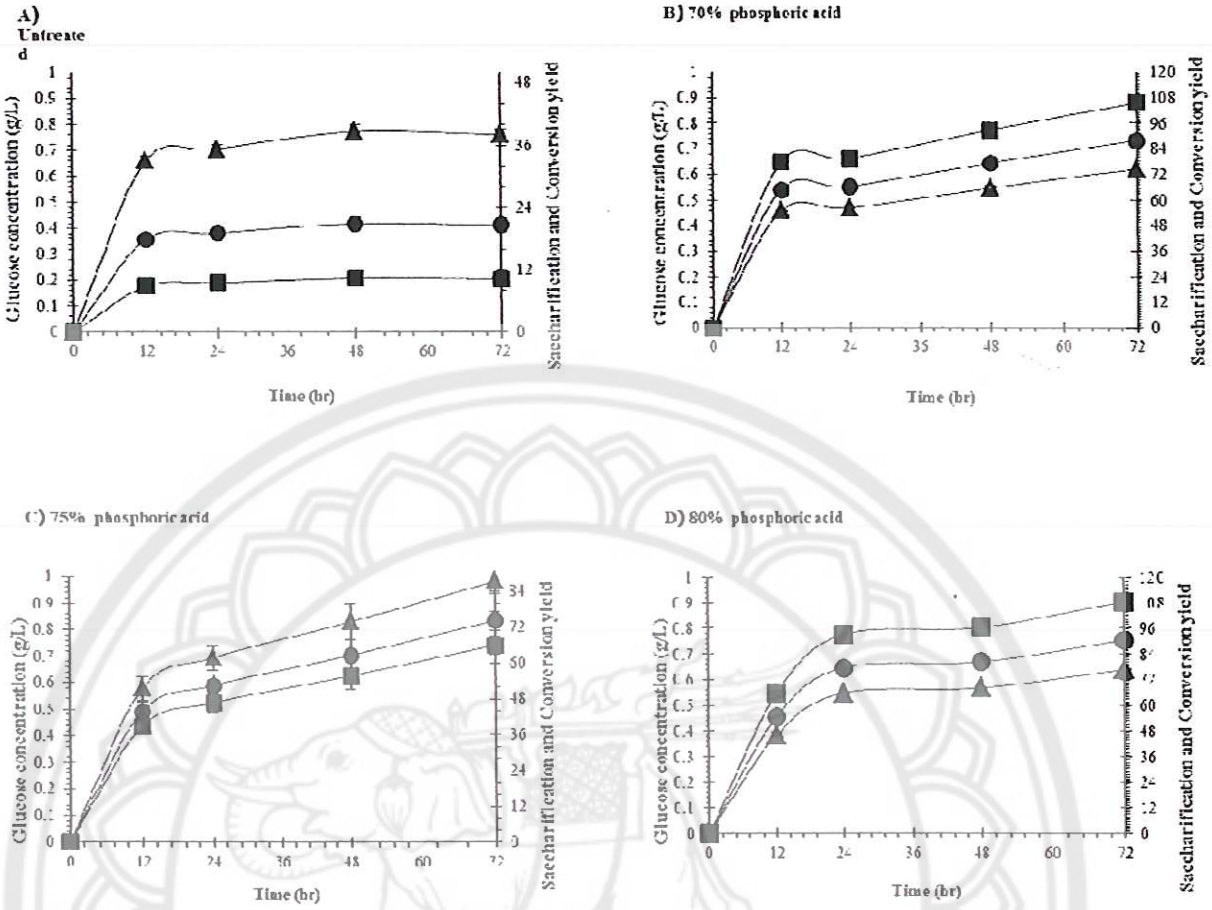
จากผลการทดลองพบว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของปอสา (ภาพที่ 4) มีการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสออกมา ที่ 12 ชั่วโมงของการบ่ม ซึ่งผลผลิตน้ำตาลกลูโคส ค่า saccharification yield และ ค่า conversion yield สูงที่สุด ที่ 72 ชั่วโมง ในการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 75เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 78.05±3.97 และ 57.81±2.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มต่อถึง 96 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลลดลง เนื่องจากเอนไซม์ได้ทำการย่อยซับสเตรตจนหมด และประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลง



ภาพที่ 1 ผลผลิตกลูโคส saccharification และ conversion yields ที่ระยะเวลาต่างๆของเปลือกปอคิวบา

A) ตัวอย่างเปลือกปอคิวบาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ B) ปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 70 C) 75 D) 80 เปอร์เซ็นต์

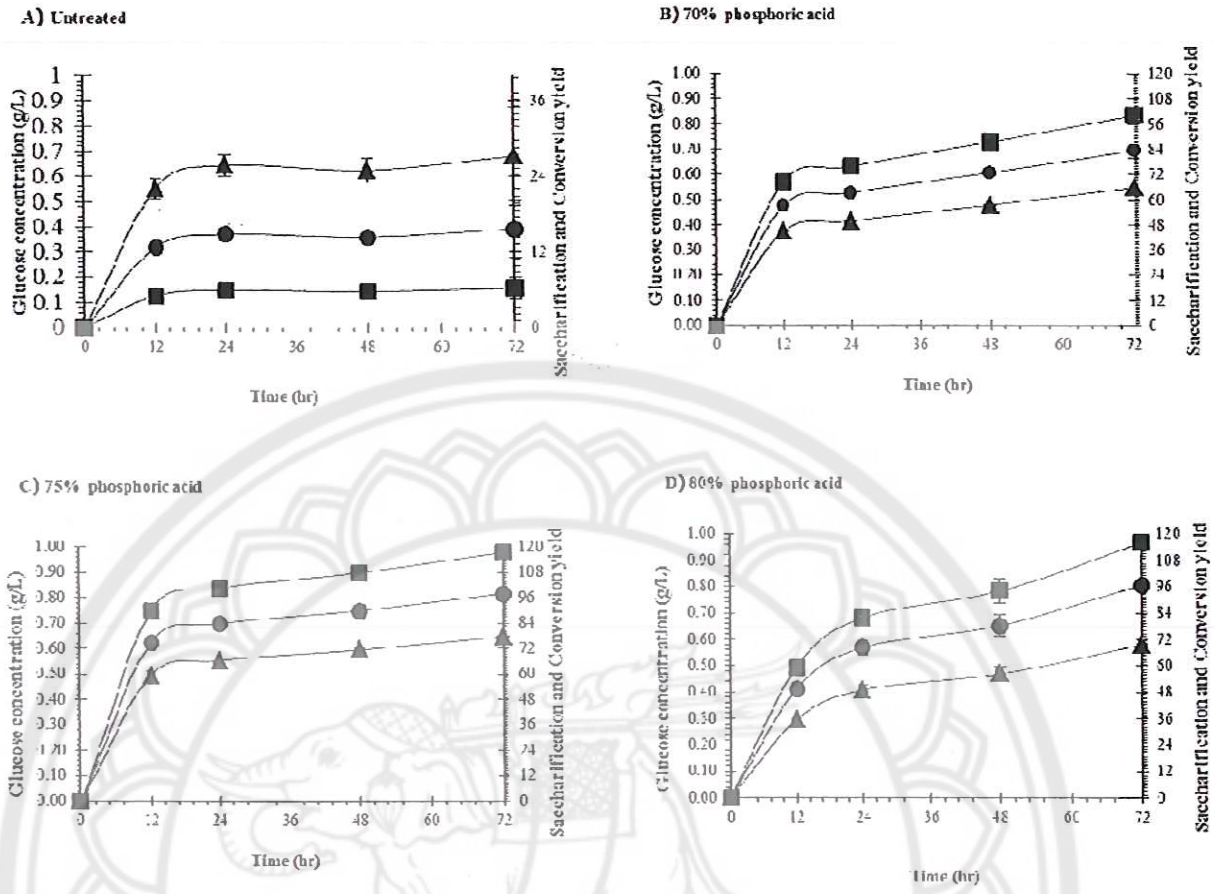
B) สัญลักษณ์ ▲ conversion ● saccharification ■ glucose



ภาพที่ 2 ผลผลิตกลูโคส saccharification และ conversion yields ที่ระยะเวลาต่างๆของเปลือกปอแก้ว

A) ตัวอย่างเปลือกปอแก้วที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ B) ปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 70 C) 75 D) 80 เปอร์เซ็นต์

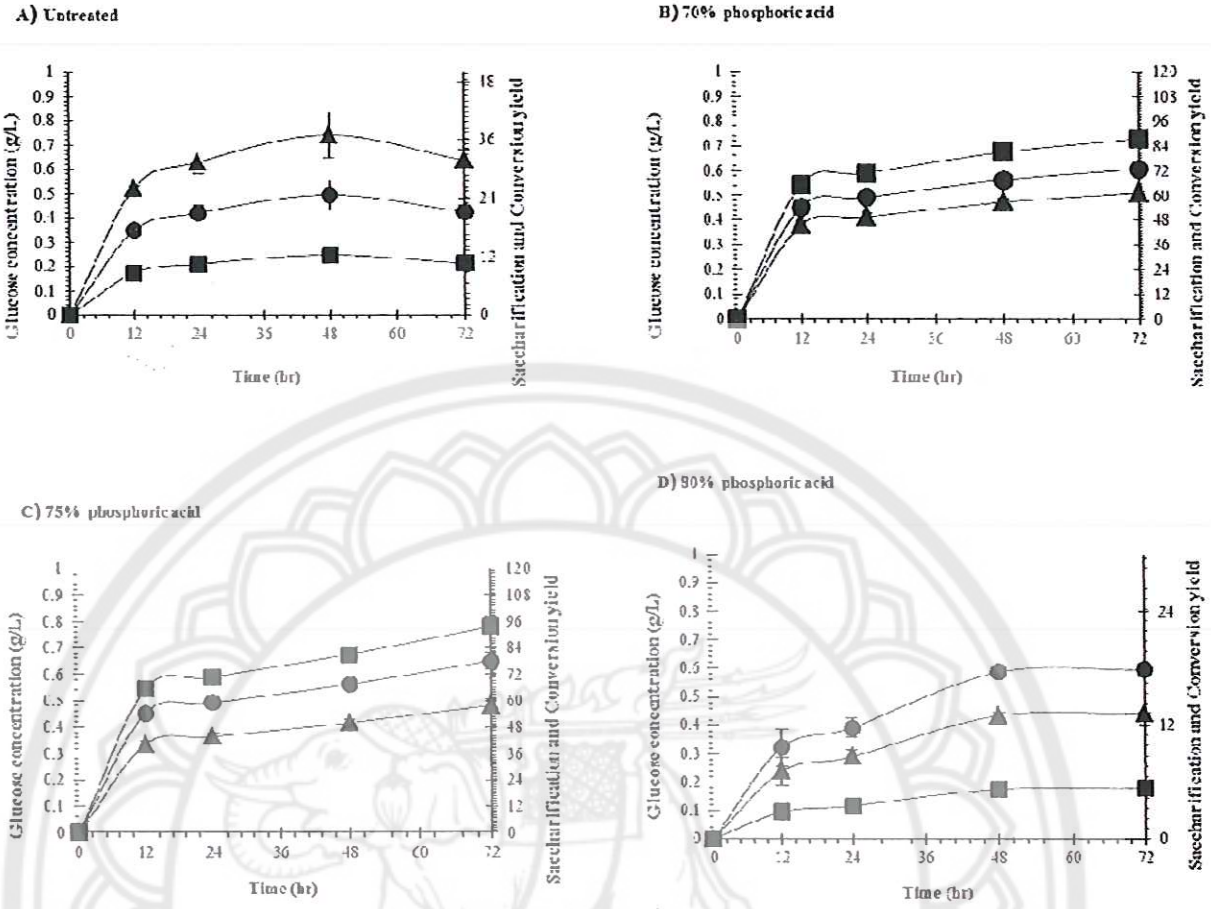
สัญลักษณ์ ▲ conversion ● saccharification ■ glucose



ภาพที่ 3 ผลผลิตกลูโคส saccharification และ conversion yields ที่ระยะเวลาต่างๆของเปลือกปอกระเจา

A) ตัวอย่างเปลือกปอกระเจาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ B) ปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 70 C) 75 D) 80 เปอร์เซ็นต์

สัญลักษณ์ ▲ conversion ● saccharification ■ glucose



ภาพที่ 4 ผลผลิตกลูโคส saccharification และ conversion yields ที่ระยะเวลาต่างๆของปอสา A) ตัวอย่างปอสาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ B) ปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 70 C) 75 D) 80 เปอร์เซ็นต์

สัญลักษณ์ conversion ▲ saccharification ● glucose ■

การปรับสภาพปอคิวบา ปอแก้ว ปอกระเจา และปอสา ด้วยกรดฟอสฟอริก 75 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้การย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า saccharification yield เท่ากับ 77.61±0.31 และ conversion yield เท่ากับ 97.79±0.39 เปอร์เซ็นต์ ของปอกระเจา สูงกว่าปอชนิดอื่น ที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะเดียวกัน

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. จากผลการศึกษาของปอคิวบา ปอแก้ว ปอกระเจา และปอสา พบว่า จากการนำตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า ปอทั้ง 4 ชนิด มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก แต่ปอสามีปริมาณเซลลูโลสสูงสุดคือ 66.75±0.31 รองลงมาคือ ปอคิวบา 62.49±0.11 ปอกระเจา 57.64±0.24 และปอแก้ว 54.18±0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปอคิวบามีปริมาณลิกนินน้อยที่สุดคือ 15.2±0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณเฮมิเซลลูโลสของพืชทั้ง 4 ชนิดไม่แตกต่างกันมาก

2. สภาวะที่เหมาะสมในปรับสภาพตัวอย่างปอทั้ง 4 ชนิด ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกที่มีความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุด ซึ่งพบว่าปอคิวบามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด รองลงมา ปอแก้ว ปอสา และปอกระเจา ตามลำดับ

3. เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 70 , 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีอัตราการผลิตกลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่เวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไปอัตราการผลิตกลูโคสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งพบว่าค่า saccharification yield และ conversion yield จะสูงขึ้น เมื่อปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของปอทั้ง 4 ชนิด ผลปรากฏว่า ปอคิวบาปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสมากที่สุด โดยมีค่า saccharification yield เท่ากับ 88.27±0.50 และมีค่า conversion yield เท่ากับ 97.26±0.55 รองลงมา ปอแก้ว ปอกระเจา และปอสา ตามลำดับ หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ 72 ชั่วโมง ปริมาณกลูโคสที่ปลดปล่อยออกมาจะลดลง แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ลดลง ขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นการทดสอบการทำงานและบ่งบอกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ว่ามีความเหมาะสมต่อตัวอย่างชนิดนั้นๆหรือไม่ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง ปริมาณเซลลูโลส ซึ่งเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเป็นตัวขัดขวางและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เพราะฉะนั้นขั้นตอนที่สำคัญขั้นแรกคือการปรับสภาพ เพื่อให้โครงสร้างที่ง่ายต่อการเข้าทำปฏิกิริยาและมีสัดส่วนเซลลูโลสสูง ทำให้ผลผลิตกลูโคสได้ในปริมาณมากเพื่อให้ยีสต์ใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอลต่อไป

บรรณานุกรม

จิระศักดิ์, ปรีชา, ไพรัตน์ และคณะ (2543) พันธุ์พืชขึ้นทะเบียนและพันธุ์พืชรับรอง ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, 101(13), 4851-4861.

Amaducci, S., Amaducci, M.T., Benati, R. & Venturi, G. Crop yield and quality parameters of 4 annual fibre crops (Hemp, Kenaf, Maize and Sorghum) in the North of Italy. Industrial Crops and Products 11 (2000) 2-3, 179-186.

Baños, R. et al. (2011). Optimization methods applied to renewable and sustainable energy: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 15, 1753-1766.

Geddes, C. C., Peterson, J. J., Roslander, C., Zacchi, G., Mullinnix, M. T., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. et al. (2010). Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. Bioresource Technology, 101(6), 1851-1857.

Goshadrou, A., Karimi, K., and Taherzadeh, M. J. (2011). Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by Mucor hiemalis. Industrial Crops and Products, 34(1), 1219-1225.

Hendriks, A.T.W.M. & Zeeman, G. (2009).Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 100, 10-18.

Ibrahim, N.A., Amr, A., Eid, B.M. & El-Sayed, Z.M. (2010).Innovative multi-functional treatments of ligno-cellulosic jute fabric. Carbohydrate Polymers 82, 1198-1204.

Kahraman, B. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. Renewable and Sustainable Energy Reviews 12, 542-552.

Khristova, P. and Tissot, M. (1995). Soda-anthraquinone pulping of Hibiscus sabdariffa (karkadeh) and Calotropis procera from Sudan. Bioresource Technology 53, 67-72.

Kim, J. W., and Mazza, G. (2008). Optimization of phosphoric acid catalyzed fractionation and enzymatic digestibility of flax shives. Industrial Crops and Products, 28(3), 346-355.

Kim, T. H., Taylor, F., and Hicks, K. B. (2008). Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. Bioresource Technology, 99(13), 5694-5702.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production Industrial & Engineering Chemistry Research 8, 3713-3729.

Li, H., Kim, N., Jiang, M., Kang, J. W., and Chang, H. N. (2009). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid–acetone for bioethanol production. Bioresource Technology, 100(13), 3245-3251.

Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M. and Ladisch, M.R. (2005). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. Bioresource Technology 96, 1986-1993.

Murphy, P.T., Moore, K.J., Richard, T.L. and Bern, C.J. (2007). Enzyme enhanced solid-state fermentation of kenaf core fiber for storage and pretreatment. Bioresource Technology 98, 3106-3111.

Nigam, P.S. and Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. Progress in Energy and Combustion Science 37, 52-68.

Ooi, B.G., Rambo, A.L. and Hurtado, M.A. (2011). Overcoming the recalcitrance for the conversion of kenaf pulp to glucose via microwave-assisted pre-treatment processes. International Journal of Molecular Sciences 12, 1451-1463.

Romero, I., Moya, M., Sánchez, S., Ruiz, E., Castro, E., Bravo, V. et al. (2007). Ethanolic fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning. industrial Crops and Products, 25(2), 160-168.

Sandra, M. G., Rafael, R. A., Carlos, S., aline, C. and Miciel. (2010). Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis. Chemical Engineering Transaction,20(0), 321-326.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology 83, 1-11.

Um, B.-H., Karim. and M. N., Henk, L. (2003). Effect of Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. In B. Davison, J. Lee, M.Finkelstein and J. McMillan (Eds.), Biotechnology for Fuels and Chemicals (pp. 115-125).Humana Press.

Vasconcelos, S. M., Santos, A. M. P., Rocha, G. J. M., and Souto-Maior, A. M. (2013). Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. Bioresource Technology, 135(0), 46-52.

Volynets, B. & Dahman, Y. (2011). Assessment of pretreatments and enzymatic hydrolysis of wheat straw as a sugar source for bioprocess industry. International Journal of Energy and Environment 2, 427-446.

Wyman, C.E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. Bioresource Technology 96, 1959-1966 (2005).

Xu, J. and Cheng, J.J. (2011). Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. Bioresource Technology 102, 3861-3868.

Zhang, J., Zhang, B., Zhang, J., Lin, L., Liu, S. and Ouyang, P. (2010). Effect of phosphoric acid pretreatment on enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. Biotechnology Advances, 28(5), 613-619.

Zhang, J., Zhang, J., Lin, L., Chen, T., Zhang, J., Liu, S. and Ouyang, P. (2009). Dissolution of Microcrystalline Cellulose in Phosphoric Acid-Molecular Changes and Kinetics Molecules. 14(12), 5027-5041.