วิทยานิพนธ์

การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อผลิตเอทานอล จากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก

PRETREATMENT OF WASTE PAPER SLUDGE FOR ETHANOL PRODUCTION BY ENZYMATIC SACCHARIFICATION AND FERMENTATION

นางสาวอิสรี รอดทัศนา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อผลิตเอทานอล
จากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก

Pretreatment of Waste Paper Sludge for Ethanol Production by
Enzymatic Saccharification and Fermentation

นามผู้วิจัย นางสาวอิสรี รอดทัศนา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มณฑล ฐานุตตมวงศ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จีมา ชมสุรินทร์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัญญา สิริวิทยาปกรณ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
(อาจารย์ธนาวดี ลี้จากภัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มงคล ดำรงศรี, Dr.Ing.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อผลิตเอทานอล จากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก

Pretreatment of Waste Paper Sludge for Ethanol Production by Enzymatic Saccharification and Fermentation

โดย

นางสาวอิสรี รอดทัศนา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)
พ.ศ. 2550

อิสรี รอดทัศนา 2550: การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อผลิตเอทานอลจากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม) สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์มณฑล ฐานุตตมวงศ์, Ph.D. 156 หน้า

กากตะกอนเยื่อกระดาษเป็นชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลส 51% เฮมิเซลลูโลส 39% และลิกนิน 7% (ของน้ำหนักแห้ง) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำไปเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอล แต่จำเป็นต้องทำการปรับสภาพขั้นต้นก่อนเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง สภาวะที่เหมาะสมคือการใช้กรดซัลฟูริกเจือจางความเข้มข้น 2% อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพ 120 °C เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาผ่านกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง) เกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 76.05 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษและเมื่อนำมาหมักโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เกิดเป็นเอทานอล 21.50 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ โดยเกิดเอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 60 ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 70.59% เมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปพบว่าทำให้เกิดเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 27.55 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ โดยเกิดเอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 40 ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 88.24% ดังนั้นในการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่างจึงเป็นการเพิ่มปริมาณเอทานอลและช่วยลดระยะเวลาในการหมักลง

ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยโอโซน สภาวะที่เหมาะสมคือ การใช้โอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 45 นาที (ค่าความเป็นกรดด่าง 10.0) แล้วนำมาผ่านกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง) เกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 54.7 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ และเมื่อนำมาหมักจะเกิดเป็นเอทานอล 19.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ โดยเกิดเอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 40 ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 90.59%

_____ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Isaree Rodtusana 2007: Pretreatment of Waste Paper Sludge for Ethanol Production by Enzymatic Saccharification and Fermentation. Master of Engineering (Environmental Engineering), Major Field: Environmental Engineering, Department of Environmental Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Monthon Thanuttamavong, Ph.D. 156 pages.

Waste paper sludge (WPS) is a lignocellulose biomass that consists of 51% cellulose, 39% hemicellulose and 7% lignin on dry solid basis which should be potentially used for ethanol production. To produce ethanol from WPS was initially pretreated in order to improve efficiency. The optimum conditions for dilute acid pretreatment was 2% H_2SO_4 at 120°C for 60 minutes and enzymatic saccharification (pH 5.5 , 50°C, 10 h) using cellulase enzyme, the reducing sugar concentration obtained was 76.05 mg/g WPS and then fermented by yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The results that the ethanol yield was 21.50 mg/g WPS, maximum rate of ethanol production after fermented 60 h and fermentation efficiency 70.59%, when detoxification of the dilute acid pretreatment by overliming use $Ca(OH)_2$ increased the ethanol yield 27.55 mg/g WPS, maximum rate of ethanol production after fermented 40 h and fermentation efficiency 88.24% , so overlime increased the ethanol yield and decreased the fermentation time from 60 to 40 h.

The optimum conditions for ozone was used flow air into ozone generator 4 l/min contact time 45 minutes (pH 10.0) and enzymatic saccharification (pH 5.5 , 50°C, 10 h) using cellulase enzyme, the reducing sugar concentration obtained was 54.7 mg/g WPS and then fermented by yeast *S. cerevisiae*. The results that the ethanol yield was 19.6 mg/g WPS, maximum rate of ethanol production after fermented 40 h and fermentation efficiency 90.59%.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มณฑล ฐานุตตมวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จีมา ชมสุรินทร์ อาจารย์สัญญา สิริวิทยาปกรณ์ และ ดร.ธนาวดี ลี้จากภัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำเพื่อตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ปั้นสุวรรณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความรู้และให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ตัวอย่างทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมทุกๆท่านที่อบรมสั่งสอนถ่ายทอดวิชาความรู้แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด และขอบคุณเจ้าหน้าที่จากภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง ที่ให้ความสนับสนุน ความช่วยเหลือ ความรัก ความเมตตา และกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด สุดท้ายขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆน้องๆทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี

อิสรี รอดทัศนา

ตุลาคม 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)
สารบัญตาราง (2)
สารบัญภาพ (9)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (13)
คำนำ 1
วัตถุประสงค์ 3
การตรวจเอกสาร 4
อุปกรณ์และวิธีการ 43
อุปกรณ์ 43
วิธีการ 46
ผลและวิจารณ์ 54
สรุปและข้อเสนอแนะ 103
สรุป 103
ข้อเสนอแนะ 105
เอกสารและสิ่งอ้างอิง 106
ภาคผนวก 111
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์ 112
ภาคผนวก ข การทดสอบอัตราการผลิตโอโซน 124
ภาคผนวก ค ตารางผลการทดลอง 127
ภาคผนวก ง ตัวอย่างการคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ 148
ภาคผนวก จ การคำนวณต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ 153
ประวัติการศึกษาและการทำงาน 156

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบทางเคมีของเส้นใยวัตถุดิบต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษ	4
2	พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์	47
3	คุณลักษณะและองค์ประกอบในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบดแต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี	54
4	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิ120 °C เป็นเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์และชุดที่ไม่มีการเติมด่างลงไป	80
5	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิ140 °C เป็นเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์และชุดที่ไม่มีการเติมด่างลงไป	81
6	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิ160 °C เป็นเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์และชุดที่ไม่มีการเติมด่างลงไป	82
7	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิ180 °C เป็นเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์และชุดที่ไม่มีการเติมด่างลงไป	83

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล	94
9	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 30 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล	95
10	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 45 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล	96
11	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล	97
12	การเปรียบเทียบความเหมาะสมของวิธีการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นโดยการใช้กรดเจือจางและการใช้โอโซน	98
13	การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ	100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ก1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน 112

ข1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลอากาศและอัตราการผลิตโอโซน 125

ข2 ปริมาณโอโซนที่เติมลงในน้ำที่ระยะเวลาในการป้อนโอโซนต่างๆ 126

ค1 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก1% อุณหภูมิ 120 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 128

ค2 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 120 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 128

ค3 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก2% อุณหภูมิ 120 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 129

ค4 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 120 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 129

ค5 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก3% อุณหภูมิ 120 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 130

ค6 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 120 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 130

ค7 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก1% อุณหภูมิ 140 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 131

ค8 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 140 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 131

ค9 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก2% อุณหภูมิ 140 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 132

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค10 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 140 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 132

ค11 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก3% อุณหภูมิ 140 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 132

ค12 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 140 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 133

ค13 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก1% อุณหภูมิ 160 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 134

ค14 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 160 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 134

ค15 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก2% อุณหภูมิ 160 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 135

ค16 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 160 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 135

ค17 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก3% อุณหภูมิ 160 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 136

ค18 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 160 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 136

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค19 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก1% อุณหภูมิ 180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 137

ค20 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 137

ค21 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก2% อุณหภูมิ 180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 138

ค22 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 138

ค23 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก3% อุณหภูมิ 180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 139

ค24 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 139

ค25 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 140

ค26 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 140

ค27 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 141

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค28 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 141

ค29 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน30นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 142

ค30 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน30นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 142

ค31 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน30นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 143

ค32 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน30นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 143

ค33 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 144

ค34 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 144

ค35 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 145

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค36 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 145

ค37 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน60นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 146

ค38 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน60นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 146

ค39 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน60นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 147

ค40 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน60นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 147

ง1 การคำนวณอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะและอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ 149

จ1 การคำนวณค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ 155

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของเอทานอล	5
2	โครงสร้างในเซลล์พืชซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	7
3	ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส	8
4	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	9
5	โครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน	10
6	กระบวนการการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	12
7	กระบวนการย่อยเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส	16
8	กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	18
9	กลไกการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส	18
10	ลักษณะของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถ่ายจากกล้อง Scanning electron micrograph กำลังขยาย 5000 เท่า	21
11	การผลิตเอทานอลด้วยน้ำตาลเฮกโซสโดยยีสต์ผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas pathway	28
12	ลักษณะการเจริญของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง	30
13	ลักษณะการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ในการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง	34
14	จุดเก็บตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษจากบริษัทคิมเบอลี่-คล้ากประเทศไทย จำกัด	46
15	แผนผังขั้นตอนการทดลองการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยทำการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง	50
16	แผนผังขั้นตอนการทดลองการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยทำการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน	53
17	กากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งจากจุดที่ 3 ซึ่งนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล	55
18	การเปรียบเทียบผลของความเป็นกรดด่างและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์เมื่อปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางความเข้มข้น 0 - 2% (โดยปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ120 °C เป็นระยะเวลา60 นาที	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังจากปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง เมื่อใช้ความเข้มข้นกรด 0-2% โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในการปรับสภาพ ตั้งแต่ 120-180 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ แล้วผ่านการย่อยเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์	60
20	การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง มาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยไม่มีการลดความเป็นพิษ ด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป	64
21	การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง มาหมักเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อมีการลดความเป็นพิษ โดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป	65
22	การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง มาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยไม่มีการลดความเป็นพิษ ด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป	68
23	การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง มาหมักเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อมีการลดความเป็นพิษ โดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป	69
24	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง มาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยไม่มีการลดความเป็นพิษ ด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง มาหมักเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อมีการลดความเป็นพิษ โดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป	72
26	การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง มาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยไม่มีการลดความเป็นพิษ ด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป	74
27	การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง มาหมักเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อมีการลดความเป็นพิษ โดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป	75
28	การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นของน้ำหมัก โดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษโดยการเติม ด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์และชุดที่ไม่มีการลดความเป็นพิษ	77
29	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อปรับสภาพด้วยโอโซน ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ เมื่อใช้อัตราการไหลอากาศตั้งแต่ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15-60 นาที	86
30	การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์ในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15-60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15-60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล	90
32	การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15-60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล	91
33	การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นในน้ำหมัก เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15-60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล	92

ภาพผนวกที่

ก1	มาตรฐานสำหรับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	115
ข2	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอากาศและอัตราการผลิตโอโซนของเครื่องผลิตโอโซน	126
ง1	การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด	150
ง2	การคำนวณค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	151

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

K_d	=	อัตราการการตายจำเพาะของจุลินทรีย์ (h^{-1})
P	=	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ (g/l)
P_{max}	=	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (g/l.h)
$q_{p,max}$	=	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด (g/g.h)
$q_{s,max}$	=	อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด (g/g.h)
S	=	ความเข้มข้นของสารอาหาร (g/l)
t	=	เวลา (h)
T	=	อุณหภูมิ (°C)
x	=	ความเข้มข้นของเซลล์ (g/l)
$Y_{p/s}$	=	ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร (g ethanol/g sugar.h)
$Y_{x/s}$	=	ค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหาร (g cell/g sugar.h)
μ_{max}	=	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (h^{-1})

การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อผลิตเอทานอล จากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก

Pretreatment of Waste Paper Sludge for Ethanol Production by Enzymatic Saccharification and Fermentation

คำนำ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษในประเทศไทยได้มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะการผลิตเยื่อกระดาษจากกระดาษที่ใช้แล้ว (recycled paper) อย่างไรก็ตามพบว่ากระบวนการผลิตเยื่อกระดาษโดยกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างตามมา โดยเฉพาะปัญหาการสูญเสียเยื่อกระดาษในปริมาณสูง ซึ่งส่งผลให้ถึงแม้จะมีการบำบัดน้ำเสียแล้ว แต่ก็ยังเป็นผลให้กากตะกอน (sludge)นั้น มีส่วนที่เป็นเยื่อกระดาษเจือปนอยู่เป็นจำนวนมากเรียกว่า กากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) ซึ่งเป็นเยื่อขนาดสั้นเนื่องจากผ่านการผลิตหลายครั้งไม่เหมาะสมจะนำกลับไปใช้ใหม่ในกระบวนการผลิตกระดาษ ทางโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษมักมีการนำไปกำจัดโดยวิธีการฝังกลบ ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงในส่วนของการกำจัดกากตะกอน ทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมตามมาอีกด้วย

จากปัญหาที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษที่ใช้แล้วดังกล่าวไว้ข้างต้น จึงเกิดแนวคิดในการแก้ปัญหาโดยการนำเอากากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งจัดเป็นชีวมวลที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (cellulosic biomass) มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ซึ่งพบว่ามีความเป็นไปได้ เนื่องจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหล่านี้ มีองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลส 50% , เฮมิเซลลูโลส 25% , ลิกนิน 15% และ อื่นๆ 10% (Ye Sun, 2002) ทั้งนี้ถึงแม้ว่าในต่างประเทศจะเคยมีการศึกษาวิจัยในด้านของการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส เช่น เยื่อไม้ กระดาษหนังสือพิมพ์ ซังข้าวโพด ฟางข้าว เป็นต้น (Ballesteros, 2004) แต่ก็ยังพบว่าให้ผลผลิตเอทานอลต่ำในขณะที่มีต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการปรับปรุงขั้นตอนและวิธีการต่างๆเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงขึ้น สามารถดำเนินการได้จริงในทางปฏิบัติและมีความคุ้มทุนมากยิ่งขึ้น

ซึ่งจากแนวคิดดังกล่าวจะเป็นการลดปริมาณของเสียที่ทางโรงงานผลิตกระดาษจะต้องนำไปฝังกลบ ก่อให้เกิดผลดีต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นการลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังได้ผลผลิตคือเอทานอลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทดแทนทางเลือกหนึ่งมาใช้ประโยชน์ เป็นการสอดคล้องกับแนวพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ ด้านการพัฒนาพลังงานทดแทนเพื่อลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ (คณะกรรมการพลังงาน, 2545) จึงทำให้มีหลายหน่วยงานทำการศึกษาวิจัยเพื่อผลิตเอทานอลจากผลผลิตทางการเกษตรที่ปลูกได้เองภายในประเทศ เช่น มันสำปะหลัง อ้อย เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตทางการเกษตรเหล่านี้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์กอปรกับหากนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลก็จะมีต้นทุนในการซื้อวัตถุดิบ แต่ถ้าหากมีการนำกากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งเป็นของเสียที่เกิดขึ้นจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษมาใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งไม่ต้องซื้อแต่อย่างใดมาผลิตเป็นเอทานอลและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ก็จะเกิดผลดีเป็นอย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งเมื่อปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง (dilute acid pretreatment) และเปรียบเทียบผลของการลดความเป็นพิษ (detoxification) เมื่อใช้ด่าง (overliming) ประเภทแคลเซียมไฮดรอกไซด์

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งเมื่อปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน (ozone pretreatment)

ขอบเขตการวิจัย

1. ใช้ตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานคิมเบอร์ลี่-คล้าก ประเทศไทย จำกัด เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

2. ศึกษากระบวนการย่อยเซลลูโลสจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic Saccharification) และการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอล (fermentation)

3. ในกระบวนการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอลใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

สมมติฐานในการวิจัย

ในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งเมื่อปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง แล้วมีการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่างประเภทแคลเซียมไฮดรอกไซด์ควบคู่ไปด้วยจะเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้มากขึ้น

การตรวจเอกสาร

1. กากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง

กากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งเป็นของเสียจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษซึ่งจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตและกระบวนการผลิต โดยทั่วไปแล้วในการผลิตเยื่อและกระดาษจะใช้ไม้เป็นวัตถุดิบหลัก ซึ่งส่วนประกอบของไม้จะประกอบไปด้วยเส้นใยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แสดงองค์ประกอบดังตารางที่ 1 โดยมีลิกนินทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับไม้โดยยึดเกาะเส้นใยเซลลูโลสให้ติดกัน ในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษจึงมีการแยกลิกนินออกมาเพื่อให้เส้นใยสามารถกระจายตัวได้อย่างอิสระ

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมีของเส้นใยวัตถุดิบต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษในประเทศไทย

ชนิดของวัตถุดิบ	ร้อยละขององค์ประกอบ				
	Cellulose	Lignin	Hot water Soluble	Alcohol Benzene soluble	Ash
ฟางข้าว	28-41	10-17	13-17	1-7	14-22
ปอแก้ว	64	11-21	1.1	1.2	0.5
ชานอ้อย	26-39	19-22	3-11	3-11	1-5
ไม้ไผ่	35-47	22-30	16-21	3-6	1-5
ยูคาลิปตัส	47	20	2.4	1.5	0.4

ที่มา: UNEP (1996)

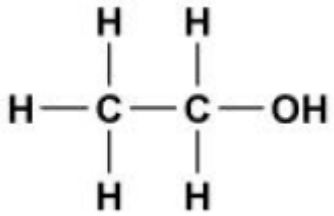
2. เอทานอล (Ethanol)

2.1 คุณสมบัติของเอทานอล

เอทานอลบริสุทธิ์มีคุณสมบัติดังนี้ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2529)

1) มีเนื้อแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 99.8 โดยทั่วไปมีน้ำเจือปนไม่เกินร้อยละ 5
2) เป็นสารละลายไม่มีสี ระเหยง่าย
3) จุดเดือด 78.32°C
4) ความถ่วงจำเพาะ 1.794 ที่ 60°C
5) จุดเยือกแข็ง -117.3 °C
6) ให้พลังงานความร้อน (Calorific Value) 12,800 Btu/lb
7) สามารถละลายในน้ำและสารอินทรีย์ได้ดี เช่น เมทานอล คลอโรฟอร์ม ฯลฯ

2.2 สูตรโครงสร้าง



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเอทานอล
ที่มา: มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2529)

2.3 ประโยชน์ของเอทานอล

เอทานอลใช้เป็นสารเคมีที่มีความเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวัน เช่น ทางด้านการแพทย์ เภสัชกรรม และสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเบนซินได้ นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบในเครื่องดื่มที่นิยมกันทั่วไป คือ สุรา เบียร์ และไวน์ เป็นต้น (เทพปัญญา, 2545)

3. แหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรหลายชนิดแบ่งออกเป็น 3 ประเภท

3.1 วัตถุดิบประเภทแป้ง (starchy material)

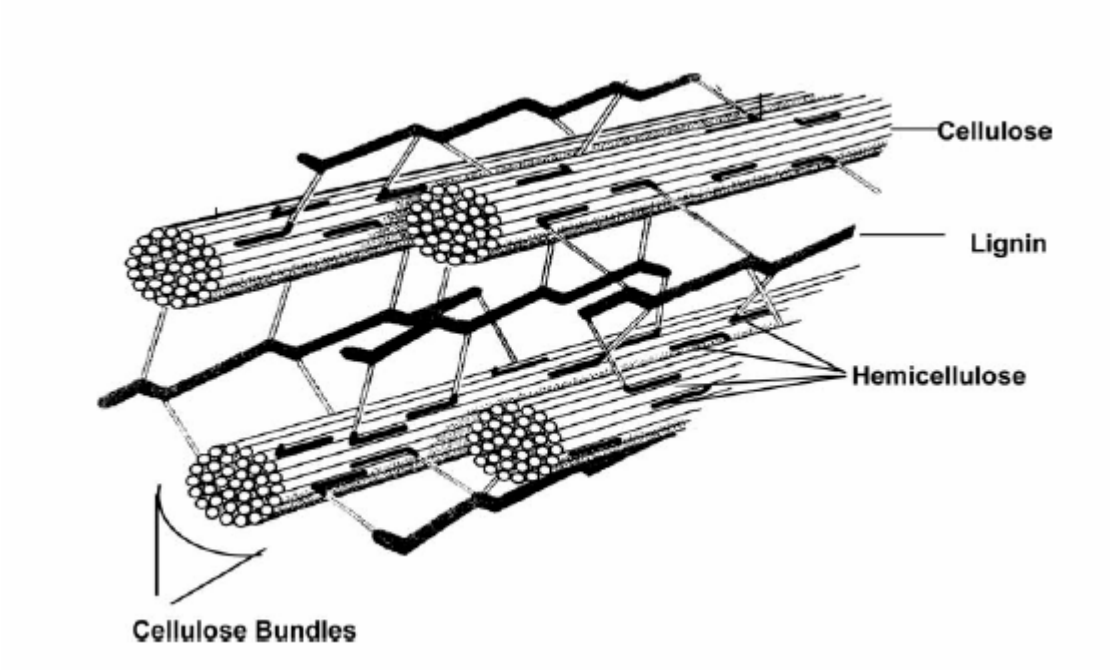
เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาเล่ย์ มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้นวัตถุดิบพวกนี้สามารถย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลได้โดยการใช้เอ็นไซม์หรือกรด แป้งที่สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ต้องเป็นแป้งที่สามารถละลายน้ำได้ในน้ำร้อน ซึ่งจะถูกเอ็นไซม์ย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ (เทพปัญญา, 2545)

3.2 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล (saccharide material)

เช่น อ้อย กากน้ำตาล ข้าวฟ่างหวาน หัวผักกาดหวาน เป็นต้น (ธีรภัทร, 2543)

3.3 วัตถุดิบที่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (cellulosic biomass)

เช่น ฟางข้าว ผักตบชวา หญ้าแฝก หรือเยื่อใยจากพืชชนิดต่างๆ (ธีรภัทร, 2543; อำนวย, 2548) วัสดุเหลือทิ้งจากโรงเลื่อย โรงงานทำกระดาษ กระดาษหนังสือพิมพ์ (เทพปัญญา, 2543) วัตถุดิบประเภทนี้มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักและมีองค์ประกอบอื่นๆ คือ ลิกนิน โปรตีน เถ้า และสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ (Murphy, 2005) แสดงลักษณะโครงสร้างดังภาพที่ 2 รายละเอียดดังนี้



ภาพที่ 2 โครงสร้างในเซลล์พืชซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
ที่มา: Ye Sun and Jiayang Cheng (2002)

3.3.1 เซลลูโลส

เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช พบตามผนังเซลล์ของพืชทุกชนิดมีหน้าที่ช่วย ทำให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักจะพบรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส กัม เพนโตแซน แทนนิน ไขมัน และสารเกิดสี เป็นต้น

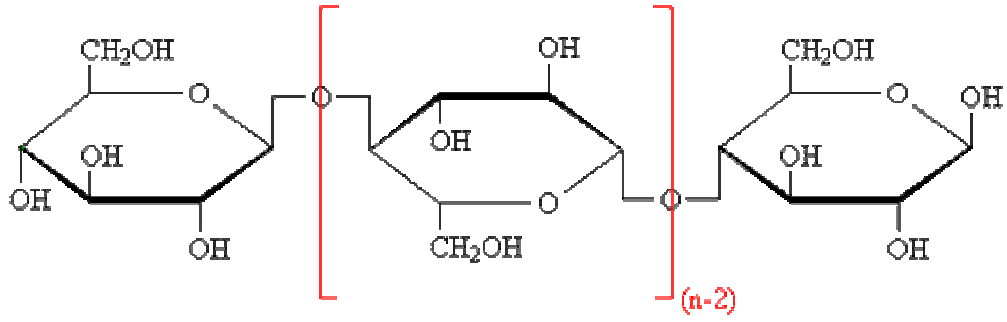
เซลลูโลสเป็นโฮโมโพลิเมอร์ (homopolymer) ที่มีลักษณะเป็นสายตรง ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ β-D-glucopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วย β-1,4-glycosidic bond เกิดเป็นสายกลูเคน แต่ละสายยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โครงสร้างเซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรทที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสหลายโมเลกุลเรียงต่อกันเป็นโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ (ระวีวรรณ, 2538; Joban, 2000)

โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสแสดงดังภาพที่ 3 การจัดเรียงตัวของกลูโคสอยู่ในลักษณะรูปเก้าอี้ แต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะไกลโคสิดิก ระหว่างคาร์บอนตัวที่หนึ่งของกลูโคสกับคาร์บอนตัวที่สี่ของกลูโคสตัวถัดไป เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตัวที่หนึ่งอยู่ในตำแหน่งเบต้าจึงเรียกพันธะนี้ว่า เบต้า-1-4-ไกลโคสิดิก (β-1,4-glycosidic) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไปคือ $-(C_6H_{10}O_5)_{n-}$ เมื่อ n คือจำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้างจำนวนเซลลูโลสในสายกลูโคสไม่สามารถทราบจำนวนที่ แท้จริงได้ เนื่องจากระหว่างสายเซลลูโลสจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนซึ่งเรียงแน่นเป็นมัดไมโครไฟบริลจึงมีความแข็งแรงและไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ใด ๆ ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามปริมาณการละลายในสารละลายโซเดียมไฮครอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด (TAPPI, 2000-2001) คือ

แอลฟา-เซลลูโลส คือ เซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น17.5 เปอร์เซ็นต์

เบต้า-เซลลูโลส คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

แกมม่า-เซลลูโลส คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น17.5 เปอร์เซ็นต์และสารละลายกรด สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์



ภาพที่ 3 ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส

ที่มา: Ballesteros and Oliva (2004)

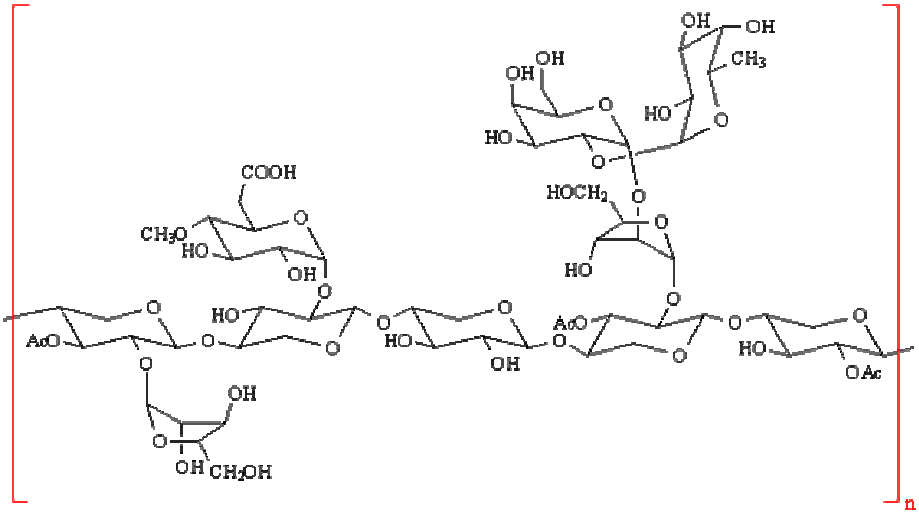
3.3.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยรวมอยู่กับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน เซลลูโลส เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ สูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{12}O_5)_{2n}$ เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตสซึ่งส่วนมากเป็น ดี-ไซแลน ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสหลาย ๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะเบต้า- 1-4-ไกลโคสิดิก (ระวีวรรณ, 2538; Joban, 2000) โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส แสดงดังภาพที่ 4 สายโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเฮทเทอโรจีนัสประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดปนกัน คือ

เพนโตแซน ส่วนใหญ่เป็นไซแลนและอะราแบนเมื่อนำไปย่อยจะได้น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส ไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่น

เฮกโซแซน ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน กาแลคแทน และกลูแคน เมื่อถูกย่อยจะได้น้ำตาล แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส ตามลำดับ

โพลียูโรไนด์ ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดโพลียูโรนิคและยังพบกรดยูโรนิคปนอยู่ด้วย ที่สำคัญคือ เฮกซูโลนิค

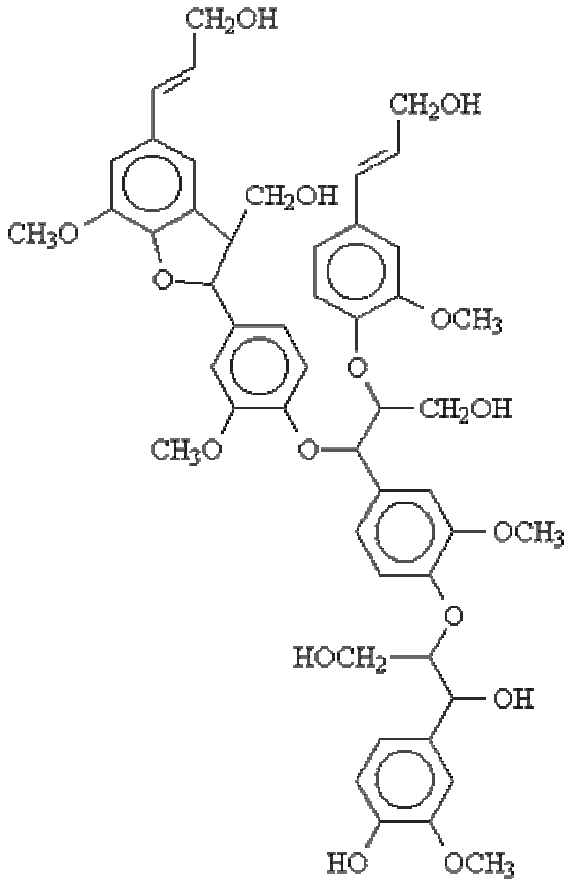


ภาพที่ 4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Ballesteros and Oliva (2004)

3.3.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นโพลีเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติกหรือที่เรียกว่าเป็นพีโนลิกาโพลิเมอร์ โดยมีหน่วย ฟีนิลโพรเพน เรียงต่อกันแบบสุ่ม ที่หน่วยฟีนอลอาจเป็นกัวอิเอซิล(guaiacyl) หรือไซรินกิล (syringyl) ที่ตำแหน่งแอลฟาและเบต้าของโมเลกุลลิกนิน อาจเกิดการเชื่อมกัน ระหว่างโมเลกุลหรือคาร์บอนในหน่วยฟีนอลอาจเกิดพันธะในอีกหน่วยหนึ่งภายในสายโพลีเมอร์ที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลลิกนิน โครงสร้างโมเลกุลลิกนินแสดงดังภาพที่ 5 ทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ในเอทานอลหรือ เมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปกติลิกนินจะอยู่ในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบ ๆ เซลลูโลส โดยเป็นตัวป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยอีกด้วย



ภาพที่ 5 โครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน

ที่มา: Glazer and Nikaido (1995)

4. กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นเซลลูโลส (cellulosic biomass)

กระบวนการผลิตเอทานอลที่สำคัญแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน แสดงดังภาพที่ 6 ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆดังต่อไปนี้

4.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)

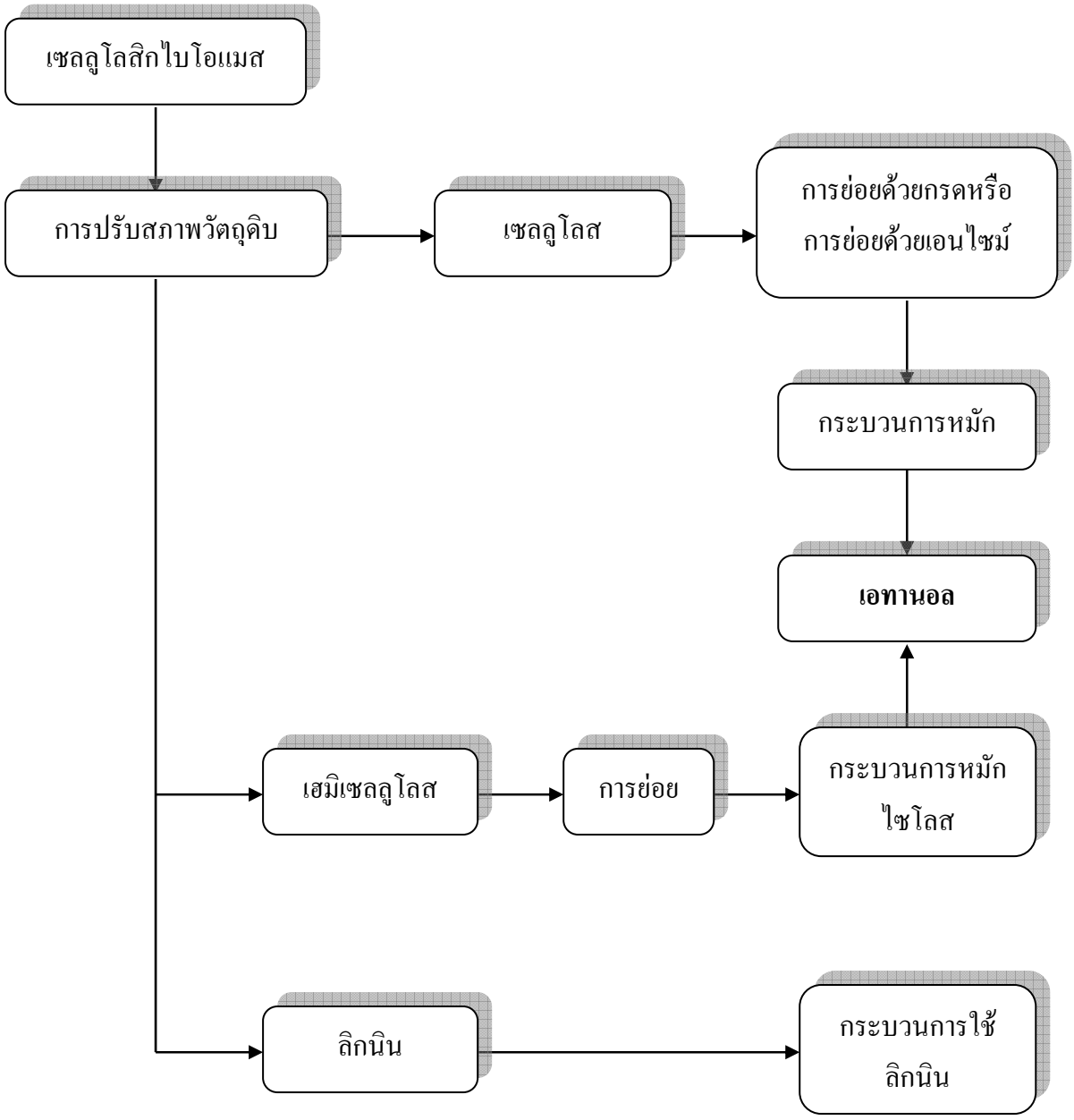
เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลอยู่ในรูปที่เป็นสารผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนที่นำมาใช้จริง คือ ส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เพราะส่วนประกอบทั้งสองทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักด้วย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการผลิตเอทานอล คือเพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกและเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ วิธีการปรับสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธีใหญ่ๆ คือ

4.1.1 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด การใช้ความร้อน การระเบิดด้วยไอน้ำความดันสูง เป็นต้น

นฤมล (2549) ได้ทำการปรับสภาพกากสับปะรด ในส่วนที่เป็นเศษเนื้อสับปะรดจากโรงงาน 3 วิธี คือ การโม่จนได้ขนาดอนุภาคประมาณ 250 ไมครอน การอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 3 ชั่วโมง และการโม่ควบคู่กับ การอบไอน้ำ จากการทดลองพบว่าการปรับสภาพโดยการโม่ควบคู่กับการอบไอน้ำ จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด

Perez (1995) ศึกษาการปรับสภาพไม้สน โดยใช้ไอน้ำความดันสูง ที่อุณหภูมิ 200 และ 220 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ กัน จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มอุณหภูมิมีผลทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้น แต่การเพิ่มเวลาไม่มีผลต่อการเพิ่มของน้ำตาลรีดิวซ์มากนัก



ภาพที่ 6 กระบวนการการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: Ye Sun and Jiayang Cheng (2002)

4.1.2 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายกรด สารละลายด่าง โอโซน ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารออกซิแดนท์ วัตถุประสงค์เพื่อแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ออกจากเซลลูโลส ในกรณีการใช้สารละลายกรดจะพบว่าเป็นการเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสย่อยได้ในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส และยังทำให้เกิดการบวมของโครงสร้าง ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยเนื่องจากเอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น

Badal (2005) ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.50 % โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 141 °C เป็นเวลา 30 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสสูงสุดคือ 565 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของฟางข้าว หลังจากนั้นจึงทำการหมักด้วยแบคทีเรีย *Escherichia coli* strain FBR5 ได้ผลผลิตเอทานอล 0.24 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Okeke (1995) ศึกษาการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสขั้นต้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 M ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่าการปรับสภาพก่อนนำไปย่อยจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทำให้ได้ผลผลิตของน้ำตาลสูง ขึ้น 24-53 %

Janusz (1988) ทำการปรับสภาพฟางข้างสาลีโดยเปรียบเทียบวิธีทางกายภาพด้วยกระบวนการใช้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กับวิธีทางเคมีโดยใช้เอทานอล 96% และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 % พบว่าการปรับสภาพโดยวิธีทางกายภาพด้วยกระบวนการใช้ความร้อน และวิธีทางเคมีจะมีปริมาณลิกนินเหลืออยู่ในฟางข้าว 30.6% และ 5.4% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพทางเคมีทำให้สามารถกำจัดลิกนินออกไปได้มากกว่า

Farooq (2001) ทำการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยนำมาซังข้าวโพดมาบดให้มีขนาด 0.5 - 1 มิลลิเมตร นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2% ในอัตราส่วน 1:5 แล้ว นำไป autoclave เป็นเวลา 15 นาที พบว่า ก่อนปรับสภาพ มีส่วนประกอบของ เซลลูโลส ไซเลน ลิกนิน และอะซิเตต เป็น 41 36 7 และ 3.2% ตาม ลำดับ หลังจากปรับสภาพแล้วจะได้เซลลูโลสมากขึ้น

ปราณี (2542) ได้ทำการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้สารละลายกรด ด่างและการใช้ไอน้ำที่ความดันสูง พบว่าการปรับสภาพผักตบชวาด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 % ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จะช่วยให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด

ระวีวรรณ, 2538 ได้ทำการปรับสภาพฟางข้าวขั้นต้นโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที จะทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสเกิดได้ดีขึ้น

4.1.3 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (physico-chemical pretreatment)

เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำความดันสูงซึ่งมีการเติมสารเคมีลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ดังเช่นตัวอย่างการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และความร้อนในสภาวะความดันสูงของการปรับสภาพฟางข้าวในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงเพียงอย่างเดียว พบว่า การย่อยสลายลดลง เมื่อความร้อนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของน้ำตาลที่เกิดขึ้นเปลี่ยนเป็นสารประเภทเฟอฟูรัล (furfural) สารฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) หรือกรดฟอร์มิก (formic acid) ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (Badal, 2005)

Acebal (1986) ทำการปรับสภาพฟางข้าวโดยเปรียบเทียบวิธีทางกายภาพโดย การบดและวิธีทางเคมีฟิสิกส์โดยการบดและแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 %w/v เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้วิธีทางเคมีฟิสิกส์ในการปรับสภาพฟางข้าว ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเซลลูโลสสูงกว่าการใช้วิธีทางกายภาพเพียงอย่างเดียว คือ 0.557% และ 0.243% ตามลำดับ

4.1.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก

4.2 การย่อยหรือไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

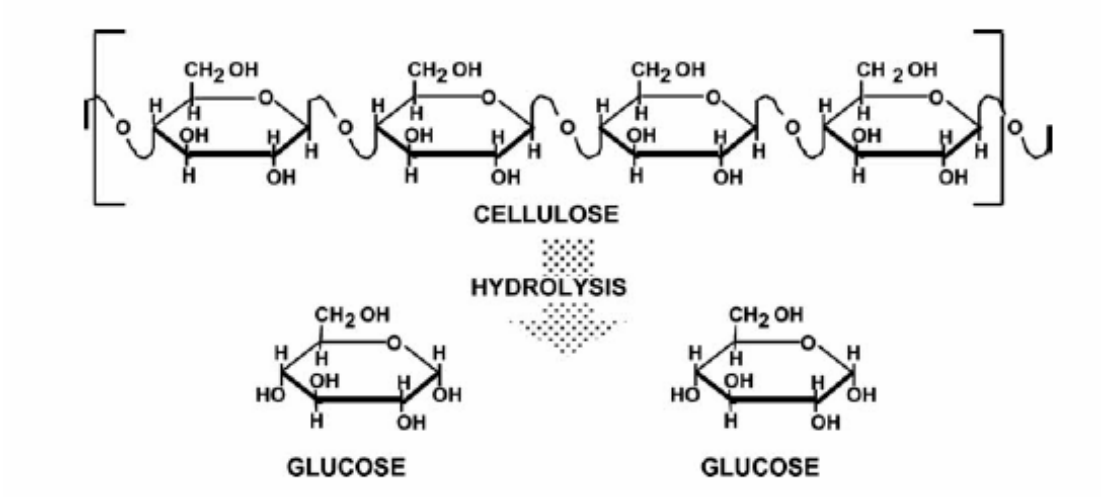
การย่อยเป็นกระบวนการเปลี่ยนจากเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสแสดงดังภาพที่ 7 ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

4.2.1 การย่อยด้วยสารเคมี

เป็นการย่อยด้วยสารเคมี เช่นสารละลายกรดหรือด่างซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาการทำลายพันธะไกลโคสิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจนถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (เกื้อกูล, 2547)

4.2.2 การย่อยด้วยเอนไซม์

จะใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสแสดงดังภาพที่ 7 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) นี้พบทั่วไปในจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากในเชื้อรา เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์ เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูง ในสภาวะการทำงานที่เหมาะสม จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วถึง 10^{8} ถึง 10^{11}เท่า เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความเฉพาะ (specificity) ต่อปฏิกิริยาหนึ่งๆเท่านั้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีความบริสุทธิ์สูงแม้ว่าเอนไซม์จะถูกสร้างอยู่ภายในเซลล์ แต่สามารถสกัดออกมาใช้งานได้เช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในเซลล์



ภาพที่ 7 กระบวนการย่อยเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส
ที่มา: Ye Sun and Jiayang Cheng (2002)

ก) ชนิดและตำแหน่งทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบเซลลูโลส คือ เซลลูเลส ปัจจุบันมีการวิจัยกันอย่างกว้างขวางโดยเน้นถึงการพัฒนากระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งต่างๆให้เป็นน้ำตาลกลูโคสที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย

เอนไซม์เซลลูเลสนี้มีสมบัติเป็น multicomponent enzyme โดยมีองค์ประกอบของเอนไซม์ อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน แสดงดังภาพที่ 8 และ 9 (Nathan, 2004) ดังนี้

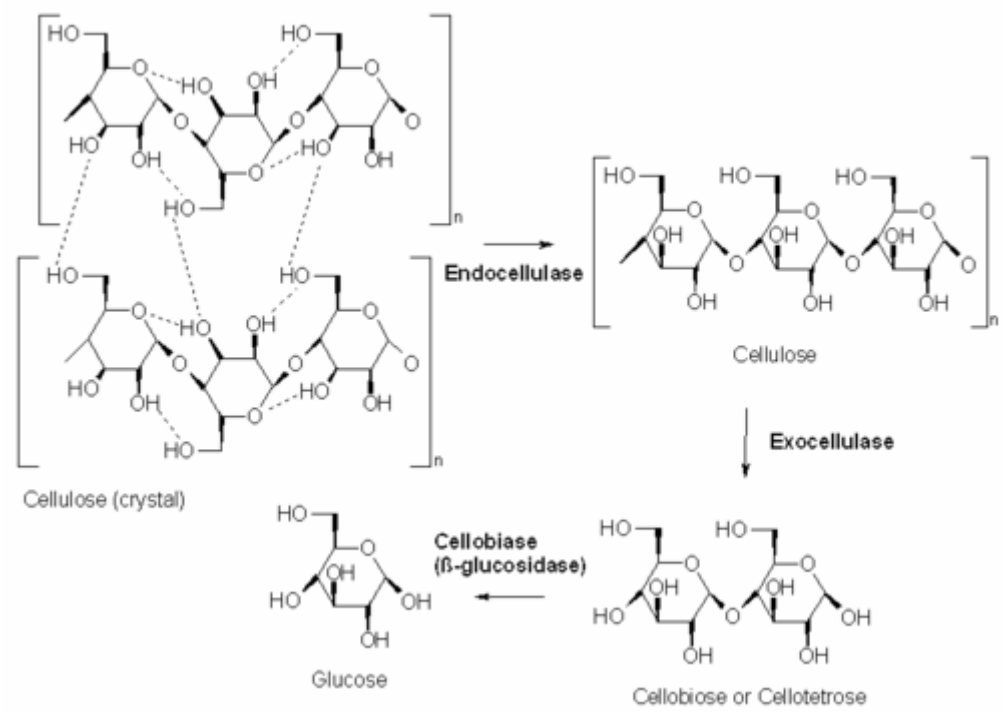
1) เอ็นโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือEndoβ-1, 4-glucan glucanohydrolase หรือ EBG หรือ C_X ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1,4 ภายในสายเซลลูโลสบริเวณโครงสร้างอะมอร์ฟัสอย่างสุ่ม (randomly acting) ทำให้เกิดปลายอิสระขึ้น ทำให้ได้ เซลโลไบโอส (cellobiose) โอลิโกเซลลูโลส (oligocellulose) และกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (reducing end) ของสายโซ่เซลลูโลส

2) เอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase) หรือ Exo β-1, 4-glucan cellobiohydrolase หรือ CBH หรือ C_1 ทำหน้าที่ย่อยสลายโดยการตัดโมเลกุลของเซลโลไบโอส ออกจากปลายที่เป็น

อิสระนั้นหรือคือการย่อย สลายเซลลูโลสและโอลิโกเซลลูโลส ไปเป็นเซลโลไบโอสนั่นเองโดยตำแหน่งที่ทำงานเป็นแบบสุ่ม

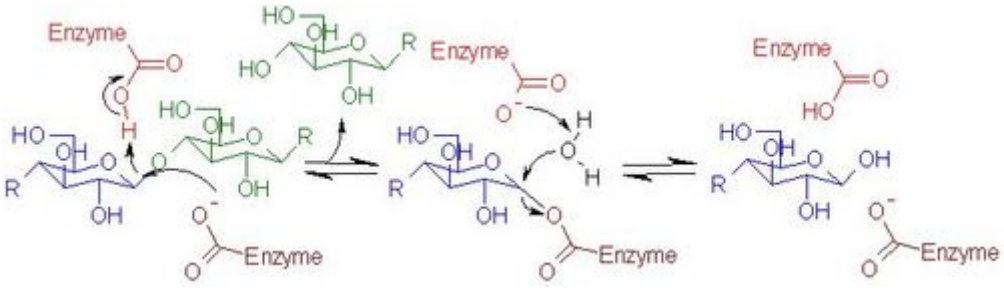
3) เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) หรือ เซลโลไบเอส (cellobiase) หรือ C_b ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคส ซึ่งเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จะเป็นตัว ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ทำให้ย่อยสลายได้กลูโคสมากขึ้น การย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ปริมาณกลูโคสมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในเซลลูเลสว่าจะมีมากหรือน้อย ดังนั้นเอนไซม์ตัวนี้จึงเป็นกุญแจสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นดังนี้ β-glucosidase จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลยับยั้งต่อเนื่อง คือทำให้มีการสะสมของ เซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucannase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ต้องทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดี แต่เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะมีผลทำให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง



ภาพที่ 8 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา: Nigam (1999)



ภาพที่ 9 กลไกการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase)

ที่มา: Nigam (1999)

ข) ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

1) อุณหภูมิ (temperature)

อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า " ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (optimum temperature)" เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรือ อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดย เอนไซม์เซลลูเลส จะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส

2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชค่าหนึ่งเรียกว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ณ จุดที่พีเอชมีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรม (activity) ของเอนไซม์จะลดลง เอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดี ที่สุดที่ค่า pH ระหว่าง 5.0 - 9.0 ความเข้มข้นของซับสเตรท (substrate) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรท อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และลดช้าลงเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทสูงขึ้น จนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก

3) ปริมาณเอนไซม์

เมื่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงจุดสูงสุด พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะมีค่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์

4) ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor)

เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกระบวนการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรท และลักษณะของ function group ที่บริเวณ active side ทำให้เข้าใจและสามารถ ควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้

ค) ปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนจึงมีผล ต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ด้วย เช่น สภาพความเป็นกรด-ด่าง ตัวทำละลายอินทรีย์ ยูเรีย ความร้อนหรือรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นต้น

4.3 การหมักเพื่อผลิตเอทานอล (fermentation)

การหมักเพื่อผลิตเอทานอล คือกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสให้เป็น เอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีส ต์ แบคทีเรีย โดยปกติจะเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic process) เรียกกระบวนการเปลี่ยนนี้ว่ากระบวนการหมัก การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็น เอทานอลจำเป็นต้องพิจารณาถึงปริมาณ น้ำตาลที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ กระบวนการผลิต ปริมาณและความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การเปลี่ยนเป็นเอทานอลของน้ำตาล ตัวยับยั้งปฏิกิริยา และสภาวะของกระบวนการ

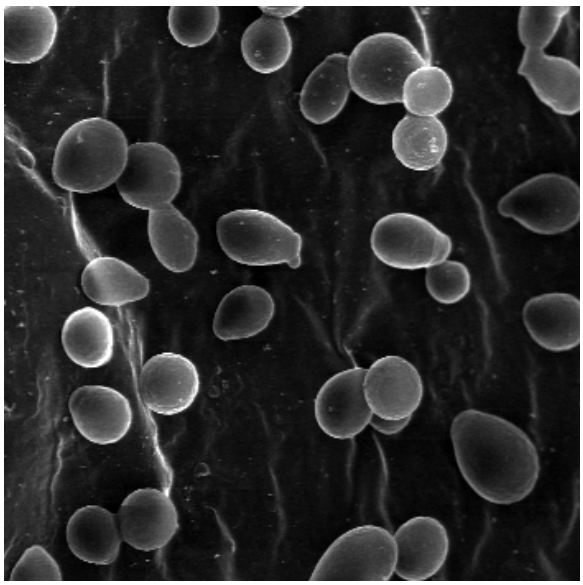
4.3.1 ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมัก

ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมัก คือ จุลินทรีย์ อาหาร ค่าความเป็น กรดด่าง อุณหภูมิ ออกซิเจน ปัจจัยทั้ง 5 นี้จะมีผลเกี่ยวเนื่องซึ่งกันและกัน การทำให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพจะต้องทำการปรับสภาวะให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดและประหยัดที่สุด

ก) จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องและรู้จักกันดีซึ่งใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันคือ เชื้อยีสต์พวก *Saccharomyces sp.* เช่น *S. cerevisiae, S. ellipsoideus, S . uvarum* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* แสดงรูปร่างลักษณะดังภาพที่ 10 เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักน้ำตาลกลูโคส เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจนเป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมการหมัก สามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มี

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดี ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในการผลิตเอทานอล



ภาพที่ 10 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถ่ายจากกล้อง Scanning electron micrograph กำลังขยาย 5000 เท่า

ที่มา: Reddy (2005)

ยีสต์สายพันธ์ *S. cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์พวก *eukaryote* ในกลุ่ม fungi ดำรงชีวิตในลักษณะเซลล์เดียว (unicellular organism) สืบพันธ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศ มีลักษณะรูปไข่ ทรงกลม หรือค่อนไปทางทรงกระบอก และมีการแบ่งตัวแบบ multipolar budding

การจำแนกยีสต์ *S. ces cerevisiae* ในทางชีววิทยา

Pyhlum	*Ascomycetes*
Order	*Saccharomycetales.*
Family	*Saccharomycetaceae.*
Subfumily	*Saccharomycetoideae*
Genus	*Saccharomyces*
Species	*Saccharomyces cerevisiae.*

ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ซึ่งกระบวนการผลิตพลังงานและผลผลิตที่ได้ทั้งสภาวะทั้งสองก็แตกต่างกัน ตัวแปรที่สำคัญในการที่ยีสต์จะใช้กระบวนการในการใช้สารอาหารในการผลิตพลังงานและได้ผลผลิตออกมานั้นขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลในสภาวะแวดล้อมที่มียีสต์เจริญอยู่ การใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสร้างพลังงานของยีสต์ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยทั่วไปเรียกว่าการหมัก พลังงานในรูป ATP ได้มาจากการใช้สับสเตรทผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway)ในกระบวนการหมักแบบไม่มีอากาศโดย *S. cerevisiac* นอกจากจะได้แอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตหลักแล้วยังได้สารอื่นๆ เช่น กลีเซอรอล, อะซีเตท, เอสเตอร์และสารประกอบคาร์บอนิลที่มีส่วนในการเพิ่มกลิ่นและรสชาติของแอลกอฮอล์ได้ (Reddy, 2005)

ข) อาหาร

หมายถึง สารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งใช้ในการดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ สารอาหารที่จำเป็นได้แก่

1) คาร์บอน

คาร์บอนเป็นสารอาหารหลักที่จุลินทรีย์ต้องได้รับเพียงพอเพื่อการดำรงชีวิตและการขยายพันธุ์ *S. cerevisiac* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้โดยใช้ขบวนการแบบ Embden-Meyerhof-Parnas pathway ในการย่อยสลายได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนั้นยังมีกรด แลคติค (lactic acid) และอะซีตาลดีไฮด์ (acetaldehyde) เกิดขึ้นเล็กน้อย ในน้ำหมักที่มี yeast extract จะมีกรดซัคซินิก (succinic acid) เกิดขึ้นด้วยเนื่องจากกรดอะมิโนใน yeast extract เกิดปฏิกิริยารีดักชั่นและถ้าหมักในน้ำหมักที่มีกลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอน เชื้อจะเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีในระยะ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจะใช้น้ำตาลกลูโคสได้เกือบหมดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 2 วัน สมการการใช้น้ำตาลกลูโคส แสดงได้ดังสมการ

$$1\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 1.8\ C_2H_5OH + 1.9\ CO_2 + 0.15\ \text{lactic acid} \qquad (1)$$

2) ไนโตรเจน

ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10% (โดยน้ำหนักแห้ง) ดังนั้น ไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้แต่ยีสต์บางชนิดต้องการกรดอะมิโน เพราะกรดอะมิโนจะเป็นตัวควบคุมการทำงานของ glycolysis pathway แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ เกลือแอมโมเนียซัลเฟต

3) ฟอสฟอรัส

ปกติฟอสฟอรัสที่ให้แก่เซลล์ยีสต์จะอยู่ในรูปฟอสเฟต เช่น ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ฟอสเฟตเป็นธาตุที่จำเป็นต่อกระบวนการหมักเอทานอล ยีสต์ใช้ฟอสเฟตในกระบวนการสร้างพลังงานในรูป ATP สังเคราะห์นิวคลีโอโปรตีน และสารอื่น ๆ ภายในเซลล์ การแตกตัวของฟอสเฟตจะทำให้เกิดสภาพบัฟเฟอร์ (buffer) ช่วยรักษาค่าพีเอชให้คงที่ กรณีที่เซลล์ของยีสต์ขาดฟอตเฟสเซลล์จะอ่อนแอ ฉะนั้นฟอสฟอรัสจึงจำเป็นสำหรับเซลล์ยีสต์ทุกตัว การแลกเปลี่ยนประจุของไซโทพลาสซึมของเซลล์ยีสต์เกิดขึ้นในระหว่างการรับเกลืออนินทรีย์ซัลเฟต และหมู่ฟอสเฟตในสารประกอบอินทรีย์เข้ามา เกลือฟอสเฟตที่ประกอบอยู่ในเซลล์ยีสต์จะมีอยู่ประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ ออร์โทฟอสเฟต (orthophosphate) ซึ่ง ออร์โทฟอสเฟต (H_2PO_4) และสารละลายฟอสเฟต (Rosen, 1968)

ค) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ *S. cerevisiae* สามารถเติบโตได้มีค่า 2.4-8.6 โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาลประสิทธิภาพจะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงพีเอช 3.5-6.0 ความสามารถในการหมักเอทานอลของเชื้อลดลงเมื่อค่าพีเอชต่ำมากๆ นอกจากการหมักเอทานอลที่ค่าพีเอชเป็นกรดหรือประมาณ 4.5 จะส่งเสริมการหมักแล้วยังช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนมาจากสารอาหารด้วย เพราะเชื้อแบคทีเรียส่วนมากสามารถเติบโตได้ดีที่ค่าพีเอชเป็นกลาง (เทพปัญญา, 2544)

ง) อุณหภูมิ

S. cerevisiae เป็นสายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) มีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิปานกลางประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส การเติบโตจะหยุดลงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเติบโตได้ดี คือ 5-10 องศาเซลเซียส ความทนต่ออุณหภูมิสูงจะมากขึ้นเมื่อเชื้อเติบโตในอาหารที่มีความสมบูรณ์ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะต่อการหมักจะสูงกว่าการเติบโตประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส (Rosukas, 1996) ในระหว่างการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้น โดยกลูโคส 1 โมเลกุลจะให้ปริมาณความร้อน 26 แคลอรี่ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 26.0 \text{ แคลอรี่} \qquad (2)$$

ปัจจัยที่สำคัญที่จุลินทรีย์สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากน้อยต่างกันมีหลายประการ เช่น การ สังเคราะห์เอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ กลไกการควบคุมภายในเซลล์ การถ่ายทอด anaerobic information จากยีสต์ไปยังไรโบโซม การนำอาหารเข้ามาภายในเซลล์ และองค์ประกอบของเยื่อ หุ้มเซลล์ เป็นต้น การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิสูง กว่า 40 องศาเซลเซียส จะเพิ่มอัตราการเกิด respiration dificiency "petite" mutant มากกว่าปกติ (Hutter and Oliver,1998) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เนื่องจากปฏิกิริยาการหมักเอทานอลเกิดความร้อนทำให้อุณหภูมิในถังหมักสูงขึ้น ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะต้องลดอุณหภูมิของถังหมักลงและรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 32- 33 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส โดยวิธีการต่างๆเช่น การ พ่นน้ำให้ เป็นฝอยทั่วผิวนอกของถังหมัก ใช้ cooling coil ในถังหมัก หรือผ่านส่าออกไปทำให้เย็นลงนอกถังหมัก (Paturau, 1987)

จ) ออกซิเจน

ออกซิเจนมีบทบาทต่อกระบวนการหมักเอทานอล โดยพบว่าออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่การหายใจ (respiratory chain) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของเชื้อยีสต์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดโอลิอิก และกรดไลโนลิอิก ทำให้ยีสต์มีความทนต่อเอทานอลได้มากขึ้น โดยส่งเสริมให้เกิดการขนถ่ายเอทานอลออกจากเซลล์นั้นคือถ้ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในผนังเซลล์มากจะทำให้เกิดการขนถ่ายเอทานอลออกจากเซลล์มาก ในที่สุดความเข้มข้นของเอทานอลในเซลล์จึงลดลง สำหรับในสภาวะที่ขาดออกซิเจน ยีสต์จะไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวได้จึงต้องมีการเติมลงไปให้ยีสต์สามารถอยู่รอดได้ (เทพปัญญา, 2544)

4.3.2 ชีวเคมีของกระบวนการผลิตเอทานอลโดยการหมัก

ยีสต์ *S. cerevisiae* จะใช้กระบวนการแบบ Embden-Meyerhof-Parnas pathway ในการผลิตเอทานอลจากกลูโคส โดยในสภาวะที่มีอากาศเชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสในการหายใจเพื่อเป็นการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP ดังแสดงในสมการที่ 3

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6H_2O + 6CO_2 + 38ATP \qquad (3)$$

การผลิตเอทานอลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยอาศัยเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในสภาวะที่ไร้อากาศ ซึ่งเชื้อยีสต์จะทำการหมักเอทานอลโดยผ่านวิถี glycolysis หรือ Embden-Meyerhof-Parnas pathway แสดงดังภาพที่ 11 ซึ่งในการหมักน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์จะได้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอทานอลตามทฤษฎี (yield) เป็น 0.51 กรัม/กรัมน้ำตาลที่ใช้ นอกจากเอทานอลแล้วยังได้คาร์บอนไดออกไซด์และพลังงานในรูป ATP จากวิถีดังกล่าวเล็กน้อย ดังแสดงในสมการที่ 4

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP \qquad (4)$$

ในขั้นตอนของวิถี glycolysis เพื่อให้ได้เอทานอลแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1) การสลายกลูโคสให้เป็น 2 ไทรโอสฟอสเฟท (triose phosphate)

ประกอบด้วย 4 ปฏิกิริยา ได้แก่ ปฏิกิริยาของ hexokinase หรือ glucokinase ใช้ ATP เพื่อเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น glucose-6-phosphate (G6P) ซึ่งเปลี่ยนเป็น fructose-6-phosphate (F6P) ด้วยphosphohexoisomerase จากนั้น phosphofructokinase จะเปลี่ยน F6P ให้เป็น fructose1,6-diphosphate (FDP) ซึ่งแตกตัวเป็นสารที่มีสามคาร์บอน 2 ชนิด คือ glyceraldehydes-3-phosphate (G3P) และdihydroxyacetonephosphate (DHAP) โดยอาศัยการเร่งของเอ็นไซม์ aldolase จากนั้น DHAP จะเปลี่ยนเป็น glycerol phosphate และได้ glycerol ในที่สุด

2) การเปลี่ยนไทรโอสฟอสเฟทให้เป็นไพรูเวท (pyruvate)

มี 6 ปฏิกิริยาเริ่มด้วย DHAP เปลี่ยนเป็น G3P โดยเอ็นไซม์ triosephosphate isomeraseต่อจากนั้น G3P จะทำปฏิกิริยากับฟอสเฟทให้ได้ 1,3 diphosphoglycerate (DPG) ขณะเดียวกันก็ปล่อยอิเล็กตรอนให้แก่ NAD+ ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วย glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenaseซึ่ง DPG จะทำปฏิกิริยากับ ADP ได้ 3-phosphoglycerate (3PG) และ ATP ในปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ phosephoglycerate kinase ปฏิกิริยานี้สร้าง ATP โดยวิธี substarte level phosphorylation โดย 3PG จะเปลี่ยนแปลงเป็น phosphoenol-pyruvate (PEP) ซึ่งจะให้ ATP อีกหนึ่งโดยวิธี substarte level phosphorylation เช่นเดียวกัน รวมทั้งให้ไพรูเวทด้วย ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย pyruvate kinase

3) เป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็น 2 หรือ 3 คาร์บอน

เป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสารประกอบที่มี 2 หรือ 3 คาร์บอน ดังแสดงในภาพที่ 11 ทั้งนี้ขึ้นกับเอ็นไซม์ที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ ในกรณีขาดออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจนไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นแลคเตท (lactate) โดยใช้ NADH เป็นตัวอิเล็คตรอนในปฏิกิริยาของ lactate dehydrogenase เมื่อมีออกซิเจนไพรูเวทอาจเปลี่ยนเป็น acetyl CoA โดยเอ็นไซม์ pyruvate dehydrogenase complex ซึ่ง acetyl CoA จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป เอ็นไซม์นี้อยู่ในไมโตคอนเดรีย และเป็น enzyme complex ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดไพรูเวทอาจสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็น acetaldehyde โดยการเร่งของ pyruvate decarboxylase ต่อจากนั้น

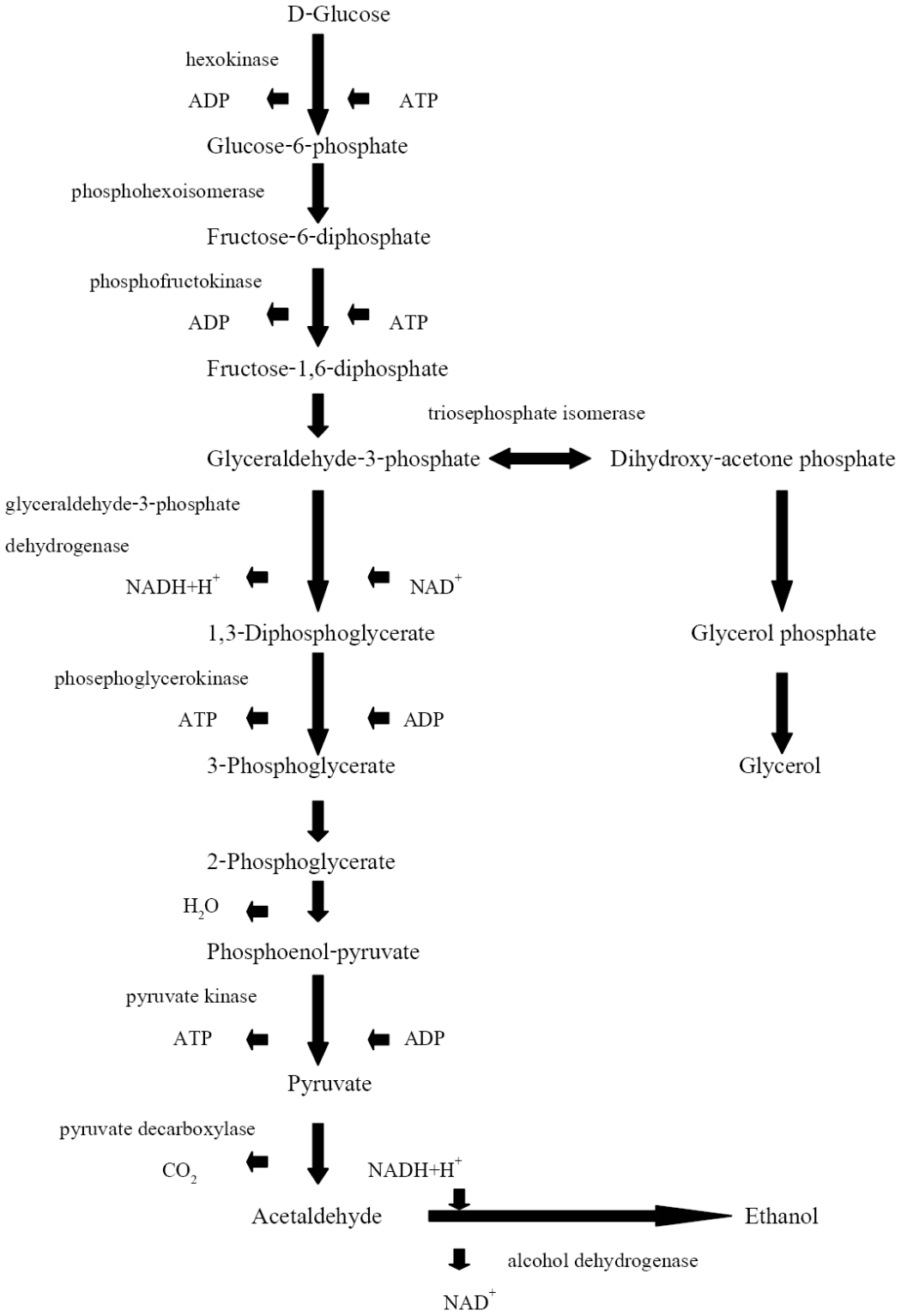
acetaldehyde จะถูกออกซิไดซ์ด้วย NAD+ กลายเป็นอะซิเตท (acetate) หรือถูกรีดิวซ์ด้วย NADH โดยเอ็นไซม์ alcohol dehydrogenase ได้เป็นเอทานอล

ในปี ค.ศ. 1810 Gay-Lussac ได้แสดงผลการหมักเอทานอลเป็นสมการที่ 5 ดังนี้

$$\underset{100}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{48.89}{2CO_2} + \underset{51.11}{2C_2H_5OH} + 28.7\ \text{kcal} \qquad (5)$$

จากสมการของ Gay-Lussac สามารถคำนวณได้ว่าในการหมักเอทานอล จะเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 51.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำตาล และมีความร้อนเกิดขึ้น ต่อมาในปี 1875 Pasteur ได้แสดงให้เห็นว่าในสภาพที่เป็นจริง การหมักเอทานอลที่ให้ผลผลิตสูงสุดที่จะเป็นไปได้โดยคิดเทียบจากเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำตาลที่ถูกใช้ไปจะได้ดังนี้ เอทานอล 48.4 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ 46.6 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 3.3 เปอร์เซ็นต์ กรดซัคซินิค 0.6 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆ

จากปริมาณเอทานอลที่ไ ด้ 48.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำตาลที่ถูกใช้ไปที่ Pasteur คำนวณได้จะมีค่าประมาณ 94.5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเอทานอลตามทฤษฎีที่ได้จากวิธีของ Gay-Lussac ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 90-95 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี โดยผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่สร้างขึ้นเกิดจากการใช้สับสเตรต 4-5 เปอร์เซ็นต์ และถ้าสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์พลอยได้เหล่านี้แล้วจะสามารถเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลได้ 2.7 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะมีค่าเพียง 80-90 เปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (Esser and Karsch, 1984)



ภาพที่ 11 การผลิตเอทานอลด้วยน้ำตาลเฮกโซสโดยยีสต์ผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas pathway

ที่มา: Scragg (1999)

5. กระบวนการหมักแบบแบตช์ (Batch culture)

เป็นกระบวนการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายในระบบปิด การเลี้ยงเชื้อนิยมทำในขวดเขย่าหรือในถังหมัก โดยใช้สารอาหารและภาวะต่างๆเช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโต สารอาหารที่ใช้ในระบบมีปริมาณจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหาร ภาวะในระบบมีการเปลี่ยนแปลง สารอาหารถูกใช้หมดไป ความเป็นกรดด่างเปลี่ยนไป มีการสะสมสารพิษ เป็นต้น (สาโรจน์, 2544; Lee and Chang, 1992) เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์จะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น โดยจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารที่มีอยู่จนหมดและมีการสร้างผลิตภัณฑ์และสารอื่นๆ ออกมา

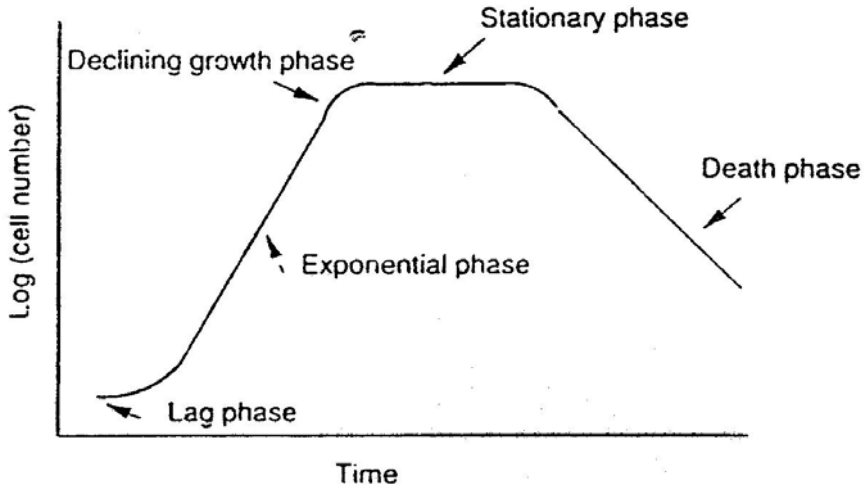
5.1 จลนพลศาสตร์การเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ (Kinetics of batch culture)

5.1.1 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ต้องอาศัยสภาวะแวดล้อมทางฟิสิกส์ เคมี และสารอาหารที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น มีสารอาหารบริบูรณ์คือ มีทั้งแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และสารเร่งการเจริญเติบโต (growth factor) ชนิดต่างๆ ตลอดจนการควบคุมอุณหภูมิและพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อบางส่วนเป็นแหล่งพลังงาน และบางส่วนถูกใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโต และสร้างผลิตภัณฑ์ จากการใช้สารอาหารนี้ทำให้มวลของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตามเวลาซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (microbial growth kinetic) (สาโรจน์, 2538)

สารอาหาร + เซลล์ $\longrightarrow$ ผลิตภัณฑ์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ + ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ตามเวลาในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์ แบ่งออกได้เป็น 5 ระยะ ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ลักษณะการเจริญของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง
ที่มา: Wang *et al*. (1980)

1) ระยะปรับตัว (lag phase) จุลินทรีย์ยังคงไม่มีการเจริญเติบโต แต่จะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ระยะที่ ใช้ในการปรับตัวนี้จะมากหรือน้อยมีผลมาจากหลายปัจจัย เช่น อายุ ความเข้มข้น ปริมาณหัวเชื้อตลอดจนสารช่วยในการเจริญเติบโต เนื่องจากเมื่อเซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ความเข้มข้นของวิตามิน, กรดอะมิโน และไอออนต่างๆ (เช่น Mg^{2+}, Ca^{2+} และอื่นๆ) อาจจะถูกถ่ายเทผ่านผนังเซลล์เป็นผลให้ความเข้มข้นต่ำลงอย่างมาก ซึ่งสารเหล่านี้อาจเป็นสิ่งจำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในวิธีเมแทบอลิซึม

2) ระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log หรือ exponential phase) ในช่วงนี้เซลล์มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่แล้ว เซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนและมวลขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นทวีคูณ (exponential) กับเวลาอย่างต่อเนื่อง และเป็นช่วงเวลาของ balanced growth ซึ่งทุกองค์ประกอบของเซลล์เจริญเติบโตด้วยอัตราเดียวกัน นั่นคือองค์ประกอบเฉลี่ยของเซลล์เดียวยังคงประมาณได้คงที่ในช่วงการเจริญเติบโตนี้ และในช่วง balanced growth อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่คำนวณจากทั้งจำนวนเซลล์และมวลของเซลล์จะได้ค่าเท่ากัน สำหรับในระยะนี้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate,μ) มีค่าเท่ากับ

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt} \qquad (6)$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ (g/l)

t = เวลา (h)

μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (h^{-1})

3) ระยะการเจริญเติบโตแบบถดถอย (declining growth phase) เป็นช่วงที่อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง เนื่องจากสภาพที่ไม่เหมาะสมหลายประการ

- สารอาหารไม่เพียงพอเพราะถูกใช้หมดไปทำให้จุลินทรีย์ชะงักการเจริญเติบโต

- การสะสมเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์บางชนิดที่เป็นพิษยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น เอทานอลและผลิตภัณฑ์บางชนิด ทำให้พีเอชเปลี่ยนไป เช่น กรดซิตริก เป็นต้น

- สารช่วยการเจริญเติบโตถูกใช้หมดไป ได้แก่ วิตามิน และ โลหะไอออนต่างๆ

- สภาพแออัดของจุลินทรีย์เนื่องจากการเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้พื้นที่ต่อหน่วยเซลล์ลดลง

การเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมอย่างรวดเร็วดังที่กล่าวมาส่งผลให้หลังจากช่วงนี้ไปจะเป็น unbalanced growth สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงใน ช่วงนี้เกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้นมาก

4) ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นช่วงที่อัตราการเจริญเติบโตสุทธิ เป็นศูนย์ ซึ่งในความเป็นจริงแล้วจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่มีค่าเท่ากับอัตราการตาย (death rate) ดังนั้นปริมาณเซลล์จะมีค่าคงที่เป็นระยะเวลาหนึ่ง เนื่องจากเซลล์ย่อยสลายกันเองเพราะขาดแคลนอาหาร (endogenous metabolism) และเกิดการออกซิเดชันสารพอลิเมอร์ โปรตีน และ สารอื่นๆที่สะสมอยู่ในเซลล์ ถึงแม้ว่าในช่วงนี้อัตราการเจริญเติบโตสุทธิจะเป็นศูนย์ แต่เซลล์บางชนิด

ยังมีการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งอาจเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในกระบวนการหมัก เช่น การผลิต antibiotic

5) ระยะตาย (declining phase) ในระยะนี้อัตราการตายของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นซึ่งสามารถอาศัยสมการ 7 เขียนแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ขึ้นใหม่อธิบายได้ดังสมการที่ 8

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad (7)$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - K_d x \qquad (8)$$

เมื่อ K_d = อัตราจำเพาะการตายของจุลินทรีย์ (h^{-1})

ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ K_d มีค่าน้อยมากแต่ในระยะคงที่และระยะตาย พบว่า K_d มีค่าเพิ่มขึ้น แสดงว่าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้อัตราการตายของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นทำให้จุลินทรีย์สลายตัวเอง (autolysis) อัตราการตายมีค่ามากกว่าอัตราการเจริญเติบโตปริมาณเซลล์จึงลดลงเรื่อยๆ

5.1.2 การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ (yield coefficient)

เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโตเชื่อมโยงกับการใช้สารอาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้น จึงมีการนิยามพารามิเตอร์ที่เชื่อมโยงสัมประสิทธิ์ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Stoichiometry) และแสดงถึงประสิทธิภาพของการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นเซลล์และผลิตภัณฑ์ ซึ่งก็คือสัมประสิทธิ์ผลได้ (yield coefficient) โดยนิยามเป็นอัตราส่วนโดยมวลของผลิตภัณฑ์ต่างๆในการหมักที่ได้มาจากการใช้สารอาหาร เช่น

$$\text{ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร} = \frac{\text{การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของชีวมวล}}{\text{การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหาร}}$$

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \qquad (9)$$

$Y_{x/s}$ = สัมประสิทธิ์ของการสร้างเซลล์ มีหน่วยเป็น กรัมเซลล์/กรัมสารตั้งต้น

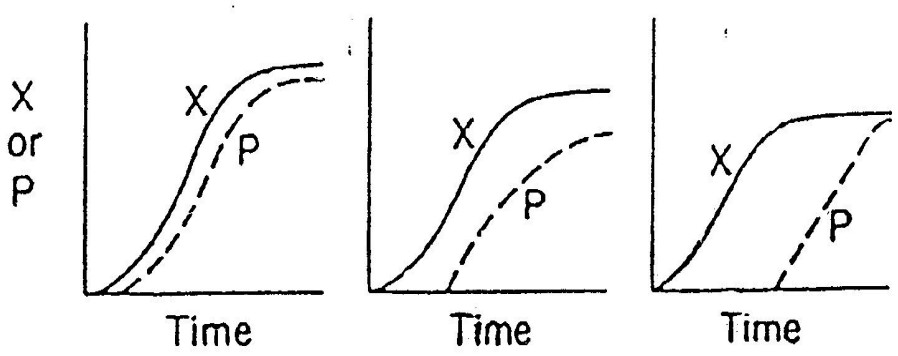
$$\text{ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร} = \frac{\text{การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์}}{\text{การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหาร}}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \qquad (10)$$

$Y_{p/s}$ = สัมประสิทธิ์ของการสร้างผลิตภัณฑ์ มีหน่วยเป็น กรัมผลิตภัณฑ์/กรัมสารตั้งต้น

5.1.3 ลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์ (product formation)

ผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์จากหลายกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ และที่ผ่านมามีหลายรูปแบบที่ถูกเสนอขึ้นเพื่อแบ่งแยกผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการสร้างผลิตภัณฑ์หนึ่งซึ่งใช้กันอย่างกว้างขวาง คือแบบจำลองที่อธิบายการสร้างผลิตภัณฑ์ซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต โดยแบ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากจุลินทรีย์ออกได้เป็น 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ลักษณะการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ในการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์

(1) การสร้างผลิตภัณฑ์แบบ growth-associated

(2) การสร้างผลิตภัณฑแบบ mixed-growth-associated และ

(3) การสร้างผลิตภัณฑ์แบบ nongrowth-associated

ที่มา: Scragg (1988)

(1) การสร้างผลิตภัณฑ์สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (growth-associated products) ในกรณีนี้การสร้างผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นอัตราการสร้าง ผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific production rate,q_p) เป็นสัดส่วนกับอัตราการเจริญเติบโต

$$q_p = \mu Y_{p/x} \qquad (11)$$

หรือมักเรียกว่าเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) เช่น กระบวนการผลิตเอทานอลจากการหมักกลูโคสแบบไร้ออกซิเจนโดยใช้ยีสต์ และการผลิตกรดกลูโคนิกจากกลูโคสโดยใช้ Gluconobacter

(2) การสร้างผลิตภัณฑ์ไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (Nongrowth-associated products) การสร้างผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นในช่วง stationary phase และมีค่าเท่ากับศูนย์ในช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตหรือเรียกว่าเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น กระบวนการผลิต antibiotic และวิตามิน ดังนั้นอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะจะเป็นค่าคงที่

$$q_p = b \qquad (12)$$

(3) การสร้างผลิตภัณฑ์ผสมกันระหว่างแบบสัมพันธ์และไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (mixed growth-associated) การสร้างผลิตภัณฑ์มีลักษณะรวมกันระหว่าง growth-associated กับ nongrowth-associated เช่น กระบวนการผลิตกรดอะมิโน กรดแลกติก และพอลิแซคคาไรด์ที่ขับออกมานอกเซลล์ (xanthan และ pullan) ดังนั้นค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะเป็นดังสมการต่อไปนี้

$$q_p = a\mu + b \qquad (13)$$

5.2 สมการสมดุลมวลและการคำนวณอัตราจำเพาะ (specific rate)

สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จะเป็นระบบปิดไม่มีการเติมสารอาหารเข้าและดึงผลิตภัณฑ์ออกจากถังปฏิกรณ์ ดังนั้นความเข้มข้นของสารอาหาร เซลล์ และผลิตภัณฑ์จึงเปลี่ยนแปลงตามเวลา โดยมีสมมติฐานคือของเหลวถังหมักมีการผสมกันอย่างสมบูรณ์ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ขึ้นกับปริมาณสารอาหารที่กำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพียงหนึ่งชนิด ในขณะที่สารอาหารชนิดอื่นๆ มีในปริมาณที่เกินพอและเป็นการทำสมดุลมวลสารในช่วง balance growth (เซลล์อยู่ในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ) ดังนั้นสมการสมดุลมวลสารขององค์ประกอบภายในถังปฏิกรณ์แสดงได้ดังนี้

$$\frac{d}{dt}\left[\begin{array}{c}\text{ปริมาตรของ}\\ \text{อาหารเลี้ยงเชื้อ}\end{array}\right]\left[\begin{array}{c}\text{ความเข้มข้นของ}\\ \text{องค์ประกอบi}\end{array}\right]=\left[\begin{array}{c}\text{ปริมาตรของ}\\ \text{อาหารเลี้ยงเชื้อ}\end{array}\right]\left[\begin{array}{c}\text{มวลของiที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา}\\ \text{หนึ่งหน่วยปริมาตร.หนึ่งหน่วยเวลา}\end{array}\right]$$

$$\frac{d\,(V_R \cdot C_i)}{dt} = V_R \cdot R_{fi} \qquad (14)$$

ปริมาตรของน้ำหมักคงที่

$$\frac{d\,C_i}{dt} = r_{fi} \qquad (15)$$

5.2.1 สมการสมดุลมวลสารของเซลล์และการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ)

เนื่องจากการเจริญของเชื้อยีสต์มีระยะการเจริญแบบทวีคูณ (Log phase) มีบทบาทสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นแบบเอกซ์โพเนนเชียล จึงสามารถอธิบายการเจริญของยีสต์คือ การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (dx) ในระยะเวลาที่จำกัด (dt) จากปริมาณเซลล์ที่มี ณ เวลาใดๆ (x) ดังนั้นจากสมการที่ 14 สมดุลมวลสารของเซลล์จึงเขียนได้เป็น

$$\frac{dx\,(t)}{dt} = \mu\, x(t) \qquad (16)$$

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) มีหน่วยเป็น h^{-1}

และสามารถคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ได้จากวิธีอินทิกรัลโดยจัดรูปสมการเป็น

$$\int_{t_o}^{t_i} \mu dt = \int_{x(t_o)}^{x(t_i)} \frac{1}{X(t)} dX(t) \qquad (17)$$

$$\mu [t_i - t_o] = \ln x (t_i) - \ln x (t_o) \qquad (18)$$

$$\ln x (t_i) = \mu [t_i - t_o] + \ln x (t_o) \qquad (19)$$

จากสมการที่ 19 จะเห็นได้ว่าเมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln x (t_i)$ กับ $[t_i - t_o]$ จะได้สมการเส้นตรงที่ความชันของกราฟมีค่าเท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์, μ (ต่อชม.) และพบว่าจุลินทรีย์ใดๆที่อยู่ในระยะการเติบโตแบบทวีคูณนี้จะมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

5.2.2 สมการสมดุลมวลของสารอาหารและคำนวณอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (Specific consumption rate,q_s)

สำหรับการดำเนินการแบบแบตช์ ความเข้มข้นของเซลล์และสารอาหารเปลี่ยนแปลงไปตามเวลา ดังนั้นจากสมการที่ 14 สมดุลมวลสารของสารตั้งต้นจึงเขียนได้เป็น

$$-q_s = \frac{1}{x} \frac{ds}{dt} \qquad (20)$$

ดังนั้นสามารถคำนวณหาอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ, q_s (กรัมสารอาหาร ต่อกรัมเซลล์. ชม.)

5.2.3 สมการสมดุลมวลของผลิตภัณฑ์และการคำนวณอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific production rate, q_p)

สำหรับการดำเนินการแบบไม่ต่อเนื่องความเข้มข้นของเซลล์และผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลง ไปตามเวลา ดังนั้นจากสมการที่ 14 สมดุลมวลสารของผลิตภัณฑ์ จึงเขียนได้เป็น

$$q_p = \frac{1}{x}\frac{dp}{dt} \qquad (21)$$

ดังนั้นสามารถคำนวณหาอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ,q_p (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์ .ชม.)

6. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับโอโซน

6.1 คุณสมบัติของโอโซน

โอโซน (ozone) มีสูตรโมเลกุล คือ O_3 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 48 อยู่ในสถานะก๊าซที่อุณหภูมิและความดันปกติ มีจุดเดือดเท่ากับ –111.9°C ที่ความดันบรรยากาศ และไม่เสถียร โอโซนเป็นตัวออกซิแดนท์ (oxidation/oxidizing agent) ที่รุนแรงมาก มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายกลิ่น สี และรสในน้ำ และสามารถละลายในน้ำได้ประมาณ 20 เท่าของการละลายในน้ำของออกซิเจน แต่จะไม่เสถียรในน้ำ โอโซนมีความเสถียรในอากาศมากกว่าในน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอากาศที่เย็นและแห้ง (Weber, 1972; Cheremisinoff, 1993) ความสามารถในการละลายน้ำของโอโซนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความดันของโอโซนในสถานะก๊าซ

6.2 การสลายตัวของโอโซนในน้ำ

โอโซนเป็นก๊าซที่ไม่เสถียร สามารถสลายตัวเป็นออกซิเจนโดยแตกตัวให้ radical ต่างๆ ได้แก่ Hydroxyl radical (OH°), OH_3, HO_4 และ Super oxide (O_2^-) ซึ่ง radical ต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะมีความว่องไวมากในการทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ (strong oxidant) โอโซนสามารถออกซิไดส์สูงกว่าคลอรีนถึง 1.52 เท่า และสูงกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2)

การสลายตัวของโอโซนจะเพิ่มขึ้นเมื่อ ความเป็นด่าง (Alkalinity) เพิ่มขึ้น ทำให้โอโซนสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำและ hydroxide ion (OH^-) ได้ hydroxyl radical(OH°) เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งกระบวนการนี้จะมี hydroxide ion (OH^-) เป็นตัว promoter ของปฏิกิริยาการสลายตัวของโอโซน ดังนั้นครึ่งชีวิต(half life) ของโอโซนจึงค่อนข้างสั้นในสภาพที่เป็นด่าง โดยที่ pH 10 ครึ่งชีวิตของโอโซนในน้ำบริสุทธิ์มีค่าประมาณ 30 นาที สารประกอบอินทรีย์ในธรรมชาติเป็นทั้งตัว inhibitor และตัว promoter ของปฏิกิริยาการสลายตัวของโอโซน (Langlais *et al*,1991; Gottschalk *et al.*, 2000)

6.3 ปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างสารอินทรีย์กับโอโซน

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างสารอินทรีย์กับโอโซน (สุเมธ, 2541; Gottchalk *et al.,* 2000) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ

6.3.1 Direct Attack

สารอินทรีย์จะถูกทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของโอโซนโดยตรง ซึ่งเกิดได้โดยปฏิกิริยา electrophilic หรือ dipolar cyclo addition โอโซนจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์บริเวณพันธะคู่ (C=C, C=C-O-R, C=C-X) หรืออะตอมที่มีประจุลบ (N, P, O, S และnucleophilic C) สาร aromatics ที่มีหมู่ OH, CH_3 หรือ OCH_3 อยู่ตรงตำแหน่ง ortho จะทำปฏิกิริยากับโอโซนได้ดี (high reactivity) แต่ถ้ามีหมู่ NO_2, COOH หรือ CHO ปฏิกิริยาจะเกิดช้า

6.3.2 Indirect Attack

สารอินทรีย์จะถูกทำปฏิกิริยากับ free redicals ที่เกิดจากปฏิกิริยาขั้นที่ 1 อันได้แก่ OH° OH2° ซึ่งประจุเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดส์อีกทีหนึ่ง และสามารถออกซิไดส์สารอินทรีย์ประเภท acids aldehydes ketones และพวก less highly activated aromatic ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การใช้โอโซนในการสลายพันธะสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนจะได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันนอกจากจะมีการใช้โอโซนเพียงอย่างเดียวในการ

บำบัดน้ำเสียแล้ว ยังพบว่ามีการใช้โอโซนในการบำบัดน้ำเสียขั้นต้น ก่อนที่จะทำการบำบัดทางชีวภาพ ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น

นนทพงษ์ (2548) ทำการศึกษาการบำบัดสีน้ำทิ้งโรงงานเยื่อและกระดาษโดยกระบวนการโอโซเนชัน เนื่องจากในน้ำเสียดังกล่าวมีสารอินทรีย์พวกเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ยาก จึงได้นำโอโซนซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่รุนแรงมาบำบัดน้ำเสียก่อนที่จะมีการบำบัดทางชีวภาพพบว่าโอโซนสามารถย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ในน้ำเสียให้เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบที่โมเลกุลเล็กลงได้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การผลิตเอทานอลสามารถใช้วัตถุดิบประเภทต่างๆ ดังนี้

วัตถุดิบจำพวกน้ำตาลที่สำคัญได้แก่ อ้อย และกากน้ำตาล(คณะกรรมการพลังงาน, 2002) ซึ่งสามารถนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลได้โดยตรงแต่อย่างไรก็ตามวัตถุดิบดังกล่าวมีไม่เพียงพอและมีราคาต้นทุนค่อนข้างสูง

วัตถุดิบจำพวกแป้ง ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด (Ye Sun, 2002) กากมันสำปะหลัง (ธันยาภรณ์, 2548; ชลดา, 2546) โดยที่ก่อนจะเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล สารจำพวกแป้งจะ ต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นสารจำพวกน้ำตาลก่อนโดยเอนไซม์(enzymatic hydrolysis) เสียก่อน ซึ่งพบว่ามีการศึกษาวิจัยมากมายเพื่อพัฒนาการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทนี้

ธันยาภรณ์ (2548) ทำการศึกษาวิจัยการผลิตเอทานอลจากมันเส้นโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักพร้อมกัน โดยในขั้นตอนย่อยแป้งเป็นน้ำตาลนั้นจะประกอบด้วยการย่อย 2 ครั้ง คือ การย่อยแป้งครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และการย่อยแป้งครั้งสุดท้าย(Saccharification) ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการหมักด้วยยีสต์ ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้ 0.521 กรัมเอทานอลต่อกรัมแป้ง คิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 84 เมื่อเทียบกับผลที่ได้ทางทฤษฎี

ชลดา (2546) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล โดยในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลสและเพคติเนสที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงและย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง พบว่าให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 122.4 กรัมต่อลิตร เมื่อนำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 89.2 กรัมต่อลิตร หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 จะสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณ 3.62% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ 24 ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 91% ของทฤษฎี

วัตถุดิบจำพวกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ ไม้เนื้ออ่อน ซังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว (วรณี, 2546; Badal *et al*., 2005) ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ (Nicole *et al*., 1996 ; Kadar *et al*., 2004) ซึ่งก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลจะต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นสารจำ พวกน้ำตาลเสียก่อน

วรณี (2546) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว โดยพบว่าการไฮโดรไลลิสเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสจากการทดลองจะได้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุดที่สภาวะการไฮโดรไลซีสโดยใช้ความเข้มข้นกรดซัลฟูริก 1.0%โดยปริมาตรที่เวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อทำการหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 จะได้เอทานอลมากที่สุดที่เวลา 5 วัน

Badal (2005) ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว โดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.50 % โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 141 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 2 มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของฟางข้าว ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสสูงสุดคือ 565 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของฟางข้าว ทั้งนี้พบว่าในสภาวะดังกล่าวไม่เกิดฟูเฟอรัลและไฮดรอกซีเมทิลฟูเฟอรัล หลังจากนั้นจึงทำการหมักด้วยแบคทีเรีย *Escherichia coli* strain FBR5 ได้ผลผลิตเอทานอล 0.14 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งฟางข้าว

สำหรับการผลิตเอทานอลจากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ(Kadal, 2004; Nicole, 1996) โดยใช้วัตถุดิบพวกกากตะกอนเยื่อกระดาษ (recycled paper sludge;RPS) ก็มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง

Kadal (2004) ได้ศึกษากระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation ; SSF) โดยใช้เชื้อยีสต์ 2 ชนิด ได้แก่ *Kluyveromyces marxianus* และ *S. cerevisiae* ควบคุมสภาวะภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิต เอทานอลได้ประมาณ 0.17 กรัมเอทานอลต่อกรัมเยื่อกระดาษ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยที่มีความคล้ายคลึงกันในด้านของการนำวัตถุดิบประเภทกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งมาผลิตเป็นเอทานอล กล่าวคือ ในงานวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาเพื่อปรับสภาพวัตถุดิบให้มีความเหมาะสมก่อนด้วยวิธีการต่างๆคือ การใช้กรดเจือจางและการใช้โอโซน แล้วจึงนำไปย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ พร้อมทั้งศึกษาทดลองวิธีการลดความเป็นพิษที่เกิดจากการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางโดยการใช้ด่างประเภทแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งน่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้ดียิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ Jasco รุ่น U-2800
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) ของ Denver รุ่น 215
3. เครื่องผลิตโอโซน (Ozone generator) ของ Ozonair รุ่น OZ-7505
4. ตู้อบแห้ง (dryer oven) ของ Memmert รุ่น Binder
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น BWB
6. เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer /hot plate) ของ Stuart Scientific รุ่น SM6
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของ Hettich
8. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance) ของ Denver
9. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (laboratory balance) ของ Precisa รุ่น 240A
10. เครื่องเขย่า (shaker)
11. ปั๊มลม
12. ถ้วยกรองเบอร์ 2 (Filter crucible Por.2)
13. ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร ของ Nichipet EX

14. ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 1000-5000 ไมโครลิตร ของ Nichipet EX

15. เครื่องแก้วพื้นฐาน

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของ E. Merk Damstadt, Germany.

2. โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (Na-K tartrate) ของ AJAX Chemical, Australia.

3. โปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ของ AJAX Chemical, Australia

4. กรดไดไนโตรสาลิไซลิก ($C_7H_4N_2O_7$) ของ Fluka Chemika, Switzerland.

5. ฟีนอล ของ E. Merk Damstadt, Germany.

6. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ของ E. Merk Damstadt, Germany.

7. ออโทฟีแนนโทรลีน ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) ของ AJAX Chemical, Australia.

8. เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($(Fe(NH_4)_2SO_2)_2.6H2O$) ของ AJAX Chemical, Australia

9. เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของ AJAX Chemical, Australia.

10. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของ E. Merk Damstadt, Germany.

11. กรดอะซิติก (CH_3COOH) ของ E. Merk Damstadt, Germany

12. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของ APS Finechem, Australia.

13. โปแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) ของ AJAX Chemical, Australia.

14. โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) ของ AJAX Chemical, Australia

15. โซเดียมคลอไรด์ ของ AJAX Chemical, Australia

16. อะซิโตน (C_3H_6O) ของ E. Merk Damstadt, Germany

17. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (CaOH) ของ E. Merk Damstadt, Germany.

เอนไซม์

เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase enzyme) ซึ่งมีชื่อทางการค้าคือ Biozyme A40 ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* มีค่า Activity 2200 IU/mg ของบริษัท สยามวิคตอรี่ เคมิคอล จำกัด

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาคือ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถทนอยู่ในสภาวะการหมักที่เป็นกรดและทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้ดีของบริษัท สยามวิคตอรี่ เคมิคอล จำกัด

กากตะกอนเยื่อกระดาษ

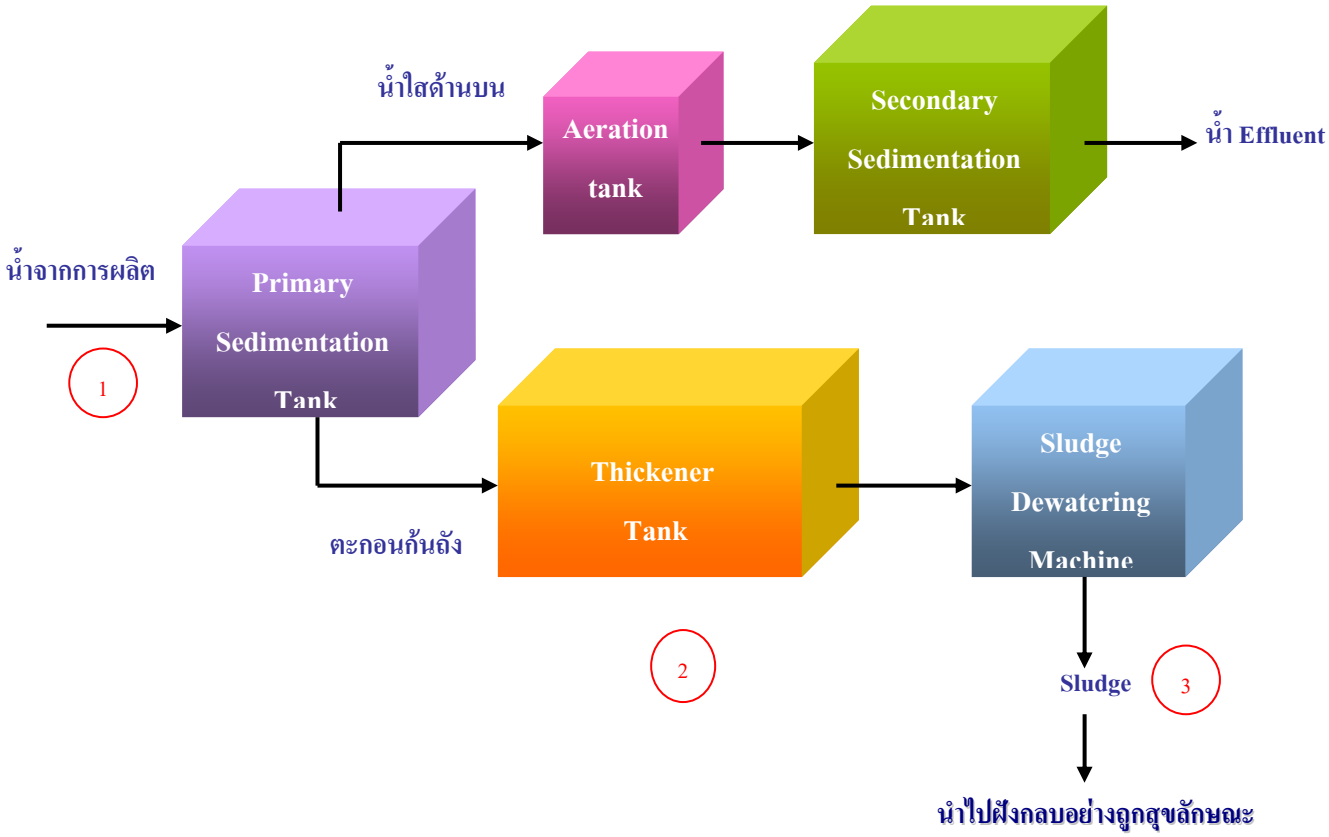
กากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานคิมเบอร์ลี่-คล้าก ประเทศไทย จำกัด ซึ่งปริมาณเยื่อกระดาษเหลือทิ้งที่เกิดขึ้นมีประมาณ 50-60 ตันต่อวัน ทางโรงงานฯ ทำการกำจัดโดยนำไปฝังกลบ

วิธีการ

1. ศึกษาคุณลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีของกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง

เก็บตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งจากบริษัทคิมเบอลี่-คล้าก ประเทศไทย จำกัด โดยเก็บตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษบริเวณก่อนเข้าและออกจากระบบบำบัดน้ำเสียที่จุดต่างๆ รวม 3 จุด ดังแสดงในภาพที่ 14 ได้แก่

จุดที่ 1 : น้ำเสียเยื่อกระดาษที่เกิดจากกระบวนการผลิตก่อนเข้าระบบบำบัดน้ำเสีย
จุดที่ 2 : น้ำเสียเยื่อกระดาษภายในถังทำข้น (Thickener tank)
จุดที่ 3 : กากตะกอนเยื่อกระดาษ(Sludge)ที่ผ่านการรีดน้ำก่อนนำไปฝังกลบ



ภาพที่ 14 จุดเก็บตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษ จากบริษัทคิมเบอลี่-คล้ากประเทศไทย จำกัด

นำกากตะกอนเยื่อกระดาษมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด นำมาร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดเล็กกว่า 0.25 มิลลิเมตร นำมาวิเคราะห์คุณลักษณะและองค์ประกอบต่างๆ ในกากตะกอนเยื่อกระดาษดังตารางที่ 2 ได้แก่

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	pH meter
ความชื้น	Moisture at 60°C
ปริมาณเซลลูโลส	TAPPI 203 om-88
ปริมาณเฮมิเซลลูโลส	TAPPI 203 om-88
ปริมาณลิกนิน	TAPPI 203 om-88
ปริมาณเถ้า	TAPPI T211 om-93

2. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยทำการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง (dilute acid pretreatment)

2.1 ศึกษาค่าความเป็นกรดด่างและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์ในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง

2.1.1 นำกากตะกอนเยื่อกระดาษที่อบแห้งและบดละเอียดมาในอัตราส่วน 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 - 2% (โดยปริมาตร) มาให้ความร้อนโดยเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 120°C เป็นระยะเวลา 60 นาที

2.1.2 กรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นเยื่อกระดาษออกมาแล้วจึงเติมน้ำกลั่นเข้าไปแทนสารละลายกรดเจือจางที่ทิ้งไป

2.1.3 ปรับให้มี pH ต่างๆ ได้แก่ 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ด้วย 6 N NaOH และ HCl

2.1.4 เติมเอนไซม์เซลลูเลส Biozyme A40 ซึ่งผลิตจากเชื้อรา *T. reesei* มีค่า Activity 2200 IU/mg ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร/200 กรัมเยื่อกระดาษ เพื่อย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลภายใต้อุณหภูมิ50˚C เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Mandel และ Sternbery (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง

2.2.1 นำกากตะกอนเยื่อกระดาษที่อบแห้งและบดละเอียดมาในอัตราส่วน 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 - 2% (โดยปริมาตร) มาให้ความร้อนโดยเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 120 - 180 ˚C เป็นระยะเวลา 15 - 60 นาที

2.2.2 กรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นเยื่อกระดาษออกมา แล้วจึงเติมน้ำกลั่นเข้าไปแทนสารละลายกรดเจือจางที่ทิ้งไป

2.2.3 ปรับให้มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (ได้จากการทดลอง 2.1)

2.2.4 เติมเอนไซม์เซลลูเลส Biozyme A40 ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร/200 กรัมเยื่อกระดาษ ควบคุมอุณหภูมิที่ 50˚C เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

2.3 ศึกษาการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่าง

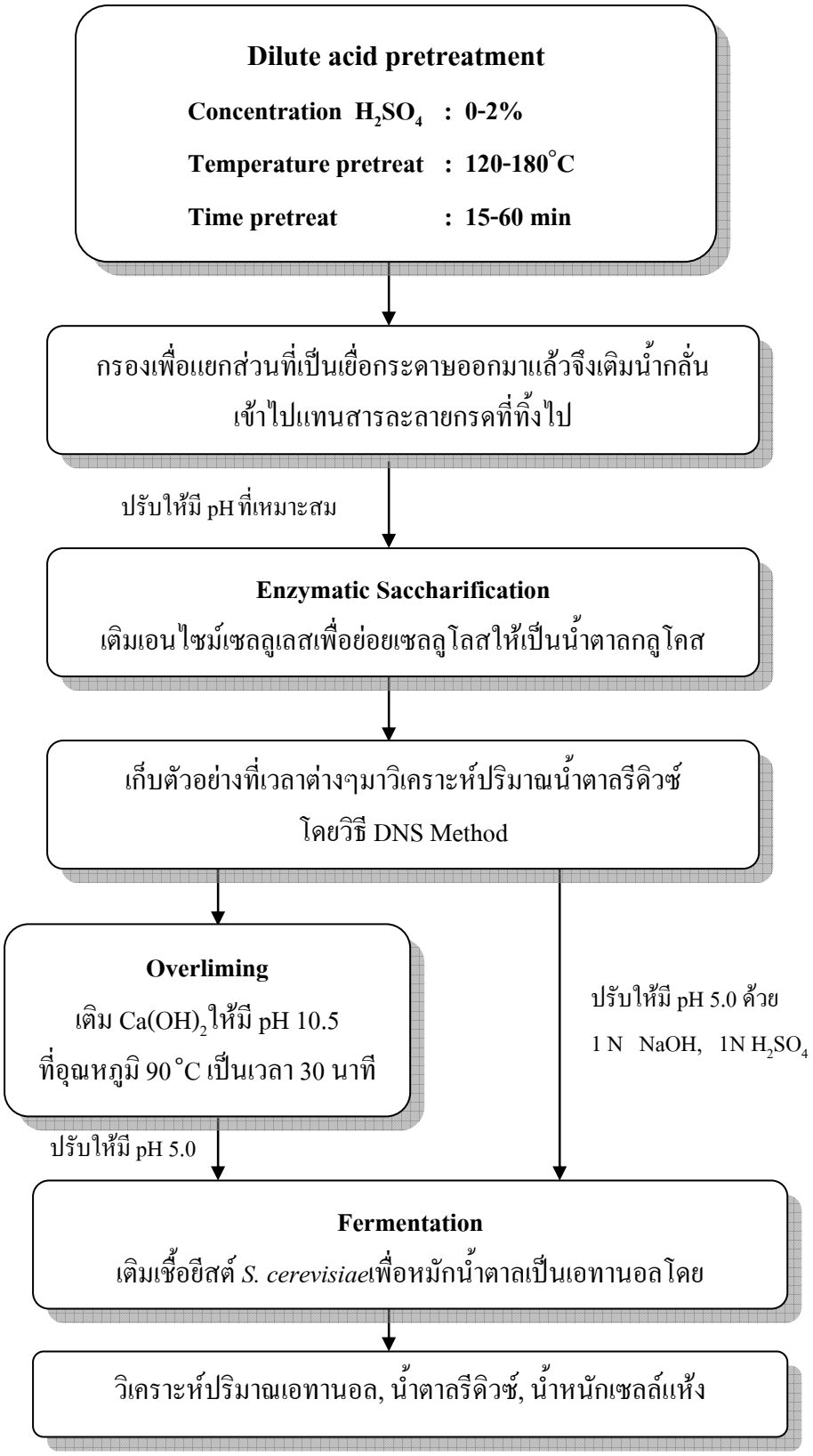
2.3.1 นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากข้อ 2.2.4 มากรองเพื่อแยกเอาส่วนเยื่อกระดาษออกไปให้เหลือแต่น้ำใส

2.3.2 ศึกษาผลของการลดความเป็นพิษโดยชุดหนึ่งมีการเติม $Ca(OH)_2$ จนมี pH 10.5 ที่อุณหภูมิ 90˚C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปรับให้มี pH 5.0 ด้วย1N HCl อีกชุดหนึ่งไม่มีการเติม $Ca(OH)_2$ ลงไป แล้วปรับให้มี pH 5.0

2.4 ศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

2.4.1 นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากข้อ 2.3.2 มาเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35°C pH 5.0

2.4.2 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นโดยวิธีไดโครเมตออกซิเจน (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก) ขั้นตอนการทดลองแสดงดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 แผนผังขั้นตอนการทดลองการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยทำการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง

3. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยทำการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน

3.1 การทดสอบอัตราการผลิตโอโซนของเครื่องผลิตโอโซน

ในการทดลองทำการตรวจสอบปริมาณโอโซนจากเครื่องผลิตโอโซน โดยปริมาณโอโซนที่เกิดขึ้นจากเครื่องผลิตสัมพันธ์โดยตรงกับระยะเวลาที่สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์สัมผัสโอโซน ในการทดลองใช้เครื่องผลิตโอโซนมีแหล่งกำเนิดคืออากาศ (มีออกซิเจนประมาณ 21 %) ซึ่งในการผลิตโอโซนนี้การเพิ่มปริมาณโอโซนสามารถทำได้โดยการเพิ่มค่าอัตราการไหลของอากาศที่เข้าสู่เครื่องผลิตโอโซน ในการทดลองเลือกปรับค่าอัตราการไหลของอากาศ 2 4 6 และ 8 ลิตรต่อนาที โดยในการหาปริมาณโอโซน (Ozone dose) ใช้วิธี Wet Chemistry Potassium Iodide Method (Ozone Demand/Requirment Semi-Batch Method : 2350E ใน Standard Methods for the examination of water and wastewater) (APHA, 1992)

3.2 ศึกษาค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมในการใช้โอโซนเพื่อปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้น

3.2.1 นำกากตะกอนเยื่อกระดาษที่อบแห้งและบดละเอียดมาในอัตราส่วน 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมน้ำกลั่นแล้วปรับให้มี pH 5.0 7.0 และ 10.0 ด้วย 6 N NaOH และ HCl

3.2.2 นำมาเติมโอโซนโดยปรับอัตราการไหลอากาศ 2 4 6 และ8 ลิตรต่อนาที มีระยะเวลาในการป้อนโอโซนเท่ากับ 15 30 45 และ 60 นาที

3.2.3 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 60 นาทีเพื่อให้โอโซนในสารละลายสลายตัว แล้วจึงปรับให้มี pH ที่เหมาะสม (จากการทดลอง 2.1)

3.2.4 เติมเอนไซม์เซลลูเลส Biozyme A40 ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร/100 กรัมเยื่อกระดาษ ควบคุมอุณหภูมิที่ 50°C วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

3.3 ศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล (Fermentation)

3.3.1 นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากข้อ 3.2.4 มาเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35°C pH 5.0

3.3.2 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือและปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ขั้นตอนการทดลองแสดงดังภาพที่ 16

4. การคำนวณหาค่าพารามิเตอร์และค่าประสิทธิภาพการหมัก (fermentation efficiency)

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\mu = \frac{\ln x (t_i) - \ln x (t_o)}{(t_i - t_o)} \quad (22)$$

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \quad (23)$$

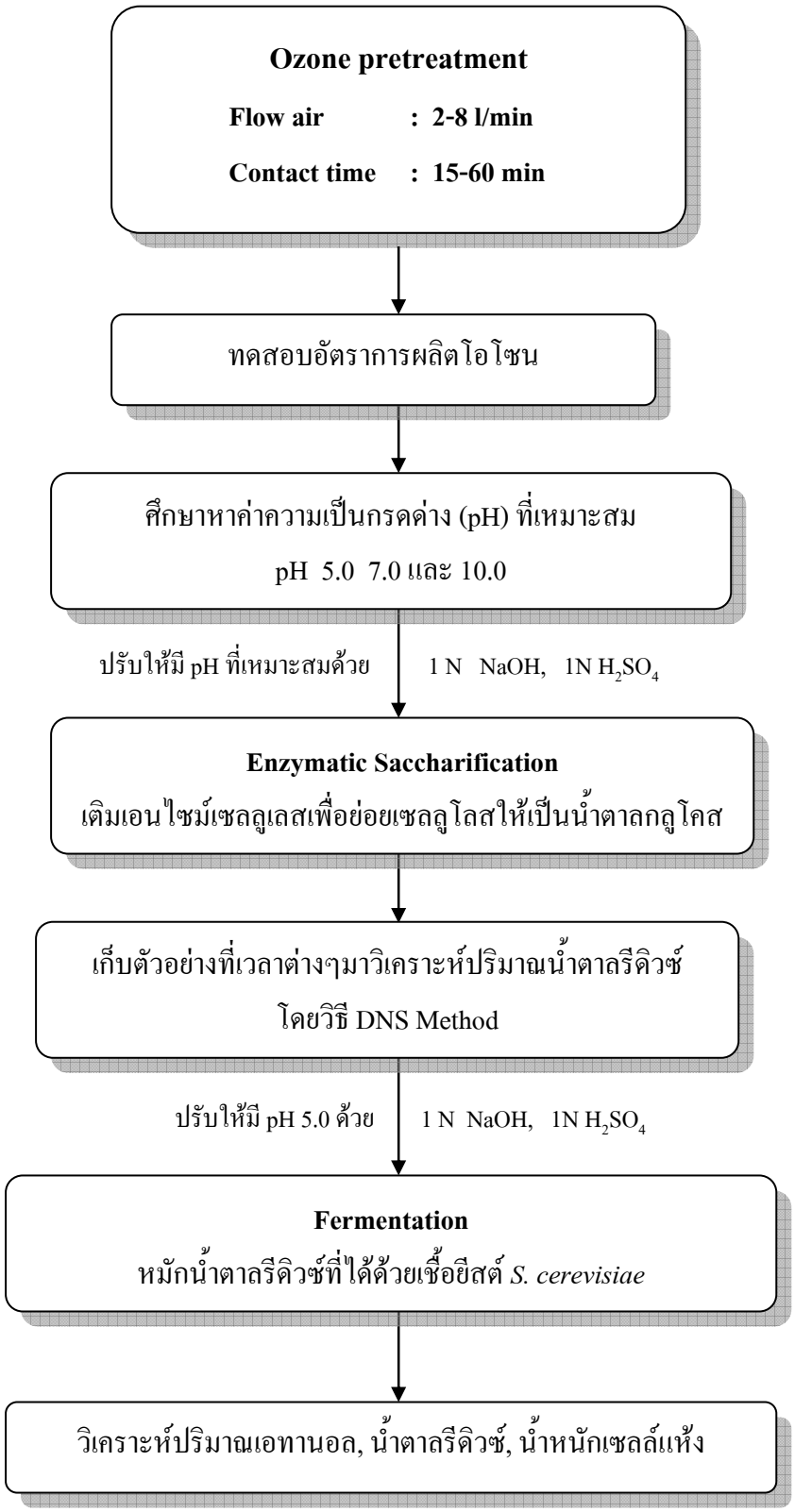
$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \quad (24)$$

$$q_s = \frac{-1}{\bar{x}} \frac{ds}{dt} \quad (25)$$

$$q_p = \frac{1}{\bar{x}} \frac{dp}{dt} \quad (26)$$

$$P_{max} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลสูงสุด (mg/l)}}{\text{เวลา (h)}} \quad (27)$$

$$\text{Fermentation efficiency} = \frac{Y_{p/s}}{0.51} \quad (28)$$



ภาพที่ 16 แผนผังขั้นตอนการทดลองการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยทำการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาคุณลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีของกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง

จากการวิเคราะห์คุณลักษณะและองค์ประกอบในกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งทั้ง 3 จุด ได้แก่

จุดที่ 1 : น้ำเสียเยื่อกระดาษที่เกิดจากกระบวนการผลิตก่อนเข้าระบบบำบัดน้ำเสีย
จุดที่ 2 : น้ำเสียเยื่อกระดาษภายในถังทำข้น (Thickener tank)
จุดที่ 3 : กากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) ที่ผ่านการรีดน้ำก่อนนำไปกำจัดโดยการฝังกลบ

เมื่อปรับสภาพทางกายภาพโดยวิธีการบดแต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณลักษณะและองค์ประกอบในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพทางกายภาพโดยการบดแต่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

พารามิเตอร์	จุดเก็บตัวอย่างเยื่อกระดาษ		
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3 [1]
ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	7.34	7.45	7.47
ความชื้น (%)	98.13	97.95	74.19
ปริมาณเซลลูโลส (% โดยน้ำหนัก)	47.48	51.23	51.27
ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (% โดยน้ำหนัก)	41.73	37.61	38.81
ปริมาณลิกนิน (% โดยน้ำหนัก)	7.11	7.07	7.18
ปริมาณเถ้า	4.25	4.16	4.14

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ

[1] เลือกใช้ในการทดลองโดยนำมาปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง ผ่านกระบวนการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลและทำการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

จากการวิเคราะห์คุณลักษณะและองค์ประกอบในน้ำเสียเยื่อกระดาษเหลือทิ้งพบว่า องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นพวกเซลลูโลส ดังนั้นจึงเป็นแรงจูงใจในการศึกษาและวิจัยเพื่อนำกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งเหล่านี้กลับมาใช้ประโยชน์ให้คุ้มค่า โดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกลูโคส เนื่องจากกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะผลิตเอทานอลโดยใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษที่เหลือทิ้งของทางโรงงานเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและเป็นการลดปริมาณของเสียที่ทางโรงงานผลิตกระดาษจะต้องนำไปฝังกลบ

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบในน้ำเสียเยื่อกระดาษทั้ง 3 จุด พบว่าจุดที่ 2 ซึ่งเป็นน้ำเสียเยื่อกระดาษภายในถังทำข้น และจุดที่ 3 ซึ่งเป็นกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง แสดงลักษณะดังภาพที่ 17 นั้นมีองค์ประกอบประเภทเซลลูโลสอยู่มากกว่าจุดที่ 1 และเมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมและความเป็นไปได้ในการที่จะนำเยื่อกระดาษเหลือทิ้งเหล่านี้มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลพบว่ากากตะกอนเยื่อกระดาษจากจุดที่ 3 มีความเหมาะสมมากที่สุดเพราะมีลักษณะเป็นของแข็งเนื่องจากผ่านขั้นตอนการรีดน้ำแล้ว จึงมีส่วนที่เป็นเยื่อกระดาษผสมอยู่มาก แต่สำหรับจุดที่ 2 นั้นมีลักษณะเป็นน้ำเสียซึ่งมีเยื่อกระดาษผสมอยู่น้อยกว่า หากนำมาใช้เป็นวัตถุดิบจำเป็นต้องมีขั้นตอนในการแยกส่วนที่เป็นเยื่อกระดาษออกมาอีก จึงเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากกว่า

(A) (B)

ภาพที่ 17 กากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งจากจุดที่ 3 ซึ่งนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล (A) กากตะกอนเยื่อกระดาษก่อนอบ (B) กากตะกอนเยื่อกระดาษหลังอบที่บดละเอียด

เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย คือ กากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งซึ่งยังมีเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส เพราะส่วนประกอบทั้งสองทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักด้วย ดังนั้นขั้นตอนแรกจึงต้องทำการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกก่อน ทั้งนี้ยังเป็นการช่วยปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์

ในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทที่เป็นเซลลูโลสเพื่อผลิตเอทานอลนั้นสามารถทำได้หลายวิธี แต่เมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมของวิธีการ ลักษณะของวัตถุดิบและความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ จึงเลือกทำการศึกษาวิจัยโดยเปรียบเทียบระหว่างการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางและการใช้โอโซน เพื่อหาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ ซึ่งสาเหตุในการเลือกวิธีการปรับสภาพทั้ง 2 วิธีนี้เนื่องจาก

การปรับสภาพโดยใช้สารละลายกรดเจือจาง พบว่าเป็นการกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกจากโครงสร้าง เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถละลายในสารละลายกรดเจือจางได้ดีกว่าเซลลูโลส และยังทำให้เกิดการบวมของโครงสร้าง ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยเนื่องจากเอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น

การปรับสภาพขั้นต้นโดยใช้โอโซน เนื่องจากโอโซนเป็นสารออกซิแดนท์ที่รุนแรงและมีประสิทธิภาพ โอโซนสามารถย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ในน้ำเสีย เช่น เซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ให้เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่โมเลกุลเล็กลงได้ ส่งผลให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้โอโซนไม่เสถียร สามารถสลายตัวได้ง่าย จึงไม่ตกค้างอยู่ในตัวอย่าง

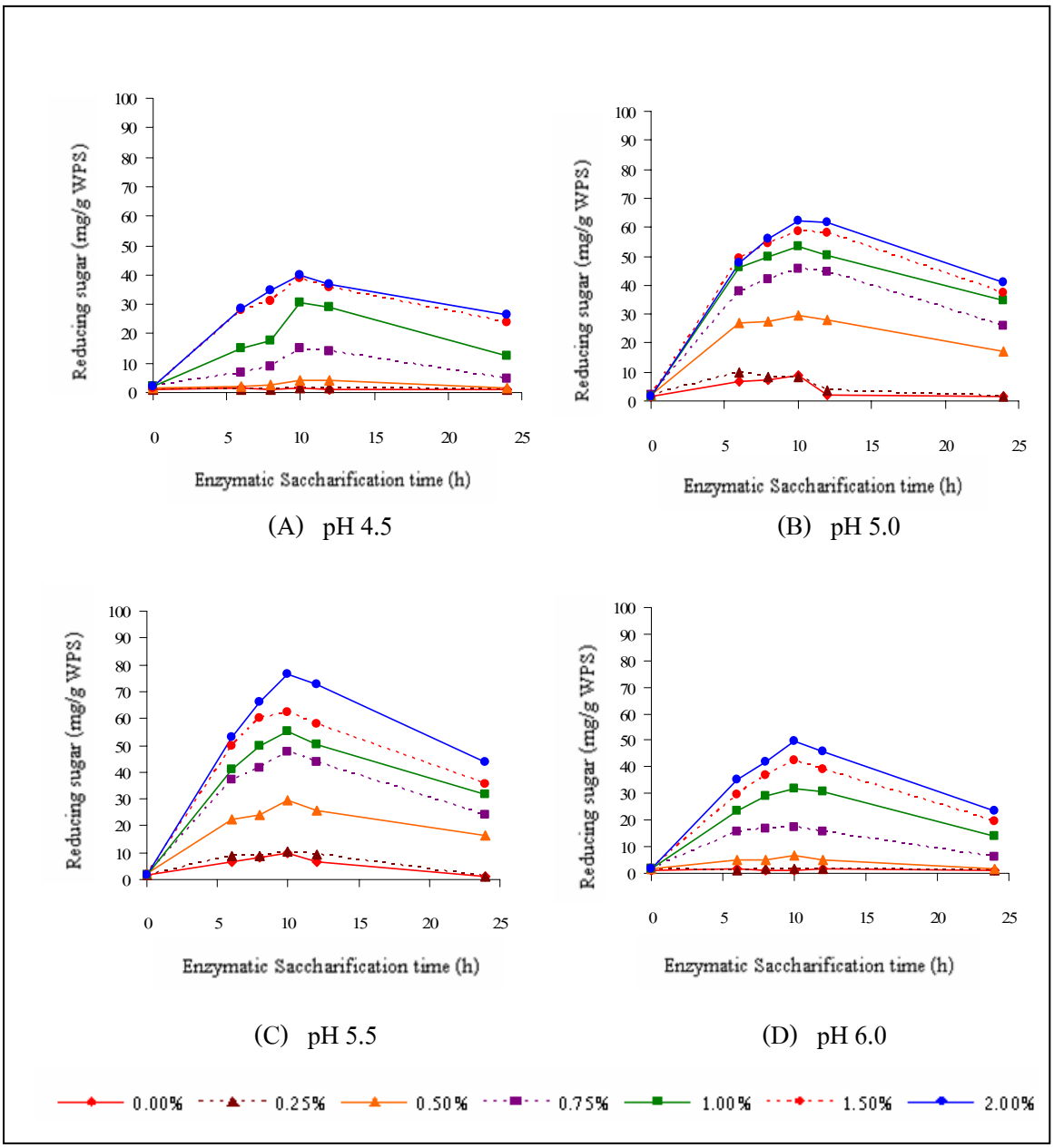
2. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยทำการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง

2.1 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดด่าง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์

จากการทดลองพบว่าหลังจากเติมเอนไซม์เซลลูเลสลงไปในเยื่อกระดาษที่ปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 - 2% (โดยปริมาตร) ระบบเริ่มเข้าสู่กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ เมื่อเวลาผ่านไปจะค่อยๆเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น โดยเกิดน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆลดลง ซึ่งอาจมีผลมาจากเริ่มมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆในระบบและใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเป็นอาหาร จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลค่อยๆลดลง

เมื่อเปรียบเทียบสภาพความเป็นกรดด่าง (pH) เริ่มต้นที่แตกต่างกันคือ 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ก็พบว่าเกิดน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน แต่จะพบว่าที่สภาพความเป็นกรดด่างต่างกันนั้นมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเห็นได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้แตกต่างกัน คือ 39.65 62.15 76.75 และ 49.90 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ ตามลำดับ (เมื่อใช้กรดซัลฟูริก 2%) ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 18 แสดงให้เห็นว่าสภาพความเป็นกรดด่าง 5.5 นั้นเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเพราะสามารถย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลได้มากกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆ การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่างเนื่องจากที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างกันมีผลทำให้กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มีการแตกตัวของอิออนให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการจับกันของเอนไซม์และสับสเตรทได้แตกต่างกัน

ดังนั้นจึงเลือกที่เวลา 10 ชั่วโมงและค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 เป็นค่าที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสจากกากตะกอนเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบผลของความเป็นกรดด่าง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ เมื่อปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางความเข้มข้น 0 - 2% (โดยปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ120 °C เป็นระยะเวลา60 นาที

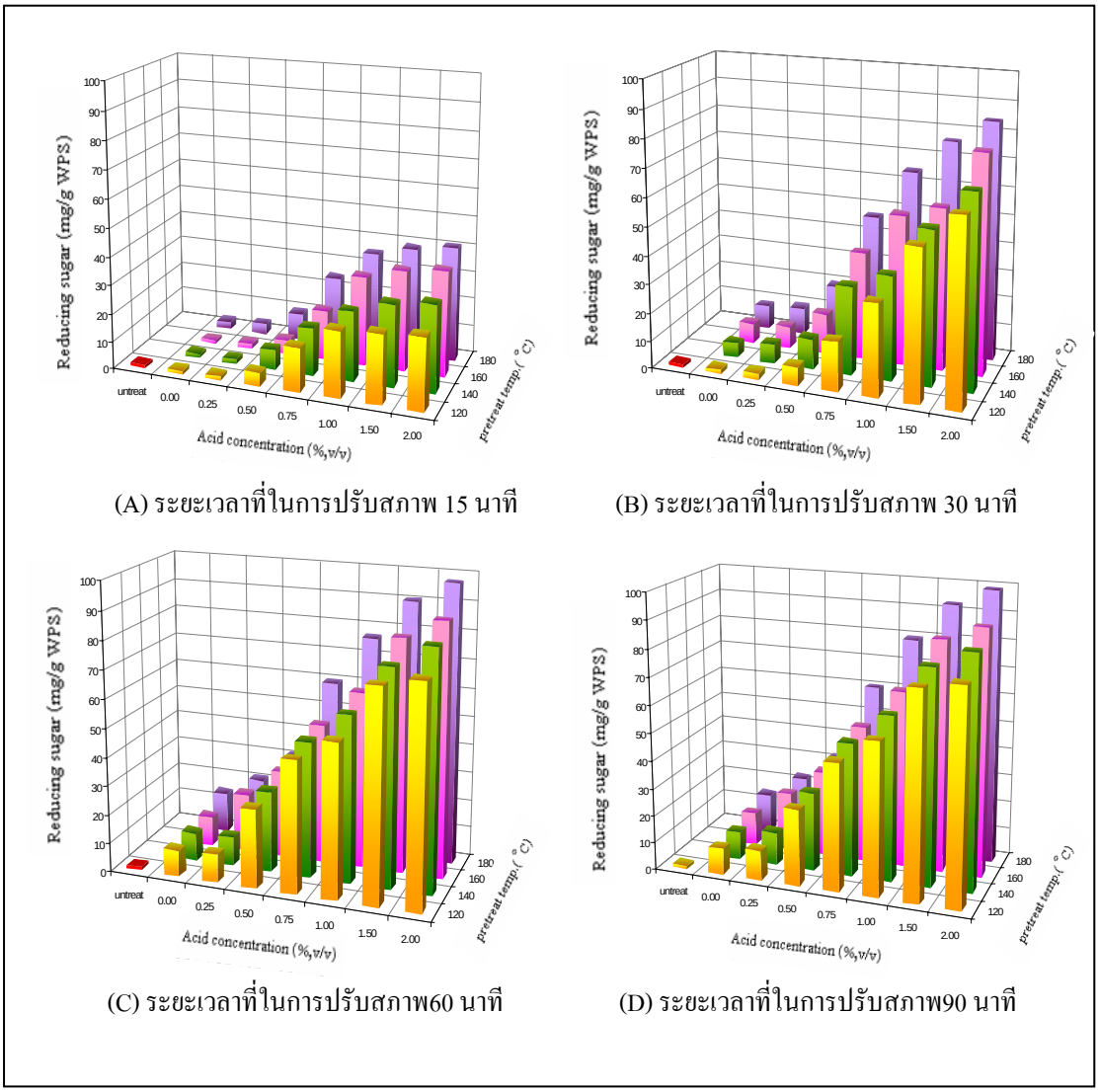
2.2 ผลการศึกษาการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษด้วยกรดเจือจางและกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์

2.2.1 ผลของความเข้มข้นกรดซัลฟูริกเจือจางที่ใช้ในการปรับสภาพ

ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง ศึกษาผลของความเข้มข้นกรดซัลฟูริกตั้งแต่ 0.0-2.0% (โดยปริมาตร) โดยใช้เยื่อกระดาษ (2%, น้ำหนักต่อปริมาตร, น้ำหนักแห้ง) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120-180°C เป็นระยะเวลา 15 , 30 และ 60 นาที หลังจากนั้นจึงปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 5.5 (ได้จากผลการทดลองข้อ 2.1) เติมเอนไซม์เซลลูเลส Biozyme A40 ควบคุมอุณหภูมิที่ 50°C ให้ระบบเข้าสู่กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง (Enzymatic Saccharification time) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ได้ผลดังภาพที่ 19

จากภาพที่ 19 เป็นกราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง 0-2% โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในการปรับสภาพตั้งแต่ 120-180 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการปรับสภาพ กล่าวคือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริกเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดเพิ่มขึ้นไปด้วย อธิบายได้ว่าสารละลายกรดซัลฟูริกเข้าไปทำปฏิกิริยาสลายพันธะของโครงสร้างโมเลกุลระหว่างเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส เป็นตัวละลายเฮมิเซลลูโลสที่เกาะอยู่กับโครงสร้างของเซลลูโลสออกมาเพราะเฮมิเซลลูโลสละลายในกรดเจือจางได้ดีกว่าเซลลูโลส ดังนั้นจึงเป็นการกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกจากกากตะกอนเยื่อกระดาษได้มากขึ้น สารละลายกรดซัลฟูริกยังทำให้เกิดการพองตัวในโครงสร้างของเซลลูโลสซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยเนื่องจากเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น (Gallichsen and Paulapuro, 2000)

นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกจนถึง 1.5-2.0 % ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการปรับสภาพไม่มีความจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่า 2.0% เพราะจะเป็นการสิ้นเปลืองโดยใช่เหตุเนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีพียงเล็กน้อย



(A) ระยะเวลาที่ในการปรับสภาพ 15 นาที (B) ระยะเวลาที่ในการปรับสภาพ 30 นาที

(C) ระยะเวลาที่ในการปรับสภาพ60 นาที (D) ระยะเวลาที่ในการปรับสภาพ90 นาที

ภาพที่19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังจากปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง เมื่อใช้ความเข้มข้นกรด 0-2% โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในการปรับสภาพตั้งแต่ 120-180 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ แล้วผ่านการย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส

(A) ระยะเวลาที่ในการปรับสภาพ 15 นาที (B) ระยะเวลาที่ในการปรับสภาพ30 นาที

(C) ระยะเวลาที่ในการปรับสภาพ 60 นาที (D) ระยะเวลาที่ในการปรับสภาพ 90 นาที

2.2.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษ

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งนั้น ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 120, 140, 160 และ180 °C โดยใช้ความเข้มข้นกรดซัลฟูริกตั้งแต่ 0-2 % (โดยปริมาตร) ระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพตั้งแต่ 15-60 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 19

จากภาพที่ 19 เป็นกราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง 0-2% โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในการปรับสภาพตั้งแต่ 120-180 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่าเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นด้วย เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นนี้มีผลทำให้สารละลายกรดซัลฟูริกสามารถแพร่เข้าไปในโครงสร้างของเซลลูโลสได้เร็วขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยาและเกิดการบวมตัวได้เร็วขึ้น จึงสามารถละลายและแยกเฮมิเซลลูโลสออกมาได้มากขึ้น (Soto *et al*., 1994)

2.2.3 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษ

ในการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษได้ทำการทดลองเปรียบเทียบที่ระยะเวลาต่างๆตั้งแต่ 15, 30 และ 60 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 19

จากภาพที่ 19 พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพมากขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดมากขึ้นด้วย โดยเมื่อปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 15 นาที ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณเล็กน้อย แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพมากขึ้นเป็น 30, 60 และ 90 นาที จะทำให้เกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นตามลำดับ เนื่องจากเป็นการเพิ่มเวลาให้สารละลายกรดซัลฟูริกเข้าไปละลายเฮมิเซลลูโลสออกจากโครงสร้างของเซลลูโลสนานขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระยะเวลาในการปรับสภาพ 60 และ 90 นาทีนั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นค่อนข้างคงที่ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าในการทดลองนี้ใช้เวลาในการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางเป็นระยะเวลา 60 นาที ก็เป็นเวลาที่มากเพียงพอที่สารละลายกรดซัลฟูริกจะสามารถแพร่เข้าไปในโครงสร้างและทำปฏิกิริยาได้หมดแต่ถ้าใช้เวลาในการปรับสภาพน้อยกว่า นี้สารละลายกรดซัลฟูริกอาจจะแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยาได้ยังไม่หมด แต่ถ้าใช้เวลามากกว่านี้ก็จะเป็นการสิ้นเปลือง โดยใช่เหตุ

2.3. ผลการศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล (Fermentation)

ในการศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางในสภาวะต่างๆ คือ อุณหภูมิในการปรับสภาพ 120, 140, 160 และ180 °C ใช้ความเข้มข้นกรดซัลฟูริกตั้งแต่ 1-3 % (โดยปริมาตร) ระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ 60 นาที ศึกษาผลของการลดความเป็นพิษโดย ชุดหนึ่งมีการเติม $Ca(OH)_2$ จนมี pH 10.5 ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปรับให้มี pH 5.0 ด้วย1N HCl ส่วนอีกชุดหนึ่งไม่มีการเติม $Ca(OH)_2$ ลงไปแล้วจึงเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35°C เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ได้ผลการทดลองดังนี้

2.3.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักมีแนวโน้มลดลงทั้งชุดที่ไม่มีการลดความเป็นพิษและชุดที่มีการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่าง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 20 และ 21

จากภาพที่ 20 เป็นการเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักเมื่อระยะเวลาผ่านไป พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 ° C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล พบว่าค่าความเป็นกรดด่างมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น เนื่องจากในกระบวนการหมักมีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH + 28.7\ kcal \qquad (29)$$

เมื่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในน้ำจึงเกิดเป็นกรดคาร์บอนิก ส่งผลให้น้ำหมักมีสภาพความเป็นกรดมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น จึงทำให้น้ำหมักมีค่าความเป็นกรดด่างลดลง อย่างไรก็ตามพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงนี้ขึ้นอยู่กับสองปัจจัยด้วยกัน คือ

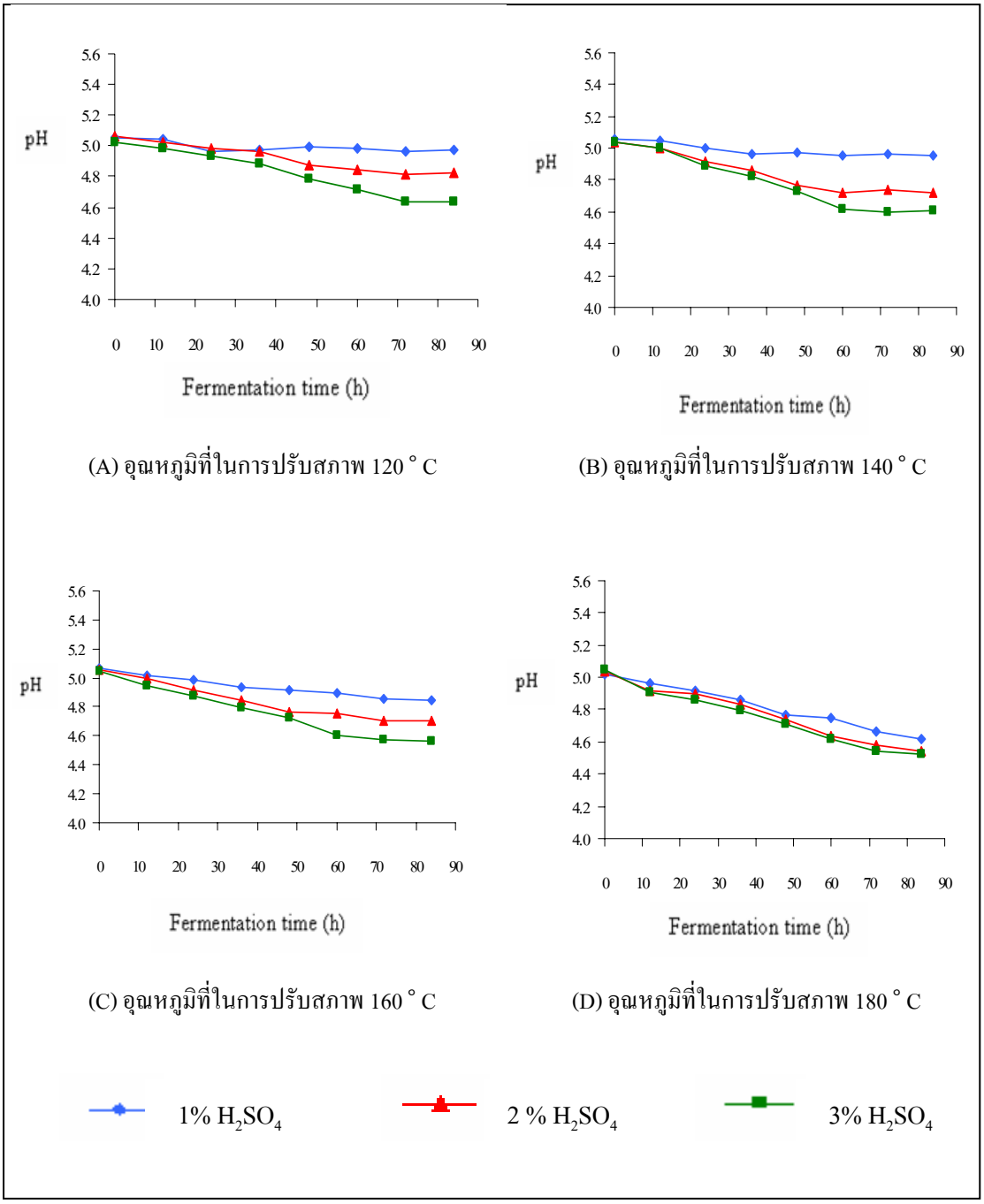
ปัจจัยที่หนึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกเจือจางและปัจจัยที่สอง ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพขั้นต้น กล่าวคือ

ปัจจัยที่หนึ่งได้แก่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกเจือจางที่ใช้ในการปรับสภาพขั้นต้น จากการทดลองพบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของกรดต่ำๆในการปรับสภาพขั้นต้น ซึ่งจากการทดลองใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง 1% ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักค่อนข้างคงที่มากกว่าการใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง 2 และ 3% แสดงดังภาพที่ 20

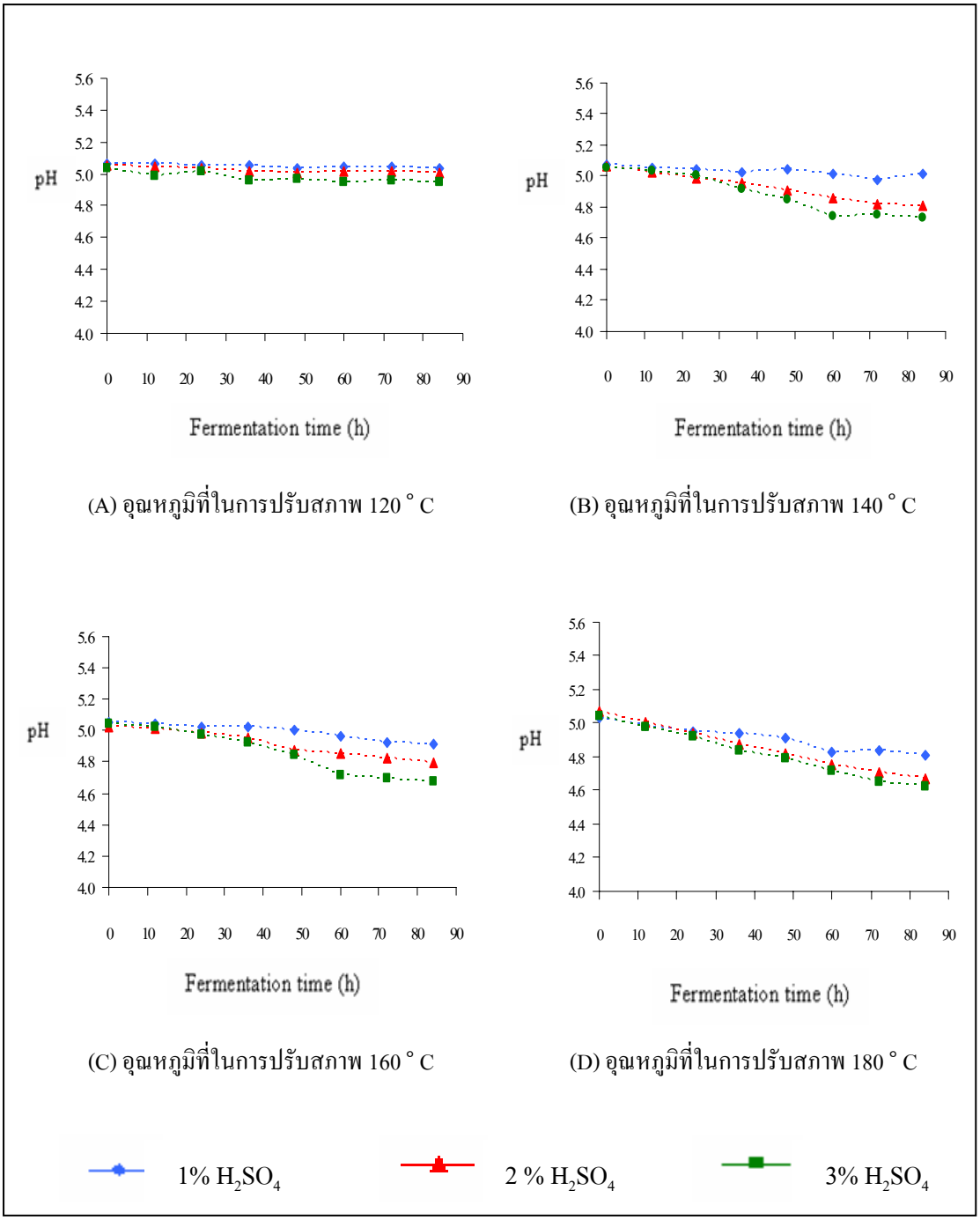
ปัจจัยที่สอง ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพขั้นต้น จากการทดลองพบว่าถ้าใช้อุณหภูมิต่ำในการปรับสภาพค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักจะเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าการปรับสภาพโดยใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งจากภาพที่ 20 เป็นการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก โดยจะพบว่าที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 120 ° C ค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างคงที่ แต่เมื่อใช้อุณหภูมิในการปรับสภาพเป็น 180 ° C จะพบว่าค่าความเป็นกรดด่างมีแนวโน้มลดลง

นอกจากนี้ในการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นกรดและอุณหภูมิสูงจะเกิดสารต่างๆจำพวก ฟูเฟอรัล ไฮดรอกซีเมธทิลฟูเฟอรัล สารประกอบฟีนอลิก และกรดอะซิติก ซึ่งมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักลดลงและมีผลยับยั้งการทำงานของเชื้อยีสต์ (Badal, 2005)

ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบโดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อลดความเป็นพิษจากสารต่างๆจำพวก ฟูเฟอรัล ไฮดรอกซีเมธทิลฟูเฟอรัล และกรดอะซิติก และเพื่อควบคุมให้น้ำหมักมีค่าความเป็นกรดด่างคงที่มากขึ้น เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างนี้มีผลต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการทำงานของเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักโดยตรง ผลแสดงดังภาพที่ 21 พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักค่อนข้างคงที่มากกว่าการไม่มีการลดความเป็นพิษ (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 ° C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยไม่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป



ภาพที่ 21 การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 ° C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป

2.3.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight)

ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ทำการเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR ลงไปในน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางในสภาวะต่างๆ ในปริมาณที่เท่ากัน แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์มีความแตกต่างกันโดยจะพบว่าชุดที่มีการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่าง เชื้อยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าชุดที่ไม่มีการลดความเป็นพิษ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 22 และ 23

จากภาพที่ 22 เมื่อทำการหมักในระยะแรกน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์จะค่อยๆเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆเนื่องจากเชื้อยีสต์อยู่ในขั้นของการปรับตัวและปรับสภาพเพื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่มีในระบบในการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอล แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 60 จะพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากเชื้อยีสต์ได้ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโตรวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งใช้เป็นอาหารเริ่มเหลือน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาการปรับสภาพเมื่อใช้ความเข้มข้นกรดเจือจางและอุณหภูมิต่างๆพบว่า เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 1 2 และ 3% ตามลำดับ และยังพบว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีทีสุดในน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยอุณหภูมิต่ำคือ 120 140 และ160° C ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิสูงคือ 180 °C นั้นเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากว่าการปรับสภาพด้วยกรดที่มีความเข้มข้นสูงและการใช้อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดสารซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ เช่น ฟูเฟอรัล ไฮดรอกซีเมธทิลฟูเฟอรัล และกรดอะซิติก เป็นต้น

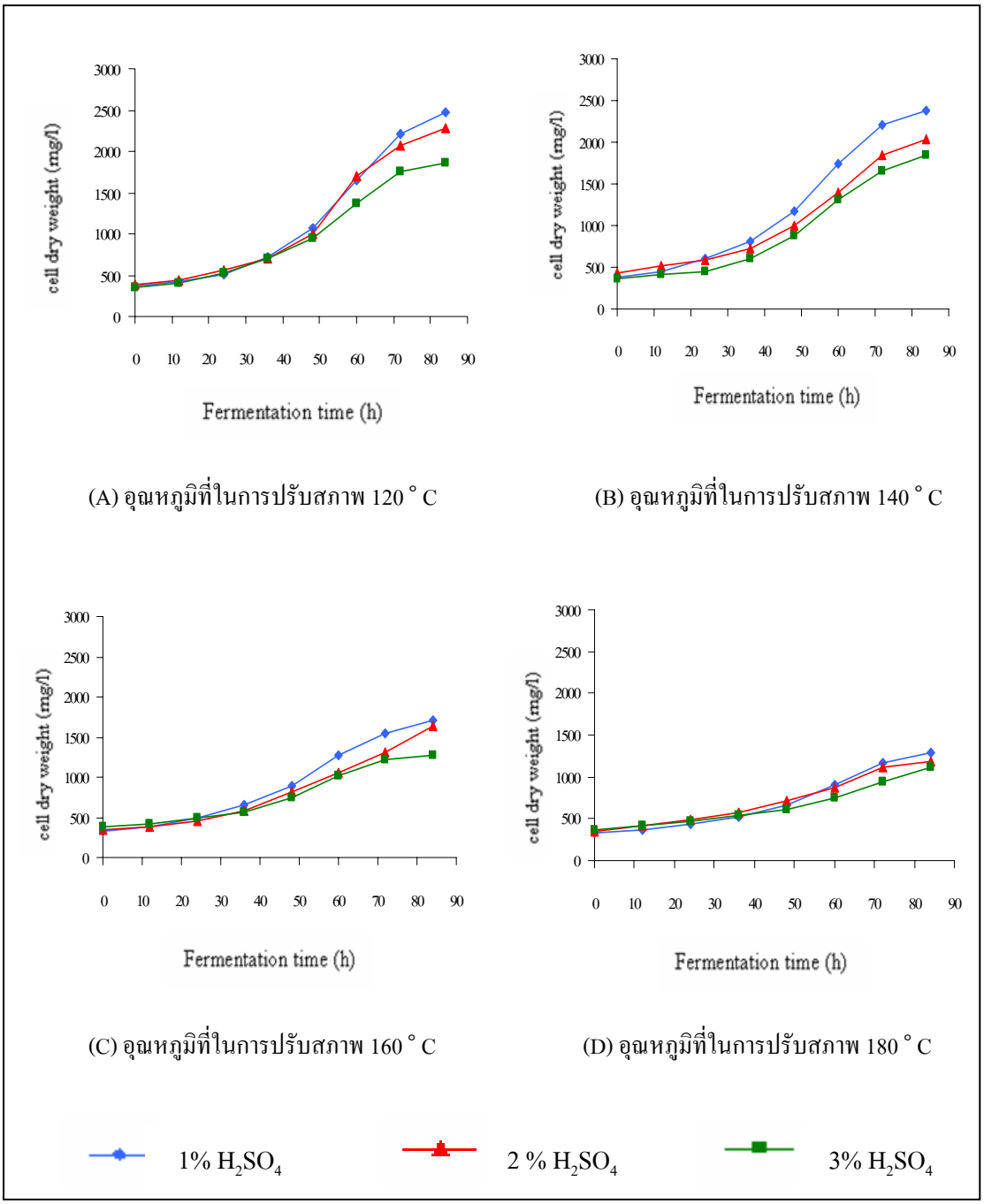
เมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยเติมด่างลงไปพบว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ดังภาพที่ 23 ซึ่งเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น โดยในระยะแรกน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆและจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 40 และหลังจากชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไป น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่ อย่างไรก็ตามการเติมด่างเพื่อช่วยลดความเป็นพิษนั้นถึงแม้จะเพิ่มความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์แต่ก็ยังพบว่าในการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจากการทดลองใช้อุณหภูมิ180 °C จะพบว่าการใช้ด่างเป็นการช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งในน้ำหมักที่ไม่มีการลดความเป็นพิษและมีการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่างพบว่า ในน้ำหมักที่มีการเติมด่างลงไปจะช่วยให้เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นจึงมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้นจึงน่าจะมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ในน้ำหมักที่มีการเติมด่างยังเป็นการช่วยลดความเป็นพิษทำให้เชื้อยีสต์มีความสามารถในการปรับสภาพได้รวดเร็วกว่าจึงทำให้เชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงการหมักที่ 40 แต่สำหรับน้ำหมักที่ไม่มีการเติมด่างจะพบว่าเชื้อยีสต์ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพนานกว่าซึ่งต้องใช้เวลามากกว่า 60 ชั่วโมงเชื้อยีสต์จึงจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

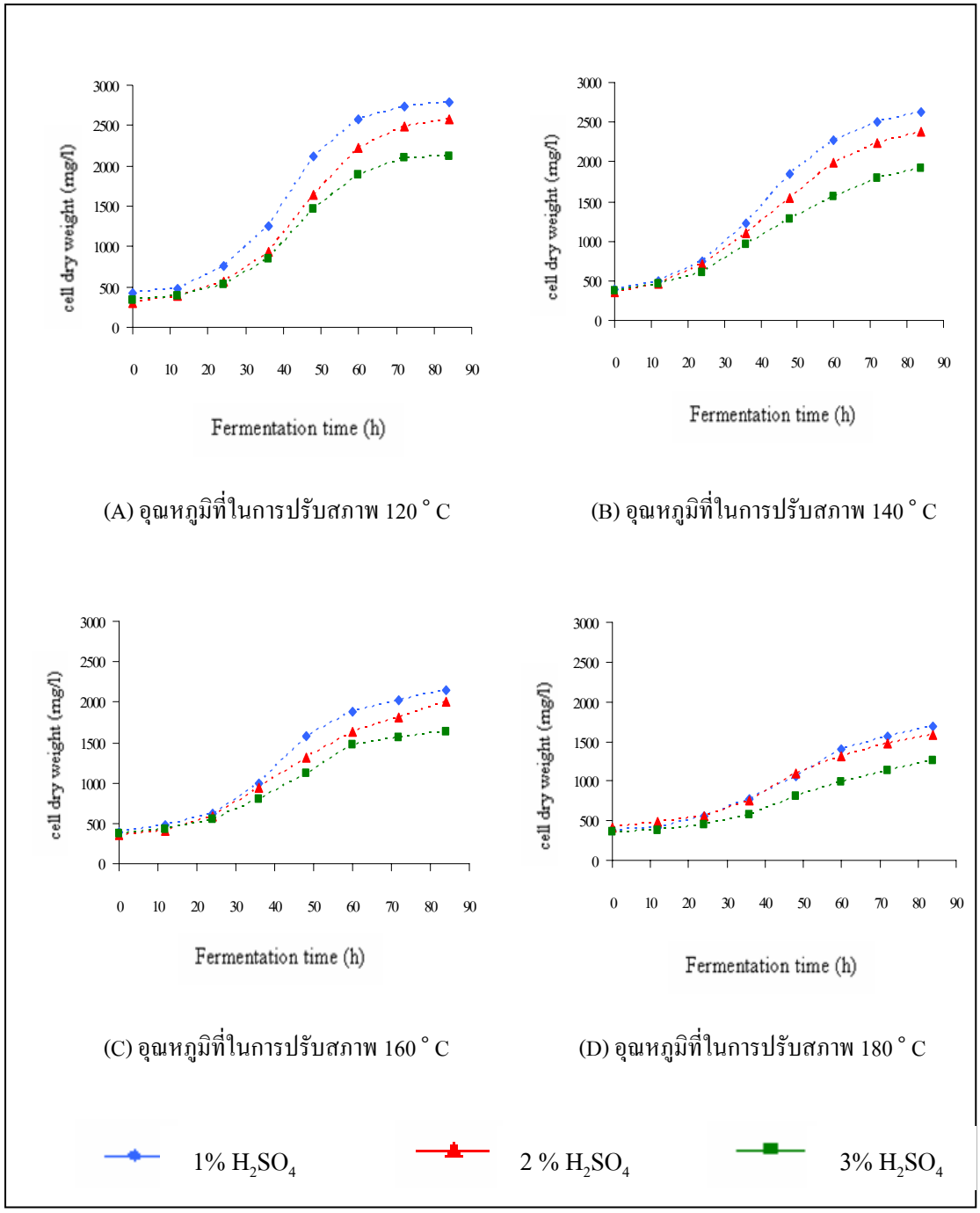
2.3.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

ในกระบวนการหมักเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR จะเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะไร้อากาศ ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบค่อยๆลดลง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 24 และ 25

จากภาพที่ 24 เมื่อทำการหมักในระยะแรกน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างช้าๆ และเมื่อเข้าสู่เข้าสู่ชั่วโมงที่ 60 จะพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน เนื่องจากเชื้อยีสต์ได้ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโต รวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆลดลงอย่างช้าๆ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาการปรับสภาพเมื่อใช้ความเข้มข้นกรดเจือจางและอุณหภูมิต่างๆพบว่า น้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเป็นอย่างมากเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 1 2 และ 3% ตามลำดับ เนื่องจากว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และยังพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงมากเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยอุณหภูมิต่ำคือ 120 140 160° C ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิสูงคือ 180 °C นั้นน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น



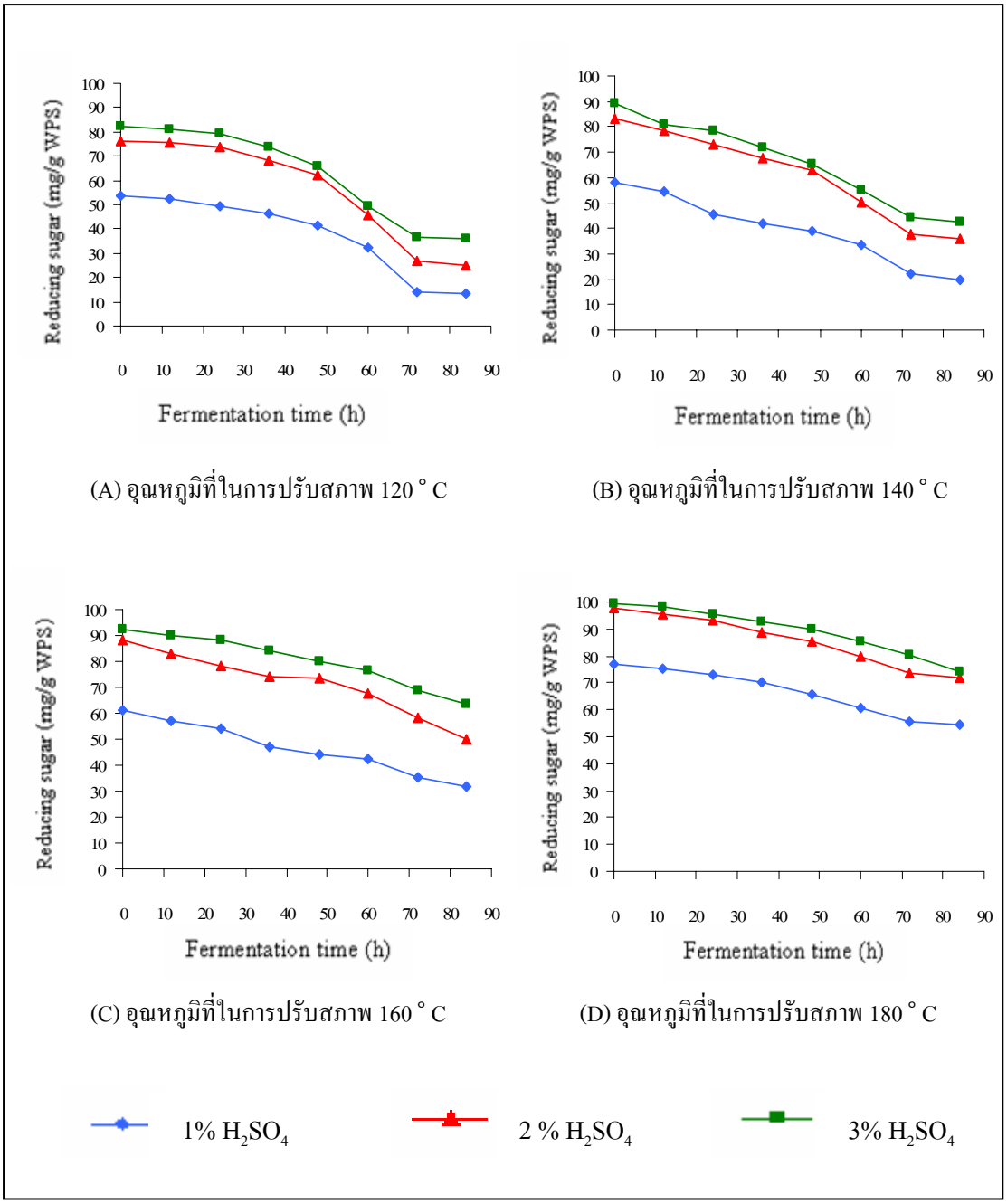
ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์ในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 ° C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยไม่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป



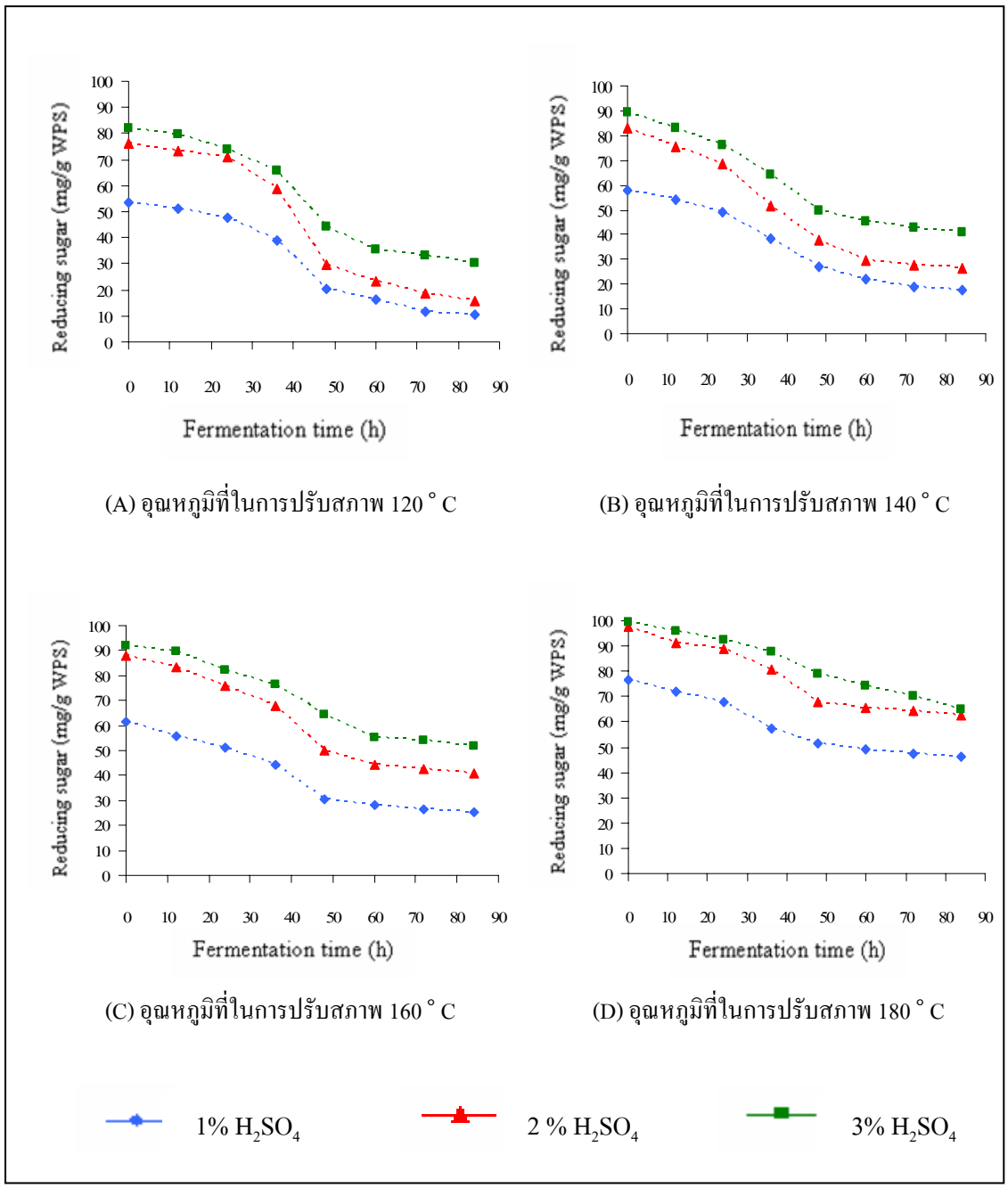
ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์ในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 ° C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป

เมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยเติมด่างลงไปพบว่าเมื่อเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นจึงทำให้เกิดการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ผลิตเป็นเอทานอลได้มากขึ้น จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงมากยิ่งขึ้น ดังภาพที่ 25 โดยในระยะแรกปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเพียงเล็กน้อย และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 40 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากเป็นช่วงที่เชื้อยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจึงมีการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้มาก ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลง ทั้งนี้เมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยเติมด่างลงไปพบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% ที่อุณหภูมิ 120 °C จะมีแนวโน้มการลดลงของปริมาณน้ำตาลในระบบสูงสุดซึ่งเนื่องมาจากเป็นสภาวะที่เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถใช้ด่างเพื่อช่วยลดความเป็นพิษในน้ำหมักได้ แต่สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิสูงๆ เช่น 180 °C ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะใช้ด่างเพื่อช่วยลดความเป็นพิษในน้ำหมักแล้วแต่ก็ไม่สามารถช่วยให้การทำงานของเชื้อยีสต์มีประสิทธิภาพมากขึ้นซึ่งเห็นได้จากการเจริญของเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และปริมาณน้ำตาลก็ลดลงไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ไม่มีการลดความเป็นพิษและมีการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่างพบว่า ในน้ำหมักที่มีการเติมด่างลงไปจะช่วยให้เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้นจึงสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ผลิตเป็นเอทานอลได้มากขึ้น ในชั่วโมงการหมักที่ 40 ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลงมากกว่าในน้ำหมักที่ไม่มีการเติมด่างลงไป



ภาพที่ 24 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยไม่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป



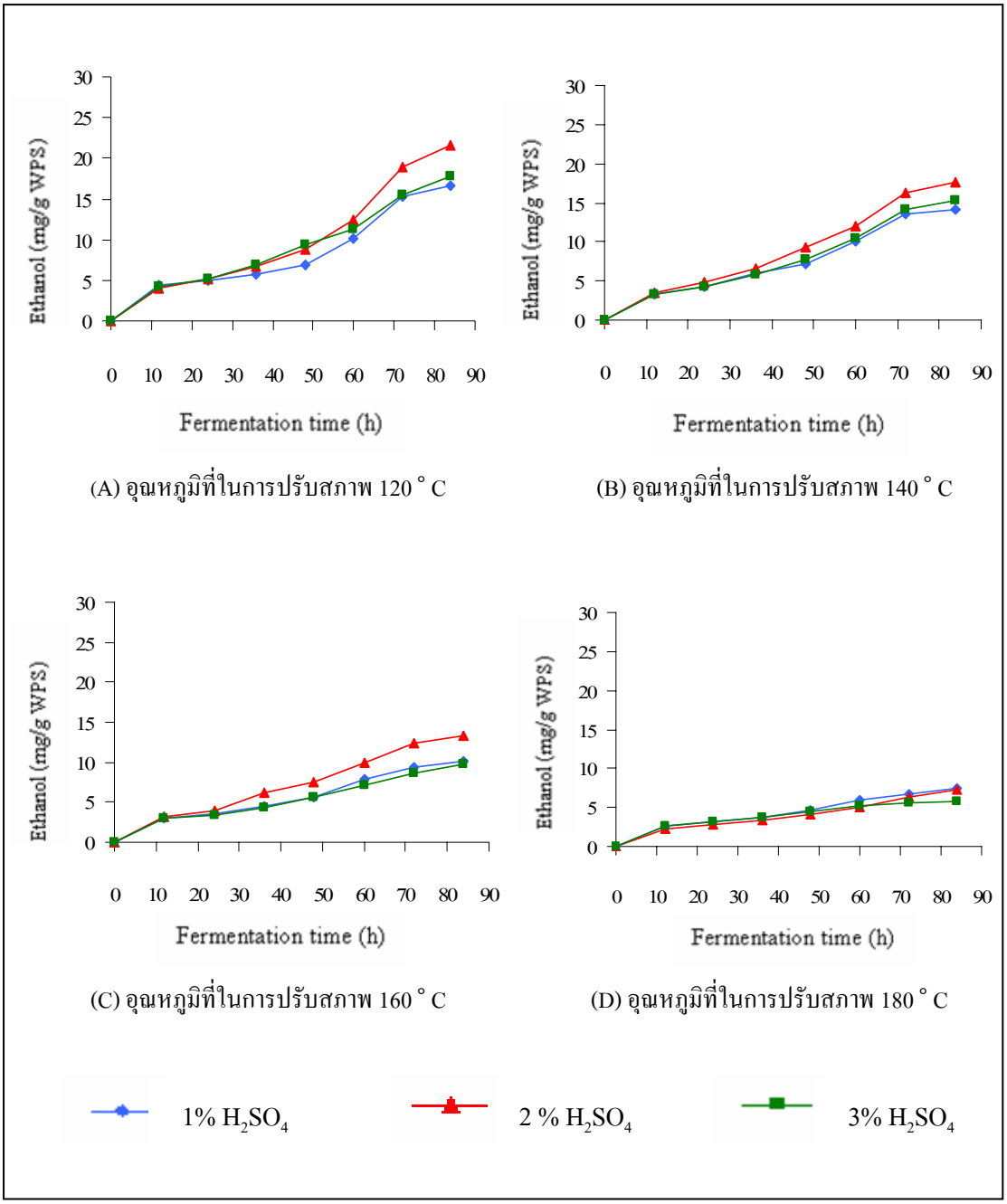
ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป

2.3.4 ปริมาณเอทานอล (ethanol)

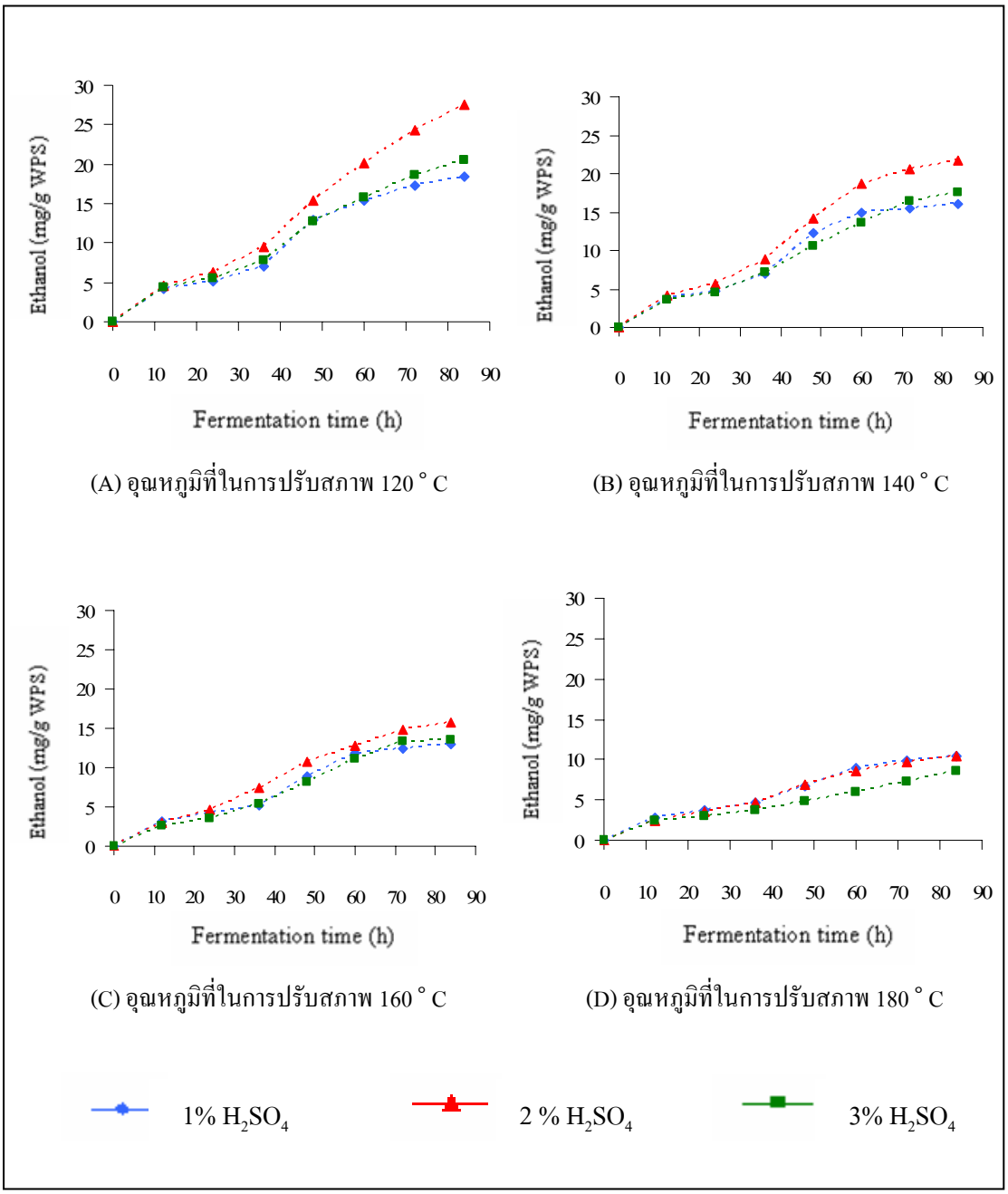
ในกระบวนการหมักเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR จะเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะไร้อากาศ ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบค่อยๆ ลดลง ในขณะเดียวกันปริมาณเอทานอลในระบบจะค่อยๆเพิ่มขึ้น ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 26 และ 27

จากภาพที่ 26 เมื่อทำการหมักในระยะแรกปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆและเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 60 จะพบว่าปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อธิบายได้เนื่องจากว่าเชื้อยีสต์ได้ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโต รวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว หลังจากชั่วโมงที่ 70 เป็นต้นไป น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งใช้เป็นอาหารเริ่มเหลือน้อยลง จึงทำให้ปริมาณเอทานอลค่อนข้างคงที่ไปด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพเมื่อใช้ความเข้มข้นกรดเจือจางและอุณหภูมิต่างๆพบว่าปริมาณเอทานอลจะเกิดขึ้นมากหากหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% เนื่องจากว่า ที่ความเข้มข้นกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% นี้สามารถช่วยย่อยสลายโครงสร้างของเซลลูโลสให้เหมาะต่อสภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีจึงทำให้เกิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้มาก ในขณะเดียวกันก็ผลิตสารซึ่งยับยั้งการทำงานของเชื้อยีสต์ต่ำดังนั้นเชื้อยีสต์จึงสามารถเจริญเติบโตได้และผลิตเอทานอลได้มาก และจากการทดลองยังพบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในการปรับสภาพสูงขึ้นคือ 140, 160 และ 180° C จะส่งผลการผลิตเอทานอลเกิดได้น้อยลงตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่สภาวะดังกล่าวเกิดสารพิษซึ่งยับยั้งการทำงานของเชื้อยีสต์ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลงเล็กน้อยและเกิดเป็นเอทานอลได้น้อยเช่นกัน



ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยไม่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป

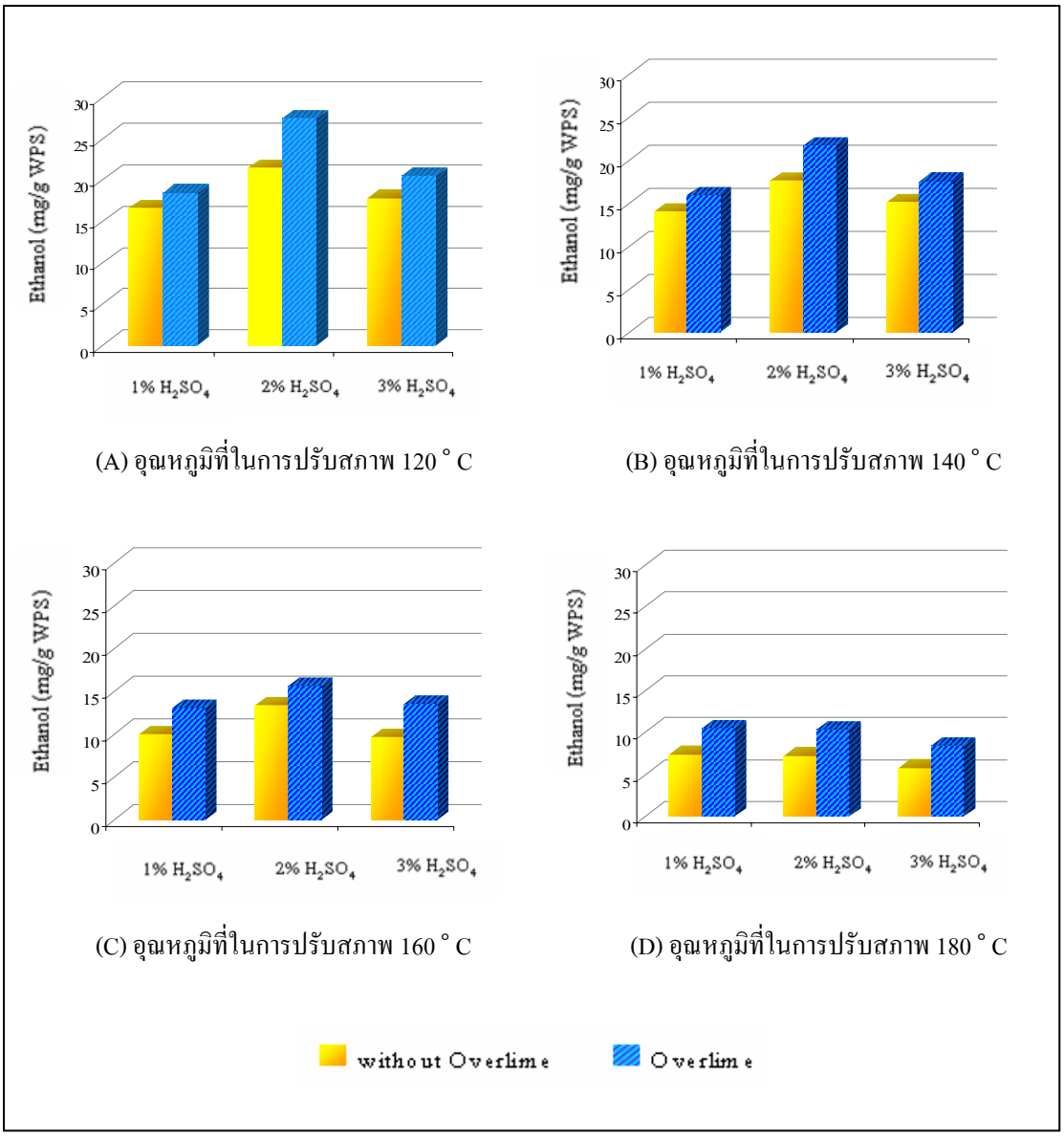


ภาพที่ 27 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป

เมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยเติมด่างลงไปพบว่าเมื่อเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นจึงทำให้เกิดการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ผลิตเป็นเอทานอลได้มากขึ้น ดังภาพที่ 27 โดยในระยะแรกปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 40 ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากเป็นช่วงที่เชื้อยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจึงมีการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้มาก

ทั้งนี้เมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยเติมด่างลงไปพบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% ที่อุณหภูมิ 120 °C จะมีแนวโน้มการลดลงของปริมาณน้ำตาลในระบบสูงสุดซึ่งเกิดเป็นปริมาณเอทานอลได้สูงสุดเช่นเดียวกันดังภาพที่ 27 เนื่องมาจากเป็นสภาวะที่เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถใช้ด่างเพื่อช่วยลดความเป็นพิษในน้ำหมักได้ แต่สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นสูงๆ เช่น กรดซัลฟูริกเจือจาง 3% ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้กลับลดน้อยลง นอกจากนี้เมื่อยังพบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิสูงในการปรับสภาพปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะลดน้อยลงตามลำดับซึ่งจากภาพที่ 28 แสดงให้เห็นว่าเมื่อปรับสภาพขั้นต้นที่อุณหภูมิ 180 °C ปริมาณเอทานอลเกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นซึ่งแสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะใช้ด่างเพื่อช่วยลดความเป็นพิษในน้ำหมักแล้วแต่ก็ไม่สามารถช่วยให้การทำงานของเชื้อยีสต์มีประสิทธิภาพมากขึ้น ไม่สามารถลดความเป็นพิษอันเนื่องมาจากสารจำพวกฟูเฟอรัล ไฮดรอกซีเมธทิลฟูเฟอรัล และกรดอะซิติกได้ ซึ่งเห็นได้จากการเจริญของเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ปริมาณน้ำตาลก็ลดลงไปเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงเกิดเป็นเอทานอลได้เพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นเมื่อทำการหมักน้ำหมักที่ไม่มีการลดความเป็นพิษและมีการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่างพบว่า ในน้ำหมักที่มีการเติมด่างลงไปจะช่วยให้เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้นจึงสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ผลิตเป็นเอทานอลได้มากขึ้น ในชั่วโมงการหมักที่ 40 ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลงมากกว่าและเกิดเป็นปริมาณเอทานอลได้มากกว่าในน้ำหมักที่ไม่มีการเติมด่างลงไป



ภาพที่ 28 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นของน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ (อุณหภูมิ 120-180 °C เป็นระยะเวลา 60 นาที) และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษโดยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์และชุดที่ไม่มีการลดความเป็นพิษ

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ได้แก่ μ $q_{s,max}$ $q_{p,max}$ P_{max} $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ และ Fermentation efficiency ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4 - 7 (ตัวอย่างการคำนวณดังภาคผนวก จ)

จากตารางที่ 4 แสดงค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 120 ° C เป็นเวลา 60 นาที เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) พบว่าเมื่อใช้กรดความเข้มข้น 1 และ 2% เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดย μ มีค่า 0.027 และ 0.037 ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดมากขึ้นเป็น 3% พบว่า μ มีค่าลดลงเป็น 0.035 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์มีความสามารถในการเจริญเติบโตลดลง แต่เมื่อมีการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปเพื่อลดความเป็นพิษพบว่าช่วยให้เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเห็นได้จาก μ มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.031 0.053 และ 0.041 เมื่อใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง 1 2 และ 3% ตามลำดับ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าที่สภาวะการปรับสภาพขั้นต้นที่อุณหภูมิ 120 ° C เป็นเวลา 60 นาที การใช้ด่างสามารถช่วยลดความเป็นพิษในน้ำหมักได้ แต่เมื่อมีการปรับสภาพด้วยอุณหภูมิสูงจะพบว่า μ มีค่า ลดลงถึงแม้จะมีการลดความเป็นพิษด้วยด่างแล้วก็ตามโดยเห็นได้จากเมื่อปรับสภาพด้วยกรด 2% และมีการเติมด่างลงไปที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 120 140 160 และ180 °C มีค่า μ เป็น 0.053 0.043 0.037 และ0.03 ตามลำดับ ซึ่งอธิบายได้ว่าในการปรับสภาพด้วยความเข้มข้นกรดและอุณหภูมิสูงๆนั้นก่อให้เกิดสารพิษจำพวกฟูเฟอรัล ไฮดรอกซีเมธทิลฟูเฟอรัล สารประกอบฟีนอลิกและกรดอะซิติก ซึ่งยับยั้งการทำงานของเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมัก

ดังนั้นเมื่อพบว่าในการปรับสภาพที่ความเข้มข้นกรดและอุณหภูมิสูงมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการทำงานของเชื้อยีสต์ลดลงจึงเป็นผลให้อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด ($q_{s,max}$) มีค่าลดลงไปด้วย เนื่องจากเชื้อยีสต์มีปริมาณน้อยจึงทำให้ อัตราการใช้สารอาหาร (น้ำตาลรีดิวซ์)เพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลลดน้อยลงไปด้วย เมื่อพิจารณาค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{p/s}$) พบว่าในการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 120 ° C เป็นเวลา 60 นาที เมื่อใช้กรดความเข้มข้น 1และ 2% จะให้ค่า $Y_{p/s}$ ใกล้เคียงกันคือ 0.30 และ 0.36 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดและอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพจะทำให้ค่า $Y_{p/s}$ มีค่าลดลงซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้น้อยลงเพราะเกิดสารพิษซึ่งยับยั้งการทำงานของเชื้อยีสต์นั่นเอง การใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษนั้นช่วยให้ค่า $Y_{p/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.40 และ 0.45 ตามลำดับ

สำหรับ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max}) และประสิทธิภาพในการหมัก (Fermentation efficiency) จากการทดลองพบว่า ในการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 120 ° C เป็นเวลา 60 นาที เมื่อใช้กรดความเข้มข้น 2% และมีการเติมด่างลงไปเพื่อลดความเป็นพิษจะมีค่า P_{max} และ Fermentation efficiency สูงสุดในการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่สภาวะต่างๆ คือ มีอัตราการผลิตเอทานอล 6.44 มิลลิกรัม/ลิตร.ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 88.24% ของงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎี เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดและอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพพบว่าค่า P_{max} และ Fermentation efficiency จะมีค่าลดลงถึงแม้ว่าจะมีการเติมด่างเพื่อลดความเป็นพิษในน้ำหมักแล้วก็ตาม

เมื่อพิจารณาความเหมาะสมในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง 2% อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพคือ 120 ° C เป็นเวลา 60 นาที และมีการเติมด่างแคลดซียมไฮดรอกไซด์ลงไปเพื่อลดความเป็นพิษ เนื่องจากที่สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักที่ทำให้เกิดอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดและประสิทธิภาพในการหมักสูงกว่าที่สภาวะอื่นๆ

ตารางที่ 4 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 120 °C เป็นเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษ ด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และชุดที่ไม่มีการเติมด่างลงไป

การคำนวณค่าพารามิเตอร์		การปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางและการลดความเป็นพิษ					
		1% H_2SO_4	1% H_2SO_4 Overlime	2% H_2SO_4	2% H_2SO_4 Overlime	3% H_2SO_4	3% H_2SO_4 Overlime
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	μ (h^{-1})	0.027	0.031	0.037	0.053	0.035	0.041
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด	$q_{s,max}$ (mg/mg.h)	2.020	2.14	2.34	4.26	2.81	3.56
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด	$q_{p,max}$ (mg/mg.h)	0.560	0.67	0.75	0.88	0.62	0.80
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด	P_{max} (mg/l.h)	4.250	5.33	5.26	6.44	4.31	5.27
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	$Y_{p/s}$ (mg ethanol/mg sugar)	0.304	0.40	0.36	0.45	0.34	0.41
ประสิทธิภาพการหมัก	Fermentation efficiency	60	78.43	70.59	88.24	66.67	80.39

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 140 ° C เป็นเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และชุดที่ไม่มีการเติมด่างลงไป

การคำนวณค่าพารามิเตอร์		การปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางและการลดความเป็นพิษ					
		1% H_2SO_4	1% H_2SO_4 Overlime	2% H_2SO_4	2% H_2SO_4 Overlime	3% H_2SO_4	3% H_2SO_4 Overlime
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	μ (h^{-1})	0.026	0.032	0.034	0.043	0.034	0.039
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด	$q_{s,max}$ (mg/mg.h)	1.21	2.03	2.18	3.60	2.60	3.02
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด	$q_{p,max}$ (mg/mg.h)	0.50	0.69	0.67	0.82	0.51	0.66
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด	P_{max} (mg/l.h)	3.76	4.08	4.51	5.90	3.90	4.38
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	$Y_{p/s}$ (mg ethanol/mg sugar)	0.32	0.39	0.37	0.41	0.33	0.36
ประสิทธิภาพการหมัก	Fermentation efficiency	62.75	76.47	72.55	80.39	64.71	70.59

ตารางที่ 6 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 160 ° C เป็นเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และชุดที่ไม่มีการเติมด่างลงไป

การคำนวณค่าพารามิเตอร์		การปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางและการลดความเป็นพิษ					
		1% H_2SO_4	1% H_2SO_4 Overlime	2% H_2SO_4	2% H_2SO_4 Overlime	3% H_2SO_4	3% H_2SO_4 Overlime
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	μ (h^{-1})	0.024	0.030	0.031	0.037	0.028	0.033
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด	$q_{s,max}$ (mg/mg.h)	1.14	2.10	1.70	3.10	1.56	2.59
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด	$q_{p,max}$ (mg/mg.h)	0.39	0.55	0.53	0.73	0.41	0.59
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด	P_{max} (mg/l.h)	2.63	2.93	3.43	3.55	2.38	2.70
ค่าผลได้ของเซลล์ต่อสารอาหาร	$Y_{x/s}$ (mg cell/mg sugar)	2.36	2.44	1.70	1.76	1.55	1.56
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	$Y_{p/s}$ (mg ethanol/mg sugar)	0.30	0.36	0.34	0.37	0.31	0.34
ประสิทธิภาพการหมัก	Fermentation efficiency	58.82	70.59	66.67	72.55	60.78	66.67

ตารางที่ 7 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง 1-3% ที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 180 ° C เป็นเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่มีการลดความเป็นพิษด้วยการเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และชุดที่ไม่มีการเติมด่างลงไป

การคำนวณค่าพารามิเตอร์		การปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางและการลดความเป็นพิษ					
		1% H_2SO_4	1% H_2SO_4 Overlime	2% H_2SO_4	2% H_2SO_4 Overlime	3% H_2SO_4	3% H_2SO_4 Overlime
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	μ (h^{-1})	0.022	0.027	0.026	0.030	0.023	0.026
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด	$q_{s,max}$ (mg/mg.h)	1.08	1.28	1.30	2.84	1.41	2.55
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด	$q_{p,max}$ (mg/mg.h)	0.34	0.46	0.30	0.48	0.29	0.35
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด	P_{max} (mg/l.h)	1.88	2.25	1.76	2.88	1.77	2.04
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	$Y_{p/s}$ (mg ethanol/mg sugar)	0.29	0.31	0.28	0.30	0.23	0.25
ประสิทธิภาพการหมัก	Fermentation efficiency	56.86	60.78	54.90	58.82	45.10	49.02

3. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยทำการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน

3.1 ผลการศึกษาการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษด้วยโอโซนและกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์

3.1.1 ผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการใช้โอโซนเพื่อปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้น

ในการทดลองนี้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างในการใช้โอโซนเพื่อปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้นแล้วจึงนำมาย่อยเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ โดยทดลองใช้ pH 5.0 7.0 และ 10.0 ใช้อัตราการไหลอากาศ 2 4 6 และ8 ลิตรต่อนาที มีระยะเวลาในการป้อนโอโซนเท่ากับ 15 30 45 และ 60 นาที จากการทดลองพบว่า pH เป็นปัจจัยที่มีผลในการใช้โอโซนเพื่อปรับสภาพขั้นต้น ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 29

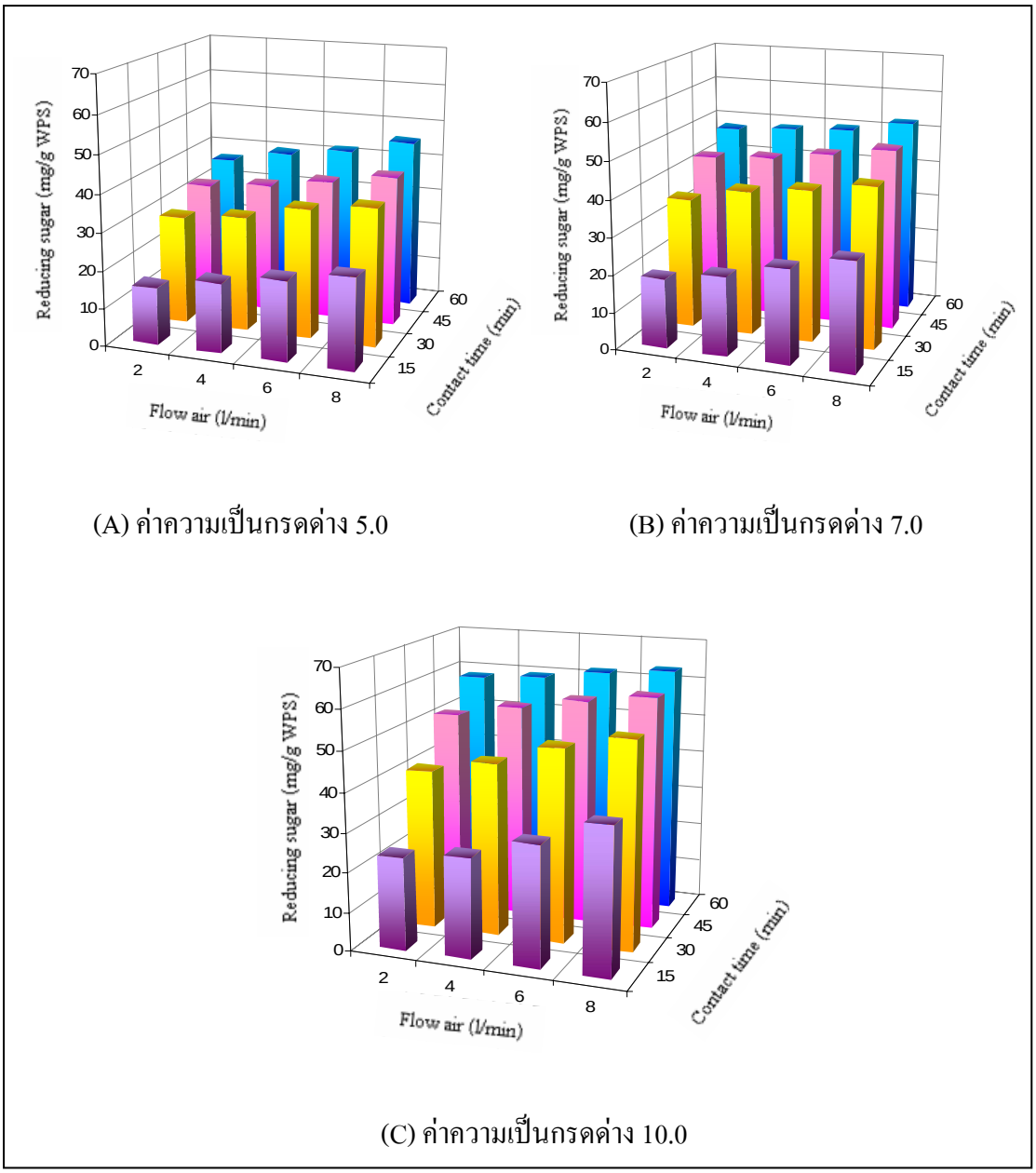
จากภาพที่ 29 พบว่าในการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่ค่าความเป็นกรดด่าง 10.0 แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงกว่าการปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 และ 5.0 ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเมื่อปรับให้น้ำตัวอย่างมีค่าความเป็นกรดด่าง 10.0 นั้นส่งผลให้ในระบบมีปริมาณของ Hydroxide ion (OH^-) ในปริมาณมาก เมื่อ OH^- สัมผัสกับโอโซนที่เติมลงไปทำให้เกิด Hydroxyl radicle ($^{\circ}OH$) ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรงและว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารต่างๆรวมถึงเซลลูโลสซึ่งเป็นสารอินทรีย์ทำให้ระบบมีความสามารถในการออกซิไดซ์และทำลายโครงสร้างของเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าสูงขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรดด่าง 10.0 ในขั้นของการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน แล้วจึงนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (pH 5.5) ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อนำไปหมักเป็นเอทานอลในขั้นตอนต่อไป

3.1.2. ผลของปริมาณโอโซนและระยะเวลาในการป้อนโอโซน

จากการทดลองซึ่งแสดงดังภาพที่ 29 พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนนานขึ้นเป็น 15 30 45 และ 60 นาที และเพิ่มอัตราการไหลของอากาศเข้าสู่เครื่องผลิตโอโซนมากขึ้นเป็น 2 4 6 และ8 ลิตรต่อนาที จะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าสูงขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากว่าเป็นการเพิ่มปริมาณโอโซนเข้าสู่ระบบมากขึ้นทำให้โอโซนสามารถเข้าไปทำลายพันธะและโครงสร้างของเซลลูโลสได้มากขึ้น จึงทำให้เอนไซม์เซลลูเลส สามารถย่อยเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนเป็น 45 และ 60 นาที ถึงแม้จะใช้อัตราการไหลของอากาศเข้าสู่เครื่องผลิตโอโซนเป็น 2 4 6 และ 8 ลิตรต่อนาที ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าที่สภาวะดังกล่าวในระบบมีปริมาณโอโซนมากเพียงพอที่จะออกซิไดซ์และทำลายโครงสร้างของเซลลูโลสซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในระบบ จึงทำให้เกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงหลังจากการเพิ่มปริมาณโอโซนเข้าไปในระบบ



(A) ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

(B) ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0

(C) ค่าความเป็นกรดด่าง 10.0

ภาพที่ 29 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อปรับสภาพด้วยโอโซนที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ เมื่อใช้อัตราการไหลอากาศตั้งแต่ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15-60 นาที แล้วผ่านการย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส

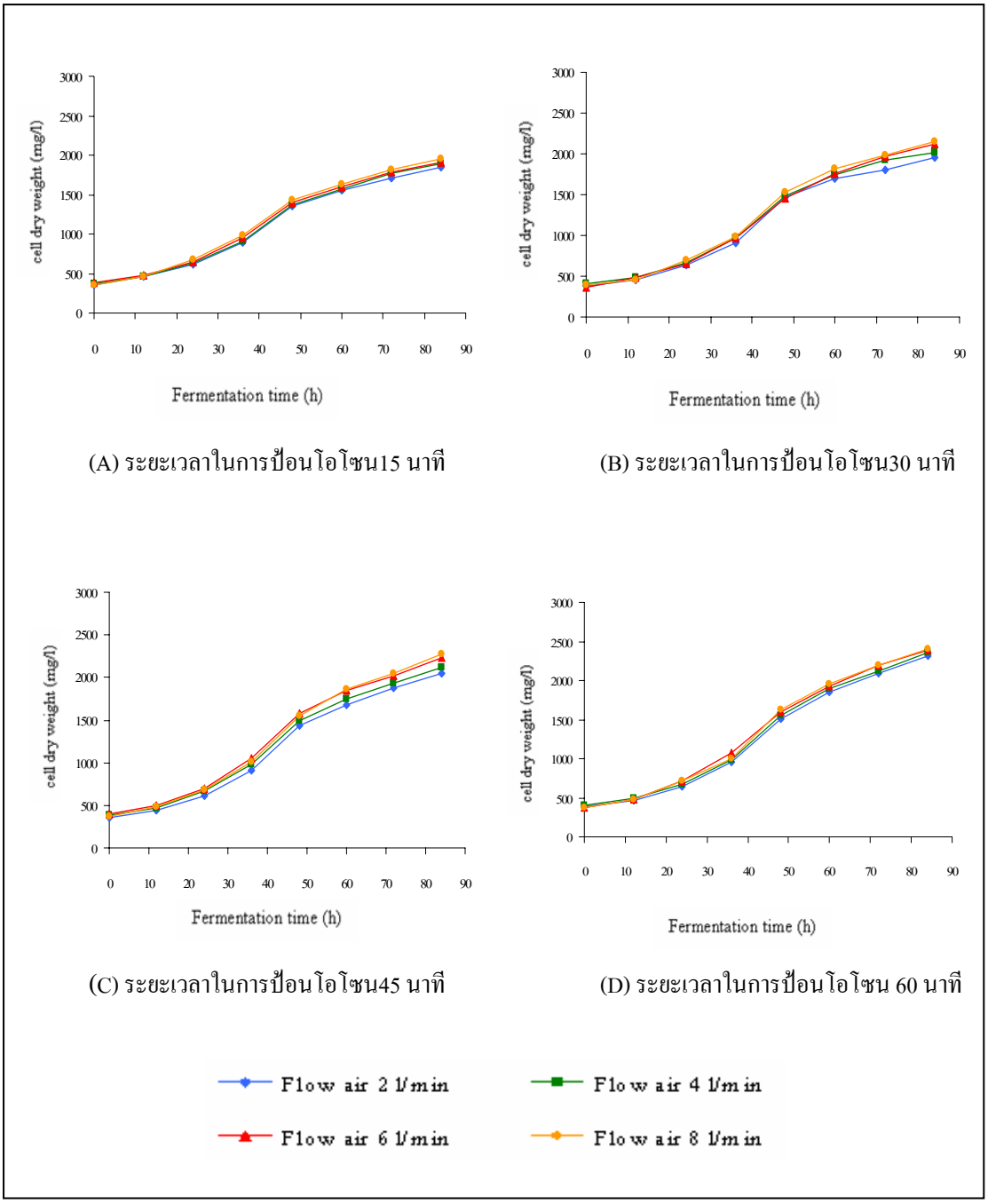
3.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

ในการศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน (pH 10.0) ใช้อัตราการไหลอากาศ 2 4 6 และ8 ลิตรต่อนาที ที่ระยะเวลาในการป้อนโอโซนเท่ากับ 15 30 45 และ 60 นาที แล้วนำมาย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์หลังจากนั้นเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35°C เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ได้ผลการทดลองดังนี้

3.2.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

เมื่อทำการหมักในระยะแรกน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์จะค่อยๆเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆเนื่องจากเชื้อยีสต์อยู่ในขั้นของการปรับตัวและปรับสภาพเพื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่มีในระบบในการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอล เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 40 จะพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากเชื้อยีสต์ได้ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอล หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 60 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งใช้เป็นอาหารเริ่มเหลือน้อยลง แสดงดังภาพที่ 30

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์ในการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพเมื่อใช้โอโซนที่ระยะเวลาสัมผัสต่างๆพบว่า เมื่อระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15 นาที ที่อัตราการไหลอากาศ 2 4 6 และ8 ลิตรต่อนาที น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์มีค่าต่ำกว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนนานขึ้นเป็น 30 45 และ 60 นาทีตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนนานขึ้นเป็นการเพิ่มปริมาณโอโซนที่เข้าไปทำลายโครงสร้างเซลลูโลสทำให้เกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากขึ้น ดังนั้นเมื่อมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากจึงทำให้เชื้อยีสต์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้มากขึ้น นอกจากนี้เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนเป็น 45 และ 60 นาที แม้จะมีการปรับอัตราการไหลที่ค่าต่างๆ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าใกล้เคียงกันเนื่องจากที่สภาวะดังกล่าวมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 30 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์ในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15-60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล

3.2.2 น้ำตาลรีดิวซ์

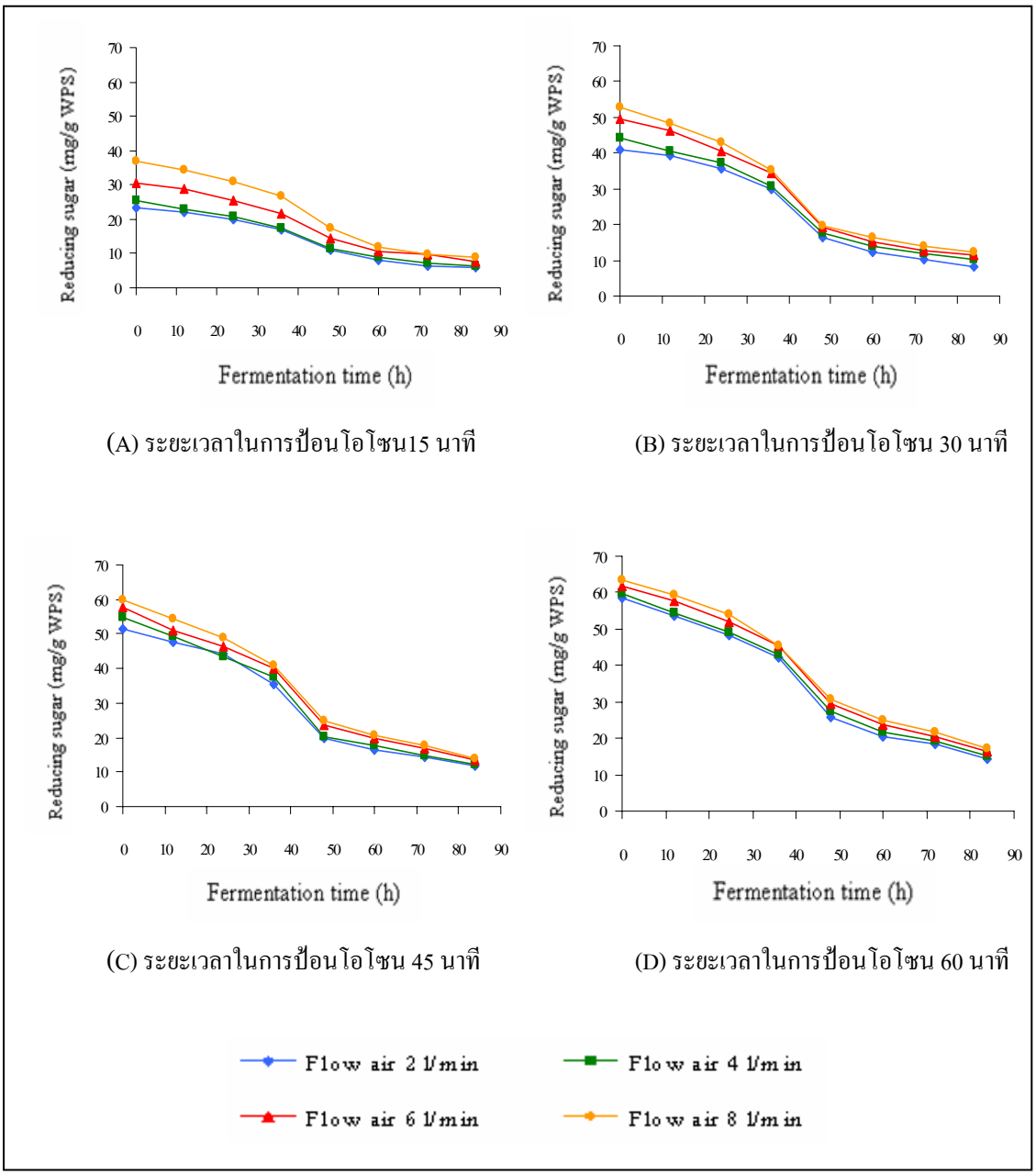
ในกระบวนการหมักเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* จะเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะไร้อากาศ ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบค่อยๆลดลง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 31

จากภาพที่ 31 เมื่อทำการหมักในระยะแรกน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างช้าๆและเมื่อเข้าสู่เข้าสู่ชั่วโมงที่ 40 พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน เนื่องจากเชื้อยีสต์ได้ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโตรวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆลดลงอย่างช้าๆ

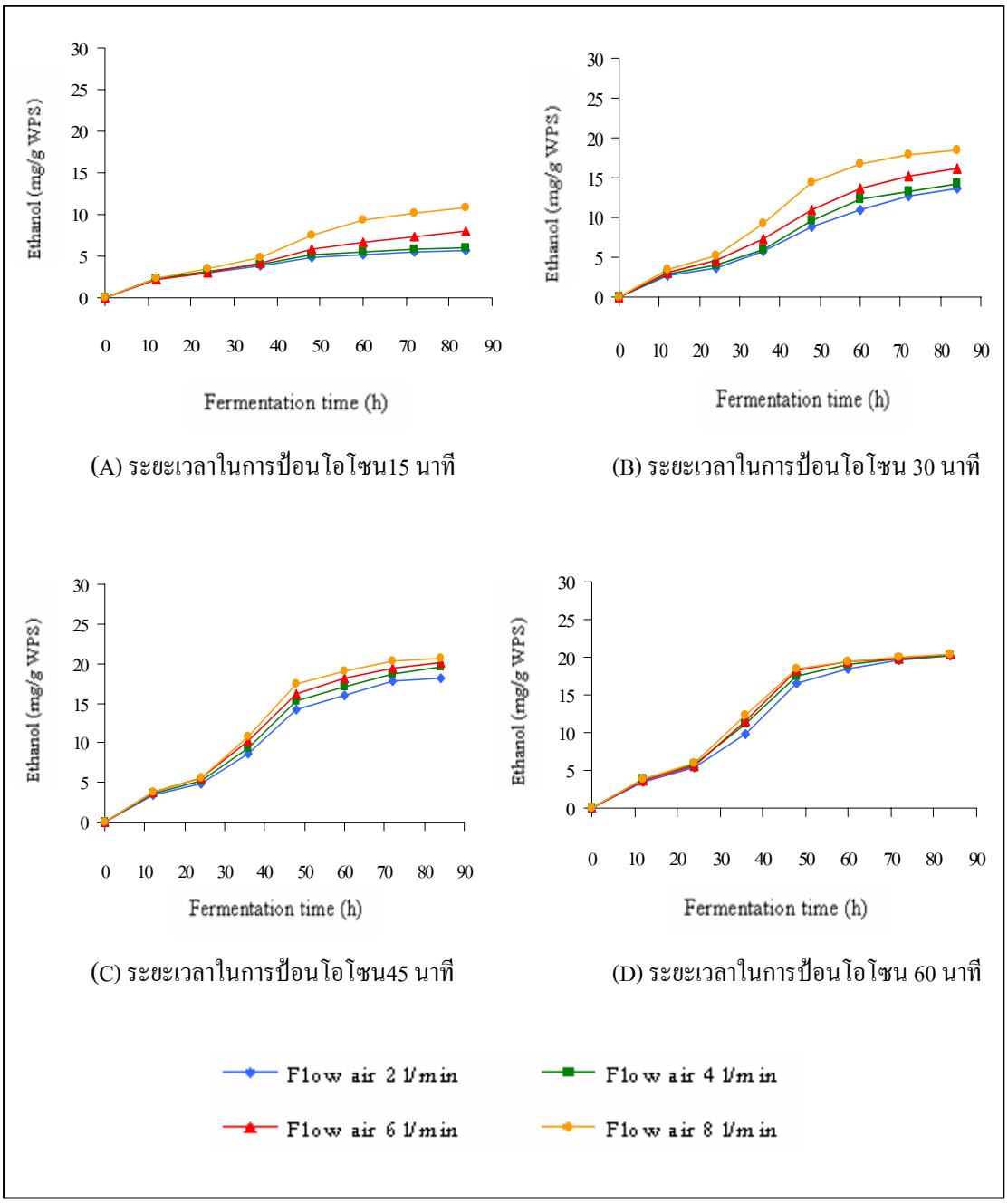
เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพเมื่อใช้โอโซนที่ระยะเวลาสัมผัสต่างๆพบว่า เมื่อระยะเวลาในการป้อนโอโซน15 นาที ที่อัตราการไหลอากาศ 2 4 6 และ8 ลิตรต่อนาที พบว่าเนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นมีน้อยดังนั้นการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นเอทานอลโดยเชื้อยีสต์จึงเกิดขึ้นได้น้อย เป็นผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงไม่มากนัก แต่เมื่อระยะเวลาในการป้อนโอโซนนานขึ้นเป็น 30 45 และ 60 นาที เนื่องจากว่าในระบบมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นอยู่มากจึงทำให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตได้ดีจึงเกิดเป็นเอทานอลได้มาก ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลงไปมาก

3.2.2 ปริมาณเอทานอล

ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพที่ 32 เมื่อทำการหมักในระยะแรกปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆและเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 40 จะพบว่าปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อธิบายได้เนื่องจากว่าเชื้อยีสต์ได้ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโตรวมทั้งยังสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว หลังจากชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไป น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งใช้เป็นอาหารเริ่มเหลือน้อยลง จึงทำให้ปริมาณเอทานอลค่อนข้างคงที่ไปด้วย



ภาพที่ 31 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15-60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล

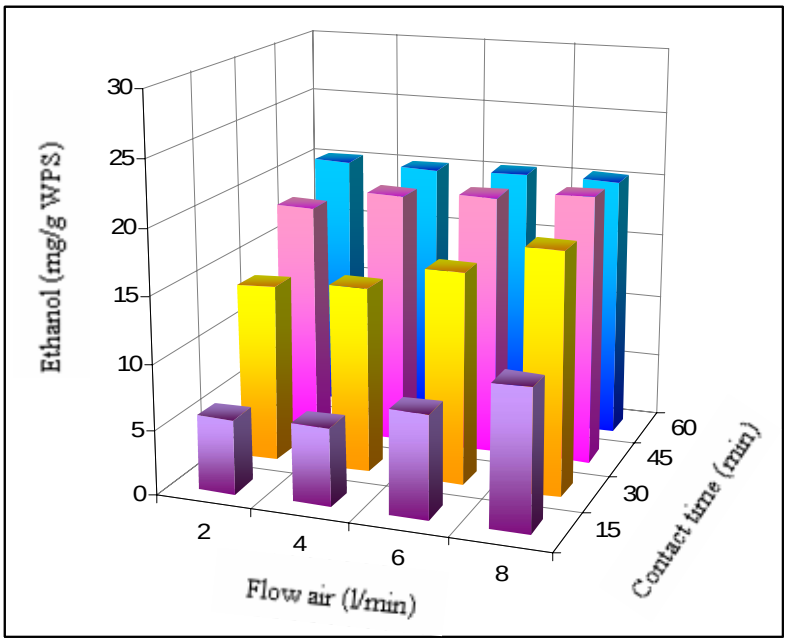


(A) ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15 นาที (B) ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 30 นาที

(C) ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45 นาที (D) ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 60 นาที

ภาพที่ 32 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15-60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการปรับสภาพเมื่อใช้โอโซนที่ระยะเวลาสัมผัสต่างๆดังภาพที่ 33 พบว่า เมื่อระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15 และ 30 นาที ปริมาณเอทานอลจะมากขึ้น หากในการปรับสภาพใช้อัตราการไหลอากาศเพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณโอโซนในระบบ แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนนานขึ้นเป็น 45 และ60 นาทีปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจะมีค่าใกล้เคียงกันถึงแม้จะเพิ่มอัตราการไหลของอากาศ ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าที่สภาวะดังกล่าวในระบบมีปริมาณโอโซนมากเพียงพอที่จะออกซิไดซ์และทำลายโครงสร้างของเซลลูโลสซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในระบบ ดังนั้นจึงทำให้เกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน เมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักจึงเกิดเป็นเอทานอลได้ใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 33 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15-60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ได้แก่ μ $q_{s,max}$ $q_{p,max}$ P_{max} $Y_{p/s}$ และ Fermentation efficiency ได้ผลแสดงดังตารางที่ 8 - 11

จากตารางที่ 6-9 เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) พบว่าค่า μ มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการป้อนโอโซนนานขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากในระบบมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่มากจึงทำให้เชื้อยีสต์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้มาก

เมื่อพิจารณาอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด ($q_{s,max}$) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด ($q_{p,max}$) ที่อัตราการไหลอากาศ 2 4 6 และ8 ลิตรต่อนาที พบว่ามีค่ามากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนนานขึ้น เนื่องจากในระบบมีน้ำตาลรีดิวซ์และเชื้อยีสต์อยู่มากจึงทำให้อัตราการใช้สารอาหาร (น้ำตาลรีดิวซ์)เพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลเพิ่มขึ้นไปด้วย แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนเป็น 45 และ 60 นาทีจะพบว่าค่า $q_{s,max}$ และ $q_{p,max}$ มีค่าใกล้เคียงกันเนื่องจากว่าที่สภาวะดังกล่าวมีปริมาณโอโซนมากเกินพอที่จะทำลายโครงสร้างของเซลลูโลสจึงผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เริ่มต้นในการหมักในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

สำหรับอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max}) และประสิทธิภาพในการหมัก จากการทดลองพบว่าการใช้โอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2 4 6 และ8 ลิตรต่อนาที มีระยะเวลาในการป้อนโอโซน45และ 60 นาทีจะมีค่า P_{max} และ Fermentation efficiency สูงใกล้เคียงกัน คือมีอัตราการผลิตเอทานอลในช่วง 5.92-7.75 มิลลิกรัม/ลิตร.ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมักของงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎี อยู่ในช่วง 86.27- 90.20%

เมื่อพิจารณาความเหมาะสมในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นด้วยโอโซนพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้โอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45 นาที เนื่องจากที่สภาวะดังกล่าวมีปริมาณโอโซนที่มากเพียงพอในการทำลายโครงสร้างของเซลลูโลสและสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักที่ทำให้เกิดอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max}) และประสิทธิภาพในการหมักสูง หากเพิ่มอัตราการไหลอากาศหรือเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนก็จะเป็นการสิ้นเปลืองเพราะไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของการหมัก

ตารางที่ 8 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 15 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล

การคำนวณค่าพารามิเตอร์		การปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน เมื่อใช้อัตราการไหลอากาศค่าต่างๆ (ลิตรต่อนาที)			
		2	4	6	8
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	μ (h^{-1})	0.025	0.028	0.030	0.031
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด	$q_{s,max}$ (mg/mg.h)	1.02	1.03	1.23	1.57
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด	$q_{p,max}$ (mg/mg.h)	0.29	0.20	0.29	0.42
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด	P_{max} (mg/l.h)	2.02	2.15	2.44	3.10
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	$Y_{p/s}$ (mg ethanol/mg sugar)	0.30	0.31	0.34	0.38
ประสิทธิภาพการหมัก	Fermentation efficiency	58.82	60.78	66.67	74.51

ตารางที่ 9 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 30 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล

การคำนวณค่าพารามิเตอร์		การปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน เมื่อใช้อัตราการไหลอากาศค่าต่างๆ (ลิตรต่อนาที)			
		2	4	6	8
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	μ (h^{-1})	0.032	0.035	0.038	0.040
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด	$q_{s,max}$ (mg/mg.h)	2.20	2.17	2.44	2.42
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด	$q_{p,max}$ (mg/mg.h)	0.52	0.57	0.60	0.79
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด	P_{max} (mg/l.h)	3.71	3.98	4.58	5.98
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	$Y_{p/s}$ (mg ethanol/mg sugar)	0.42	0.42	0.43	0.45
ประสิทธิภาพการหมัก	Fermentation efficiency	82.35	82.35	84.31	88.24

ตารางที่ 10 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 45 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล

การคำนวณค่าพารามิเตอร์		การปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน เมื่อใช้อัตราการไหลอากาศค่าต่างๆ (ลิตรต่อนาที)			
		2	4	6	8
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	μ (h^{-1})	0.043	0.046	0.048	0.050
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด	$q_{s,max}$ (mg/mg.h)	2.66	2.83	2.50	2.46
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด	$q_{p,max}$ (mg/mg.h)	0.94	0.95	0.89	1.05
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด	P_{max} (mg/l.h)	5.92	6.38	6.73	7.29
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	$Y_{p/s}$ (mg ethanol/mg sugar)	0.45	0.46	0.46	0.45
ประสิทธิภาพการหมัก	Fermentation efficiency	88.24	90.59	89.41	88.24

ตารางที่ 11 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* Bio-Ferm XR เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากการย่อยเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 2-8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วมาหมักเพื่อผลิตเอทานอล

การคำนวณค่าพารามิเตอร์		การปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน เมื่อใช้อัตราการไหลอากาศค่าต่างๆ (ลิตรต่อนาที)			
		2	4	6	8
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	μ (h^{-1})	0.048	0.050	0.052	0.051
อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะสูงสุด	$q_{s,max}$ (mg/mg.h)	2.67	2.44	2.42	2.22
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด	$q_{p,max}$ (mg/mg.h)	1.07	0.97	1.02	0.93
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด	P_{max} (mg/l.h)	6.92	7.31	7.65	7.75
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร	$Y_{p/s}$ (mg ethanol/mg sugar)	0.46	0.45	0.44	0.44
ประสิทธิภาพการหมัก	Fermentation efficiency	89.80	89.02	86.27	86.31

การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นที่เหมาะสมเพื่อผลิตเอทานอลนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณผลผลิตที่ได้ ค่าใช้จ่ายที่เกิดจากการผลิต เทคโนโลยีในการผลิต การจัดการกับของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นโดยการใช้กรดเจือจางและการใช้โอโซนก่อนที่จะผ่านกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมักเพื่อผลิตเอทานอล เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความเป็นไปได้และความเหมาะสมของแต่ละวิธีการ ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบความเหมาะสมของวิธีการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นโดยการใช้กรดเจือจางและการใช้โอโซน

ปัจจัยต่างๆ	**Dilute acid pretreatment** (2% H_2SO_4 , Overlime 120°C, 60 min)	**Ozone pretreatment** (Flow air 4 l/min, contact time 45 min)
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ (mg/g WPS)	76.05	54.70
ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (mg/g WPS)	27.55	19.60
ค่า $Y_{p/s}$ (g ethanol/g sugar)	0.457	0.462
ประสิทธิภาพในการหมัก (%)	89.61	90.59
ระยะเวลาในการหมัก (h)	40	40
การเกิดสารพิษ	เกิดพวกฟูเฟอรัล ไฮดรอกซีเมธทิลฟูเฟอรัล และกรดอะซิติก ในกรณีใช้ความเข้มข้นกรดหรือใช้อุณหภูมิสูง	ไม่เกิดสารพิษ แต่โอโซนอาจมีผลในการทำลายเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมัก

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ปัจจัยต่างๆ	**Dilute acid pretreatment** (2% H_2SO_4 , Overlime 120°C, 60 min)	**Ozone pretreatment** (Flow air 4 l/min, contact time 45 min)
การลดความเป็นพิษ	ใช้ด่างเพื่อช่วยลดความเป็นพิษที่เกิดขึ้น แต่การใช้ความเข้มข้นกรดและอุณหภูมิสูง การใช้ด่างไม่สามารถช่วยลดความเป็นพิษได้	ไม่ต้องใช้ แต่สามารถตั้งทิ้งไว้เพื่อให้โอโซนในน้ำสลายตัวไป โดยโอโซนมีครึ่งชีวิตในน้ำประมาณ 30 นาที
ถังหมัก	ถังหมักต้องเป็นวัสดุที่ทนกรดได้ดี เมื่อใช้ไปนานๆจะเกิดการสึกกร่อน สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซม	ถังหมักควรทำจากวัสดุประเภทแก้ว หรือวัสดุที่ทนต่อปฏิกิริยาของโอโซน
การใช้สารเคมี	จำเป็นต้องใช้สารเคมีในปริมาณมาก โดยใช้กรดในการปรับสภาพขั้นต้น และใช้ด่างในการลดความเป็นพิษ	ใช้ปริมาณสารเคมีน้อยกว่า โดยจะใช้กรด-ด่างเพียงเล็กน้อยในการปรับค่า pH
ค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอล	ค่าสารเคมี ค่าไฟฟ้า	เครื่องผลิตโอโซนมีราคาแพง ค่าไฟฟ้า
ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม	ของเสียที่เกิดขึ้นมีกรดปนอยู่ด้วยจึงทำให้เกิดปัญหาในการบำบัดและเป็นพิษต่อสภาพแวดล้อม	โอโซนที่เจือปนในน้ำและในอากาศไม่เสถียร จึงสามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

แหล่งคาร์บอน	จุลินทรีย์	Fermentation efficiency	ค่า $Y_{p/s}$ (g ethanol/g sugar)	Ethanol (g/l)	Ethanol (g/g)	เอกสารอ้างอิง
กากน้ำตาล	*S. cerevisiae* SKP1	95.4	0.48	50	-	Roukas, 1996
เหง้ามันสำปะหลัง	*Z. mobillis* TISTR 405	69.84	0.68	10.60	-	พรรณวิไล, 2545
กากมันสำปะหลัง	*S. cerevisiae* TISTR 5596	91	-	3.62	-	ชลดา, 2546
มันเส้น	*S. cerevisiae*	84	-	-	0.521	ธันยาภรณ์, 2548
น้ำตาลกลูโคส	*S. cerevisiae*	91	0.31	53	-	Najafpour, 2004
น้ำตาลซูโครส	*S. cerevisiae*	88	0.46	45	-	Pramanik, 2004

ตารางที่ 13 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	จุลินทรีย์	Fermentation efficiency	ค่า $Y_{p/s}$ (g ethanol/g sugar)	Ethanol (g/l)	Ethanol (g/g)	เอกสารอ้างอิง
ฟางข้าว	*S. cerevisiae* TISTR 5013	88.64	-	-	0.11	วรณี, 2546
ฟางข้าว	*E. coli* FBR5	92.11	0.48	-	0.14	Badal, 2005
ของเสียจากโรงงานกระดาษ	*K. marxianus* และ *S. cerevisiae*	87.49	-	-	0.17	Kadal, 2004
กากตะกอนเยื่อกระดาษ	*S. cerevisiae*	89.61	0.46	0.55	0.03	งานวิจัยนี้

เมื่อนำผลผลิตเอทานอลที่ได้จากงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 13 พบว่าค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{p/s}$) และประสิทธิภาพในการหมักมีค่าใกล้เคียงกับกับงานวิจัยอื่น แต่ให้ผลผลิตเอทานอลน้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาใช้มีความแตกต่างกัน โดยจะพบว่าวัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น กากน้ำตาล น้ำตาลกลูโคส สามารถนำไปหมักเป็นเอทานอลได้เลยเพียงแค่ปรับให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก จึงสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณมาก ส่วนวัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง นั้นสามารถย่อยไปเป็นน้ำตาลได้ง่าย ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลเพื่อหมักเป็นเอทานอลได้ สำหรับวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว กากตะกอนเยื่อกระดาษ ในกระบวนการย่อยเกิดเป็นน้ำตาลในปริมาณที่น้อยกว่า ดังนั้นจึงทำให้ในกระบวนการหมักเกิดเป็นเอทานอลในปริมาณที่น้อยกว่า

นอกจากนี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักก็มีผลต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เช่นเดียวกัน จากงานวิจัยของ Badal, 2005 มีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโดยใช้ *E. coli* FBR5 ซึ่งมีความสามารถในการหมักน้ำตาลเพนโตสและน้ำตาลเฮกโซสไปเป็นเอทานอลจึงทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าในงานวิจัยนี้

ในการประมาณค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษในงานวิจัยนี้จะพิจารณาราคาของเอนไซม์เซลลูเลสและเชื้อยีสต์เป็นหลัก จากการคำนวณซึ่งแสดงในภาคผนวก จ พบว่าค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษคือ 57.13 บาทต่อเอทานอล 1 ลิตร และถ้าหากโรงงานคิมเบอร์ลี่-คล้าก ประเทศไทย จำกัด มีการนำกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล จะมีกำลังการผลิต 2,100 ลิตรต่อวัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ในงานวิจัยนี้เป็นการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งโดยศึกษาเปรียบเทียบวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขั้นต้นก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการย่อยเซลลูโลสในเยื่อกระดาษเป็นน้ำตาลรีดิวซ์และหมักเป็นเอทานอล สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. องค์ประกอบของกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลสประมาณร้อยละ51 เฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 39 และลิกนินประมาณร้อยละ 7 ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ แต่ทั้งนี้องค์ประกอบที่เป็นเฮมิเซลลูโลสซึ่งมีอยู่ในกากตะกอนเยื่อกระดาษจะลดประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตได้ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับสภาพขั้นต้นเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลก่อน

2. ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง สภาวะที่เหมาะสมคือการใช้กรดซัลฟูริกเจือจางความเข้มข้น 2% อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพ 120 ˚C เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาผ่านกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 อุณหภูมิ 50˚C เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง) จะเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 76.05 มิลลิกรัมต่อเยื่อกระดาษ และเมื่อนำมาหมักเกิดเป็นเอทานอล 21.50 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ โดยจะเกิดเอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 60 ชั่วโมง และที่สภาวะดังกล่าวเกิดอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด คือ 5.26 มิลลิกรัมต่อลิตร.ชั่วโมงและประสิทธิภาพในการหมัก คือ 70.59 ซึ่งที่สภาวะการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดเจือจางดังกล่าวนั้นสามารถช่วยย่อยสลายพันธะของโครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลสและเป็นตัวละลายเฮมิเซลลูโลสที่เกาะอยู่กับโครงสร้างของเซลลูโลสออกมา ดังนั้นจึงเป็นการกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ นอกจากนี้สารละลายกรดซัลฟูริกยังทำให้เกิดการพองตัวในโครงสร้างของเซลลูโลสซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยเนื่องจากเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น จึงทำให้เกิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้มาก ในขณะเดียวกันก็ผลิตสารซึ่งยับยั้งการทำงานของเชื้อยีสต์ต่ำ ดังนั้นยีสต์จึงสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้มาก แต่เมื่อใช้อุณหภูมิในการปรับสภาพสูงขึ้นคือ 140 160 และ 180˚ C จะส่งผลให้การผลิตเอทานอลเกิดได้น้อยลงตามลำดับเนื่องมาจากที่สภาวะดังกล่าวมีการผลิตสารพิษซึ่งยับยั้งการทำงาน

ของเชื้อยีสต์ ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบจึงลดลงเพียงเล็กน้อยและเกิดเป็นเอทานอลได้น้อยเช่นกัน

3. เมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปพบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 60 นาที (pH 10.0) เมื่อนำมาหมักเกิดเป็นเอทานอล 27.55 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ โดยจะเกิดเอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 40 ชั่วโมง และที่สภาวะดังกล่าวเกิดอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด คือ 6.44 มิลลิกรัมต่อลิตร.ชั่วโมงและประสิทธิภาพในการหมัก คือ 88.24 ซึ่งสูงกว่าที่สภาวะอื่นๆ เนื่องมาจากเป็นสภาวะที่เชื้อยีสต์สามารถเจริญ เติบโตได้ดี สามารถใช้ด่างเพื่อช่วยลดความเป็นพิษในน้ำหมักได้ แต่สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นสูงๆ เช่น กรดซัลฟูริกเจือจาง 3% ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้กลับลดน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นในการปรับสภาพ คือ อุณหภูมิ 140 160 และ 180 °C ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะลดน้อยลงตามลำดับ ซึ่งถึงแม้จะใช้ด่างเพื่อช่วยลดความเป็นพิษในน้ำหมักแล้วแต่ก็ไม่สามารถช่วยให้การทำงานของเชื้อยีสต์มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งเห็นได้จากการเจริญของเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและเกิดเป็นเอทานอลได้เพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน ดังนั้นในการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่างจึงเป็นการเพิ่มปริมาณเอทานอลและช่วยลดระยะเวลาในการหมักลง

4. ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยโอโซน สภาวะที่เหมาะสมคือ การใช้โอโซนที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน 45 นาที แล้วนำมาผ่านกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (pH 5.5 อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง) จะเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 54.70 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ และเมื่อนำมาหมักจะเกิดเป็นเอทานอล 19.60 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ โดยจะเกิดเอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 40 ชั่วโมงและที่สภาวะดังกล่าวเกิดอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด คือ 6.38 มิลลิกรัมต่อลิตร.ชั่วโมง และประสิทธิภาพในการหมัก คือ 90.59 ซึ่งที่สภาวะการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซนดังกล่าวมีปริมาณโอโซนที่มากเพียงพอในการทำลายพันธะและโครงสร้างของเซลลูโลสซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในระบบ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักที่ทำให้เกิดอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max}) และประสิทธิภาพในการหมักสูง หากเพิ่มอัตราการไหลอากาศหรือเพิ่มระยะเวลาในการป้อนโอโซนก็จะเป็นการสิ้นเปลืองเพราะไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของการหมัก

5. เมื่อเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นโดยการใช้กรดเจือจางและการใช้โอโซนก่อนที่จะผ่านกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมักเพื่อผลิตเอทานอลพบว่าการใช้กรดจะสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่มากกว่า แต่ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารและประสิทธิภาพการหมักมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาความเหมาะสมในด้านอื่นๆพบว่าการใช้กรดเจือจางมีการใช้สารเคมีในปริมาณมากทั้งการใช้กรดในการประบสภาพและการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษจึงทำให้มีค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลสูงกว่า อีกทั้งของเสียที่เกิดขึ้นนั้นมีกรดปนอยู่ด้วยในปริมาณมากจึงทำให้เกิดปัญหาในการบำบัดและยังเป็นพิษต่อสภาพแวดล้อมอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ในงานวิจัยนี้ใช้เอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. reesei* จึงทำให้มีต้นทุนในการผลิตเอทานอลสูง แต่สามารถลดต้นทุนในการผลิตลงได้โดยการผลิตเอนไซม์ขึ้นมาเอง โดยการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและสกัดเอนไซม์มาใช้ในการย่อยเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์และนำไปหมักเพื่อผลิตเอทานอล

2. ในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งใช้น้ำตาลเฮกโซส (C_6) เช่น น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตและผลิตเป็นเอทานอล จึงควรมีการศึกษาโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่สามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลเพนโตส (C_5) มักพบในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสและน้ำตาลเฮกโซส (C_6) ที่พบในโครงสร้างของเซลลูโลสที่มีอยู่ในวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งอาจทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้น

3. จากงานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งโดยใช้กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกจากการหมัก (Separate Hydrolysis and Fermentation ; SHF) จึงอาจทำการศึกษากระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation ; SSF) ซึ่งจะทำให้สามารถลดระยะเวลาและพลังงานในกระบวนการหมักลงและเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตอันจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2547. **โอกาสของมันสำปะหลังกับอุตสาหกรรม**. หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

คณะกรรมการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร์. 2545. **พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล**. กรุงเทพฯ.

ชลดา ซื่อสัตย์. 2546. **การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2545. **การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังแบบครั้งคราวโดยการเติมสับสเทรตขึ้นกับพีเอช**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี สถิรพิพัฒน์กุล. 2542. **การผลิตเอทานอลจากผักตบชวาที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. **การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นฤมล ศรียุทธิรัตน์ และ กาญจนา ทุมมานนท์. 2549. **การผลิตเอทานอลจากกากสับปะรด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นนทพงษ์ ภาณุดุลกิตติ. 2548. **การบำบัดสีน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อและกระดาษโดยกระบวนการโอโซเนชัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 2529. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.**

ธันยาภรณ์ เวทย์ไทยสงค์. 2548. **การผลิตเอทานอลจากมันเส้นโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2543. เชื้อเพลิงเอทานอลจากวัสดุทางการเกษตร:แหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ของคนไทย. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 15(3): 5-8.

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. 2538. **การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรณี แพ่งจันทึก. 2546. **การศึกษาการสกัดเอทานอลจากฟางข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และคณะ. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1,** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และคณะ. 2544. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2,** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุเมธ ชวเดช. 2541. **รายงานฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การพัฒนากระบวนการออกซิเดชันโอโซนสำหรับการบำบัดน้ำเสีย**. วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อำนวย ขวัญเมือง. 2548. **การหมักแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เซลลูเลสและ Saccharomyces cerevisiae**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Acebal, C., M.P. Castillon and P. Estrada. 1986. Enhanced cellulase production from Trichoderma reesei QM 9414 on physically treated wheat straw. **Applied Microbiol Biotechnol.** 218-223.

Badal, C. S. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**. 40: 3693–3700.

Cheremisinoff, N.P. 1993. **Water Treatment and Waste Recovery Advanced Technology and Applications**. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Gottschalk, C., J. A. Libra and A. Saupe. 2000. **Ozonation of Water and Waste Water**. WILEY-VCH, Inc., Germany.

UNEP .1996. Environmental Management in the Pulp and Paper Industry.

Esser, K., and T. Karsch. 1984. Bacterial ethanol production: advantages and disadvantage. **Process Biochem.** 116-121.

Farooq, L., I. R. Mohammad. 2001. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology.** 77: 57-63.

Glazer, A.W. and H. Nikaido. 1995. **Microbial Biotechnology**. W.H. Freeman, New York.

Hutter, A. and S.G. Oliver. 1998. Ethanol production using nuclear petite yeast mutants. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 49: 511 - 516.

Janusz , S. 1988. The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. **Biotecnology and Bioengineering.** 67: 771-776.

Murphy, J.D. and K. McCarthy. 2005. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. **Applied Energy.** 82: 148–166.

Johan, G. and C.J. Fogelbolm. 2000. **ChemicalPulping.** Finland: Fapet Jyvaskyla.

Kadal, Z., Z. Szengyel and K. Reczey. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for production of ethanol**. Industrial Crops and Products**. 20: 103–110.

Langlais, B., D.A. Reckhow and D.R. Brink. 1991. **Ozone in Water treatment Application and Engineering**. Lewis Publ. Inc., Chelsea.

Lee, C.W. and H.N. Chang. 1987. kinetic of ethanol fermentation in membrane cell recycle Fermentor. **Biotechnology and Bioengineering,** 29: 1105-1112.

Ballesteros, M. and J.M. Oliva. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**. 39: 1843–1848.

Najafpour, G. and K.S.K. Ismail. 2004. Ethanol fermentation in an Immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae.* **Bioresoure Technology.** 93:181-187.

Miller, G.L. 1969. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry**,** Vol. 31:426-428.

Nigam, J.N. 1999. Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluveromyces Marxianus*. **Biomass and Bioenergy.** 21: 135-143.

Okeke, B.C. 1995. Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases. **Bioresource Technology.** 51: 23-27.

Paturau, J.M. 1987. **By-products of cane sugar industry**. Amsterdams:Elsevier.

Pramanik, K. 2004. Parametric studies on batch alcohol fermentaion using Saccharomyces yeast extracred. **Biotechnology and Bioengineering.** 23: 201-211.

Perez, C. and R. Briones. 1995. Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (pinus radiata) using steam explosion. **Bioresoure Technology.** 98: 411-420.

Reddy, L.V.A. 2005. Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Role of finger millet, **Process Biochemistry**. 32: 432-441

Roukas, T. 1996. Ethanol production from non-sterilized molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. **J. Food**. 26: 165-173

Scragg, A.H. 1999. **Biotechnology for Engineers : biological systems in technological processes**. New York: John Willey and Sons. 187-189.

TAPPI. 2000-2001. **Method for determination of alpha-, beta-, gramma-cellulose in pulp. Technical Association of Pulp and Paper Industry**.

Wang, P. Y., C. Shopsis and H. Schneider. 1980. Fermentation of a pentose by yeasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 94: 248-254.

Weber, W.J. 1972**. Physicochemical Processes For Water Quality Control**. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Ye Sun and Jiayang Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology.** 34: 831–841.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller L.G., 1959)

1.1 สารเคมี

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตท (K-Na tartrate) 100 กรัม ฟีนอล (phenol) 2.0 กรัม และ DNS 10 กรัม ตามลำดับ คนให้เข้ากันบนอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส ทำให้เย็น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2.2 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

1.2.3 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที โดยนำลูกแก้วมาวางที่ปากหลอด

1.2.4 แช่หลอดในอ่างน้ำเย็นทันที

1.2.5 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

1.2.6 นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

1.3 การหากราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1.3.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3.2 เตรียมสารละลายน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆจากสารละลายน้ำตาล 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางผนวกที่ ก1

1.3.3 ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 ถึง 1.2.5

1.3.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานกับความเข้มข้นของน้ำตาล

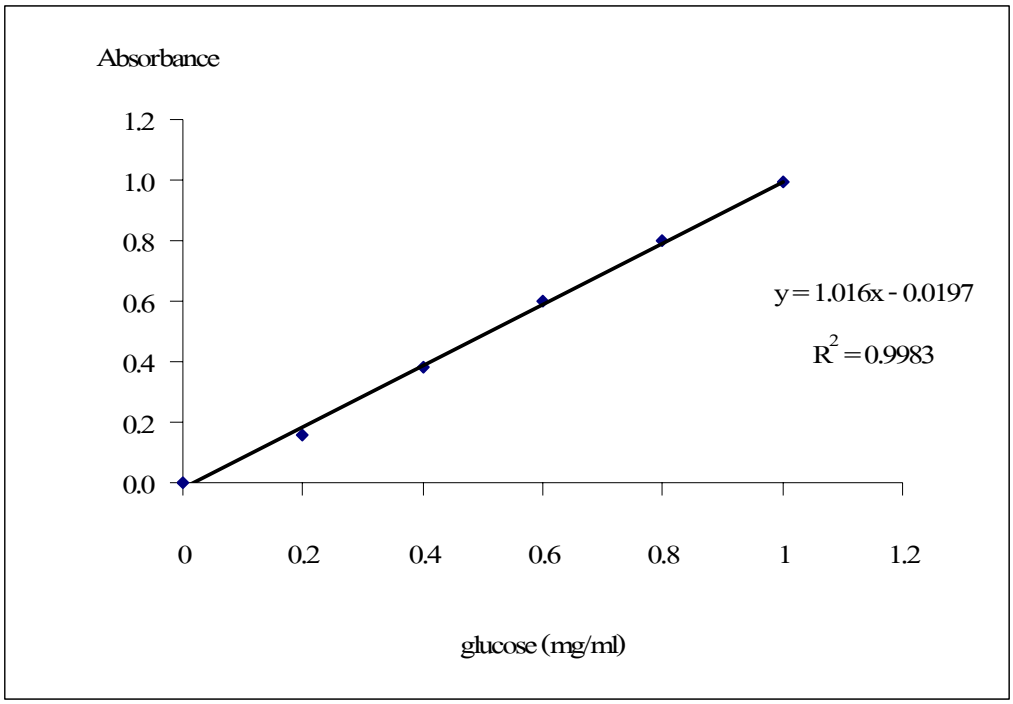
1.4 การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

$$\text{ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

ตารางผนวกที่ ก1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารละลายมาตรฐานกลูโคส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	0.2	0.8
0.4	0.4	0.6
0.6	0.6	0.4
0.8	0.8	0.2
1.0	1.0	0.0

กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีไดโครเมตออกซิเจน

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 33.77 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 450 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 325 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

2.1.2 สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($(Fe(NH_4)_2SO_2)_2.6H2O$) 135 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 750 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้าๆ ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.1.3 สารละลาย 1, 10 ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต ละลายฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.70 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมออโทฟีแนนโทรลีน ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) 1.49 กรัม คนให้ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 เติมน้ำกลั่นลงในฟลาสก์สำหรับกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.2.2 ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์สำหรับกลั่น ต่อชุดกลั่น

2.2.3 ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 25 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปวางที่ปลายส่วนควบแน่น โดยให้ปลายของส่วนควบคุมจุ่มลงในสารละลาย

2.2.4 กลั่นด้วยความร้อนต่ำจนได้ส่วน distillate รวมกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตจนมีปริมาตร 40-45 มิลลิลิตร จึงหยุดกลั่น

2.2.5 ฉีดล้างส่วนควบแน่นด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยให้ลงไปรวมอยู่ในฟลาสก์สารละลายโพแทสซียมไดโครเมต

2.2.6 นำขวดสารละลายที่ได้ไปแช่ในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิที่ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที เพื่อให้แอลกอฮอล์ทำปฏิกิริอยากับโพแทสเซียมไดโครเมตที่อยู่ในสารละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นถ่ายสารละลายพร้อมทั้งใช้น้ำกลั่นเล็กน้อยฉีดล้างสารละลายทั้งหมดลงสู่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2.7 ไทเทรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส เติมสารละลาย 1, 10 ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต ลงไปประมาณ 10 หยด แล้วไทเทรตต่อจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จดปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไปเป็นค่า V_A

2.2.8 ทำ blank โดยปิเปตน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 25 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที นำมาไทเทรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ 2.2.7 จดปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไปเป็นค่า V_B

2.2.9 นำค่า V_A และ V_B ที่ได้คำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ (\% V/V)} = 25 - 25 \times \frac{V_A}{V_B}$$

3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโฮโลเซลลูโลส ใช้วิธีใน TAPPI 203 om-88

3.1 สารเคมี

3.1.1 กรดอะซิติก

3.1.2 โซเดียมคลอไรต์

3.1.3 อะซิโตน

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 ชั่งผงตัวอย่างลงในกระดาษฟอยล์โดยน้ำหนักอบแห้ง 3 กรัม ถ่ายผงเยื่อใส่ลงในขวดรูปกรวบขนาด 250 มิลลิลิตร

3.2.2 เติมน้ำกลั่นลงในขวดรูปกรวยจำนวน 160 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกเข้มข้นจำนวน 0.5 มิลลิลิตร กับโซเดียมคลอไรต์ 1.5 กรัมลงไปด้วย ตามลำดับ แล้วใช้ขวดรูปกรวยขนาดเล็กคว่ำปิดปากขวดรูปกรวยที่ใส่ผงตัวอย่างนั้น นำไปตั้งในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 70-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการทดลองในตู้ดูดควันพิษ มีการเขย่าเป็นระยะจะได้ก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) เกิดขึ้น และมีการทำปฏิกิริยากับลิกนินในผงตัวอย่าง

3.2.3 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง เติมกรดอะซิติกเข้มข้นจำนวน 0.5 มิลลิลิตร กับโซเดียมคลอไรต์ 1.5 กรัมตามลำดับ ลงในขวดรูปกรวย ยังคงเขย่าขวดเป็นระยะ ทำเช่นนี้นาน 1 ชั่วโมง และทำต่อไปอีก 2 3 และ 4 ชั่วโมงหรือจนกว่าผงตัวอย่างจะมีสีขาว

3.2.4 เมื่อครบกำหนดเวลา นำขวดรูปกรวยไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อให้ก๊าซพิษลดการฟุ้งกระจายลงเป็นเวลา 30 นาที

3.2.5 กรองผงเยื่อด้วยถ้วยกรองเบอร์ 2 ที่ทราบน้ำหนักอบแห้งละเอียดถึง 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องกรองที่มีแรงดูดจากการไหลผ่านของน้ำที่ปั๊มมาจากเครื่องปั๊มลงครบชุด ทำให้ก๊าซพิษที่ฟุ้งกระจายออกจากสารละลายจะได้ถูกดูดและละลายไปกับน้ำ

3.2.6 ล้างผงโฮโลเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งมีสีขาว จึงล้างด้วยอะซิโตนและดูดออกให้มากที่สุด

3.2.7 นำโฮโลเซลลูโลสไปผึ่งให้แห้งในบรรยากาศและทำให้แห้งในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก เก็บผงตัวอย่างไว้วิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสต่อไป

3.2.8 นำถ้วยกรองพร้อมโฮโลเซลลูโลสบางส่วนไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก

3.2.9 นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโฮโลเซลลูโลสเป็นร้อยละ

$$\% \text{ ปริมาณโฮโลเซลลูโลส} = 100 \times \frac{W_1}{W_2}$$

W_1 คือ น้ำหนักอบแห้งของโฮโลเซลลูโลส (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

4. วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส ใช้วิธีใน TAPPI 203 om-88

4.1 สารเคมี

4.1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 % เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 87.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และเจือจางเป็น 500 มิลลิลิตร

4.1.2 กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 10

4.2 วิธีการวิเคราะห์

4.2.1 ชั่งโฮโลเซลลูโลสที่ทราบน้ำหนักอบแห้งแน่นอนแล้วจำนวน 2 กรัม โดยน้ำหนักอบแห้งใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 300 มิลลิลิตร

4.2.2 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น17.5 % จำนวน 75 มิลลิลิตรลงไป และปรับอุณหภูมิของสารละลายโดยนำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.2.3 คนสารละลายด้วยเครื่องกระจายจนเกิดการกระจายอย่างสมบูรณ์โดยมิให้เกิดฟองอากาศ 5 นาที

4.2.4 ล้างเครื่องกระจายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์17.5 % จำนวน 25 มิลลิลิตร

4.2.5 คนสารละลายด้วยแท่งแก้วและนำไปแช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

4.2.6 เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายจำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วคนด้วยแท่งแก้วทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิอีก 30 นาที

4.2.7 กรองสารละลายด้วยถ้วยกรองเบอร์ 2

4.2.8 ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งเป็นกลาง

4.2.9 ล้างตะกอนต่อไปอีกด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยให้แช่อยู่นาน 5 นาทีจำนวน 40 มิลลิลิตร

4.2.10 ล้างตะกอนครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นจนน้ำที่ล้างนั้นไม่มีสภาพเป็นกรด

4.2.11 นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นและทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักจนคงที่ นำผลมาคำนวณหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

$$\% \text{ ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส} = \frac{100 \times W_1}{W_2}$$

W_1 คือ น้ำหนักอบแห้งของแอลฟาเซลลูโลส (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

5.วิเคราะห์ปริมาณลิกนินใช้วิธีใน TAPPI 203 om-88

5.1 สารเคมี

5.1.1 กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 72 เตรียมโดยเทกรดซัลฟิวริกเข้มข้นจำนวน 665 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้ของผสมเย็นลงเท่าอุณหภูมิปกติ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ของผสมมีปริมาตรทั้งหมด 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

5.1.2 สารผสมเอทานอล-เบนซีน โดยมีอัตราส่วน 1 : 2 โดยปริมาตร

5.2 วิธีการวิเคราะห์

5.2.1 ชั่งผงตัวอย่าง 2 กรัมโดยน้ำหนักอบแห้งลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

5.2.2 วางบีกเกอร์ลงในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 72 ที่แช่เย็นลงไป 15 มิลลิลิตร พร้อมคนให้กระจายอย่างสม่ำเสมอจนกระทั่งผงตัวอย่างละลายหมด

5.2.3 เมื่อผงตัวอย่างกระจายดีแล้วปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา นำมาตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมคนสารละลายอย่างสม่ำเสมอทุกๆ 15 นาที จนแน่ใจว่ามีการละลายสมบูรณ์

5.2.4 เติมน้ำกลั่น 300-400 มิลลิลิตรลงใน Erlenmeyer flask แล้วเทสารละลายในบีกเกอร์ลงใน Erlenmeyer flask ด้วย และเติมน้ำกลั่นลงไปอีกเพื่อให้กรดมีความเจือจางลดลงจนเหลือความเข้มข้นร้อยละ 3 จนถึงระดับ 1540 มิลลิลิตร ที่ได้ทำเครื่องหมายไว้

5.2.5 Reflux สารละลายเป็นเวลา 4 ชั่วโมง รักษาปริมาตรสารละลายใน Flask ให้คงที่

5.2.6 ปล่อยทิ้งให้ตะกอนนอนก้น 1 คืน นำมากรองผ่านถ้วยกรองเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักแล้ว โดยกรองน้ำใสก่อนแล้วจึงกรองตะกอนลิกนิน

5.2.7 ล้างลิกนินให้ปราศจากกรดด้วยน้ำร้อน

5.2.8 นำถ้วยกรองที่มีลิกนินอยู่ใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นให้เย็นและชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณหาปริมาณลิกนินเป็นร้อยละ

$$\% \text{ ปริมาณลิกนิน} = 100 \times \frac{W_1}{W_2}$$

W_1 คือ น้ำหนักของลิกนินอบแห้ง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

ภาคผนวก ข

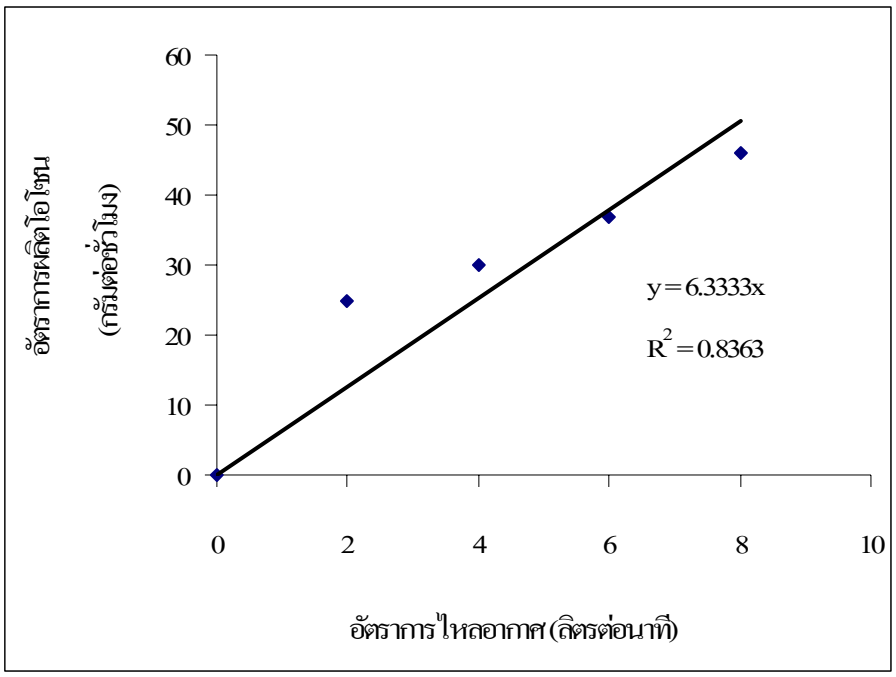
การทดสอบอัตราการผลิตโอโซน

การทดสอบอัตราการผลิตโอโซนของเครื่องผลิตโอโซน

ในการทดลองทำการตรวจสอบปริมาณโอโซนจากเครื่องผลิตโอโซน โดยปริมาณโอโซนที่เกิดขึ้นจากเครื่องผลิตสัมพันธ์โดยตรงกับระยะเวลาที่สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์สัมผัสโอโซน ได้กราฟความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นตรง ในการทดลองใช้เครื่องผลิตโอโซนมีแหล่งกำเนิดคืออากาศ (มีออกซิเจนประมาณ 21 %) ซึ่งในการผลิตโอโซนนี้การเพิ่มปริมาณโอโซนสามารถทำได้โดยการเพิ่มค่าอัตราการไหลของอากาศที่เข้าสู่เครื่องผลิตโอโซน ในการทดลองใช้อัตราการไหลของอากาศ 2 4 6 และ 8 ลิตรต่อนาที ผลการทดลองแสดงดังตารางผนวกที่ 2 และภาพผนวกที่ 2 และแสดงปริมาณโอโซนที่เติมลงในน้ำที่ระยะเวลาสัมผัสต่างๆดังตารางผนวกที่ 3

ตารางผนวกที่ ข1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลอากาศและอัตราการผลิตโอโซน

อัตราการไหลอากาศ (ลิตรต่อนาที)	อัตราการผลิตโอโซน (กรัมต่อชั่วโมง)
0	0
2	25
4	30
6	37
8	46



ภาพผนวกที่ ข2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอากาศและอัตราการผลิตโอโซนของเครื่องผลิตโอโซน

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณโอโซนที่เติมลงในน้ำที่ระยะเวลาสัมผัสต่างๆ

ระยะเวลาสัมผัส	ปริมาณโอโซน (กรัม) ที่อัตราการผลิตโอโซน (กรัมต่อชั่วโมง) ต่างๆ			
(นาที)	25	30	37	46
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	2.08	2.50	3.08	3.83
10	4.17	5.00	6.17	7.67
15	6.25	7.50	9.25	11.50
30	12.50	15.00	18.50	23.00
45	18.75	22.50	27.75	34.50
60	25.00	30.00	37.00	46.00
90	37.50	45.00	55.50	69.00

ภาคผนวก ค

ตารางผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ค1 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 120 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.05	360	53.4	0
12	5.04	420	52.25	4.45
24	4.96	515	49.6	5.05
36	4.97	728	46.5	5.7
48	4.99	1075	41.65	6.9
60	4.98	1652	32.45	10.15
72	4.96	2216	13.8	15.3
84	4.97	2467	13.35	16.6

ตารางผนวกที่ ค2 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก1% อุณหภูมิ 120 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.06	420	53.4	0
12	5.06	480	50.95	4.1
24	5.05	752	47.5	5.1
36	5.05	1258	39.2	6.95
48	5.03	2113	20.35	12.9
60	5.04	2581	16	15.4
72	5.04	2742	11.55	17.25
84	5.03	2797	10.25	18.5

ตารางผนวกที่ ค3 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก2% อุณหภูมิ 120 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.06	390	76.05	0
12	5.02	435	75.35	4.05
24	4.98	560	73.5	5.15
36	4.96	702	68.4	6.6
48	4.87	998	62.35	8.7
60	4.84	1694	45.8	12.45
72	4.81	2075	26.9	18.95
84	4.82	2280	25.1	21.5

ตารางผนวกที่ ค4 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 120 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.05	300	76.05	0
12	5.04	380	73.4	4.55
24	5.03	560	70.85	6.2
36	5.02	940	58.95	9.4
48	5.01	1643	29.75	15.45
60	5.02	2224	23.05	20.1
72	5.02	2496	18.6	24.35
84	5.01	2572	15.8	27.55

ตารางผนวกที่ ค5 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก3% อุณหภูมิ 120 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.02	350	82.15	0
12	4.98	400	81.4	4.15
24	4.93	518	79.3	5.1
36	4.88	693	73.9	6.9
48	4.79	952	65.7	9.35
60	4.72	1370	49.65	11.25
72	4.64	1748	36.6	15.5
84	4.64	1861	35.8	17.8

ตารางผนวกที่ ค6 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 120 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.03	340	82.15	0
12	4.99	380	79.5	4.3
24	5.02	526	74	5.5
36	4.96	850	65.8	7.75
48	4.97	1470	44	12.65
60	4.95	1884	35.65	15.85
72	4.96	2092	33.05	18.55
84	4.95	2114	30.35	20.5

ตารางผนวกที่ ค7 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก1% อุณหภูมิ 140 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.06	385	58	0
12	5.05	454	54.75	3.2
24	5.00	598	45.6	4.25
36	4.96	812	42.05	5.95
48	4.97	1165	38.7	7.25
60	4.95	1737	33.4	10.1
72	4.96	2204	22.25	13.55
84	4.95	2385	19.6	14.1

ตารางผนวกที่ ค8 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 140 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.07	392	58	0
12	5.05	501	54.35	3.75
24	5.04	750	48.75	4.7
36	5.02	1223	38.4	6.9
48	5.04	1848	27.1	12.25
60	5.01	2281	22	14.95
72	4.98	2509	19.1	15.5
84	5.01	2624	17.3	15.95

ตารางผนวกที่ ค9 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก2% อุณหภูมิ 140 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.04	427	83	0
12	5.00	509	78.6	3.5
24	4.92	593	73.35	4.85
36	4.86	730	67.5	6.5
48	4.77	994	62.9	9.3
60	4.72	1395	50.2	12.05
72	4.74	1852	37.65	16.25
84	4.72	2041	35.75	17.65

ตารางผนวกที่ ค10 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 140 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.06	363	83	0
12	5.02	465	75.5	4.1
24	4.99	703	68.4	5.6
36	4.96	1105	51.8	8.8
48	4.91	1552	38	14.15
60	4.86	1994	29.65	18.7
72	4.82	2242	27.6	20.6
84	4.81	2378	26.4	21.75

ตารางผนวกที่ ค11 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก3% อุณหภูมิ 140 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.04	370	89.2	0
12	5.00	407	81.05	3.3
24	4.89	450	78.5	4.2
36	4.82	609	71.8	5.8
48	4.73	871	65.4	7.75
60	4.62	1314	55.25	10.5
72	4.60	1647	44.6	14.05
84	4.61	1845	42.75	15.2

ตารางผนวกที่ ค12 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 140 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.05	380	89.2	0
12	5.03	462	82.9	3.5
24	5.00	610	76.05	4.45
36	4.92	958	64	7.1
48	4.85	1275	49.75	10.5
60	4.74	1564	45.35	13.55
72	4.75	1793	42.65	16.4
84	4.73	1914	41.05	17.6

ตารางผนวกที่ ค13 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 160 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.07	329	61.3	0
12	5.02	386	57.35	2.95
24	4.99	483	54.25	3.6
36	4.94	657	46.9	4.5
48	4.92	884	44.3	5.7
60	4.90	1271	42.45	7.8
72	4.86	1549	35.1	9.45
84	4.85	1710	32.05	10.05

ตารางผนวกที่ ค14 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 160 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.05	384	61.3	0
12	5.04	483	55.65	3.1
24	5.02	626	51	4.2
36	5.02	994	44.2	5.15
48	5.00	1588	30.25	8.8
60	4.96	1890	28.05	11.85
72	4.92	2028	26.5	12.45
84	4.91	2153	25.1	13.05

ตารางผนวกที่ ค15 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 160 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.06	348	88.05	0
12	5.00	389	82.65	3.2
24	4.92	452	78.5	4
36	4.85	584	74.2	6.1
48	4.76	817	73.65	7.55
60	4.75	1056	67.6	9.9
72	4.70	1309	58.2	12.35
84	4.70	1635	50.15	13.35

ตารางผนวกที่ ค16 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 160 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.02	350	88.05	0
12	5.01	402	83.1	3
24	4.98	593	76	4.6
36	4.95	934	67.55	7.45
48	4.87	1308	50.2	10.65
60	4.85	1630	44.15	12.85
72	4.82	1806	42.45	14.9
84	4.80	2014	40.8	15.65

ตารางผนวกที่ ค17 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 160 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.05	381	92.15	0
12	4.95	420	90.1	3
24	4.88	487	87.95	3.45
36	4.80	568	84.25	4.25
48	4.72	750	80.05	5.55
60	4.60	1027	76.65	7.1
72	4.57	1224	68.8	8.55
84	4.56	1267	63.5	9.7

ตารางผนวกที่ ค18 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 160 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.04	368	92.15	0
12	5.02	422	89.85	2.65
24	4.97	558	82.15	3.55
36	4.92	806	76.4	5.3
48	4.84	1123	64.25	8.1
60	4.72	1474	55.2	11.05
72	4.70	1562	53.75	13.3
84	4.68	1637	51.45	13.6

ตารางผนวกที่ ค19 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 180 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.02	332	76.8	0
12	4.96	374	75.15	2.65
24	4.92	442	73.3	3.2
36	4.86	520	70.35	3.8
48	4.77	664	65.5	4.6
60	4.75	903	60.6	5.9
72	4.66	1160	55.35	6.75
84	4.62	1282	54.25	7.4

ตารางผนวกที่ ค20 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 1% อุณหภูมิ 180 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.03	385	76.8	0
12	4.99	420	72	2.8
24	4.95	551	67.9	3.65
36	4.94	773	57.1	4.7
48	4.91	1058	51.45	6.75
60	4.83	1395	49.2	8.9
72	4.84	1557	47.55	9.8
84	4.81	1682	46.3	10.5

ตารางผนวกที่ 821 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 180 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.04	349	97.5	0
12	4.92	411	95.55	2.3
24	4.90	484	93.5	2.75
36	4.83	582	88.7	3.35
48	4.74	710	85.15	4.1
60	4.64	873	79.9	4.95
72	4.58	1120	73.8	6.35
84	4.54	1192	72.1	7.25

ตารางผนวกที่ ค22 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 2% อุณหภูมิ 180 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.07	405	97.5	0
12	5.00	478	91.35	2.5
24	4.94	563	88.8	3.45
36	4.87	759	80.95	4.75
48	4.82	1094	68	6.95
60	4.75	1305	65.35	8.65
72	4.71	1479	64.45	9.65
84	4.67	1588	62.3	10.4

ตารางผนวกที่ ค23 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 180 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.05	374	99.45	0
12	4.91	412	98.15	2.6
24	4.86	468	95.6	3.2
36	4.80	532	92.85	3.75
48	4.71	612	90.05	4.4
60	4.62	744	85.65	5.3
72	4.54	935	80.55	5.6
84	4.52	1112	74.2	5.85

ตารางผนวกที่ ค24 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์(มีการใช้ด่างเพื่อลดความเป็นพิษ)ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริก 3% อุณหภูมิ 180 ˚C เป็นระยะเวลา 60 นาทีและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	5.04	358	99.45	0
12	4.98	385	96	2.4
24	4.92	446	92.65	3
36	4.84	576	87.7	3.7
48	4.79	807	79.1	4.9
60	4.72	996	74	6.05
72	4.65	1129	70.05	7.2
84	4.62	1260	65.1	8.5

ตารางผนวกที่ ค25 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	360	23.5	0
12	455	22.25	2.3
24	621	20.1	3.05
36	893	16.8	3.9
48	1356	11.05	4.85
60	1560	8.15	5.25
72	1703	6.25	5.5
84	1852	5.8	5.7

ตารางผนวกที่ ค26 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	370	25.4	0
12	468	23.1	2.4
24	625	20.75	3.25
36	915	17.35	4
48	1364	11.5	5.15
60	1572	8.95	5.5
72	1773	7.2	5.8
84	1894	6.2	6

ตารางผนวกที่ ค27 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	390	30.7	0
12	470	28.65	2.1
24	652	25.6	3
36	955	21.45	4.15
48	1402	14.25	5.85
60	1598	10.55	6.7
72	1790	9.6	7.4
84	1911	7.65	7.95

ตารางผนวกที่ ค28 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน15นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	350	37	0
12	469	34.4	2.35
24	673	31.05	3.45
36	984	26.6	4.9
48	1435	17.2	7.45
60	1632	11.75	9.3
72	1820	9.7	10.2
84	1956	8.85	10.8

ตารางผนวกที่ ค29 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน30นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	380	40.75	0
12	460	39.1	2.65
24	635	35.5	3.7
36	912	29.75	5.7
48	1465	16.2	8.9
60	1690	12.35	10.95
72	1806	10.25	12.75
84	1952	8.25	13.65

ตารางผนวกที่ ค30 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน30 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	410	44.3	0
12	485	40.7	2.9
24	662	37.15	4.1
36	975	30.75	6
48	1478	17.4	9.55
60	1746	13.95	12.3
72	1924	12.05	13.25
84	2012	10.1	14.3

ตารางผนวกที่ ค31 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน30นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	370	49.5	0
12	478	46.25	3.15
24	651	40.6	4.7
36	963	34.2	7.35
48	1455	19.4	11
60	1752	15.2	13.7
72	1964	12.6	15.1
84	2119	11.55	16.25

ตารางผนวกที่ ค32 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน30 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	390	53	0
12	450	48.2	3.5
24	693	43.05	5.2
36	992	35.25	9.3
48	1529	19.85	14.35
60	1824	16.25	16.7
72	1992	13.8	17.8
84	2151	12.15	18.55

ตารางผนวกที่ ค33 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	350	51.5	0
12	440	47.6	3.4
24	616	44.15	4.85
36	905	35.6	8.6
48	1432	19.75	14.2
60	1679	16.6	16
72	1882	14.3	17.7
84	2042	11.6	18.1

ตารางผนวกที่ ค34 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	380	54.7	0
12	472	49.25	3.65
24	673	43.6	5.25
36	984	37.7	9.4
48	1486	20.15	15.3
60	1748	17.6	17.05
72	1930	14.85	18.6
84	2118	12.15	19.6

ตารางผนวกที่ ค35 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	400	57.6	0
12	495	50.85	3.8
24	702	46.55	5.65
36	1056	40.1	10.25
48	1575	23.75	16.15
60	1844	19.65	18.15
72	2015	16.8	19.45
84	2237	13.5	20.1

ตารางผนวกที่ ค36 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน45 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	370	59.7	0
12	480	54.45	3.75
24	689	48.8	5.5
36	1013	40.85	10.7
48	1545	25	17.5
60	1860	20.55	19.05
72	2054	17.9	20.3
84	2275	14.1	20.7

ตารางผนวกที่ ค37 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน60นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	390	58.35	0
12	470	53.75	3.55
24	640	48.2	5.3
36	957	42.35	9.85
48	1506	25.6	16.6
60	1845	20.4	18.4
72	2083	18.25	19.55
84	2310	14.2	20.25

ตารางผนวกที่ ค38 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 4 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	410	59.6	0
12	489	54.4	3.8
24	670	49.25	5.7
36	984	43.1	11.25
48	1545	27.35	17.55
60	1889	21.5	19.1
72	2117	19.15	19.85
84	2352	15.25	20.15

ตารางผนวกที่ ค39 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน60นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	380	61.9	0
12	472	57.7	3.7
24	710	51.8	5.5
36	1072	45.5	11.55
48	1592	29.45	18.35
60	1930	23.75	19.4
72	2188	20.3	19.9
84	2383	16.2	20.3

ตารางผนวกที่ ค40 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพขั้นต้นด้วยโอโซน ที่อัตราการไหลอากาศ 8 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการป้อนโอโซน60 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g WPS)	ปริมาณเอทานอล (mg/g WPS)
0	370	63.25	0
12	474	59.3	3.9
24	715	53.95	6
36	996	45.55	12.25
48	1620	30.55	18.5
60	1952	24.9	19.5
72	2196	21.5	20.05
84	2397	17.05	20.3

ภาคผนวก ง

ตัวอย่างการคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

1. การคำนวณอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (q_s) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) จากผลการทดลองตารางผนวกที่ ง1

$$q_s = \frac{-1}{x}\frac{ds}{dt}$$

$$q_p = \frac{1}{x}\frac{dp}{dt}$$

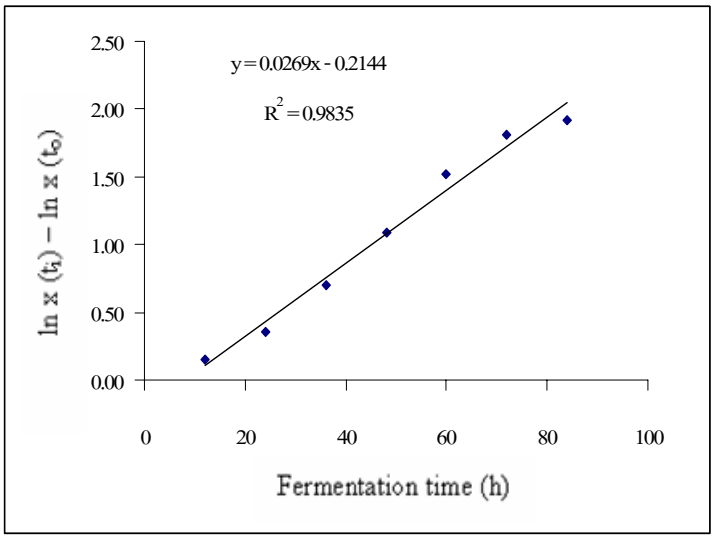
ตารางผนวกที่ ง1 การคำนวณอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (q_s) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p)

เวลา (ชั่วโมง)	dt	น้ำหนักเซลล์แห้ง (x)	dx	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (s)	ds	q_s (mg/mg.h)	ปริมาณเอทานอล (p)	dp	q_p (mg/mg.h)
0	0	360	0	53.4	0	0	0	0	0
12	12	420	60	52.25	-23	0.657	89	89	2.543
24	12	515	95	49.6	-53	1.235	101	12	0.280
36	12	728	213	46.5	-62	1.022	114	13	0.214
48	12	1075	347	41.65	-97	1.083	138	24	0.268
60	12	1652	577	32.45	-184	1.337	203	65	0.472
72	12	2216	564	13.8	-373	2.020	306	103	0.558
84	12	2467	251	13.35	-9	0.044	332	26	0.126

2. การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

$$\mu = \frac{\ln x\,(t_i) - \ln x\,(t_o)}{(t_i - t_o)}$$

แทนค่าผลการทดลองจากตารางผนวกที่ ง1



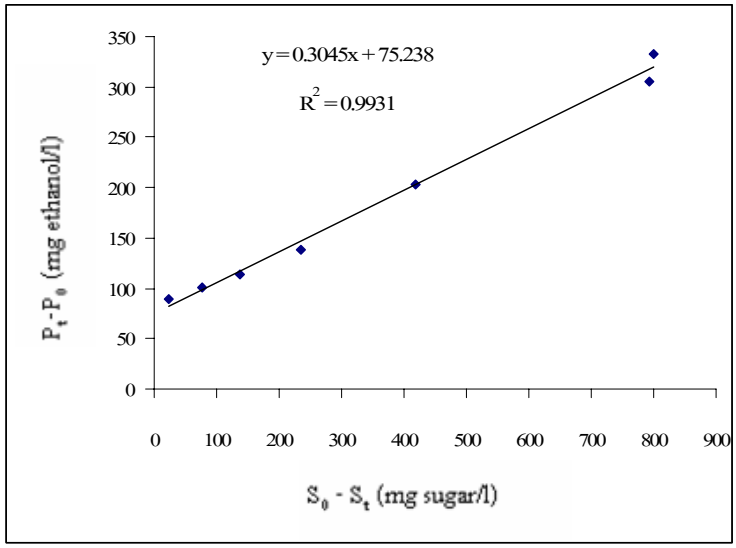
ภาพผนวกที่ ง1 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด

$$\mu = 0.027\ h^{-1}$$

3. การคำนวณค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{p/s}$)

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{-\Delta S}$$

แทนค่าผลการทดลองจากตารางผนวกที่ ง1



ภาพผนวกที่ ง2 การคำนวณค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร

$Y_{p/s}$ = 0.3045 mg ethanol/mg sugar

4. การคำนวณอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด (P_{max})

$$\text{อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด} = \frac{\text{ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุด (mg/l)}}{\text{เวลาที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (h)}}$$

แทนค่าผลการทดลองจากตารางผนวกที่ ง1

$$\text{อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด} = \frac{306 \text{ mg/l}}{72 \text{ h}}$$

$$= 4.25 \text{ mg/l.h}$$

5. การคำนวณประสิทธิภาพการหมัก (Fermentation efficiency)

$$\text{ประสิทธิภาพการหมัก(\%)} = \frac{Y_{p/s}}{0.51} \times 100$$

แทนค่าผลการทดลองจากตารางผนวกที่ ง1

$$\text{ประสิทธิภาพการหมัก(\%)} = 60$$

ภาคผนวก จ

การคำนวณต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ

1) จากงานวิจัยนี้สามารถผลิตเอทานอลได้ 27.55 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ

เอทานอลมีความหนาแน่น 0.79 g/ml

ดังนั้นสามารถผลิตเอทานอลได้ $= \frac{27.55 \times 10^{-3} \text{ g/g WPS}}{0.79 \text{ g/ml}}$

$= 0.035 \text{ ml/g WPS}$

นั่นคือ กากตะกอนเยื่อกระดาษ 1 กรัม สามารถผลิตเอทานอลได้ 0.035 มิลลิลิตร

ถ้าต้องการผลิตเอทานอล 1 ลิตร ต้องใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษ $= \frac{1000 \text{ ml} \times 1 \text{ g}}{0.035 \text{ ml}}$

$= 28.57 \text{ kg}$

2) หรือคิดเป็นปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ 551 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำหมัก

ดังนั้นคิดเป็นปริมาณเอทานอล $= \frac{551 \times 10^{-3} \text{ g/l}}{0.79 \text{ g/ml}}$

$= 0.70 \text{ ml/l}$

นั่นคือ ในน้ำหมัก 1 ลิตร มีปริมาณเอทานอลอยู่ 0.70 มิลลิลิตร

ถ้าต้องการผลิตเอทานอล 1 ลิตร ต้องมีน้ำหมักปริมาตรรวม $= \frac{1000 \text{ ml} \times 1 \text{ l}}{0.70 \text{ ml}}$

$= 1428 \text{ l}$

ตารางผนวกที่ จ1 การคำนวณค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ

	หน่วย	ราคาต่อหน่วย (บาท)	ปริมาณที่ใช้ในงานวิจัยนี้	ปริมาณที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 1 ลิตร	ค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอล 1 ลิตร (บาท)
Cellulase enzyme	ลิตร	200	1 ml/200 g WPS	142.85 ml	28.57
Yeast	กิโลกรัม	100	0.2 g/l	285.6 g	28.56
		รวมค่าใช้จ่าย			57.13

การคำนวณปริมาณการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ

โรงงานคิมเบอร์ลี่-คล้าก ประเทศไทย จำกัด มีปริมาณกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งเกิดขึ้นประมาณ 60 ตันต่อวัน

จาก	กากตะกอนเยื่อกระดาษ	28.57	กิโลกรัม	สามารถผลิตเอทานอลได้	1	ลิตร
ดังนั้น	กากตะกอนเยื่อกระดาษ	60×10^3	กิโลกรัม/วัน	สามารถผลิตเอทานอลได้	2,100	ลิตร/วัน

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวอิสรี รอดทัศนา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 16 กันยายน 2525
สถานที่เกิด	สุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	ระดับปริญญาตรี (เกียรตินิยมอันดับสอง) ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนจากสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology, TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)