การพรีทรีตเมนต์และผลผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลซิสของปอคิวบาและปอแก้ว

สุชาดา ดานะ[1], ดวงพร เปรมจิต[2] และศิริพงษ์ เปรมจิต[1*]

Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis Yields of Kenaf and Roselle

Suchada Dana[1], Duangporn Premjet[2] and Siripong Premjet[1*]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

[2]สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000

[2]Center for Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000

[*] Corresponding author. E-mail address: siripongp@nu.ac.th

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาผลของกรดฟอสฟอริกที่มีต่อการไฮโดรไลซิสของปอคิวบา (Kenaf) และปอแก้ว (Roselle) ด้วยเอนไซม์ จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบทางเคมี แสดงให้เห็นว่าปอคิวบามีปริมาณเซลลูโลส (62.49±0.1%) สูงกว่าปอแก้ว (54.18±0.1%) แต่ปอแก้วมีปริมาณลิกนิน (17.77±0.3%) สูงกว่าปอคิวบา (15.2±0.4%) เล็กน้อย หลังจากนำปอทั้ง 2 ชนิดไปพรีทรีตด้วยกรดฟอสฟอริก พบว่ามีปริมาณของแข็ง (63.00 ±0.4%) และกลูแคน (57.17 ±0.3%) ส่วนปอคิวบา พบว่ามีค่าสูงกว่าปอแก้ว (58.69±0.8% และ 50.00±0.6% ตามลำดับ) นอกจากนี้แล้วการพรีทรีตวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถขจัดลิกนินออกจากปอคิวบา (76.73%) และปอแก้ว (75.90%) ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่าง ที่ไม่ผ่านการพรีทรีต ไปไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ พบว่าปอแก้ว มีค่า saccharification yield (20.60±0.6%) สูงกว่าปอคิวบาเล็กน้อย (17.71±0.5%) แต่ค่า saccharification yield ของตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด จะสูงขึ้น เมื่อผ่านพรีทรีตแล้ว โดยพบว่า saccharification yield ของปอคิวบาสูงขึ้นจาก 17.71±0.5% ไปเป็น 88.27±0.5% ในขณะที่ปอแก้วสูงขึ้นจาก 20.60±0.6% ไปเป็น74.17±3.3% นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่า conversion yield ของปอคิวบาสูงสุด (97.26±0.6%) ตามด้วยปอแก้ว (87.37±3.9%) ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นการพรีทรีตเมนต์ วัตถุดิบของปอทั้ง 2 ชนิดด้วยกรดฟอสฟอริก เป็นขั้นตอนที่มีผลอย่างยิ่ง ต่อการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคสในเอนไซม์ไฮโดรไลซิส นอกจากนี้แล้วยังพบว่า ปอคิวบาและปอแก้ว เป็นพืชเส้นใยที่มีลิกโนเซลลูโลสสูงจึงมีศักยภาพในการนำมาผลิตไบโอเอทานอล

คำสำคัญ: พรีทรีตเมนต์ กรดฟอสฟอริก ลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน

Abstract

The purpose of this research was to investigate the effect of phosphoric acid pretreatment on enzymatic hydrolysis of Kenaf and Roselle. Results from composition analysis revealed that Kenaf had higher cellulose amount (62.49±0.1%) than that of Roselle (54.18 ±0.1%). However, lignin content of Roselle (17.77±0.3%) was slightly higher than Kenaf (15.2±0.4%). After pretreatment of both samples with 75% phosphoric acid, the solid residue (63.00 ±0.4%) and glucan (57.17 ±0.3%) of Kenaf were higher than that of the Roselle (58.69±0.8% and 50.00±0.6%), respectively. Additionally, pretreatment of both raw materials could remove lignin from Kenaf (76.73%) and Roselle (75.90%), respectively. The enzymatic hydrolysis of untreated samples showed that saccharification yield of Roselle (20.60±0.6%) was higher than Kenaf (17.71±0.5%). However, saccharification yield of both treated samples were improved from 17.71±0.5% to 88.27±0.5% for Kenaf and 20.60±0.6% to 74.17±3.3% for Roselle. In addition, the maximum conversion yield was obtained from Kenaf (97.26±0.6%) following by Roselle (87.37±3.9%). These results indicated that pretreatment of both raw materials with 75% phosphoric acid was highly affected for improving enzymatic hydrolysis yields. Moreover, Kenaf and Roselle are fiber plants which have potential to utilize as bioethanol feedstock.

Keywords: Pretreatment, Phosphoric acid, Lignocellulose, Hemicellulose, Lignin

บทนำ

ปัจจุบันประชากรทั่วโลกให้ความตระหนักถึงความสำคัญเกี่ยวกับภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) หรือ ภาวะโลกร้อน (Global Warming) ส่งผลให้อุณหภูมิเฉลี่ยของโลกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้เป็นผลมาจากการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจก (Greenhouse Gas) สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดแก๊สเรือนกระจกส่วนใหญ่เกิดจากการนำพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิล ได้แก่ น้ำมันเบนซินและดีเซล มาใช้ในภาพการขนส่ง (Hahn-Hägerdal, Galbe, Gorwa-Grauslund, Lidén, & Zacchi, 2006, pp. 549-556; Tan, Lee, & Mohamed, 2008, pp. 3360-3365) ดังนั้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าวและเพื่อความยั่งยืนของการใช้พลังงานในอนาคต พลังงานหมุนเวียน (renewable energy) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจมาก ที่จะนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากเชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009, pp. 3713-3729) เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลส (Cellulosic ethanol) เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ ที่สามารถผลิตได้มาจากส่วนประกอบของพืชที่ไม่ใช้เป็นอาหาร มีราคาถูกเป็นสารอินทรีย์ที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ หาได้ง่าย มีอยู่ทั่วไป เช่น ชีวมวลพืช (Plant Biomass) นอกจากนี้แล้วยังไม่ก่อให้เกิดปัญหาสภาวะโลกร้อนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Balat, Balat, & Öz, 2008, pp. 551-573; Maki, Leung, & Qin, 2009, pp. 500-516; Tan, et al., 2008, pp. 3360-3365) นักวิทยาศาสตร์ได้ประมาณการไว้ว่าภาวะเรือนกระจกสามารถทำให้ลดลงได้ถึง 86 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามีการนำชีวมวลหลายชนิดมาผลิตเอทานอล เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน (Kumar, et al., 2009, pp. 3713-3729) ชีวมวลพืชหรือลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 องค์ประกอบ คือ เซลลูโลส (Cellulose), เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) แต่ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่สามารถนำไปผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวออกมา แล้วจึงนำไปหมักให้เป็นเอทานอล (Hendriks, & Zeeman, 2009, pp. 10-18) ลิกโนเซลลูโลสได้มาจากหลายแหล่ง เช่น ขยะจากการเกษตร ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมกระดาษ พืชทุกชนิด เช่นอ้อย ข้าวโพด มันสำปะหลังและพืชเส้นใย (fiber crop) เช่น ปอสายพันธุ์ต่างๆ เป็นต้น แม้ว่าแหล่งของสารประกอบลิกโนเซลลูโลส จะมีอยู่มากมาย แต่การเลือกใช้ต้องคำนึงถึงความเหมาะสม เนื่องจากพืชบางชนิดเป็นพืชที่สามารถนำไปบริโภคได้ หรือใช้เป็นพืชอาหาร หากนำพืชเหล่านี้มาผลิตเป็นพลังงานจะก่อให้เกิดปัญหาการแข่งขันกันทางด้านอาหาร (Goedecke, Therdthianwong, & Gheewala, 2007, pp. 3236-3246) ในประเทศไทยมีพืชเส้นใยอยู่หลายชนิด ได้แก่ ปอกระเจา (Jute) ปอแก้ว (Roselle) ปอคิวบา (Kenaf) และปอสา (Paper mulberry)พืชเส้นใยเหล่านี้เป็นกลุ่มพืชที่น่าสนใจมาก เพราะสามารถนำมาใช้เป็นพืชพลังงานเพื่อการผลิตเอทานอลได้เป็นอย่างดี และยังสามารถส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูก เป็นพืชเศรษฐกิจทางด้านพลังงาน เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ 1) ไม่ใช่พืชอาหาร (Nonfood plant) 2) สามารถเจริญได้ดีในดินที่มีคุณภาพต่ำ 3) ทนต่อ ความแห้งแล้งได้ดี และ 4) มีผลผลิตเส้นใยแห้งสูงถึง ประมาณ 180-403 กิโลกรัมต่อไร่ (Jute, 1995; Roselle, 1996; Kenaf, 1987; Paper mulberry, 1999) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าเส้นใยแห้งของปอสา, ปอแก้ว, ปอกระเจาและปอคิวบา มีปริมาณเซลลูโลสเฉลี่ยค่อนข้างสูงประมาณ 78.0.-60.90% (Amaducci, Amaducci, Benati, & Venturi, 2000, pp. 179-186; Ibrahim, Amr, Eid, & El-Sayed, 2010, pp. 1198-1204; Khristova, & Tissot, 1995, pp. 67-72; Tawonpanich, Srinophakun, & Srinophakun, 1999) ปริมาณเซลลูโลสนี้เป็นดัชนีบ่งชี้ที่สำคัญ สำหรับการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลจะประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน คือ 1) การพรีทรีตเมนต์ (Pretreatment) 2) การย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Saccharification) 3) การหมัก (Fermentation) และ 4) การกลั่น (Distillation) (Dashtban, Schraft, & Qin, 2009, pp. 578-595; Tan, et al., 2008, pp. 3360-3365) สิ่งที่ก่อให้เกิดปัญหาสำหรับ

การผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส คือ ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และโครงสร้างผลึก (Crystalline structure) ของเซลลูโลส จะเป็นตัวขัดขวางการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Tan, et al., 2008, pp. 3360-3365) ดังนั้นการพรีทรีตเมนต์ลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญมาก เพื่อขจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส พร้อมทั้งทำลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มพื้นที่ผิวให้เอนไซม์เข้าถึงเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น การพรีทรีตเมนต์จะทำให้กระบวนการเอนไซม์ไฮโดรไลซิสทำปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก จึงส่งผลให้ผลผลิตที่เกิดขึ้น คือ น้ำตาลกลูโคสมีปริมาณสูงขึ้น รายละเอียดและวิธีการเกี่ยวกับการพรีทรีตเมนต์แบบต่าง ๆ ได้ถูกนำเสนอไว้แล้วโดยนักวิจัยหลายท่าน (Brodeur, et al., 2011, pp. 1-17; Dashtban, et al., 2009, pp. 578-595; Hendriks, & Zeeman, 2009, pp. 10-18; Tan, et al., 2008, pp. 3360-3365) Zhang, et al. (2007, pp. 214-223) แสดงให้เห็นว่าการนำลิกโนเซลลูโลสไปพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะทำให้โครงสร้างผลึกของเซลลูโลส เปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างอสัณฐาน (Amorphous) ทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น

ดังนั้นจุดประสงค์ของการวิจัยนี้คือการพรีทรีตเมนต์ปอคิวบาและปอแก้วด้วยกรดฟอสฟอริก แล้วจึงนำเซลลูโลสของปอทั้ง 2 ชนิดนี้มาไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างสดของปอคิวบาและปอแก้ว ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น มาตากในที่ร่มนาน 5 วัน แล้วตัดให้มีขนาดเล็กประมาณ 2 x5 เซนติเมตร แล้วจึงนำไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืชที่มีตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างมาร่อนด้วยตะแกรงร่อน (test sieve) มีระยะห่างของตะแกรง 250-425 ไมโครเมตร แยกและเก็บตัวอย่างที่ต้องการไว้ในโถดูดความชื้น เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนินและเถ้าของปอทั้ง 2 ชนิด ถูกนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของ National Renewable Energy Laboratory; NREL (Sluiter, et al., 2008, pp. 1-17)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดฟอสฟอริก

นำตัวอย่างปอที่บดแล้ว ชนิดละ 3 กรัม ใส่ลงในหลอดพลาสติก ขนาด50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ 24 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมอะซิโตนลงไป 20 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ทั่ว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่น (Centrifuge) ที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เสร็จแล้วจึงเทของเหลวออกไป ในขั้นตอนนี้ให้ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อล้างเอาสิ่งที่ไม่ต้องการออกไป จากนั้นจึงเปลี่ยนมาล้างต่อด้วยน้ำสะอาด จนกระทั่งมีค่า pH ประมาณ 6-7

เอนไซม์ไฮโดรไลซิส

นำ 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ของตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการพรีทรีตใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอะซิเตรต บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 M ปริมาตร 85 มิลลิลิตร และ โซเดียมเอไซด์ที่มีความเข้มข้น 2% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในทางการค้า Cellic CTec2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง โดยเก็บอย่าง 1 มิลลิลิตร ทุก ๆ 12 ชั่วโมง คือ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

การตรวจวัดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

นำของเหลวที่ได้จากขั้นตอนเอนไซม์ไฮโดรไลซิสมากรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำตัวอย่างสาร 20 ไมโครลิตร ไปฉีดวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโมเลกุล

เดี่ยวด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) Shimazu รุ่น LC-20AD ตัวอย่างสารจะถูกแยกด้วยคอลัมน์ Aminex HPX 87P (7.8 x 300 mm) โดยใช้น้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure water) เป็นวัฏภาคไหลด้วยอัตราเร็ว 0.6 มิลิลิตรต่อนาที ปรับสภาวะคอลัมน์และ RI Detector ให้คงที่ ๆ 80 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การคำนวณหาปริมาณน้ำตาล หรือ Saccharification yield และค่าการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาล หรือ Conversion yield ที่เกิดจากเอนไซม์ไฮโดรไลซิส สามารถคำนวณได้จากสมการ ต่อไปนี้

$$\text{Saccharification yield (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยออกมา (กรัม)}}{\text{ปริมาณซับสเตรทเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

$$\text{Conversion yield (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ปลดปล่อยออกมา (กรัม)}}{\text{ปริมาณเซลลูโลสเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

การวางแผนการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการทดลองที่มีแผนแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ Completely Randomized Design:CRD และแสดงผลการทดลองด้วยค่าเฉลี่ย (mean), n เท่ากับ 3 และ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ปอแก้ว (Roselle) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* L. และปอคิวบา (Kenaf) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus cannabinus* L. พืชทั้งสองชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ Malvaceae จากผลการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบทางเคมี (ตารางที่ 1) พบว่าปอคิวบามีปริมาณเซลลูโลส (62.49±0.1%) สูงกว่าปอแก้ว (54.18±0.1%) ในขณะที่ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (13.08±0.1%) ลิกนิน (17.77±0.3%) และเถ้า (3.59±0.1%) ของปอแก้วสูงกว่าปอคิวบาเล็กน้อย (12.23±0.3%, 15.2±0.4% และ 2.75±00.1% ตามลำดับ) ปริมาณที่แตกต่างกันของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พืช รวมทั้งสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะปลูก ได้แก่ สารอาหารในดิน สภาพภูมิอากาศและการแข่งขันกันเอง (Balat, et al., 2008, pp. 551-573; McKendry, 2002, pp. 37-46) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเซลลูโลสของปอคิวบาและปอแก้วสูงกว่าสิ่งเหลือใช้ทางการเกษตรหลายชนิด ที่ได้รับความสนใจนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล (Abbasi, & Abbasi, 2010, pp. 919-937; Chandel, & Singh, 2011, pp. 1289-1303)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของปอคิวบาและปอแก้ว

องค์ประกอบ	ปอคิวบา %(w/w)	ปอแก้ว %(w/w)
เซลลูโลส (cellulose)	62.49±0.1	54.18±0.1
เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)	12.23±0.3	13.08±0.1
ลิกนิน (lignin)	15.2±0.4	17.77±0.3
เถ้า (ash)	2.75±0.1	3.59±0.1
ของแข็งทั้งหมด (total solid)	91.15±0.1	91.47±0.0
อื่น ๆ (others)	8.85±0.1	8.53±0.0

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

ผลการพรีทรีตเมนต์

หลังจากนำปอทั้ง 2 ชนิดไปพรีทรีตด้วยกรดฟอสฟอริก 75% พบว่าไซแลน ที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสถูกขจัดออกไปหมด แต่น้ำหนักของแข็งที่หายไปของปอแก้ว (41.31%) จะมากกว่าปอคิวบา (37.00%) ในขณะที่ของแข็งที่เหลือจากการพรีทรีตปอคิวบามีปริมาณกลูแคน (57.17±0.3%) สูงกว่าที่พบในของแข็งที่เหลือจากการพรีทรีตปอแก้ว (50.00±0.6%) แต่ทว่าในปอแก้วมีลิกนิน (4.28±0.1%) เหลืออยู่ในของแข็งมากกว่าปอคิวบาเล็กน้อย (3.54±0.1%) (ตารางที่ 2) จากผลการทดลองแสดงเห็นว่ากรดฟอสฟอริก เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ สามารถขจัดไซแลนออกไปได้มากกว่าลิกนิน ทั้งไซแลนและลิกนินจะทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนเอนไซม์ไฮโดรไลซิส (Brodeur, et al., 2011, pp. 1-17; Dashtban, et al., 2009, pp. 578-595; Hendriks, & Zeeman, 2009, pp. 10-18; Tan, et al., 2008, pp. 3360-3365) นอกจากนี้แล้วปริมาณของแข็งที่หายไปก็เป็นดัชนีอีกตัวหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงที่จะแสดงให้เห็นถึงความเหมาะของการพรีทรีตเมนต์ (Zhu, et al., 2006, pp. 279-283)

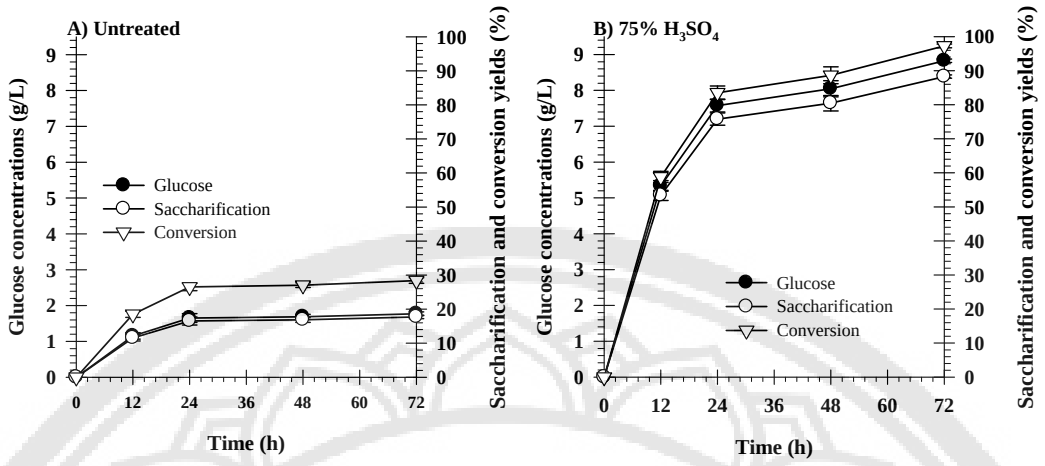
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของปอคิวบาและปอแก้ว หลังจากพรีทรีตเมนต์ด้วยฟอสฟอริกเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์

องค์ประกอบ	ปอคิวบา		ปอแก้ว	
	ไม่พรีทรีต %(w/w)	พรีทรีต %(w/w)	ไม่พรีทรีต %(w/w)	พรีทรีต %(w/w)
ของแข็ง	100	63.00±0.4(37.00)	100	58.69±0.8(41.31)
กลูแคน	62.49±0.1	57.17±0.3(8.33)	54.18±0.1	50.00±0.6(7.71)
ไซแลน	11.46±0.2	-	11.89±0.1	-
ลิกนิน	15.2±0.4	3.54±0.1(76.73)	17.77±0.3	4.28±0.1(75.90)

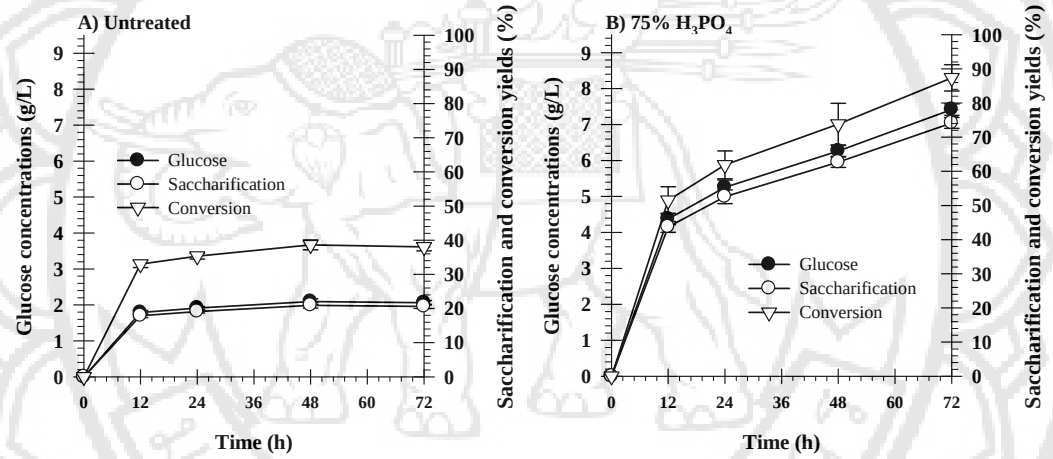
ค่าที่แสดงในตาราง คือค่าเฉลี่ย, n=3, ± SD, $P \leq 0.05$ และตัวเลขในวงเล็บ ( ) คือน้ำหนักที่หายไป

ผลของเอนไซม์ไฮโดรไลซิส

จากการนำตัวอย่างพืชทั้ง 2 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า ปริมาณน้ำตาลกูลโคสที่ปลดปล่อยออกมา จะสูงขึ้นอย่าง รวดเร็วในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลกูลโคสจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น อย่างต่อเนื่องและน้ำตาลกูลโคสจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 ของการบ่ม (รูปที่ 1-2) ทำให้พบว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ของพืชทั้ง 2 ชนิด มี saccharification yield และ conversion yield ต่ำสุด ในกรณีนี้ saccharification yield (20.60±0.6%) และ conversion yield 38.03±1.1%) ของปอแก้วสูงกว่าปอคิวบา (17.71±0.5% และ 28.40±0.8%, ตามลำดับ) เมื่อตัวอย่างพืชทั้ง 2 ชนิด ถูกนำไปพรีทรีตด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า saccharification yield และ conversion yield จะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า saccharification yield และ conversion yield ของปอคิวบาสูงขึ้นถึง 88.27±0.5% และ 97.26±0.6% ในขณะที่ saccharification yield และ conversion yield ของปอแก้วเท่ากับ 74.17±3.3% และ 87.37±3.4% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างปอแก้วที่ผ่านและไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ พบว่าปอแก้วที่ผ่านการพรีทรีตจะให้ค่า saccharification yield และ conversion yield สูงกว่าปอแก้วที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ 3.6 และ 2.3 เท่า ตามลำดับ เช่นเดียวกับปอคิวบาที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์จะให้ค่า saccharification yield และ conversion yield สูงกว่าปอคิวบาที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ 5.0 และ 3.4 เท่า ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสายพันธุ์พืชที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ พบว่าปอคิวบามีค่า saccharification yield และ conversion yield สูงกว่า



รูปที่ 1 ปริมาณความเข้มข้นของ กลูโคส saccharification และ conversion yields ของปอคิวบา A) ที่ไม่ผ่านการพรีทรีต และ B) ที่ผ่านการพรีทรีตฟอสฟอริกเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2 ปริมาณความเข้มข้นของ กลูโคส saccharification และ conversion yields ของปอแก้ว A) ที่ไม่ผ่านการพรีทรีต และ B) ที่ผ่านการพรีทรีตฟอสฟอริกเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์

ปอแก้ว 1.2 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การพรีทรีตเมนต์พืชทั้ง 2 ชนิดนี้ ด้วยกรดฟอสฟอริก ส่งผลให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยสามารถเข้าทำลาย โครงสร้างผลึกเซลลูโลส พร้อมทั้งขจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกไป ซึ่งสิ่งเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัวการขัดขวางไม่ให้เอนไซม์เซลลูเลสเข้าทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (Li, Kim, Jiang, Kang, & Chang, 2009, pp. 3245-3251; Zhang, et al., 2007, pp. 214-223) ในกรณีที่การ saccharification ของทั้งปอคิวบาและปอแก้วยังไม่สมบรูณ์ถึง 100% เกิดจากตัวอย่างผ่านการพรีทรีตเมนต์แล้ว ยังคงมีโครงสร้างผลึกเซลลูโลสและลิกนินหลงเหลืออยู่ จึงส่งผลให้เอนไซม์เซลลูเลสไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้อย่างสมบรูณ์ (Lee, Teramoto, & Endo, 2009, pp. 275-279) นอกจากนี้แล้วประสิทธิภาพของการ saccharification และ conversion ยังขึ้นอยู่กับสัดส่วนของซับสเตรทและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้เข้าทำปฏิกิริยา (Sun, & Cheng, 2002, pp. 1-11) ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตกระบวนการเอนไซม์ไฮโดรไลซิส สามารถทำได้โดยการเพิ่มความเข้มของเอนไซม์ให้สูงขึ้น (Kristensen, Felby, & Jorgensen, 2009, p. 11)

สรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษาพบว่าลิกโนเซลลูโลสของทั้งปอแก้วและปอคิวบามีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก แต่ปอคิวบามีปริมาณเซลลูโลสสูงกว่าปอแก้ว และปอคิวบามีปริมาณลิกนินต่ำกว่าปอแก้วเล็กน้อย ส่วนปริมาณเฮมิเซลลูโลสของพืชทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกันมาก การพรีทรีตเมนต์ปอแก้วและปอคิวบาด้วยกรดฟอสฟอริก 75% ส่งผลให้การย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสมีประสิทธิภาพสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า saccharification yield (88.27±0.5%) และ conversion yield (97.26±0.6%) ของปอคิวบาที่ผ่านการพรีทรีต สูงกว่าปอคิวบาที่ไม่ผ่านการพรีทรีตประมาณ 5.0 และ 3.4 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ saccharification yield (74.17±3.3%) และ conversion yield (87.37±3.4%) ของปอแก้วที่ผ่านการพรีทรีต จะสูงกว่าปอแก้วที่ไม่ผ่านการพรีทรีตประมาณ 3.6 และ 2.3 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พืชที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ พบว่าปอคิวบา มีค่า saccharification yield และ conversion yield สูงกว่าปอแก้ว ประมาณ 1.2 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าทั้งปอแก้วและปอคิวบามีศักยภาพสูงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลกูลโคสเพื่อการผลิตเอทานอลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) จากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2556 (R2555B031) และทุนการศึกษาสำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ประเภทผู้ช่วยวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2557-2558

เอกสารอ้างอิง

Abbasi, T., & Abbasi, S. A. (2010). Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, *14*(3), 919-937.

Amaducci, S., Amaducci, M. T., Benati, R., & Venturi, G. (2000). Crop yield and quality parameters of four annual fibre crops (hemp, kenaf, maize and sorghum) in the North of Italy. *Ind. Crop. Prod.*, *11*(2-3), 179-186.

Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Prog. Energ. Combust.*, *34*(5), 551-573.

Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A Review. *Enzyme Res.*, 2011, 1-17.

Chandel, A., & Singh, O. (2011). Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. *Appl. Microbiol. Biot.*, *89*(5), 1289-1303.

Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives *Int. J. Biol. Sci.*, *5*(6), 578-595.

Goedecke, M., Therdthianwong, S., & Gheewala, S. H. (2007). Life cycle cost analysis of alternative vehicles and fuels in Thailand. *Energ. Policy*, *35*(6), 3236-3246.

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., & Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnol., 24*(12), 549-556.

Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol., 100*(1), 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 Polym., 82*(4), 1198-1204.

Jute. (1995). Plant database by Systems Research Group, Planning Division and Academic, Department of Agriculture, Thailand, Retrieved August 3, 2015, from http://it.doa.go.th/cv/view2.php?id=140

Kenaf. (1987) Plant database by Systems Research Group, Planning Division and Academic, Department of Agriculture, Thailand, Retrieved August 3, 2015, from http://it.doa.go.th/cv/view2.php?id=71

Khristova, P., & Tissot, M. (1995). Soda-anthraquinone pulping of Hibiscus sabdariffa (karkadeh) and Calotropis procera from Sudan. *Bioresource Technol., 53*(1), 67-72.

Kristensen, J., Felby, C., & Jorgensen, H. (2009). Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels, 2*(1), 11.

Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res., 48*(8), 3713-3729.

Lee, S.-H., Teramoto, Y., & Endo, T. (2009). Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I – Effect of additives with cellulose affinity. *Bioresource Technol, 100*(1), 275-279.

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

Maki, M., Leung, K. T., & Qin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci., 5*(5), 500-516.

McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technol., 83*(1), 37-46.

Paper mulberry. (1999). Plant database by Systems Research Group, Planning Division and Academic, Department of Agriculture, Thailand, Retrieved August 3, 2015, from http://it.doa.go.th/cv/view2.php?id=178

Roselle. (1996). Plant database by Systems Research Group, Planning Division and Academic, Department of Agriculture, Thailand, Retrieved August 3, 2015, from http://it.doa.go.th/cv/view2.php?id=142

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D., et al. (2008). Determination of Structuralin Biomass Carbohydrates and Lignin *Laboratory Analytical Procedure (LAP)* Colorado: National Renewable Energy Laboratory.

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

Tan, K. T., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2008). Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. *Energ. Policy*, *36*(9), 3360-3365.

Tawonpanich, T., Srinophakun, P., & Srinophakun, T. (1999). *New era of cleaner production in mulberry paper industry*. Bangkok: Kasetsart University.

Zhang, Y. H. P., Ding, S.-Y., Mielenz, J. R., Cui, J.-B., Elander, R. T., & Laser, M., et al. (2007). Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnol Bioeng*, *97*(2), 214-223.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., & Jin, S., et al. (2006). Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biosyst. Eng.*, *93*(3), 279-283.