บทที่ 3

วัตถุดิบ และวิธีการทดลอง

3.1 เยื่อชีวมวล 4 ชนิด คือ ไม้ยูคาลิปตัส ไม้กระถินเทพา ลำต้นปาล์ม และทางใบปาล์ม

- ไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus spp.*) และกระถินเทพา (*Acacia mangium* Willd.) ที่ได้มาจากศูนย์วนวัฒนวิจัยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ชนิดละ 1 ต้น ทำการปลอกเปลือกและตัดให้เป็นชิ้นพอดีที่จะเข้าเครื่องทำ chip

-ลำต้นปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นลำต้นปาล์มน้ำมันสดอายุ 28 ปี จำนวน 2 ต้น และทางใบปาล์มน้ำมันจำนวน 150 ทาง จากเกษตรกรในจังหวัดกระบี่ ทำการปลอกเปลือกและตัดให้เป็นชิ้นพอดีที่จะเข้าเครื่องทำ chip

3.2 การเตรียมชีวมวล

จากนั้นบดให้เป็นชิ้นไม้ (chip) แบ่งมาหาความชื้นเริ่มต้น นำเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นที่หาได้ มาคำนวณน้ำหนักชีวมวลเปียกที่จะใช้เข้าเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อให้ได้เป็นน้ำหนักชีวมวลแห้ง เท่ากับ 200 กรัม จากนั้น นำชิ้นไม้ที่เหลือไปตากแดดเป็นเวลา 3 วันให้แห้ง และนำมาเข้าเครื่องบด และร่อนให้ได้ขนาดระหว่าง 40 ถึง 60 mesh ด้วยตะแกรง วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามมาตรฐานของ Technical Assocaiation of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) ได้แก่ สารแทรก (TAPPI T 264 om-97, 1997) เซลลูโลส (TAPPI T 203 om-93, 1988) เพนโตแซน (TAPPI T 223 om-84, 1984) ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (Acid insoluble lignin, AIL) (TAPPI T 222 om-98, 1998) เถ้า (TAPPI T 211 om-85, 1985) โฮโลเซลลูโลสวิเคราะห์ตามวิธีของBrowning (1983)

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำพรีทรีตเมนต์ โดยการระเบิดด้วยไอน้ำ ของไม้ยูคาลิปตัส กระถินเทพา ลำต้นปาล์มน้ำมัน และทางใบปาล์ม

การระเบิดด้วยไอน้ำแต่ละครั้งจะใช้ชีวมวลอบแห้งครั้งละ 200 กรัมน้ำหนัก โดยแปรผันสภาวะการระเบิดด้วยไอน้ำดังตารางที่ 6 และเมื่อระเบิดเสร็จแต่ละสภาวะใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงด้วยยางรัดให้แน่น แช่ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ ก่อนเก็บจะแบ่งมา 20 กรัม นำมาตากแห้ง บดและร่อนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เป็นต้น และอีก 1 กรัม มาหาปริมาณเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ TAPPI การระเบิดแต่ละสภาวะจะทำการทดลองสภาวะละ 3 ซ้ำ และแบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่งประมาณ 1 กรัม ไว้เพื่อหาความชื้นของเยื่อหลังระเบิดด้วยไอน้ำ ก่อนที่จะนำไปสกัดด้วยน้ำเพื่อหาสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำของชีวมวล โดยค่า severity factor จะสัมพันธ์กับอุณหภูมิและเวลาของการระเบิดด้วยไอน้ำ

	สภาวะ		
ชีวมวล	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ค่า Severity factor ($\log(R_o)$)
ไม้ยูคาลิปตัส	200	2	3.24
ไม้กระถินเทพา		4	3.55
ลำต้นปาล์มน้ำมัน		6	3.72
ทางใบปาล์ม	210	2	3.54
		4	3.84
		6	4.02

3.4 การสกัดน้ำร้อน ของไม้ยูคาลิปตัส กระถินเทพา ลำต้นปาล์มน้ำมัน และทางใบปาล์ม

นำเยื่อทั้งหมดที่ได้ภายหลังการระเบิด นำไปล้างในน้ำร้อน ซึ่งใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นโดยมีสัดส่วนเยื่อต่อน้ำ เท่ากับ 1:8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (กรัมต่อมิลลิลิตร) ให้ความร้อน ใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที คนเป็นครั้งคราว เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้งให้เย็น แล้วกรองแยกเอาเยื่อออก ด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นล้างเยื่อด้วยน้ำประปา จนน้ำล้างใส ไม่มี

สี โดยเก็บน้ำล้างเยื่อครั้งแรกใส่ขวดเก็บตัวอย่างพร้อมปิดฝาให้สนิท เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเฟอร์ฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล นำเยื่อมาตั้งทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ บันทึกน้ำหนักเยื่อที่ได้ แบ่งเยื่อออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีหลังการสกัดด้วยน้ำร้อนตามมาตรฐานการวิเคราะห์ TAPPI ส่วนที่เหลือเก็บในถุงพลาสติกปิดปากถุงด้วยยางรัดให้แน่น นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอนำไปสกัดด้วยด่าง (alkaline extraction) ขั้นต่อไป

3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่าง (Alkaline extraction) ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน

- การออกแบบการทดลองโดยวิธีทะกุจิ

ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีทะกุจิแบบ Three Level Orthogonal Array (L-9) ออกแบบเพื่อศึกษาหาระดับที่เหมาะสมของตัวแปร 3 ปัจจัย ซึ่งแต่ละปัจจัยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ โดยแบ่งออกเป็นความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้สกัด ดังนั้นจึงได้การทดลองทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง ประกอบด้วยจำนวนการทดลองที่ขึ้นอยู่กับระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยในการหาสภาวะการสกัดด้วยด่าง ของชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน

ปัจจัย	ระดับ		
	1	2	3
1: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)	15	20	25
2: อุณหภูมิการสกัด (องศาเซลเซียส)	70	80	90
3: เวลาการสกัด (นาที)	30	60	90

ตารางที่ 8 $L_9 (3^3)$ Orthogonal Array

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		
	1	2	3
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

ตารางที่ 9 ปัจจัยและระดับต่าง ๆ ในการทดลองการหาสภาวะการสกัดด้วยด่าง ของชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน

ชุดการทดลอง	ปัจจัยการทดลอง		
	ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1	15	70	30
2	15	80	60
3	15	90	90
4	20	70	60
5	20	80	90
6	20	90	30
7	25	70	90
8	25	80	30
9	25	90	60

ขั้นตอนการสกัดด้วยด่าง

นำชิ้นไม้มาทำการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะที่เหมาะสมและสกัดด้วยน้ำร้อนใหม่ให้เพียงพอต่อการ ศึกษาสภาวะการสกัดด้วยด่าง นำมาคลุกรวมกัน หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นเพื่อชั่งเยื่อหลังระเบิดและสกัดด้วยน้ำร้อนมา 50 กรัมน้ำหนักแห้ง ทำการแปรผันเปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ (น้ำหนักด่างต่อปริมาตรสารละลายด่าง) อุณหภูมิและเวลาการสกัด ดังตารางที่ 9 ทำการทดลองสภาวะละ 3 ซ้ำ สัดส่วนเยื่อต่อน้ำด่างเท่ากับ 1:8 (กรัมเยื่อต่อมิลลิลิตรน้ำด่าง)

ในการสกัดด่าง ใส่ในบีกเกอร์ คนโดยใช้แท่งแก้วเป็นครั้งคราว ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บส่วนที่เป็นเส้นใยไว้ ล้างด้วยน้ำประปาจนน้ำที่ผ่านออกมาใสไม่มีสี และจนกว่าน้ำที่ผ่านออกมาจะมีค่า pH เป็นกลาง วัดโดยใช้กระดาษยูนิเวอร์แซลจุ่ม เทียบสี จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนสะเด็ดน้ำ รวบรวมใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงด้วยยางรัดให้แน่นแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ โดยจะทำการตากแห้ง บดและร่อนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ TAPPI จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองตามวิธีกทะกุจิ เพื่อสรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการสกัดด้วยด่างในชีวมวลแต่ละชนิด เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงทำการทดลองซ้ำภายใต้สภาวะดังกล่าว เพื่อยืนยันผลการทดลอง และประมาณค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของไม้ เพื่อศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีดังกล่าว

3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการย่อยและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

-การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90

เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ YPD ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เปปโตน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ประมาณ 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่

ปริมาตร 270 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักไปใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป

-การย่อย และการหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

ทำการผลิตเอทานอลและน้ำตาล ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้เยื่อที่ผ่านพรีทรีตเมนต์ (pretreatment) และกำจัดลิกนินในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นของเยื่อที่ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเติมเปปโตน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร แทนการใช้อาหาร YPD และทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ทางการค้า ประกอบด้วย Celluclast 1.5L ความเข้มข้น 15 FPU ต่อกรัมเยื่อ และ Novozym 188 ความเข้มข้น 15 IU ต่อกรัมเยื่อ ใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรยีสต์ต่อปริมาตรน้ำหนัก) ภายใต้สภาวะการหมักที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่า ศึกษาการหมักที่อุณหภูมิ 30 , 35, 40 และ45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักครั้งละ 4 มิลลิลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ กลูโคส และเอทานอล

3.7 วิเคราะห์ผลการทดลอง

3.7.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของชีวมวล ซึ่งประกอบด้วย

- การสุ่มและการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ตามมาตรฐาน TAPPI T257 cm-85 และมาตรฐาน TAPPI T264 om-88

- ปริมาณสารแทรก ตามมาตรฐาน TAPPI T264 om-88 และมาตรฐาน TAPPI T264 cm-97

- ปริมาณลิกนิน วิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน TAPPI T222 om-98

- ปริมาณโฮโลเซลลูโลส วิเคราะห์โดยวิธีของ Browing in method of wood chemistry (1967)

- ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส วิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน TAPPI T203 om-88

- ปริมาณเพนโตแซน วิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน TAPPI T223 cm-84

- ปริมาณเถ้า วิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน TAPPI T211 om-93

- ปริมาณเฟอร์ฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล วิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

3.7.2 การวิเคราะห์กระบวนการหมักแบบแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

- การหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (สาโรจน์ และคณะ, 2544)

- การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและเอทานอลด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

3.7.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

- โปรแกรม SAS

- Taguchi method