

การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลจากเปลือกกล้วยน้ำว้าโดยเชื้อ *Pichia stipitis*

Study on bioethanol production efficiency of banana peel (*Musa sapientum* L.)

by *Pichia stipitis*

วัชรารณ์ ตันติพานิชย์¹ และ ประดิษฐ์ เอี่ยมสะอาด^{1,*}

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

E-mail: pradinunt.e@aru.ac.th

Watcharaporn Tantipanathip¹ and Pradinunt Eiamsa-ard^{1,*}

¹ Department of Environmental Science, Faculty of Science and Technology,

Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, Phranakhon Si Ayutthaya 13000.

E-mail: pradinunt.e@aru.ac.th

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลสได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากความต้องการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนมีแนวโน้มสูงขึ้น การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเปลือกกล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* L.) ในการผลิตไบโอเอทานอล โดยการศึกษาการปรับสภาพเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยวิธีการทางเคมี และวิธีการทางเคมีกายภาพ ก่อนนำชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพไปย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างไซแลนเนสและเซลลูเลส ผลการทดลองพบว่ากระบวนการปรับสภาพด้วยอุณหภูมิ 121°C ร่วมกับ NaOH 0.05 N ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 808.88 mg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์จากตัวอย่างชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้ามีปริมาณมากขึ้นในทุกชุดการทดลองเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยเฉพาะชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการทางเคมีกายภาพ และเมื่อนำไฮโดรไลเสทจากการย่อยชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้ามาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลด้วยยีสต์ *Pichia stipitis* TISTR 5306 ผลการทดลองพบว่าปริมาณเอทานอลสะสมสูงสุดที่ 7.47 g/l เมื่อใช้ไฮโดรไลเสทที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเป็นสับสเตรท จากผลการทดลองในครั้งนี้นำไปสู่แนวทางสำคัญในการจัดหาชีวมวลทางเลือกควบคู่กับการศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อตอบสนองต่อความต้องการเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีแนวโน้มมากขึ้นต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: เปลือกกล้วยน้ำว้า; ไบโอเอทานอล; การปรับสภาพชีวมวล; ชีวมวลลิกโนเซลลูโลส

Abstract

Nowadays, the production of bioethanol from lignocellulosic biomass is intensive attention regarding to the largest increase in the renewable energy demand. The objective of this study was focused on the efficiency of bioethanol production from banana peel (*Musa sapientum* L.) rely on the differentiated biomass pretreatment either chemical or physico-chemical techniques followed by the synergistic of cellulase and xylanase enzyme hydrolysis. The physico-chemical pretreatment through 121°C and 0.05 N NaOH was exhibited the highest reducing sugar concentration at 800.88 mg/ml. Moreover, the reducing sugar derived from the pretreated banana peel biomass was slightly enhanced according to the enzymatic hydrolysis reaction, especially the physico-chemical pretreated biomass. The banana peel hydrolysate was readily accessed to the bioethanol fermentation constructed by *Pichia stipitis* TISTR5306. The result revealed the maximize ethanol accumulation at 7.47 g/l according to the utilization of the highest reducing sugar as a substrate. The overall results would be defined as the considerable scheme toward simultaneously alternative biomass and the effectiveness technology optimization for bioethanol production responded to the further extending demand of an alternative bio-fuel.

Keywords: Banana peel (*Musa sapientum* L.); Bioethanol; Biomass pretreatment; Lignocellulosic biomass

1. บทนำ

การผลิตไบโอเอทานอล (bioethanol) จากชีวมวลลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic biomass) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะการณ์ที่ทั่วโลกให้ความสำคัญในขณะนี้ ได้แก่ ปริมาณความต้องการพลังงานสำหรับระบบขนส่ง พลังงานเชื้อเพลิงในอุตสาหกรรมและกิจกรรมอื่น ๆ ที่เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็วส่งผลต่อราคาน้ำมันที่เพิ่มสูงขึ้นในหลายพื้นที่ทั่วโลก รวมไปถึงผลกระทบต่อในเรื่องของการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas, GHG) ที่เกิดจากกิจกรรมการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล ผลจากปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลให้หลายประเทศทั่วโลกมีความตื่นตัวในการพัฒนาแหล่งพลังงานทางเลือกเพื่อทดแทนการใช้ น้ำมันเชื้อเพลิงในกิจกรรมต่าง ๆ [1-2] ปัจจุบันในหลาย ๆ ประเทศมีการใช้เอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินเป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทน เช่น การผสมในอัตราส่วน 10 ถึง 85% เป็นต้น [3-4] นอกจากนี้เป็นการลดการใช้ น้ำมันเชื้อเพลิงได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้วนั้น การใช้เอทานอลเป็นส่วนผสมยังเป็นการช่วยเพิ่มค่าออกเทนและให้ความร้อนกับเครื่องยนต์ได้เร็วขึ้น [5]

การพิจารณาเลือกใช้ชีวมวลลิกโนเซลลูโลส เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ในการผลิตไบโอเอทานอล จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพชีวมวลและการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อทำลายพันธะระหว่างโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส (40-50%) เฮมิเซลลูโลส (25-35%) และลิกนิน (15-20%)

การทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นการปรับสภาพเปลือกกล้วยน้ำว้าจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการกำจัดลิกนินและปรับสภาพโครงสร้างเปลือกกล้วยน้ำว้าในอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) สำหรับการผลิตเอทานอลเป็นลำดับต่อไป [16] จากรายงานวิจัยที่ผ่านมามีการใช้เปลือกกล้วยน้ำว้าเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอเอทานอลโดยการปรับสภาพด้วยการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 91.02°C ความดัน 15 psi ควบคู่กับการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ไบโอเอทานอล 45% โดยอาศัยกิจกรรมของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* [17] ในการทดลองครั้งนี้จึงมีความสนใจศึกษาแนวทางการปรับสภาพเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยวิธีการต่าง ๆ ทั้งวิธีการทางเคมี และวิธีการปรับสภาพร่วมเคมีกายภาพ ก่อนนำไปย่อยทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ผสมสองชนิดเพื่อเตรียมชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าให้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไบโอเอทานอลด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Pichia stipitis* ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการทดสอบ

2.1 การเตรียมชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้า

เปลือกกล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* L.) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้จากร้านจำหน่ายกล้วยทอดในพื้นที่อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยเลือกใช้เปลือกกล้วยน้ำว้าที่ไม่ทิ้งไว้ค้างคืนและมีลักษณะอวบ น้ำ นามาล้างทำความสะอาด วางให้สะเด็ดน้ำ แล้วกำจัดยางกล้วยด้วยการแช่เปลือกกล้วยในสารละลาย NaCl 3% เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นต้มเปลือกกล้วยให้เดือดในสารละลายกรดแอสซิดิก 5% ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 30 นาที [ดัดแปลงจาก 11] หั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร แล้วทำให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง [18] จากนั้นนำเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการอบแห้งไปบดละเอียดด้วยเครื่องปั่นเอนกประสงค์แล้วร่อนผ่านตะแกรง (sieve no. 40 และ 60, Cole Parmer, USA) จนได้อนุภาคชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าขนาด 250 μm สำหรับการทดลองในขั้นตอนถัดไป

2.2 การปรับสภาพเปลือกกล้วยน้ำว้า (Pretreatment)

2.2.1 การปรับสภาพตัวอย่างเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยวิธีการทางเคมี (Chemical pretreatment)

การปรับสภาพด้วยวิธีการทางเคมีได้ดำเนินการศึกษาโดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 N โดยกำหนดอัตราส่วนเปลือกกล้วยน้ำว้าต่อสารละลาย เท่ากับ 1 : 6 (ชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้า 10 g ในสารละลายปริมาตร 60 ml) การปรับสภาพดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 60 นาที [ดัดแปลงจาก 19] จากนั้นแยกสารละลายส่วนใสออกจากชีวมวลด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที (Sigma 3-16KL, USA) แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

2.2.2 การปรับสภาพด้วยวิธีการทางเคมีกายภาพ (Physico-chemical pretreatment)

การปรับสภาพดำเนินการโดยให้ความร้อนกับตัวอย่างเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ภายใต้อัตราดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นการประยุกต์จากวิธี popping treatment

[20] พกให้เขนที่อุณหภูมิห้อง แลวแบ่งเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการให้ความรอนอกเป็น 2 ส่วน นำไปปรับสภาพด้วย H_2SO_4 และ $NaOH$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, และ 0.2 N การปรับสภาพดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.2.1

2.3 การย่อยชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Enzymatic saccharification)

การย่อยชีวมวลด้วยเอนไซม์ดำเนินการโดยการนำเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีและวิธีการทางเคมีกายภาพ (ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด) ปริมาณ 1.5 g ในน้ำกลั่น 200 ml จากนั้นใช้เอนไซม์เซลลูเลส (Celluclast, Sigma Aldrich) และไซแลนเนส (Pentopan Mono BG, Sigma Aldrich) ที่ปริมาณเอนไซม์ 15 U/g ปรับ pH เท่ากับ 5.0 ± 0.5 ก่อนเริ่มปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ $50^\circ C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $95^\circ C$ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยุคปฏิกิริยาการย่อย [ดัดแปลงจาก 21-22] แยกสารละลายไฮโดรไลสออกจากชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที (Sigma 3-16KL, USA) แล้วจึงนำไฮโดรไลสทไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (3, 5-dinitrosalicylic acid)

2.4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (Glucose standard curve)

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นช่วง 0 - 1,500 mg/ml ปริมาตร 1.5 ml ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย DNS (3, 5-dinitro salicylic acid, Sigma Aldrich, USA) ปริมาตร 1.5 ml ปิดฝาหลอดทดลองแล้วผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ $80^\circ C$ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงย้ายหลอดทดลองลงในน้ำเย็นทันทีเพื่อยุคปฏิกิริยา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้องจึงนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm [23-24]

2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี เคมีกายภาพ และการย่อยด้วยเอนไซม์ การทดลองดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยใช้สารละลายส่วนสที่ไดจากการปรับสภาพชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้า และไฮโดรไลสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปริมาตร 1.5 ml แทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลสทำได้โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงจากการทดลองกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (glucose standard curve)

2.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผลค่าน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปค่าเฉลี่ย จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

2.5 การผลิตไบโอเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *Pichia stipitis* TISTR 5306

การผลิตไบโอเอทานอลด้วยการหมักดำเนินการโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ yeast malt medium (g/l : yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g และ dextrose 10 g) ปริมาตร 100 ml ซึ่งในชุดการทดลองที่ใช้เปลือกกล้วยน้ำว้าเป็นสับสเตรททำได้โดยใช้ไฮโดรไลสที่เกิดจากการย่อยชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพเปลือกกล้วยน้ำว้า ปริมาตร 10 ml [ดัดแปลงจาก 25] ทดแทนน้ำตาล dextrose จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ $110^\circ C$ เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงถ่ายกล้าเชื้อ *P. stipitis* TISTR 5306 (5% v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ $30^\circ C$ ที่ความเร็วรอบ 100 rpm

เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวน้ำหมักโดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำหมัก แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เป็นลำดับต่อไป การทดลองชุดควบคุม (control) ดำเนินการโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ yeast malt medium ในการผลิตเอทานอล

การศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลดำเนินการโดยใช้ Gas-chromatography - Flame ionization detector (GC-FID) โดยการนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการหมักไบโอเอทานอลในแต่ละชุดการทดลองข้างต้นมากรองด้วย Syringe Filter 0.2 μm (Minisart, Satorious, Germany) เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกและป้องกันการอุดตันของคอลัมน์ ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-FID (Agilent 6890N, Agilent Inc., USA) ที่ติดตั้งด้วยคอลัมน์ HP-Innowax capillary column (HP-Innowax 30 m, 0.32 mm, 0.15 μm) การวิเคราะห์ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ไบโอเอทานอลเปรียบเทียบกับความเข้มข้นสารมาตรฐานเอทานอล [ดัดแปลงจาก 26]

3. ผลการทดสอบ

3.1 การปรับสภาพเปลือกกล้วยน้ำว้า (Pre-treatment)

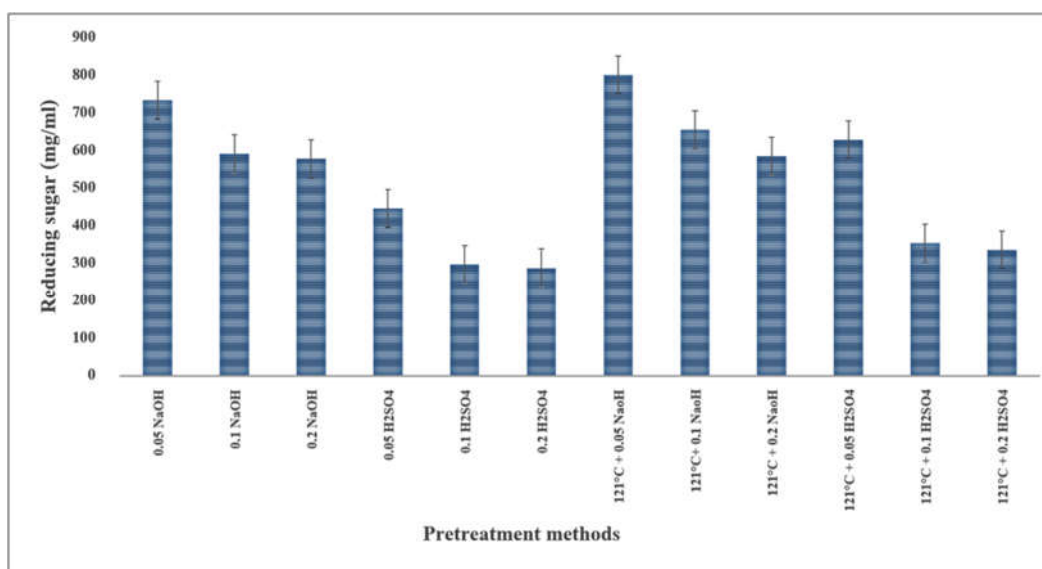
การปรับสภาพเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดขนาดอนุภาค 250 μm (รูปที่ 2) ด้วยวิธีการทางเคมีด้วยสารละลาย H_2SO_4 และ NaOH ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 N ผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นกับกราฟมาตรฐาน (glucose standard curve) พบว่าการปรับสภาพทางเคมีของตัวอย่างเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วย NaOH 0.05 N ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 733.62 mg/ml ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อยที่สุดเมื่อใช้ H_2SO_4 ที่ความเข้มข้น 0.2 N โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้มีค่า 288.28 mg/ml (รูปที่ 3) และยังพบว่าการใช้ความร้อนสูงที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi ในการปรับสภาพพร้อมกับการใช้สารละลายกรด-ด่าง (H_2SO_4 และ NaOH) มีผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในทุกชุดการทดลองมีปริมาณมากกว่าการปรับสภาพทางเคมี โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้ความร้อนควบคู่กับการใช้สารละลาย NaOH 0.05 N ให้ปริมาณน้ำตาลสูงที่สุดที่ 800.88 mg/ml (รูปที่ 3)

จากการทดลองปรับสภาพชีวมวลด้วยวิธีการทางเคมีด้วยการใช้สารละลายกรดและด่าง รวมทั้งการใช้ความร้อนร่วมกับวิธีการทางเคมีในครั้งนี้เป็นวิธีการที่นิยมใช้มากในการปรับสภาพชีวมวลก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการย่อยให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลเป็นลำดับต่อไป [27] ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากตัวอย่างชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Danmaliki และคณะ [28] ที่พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพตัวอย่างเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยวิธี alkaline pretreatment เวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้ NaOH 10% (v/v) เป็นวิธีการที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธี water pretreatment และ acid pretreatment ตามลำดับ ดังนั้นการพิจารณาเลือกใช้ชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายด่างในการผลิตไบโอเอทานอลจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสม ทั้งยังมีรายงานพบว่าการปรับสภาพด้วยด่างช่วยลดการเกิดสารยับยั้งการผลิตไบโอเอทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรด นอกจากนี้พบว่าการใช้สารละลายด่างสามารถดำเนินการได้ในสถานะที่ไม่รุนแรง เช่น การใช้อุณหภูมิปกติในการปรับสภาพ [29] แต่อย่างไรก็ตาม

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้า โดยเฉพาะปัจจัยเกี่ยวกับอุณหภูมิและระยะเวลาที่ต่างกันจำเป็นต้องพิจารณา เนื่องจากปัจจัยดังกล่าวอาจมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น [17, 25]



รูปที่ 2 ชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้า (a) และเปลือกกล้วยน้ำว้าบดละเอียดขนาด 250 μm (b)

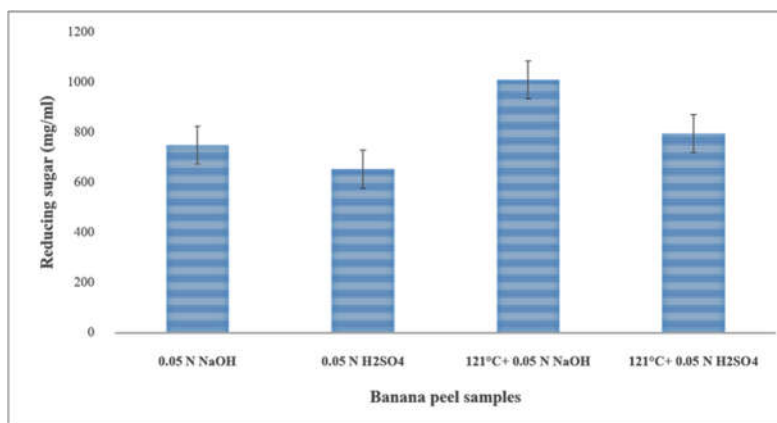


รูปที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี และเคมีกายภาพ

3.2 การย่อยชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Enzymatic saccharification)

การทดลองใช้เอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนส ในการย่อยชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี และเคมีกายภาพ โดยพิจารณาเลือกชุดการทดลองที่ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ผลการทดลองพบว่าเมื่อย่อยชีวมวลด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสมีผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเสทเพิ่มสูงขึ้นในทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 4) เนื่องจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการกำจัดลิกนินด้วยการปรับสภาพตามวิธีข้างต้น [30] โดยพบว่าเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการปรับ

สภาพด้วยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C ตามด้วยการใช้สารละลาย NaOH 0.05 N ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 1011.60 mg/ml (รูปที่ 4) เนื่องด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์เปลือกกล้วยน้ำว้าที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาล ได้แก่ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ผลจากการศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดพบว่าให้ประสิทธิภาพการย่อยชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าโดยพบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสมีกิจกรรมในการย่อยไซแลน (xylan) ที่มีโครงสร้างหลักเป็นไซโลส (xylose backbone) ที่ยึดกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic linkage [21] ซึ่งช่วยส่งเสริมกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยโครงสร้างเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสช่วยให้เส้นใยเกิดการขยายตัว เพิ่มความมีรูพรุน และเกิดการแตกหัก จึงส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสไม่เพียงแต่เกิดขึ้นเฉพาะโครงสร้างภายนอกเท่านั้น ยังพบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับส่วนของโครงสร้างเซลลูโลสที่ถูกห่อหุ้มไว้ภายในได้อีกด้วย [31-32] แต่อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์สองชนิดร่วมกันเพื่อย่อยโครงสร้างผนังเซลล์ของชีวมวลนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์ ความเข้มข้น ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากชีวมวลที่ใช้ในการทดลองแต่ละชนิดมีโครงสร้างและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน เช่น ความแตกต่างของระยะเวลาในการย่อยมีผลต่อการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสในการย่อยชีวมวลชานอ้อย เป็นต้น [31, 33]



รูปที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในกิจกรรมการเตรียมชีวมวลลิกโนเซลลูโลสสำหรับอุตสาหกรรมเชื้อเพลิงชีวภาพยังเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการพัฒนางานวิจัย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตรวมไปถึงการพัฒนาประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยองค์ประกอบชีวมวลลิกโนเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์ [34] แนวทางหนึ่งที่เหมาะสมได้แก่ การพิจารณาเลือกใช้เอนไซม์ผสม (synergistic enzymes) ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการย่อยองค์ประกอบลิกโนเซลลูโลสในชีวมวลได้สมบูรณ์ โดยอาจเตรียมในรูปแบบของสารสกัดหยาบเอนไซม์จากเชื้อราหรือแบคทีเรีย เช่น การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยชีวมวลชานอ้อยของสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่

ตารางที่ 1 การผลิตไบโอเอทานอลจากไฮโดรไลสของชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าผ่านการปรับสภาพ

ไฮโดรไลสของชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้า	ปริมาณไบโอเอทานอล (g/l)
การปรับสภาพด้วยสารละลาย 0.05 NaOH	4.24 ± 0.35
การปรับสภาพด้วยสารละลาย 0.05 H ₂ SO ₄	3.75 ± 1.79
การปรับสภาพด้วยความร้อนที่ 121°C ควบคู่กับสารละลาย 0.05 NaOH	7.47 ± 0.35
การปรับสภาพด้วยความร้อนที่ 121°C ควบคู่กับสารละลาย 0.05 H ₂ SO ₄	5.50 ± 0.35
ชุดควบคุม	6.73 ± 0.35

หมายเหตุ: ผลการทดลองแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตไบโอเอทานอลจากการเตรียมสับสเตรทรูปแบบ SHF อาจทำให้เกิดการสะสมสารผลิตภัณฑ์น้ำตาลจากการย่อยที่มากเกินไป จึงยับยั้งอัตราการผลิตไบโอเอทานอล (substrate inhibition) ในขณะที่การหมักรูปแบบ SSF นั้น ถึงแม้ว่าอัตราการย่อยชีวมวลจะเกิดขึ้นช้าเนื่องจากสภาวะในการย่อยที่ไม่เหมาะสมมากนัก แต่พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถเข้าสู่การหมักเพื่อการผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่อง จึงไม่เกิดปัญหาการสะสมของสับสเตรทในการหมักที่มากเกินไป [39-40] แต่อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองในครั้งนี้สามารถพัฒนาไปสู่แนวทางการพัฒนารูปแบบการวิจัยเพื่อการผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลให้มีประสิทธิภาพ โดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ผสมในอัตราส่วนที่เหมาะสมควบคู่กับการหมักในรูปแบบ SSF เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตผลิตภัณฑ์ไบโอเอทานอลเพิ่มมากขึ้น

4. บทสรุป

จากคุณสมบัติของเปลือกกล้วยน้ำว้าที่พบว่ามีองค์ประกอบสำคัญประกอบด้วยโครงสร้างส่วนลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic material) สามารถประยุกต์ใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลที่กำลังจะหมดไปในอนาคต ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาวิธีการปรับสภาพโดยใช้สารละลายกรดและด่าง รวมทั้งการใช้ความร้อนควบคู่กับสารละลายกรดและด่างเพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นพบว่าเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C ควบคู่กับการใช้สารละลายกรดหรือด่างส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C ควบคู่กับการใช้ NaOH 0.05 N พบว่าให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 800.88 mg/ml และเมื่อนำชีวมวลเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นโดยเลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดมาย่อยด้วยเอนไซม์สองชนิด (synergistic enzymes) พบว่าในทุกชุดการทดลองให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากสับสเตรทเปลือกกล้วยน้ำว้าด้วยยีสต์ *P. stipitis* พบการผลิตไบโอเอทานอลสูงสุดที่ 7.47 g/l เมื่อใช้ชีวมวล

เปลือกกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนควบคู่กับสารละลาย NaOH 0.05 N และผ่านการย่อยด้วย เอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลสและไซแลนเนส จากผลการทดลองในครั้งนี้นับได้ว่าเป็นแนวทางสำคัญในการจัดหาแหล่งชีวมวลทางเลือกสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล เพื่อตอบสนองความต้องการเชื้อเพลิงชีวภาพที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ซึ่งนอกจากจะเป็นวิธีการในการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแล้วนั้นยังเป็นวิธีการบริหารจัดการของเสียอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพอีกแนวทางหนึ่งด้วย

เอกสารอ้างอิง

- [1] B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M.F. Gorwa-Grauslund, G. Liden and G. Zacchi, "Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today," Trends in Biotechnology, Vol. 24, No. 12, 2006, pp. 549-556.
- [2] T. Goshima, M. Tsuji, H. Inoue, S. Yano, T. Hoshino and A. Matsushika, "Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain," Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 77, No. 7, 2013, pp. 1505-1510.
- [3] J.R. Mielenz, "Ethanol production from biomass: technology and commercialization status," Current Opinion in Microbiology, Vol. 4, No. 3, 2001, pp. 324-329.
- [4] A. Demirbas, "Bioalcohols as alternatives to gasoline," Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, Vol. 31, No. 12, 2009, pp. 1056-1062.
- [5] L.S. Khuong, H.H. Masjuki, N.W.M. Zulkifli, E.N. Mohamad, M.A. Kalam, A. Alabdulkarem, A. Arslan, M.H. Mosarof, A.Z. Syahir and M. Jamshaid, "Effect of gasoline-bioethanol blends on the properties and lubrication characteristics of commercial engine oil," The Royal Society of Chemistry, Vol. 7, No. 25, 2017, pp. 15005-15019.
- [6] X. Zhao, L. Xiong, M. Zhang and F. Bai, "Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering," Bioresource Technology, Vol. 215, 2016, pp. 84-91.
- [7] I.S. Horváth, C.J. Franzen, M.J. Taherzadeh, C. Niklasson and G. Lidén, "Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats," Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 7, 2003, pp. 4076-4086.
- [8] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros and M.J. Negro, "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review," Bioresource Technology, Vol. 101, No. 13, 2010, pp. 4851-4861.

- [9] S.K. Bhatia, S.S. Jagtap, A.A. Bedekar, R.K. Bhatia, A.K. Patel, J.R. Banu, C.V. Rao, Y.G. Kim and Y.H. Yang, "Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges," *Bioresource Technology*, Vol. 300, No. 122724, 2020, pp 1-13.
- [10] M. Tayyab, A. Noman, W. Islam, S. Waheed, Y. Arafat, F. Ali, M. Zaynab, S. Lin, H. Zhang and W. Lin, "Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: a review," *Applied Ecology and Environmental Research*, Vol. 16, No. 1, 2017, pp. 225-249.
- [11] S. Chongkhong, "Response surface optimization of ethanol production from banana peels by organic acid hydrolysis and fermentation," *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, Vol. 39, No. 2, 2017, pp. 245-252.
- [12] B.A. Anhwange, T.J. Ugye and T.D. Nyiaatagher, "Chemical composition of *Musa sapientum* (Banana) peels," *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 8, No. 6, 2009, pp. 437-442.
- [13] D. Mohapatra, S. Mishra and N. Sutar, "Banana and its by-product utilisation: an overview," *Journal of Scientific and Industrial Research*, Vol. 69, 2010, pp. 323-329.
- [14] A.G. Waghmare and S.S. Arya, "Utilization of unripe banana peel waste as feedstock for ethanol production," *Bioethanol*, Vol. 2, 2016, pp.146-156.
- [15] J. Guo, Z. Li, L. Su, Y.F. Tsang, A.K. An and C.F. Yu, "Optimization of acid pretreatment and enzymatic hydrolysis on the production of ethanol fuel from waste banana peels," *Energy & Environment*, Vol. 29, No. 8, 2018, pp. 1354-1364.
- [16] H.S. Oberoi, P.V. Vadlani, L. Saida, S. Bansal and J.D. Hughes, "Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process," *Waste Management*, Vol. 31, No. 7, 2011, pp. 1576-1584.
- [17] A. Gebregergs, M. Gebresemati and O. Sahu, "Industrial ethanol from banana peels for developing countries: response surface methodology," *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, Vol. 18, No. 1, 2016, pp. 22-29.
- [18] A. Singh and N.R. Bishnoi, "Comparative study of various pretreatment techniques for ethanol production from water hyacinth," *Industrial Crops and Products*, Vol. 44, 2013, pp. 283-289.
- [19] Y. Madhumala, V. Naganuri and M. Mathad, "Bioethanol production from waste banana peel," *International Research Journal of Engineering and Technology*, Vol. 7, 2013, pp. 124-129.
- [20] S.G. Wi, I.S. Choi, K.H. Kim, H.M. Kim and H.-J. Bae, "Bioethanol production from rice straw by popping pretreatment," *Biotechnology for Biofuels*, Vol. 6, No. 1, 2013, pp. 1-7.

- [21] S. Ostadjoo, F. Hammerer, K. Dietrich, M.J. Dumont, T. Friscic and K. Auclair, "Efficient enzymatic hydrolysis of biomass hemicellulose in the absence of bulk water," *Molecules*, Vol. 24, No. 23, 2019, pp. 1-12.
- [22] J. Zeghlouli, G. Christophe, A. Guendouz, C. El Modafar, A. Belkamel, P. Michaud and C. Delattre, "Optimization of bioethanol production from enzymatic treatment of argan pulp feedstock," *Molecules*, Vol. 26, No. 9, 2021, pp. 1-12.
- [23] G.L. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Analytical Chemistry*, Vol. 31, No. 3, 1959, pp. 426-428.
- [24] C.C. Fu, T.C. Hung, J.Y. Chen, C.H. Su and W.T. Wu, "Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction," *Bioresource Technology*, Vol. 101, No. 22, 2010, pp. 8750-8754.
- [25] S. Palacios, H.A. Ruiz, R. Ramos-Gonzalez, J. Martínez, E. Segura, M. Aguilar, A. Aguilera, G. Michelena, C. Aguilar and A. Ilyina, "Comparison of physicochemical pretreatments of banana peels for bioethanol production," *Food Science and Biotechnology*, Vol. 26, No. 4, 2017, pp. 993-1001.
- [26] X. Lin, J. Fan, Q. Wen, R. Li, X. Jin, J. Wu, W. Qian, D. Liu, J. Xie, J. Bai and H. Ying, "Optimization and validation of a GC-FID method for the determination of acetone-butanol-ethanol fermentation products," *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 52, No. 3, 2014, pp. 264-270.
- [27] J. Singh, M. Suhag and A. Dhaka, "Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review," *Carbohydrate Polymers*, Vol. 117, No. 6, 2015, pp. 624-631.
- [28] G.I. Danmaliki, A.M. Muhammad, A.A. Shamsuddeen and B.J. Usman, "Bioethanol production from banana peels," *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, Vol. 10, No. 6, 2016, pp. 56-52.
- [29] L.J. Jönsson and C. Martín, "Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects," *Bioresource Technology*, Vol. 199, 2016, pp. 103-112.
- [30] A.K. Chandel, V.K. Garlapati, A.K. Singh, F.A.F. Antunes and S.S. da Silva, "The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization," *Bioresource Technology*, Vol. 264, 2018, pp. 370-381.
- [31] H.-T. Song, Y. Gao, Y.-M. Yang, W.-J. Xiao, S.-H. Liu, W.-C. Xia, Z.-L. Liu, L. Yi and Z.-B. Jiang, "Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates," *Bioresource Technology*, Vol. 219, 2016, pp. 710-715.
- [32] W. Xiao, H. Li, W. Xia, Y. Yang, P. Hu, S. Zhou, Y. Hu, X. Liu, Y. Dai and Z. Jiang, "Co-expression of cellulase and xylanase genes in *Saccharomyces cerevisiae* toward enhanced bioethanol production from corn stover," *Bioengineered*, Vol. 10, No. 1, 2019, pp. 513-521.

- [33] J. Li, P. Zhou, H. Liu, C. Xiong, J. Lin, W. Xiao, Y. Gong and Z. Liu, "Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies," *Bioresource Technology*, Vol. 155, 2014, pp. 258-265.
- [34] A.M. Lopes, E.X. Filho Ferreira and L.R.S. Moreira, "An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown," *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 125, 2018, pp. 632-645.
- [35] J.M. Arias, L.F.A. Modesto, I. Polikarpov and N. Pereira-Jr, "Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies," *Biotechnology Progress*, Vol. 32, No. 5, 2016, pp. 1222-1229.
- [36] Y. Arslan and N. Eken-Saracoglu, "Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol," *Bioresource Technology*, Vol. 101, No. 22, 2010, pp. 8664-8670.
- [37] B. Buaban, H. Inoue, S. Yano, S. Tanapongpipat, V. Ruanglek, V. Champreda, R. Pichyangkura, S. Rengpipat and L. Eurwilaichitr, "Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose fermenting *Pichia stipitis*," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 110, No. 1, 2010, pp. 18-25.
- [38] E. Palmqvist and B. Hahn-Hagerdal, "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanism of inhibition," *Bioresource Technology*, Vol. 74, No. 1, 2000, pp. 25-33.
- [39] N. Srirakul, S. Nitisinprasert and S. Keawsompong, "Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith," *Agriculture and Natural Resources*, Vol. 51, No. 6, 2017, pp. 512-519.
- [40] V. Rana, A.D. Eckard and B.K. Ahring, "Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus*," *SpringerPlus*, Vol. 3, No. 516, 2014, pp. 1-13.