



FEAT JOURNAL

FARM ENGINEERING AND AUTOMATION TECHNOLOGY JOURNAL

วารสารวิศวกรรมฟาร์มและเทคโนโลยีการควบคุมอัตโนมัติ

การเปรียบเทียบตัวเร่งปฏิกิริยากรดในการปรับสภาพต้นข้าวโพด เพื่อพัฒนาการย่อย เซลลูโลสโดยเอนไซม์ในการผลิตไบโอเอทานอล

Comparison of catalytic acid pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of
cellulose in corn stover to bioethanol

ปรานปรียา อุปจักร¹⁾ ต่อบงศ์ กรีธาชาติ²⁾ และ ศักดิ์สิทธิ์ อิมแมน^{2)*}

Pranpreeya Upajak¹ Torpong Kreetachat and Saksit Imman^{1*}

¹⁾ นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง
จังหวัดพะเยา 56000

²⁾ อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง
จังหวัดพะเยา 56000

¹⁾ Master Student in Environmental Engineering, School of Energy and Environment, University of Phayao, Tambon
Maeka, Amphur Muang Phayao 56000, Thailand.

²⁾ Lecturer in Environmental Engineering, School of Energy and Environment, University of Phayao, Tambon Maeka,
Amphur Muang Phayao 56000, Thailand.

Received: 29 June 2020

Revised: 11 October 2021

Accepted: 12 October 2021

Available online: 24 December 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาตัวเร่งปฏิกิริยากรดที่แตกต่างกัน ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิก หาสภาวะที่เหมาะสมของตัวเร่งปฏิกิริยากรดในการปรับสภาพต้นข้าวโพด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์ สู่การผลิตไบโอเอทานอล ด้วยวิธีออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) โดยโปรแกรม Design-Expert 10.0.1 วางแผนการทดลองด้วยวิธี Central Composite ซึ่งประกอบด้วยปัจจัยหลัก 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นกรด (0.05, 0.1 และ 0.15 โมลาร์) เวลาในการทำปฏิกิริยา (15, 30 และ 45 นาที) และอุณหภูมิ (90, 120, 150, 180 และ 210 องศาเซลเซียส) ต้นข้าวโพดหลังผ่านการปรับสภาพจะ

นำมาวิเคราะห์ทางกายภาพ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM), ความเป็นผลึกด้วยเทคนิค (XRD), สมบัติรูพรุน (BET) และ หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค (FTIR) หลังจากทำการปรับสภาพแล้วนำไปย่อยด้วย เอนไซม์ เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคส (Glucose yield) เพื่อการผลิตไบโอเอทานอล ผล การศึกษา พบว่า การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพต้นข้าวโพด สภาวะที่เหมาะสมที่สุดนั้นมุ่งเน้นไปที่การผลิตน้ำตาล กลูโคสสูงสุดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ และเกิดสารยับยั้งในของเหลวหลังจากปรับสภาพต่ำ สภาวะที่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตกลูโคส 91.34% จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของต้นข้าวโพดและการละลายของเฮมิ เซลลูโลส 99.39% เกิดสารยับยั้งในกระบวนการปรับสภาพต่ำ

คำสำคัญ: ต้นข้าวโพด การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด การย่อยด้วยเอนไซม์ ตัวเร่งปฏิกิริยากรด

Abstract

The Central Composite based Response Surface Methodology (RSM) (Design-Expert 10.0.1) was used to optimize acid catalyzed pretreatment of corn stover. The experimental of pretreatment was conducted under the acid concentration of 0.05 - 0.15 M using sulfuric acid, formic acid and phosphoric acid as homogeneous promoters. The reaction time of 15 - 45 min were selected. The reaction temperature of 90 - 210°C was selected all the works. After pretreatment, enzymatic hydrolysis was also hydrolyzed the pretreated solid to evaluate the optimal pretreatment conditions for maximizing sugar production. The results showed that pretreatment with 0.1M sulfuric acid at 180°C for 30 min was found to be the optimal condition for pretreatment of corn stover. The optimal condition was focused on the highest sugar production from enzymatic hydrolysis with low inhibitory by-product detected in the aqueous phase after pretreatment. The optimum condition showed 88.93% reducing sugar and 89.26 glucose yield from enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover. Hemicellulose solubilization of 85.08% was removed under the optimal condition. Scanning electron microscopy revealed disruption of the intact biomass structure allowing increasing enzyme's accessibility to the cellulose microfibrils which showed higher crystallinity index compared to the native biomass as shown by x-ray diffraction with a marked increase in surface area as revealed by BET measurement. The work provides an insight into effects of acid pretreatment on modification of physicochemical properties of corn stover and an efficient approach for its processing in biorefinery industry.

Keywords: Corn stover: Acid pretreatment: Enzymatic hydrolysis: Homogeneous catalyst

*ติดต่อ: saksit.im@up.ac.th, เบอร์โทร: 054-466666 ต่อ 3405, เบอร์โทรสาร: 054-466704

1. บทนำ

เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญและเป็นแหล่งพลังงานหลักทั่วโลก การเพิ่มขึ้นของประชากร และอุตสาหกรรมที่เติบโตอย่างรวดเร็ว เป็นสาเหตุของความต้องการพลังงานที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลที่สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม โดยการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของภาวะโลกร้อน ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการเติบโตทางด้านเศรษฐกิจ อุตสาหกรรมและการขนส่ง ส่งผลมีความต้องการการใช้น้ำมันในปริมาณที่สูงขึ้น โดยเฉพาะภาคการขนส่ง มีการใช้น้ำมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.9 เมื่อเปรียบเทียบกับปี 2562 [1] ดังนั้นการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากชีวมวลมาใช้เป็นพลังงานทดแทนในระบบขนส่ง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้น้ำมันฟอสซิล ลดปริมาณก๊าซ CO_2 ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจกในบรรยากาศ และเป็นสาเหตุของการเกิดปัญหาภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน [2]

ในปัจจุบันไบโอเอทานอลถือเป็นทางเลือกที่สะอาดและสามารถผลิตได้จากชีวมวลหลายประเภท โดยเฉพาะวัตถุดิบประเภท Lignocellulose เช่น เศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร (ต้นข้าวโพด ฟางข้าว อ้อย ชานอ้อย ฯลฯ) เศษซากไม้ (เศษไม้ ขี้เลื่อย ใบไม้ จากป่า) และขยะชุมชน ดังนั้น การใช้ชีวมวลเหล่านี้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอล ถือเป็นทางเลือกในการผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทย และหากสามารถพัฒนาองค์ความรู้ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนวัตถุดิบเหล่านี้เป็นไบโอเอทานอล จะสามารถช่วยประเทศชาติในการลดอัตราการนำเข้าเชื้อเพลิงรวมทั้ง

ลดปัญหามลพิษทางอากาศจากการเผาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร การเปลี่ยนชีวมวลเป็นไบโอเอทานอลต้องผ่านขั้นตอนดังนี้ (1) การลดขนาดเชิงกล (2) ปรับสภาพ (3) การย่อยด้วยเอนไซม์ (4) การหมักและ (5) การกลั่น กระบวนการปรับสภาพชีวมวลนั้นมุ่งเน้นการสลายโครงสร้างที่เป็นผลึกของชีวมวล สลายเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เพื่อให้เอนไซม์เข้าไปทำลายเส้นใยเซลลูโลส และย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นน้ำตาลกลูโคสจะถูกนำไปหมักเป็นไบโอเอทานอล ในขั้นตอนการปรับสภาพหรือการย่อยด้วยเอนไซม์จะต้องได้เซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูง และมีสารยับยั้งต่ำ

วัตถุประสงค์งานวิจัยนี้ คือการนำต้นข้าวโพดมาผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดต่างชนิดกัน เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของการแยกองค์ประกอบต้นข้าวโพด เพื่อให้ได้เซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูง ปริมาณสารยับยั้งต่ำ เพื่อเพิ่มการผลิตน้ำตาลกลูโคสให้ได้มากที่สุด

2. วิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมตัวอย่าง

วัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลในการศึกษานี้ คือ ต้นข้าวโพด จากเกษตรกรหมู่บ้านผาคับ อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน โดยนำต้นข้าวโพดมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้อบลมร้อนและบดให้มีขนาดอนุภาคประมาณ 1-2 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่องบดชีวมวล (Retsch SM2000, Hann, Germany) แล้วนำมาแยกขนาดด้วยตะแกรงขนาด 1, 0.625 และ 0.25 มิลลิเมตร แล้วนำไปทางองค์ประกอบทางเคมี

ตามมาตรฐาน NREL [3] ต้นข้าวโพดที่นำมาทดลองมี เซลลูโลส 31.62% เฮมิเซลลูโลส 28.75% ลิกนิน 18.44% และ เถ้า 2.45%

2.2. การหาค่าประกอบต้นข้าวโพด

2.2.1 เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

วิเคราะห์หาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคส ไสโลสและอาราบินอส) ในส่วนที่เป็นของเหลวหลังการปรับสภาพ ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ในขั้นตอนแรกนำส่วนที่เป็นของเหลวมาทำให้เป็นกลางด้วย CaCO_3 และกรองโดยใช้ไซริงค์ฟิลเตอร์สำหรับ HPLC ขนาด 0.2 ไมครอนเมตร วิเคราะห์ HPLC (LDC Model 4100, Shimadzu, Kyoto, Japan) โดยใช้ คอลัมน์ Aminex HPX-87 H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) และ 5 mM H_2SO_4 เป็นโมบายเฟส อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที มาตรฐานน้ำตาลใช้กลูโคส ไสโลส และอะราบินอสเป็นมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC [4]

2.2.2 ลิกนิน

หาค่าประกอบและปริมาณลิกนินที่ละลายน้ำและลิกนินที่ไม่ละลายน้ำ โดยวิธี Klason lignin ตามมาตรฐานวิธีการวิเคราะห์ของ NREL [3]

2.3 การปรับสภาพด้วยตัวทำละลายกรด

การปรับสภาพทำปฏิกิริยาใน Reactor ขนาด 600 มิลลิลิตร (Parr Reactor 4560, Parr instrument, Moline, IL, USA) อัตราส่วนต้นข้าวโพด 1 กรัม ต่อกรด 15 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นกรด 0.05, 0.1 และ 0.15 โมลาร์ (M) ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 15, 30 และ 45 นาที และอุณหภูมิ 90, 120, 150, 180 และ 210 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดซัลฟิวริก กรดฟอสฟอริก และกรดฟอสฟอริก และอัดก๊าซไนโตรเจนเข้าไปใน

เครื่องปฏิกรณ์ ปรับความดันเริ่มต้นที่ 20 บาร์ กวนที่ 100 รอบต่อนาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman หมายเลข 4) ส่วนที่เป็นของแข็งนำไปอบแห้งอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นเพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป ส่วนของเหลวถูกเก็บรวบรวมเพื่อการวิเคราะห์หาน้ำตาลและสารยับยั้ง โดยเครื่อง HPLC

2.4 การย่อยด้วยเอนไซม์

ศึกษาความสามารถในการย่อยได้ของเอนไซม์ หลังการปรับสภาพของต้นข้าวโพดโดยใช้เอนไซม์ เซลลูเลส (Cellic Ctec2) เพื่อศึกษาการผลิตน้ำตาล กลูโคสจากการย่อยด้วยเอนไซม์ในปฏิกิริยาการย่อย ด้วยเอนไซม์มีปริมาตรรวม 1 มล. ประกอบด้วย ต้นข้าวโพดผ่านการปรับสภาพ 5% (w/v) เอนไซม์ Cellic Ctec2 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, เดนมาร์ก) 25 FPU/g โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (Sodium citrate buffer) 50 mM และโซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) 1% บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หมุน 30 รอบต่อนาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้วิธีการ 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) [5] วิเคราะห์ปริมาณของ น้ำตาลที่ได้หลังการย่อยด้วยเอนไซม์โดยเครื่อง HOLC (รุ่น LDC 4100, Shimadzu, Kyoto, Japan) คอลัมน์ Aminex HPX-87 H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใช้กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) 5 mM เป็นโมบายเฟส ที่อัตราการไหล 0.5 mL/min ปริมาณกลูโคส คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของกลูโคสจากการย่อยด้วยเอนไซม์จากเซลลูโลสที่มี

อยู่ในต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ (0.9 เป็นปัจจัยการแปลงกลุโคสเป็นเซลลูโลสเทียบเท่า) (สมการที่ 1)

$$\text{ปริมาณกลุโคส (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักกลุโคส} \times 0.9}{\text{น้ำหนักเซลลูโลส}} \times 100 \quad (1)$$

2.5 การวิเคราะห์ทางกายภาพของต้นข้าวโพดหลังปรับสภาพ

2.5.1 Scanning electron microscopy (SEM)

วิเคราะห์เส้นใยต้นข้าวโพดก่อนและหลังปรับสภาพ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) JSM-6301F (JSM-6301F, JEOL ญี่ปุ่น) ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะนำไปเคลือบด้วยทองเพื่อให้เห็นพื้นผิวได้ชัดเจนขึ้น ในการส่องวิเคราะห์ใช้ลำแสงอิเล็กตรอนขนาด 20 kV

2.5.2 X-ray diffraction (XRD)

วิเคราะห์ค่าความเป็นผลึกของต้นข้าวโพดก่อนและหลังปรับสภาพโดยวิธี X-ray diffraction (XRD) โดยใช้เครื่อง X'Pert PRO diffractometer (PANalytical, Almelo, The Netherlands) ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะสแกนในช่วง $2\theta = 10^\circ - 30^\circ$ ด้วยขนาด 0.02° ที่ 500 kV และ 30 mA คำนวณค่าความเป็นผลึกตามสมการ 2 [6]

$$\text{CrI (\%)} = \left(\frac{I_{002} - I_{\text{amorphous}}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad (2)$$

ที่ I_{002} คือความเข้มกระจุกกระจายที่จุดสูงสุดของเซลลูโลส ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่รอบๆ ที่ $002 = 22.4$ และ $I_{\text{amorphous}}$ คือความเข้มที่กระจุกกระจายของส่วนสัณฐานที่ประเมินว่าการเลี้ยวเบนความเข้มต่ำสุด

ระหว่างระนาบหลักและระนาบรอง (ระนาบ 001 และ 002) ที่ $2\theta = 18.0$

2.5.3 Fourier transform Infrared (FTIR)

วิเคราะห์หาพันธะเคมีหรือหมู่ฟังก์ชันโมเลกุลของเซลลูโลสในต้นข้าวโพดก่อนและหลังปรับสภาพโดยวิธี FT-IR ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer System 2000 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr pellet ตั้งค่าความละเอียดการวัดไว้ที่ 4 cm^{-1} ความเร็ว 0.6329 cm/s ช่วงสเปกตรัมอินฟราเรด $4,000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ นำกราฟที่ได้ไปเปรียบเทียบกับที่ได้กราฟกับมาตรฐานเซลลูโลส

2.5.4 สมบัติรูพรุน (BET)

วิเคราะห์หาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน (Pore size diameter) พื้นที่ผิวของผงตัวอย่าง (Surface area) ปริมาตรของรูพรุน (Pore volume) ของต้นข้าวโพดก่อนและหลังปรับสภาพโดยใช้วิธีการของ Brunauer-Emmett และ Teller (BET) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์หาค่าพื้นที่ผิว (Surface area) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยอาศัยเทคนิคการแทนที่พื้นที่ผิวหรือรูพรุนด้วยแก๊สไนโตรเจน (TriStar II 3020, Micromeritics Co., USA)

2.6 การหมักเอทานอล โดยวิธี Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

การหมักแบบ SSF ดำเนินการในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร (Biostat® b2, B. Braun (Thailand), Bangkok, Thailand) โดยในการหมักมีปริมาตรรวม 1.2 ลิตร ซึ่งในการหมักประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต $5 \text{ g/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) 0.025 \text{ g/L}$, สารสกัดจากยีสต์ 1.0 g/L , pH 4.8 และ ต้นข้าวโพด

ที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะที่เหมาะสม 6.25% (w/v) นำไปหนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ทำการฟรีการย่อยด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2 ความเข้มข้น 25 FPU / g บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส รอบการกวน 500 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ซีดเชื้อยีสต์ปริมาตร 10% (v/v) ผสมลงในการย่อย Cellic Ctec2 ส่วนผสมการหมักจะบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสควบคุมค่า pH ให้อยู่ที่ 4.8 โดย กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) และ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ทำการหมักระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยกวนผสมอย่างต่อเนื่องที่ 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมัก ปริมาณกลูโคส และไซโลส โดยเครื่อง HPLC คอลัมน์ Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

3.1 องค์ประกอบของต้นข้าวโพด

ส่วนประกอบของต้นข้าวโพดที่ใช้ในการศึกษานี้พบว่า มีเซลลูโลส $31.62\% \pm 0.53\%$, เฮมิเซลลูโลส $28.75 \pm 0.48\%$ ลิกนิน $18.44\% \pm 0.62\%$ เถ้า $2.45 \pm 0.38\%$ และ สารอื่นๆ $18.74 \pm 0.25\%$ คาร์โบไฮเดรต มีสัดส่วนประมาณ 60.37% (ในรูปของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส) เฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยไซโลสประมาณ 95% และอะราบินอสประมาณ 5%

ตารางที่ 1 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Central composite เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยกรดซัลฟูริก

Run No.	ความเข้มข้นกรด (M)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (min)	Glucose yield (%)
1	0.05	90	15	49.81
2	0.1	150	30	86.05
3	0.15	90	45	53.03
4	0.15	150	30	81.15
5	0.05	210	15	75.57
6	0.15	210	15	75.97
7	0.05	210	45	73.18
8	0.1	90	30	59.53
9	0.1	210	30	79.17
10	0.1	150	30	86.05
11	0.15	90	15	55.79
12	0.05	150	30	79.19
13	0.1	150	45	83.93
14	0.1	150	30	86.05
15	0.1	150	30	86.05

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก

การปรับสภาพเป็นหนึ่งในขั้นตอนสำคัญในกระบวนการเปลี่ยนวัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นไบโอเอทานอล แต่เนื่องจากในกระบวนการมีค่าใช้จ่ายสูงและสิ้นเปลืองพลังงาน [7] การศึกษาจำนวนมากได้เน้นถึงความสำคัญของการพัฒนากระบวนการประหยัดพลังงาน โดยใช้สารเคมีในปริมาณที่น้อย อุณหภูมิต่ำ หรือระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยลง ในการปรับสภาพสารละลายกรดเจือทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะ glycosidic ซึ่งส่งผลให้เกิดการแยกส่วนของเซลลูโลสและการแตกของเฮมิเซลลูโลส [8] เป้าหมายหลักของการปรับสภาพคือลดความเป็นผลึก

ของชีวมวล และเพิ่มการย่อยได้ของเอนไซม์ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนากระบวนการปรับสภาพ ไม่เพียงแต่การแตกของเฮมิเซลลูโลสและการกำจัด ลิกนินเท่านั้น แต่ยังรวมถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นใน กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วย [7] ในการศึกษา นี้ ได้นำวิธีแบบพื้นผิวตอบสนอง หรือ RSM โดย โปรแกรม Design-Expert 10.0.1 มาใช้เพื่อออกแบบ การทดลอง ปรับพารามิเตอร์ที่สำคัญ เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของกรด และระยะเวลาทำปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ปริมาณกลูโคสสูงสุดหลังจากการย่อยด้วย เอนไซม์ การออกแบบการทดลองแสดงในตารางที่ 1 การทดลองปรับสภาพจากการออกแบบด้วยโปรแกรม ได้ 15 การทดลอง ส่วนประกอบของน้ำตาลและ สารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในส่วนที่เป็นของเหลว

และอัตราการลดลงของของแข็งหลังปรับสภาพ แสดง ในตารางที่ 2 สารประกอบอื่นๆ ที่ระบุไว้ในตารางที่ 2 หมายถึงสารยับยั้งและสารประกอบอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นใน ขั้นตอนการปรับสภาพ

ในการปรับสภาพมีความเข้มข้นของไซโลสสูงสุด 2.02 กรัมต่อลิตร และอะราบินอสสูงสุด 0.11 กรัมต่อ ลิตร ที่ความเข้มข้นกรดซัลฟูริก 0.05% M ระยะเวลา 45 นาที อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรด อุณหภูมิ และระยะเวลาใน การปรับสภาพ เพิ่มปัจจัยเหล่านี้ ยังเกิดสารยับยั้งมาก ขึ้น ความเข้มข้นของกรดมีผลต่ออัตราการละลายเฮมิ เซลลูโลสออกจากต้นข้าวโพดและอัตราการลดลงของ ของแข็งหลังปรับสภาพอย่างมาก

ตารางที่ 2 องค์ประกอบที่เป็นของแข็งและของเหลวหลังจากปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกของต้นข้าวโพด

Run No.	Liquid phase (hydrolysate)								Solid phase ^a		
	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Arabinose (g/L)	Acetic acid (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Formic acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	Cellulose (g)	Hemicellulose (g)	%pulp
1	0.15	0.30	0.02	0.10	0.01	0.00	0.00	0.00	29.55	24.36	87.98
2	0.22	1.27	0.07	0.83	0.36	0.01	0.11	0.03	28.56	10.59	70.19
3	0.19	0.61	0.03	0.12	0.07	0.00	0.00	0.00	28.96	19.98	81.57
4	0.25	1.42	0.07	0.23	0.05	0.00	0.03	0.01	28.22	8.52	67.31
5	0.27	1.79	0.09	0.74	0.36	0.03	0.10	0.03	27.95	3.16	60.18
6	0.38	0.36	0.02	0.88	0.46	0.05	0.09	0.03	26.53	0	50.39
7	0.32	2.02	0.11	1.55	1.26	0.14	0.16	0.03	27.31	0	51.47
8	0.16	0.42	0.02	1.85	0.88	0.06	0.13	0.03	29.35	22.74	85.62
9	0.32	2.00	0.11	1.01	0.71	0.07	0.10	0.04	27.24	0.16	52.41
10	0.22	1.27	0.07	0.83	0.36	0.01	0.11	0.03	28.56	10.59	70.19
11	0.16	0.46	0.02	1.28	0.68	0.06	0.08	0.01	29.38	22.12	85.08
12	0.21	0.72	0.04	1.53	0.66	0.05	0.16	0.03	28.73	18.48	79.88
13	0.28	1.43	0.08	0.07	0.10	0.00	0.05	0.02	27.74	8.38	64.79
14	0.21	0.72	0.04	0.83	0.36	0.01	0.11	0.03	28.73	18.48	79.88
15	0.21	0.72	0.04	0.83	0.36	0.01	0.11	0.03	28.73	18.48	79.88

เมื่อความเข้มข้นกรดเพิ่มขึ้นจาก 0.05 M เป็น 0.15 M ทำการปรับสภาพที่ระยะเวลาทำปฏิกิริยา 30 นาที อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ทำให้อัตราการผลิตของของแข็งหลังปรับสภาพเพิ่มขึ้นจาก 33.51% เป็น 42.48% แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของกรดที่สูงขึ้น อาจทำลายโครงสร้างของต้นข้าวโพด ลดความเป็นผลึก และมีการย่อยน้ำตาลให้เป็นสารประกอบอื่นๆ หรือสลายยับยั้งในการปรับสภาพด้วยกรด [9]

ค่าออกแบบการทดลองที่ได้จากโปรแกรม Design-Expert สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ค่า ANOVA สำหรับพื้นผิวตอบสนองรูปแบบสมการกำลังสอง ดังแสดงในตารางที่ 3 รูปแบบจำลองที่ใช้ในการอธิบายผลการทดลองจะขึ้นอยู่กับผลกระทบของทั้งสามปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของกรด ระยะเวลาในการปรับสภาพ และอุณหภูมิ พารามิเตอร์สำหรับความสัมพันธ์และปัจจัยกำลังสอง (สมการที่ 3) ค่าสัมประสิทธิ์ R^2 สำหรับ Glucose yield ที่ได้เป็น 0.9960 ส่วนค่า R^2 ที่ได้จากการออกแบบการทดลอง 0.9713 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า R^2 จากผลการทดลองคือ 0.9923

สมการกำลังสองของปัจจัยทั้งสาม ที่เกิดได้จากการออกแบบการทดลองสามารถใช้ในการคาดการณ์เกี่ยวกับการตอบสนองสำหรับระดับที่กำหนดของแต่ละปัจจัย สมการสุดท้ายจากปัจจัยทั้งสามดังแสดงในสมการที่ 3

Glucose yield (%) =

$$\begin{aligned} & - 84.06 + 528.80A + 1.57B \\ & + 0.8620C - 0.4996AB \\ & - 0.5650AC + 1.20BC \\ & - 1981.27 A^2 - 4.38 B^2 - 9.77 C^2 \end{aligned} \quad (3)$$

โดยที่ A คือ ความเข้มข้นของกรด
B คือ อุณหภูมิ
C คือ ระยะเวลาในการปรับสภาพ

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ตารางความแปรปรวนสำหรับรูปแบบสมการกำลังสองของการตอบสนองพื้นผิว

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	3240.65	9	360.07	273.76	0.0000
A-Con	2.84	1	2.84	2.16	0.1724
B-Temp	1058.22	1	1058.22	804.56	0.0000
C-Time	8.32	1	8.32	6.32	0.0307
AB	17.97	1	17.97	13.66	0.0041
AC	11.02	1	11.02	8.38	0.0160
BC	9.35	1	9.35	7.11	0.0236
A ²	67.47	1	67.47	51.30	0.0000
B ²	684.18	1	684.18	520.18	0.0000
C ²	13.29	1	13.29	10.10	0.0098
Residual	13.15	10	1.32		
Cor Total	3253.80	14			

Std. Dev. = 1.15 PRESS = 93.27 Mean = 74.22

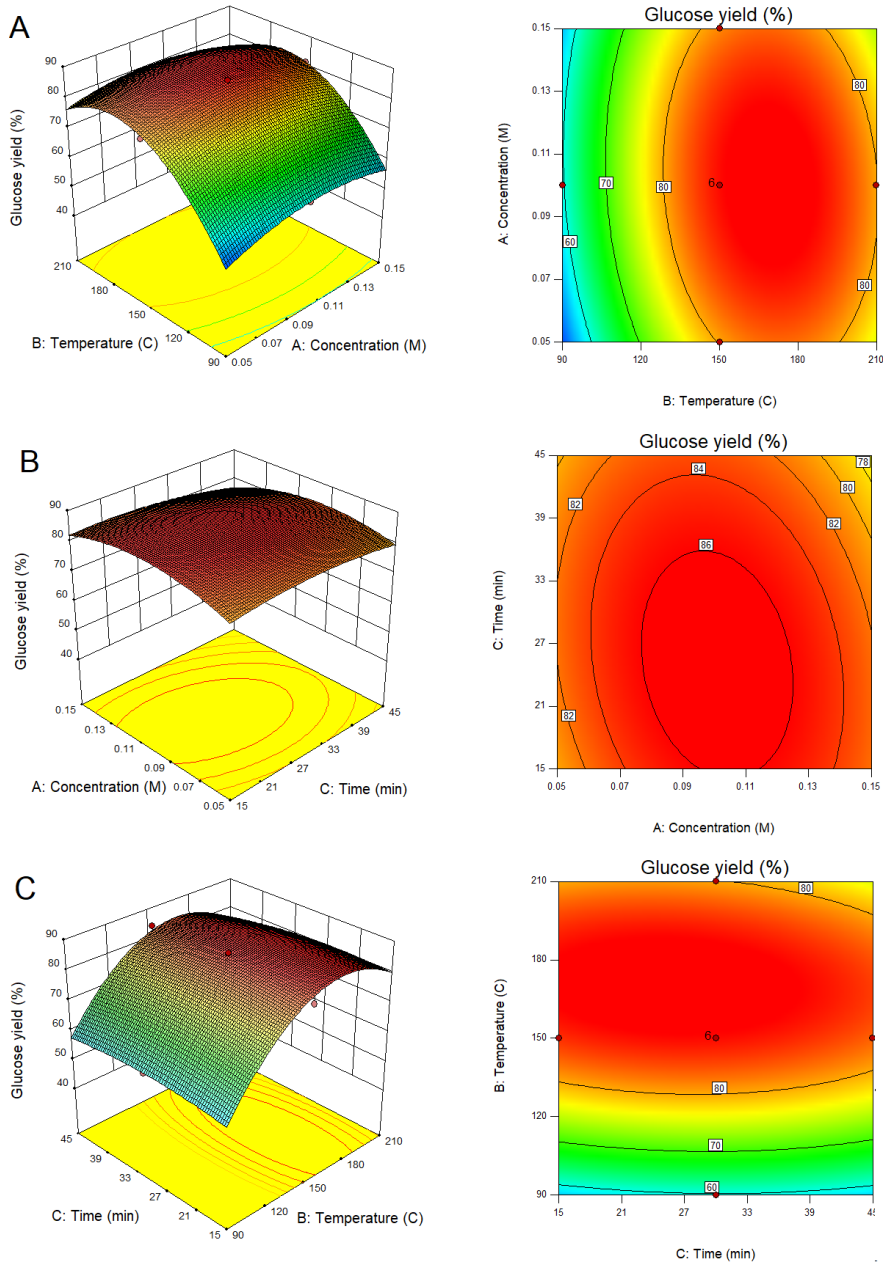
R-Sq = 99.60% R-Sq(pred) = 97.13%

R-Sq(adj) = 99.23%

โดยปกติแล้ว อัตราส่วนความแปรปรวน ค่า F-value จะมีค่าที่สูง การคาดการณ์ผลการทดลองจะมีนัยสำคัญ และค่า p-value ที่มากกว่า 0.05 หรือ $p < 0.05$ บ่งชี้ว่าเงื่อนไขของแบบจำลองมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นกว่า 95% หรือปัจจัยนั้นๆ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทดลอง ในการออกแบบการทดลอง ตารางที่ 3 ค่า F-value ในการทดลองมีค่าเท่ากับ 273.76 หมายถึง แบบจำลองเป็นไปอย่างมีนัยสำคัญ ค่า p-value ของความเข้มข้นของกรด ซึ่งมีค่า 0.1724 แสดงว่าปัจจัยความเข้มข้นกรดมีผลต่อการเพิ่มขึ้น หรือลดลงของการผลิตน้ำตาล ในการทดลองนี้

รูปที่ 1 แสดงพื้นผิวการตอบสนองสามมิติแสดง ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ในการปรับสภาพ ต้นข้าวโพดเพื่อใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของ

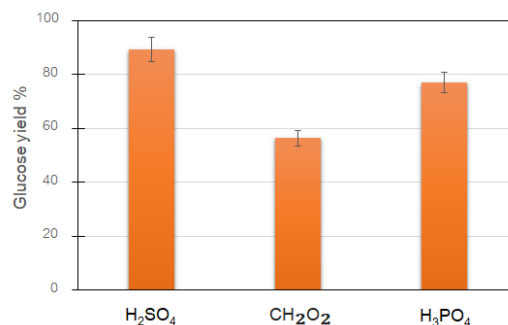
การปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยกรดซัลฟูริก มีผลต่อ ปฏิกริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อการผลิตกลูโคส (Glucose yield %) ของแต่ละปัจจัย



รูปที่ 1 พื้นผิวการตอบสนองสามมิติ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก อุณหภูมิ และเวลาที่มีผลต่อ Glucose yield; A ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นกรด ที่เวลา 30 นาที, B ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรด และเวลา ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส, C ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและอุณหภูมิ ที่ความเข้มข้นกรด 0.1 M

เพื่อให้ได้การตอบสนองสูงสุด ในรูปที่ 1A ที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟริกต่ำ (0.25 M) และอุณหภูมิต่ำ (90 องศาเซลเซียส) Glucose yield จากการย่อยด้วยเอนไซม์อยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดซัลฟริกเป็น 0.05 M เวลา 30 นาที และอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ได้ Glucose yield จากการย่อยด้วยเอนไซม์สูงถึง 89.26% การเพิ่มความเข้มข้นกรดอุณหภูมิ และระยะเวลาในการปรับสภาพ สามารถเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ [8] การเพิ่มความเข้มข้นกรดซัลฟริกจาก 0.25 เป็น 0.50 M ที่ระยะเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ทำให้ Glucose yield เพิ่มขึ้นจาก 79.19% เป็น 84.61% ของปริมาณกลูโคสตามทฤษฎี [8,10] แต่เมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นจาก 0.50 เป็น 0.75 M ทำให้ปริมาณกลูโคสลดลง อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของกรดสูงเกินไป และอุณหภูมิสูงส่งผลให้ปริมาณของแข็ง (solid recovery) ลดลง และน้ำตาลเปลี่ยนรูปเกิดเป็นสารยับยั้งได้ [10,11] รูปที่ 1B อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาในการปรับสภาพ เพื่อการผลิตกลูโคสจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ที่อุณหภูมิต่ำ (90 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาในการปรับสภาพต่ำ (15 นาที) การผลิตน้ำตาลกลูโคสอยู่ในระดับต่ำ (Glucose yield 49.81% - 55.79%) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงสุด (210 องศาเซลเซียส) และเวลาการปรับสภาพนาน (45 นาที) การผลิตน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยด้วยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น (69.39% - 76.72%) รูปที่ 1C อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและเวลาในการปรับสภาพ เพื่อการผลิตกลูโคสจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 0.50 M อุณหภูมิ 180 องศา

เซลเซียส และทุกช่วงเวลา (15-45 นาที) การผลิตกลูโคสอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูง (Glucose yield 77.14% - 89.26%)



รูปที่ 2 Glucose yield จากการปรับสภาพด้วยกรดของต้นข้าวโพดที่ความเข้มข้นกรด 0.1 M อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที

3.3 ผลของตัวเร่งปฏิกิริยากรดปฏิกิริยากรด H₂SO₄, CH₂O₂ และ H₃PO₄ ต่อการปรับสภาพต้นข้าวโพด

เพื่อหาตัวเร่งปฏิกิริยากรดที่ดีที่สุดของกรด ทั้ง 3 ชนิด จากสภาวะที่เหมาะสมของกรดซัลฟริก ที่ความเข้มข้นกรด 0.50 M อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 30 นาที มาเปรียบเทียบกับกรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิก ในการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยด้วยเอนไซม์ จากรูปที่ 2 จะเห็นได้ชัดว่า กรดซัลฟริกสามารถผลิตกลูโคสได้สูงกว่ากรดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ในความเข้มข้นของกรด ระยะเวลา และอุณหภูมิเดียวกัน ได้ Glucose yield 89.26% และ Glucose yield ของกรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิก ได้ 76.93% และ 56.31% ตามลำดับ

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยกรดฟอสฟอริกและกรดฟอร์มิก ได้กลูโคสจากการย่อยด้วยเอนไซม์ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟริกที่สภาวะเดียวกัน หากมี

การศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของสภาวะอื่น ๆ ในการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกและกรดฟอร์มิก อาจได้ Glucose yield ที่ใกล้เคียงกันที่สภาวะที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามอาจเป็นเพราะในการปรับสภาพและการย่อยด้วยเอนไซม์ ของกรดฟอสฟอริกและกรดฟอร์มิก เกิดสารยับยั้งค่อนข้างสูง จึงทำให้มีการผลิตกลูโคสได้น้อย [12,13] ในงานวิจัยต่าง ๆ เกี่ยวกับการปรับสภาพชีวมวลประเภท ลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด สามารถเกิดการก่อตัวของสารยับยั้ง เช่น เฟอรัลฟูรัล (furfural) สาร HMF (5-hydroxymethyl-2-furaldehyde) และสารประกอบอื่น ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพการเกิดสารยับยั้งเหล่านี้สามารถทำให้ปริมาณกลูโคสต่ำลง [14]

3.4 ลักษณะทางกายภาพของต้นข้าวโพดก่อนและหลังปรับสภาพ

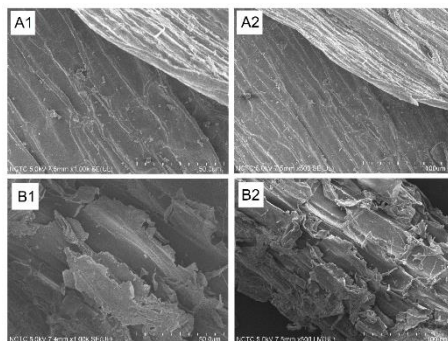
3.4.1 การวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของต้นข้าวโพด (Scanning electron microscopy)

การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะพื้นผิวของต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเทียบกับต้นข้าวโพดที่ไม่ได้ปรับสภาพ

ดังแสดงในรูปที่ 3 ในรูปที่ 3A ลักษณะพื้นผิวของต้นข้าวโพดที่ไม่ได้ปรับสภาพมีโครงสร้างเส้นใยเซลลูโลสที่มีความเป็นระเบียบ และพื้นผิวเรียบเนียน หลังจากการปรับสภาพด้วยกรด โครงสร้างมีลักษณะขรุขระ มีความพรุนและเส้นใย เปื่อยยุ่ยให้โครงสร้างภายในของต้นข้าวโพด จึงแสดงให้เห็นว่ากระบวนการปรับสภาพส่งผลให้มีการกำจัดเส้นใยภายนอก ซึ่งจะเพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อให้เซลลูโลสเข้าถึงเอนไซม์ได้มากขึ้น การเพิ่มพื้นที่ผิวและปริมาตรของรูพรุนในต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว สามารถเพิ่มการผลิตกลูโคสในระหว่างการย่อยด้วยเอนไซม์ [15]

3.4.2 วิเคราะห์ความเป็นผลึก (XRD analysis)

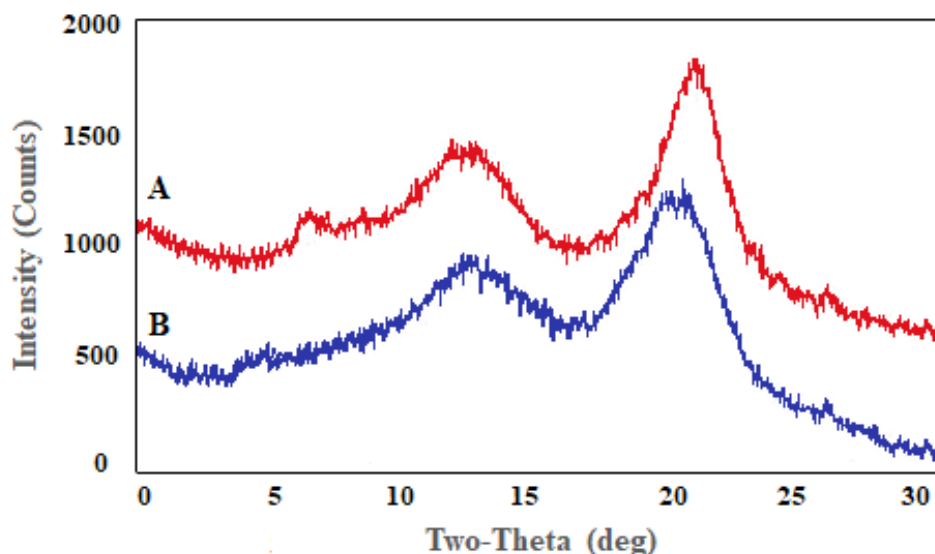
X-ray diffraction (XRD) หรือการวิเคราะห์ความเป็นผลึก เป็นหนึ่งในวิธีที่สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงความเป็นผลึกของเซลลูโลส [16] ต้นข้าวโพดผ่านการปรับสภาพแล้ว มีความเป็นผลึกที่ต่ำลงเป็นคุณสมบัติสำคัญที่แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพมีผลต่อการย่อยได้ของเอนไซม์ [17]



รูปที่ 3 การวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของต้นข้าวโพด; A ต้นข้าวโพดที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ, B ต้นข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก 0.1 โมลาร์ อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที)

ในการศึกษานี้คุณสมบัติของต้นข้าวโพดหลังจากผ่านการปรับปรุงสภาพด้วยกรดในสภาวะที่เหมาะสม (กรดซัลฟูริก 0.5 M อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที) เมื่อเทียบกับต้นข้าวโพดที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงสภาพ ดังแสดงในรูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวโพดที่ไม่ผ่านการปรับปรุงสภาพนั้นมีความเป็นผลึกสูง (51.36%) หลังจากผ่านการปรับปรุงสภาพด้วยกรดค่าความเป็นผลึกของต้นข้าวโพดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 65.32% การลดลงของความเป็นผลึก

แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างเซลลูโลสหลังจากการปรับปรุงสภาพต้นข้าวโพดมีการเรียงเป็นระบบในโครงสร้างของเส้นใย และการลดลงของผลึกทำให้ความสามารถในการเข้าถึงพื้นผิวของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น [18] การเพิ่มขึ้นของค่า CrI นั้นสัมพันธ์กับการปรับปรุงสภาพด้วยกรดต่อการกำจัดส่วนที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous) ไส้แลนและ ลิกนิน ในการลดความเป็นผลึกของเส้นใยเซลลูโลส [19]

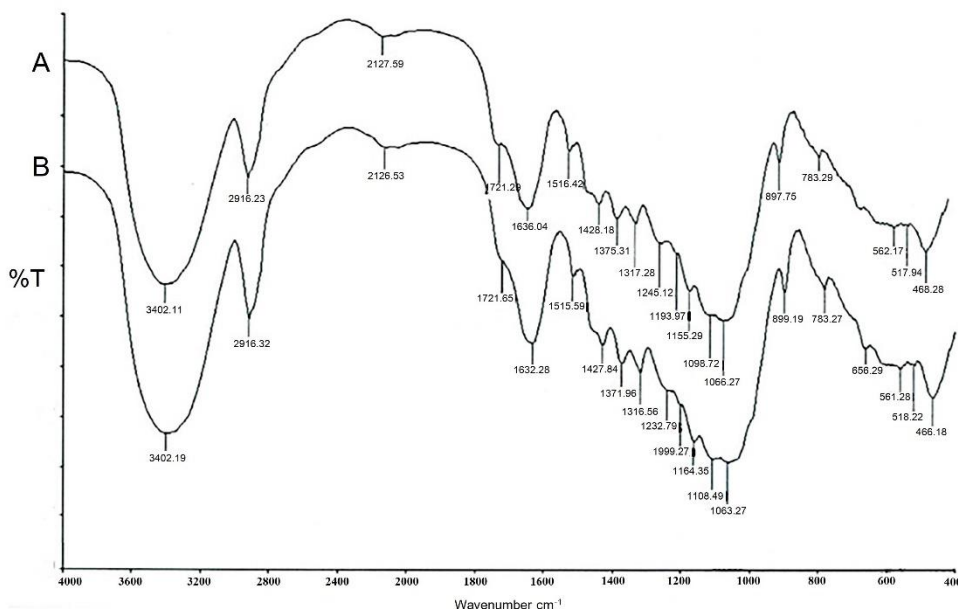


รูปที่ 4 การเลี้ยวเบนของรังสี X-ray ของต้นข้าวโพด; A ต้นข้าวโพดที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงสภาพ, B ต้นข้าวโพดที่ปรับปรุงสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (ความเข้มข้นกรดซัลฟูริก 0.1 โมลาร์ อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที)

3.4.3. วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันโมเลกุล ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

การวิเคราะห์ FTIR ของเซลลูโลสแสดงในรูปที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ $3402 - 897 \text{ cm}^{-1}$ นั้นสัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันเซลลูโลส ที่ความยาวคลื่น 3402 cm^{-1} คือ

การยืดออกของพันธะระหว่างอะตอม O-H ที่ 2916 cm^{-1} คือ การหดตัวระหว่างอะตอมของพันธะ C-H ที่จุด 1427 cm^{-1} คือ การแบบยืดออกแบบสมมาตรของพันธะ CH_2 ที่จุด 1371 cm^{-1} คือ การสั่นของพันธะภายในโมเลกุลแบบงอ (bending) ของพันธะ CH



รูปที่ 5 แสดง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ของต้นข้าวโพด; A ต้นข้าวโพดที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ, B ต้นข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (ความเข้มข้นกรดซัลฟูริก 0.1 โมลาร์ อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที)

ที่จุด 1316 cm^{-1} คือ พันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนไฮเดรตเปลี่ยนมุมพันธะลักษณะการสั่นแบบอของ CH_2 ที่จุด 1164 cm^{-1} คือ การยืดแบบไม่สมมาตร (asymmetrical stretching) ของพันธะระหว่างอะตอม C-O และความยาวคลื่นที่จุด 899 cm^{-1} สอดคล้องกับการเปลี่ยนรูปแบบของพันธะไกลโคซิดิก C₁-H การสั่นของพันธะภายในโมเลกุลแบบวงแหวน ซึ่งเป็นลักษณะพันธะการเชื่อมโยงของ β -glycosidic ระหว่างกลูโคสในเซลลูโลส

ในรูปที่ 5 ที่จุด $1,721\text{ cm}^{-1}$ ของต้นข้าวโพดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (A) เป็นผลมาจากกลุ่มคาร์บอนิลที่ไม่ละลายน้ำ (Unconjugated) ของเฮมิเซลลูโลส ที่จุด 1245 cm^{-1} เป็นสัญญาณการยืดออกพันธะ

ระหว่างอะตอม C-O ในเฮมิเซลลูโลสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งชี้ว่าเฮมิเซลลูโลสลดลง หรือถูกกำจัดออกไปหลังจากขั้นตอนของการปรับสภาพ นอกจากนี้ที่จุด 899 cm^{-1} แสดงให้เห็นถึงการลดลงของผลึกเซลลูโลสหลังจากการปรับสภาพ [20]

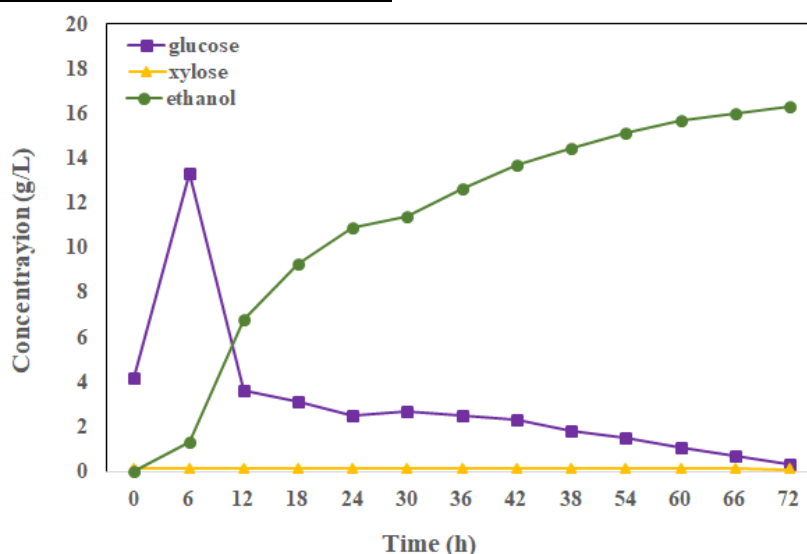
3.4.4 การวิเคราะห์ความพรุน (Porosity and surface analysis)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกมักจะมาพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ผิว ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการเข้าถึงเซลลูโลส [17] ในงานนี้ จะใช้วิธีของ Brunauer – Emmett Teller (BET) ในการวิเคราะห์หาพื้นที่ผิว และ pore volume ของต้นข้าวโพดทั้งก่อนและหลังการปรับสภาพพิจารณา

โดยใช้วิธีการดูดซับไนโตรเจน ค่าการคำนวณของพื้นที่ผิว และความพรุน ของต้นข้าวโพดทั้งก่อนและหลังการปรับสภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบต้นข้าวโพดก่อนและหลังปรับสภาพ ค่าของพื้นที่ผิวของต้นข้าวโพดหลังการปรับสภาพด้วยกรด พื้นที่ผิวเพิ่มขึ้นจาก 0.69 เป็น 13.39 cm²/g ซึ่งมากกว่า 20.19 เท่า และค่าความพรุนเพิ่มขึ้น 16.75 เท่า ดังนั้น ค่าความพรุนและพื้นที่ผิวชี้ให้เห็นว่าการปรับสภาพด้วยกรดนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิว และความพรุนของเส้นใย ส่งผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการเข้าถึงของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ [21, 22]

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบพื้นที่ผิวและความพรุนของต้นข้าวโพดก่อนและหลังปรับสภาพ

	Untreated	Acid Pretreatment
BET surface area (m ² /g)	0.69	13.93
BJH pore volume (cm ³ /g)	0.004	0.067



รูปที่ 6 การหมักกลูโคสเป็นเอทานอล ส่วนผสมการหมักประกอบด้วย ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด 6.7% w/v

3.4 การหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกสภาวะที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการปรับสภาพด้วยกรดของต้นข้าวโพดมาผลิตเอทานอลด้วยวิธีการหมักแบบ SSF ในการหมักปริมาณเริ่มต้นของต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 70 กรัมต่อลิตร เทียบเท่ากับกลูโคส 35 กรัมต่อลิตร ในการเริ่มการหมัก ต้นข้าวโพดจะนำไปทำการ pre-digested โดยเอนไซม์ Cellic Ctec2 จากนั้นจึงเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อทำการหมัก เปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอล

ในขั้นตอนการ pre-hydrolysis ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพจะถูกย่อยเป็นกลูโคสอย่างรวดเร็วโดยมีความเข้มข้นของกลูโคสสะสมเฉลี่ยสูงสุดที่ 13.36 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเอทานอลเฉลี่ยสูงสุดที่ 16.31 กรัมต่อลิตร

ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เทียบเท่ากับทฤษฎีการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลได้ 94% [23] ด้วยประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล 0.23 กรัม / ลิตร / ชั่วโมง (รูปที่ 6) ตอนท้ายของการหมักกลูโคสที่เหลือ 0.3 กรัมต่อลิตร

อย่างไรก็ตาม การหมักเพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงจากการหมักของชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ รวมทั้งลักษณะของชีวมวล วิธีการปรับปรุงภาพ เชื้อจุลินทรีย์หรือยีสต์ที่นำมาใช้ และพารามิเตอร์ทางกายภาพของกระบวนการหมัก

ในงานวิจัยที่ผ่านมาการหมักฟางข้าวที่ผ่านการปรับปรุงสภาพด้วยกรดและด่าง ได้เอทานอล 84.6% [24] และการหมักฟางข้าวโพดโดยปรับปรุงสภาพแบบ steam-pretreated ได้เอทานอล 72.4% [25] ในช่วงแรกของการหมักจะเกิดการสะสมของกลูโคสหรือมีกลูโคสในปริมาณที่สูง แต่เอทานอลต่ำ เนื่องจากเป็นช่วง lag phase ของการหมัก แต่เมื่อเชื้อจุลินทรีย์หรือยีสต์เริ่มมีการแพร่กระจายและเติบโต กลูโคสที่สะสมอยู่ในช่วงแรกก็จะเริ่มลดลง ถูกใช้ไป จากรูปที่ 6 หลังจากผ่านไป 8 ชั่วโมง ปริมาณเอทานอลมีความเข้มข้นขึ้นแสดงถึงการหมักที่สมบูรณ์

4. สรุป

การปรับปรุงสภาพด้วยกรดของต้นข้าวโพด เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์ให้ได้กลูโคสสูงสุด เพื่อการผลิตไบโอเอทานอล ในการวิจัยได้ Glucose yield สูงสุด 89.26% สภาวะที่ดีที่สุดในการปรับปรุงภาพที่ความเข้มข้นกรดซัลฟูริก 0.1 M อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 30 นาที ผลการวิจัยพบว่าในสภาวะ

ที่เหมาะสมนี้ เมื่อวิเคราะห์ในส่วนที่เป็นของเหลวหลังจากการปรับปรุงภาพได้สารยับยั้งค่อนข้างต่ำ การวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการทางกายภาพ และทางเคมีของต้นข้าวโพดหลังผ่านการปรับปรุงภาพด้วยกรดซัลฟูริกมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการย่อยได้เอนไซม์ และสามารถเพิ่มการหมักเพื่อผลิตไบโอเอทานอล

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประเภทอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2560 คณะผู้วิจัยได้ขอพระคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Annual report 2018; 2018 [cites 2020 June 20]. Available from: <http://investor.impactgrowthreit.com/misc/ar/20180620-impact-ar-2018-en-03.pdf>.
- [2] Limayem A, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in Energy and Combustion Science. 2012; 38(4): 449-67.
- [3] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure. 2008; 1617: 1-16.

- [4] Sindhu R, Kuttiraja M, Binod P, Sukumaran RK, Pandey A. Physicochemical characterization of alkali pretreated sugarcane tops and optimization of enzymatic saccharification using response surface methodology. *Renewable Energy* 2014; 62: 362-8.
- [5] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Golden. National Renewable Energy Laboratory. 2006.
- [6] Li C, Knierim B, Manisseri C, Arora R, Scheller HV, Aue M, Vogel KP, Simmons BA, Singh S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic [11] saccharification. *Bioresource technology*. 2010; 101(13): 4900-6.
- [7] Shahabazuddin M, Chandra TS, Meena S, Sukumaran R, Shetty N, Mudliar S. Thermal assisted alkaline pretreatment of rice husk for enhanced biomass deconstruction and [12] enzymatic saccharification: Physico-chemical and structural characterization. *Bioresource technology*. 2018; 263: 199-206.
- [8] Lu X, Zhang Y, Angelidaki I. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource technology*. 2009; 100(12): 3048-53.
- [9] Zhao X, Wang L, Lu X, Zhang S. Pretreatment of corn stover with diluted acetic acid for enhancement of acidogenic fermentation. *Bioresource technology*. 2014; 158: 12-8.
- [10] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010; 101(13), 4851-61.
- [11] Suriyachai N, Champreda V, Kraikul N, Techanan W, Laosiripojana N. Fractionation of lignocellulosic biopolymers from sugarcane bagasse using formic acid-catalyzed organosolv process. *3 Biotech*. 2018; 8(5): 221.
- [12] Schneider L, Dong Y, Haverinen J, Jaakkola M, Lassi U. Efficiency of acetic acid and formic acid as a catalyst in catalytical and mechanocatalytical pretreatment of barley straw. *Biomass and Bioenergy*. 2016; 91: 134-42.

- [13] Wu W, Rondon V, Weeks K, Pullammanappallil P, Ingram LO, Shanmugam K. Phosphoric acid based pretreatment of switchgrass and fermentation of entire slurry to ethanol using a simplified process. *Bioresource technology*. 2018; 251: 171-80.
- [14] Bao W, Binder T, Abbas C, Loveless L. C1-C2 organic acid treatment of lignocellulosic biomass to produce acylated cellulose pulp, hemicellulose, lignin and sugars and fermentation of the sugars. In. Google Patents, 2014
- [15] Ge L, Wang P, Mou H. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renewable energy*. 2011; 36(1): 84-9.
- [16] Li J, Zhang R, Siddhu MAH, He Y, Wang W, Li Y, Chen C, Liu G. Enhancing methane production of corn stover through a novel way: sequent pretreatment of potassium hydroxide and steam explosion. *Bioresource Technology*. 2015; 181: 345-50.
- [17] Li C, Cheng G, Balan V, Kent MS, Ong M, Chundawat SP, daCosta Sousa L, Melnichenko YB, Dale BE, Simmons BA. Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. *Bioresource technology* 2011; 102(13): 6928-36.
- [18] Mood SH, Golfeshan AH, Tabatabaei M, Abbasalizadeh S, Ardjmand M, Jouzani GS. Comparison of different ionic liquids pretreatment for corn stover enzymatic saccharification. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2014; 44(5): 451-63.
- [19] Imman S, Laosiripojana N, Champreda V. Effects of liquid hot water pretreatment on enzymatic hydrolysis and physicochemical changes of corncobs. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2018; 184(2): 432-43.
- [20] Zhang P, Dong SJ, Ma HH, Zhang BX, Wang YF, Hu XM. Fractionation of corn stover into cellulose, hemicellulose and lignin using a series of ionic liquids. *Industrial Crops and Products*. 2015; 76: 688-96.
- [21] Guo J, Catchmark JM. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate polymers*. 2012; 87(2): 1026-37.
- [22] Tan IS, Lee KT. Solid acid catalysts pretreatment and enzymatic hydrolysis of macroalgae cellulosic residue for the production of bioethanol. *Carbohydrate Polymers*. 2015; 124: 311-21.

- [23] Bai F, Anderson W, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*. 2008; 26(1): 89-105.
- [24] Weerasai K, Suriyachai N, Poonsrisawat, A, Amthong J, Unrean P, Laosiripojana N, Champreda V. Sequential acid and alkaline pretreatment of rice straw for bioethanol fermentation. *BioResources*. 2014; 9(4): 5988-6001.
- [25] Öhgren K, Bura R, Lesnicki G, Saddler J, Zacchi G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*. 2007; 42(5): 834-9.