Thesis Title	Application of Fungal Enzymes for Bio-ethanol Production from Agricultural Residues
Author	Miss Thanunchanok Chairin
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Advisor
	Asst. Prof. Dr. Chartchai Khanongnuch Co-advisor
	Prof. Dr. Yasuhiko Asada Co-advisor

ABSTRACT

The objectives of this study are to find out the applications of fungal enzymes for bio-ethanol production from agricultural residues. White-rot fungus was selected for laccase production and hydrolysate fungus was selected for cellulase and xylanase production. The optimum conditions for these enzymes and sugar production were investigated.

White-rot fungi were primary screened for laccase production by degrading with Poly-R dye and enzyme activity were determined using 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) as a substrate. Isolate WR710-1, which produced the highest laccase activity was selected from 31 isolates. Molecular identification using an ITS gene sequence analysis indicated that the selected isolate was *Trametes polyzona* (accession number JN848329). Mycelial colonies of *T. polyzona* on PDA media were off-white, showing high density, velvety texture, and abundant aerial hyphae.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Trametes polyzona WR 710-1 completed colonization of an entire Petri dish after 5 days at 37^{o}C. The fungus had generative hyphae with clamp connections, thin-walled and 1.5-2.5 µm wide.

In this study, the optimal conditions for laccase production were determined. Among 10 agricultural residues, orange peel showed the highest level of laccase at 12-14 days incubation (0.69 U/gds). The chemical composition of orange peel substrate was shown; 16.5% cellulose, 9.31% hemicelluloses, and 8.99% lignin. For cultures grown with different nitrogen sources, peptone exhibited the highest activity of laccase (1.67 U/gds). The optimal carbon to nitrogen (C/N) ratio was done by central composite design (CCD). From the significance equation, the optimal C/N ratio at a 15/2 % (w/v) when a predicted laccase activity of 1.0 U/gds. The solid to liquid (S/L ratio) of solid state cultivation condition was 1:4, initial pH of 6.0, incubated temperature at 37^{o}C, and an addition of 50 mM $CuSO_4$ increased the amount of laccase produced 4.48-folds.

Laccase from *T. polyzona*, was produced under solid state fermentation using the peel of Tangerine orange (*Citrus reticulata*) as a substrate, and was purified to homogeneity. This laccase was found to be a monomeric protein with a molecular mass of about 71 kDa estimated by SDS-PAGE. The optimum pH were 2.0 for ABTS, 4.0 for L-DOPA, guaiacol and catechol, and 5.0 for 2,6-DMP. The K_m value of the enzyme for substrate ABTS was 0.15 mM, its corresponding V_{max} value was 1.84 mM min^{-1} and k_{cat}/K_m value was 3960 s^{-1} mM^{-1}. The enzyme activity was stable between pH 6.0 and 8.0, and temperature up to 40 ^{o}C. Laccase was inhibited more than 50 % by 20mM NaCl, 95 % inhibition at 5 mM of Fe^{2+} and completely inhibited by 0.1 mM NaN_3. The N-terminal amino acid sequence of this laccase was

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

AVTPVADLQISNAGISPDTF, which is highly similar to laccases from other white-rot basidiomycetes.

Purified laccase from *T. polyzona* was used as biocatalyst for bisphenol A biodegradation and decolorization of synthetic dyes. Degradation of bisphenol A by laccase with or without redox mediator, 1-hydroxybenzotriazole (HBT), was studied. A quantitative analysis by HPLC showed that bisphenol A was rapidly oxidized by laccase with HBT. Bisphenol A was completely removed within 3 hours and 4-isopropenylphenol was found to be the oxidative degradation product from bisphenol A when analyzed by GC-MS. All synthetic dyes used in this experiment, Bromophenol Blue, Remazol Brilliant Blue R, Methyl Orange, Relative Black 5, Congo Red, and Acridine Orange were decolorized by *Trametes*' laccase and the percentage of decolorization increased when 2mM HBT was added in the reaction mixture. This is the first report showing that laccase from *T. polyzona* is an effective enzyme for environmental detoxification, bisphenol A degradation and synthetic dye decolorization.

Three lignocelluloses (sugarcane bagasse, coffee husk and rice husk) were used as solid substrates for bio-ethanol fermentation. Pretreatment of lignocelluloses were done by biological (by *T. polyzona*) and chemical methods. The surface morphology of these lignocelluloses, showed some decreasing in cell wall thickness and crystallinity during pretreatment. Lignin content was greatly removed by 2% NaOH (remaining lignin 8.73%) followed by enzymatic pretreatment (23.13%) while, lignin content was unchanged when pretreated by 2% H_2SO_4. Cellulose content significantly increased to 59.65% by alkali, 43.89% by acid pretreatment, and slightly increased by using biological pretreatment (38.87%). Although, the cellulose content in samples

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

pretreated biologically were low, but their surface structure contained a lot of micro-pores, increasing the available surface area (pore volume) leading to an increase of fungal hydrolysis by *Thermoascus aurantiacus*. Total soluble sugar increased 85% when compared with untreated control.

The optimal growth conditions for production of cellulase and xylanase by *Thermoascus aurantiacus* SL16W were studied. The fungus *T. aurantiacus* completely covered a PDA Petri dish after 4 days (colony diameter of 9 cm) and spores were produced on the 7^{th} day at the optimal incubation temperature (45^{o}C). Among different residues, coffee husk ensured the highest cellulase (8.72 U/mg) and xylanase (86.6 U/mg) yield. Three agricultural wastes with high enzyme activity (Rice husk, coffee husk and sugarcane bagasse) were combined following a mixture design experiment. From the significance quadratic model, the optimal combination ratio for both cellulase and xylanase production were 37% (w/w) rice husk; 6% (w/w) coffee husk and 57% (w/w) sugarcane bagasse, when the predicted activity of cellulase was 20.0 U/mg and xylanase was 157 U/mg. Among the cultures tested with different sources of nitrogen, peptone showed the highest activity for both cellulase and xylanse 13.08 and 253.92 U/gds, respectively. The optimal concentration of each component in mineral solution was determined by a CCD experiment. From the significance quadratic model, the optimal concentration of mineral solution components were 0.89 %(w/v) of peptone, 0.46 %(w/v) of KH_2PO_4, 0.09 %(w/v) of $MgSO_4.7H_2O$ and 0.07 %(w/v) of $CaCl_2.2H_2O$ when predict activity of cellulase was 47.25 U/gds and xylanase was 333.06 U/gds. The modified mineral solution following CCD experiment showed an increase of cellulase and xylanase activities, 58.03 and 57.86% respectively, when compared with the mineral solution control. Moreover, the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

S/L ratio for solid state cultivation was 1:4, with a range of pH 6.0-8.0 and incubated at 45^{o}C for 10-12 days was optimal for cellulase (112.3 U/gds), and xylanase (989.2 U/gds) production. Characterization of cellulase and xylanase showed that cellulase activity was highly stable in the pH 6.0-8.0 range and 30-50^{o}C temperature range. Xylanase activity showed a high stability in the pH 4.0-8.0 range and 30-65^{o}C temperature range for 1 hr.

Fungal hydrolysis by *T. aurantiacus* showed the highest production of range reducing sugar (0.15 mg/ml) at the 10th day of incubation. The pretreated substrates produced more reducing sugars compared with control (unpretreated) substrates, increasing the rate by 78.72%. The optimal levels of some important factors; initial pH, the inoculums (yeast) concentration, and the incubation time of ethanol fermentation by *Sacchromycetes cerevisiae* were done by CCD experiment. The optimal values of the test variables were pH 5.04, the concentration of inoculums was 1.97 % and incubation time 22.27 hr, and the predicted ethanol production (0.31 g/L) was observed when initial sugar was about 3 mg/ml. For ethanol production by separate saccharification and fermentation was 4.6 g/L of ethanol were produced from 19.3 mg/ml of initial reducing sugar. Based on a theoretical yield of 0.51 g ethanol/g sugars, the ethanol yield from this experiment was calculated to be 0.24 g ethanol/g sugar or 47.06 % of the theoretical yield.

Keywords: biological pretreatment, fungal hydrolysis, white-rot fungus, enzyme, bio-ethanol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากฟังไจเพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร

ผู้เขียน นางสาวธนัญชนก ไชยรินทร์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ศ. ดร. สายสมร ลำยอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. ชาติชาย โขนงนุช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof. Dr. Yasuhiko Asada อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้คือ ศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากฟังไจเพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร ซึ่งรวมไปถึงการคัดเลือก white-rot fungus ที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสซึ่งใช้ในกระบวนการ pretreatement การใช้ฟังไจเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสซึ่งใช้ในกระบวนการ hydrolysis และการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากประบวนการ hydrolysis

การคัดเลือกหาฟังไจที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยเบื้องต้นโดยใช้ Poly-R dye และตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ 2,6-DMP เป็นสับสเตรตนั้น พบว่าตัวอย่าง WR710-1 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงที่สุดจากทั้งหมด 31 ตัวอย่าง และเมื่อบ่งชนิดด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลจากลำดับเบสในส่วน ITS ของ rRNA พบว่าคือ *Trametes polyzona* (GenBack accession number JN848329) ซึ่งเส้นใยของฟังไจชนิดนี้บนอาหารแข็ง PDA จะมีสีขาวลักษณะเหมือนกำมะหยี่ หนาแน่น และฟู โดยจะใช้เวลา 5 วันในการเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (9 cm) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C และเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเส้นใยที่มีขนาด 1.5-2.5 µm รวมถึงพบ clamp connections

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยฟังไจ *T. polyzona* พบว่าเปลือกส้มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเมื่อตรวจสอบจากวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรทั้งหมด 10 ชนิด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 0.69 U ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง เมื่อบ่มไว้ 12-14 วัน ซึ่งเมื่อตรวจสอบหาองค์ประกอบหลักในเปลือกส้มตัวอย่างพบเซลลูโลสร้อยละ 16.5 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 9.31 และลิกนินร้อยละ 8.99 จากนั้นเมื่อทดลองใส่ peptone ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 1.67 U ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นและสูงกว่าตัวแปรควบคุม (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน) อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) เมื่อใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ central composite design (CCD) คือ 15/2 %(w/v) ส่วนสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคสอื่นๆ ในกระบวนการผลิตแบบ solid state cultivation ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว (S/L ratio) คือ 1:4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิในการบ่มคือ 37^{o}C และการเติม $CuSO_4$ ความเข้มข้น 50 mM จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้น 4.48 เท่า เมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุม

จากนั้นผลิตเอนไซม์แลคเคสตามสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น และนำเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์ (purification) ผลที่ได้พบว่าแลคเคสที่ผลิตจาก *T. polyzona* เป็น monomeric protein และจากการตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE แลคเคสมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 71 kDa และที่ N terminal ของสายโปรตีนมีลำดับกรดอมิโนคือ AVTPVADLQI SNAGISPDTF จากนั้นเมื่อตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆของเอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์พบว่า ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับสับเสรต ABTS คือ 2.0 สำหรับ L-DOPA, guaiacol และ catechol คือ 4.0 และสำหรับ 2,6-DMP คือ 5.0 โดยเมื่อตรวจสอบความจำเพาะ (substrate specificity) ของเอนไซม์แลคเคสกับ ABTS ที่ความเข้มข้น 0.15 mM พบว่ามีความจำเพาะมากกว่าสับเสรตอื่นๆ โดยมีค่า V_{max} เท่ากับ 1.84 mM min^{-1} และค่า k_{cat}/K_m เท่ากับ 3960 s^{-1} mM^{-1} ซึ่งเอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์มีความเสถียร (enzyme stability) อยู่ระหว่างค่า pH ที่ 6.0 และ 8.0 และอุณหภูมิ 40 ^{o}C ซึ่งค่าความเสถียรจะลดลงร้อยละ 50 เมื่อเติม NaCl ความเข้มข้น 20mM และลดลงร้อยละ 90 ด้วยการเติม Fe^{2+} เข้มข้น 5 mM และจะไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เลยเมื่อเติม NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM ลงไปในสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง

ซึ่งคุณสมบัติหนึ่งของเอนไซม์แลคแคสคือเป็น biocatalyst ในการย่อยสลายสารพิษ bisphenol A โดยผลการทดลองพบว่า bisphenol A สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วภายใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระยะเวลา 3 ชั่วโมงเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี HPLC โดยเอนไซม์แลคเคสที่ทำงานร่วมกับ redox mediator คือ 1-hydroxybenzotriazole (HBT) และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี GC-MS พบว่าผลผลิตที่ได้จากการย่อย bisphenol A คือ 4-isopropenylphenol นอกจากนี้เอนไซม์แลคเคสยังสามารถย่อยสีสังเคราะห์ (synthetic dyes) ได้ โดยทดสอบในสีสังเคราะห์ 6 ชนิดคือ Bromophenol Blue, Remazol Brilliant Blue R, Methyl Orange, Relative Black 5, Congo Red, และ Acridine Orange ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของการย่อยเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเอนไซม์แลคเคสทำงานร่วมกับ redox mediator การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตได้จาก *T. Polyzona* มีประสิทธิภาพในการย่อยสารพิษในธรรมชาติได้

กระบวนการ pretreatment ของวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร 3 ชนิด (กากชานอ้อย เปลือกกาแฟ และแกลบ) ที่ผสมรวมกันเพื่อใช้เป็นสับสเตรตเพื่อผลิตไบโอเอทานอล โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาถึงวิธี pretreatment ด้วยวิธีชีวภาพ (biological pretreatment) ด้วย *T. polyzona* WR710-1 และการใช้สารเคมี (chemical pretreatment) แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของลักษณะพื้นผิว (surface morphology) สับสเตรตที่เกิดขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการ pretreatment ด้วยกล้องจุลทรรศอิเล็คตรอน พบว่าที่ผิวนอกของสับสเตรตทั้ง 3 ชนิดมีความหนาลดลง พบรูบนพื้นผิว และเส้นใย (fibre) จับกันอย่างหลวมขึ้น และเมื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี (chemical composition) ของสับสเตรต พบว่าปริมาณลิกนิน ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 8.73 เมื่อ pretreatment ด้วย NaOH เข้มข้น 2% ตามด้วยเอนไซม์จากฟังไจมีปริมาณลิกนินร้อยละ 23.13 ในขณะที่ pretreatment ด้วย H_2SO_4 เข้มข้น 2% ไม่ทำให้ปริมาณลิกนินลดลงเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ เมื่อลิกนินถูกกำจัดก็ทำให้ปริมาณเซลลูโลสโดยรวมเพิ่มขึ้น โดยคิดเป็นร้อยละ 59.65 เมื่อใช้ย่อยด้วยด่างอ่อน มีปริมาณร้อยละ 43.89 เมื่อย่อยด้วยกรด ส่วนการใช้วิธีทางชีวภาพพบเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย คือมีปริมาณร้อยล่ะ 38.87 ของปริมาณองค์ประกอบโดยรวม ซึ่งถึงแม้ปริมาณเซลลูโลสในสับสเตรตที่ผ่านกระบวนการ pretreatment แบบชีวภาพจะมีปริมาณน้อย แต่ที่พื้นผิวของสับสเตรตพบรูพรุนขนาดเล็ก (micro-pores) จำนวนมาก ซึ่งส่งผลดีต่อกระบวนการ hydrolysis เห็นได้จากเมื่อใช้ฟังไจ *Thermoascus aurantiacus* ในกระบวนการนี้เพื่อเปลี่ยนสับสเตรตจำพวก lignocellulose เป็นน้ำตาล พบว่าปริมาณน้ำตาลรวม (total soluble sugar) เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 85 เมื่อเทียบกับสับสเตรตที่ไม่ผ่านกระบวนการ pretreatment

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลู-เลสและไซแลนเนสโดยใช้ฟังไจ *Thermoascus aurantiacus* SL16W เพื่อใช้ในกระบวนการ hydrolysis ผลการศึกษาพบว่าเส้นใยของฟังไจเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อในวันที่ 4 ของการบ่ม และฟังไจผลิตสปอร์ในวันที่ 7 ของการบ่มที่อุณหภูมิ 45°C และเมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดโดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ผลที่ได้พบว่าเปลือกกาแฟเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส สูงที่สุด คือ 8.72 U/mg และ 86.6 U/mg ตามลำดับ จากนั้นเมื่อผสมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 3 ชนิด (ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูง 3 เป็นอันดับแรก) ได้แก่ เปลือกกาแฟ กากชานอ้อยและแกลบ ด้วยวิธีทางสถิติ เลือกแบบการทดลอง mixture design พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ แกลบ / เปลือกกาแฟ / กากชานอ้อย เท่ากับ 37: 6: 57 % (w/w) จะทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสับสเตรตเพียงชนิดเดียว ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้คือ peptone ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 13.08 U/gds และไซแลนเนสเท่ากับ 253.92 U/gds และจากการวิเคราะห์ทางสถิติตามการทดลองแบบ CCD พบว่าปริมาณของธาตุอาหารในสารละลายแร่ธาตุ (mineral solution) ที่เหมาะสมคือ peptone ปริมาณ 0.89 %(w/v) KH_2PO_4 0.46 %(w/v) $MgSO_4.7H_2O$ 0.09 %(w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ เท่ากับ 0.07 %(w/v) ซึ่งสารละลายธาตุอาหารที่ปรับปรุงสูตรแล้วนี้ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสเพิ่มขึ้น 58.03 และ 57.86 % ตามลำดับเมื่อเทียบสารละลายแร่ธาตุชนิดเดิม นอกเหนือจากนี้สภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ที่ส่งผลฟังไจสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือที่ S/L ratio เท่ากับ 1:4 ค่า pH เท่ากับ 6.0-8.0 อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 45°C และระยะเวลาในการบ่มเท่ากับ 10-12 วัน โดยเอนไซม์เซลลูเลส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 112.3 U/gds และ ไซแลนเนสเพิ่มเป็น 989.2 U/gds ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่ช่วง pH 6.0-8.0 และอุณหภูมิ 30-50°C ส่วนเอนไซม์ไซแลนเนสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่ช่วง pH ที่กว้างกว่าคือ 4.0-8.0 และอุณหภูมิ 30-65°C ในระยะเวลาบ่ม 1 ชั่วโมง

หลังจากที่สับสเตรตผ่านกระบวนการ pretreatment ด้วยวิธีทางชีวภาพดังกล่าวแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือกระบวนการ hydrolysis เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล ซึ่งเมื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากฟังไจ *T. aurantiacus* เท่ากับ 0.15 mg/ml ในวันที่ 10 ของการบ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดตัวแปรควบคุม (ไม่ผ่านกระบวนการ pretreatment) ถึง 78.72 % หลังจากนั้นนำสารละลายน้ำตาลไปทำให้เข้มข้นถึงประมาณ 3 mg/ml และนำไปหาระดับปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีส *Sacchromycetes cerevisiae* ในการหมัก ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติตามการทดลองแบบ CCD พบว่าระดับปัจจัยที่เหมาะสมคือที่ pH เท่ากับ 5.04 ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น (inoculums) เท่ากับ 1.97% และ ระยะเวลาบ่มเท่ากับ 22.27 ชั่วโมง ทำให้ผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.31 g/L และเมื่อนำสารละลายน้ำตาลไปทำให้เข้มข้นถึงประมาณ 20 mg/ml ปริมาณเอทานอลที่วัดได้เท่ากับ 4.6 g/L ในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้คิดเป็น 0.24 g ethanol/g sugar หรือคิดเป็น 47.06 % ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ตามทฤษฎี (Theoretical yield)

คำสำคัญ: กระบวนการ pretreatment ด้วยวิธีชีวภาพ การใช้ฟังไจ hydrolysis white-rot fungi เอนไซม์ ไบโอเอทานอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved