การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย *Acrophialophora* sp. และ *Candida brassicae*

นางสาว สันทนา เสถียรไพศาล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-387-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17057449

BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSICS TO ETHANOL BY SIMULTANEOUS HYDROLYSIS AND FERMENTATION TECHNIQUES USING *Acrophialophora* sp. AND *Candida brassicae*

Miss Santana Sathienpaisal

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Gradute School
Chulalongkorn University
1996

ISBN 974-634-387-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย *Acrophialophora* sp. และ *Candida brassicae*
โดย	นางสาว สันทนา เสถียรไพศาล
หลักสูตร	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ มุกดา ดูหิรัญ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ มุกดา ดูหิรัญ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สันทนา เสถียรไพศาล : การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย Acrophialophpra sp. และ Candida brassicae (BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSICS TO ETHANOL BY SIMULTANEOUS HYDROLYSIS AND FERMENTATION TECHNIQUES USING Acrophialphora sp. AND Candida brassicae) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ รศ. มุกดา คูหิรัญ , 106 หน้า. ISBN 974-634-387-4

กระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องใช้ในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยการรวมปฏิกิริยาการย่อยสลายและการหมักไว้เป็นขั้นตอนที่ต่อเนื่องในถังหมักเดียวกัน โดยเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสจากนั้นยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสที่ได้ไปเป็นเอทธานอลอย่างรวดเร็ว เมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Acrophialophora sp.และยีสต์ Candida brassicae โดยใช้เส้นใยป่านศรนารายณ์เป็นวัสดุหมัก พบว่า การใช้ปริมาณเอนไซม์ 25 เท่า โดยคำนวณจากจำนวนของน้ำหนักแห้งวัสดุหมัก ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น $3x10^{10}$ เซลล์/มล. pH 5.0 อุณหภูมิ 45°ซ สามารถให้ผลผลิตเอทธานอลสูงสุด 0.9125 เปอร์เซนต์ (0.3042 กรัม/กรัมสับสเตรท (g/g)) และการเติม casein peptone ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ และ soy peptone ความเข้มข้น 0.075เปอร์เซนต์ เป็นอาหารเสริม สามารถให้ผลผลิตเอทธานอลได้ 1.267 เปอร์เซนต์ (0.422 g/g) และ 0.9301 เปอร์เซนต์ (0.310 g/g) ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าวัสดุหมักที่ไม่มีการเติมอาหารเสริม 1.76 เท่า และ 1.29 เท่า ตามลำดับ

การศึกษาแนวทางในการผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างเชื้อรา Acrophialophora sp. และยีสต์ Candida brassicae พบว่าใช้เชื้อราที่มีอายุ 6 วัน ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น $3x10^{10}$ เซลล์/มล. ที่อุณหภูมิ 45°ซ สามารถให้ผลผลิตเอทธานอลได้ 0.7822 เปอร์เซนต์ (0.2607 g/g)

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต สันทนา เสถียรไพศาล

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม มุกดา คูหิรัญ

C526568 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: SIMULTANEOUS HYDROLYSIS AND FERMENTATION / Acrophialophora sp. / Candida brassicae
SANTANA SATHIENPAISAL : BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSICS TO ETHANOL BY SIMULTANEOUS HYDROLYSIS AND FERMENTATION TECHNIQUES USING Acrophialophora sp. AND Candida brassicae. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., ASSO.PROF. MUKDA KUHIRUN 106 pp.
ISBN 974-634-387-4

The simultaneous hydrolysis and fermentation (SHF) process has been used for the production of ethanol from lignocellulosic using one bioreactor with continuous reactions starting from the saccharification of cellulose to glucose follofed by a rapid conversion of glucose by yeast to ethanol. Optimum conditions of the SHF process using Acrophialophora sp.cellulase , Candida brassicae and Agave sisalana fiber were investigated. The condition of having 25 folds enzyme , $3x10^{10}$ cells/ml yeast inoculum pH 5.0 at 45°C gave the maximum ethanol yields of 0.9125 % (0.3042 g/g substrate). Addition of 0.05 % casein peptone or 0.075 % soy peptone as supplements were beneficial giving ethanol yields of 1.267 % (0.422 g/g or 1.76 folds increased) from casein peptone and 0.9301 % (0.310 g/g or 1.29 folds increased) from soy peptone respectively.

Study of the co-cutured fermentation process using Acrophialophora sp. and Candida brassicae revealed that the use of 6 day-old fungal culture , $3x10^{10}$ yeast cells/ml , at 45°C gave ethanol yield of 0.7822 % (0.2607 g/g).

ภาควิชา BIOTECHNOLOGY ลายมือชื่อนิสิต สันทนา เสถียรไทยศุล

สาขาวิชา BIOTECHNOLOGY ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา มุกดา กุหิรัญ

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ฮันสา ปุณณพยัค

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาและ รศ.มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆตลอดระยะเวลาของการวิจัย

กราบขอบพระคุณ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร และ ผศ.ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบ และให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สัณห์ พณิชยกุล ที่ได้กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้คำแนะนำด้านการเรียนในชั้นปีที่ 1 ของการเรียนในระดับบริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพฤกษศาสตร์รวมทั้งเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาประจำคณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา ที่ได้ให้วิชาความรู้ในการเรียนระดับขั้นบริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบคุณ คุณเกรียงศักดิ์ แซ่ลี้ และคุณ พรรษา คมสูง จากบริษัท สนเขียว จำกัด อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ ที่อำนวยความสะดวกและอนุเคราะห์เส้นใยป่านศรนารายณ์ที่นำมาใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์

ขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพและพฤกษศาสตร์ทุกคนที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีมาตลอด

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ พี่น้องในครอบครัวเสถียรไพศาลทุกท่านที่คอยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านตลอดการเรียนในระดับบริญญามหาบัณฑิต

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1
2. การตรวจเอกสาร 7
3. อุปกรณ์และวิธีการศึกษา 21
4. ผลการทดลอง 28
5. วิจารณ์ผลการทดลอง 64
6. สรุปผลการทดลอง 71

รายการอ้างอิง 72
ภาคผนวก 80
ประวัติผู้เขียน 106

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 29
2. ผลของความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 33
3. ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 37
4. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 41
5. ผลของการเติม casein peptone type S ต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 45
6. ผลของการเติม soy peptone ต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 48
7. ผลของอายุเชื้อราเริ่มต้นต่อการผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน 52
8. ผลความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน 56
9. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน 60

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. แสดงสูตรโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส 9
2. แสดงการหมักเอทธานอลที่ใช้ปริมาณเอนไซม์แตกต่างกัน 30
3. ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 31
4. แสดงการหมักเอทธานอลที่ใช้ความเข้มข้นยีสต์แตกต่างกัน 34
5. ผลของความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 35
6. แสดงการหมักเอทธานอลที่ใช้ความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน 38
7. ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 39
8. แสดงการหมักเอทธานอลที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 42
9. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 43
10. แสดงการหมักเอทธานอลที่มีการเติม casein peptone เป็นอาหารเสริม 46
11. ผลของการเติม casein peptone type S ต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 47
12. แสดงการหมักเอทธานอลที่มีการเติม soy peptone เป็นอาหารเสริม 49
13. ผลของการเติม soy peptone ต่อการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง 50
14. แสดงการหมักเอทธานอลแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันที่อายุเชื้อราแตกต่างกัน 53

15. ผลของอายุเชื้อราเริ่มต้นต่อการผลิตเอทธานอล
โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน.....54
16. แสดงการหมักเอทธานอลแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน
ที่ความเข้มข้นยีสต์แตกต่างกัน.....57
17. ผลของความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นต่อการผลิตเอทธานอล
โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน.....58
18. แสดงการหมักเอทธานอลแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน
ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน.....61
19. ผลของอุณหภูมิในการหมักต่อการผลิตเอทธานอล
โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน.....62
20. แผนภูมิการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส.....63