ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตไบโอเอทานอลจากลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านพรีทรีตเมนต์โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

Bioethanol Production from Oil Palm Trunk Pretreated by Steam Explosion

นามผู้วิจัย นายเกียรติพงษ์ สงพรหม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก _____

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม _____

(รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, Dr.rer.nat)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม _____

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิคม แหลมสัก, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา _____

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

_____

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตไบโอเอทานอลจากลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านพรีทรีตเมนต์ โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

Bioethanol Production from Oil Palm Trunk Pratreated by Steam Explosion

โดย

นายเกียรติพงษ์ สงพรหม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เกียรติพงษ์ สงพรหม 2554: การผลิตไบโอเอทานอลจากลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านพรีทรีตเมนต์โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์, Ph.D. 142 หน้า

ลำต้นปาล์มน้ำมันเป็นอีกหนึ่งวัตถุดิบทางเลือกชนิดหนึ่งสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล เนื่องจากโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส พรีทรีตเมนต์จึงจำเป็นต่อการเพิ่มอัตราไฮโดรลิซิสของเอนไซม์ ชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันถูกระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 200 และ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4 และ 6 นาที จากนั้นล้างเยื่อด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนออก จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่ดีที่สุด คือการระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที (ค่าความรุนแรง = 3.84) ปริมาณเซลลูโลส, เพนโตแซน และลิกนิน เท่ากับ 58.8, 4.03 และ 27.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณเพนโตแซนลดลง 86.35 เปอร์เซ็นต์ จากชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน วิธีทะกุจิ 3 ปัจจัย 3 ระดับ ใช้ศึกษาสภาวะที่ดีที่สุดในการกำจัดลิกนินด้วยวิธีสกัดด้วยด่าง โดยปัจจัยที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร), อุณหภูมิ (70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส) และเวลา (30, 60 และ 90 นาที) สภาวะที่ดีที่สุดของการสกัดด้วยด่าง คือ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และเวลา 60 นาที ปริมาณเซลลูโลส, เพนโตแซน และลิกนิน เท่ากับ 87.14, 1.40 และ 6.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 53.14 เปอร์เซ็นต์จากชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านพรีทรีตเมนต์ ในขณะที่ปริมาณเพนโตแซน และลิกนินลดลง 95.26 และ 71.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) ใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านพรีทรีตเมนต์เป็นซับสเตรต ยีสต์สกัด เพปโตน และเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 เติมพร้อมกับเอนไซม์ Celluclast 1.5L (15 FPU ต่อกรัมซับสเตรต), Novozym 188 (15 IU ต่อกรัมซับสเตรต) และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 ในปริมาตรทั้งหมด 300 มิลลิลิตร การหมักแบบ SSF ทดลองที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ความเข้มข้นเอทานอลระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจะให้ความเข้มข้นเอทานอล (C_P) สูงที่สุด 44.25 กรัมต่อลิตร, อัตราการผลิตเอทานอล (Q_P) 0.45 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง, ผลได้เอทานอล ($Y_{P/S}$) 0.46 กรัม เอทานอลต่อกรัมกลูโคส และผลได้ของเอทานอลเทียบกับทางทฤษฎี 90.40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การหมักแบบการพรีไฮโดรลิซิสและการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Prehydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation, PSSF) ได้ให้ความเข้มข้นเอทานอล 31.22 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเอทานอลเทียบกับทางทฤษฎี 63.29 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการหมักแบบ PSSF ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล การระเบิดด้วยไอน้ำ และการสกัดด้วยด่างเพิ่ม ทำให้การไฮโดรลิซิสชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอนไซม์ดีขึ้น การหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงถึงความเป็นไปได้ของกระบวนการผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kiettipong Songprom 2011: Bioethanol Production from Oil Palm Trunk Pretreated by Steam Explosion. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Pramuk Parakulsuksatid, Ph.D. 142 pages.

Oil palm trunk is an alternative raw material for bioethanol production. Due to its structure from lingocellulosic materials, pretreatment is required to improve the rate of enzymatic hydrolysis. The oil palm trunk chips were steam exploded at temperature 200 and 210°C for 2, 4 and 6 min. The steam exploded fiber was washed by hot water at temperature 80°C for 30 min to eliminate contaminants. The optimum condition of steam explosion was 210°C for 4 min (severity factor = 3.84). The cellulose, pentosan and lignin contents were 58.83, 4.03 and 27.12 %, respectively. The pentosan content was decreased 86.35 % from the chips. Taguchi method with 3 factors with 3 levels was used to optimize the delignification by alkaline extraction. The factors of NaOH concentration (15, 20 and 25 % w/v), temperature (70, 80 and 90°C) and time (30, 60 and 90 min) were studied. The optimum condition of the alkaline extraction was 15 % w/v NaOH, temperature at 90°C and 60 min. The content of cellulose, pentosans and lignin were 87.14, 1.40 and 6.13 %, respectively. The cellulose content was increased 53.14 % from untreated oil palm trunk chips, while the pentosan and lignin contents were decreased 95.26 and 71.67 %, respectively. A simultaneous saccharification and fermentation (SSF) was used to produce ethanol by using pretreated oil palm trunk fiber as substrate. Yeast extract, peptone and 10 % w/v fibers in citrate buffer pH 4.8 solution was added with Celluclast 1.5L (15 FPU/g substrate), Novozym 188 (15 IU/g substrate) and *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 in a total volume of 300 mL. The SSF was run at temperature of 40, 45 and 50°C for 96 h. Ethanol concentrations between SSF at 40°C and 45°C were not statistically different ($p \geq 0.05$). The highest ethanol concentration (C_P) of 44.25 g/L, ethanol productivity (Q_P) 0.45 g/L h, ethanol yield ($Y_{P/S}$) 0.46 g/g and theoretical ethanol yield 90.40 % were achieved after fermentation at 40°C. In addition, the prehydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation (PSSF) gave the ethanol concentration 31.22 g/L and theoretical ethanol yield 63.29 %. It was revealed that PSSF did not enhance the efficiency of bioethanol production. Steam explosion and alkaline extraction to enhanced enzymatic hydrolysis of oil palm trunk chips. SSF at 40°C showed the potential process to produce ethanol from oil palm trunk fiber.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิคม แหลมสัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา ประธานการสอบ ที่ได้กรุณาสละเวลาให้โอกาสและแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย และการศึกษาในระดับปริญญาโท ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยทุนสนับสนุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม (ฝ่าย 5) ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ และน้องชาย รวมถึงญาติพี่น้องทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา และขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับความช่วยเหลือ คำปรึกษา กำลังใจ และมิตรภาพที่ดีในการศึกษาระดับปริญญาโท รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ที่อำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา อีกทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวนผลิตภัณฑ์ คณะวนศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ในการเตรียมตัวอย่างลำต้นปาล์มน้ำมันจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้งเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีเยื่อและกระดาษ ฝ่ายเทคโนโลยีชีวมวลและพลังงานชีวภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ คณาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอน และให้ความรู้มาจนถึงปัจจุบัน

เกียรติพงษ์ สงพรหม

กันยายน 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	39
อุปกรณ์	39
วิธีการ	42
ผลและวิจารณ์	52
สรุปและข้อเสนอแนะ	82
สรุป	82
ข้อเสนอแนะ	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	85
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	99
ภาคผนวก ข การคำนวณค่าพารามิเตอร์	124
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	131
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	142

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมัน	7
2	ส่วนประกอบของเฮเมิเซลลูโลส	12
3	สรุปเทคโนโลยีการพรีทรีตเมนต์บางวิธีและผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางกายภาพของชีวมวลลิกโนเซลลูโลส	24
4	เปรียบเทียบผลได้เอทานอลกับปริมาณ WIS โดยใช้ *S. cerevisiae* ในการหมักแบบ SSF	33
5	จำนวนการทดลองโดยวิธีทะกุจิและแฟคทอเรียลในสภาวะการทดลองต่าง ๆ	38
6	สภาวะที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำของชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน	45
7	ปัจจัยและระดับในการหาสภาวะการสกัดด้วยด่าง	47
8	L_9 (3^3) Orthogonal Array	48
9	ปัจจัยและระดับในการทดลองการหาสภาวะการสกัดด้วยด่างของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยน้ำร้อน ออกแบบด้วยวิธีทะกุจิ	48
10	องค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมัน	52
11	องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำ	53
12	ปริมาณเฟอร์ฟูรอลและ5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอลในน้ำหลังการสกัดด้วยน้ำร้อน	54
13	องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการสกัดด้วยน้ำร้อน	55
14	ค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยด่าง ณ สภาวะที่แตกต่างกัน	57
15	อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อสัดส่วนเซลลูโลสของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยด่าง	58
16	อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อสัดส่วนลิกนินของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยด่าง	58
17	อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อสัดส่วนเพนโตแซนของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยด่าง	59
18	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน	59

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

19	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการลดสัดส่วนลิกนินของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน	60
20	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการลดสัดส่วนเพนโตแซนของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน	61
21	สรุปค่าสัดส่วน S/N ของค่าสัดส่วนเซลลูโลส ลิกนิน และเพนโตแซน จากการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการสกัดด้วยด่าง	63
22	สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่างของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันคำนวณโดยวิธีทะกุจิ	66
23	องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันจากการทดลองยืนยันผลของชุดการทดลอง A และ B โดยวิธีทะกุจิ	67
24	ค่าสัดส่วนเซลลูโลสและลิกนินที่ได้จากการเปรียบเทียบการประมาณค่าและจากการยืนยันผลการทดลองของการสกัดด่างด้วยสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทะกุจิ	67
25	สรุปค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นและเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการพรีทรีตเมนต์ในสภาวะที่เหมาะสม	69
26	ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ด้วยการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และการหมักแบบ PSSF เมื่อสิ้นสุดการหมัก	80

ตารางผนวกที่

ก1	การเตรียมสารมาตรฐานกลูโคสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส	113
ก2	การเตรียมสารมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอล	115
ก3	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส, เซลโลไบโอส และ ไซโลส	119
ก4	การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล	122
ค1	การย่อยเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร	137

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค2 การผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปริมาณเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 138

ค3 การผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกันที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และปริมาณเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 139

ค4 การผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และปริมาณเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 140

ค5 การผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนพรีไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนการย่อยและหมักพร้อมกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 141

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส	9
2	โครงสร้างของเซลลูโลส	10
3	โครงสร้าง ของ 4-*O*-methylglucuronoxylan ในไม้ใบกว้าง	11
4	หน่วยซ้ำของ arabino-4-*O*-methylglucurono-xylan ในไม้ใบแคบ	11
5	โครงสร้างของลิกนิน	13
6	การพรีทรีตเมนต์ลิกโนเซลลูโลส	14
7	ขั้นตอนการสลายตัวของเซลลูโลสระหว่างพรีทรีตเมนต์	20
8	โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสและจุดเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส, เซลโลไบโอไฮโดรเลส และบีตากลูโคซิเดส	28
9	การผลิตเอทานอลโดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas	29
10	เมแทบอลิซึมแบบใช้อากาศของยีสต์	30
11	ความต้องการของพลังงานในการกลั่นจากเอทานอลเจือจางเป็นเอทานอลเข้มข้น 94.5 เปอร์เซ็นต์ (w/w)	35
12	ขั้นตอนการทดลองการผลิตไบโอเอทานอลจากชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน	42
13	ชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน	43
14	เครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ	44
15	เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำ	45
16	เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการสกัดด้วยน้ำร้อน	46
17	เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการสกัดด่าง	49
18	ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน	64
19	ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการลดสัดส่วนลิกนินของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน	64
20	ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการลดสัดส่วนเพนโตแซน ของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน	65

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ผลได้เยื่อ และองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นและเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการพรีทรีตเมนต์ขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำ, สกัดด้วยน้ำร้อน และสกัดด้วยด่าง	68
22	ความเข้มข้นของกลูโคส, เซลโลไบโอส และไซโลส ระหว่างการใช้เอนไซม์ไฮโดรลิซิสเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง ที่พีเอช 4.8, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	71
23	เปอร์เซ็นต์ Digestibility ระหว่างการใช้เอนไซม์ไฮโดรลิซิสเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่พีเอช 4.8, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	72
24	ความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8, เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	74
25	ความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสโดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8, อุณหภูมิ เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	75
26	ความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8, เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	76

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

27 เปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอลและกลูโคส ระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8 เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง 77

28 ความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักแบบ PSSF ที่อุณหภูมิของการย่อย 50 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของการหมัก 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8, เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง 79

ภาพผนวกที่

ก1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสในการวิเคราะห์เพนโตแซน 110

ก2 กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ 114

ก3 กราฟมาตรฐานพาราไนโตรกลูโคพาราโนไซด์ 116

ก4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต 118

ก5 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส 120

ก6 กราฟมาตรฐานสารละลายเซลโลไบโอส 120

ก7 กราฟมาตรฐานสารละลายไซโลส 121

ก8 กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอล 123

ข1 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 128

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ค1	output ANOVA ของเซลลูโลสเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน โดย SAS	132
ค2	output ANOVA ของเพนโตแซนเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน โดย SAS	133
ค3	output ANOVA ของลิกนินเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน โดย SAS	135

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

S/N ratio	อัตราส่วนหรือค่าที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของค่าตอบสนอง
dB	หน่วยของ S/N ratio (เดซิเบล)
d.f.	องศาความอิสระ
ANOVA	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance)
L	จำนวนระดับของปัจจัย
N	จำนวนการทดลอง
r	จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง
y	ผลการทดลอง
*p*NPG	พาราไนโตรฟีนีล บีตา-ดี-กลูโคพาราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside)
FPU/ml	The filter paper units per milliliter
IU/ml	International units per milliliter

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตไบโอเอทานอลจากลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านพรีทรีตเมนต์โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

Bioethanol Production from Oil Palm Trunk Pretreated by Steam Explosion

คำนำ

ในภาวะเชื้อเพลิงฟอสซิลที่กำลังจะหมดไปจากโลกทำให้เกิดการค้นหาพลังงานทดแทนใหม่ ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของมนุษย์ ปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตปาล์มน้ำมันอีกทั้งรัฐบาลได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรทางภาคใต้และภาคตะวันออกปลูกพืชปาล์มน้ำมันเป็นจำนวนมาก เพื่อนำผลผลิตน้ำมันปาล์มไปผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นพื้นที่การเพาะปลูกปาล์มน้ำมันจึงเพิ่มขึ้น

จากข้อมูลพื้นที่การปลูกปาล์มน้ำมันที่ให้ผลในปี 2554 จากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่การปลูกปาล์มประมาณ 3.8 ล้านไร่ ซึ่งส่วนมากเป็นจังหวัดทางภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเกษตรกรนิยมปลูกระยะห่าง 9×9×9 เมตร ซึ่งคิดเป็นจำนวนต้นปาล์มได้ประมาณ 22 ต้นต่อไร่ ปกติต้นปาล์มน้ำมันให้ผลที่สามารถนำไปสกัดน้ำมันในช่วงอายุประมาณ 3 ปี ถึง 25 ปี จึงถูกตัดทิ้ง ส่วนทางใบปาล์มจะถูกตัดแต่งเดือนละ 1 ครั้ง เนื่องจากต้นและทางใบปาล์มน้ำมันมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน สะสมอยู่ในปริมาณมาก จึงนับได้ว่าต้นปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งชีวมวลแหล่งใหญ่อีกแหล่งหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งไม่ได้แข่งขันกับแหล่งอาหาร

เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้เป็นเชื้อเพลิงในการผสมกับน้ำมันเบนซิน เป็นแก๊สโซฮอล์ โดยรัฐบาลไทยมีนโยบายสนันสนุนการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์เพื่อลดปริมาณการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง กากน้ำตาล และอ้อยเป็นหลัก แต่วัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบก็สามารถผลิตเอทานอลได้ จะต้องผ่านพรีทรีตเมนต์ โดยใช้วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) และการสกัดด้วยด่าง (alkaline extraction) เพื่อเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีให้มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทำให้ได้กลูโคสที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นกระบวนการที่ใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูงโดยไม่มีการเติมสารเคมีใด ๆ อุณหภูมิระหว่าง 180-230 องศาเซลเซียส และระยะเวลาหลายนาที เมื่อไอน้ำถูกปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการระเบิดของโครงสร้างเยื่อ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสลดลง องค์ประกอบที่เหลืออยู่ในเยื่อภายหลังการระเบิดด้วยไอน้ำคือ เซลูโลสและลิกนิน ซึ่งนำไปแยกเอาลิกนินโดยพรีทรีตเมนต์ด้วยด่างเพื่อกำจัดลิกนินออกจากเซลลูโลสทำให้ได้เยื่อที่มีเซลลูโลสสูง ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสต่ำ ทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น

การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกัน (Simutaneous saccharification and fermentation, SSF) โดยใช้เยื่อปาล์มน้ำมันที่ผ่านพรีทรีตเมนต์ที่มีเซลลูโลสสูงไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส (ß-glucosidase) ใช้ยีสต์ *Saccharomyces serevisiae* ทำการหมักพร้อมกัน โดยเมื่อเอนไซม์ทำการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสแล้ว ยีสต์จะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งการผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ช่วยให้เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งโดยกลูโคสและเซลโลไบโอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เอนไซม์สร้างขึ้น และหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์และยีสต์เพื่อให้การทำงานมีความสัมพันธ์กันมากที่สุดจึงจะทำให้การผลิตเอทานอลได้ประสิทธิภาพสูงสุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ลำต้นปาล์มน้ำมันโดยการระเบิดด้วยไอน้ำ

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ลำต้นปาล์มน้ำมันโดยวิธีการสกัดด้วยด่าง

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักพร้อมกันด้วยเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมัน

1. ความรู้โดยทั่วไปเกี่ยวกับปาล์มน้ำมัน

1.1 พันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (oil palm) เป็นพืชที่มีแหล่งกำเนิดในทวีปแอฟริกา อยู่ในตระกูล Palmae ชื่อพฤกษศาสตร์ *Elaeis guineensis* Jacq. แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

E. guineensis เป็นปาล์มน้ำมันชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกา บริเวณตอนกลางและตะวันตกของทวีป สายพันธุ์ปาล์มชนิดนี้สามารถจำแนกออกได้ 3 แบบ คือ ดูรา เทเนอร่า และพิสิเฟอร่า

E. oleifera (เดิมคือ *E. melanococca* หรือ *Corozo oleifera*) พันธุ์ปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางภาคเหนือของลุ่มน้ำอะเมซอน ของทวีปอเมริกาใต้ถึงทวีปอเมริกากลาง ไม่นิยมปลูกเป็นการค้าเนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้า ผลขนาดเล็กและให้ผลผลิตน้ำมันต่ำ

E. odora (เดิมคือ *Barcella odora*) ปาล์มน้ำมันพวกนี้พบบริเวณเดียวกับ *E. oleifera* คือ บริเวณลุ่มน้ำอะเมซอน (เอกชัย, 2548)

1.2 นิเวศวิทยาของปาล์มน้ำมัน

พรชัย (2549) กล่าวว่าสภาพแวดล้อมทางภูมิอากาศมีผลต่อการเจริญเติบโตของปาล์มน้ำมันเป็นอย่างมาก ซึ่งปาล์มน้ำมันที่ปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันจะมีการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตที่แตกต่างกัน โดยปาล์มน้ำมันจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพพื้นที่ที่มีปริมาณฝนตกกระจายประมาณ 1,800-2,000 มิลลิเมตร/ปี แสงแดดอย่างน้อยวันละ 5 ชั่วโมง อุณหภูมิเฉลี่ย 29-32 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 75

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 การปลูกปาล์มน้ำมัน

เกษตรกรนิยมปลูกระยะห่าง 9×9×9 เมตร ซึ่งคิดเป็นจำนวนต้นได้ประมาณ 22 ต้นต่อไร่ ปกติต้นปาล์มน้ำมันใช้ระยะเวลาการเติบโตประมาณ 3 ปี จึงให้ทะลายปาล์มที่สามารถนำผลไปสกัดเอาน้ำมันปาล์มออกจากผลและเมื่อต้นปาล์มน้ำมันมีอายุ 25 ปี จะต้องทำการตัดฟันทิ้ง เนื่องจากต้นปาล์มที่มีอายุมากกว่า 20 ปี จะให้ผลผลิตน้อย (พิชญา, 2549)

จากการที่รัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันเพื่อใช้ผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล โดยส่งเสริมให้มีการขยายพื้นที่ปลูกในพื้นที่ที่มีศักยภาพ 1.5 ล้านไร่ (ในช่วงปี 2549-2552) รวมทั้งมีการส่งเสริมให้มีการปลูกปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีทดแทนสวนปาล์มน้ำมันเก่า 5 แสนไร่ ปลูกทดแทนสวนไม้ผลเก่า เช่น ทุเรียน เงาะ และปลูกในพื้นที่รกร้างว่างเปล่า ดังนั้นเกษตรกรจึงมีการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันในพื้นที่ต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดในภาคใต้ที่มีความเหมาะสมต่อการปลูกปาล์มน้ำมัน ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร ตรัง สตูล พังงา และนครศรีธรรมราช เมื่อมองในภาพรวมมีการขยายพื้นที่เพาะปลูกเพิ่มมากขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

การผลิตในปี 2551 คาดว่ามีพื้นที่ให้ผล 2.9 ล้านไร่ เพิ่มขึ้นจากปี 2550 ประมาณ 0.24 ล้านไร่ หรือร้อยละ 8.88 ส่วน ผลผลิต 7.87 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมาประมาณ 1.48 ล้านตัน หรือร้อยละ 23.20 และผลผลิตต่อไร่ 2,715 กิโลกรัม เพิ่มขึ้นจากปี 2550 ประมาณ 316 กิโลกรัม หรือร้อยละ 13.17 สาเหตุเพิ่มขึ้นของปาล์มน้ำมัน เนื่องจากความต้องการทางด้านบริโภค และอุปโภค รวมทั้งการนำไปผลิตไบโอดีเซลเพื่อทดแทนพลังงาน จึงส่งผลให้เนื้อที่และการผลิตเพิ่มขึ้น (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2551)

เมื่อพิจารณาการแยกตามช่วงอายุของการปลูกปาล์มน้ำมันในปี 2549 พบว่ารวมทั้งประเทศ ช่วงก่อนให้ผล (อายุ 1-3 ปี) มีเนื้อที่ยืนต้น 575,571 ไร่ ช่วงให้ผล (อายุ 4-24 ปี) มีเนื้อที่ยืนต้น 2,144,328 ไร่ ผลผลิต 6,191,012 ตัน และผลผลิตต่อเนื้อที่ให้ผลไร่ละ 2,887 กิโลกรัม และช่วงอายุขัย (อายุ$\geq$ 25 ปี) มีเนื้อที่ยืนต้น 229,874 ไร่ ผลผลิต 524,024 ตัน และผลผลิตต่อเนื้อที่ให้ผลไร่ละ 2,280 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 การใช้ประโยชน์จากผลผลิตปาล์มน้ำมัน (พรชัย, 2549)

ผลผลิตหลักที่ได้จากปาล์มน้ำมันก็คือน้ำมันสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในชีวิตประจำวันของมนุษย์ทั้งบริโภคและอุปโภคกว่า 2,300 ชนิด น้ำมันที่ได้จากผลปาล์มน้ำมันจัดเป็นน้ำมันที่มีคุณสมบัติทางเคมีดีที่สุดประเภทหนึ่ง นอกจากนี้แล้วผลพลอยได้จากปาล์มน้ำมันยังมีอีกมากมาย ได้แก่

1.4.1 ทะลายปาล์มน้ำมัน เป็นส่วนเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในโรงงาน ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารและกากใยเป็นจำนวนมาก จึงใช้กลับคืนสู่สวนปาล์มน้ำมันเพื่อคลุมโคนต้น เพาะเห็ด เป็นต้น

1.4.2 กากใยจากส่วนเปลือก เป็นส่วนของเปลือกที่เหลือจากขั้นตอนการสกัดน้ำมัน ส่วนนี้สามารถนำไปทำปุ๋ยอินทรีย์ เฟอร์นิเจอร์ และใช้เป็นเชื้อเพลิงของโรงงานในหม้อไอ-น้ำ

1.4.3 กะลาปาล์มน้ำมัน ที่เหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม กะลาปาล์มน้ำมันสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงของหม้อไอน้ำในโรงงาน อาจนำไปทำถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และวงการแพทย์

1.4.4 ทางใบปาล์มน้ำมัน สามารถนำไปทำปุ๋ย ใช้คลุมหน้าดินเพื่อเพิ่มความชื้น หรืออาจนำส่วนของทางใบไปทำเฟอร์นิเจอร์

1.4.5 ต้นปาล์มน้ำมันเก่า นำไปทำเชื้อเพลิงซึ่งมีชีวมวล (biomass) สูงมาก

2. วัตถุดิบลำต้นปาล์มน้ำมัน

กิตติพงศ์ (2543) กล่าวว่าในรอบปีหนึ่ง ๆ มีเศษเหลือชีวมวลจากปาล์มน้ำมัน (คิดเป็นน้ำหนักแห้ง) ที่ได้จากกระบวนการทางการเกษตรของเกษตรกร เช่น ทางใบ, ลำต้น และทะลายผลเปล่า เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีถึง 20.5 ตันต่อเฮกเตอร์ ซึ่งปาล์มน้ำมันนั้นเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทางกายภาพ Hartley (1988) กล่าวว่า ลำต้นจะมีการเจริญเติบโตในช่วงต้นเป็นไปอย่างช้า ๆ ลำต้นจะพัฒนาการเจริญเติบโตออกทางด้านข้างก่อนแล้วจึงมีการยืดตัวขึ้นทางส่วนสูง เมื่อลำต้นเริ่มยืดตัวทางด้านสูงฐานของใบก็จะถูกสร้างขึ้น ซึ่งส่วนของลำต้นประกอบไปด้วยส่วนของใบและปล้อง ส่วนของข้อจะปรากฏให้เห็นภายนอกก็ต่อเมื่อใบหลุดร่วง ในส่วนของฐานใบจะติดอยู่กับลำต้นเป็นเวลาอย่างน้อง 12 ปี ส่วนในเรื่องของอัตราการขยายตัวของลำต้นค่อนข้างจะผันแปรซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และทางพันธุกรรม

พรชัย (2549) กล่าวว่าปาล์มน้ำมันมีขนาดลำต้นเมื่อโตเต็มที่จะมีขนาดต้นประมาณ 40-60 เซนติเมตร ต้นปาล์มน้ำมันไม่มีเนื้อเยื่อเจริญด้านข้าง (lateral meristematic tissue) โดยจะมีเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญที่ยอด (apical meristematic tissue) อัตราการเจริญเฉลี่ย 35-75 เซนติเมตร/ปี ความสูงของปาล์มน้ำมันนั้นจะสูงประมาณ 20-30 เมตร แต่ในการเพาะปลูกเพื่อเป็นการค้าจะปลูกปาล์มน้ำมันไว้ให้มีความสูงไม่ควรเกิน 15-18 เมตร เพราะการเก็บเกี่ยวยุ่งยาก

สมบัติทางกายภาพ Killmann and Lim (1985) ได้รายงานเกี่ยวกับความชื้นที่พบอยู่ในลำต้น โดยจากรายงานระบุว่ามีประมาณ 100-500% ความชื้นจะค่อย ๆ เพิ่มสูงชื้นตามความสูงที่เพิ่มขึ้นของลำต้น และจะพบมากในบริเวณแกนกลางของลำต้น

สมบัติทางเคมี Khozirah *et al.* (1991) อธิบาย ส่วนลำต้นของปาล์มน้ำมันจะมีปริมาณลิกนินและโฮโลเซลลูโลส น้อยอย่างเห็นได้ชัด แต่มีสารแทรกในปริมาณสูง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมัน

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ (น้ำหนักแห้ง)
สารแทรกที่ละลายในเอทานอล-เบนซีน	9.8
โฮโลเซลลูโลส	45.7
แอลฟาแซลลูโลส	29.2
ลิกนิน	18.8
เพนโตแซน	18.8
เถ้า	2.3

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mohamad *et al.* (1985)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

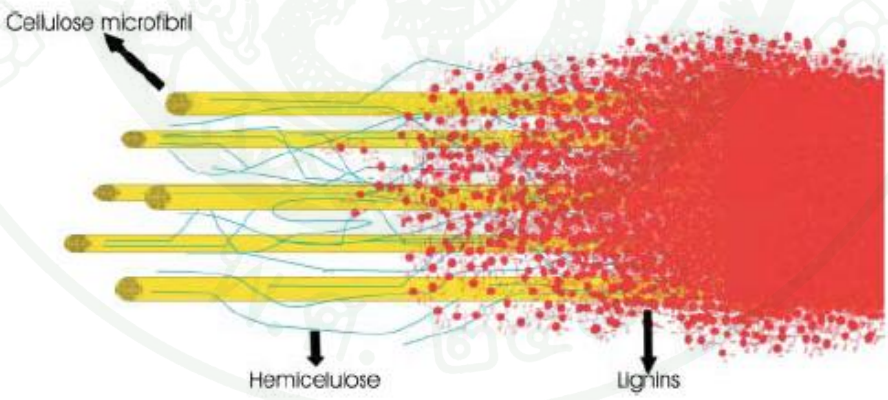
Halimahton and Abdul (1990) ได้ให้ข้อสังเกตุไว้ว่า ลิกนินนั้นจะมีการกระจายตัวอยู่ตลอดลำต้น และจะมีปริมาณน้อยลงเมื่ออยู่ในส่วนที่สูงขึ้นไปปลายยอดของลำต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

องค์ประกอบทางเคมีของไม้

ชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (ลำต้นข้าวโพด และฟางข้าวสาลี), ไม้และพืชพลังงาน เป็นวัสดุที่มีความน่าสนใจสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล และมีอยู่มากมายบนโลก ชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสสามารถผลิตไบโอเอทานอลได้ถึง 442 ล้านลิตรต่อปี ดังนั้นศักยภาพในการผลิตไบโอเอทานอลจากเศษเหลือและของเสียจากการเพาะปลูกจึงสูงกว่าการผลิตไบโอเอทานอลในปัจจุบันถึง 16 เท่า (Balat *et al*., 2008)

ลิกโนเซลลูโลสโดยทั่วไปประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ลักษณะโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสถูกสร้างให้ยึดเกาะกันรอบมัดเซลลูโลส (cellulose microfibril) ทำให้มีความแข็งแรงและต้านทานต่อแรงดึง (tensile strength) ผนังเซลล์ของมัดเซลลูโลสจะถูกห่อหุ้มด้วยเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้มัดเซลลูโลสมีความแข็งแรงมากขึ้น โดยเฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เป็นโมเลกุลเชื่อมโยงข้าม (cross-linked) ทำให้แต่ละมัดของเซลลูโลสอยู่ห่างกัน ป้องกันการสัมผัสกันโดยตรง ทำให้มีความยืดหยุ่น และพอลิแซ็กคาไรด์จะถูกผนึกด้วยลิกนินที่เป็นวัสดุประสานยึดเกาะ (polymeric matrix) ทำให้ลิกโนเซลลูโลสกันน้ำและสารเคมี (Gomez *et al*., 2008) ดังภาพที่ 1



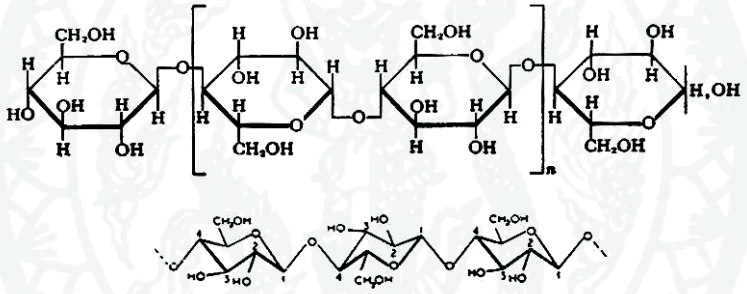
ภาพที่ 1 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: Gomez *et al*. (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. เซลลูโลส (Cellulose)

เส้นใยเซลลูโลสเป็นส่วนที่ให้ความแข็งแรงแก่ไม้และมีประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ (Mohan *et al*., 2006) เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิแซคคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยของ บีตา-ดี-กลูโคไพราโนส (ß-D-glucopyranose) ต่อกันด้วยพันธะ (1—›4) ไกลโคซิดิก (ภาพที่ 2) โมเลกุลของเซลลูโลสต่อกันเป็นสายยาวแต่ละสายของเซลลูโลสเรียงขนานกัน มัดของเซลลูโลสรวมตัวกันในรูปของไมโครไฟบริลซึ่งมีทั้งบริเวณที่เรียงตัวแบบผลึก (crystalline) และเรียงตัวแบบอสัณฐาน (amorphous) เซลลูโลสมีโครงสร้างที่เหนียวและแข็งแรงด้วยพันธะไฮโดรเจนจึงทำให้มีความยืดหยุ่นสูงและไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ (Sjostrom, 1993) กลูโคส 5000-1000 หน่วยรวมกันเป็นเซลลูโลสสายยาว หน่วยของเซลลูโลสพอลิเมอร์ประกอบด้วยกลูโคส 2 หน่วย เรียกว่าเซลโลไบโอส (Mohan *et al*., 2006)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา: Wilfred (1965)

วรณี และวิชัย (2546) กล่าวว่าเซลลูโลสสามารถแบ่งได้ตามการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้ 3 ชนิด

แอลฟา-เซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์

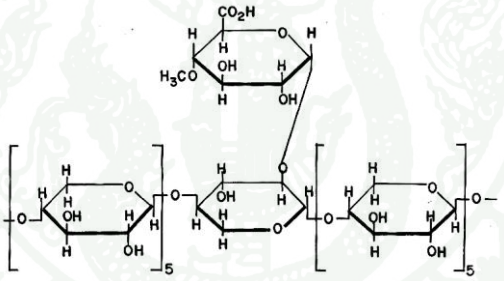
บีตา- เซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แกมม่า-เซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายกรด แต่สามารถตกตะกอนได้ด้วยแอลกอฮอล์

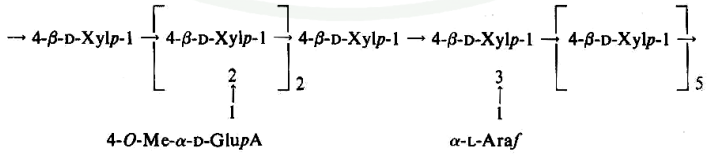
2. เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสมีอยู่ประมาณ 25-35 เปอร์เซ็นต์ในไม้ ไม้ใบแคบมีเฮมิเซลลูโลส 28 เปอร์เซ็นต์ และไม้ใบกว้างมี 35 เปอร์เซ็นต์ (Mohan *et al.*, 2006) เฮมิเซลลูโลสเป็นเฮเทอโรจีเนียสพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเกิดจากไบโอซินเทติกเราท์ (biosynthetic route) ที่แตกต่างจากการเกิดเซลลูโลส ถูกย่อยได้ง่ายด้วยกรด ประกอบด้วยน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์หลายชนิด เช่น D-กลูโคส, D-แมนโนส, D-กาแลกโทส, D-ไซโลส, L-อะราบิโนส และปริมาณเล็กน้อยของ L-รามโนส รวมทั้ง D-glucuronic acid, 4-0-methyl-D-glucuronic acid และ D-galacturonic acid เฮมิเซลลูโลสในไม้ทุกชนิดมี degree of polymerization ไม่เกิน 200 โครงสร้างบางส่วนของเฮมิเซลลูโลสของไม้ใบแคบ (softwoods) และไม้ใบกว้าง (hardwoods) แสดงดังภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ องค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสแสดงดังตารางที่ 2 (Sjostrom, 1993)



ภาพที่ 3 โครงสร้าง ของ 4-*O*-methylglucuronoxylan ในไม้ใบกว้าง

ที่มา: Wilfred (1965)



ภาพที่ 4 หน่วยซ้ำของ arabino-4-*O*-methylglucurono-xylan ในไม้ใบแคบ

ที่มา: Wilfred (1965)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของเฮเมิเซลลูโลส

Hemicellulose type	Occurrence	Amount (% of wood)	Composition		DP_n
			Units	Molar ratios	
Galactoglucomannan	Softwood	5-8	ß-D-Man*p*	3	100
			ß-D-Glc*p*	1	
			α-D-Gal*p*	1	
			Acetyl	1	
(Galacto)glucomannan	Softwood	10-15	ß-D-Man*p*	4	100
			ß-D-Glc*p*	1	
			α-D-Gal*p*	0.1	
			Acetyl	1	
Arabinoglucuronoxylan	Softwood	7-10	ß-D-Xyl*p*	10	100
			4-O-Me- α-D-Glc*p*A	2	
			α-L-Ara*f*	1.3	
Arabinogalactan	Larch wood	5-35	ß-D-Gal*p*	6	200
			α-L-Ara*f*	2/3	
			ß-L-Ara*p*	1/3	
			ß-D-Glc*p*	Little	
Glucuronoxylan	Hardwood	15-30	ß-D-Xyl*p*	10	200
			4-O-Me- α-D-Glc*p*A	1	
			Acetyl	7	
Glucomannan	Hardwood	2-5	ß-D-Man*p*	1-2	200
			ß-D-Glc*p*	1	

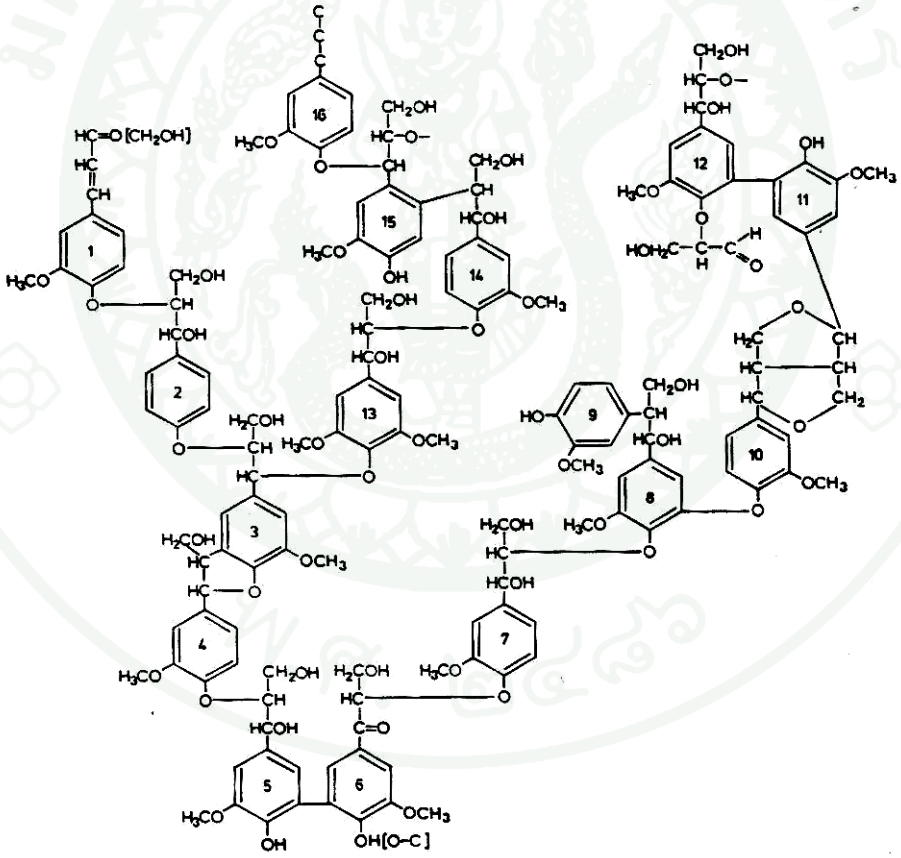
ที่มา: ดัดแปลงจาก Sjostrom (1993)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินในไม้ใบแคบมีปริมาณ 26-32 เปอร์เซ็นต์และไม้ใบกว้างมีปริมาณ 20-25 เปอร์เซ็นต์ (Sjostrom, 1993)ในพืชตระกูลหญ้ามีประมาณ 10-40 เปอร์เซ็นต์ ลิกนินมีลักษณะเป็นกิ่งแขนงมาก และเป็นอะโรมาติกพอลิเมอร์ในผนังเซลล์ของชีวมวลและเชื่อมต่อกันกับเส้นใยเซลลูโลสในรูปแบบของลิกโนเซลลูโลสเชิงซ้อน การมีลิกนินในโครงสร้างทำให้มีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงโดยจุลินทรีย์และสารเคมี (Balat *et al*., 2008)

ฟีโนลิกที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เกิดจากการขจัดน้ำของ 3 โมโนเมอริก แอลกอฮอล์ คือ coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (Kumar *et al*., 2009) แสดงดังภาพที่ 5



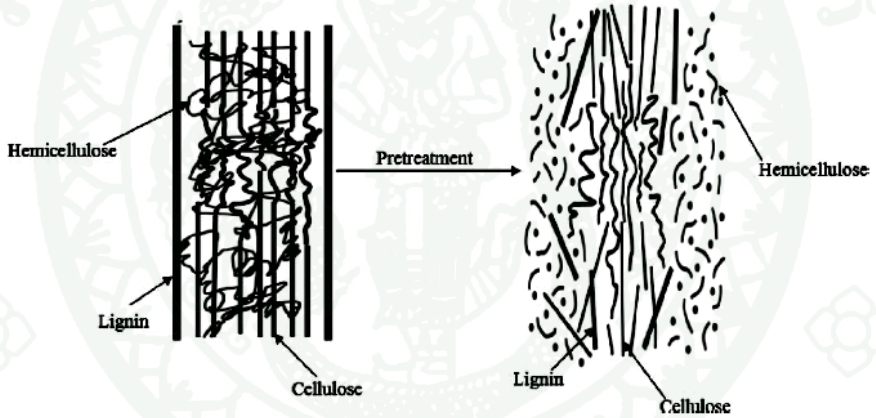
ภาพที่ 5 โครงสร้างของลิกนิน

ที่มา: Lewin and Goldstein (1991)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การพรีทรีตเมนต์

ขั้นตอนแรกของการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสเป็นไบโอเอทานอลคือการลดขนาดและการพรีทรีตเมนต์ จุดประสงค์ของเทคโนโลยีการพรีทรีตเมนต์บางประการคือเปลี่ยนแปลงหรือกำจัดโครงสร้างและองค์ประกอบที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เพื่อปรับปรุงอัตราการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์และเพิ่มผลได้ (yield) ของน้ำตาลในการหมักจากเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลส (Mosier, 2005) การพรีทรีตเมนต์นี้ทำให้ปริมาณลิกนิน, เฮมิเซลลูโลส, โครงสร้างผลึก (crystalline) ของเซลลูโลสลดลง และยังทำให้รูพรุนในวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Kumar *et al*., 2009) (ภาพที่ 6) การพรีทรีตเมนต์ที่สมบูรณ์จะทำให้เกิดผลดังนี้ 1) เพิ่มประสิทธิภาพการเกิดน้ำตาลจากการไฮโดรลิซิส 2) หลีกเลี่ยงการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต 3) หลีกเลี่ยงการเกิดตัวยับยั้งที่ส่งผลต่อกระบวนการไฮโดรลิซิสและการหมัก 4) ราคาเหมาะสม (Balat *et al*., 2008)



ภาพที่ 6 การพรีทรีตเมนต์ลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: Kumar *et al*. (2009)

วิธีการพรีทรีตเมนต์สามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ 1) กายภาพ 2) เคมี 3) เคมี-กายภาพ และ 4) ชีวภาพ (Yang and Wyman, 2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การพรีทรีตเมนต์ทางกายภาพ

1.1 การบดด้วยแรงกล (Mechanical comminution)

การบดวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยผ่านการตัด, บดหรือโม่ ถูกใช้เพื่อลดส่วนที่เป็นผลึกของเซลลูโลส หลังจากการตัดวัสดุมีขนาด 10-30 มิลลิเมตร และหลังจากการบดหรือโม่มีจะขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร (Sun and Cheng, 2002) เครื่องบดแบบเขย่าให้ประสิทธิภาพในการลดโครงสร้างผลึก สูงกว่าเครื่องบดแบบธรรมดา ซึ่งช่วยปรับปรุงการไฮโดรลิซิส ขนาดของอนุภาคและลักษณะเฉพาะของชีวมวลทำให้รู้ถึงความต้องการของพลังงานที่ใช้สำหรับเครื่องมือที่ใช้บด (Mohammad and Karimi, 2008)

1.2 การแยกสลายด้วยความร้อน (Pyrolysis)

การแยกสลายด้วยความร้อนถูกใช้ในการพรีทรีตเมนต์วัสดุลิกโนเซลลูโลส เซลลูโลสจะเกิดการสลายตัวเป็นก๊าซและถ่านอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส (Shafizadeh and Bradbury, 1979) แต่ที่อุณหภูมิต่ำการสลายตัวช้ามาก ผลิตภัณฑ์เปลี่ยนรูปเป็นสารระเหยได้น้อย Fan *et al.* (1987) กล่าวว่าเมื่อใช้กรดไฮโดรลิซิสด้วยสภาวะไม่รุนแรงหลังจากการพรีทรีตเมนต์โดยการไพโรไลซิสพบว่าเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 80-85 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนนั้นเป็นกลูโคสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

1.3 การฉายรังสี (Irradiation)

รังสีเช่น รังสีแกมมา, ลำแสงอิเล็ตรอน และไมโครเวฟ สามารถปรับปรุงการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ของลิกโนเซลลูโลสได้ เมื่อใช้การฉายรังสีและวิธีอื่นรวมกัน เช่นการพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น (Mamar and Hadjadj, 1990) การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีนี้ทำให้พันธะกลูโคไซด์ในสายเซลลูโลสเกิดการแตกออกแต่ไม่มีผลกับลิกนิน (Kumakura and Kaetsu, 1983) อย่างไรก็ตามวิธีการฉายรังสีมีราคาแพงและประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมได้ยาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การพรีทรีตเมนต์ทางเคมี

2.1 การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรด (Acid pretreatment)

การพรีทรีตลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ กรดที่นิยมใช้ได้แก่ กรดซัลฟิวริก หรือกรดอื่นๆ เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนทริก (Taherzadeh and Karimi, 2007) การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดสามารถทำได้โดยใช้อุณหภูมิสูงและความเข้มข้นกรดต่ำ (การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดเจือจาง) หรือใช้อุณหภูมิต่ำและความเข้มข้นกรดสูง (การพรีทรีตเมนต์โดยใช้กรดเข้มข้น) การพรีทรีตเมนต์โดยใช้อุณหภูมิต่ำ (40 องศาเซลเซียส) และกรดเข้มข้น (30-70 เปอร์เซ็นต์) ทำให้เกิดการกัดกร่อนและอันตรายอย่างสูง ในกระบวนการนี้จึงควรใช้โลหะชนิดพิเศษ หรืออัลลอยที่มีราคาแพง ซึ่งทำให้ให้เสียค่าซ่อมบำรุงค่อนข้างสูง กระบวนการนี้จึงมีความน่าสนใจน้อย (Sun *et al*., 2004)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดเจือจาง (dilute acid pretreatment) ใช้อุณหภูมิในช่วง 140-190 องศาเซลเซียสและความเข้มข้นกรดต่ำ (เช่น กรดซัลฟิวริก 0.1-1 เปอร์เซ็นต์) การใช้อุณหภูมิสูงส่งผลต่ออัตราปฏิกิริยาและปรับปรุงการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสได้เร็วขึ้น การใช้กรดเจือจางทำให้เฮมิเซลลูโลสทั้งหมดถูกกำจัดและเปลี่ยนรูปเป็นน้ำตาล (Gil *et al*., 2010) แม้ว่าลิกนินจะถูกกำจัดเพียงเล็กน้อย แต่กระบวนการนี้ทำให้เกิดการแตกออกของลิกนินซึ่งทำให้เอนไซม์แทรกซึมไปยังเซลลูโลสได้มากขึ้น กรดอนินทรีย์เข้มข้น (เช่น กรดซัลฟิวริก, กรดฟอสฟอริก) ถูกใช้ในกระบวนการพรีทรีตเมนต์ นอกจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสแล้วยังทำให้โครงที่เป็นผลึกของเซลลูโลสถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ (Zhang *et al*., 2007) ผลที่ตามมาทำให้เซลลูโลสที่อยู่อย่างหลวมๆ ถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของกรดในการพรีทรีตเมนต์ยังมีอุปสรรคหลายประการเช่น การกัดกร่อนของเครื่องมือ, การแยกน้ำตาลออกจากกรด, การสลายตัวของน้ำตาล และการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ (Huang *et al*., 2011)

2.2 การพรีทรีตเมนต์ด้วยด่าง (Alkaline pretreatment)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยด่างมีหลายวิธีเช่น การพรีทรีตเมนต์ด้วยแอมโมเนีย (ammonia pretreatment) การใช้แอมโมเนียไหลผ่าน (ammonia recycle percolation, ARP) และการแช่ในแอนโมเนียเหลว (soaking in aqueous ammonia, SSA) แอมโมเนียมีคุณสมบัติที่ดีในการพรีทรีตเมนต์ เช่น คุณสมบัติในการกำจัดลิกนิน, การขยายตัว, การระเหยได้เร็ว และราคาต่ำ ในกระบวนการ ARP

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แอมโมเนียเหลวถูกส่งผ่านคอลัมน์ รีเอ็กเตอร์ (column reactor) ซึ่งบรรจุด้วยชีวมวลที่อุณหภูมิสูง การกำจัดลิกนินในปริมาณสูง โดยปฏิกิริยาของแอมโมเนียกับลิกนินทำให้เกิดการแยกออกของพันธะ C-O-C ทำให้พันธะอีเทอร์และเอสเทอร์ที่เชื่อมกันเป็นลิกนิน-คาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนเกิดการขยายตัวทำให้ลิกนินถูกกำจัดได้ง่าย และวิธีนี้ยังทำให้ในพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้นเป็นผลดีในขั้นตอนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ ถึงแม้ว่าโครงสร้างที่เป็นผลึกของเซลลูโลสยังไม่ถูกเปลี่ยน (Kim *et al.*, 2003) กระบวนการ ARP ทำให้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ทำให้เซลลูโลสเกิดการสลายตัว

Kim and Lee (2007) พัฒนากระบวนการ SSA โดยทำการแช่ชีวมวลด้วยแอมโมเนียเหลวในถังปฏิกรณ์แบบเบ็ดเสร็จภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง (อุณหภูมิห้อง, ความดันบรรยากาศ) การย่อยของเซลลูโลสในกระบวนการ ARP ให้ผลเช่นเดียวกับการทรีตเมนต์แบบ SAA แต่การพรีทรีตเมนต์แบบ SSA ต้องใช้เวลา 10 วันจึงทำให้การกำจัดลิกนินและการย่อยมีประสิทธิภาพ

ในกรณีของการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์พรีทรีตเมนต์ทำให้ลิกโนเซลลูโลสเกิดการขยายตัว, พื้นผิวภายในเพิ่มขึ้น, ลดระดับของ crystallinity และแตกตัวโครงสร้างของลิกนิน ทำให้โมเลกุลของน้ำแทรกซึม (accessibility) ไปถึงชั้นในและทำลายพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน-คาร์โบไฮเดรต จากการศึกษาประสิทธิภาพของ กรดซัลฟิวริก, โซเดียมไฮดรอกไซด์, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโอโซนในการพรีทรีตเมนต์ พบว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 90 นาที อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดลิกนินได้สูงสุดถึง 65 เปอร์เซ็นต์ (Mohammad and Karimi, 2008) Zhao *et al.* (2007) กล่าวว่าเมื่อเปรียบเทียบการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟิวริก พบว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ผลที่ดีกว่าโดยทำให้การเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคสได้สูงกว่า ในขั้นตอนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์

เมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าและสิ่งแวดล้อม การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (dilute sodium hydroxide) มีความเหมาะสมกว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (concentrated sodium hydroxide) และการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางร่วมกับการพรีทรีตเมนต์ชนิดอื่นทำให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เช่นในกรณีของพรีทรีตเมนต์ต้นข้าวโพดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (2 เปอร์เซ็นต์) รวมกับการใช้รังสี (200 กิโลเกรย์) ทำให้ผลได้กลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 20 เปอร์เซ็นต์เป็น 43 เปอร์เซ็นต์ (Li *et al.*, 2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การพรีทรีตเมนต์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Organosolv pretreatmrnt)

ในกระบวนการนี้ใช้ลิกโนเซลลูโลสผสมรวมกับตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) และน้ำ แล้วให้ความร้อนเพื่อละลายลิกนินและของเฮมิเซลลูโลสบางส่วนออกจากเซลลูโลส อาจมีการเติมสารตัวเร่งเพิ่มหรือลดอุณหภูมิลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดลิกนินในกระบวนการ (Chum *et al*., 1985) การพรีทรีตเมนต์โดยวิธีนี้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 150-200 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวเร่งหรือไม่ใช้ก็ได้ ตัวอย่างเช่น กรดออกซาลิก (oxalic acid), กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) และกรดแอซีทิลซาลิซาลิก (acetylsalicylic acid) ตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอย่างเช่น แอลกอฮอล์, เอสเทอร์, คีโตน, ไกลคอล, กรดอินทรีย์, ฟีนอล และอีเทอร์ การนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่หลังจากเสร็จสิ้นเช่น การระเหย และการกลั่น เป็นการลดต้นทุนของการพรีทรีตเมนต์ วิธีนี้มีข้อเสียคือหากมีตัวทำละลายอินทรีย์เหลืออยู่ในเซลลูโลสที่นำไปใช้ในการหมัก จะทำให้การทำงานของเอนไซม์และการหมักถูกยับยั้ง (Sun and Cheng, 2002)

2.4 การพรีทรีตเมนต์ด้วยการออกซิเดชันแบบเปียก (Wet oxidation)

การออกซิเดชันแบบเปียกกระทำโดยการพรีทรีตเมนต์ลิกโนเซลลูโลสด้วยน้ำและอากาศหรือออกซิเจนที่อุณหภูมิประมาณ 120 องศาเซลเซียส (148-200 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที โดยอุณหภูมิ, เวลา และความดันของออกซิเจนเป็นตัวแปรสำคัญ กระบวนการนี้เป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวกับความร้อนทำให้เฮมิเซลลูโลสจะเกิดการแตกตัวอย่างสมดุลโดยการละลายและการสลาย กระบวนการนี้มีประสิทธิภาพในการแยกเซลลูโลสออกโดยการแตกตัวของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งออกซิเจนทำหน้าที่ในปฏิกิริยาการสลายและช่วยลดอุณหภูมิโดยทำให้เกิดกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามการควบคุมอุณหภูมิยังเป็นสิ่งที่ควรระวัง เนื่องจากอัตราของปฏิกิริยาและความร้อนเกิดขึ้นเร็ว ปฏิกิริยาหลักในการพรีทรีตเมนต์โดยการออกซิเดชันแบบเปียกคือการเกิดกรดจากกระบวนการสลาย ทำให้ลิกโนเซลลูโลสแตกออก เฮมิเซลลูโลสถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นส่วนใหญ่, ลิกนินสามารถต้านทานการแตกตัวและการออกซิเดชัน และเซลลูโลสบางส่วนถูกสลาย (Mohammad and Karimi, 2008)

2.5 การพรีทรีตเมนต์โดยโอโซน (Ozonolysis pretreatment)

วิธีนี้มีผลกับการสลายลิกนินและบางส่วนของเฮมิเซลลูโลส ทำได้ที่อุณหภูมิห้องและไม่ทำให้เกิดตัวยับยั้ง อย่างก็ตามการใช้โอโซนยังเป็นวิธีที่มีต้นทุนสูงและใช้โอโซนในปริมาณมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวแปรหลักในการพรีทรีตเมนตด้วยโอโซนคือปริมาณความชื้นของตัวอย่าง, ขนาด และความเข้มข้นของโอโซนในการไหลของก๊าซ ในตัวแปรทั้งหมดนี้เปอร์เซ็นต์ของน้ำมีความสำคัญที่สุด มีผลต่อการละลายของเฮมิเซลลูโลส โดยปริมาณน้ำเหมาะสมที่สุดคือ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับจุดอิ่มตัวของเส้นใย การใช้โอโซนมีข้อดีคือไม่ทำให้เกิดกรด, เบส และสารพิษเหลืออยู่ในเยื่อหลังจากพรีทรีตเมนต์ (Neely, 1984)

3. การพรีทรีตเมนต์ทางเคมีกายภาพ

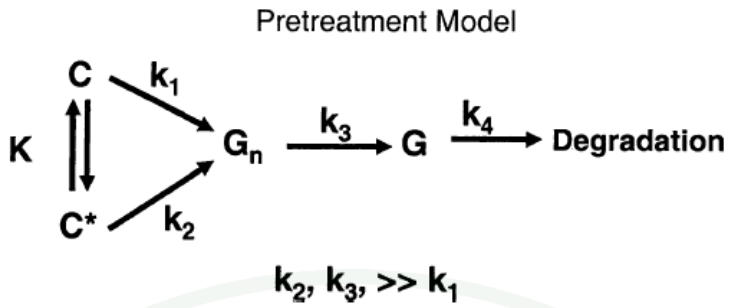
กลุ่มของการพรีทรีตเมนต์ด้วยไอน้ำประกอบด้วย การระบิดด้วยไอน้ำโดยไม่ใช้ตัวเร่ง (un-catalyzed steam explosion), การระเบิดด้วยไอน้ำโดยใช้กรดเป็นตัวเร่ง (acid-catalyzed steam explosion) การระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX) และวิธีอื่นเช่น การใช้น้ำร้อน (liquid hot water, LHW) เป็นต้น

3.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion, autolysis)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยไอน้ำที่ปราศจากตัวเร่งทำโดยให้ความร้อนแก่ชีวมวลลิกโนเซลลูโลสหลายนาทีกับไอน้ำความดันสูงโดยไม่มีการเติมสารเคมีใด ๆ เมื่อไอน้ำที่มีความดันสูงถูกปลดปล่อยสู่ความดันบรรยากาศอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการระเบิดโครงสร้างภายในชีวมวล ทำให้เฮมิเซลลูโลสบางส่วนถูกสลายเป็นมอโนและโอลิโกแซ็กคาไรด์ ยังมีกรดแอซีติกและกรดอื่น ๆ ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเฮมิเซลลูโลสระหว่างกระบวนการนี้

กลไกของปฏิกิริยาคือการให้ไอน้ำที่มีความร้อนสูงแก่ชีวมวลจะทำให้หมู่แอซีทิลที่เป็นโซ่กิ่งในเฮมิเซลลูโลสถูกตัดออก เปลี่ยนเป็นกรดแอซีติกและยังมีกรดชนิดอื่นที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยา ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการไฮโดรลิซิสเฮมิเซลลูโลสทำให้ปฏิกิริยามีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ซึ่งกลูโคสหรือไซโลสจะเกิดการสลายตัว ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นในสภาวะที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูง แต่วิธีนี้กำจัดลิกนินได้เล็กน้อยเท่านั้น (Weil *et al*., 1997; Glasser and Wright, 1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการสลายตัวของเซลลูโลสระว่างพรีทรีตเมนต์
(สัญลักษณ์ C, C*, G_n, G และ k แทนเซลลูโลส crystalline, เซลลูโลส amorphous, โอลิโกแซ็กคาไรด์ของกลูโคส, กลูโคส และอัตราเร็วของปฏิกิริยา ตามลำดับ)

ที่มา: Mosier *et al.* (2005)

จากภาพที่ 7 ขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์เริ่มต้นจากการปลี่ยนแปลงเซลลูโลส crystalline (C) เป็นเซลลูโลส amorphous (C*) ปฏิกิริยานี้ผันกลับได้ เซลลูโลสทั้งสองรูปแบบเป็นผลได้ของโอลิโกแซ็กคาไรด์ของกลูโคส (G_n) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกลูโคส และกลูโคส (G) ถูกสลายเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอล (5-hydroxymethylferfural) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการผลิตเอทานอลในขั้นตอนการหมัก (Mosier *et al*., 2005) การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส crystalline เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ของกลูโคสเกิดขึ้นน้อยมาก ทำให้ปริมาณเซลลูโลสหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำมีการเปลี่ยนแปลงน้อย

การระเบิดด้วยไอน้ำเป็นกระบวนการที่ใช้อุณหภูมิและความดันสูงซึ่งทำให้โครงสร้างภายในของชีวมวลเกิดการแตกออก สารหลักที่ถูกแยกออกคือ ลิกนินที่แตกออก,โอลิโกแซ็กคาไรด์และเซลลูโลส (Balat *et al*., 2008) การเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นมีผลต่อการละลายของเฮมิเซลลูโลสและทำให้เกิดการสลายตัวของน้ำตาลเพิ่มขึ้นด้วย จากการศึกษาการระเบิดด้วยไอน้ำก่อนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ของลำต้นทานตะวันโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 180-230 องศาเซลเซียส พบว่าผลได้กลูโคสสูงสุดเมื่อระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส และได้น้ำตาลจากเฮมิเซลลูโลสสูงเมื่อใช้อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส (Ruiz *et al*., 2008)

Overend *et al*. (1987) กล่าวว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยไอน้ำสามารถบอกค่าปัจจัยของความรุนแรง (severity factor, log R_0) ซึ่งใช้ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและอุณหภูมิ รวมเป็นปัจจัยเดียวดังสมการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\log R_0 = \log(t \cdot \exp(T-100/14.75))$$

เมื่อ	$\log R_0$	คือ	ค่าความรุนแรง
	t	คือ	ระยะเวลาในการคงอุณหภูมิ (นาที)
	T	คือ	อุณหภูมิของไอน้ำ (องศาเซลเซียส)

กระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำทำให้การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ดีขึ้นโดยเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายหลังจากที่เฮมิเซลลูโลสถูกกำจัดและลิกนินเกิดการแตกตัว อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้ต้นทุนค่อนข้างสูง ในการใช้พลังงานและเครื่องมือ และยังทำให้เกิดสารพิษ เช่น เฟอร์ฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอล ที่เปลี่ยนรูปจากน้ำตาล 5 และ 6 คาร์บอนในระหว่างการพรีทรีตเมนต์เมื่อใช้สภาวะที่รุนแรง (อุณหภูมิและความดันสูง) (Huang *et al*., 2011)

3.2 การระเบิดด้วยไอน้ำโดยใช้กรดเป็นตัวเร่ง (Acid-catalyzed steam explosion)

กระบวนการนี้เป็นการปรับปรุงให้การพรีทรีตเมนต์มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและยังทำในสภาวะความรุนแรงปานกลาง พบว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่ง เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ร่วมกับการใช้ไอน้ำพรีทรีตเมนต์สามารถลดเวลาและอุณหภูมิแต่ทำให้เกิดตัวยับยั้งขึ้น (Sassner *et al*., 2008) จุดประสงค์ของการใส่สารเคมีนี้คือปรับปรุงการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่แตกตัว ในการทดลองอาจใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ 1-4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก ซับสเตรต) ที่อุณหภูมิ 160-230 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เป็นต้น ตัวอย่างการศึกษาโดยพรีทรีตเมนต์ด้วยไอน้ำกับต้นหลิวมีการเติม กรดซัลฟิวริกหรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาล พบว่าผลได้กลูโคสสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพรีทรีตเมนต์ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส แต่ผลได้ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ต่ำกว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง (Eklund *et al*., 1995)

3.3 การระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fiber explosion, AFEX)

ในกระบวนการ AFEX ลิกโนเซลลูโลสจะทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิปานกลางและความดันสูง ตามด้วยการปลดปล่อยแอมโมเนียอย่างรวดเร็ว กระบวนการนี้ทำให้เซลลูโลสแบบผลึกลดลง, ขยายโครงสร้างของเส้นใย และเพิ่มพื้นที่การซึมผ่านของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิกิริยาของแอมโมเนียกับโมเลกุลขนาดใหญ่ของลิกนินทำให้ปริมาณลิกนินลดลงหรือทำให้โครงสร้างของลิกนินเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งทำให้โครงสร้างทางกายภาพและทางเคมีของลิกโนเซลลูโลสเกิดการเปลี่ยนแปลงช่วยในการปรับปรุงการ ไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ไปเป็นน้ำตาลที่ใช้ในการหมัก (Sendich *et al*., 2008; Bals *et al*., 2010)

Holtzapple *et al.* (1991) กล่าวว่า AFEX เป็นการพรีทรีตเมนต์ทางเคมีกายภาพด้วยด่างโดยชีวมวลที่ถูกระเบิดด้วยแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที หลังจากนั้นปล่อยความดันอย่างรวดเร็ว ประสิทธิภาพของ AFEX ขึ้นอยู่กับตัวแปรคือปริมาณแอมโมเนียที่เติมลงไป, อุณหภูมิ, น้ำ, การลดความดัน, เวลา และจำนวนครั้งของการพรีทรีตเมนต์

ข้อดีของการพรีทรีตเมนต์โดยวิธี AFEX คือไม่ทำให้เกิดผลพลอยได้ที่เป็นตัวยับยั้งซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีอื่น เช่น เฟอร์ฟูรอลในการพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดเจือจางและการระเบิดด้วยไอน้ำ อย่างไรก็ตามในส่วนของฟีโนลิกที่แตกออกจากลิกนินและสารแทรกจากผนังเซลล์ ยังตกค้างอยู่ในพื้นผิวเซลลูโลส จำเป็นต้องล้างออกด้วยน้ำเพื่อกำจัดส่วนที่เป็นตัวยับยั้ง (Chundawat *et al*., 2007) อย่างไรก็ตาม AFEX มีผลต่อปริมาณลิกนินค่อนข้างน้อยและไม่มีผลต่อการละลายเฮมิเซลลูโลสเมื่อเปรียบเทียบกับการพรีทรีตเมนต์วิธีอื่น เช่น การใช้กรดเจือจาง (Sun and Cheng, 2002)

3.4 การใช้น้ำร้อน (Liquid hot water, LHW)

LHW เป็นวิธีพรีทรีตเมนต์แบบไฮโดรเทอร์มอล (hydrothermal) โดยใช้น้ำภายใต้แรงดันสูงผ่านชีวมวล ทำให้เฮมิเซลลูโลสและบางส่วนของลิกนินถูกกำจัด ข้อดีของวิธีนี้คือ ไม่ต้องเติมสารเคมีและไม่ต้องใช้วัสดุที่ต้านทานการกัดกร่อนในกระบวนการพรีมรีตเมนต์, ใช้สารเคมีปรับสภาวะให้เป็นกลางน้อยในสารละลายหลังจากการพรีทรีตเมนต์เมื่อเปรียบเทียบการพรีทรีตเมนต์โดยใช้กรดเจือจาง เฮมิเซลลูโลสถูกละลายในรูปสารละลายโอลิโกแซ็กคาไรด์ และสามารถแยกออกจาก เซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำและลิกนินที่แตกตัว LHW ทำให้เซลลูโลสเกิดการขยายตัวเกิดพื้นที่ผิว และง่ายต่อการเข้าไฮโดรลิซิสโดยเอนไซม์ (Zeng *et al*., 2007)

Dien *et al*. (2006) กล่าวว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยไอน้ำและ LHW ทั้งคู่เป็นการพรีทรีตเมนต์แบบไฮโดรเทอร์มอล เมื่อเปรียบเทียบ LHW กับการระเบิดด้วยไอน้ำพบว่า LHW ทำให้เพนโตแซนเปลี่ยนเป็นสารละลายน้ำตาลสูงกว่าและเกิดตัวยับยั้งน้อยกว่า จากการทดลองพรีทรีตเมนต์เส้นใย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวโพดที่เอาแป้งออกแล้ว ด้วยน้ำร้อน 160 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที พบว่าไซแลนถูกละลายไป 75 เปอร์เซ็นต์ และใช้อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส สามารถละลายเฮมิเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์

4. การพรีทรีตเมนต์ทางชีวภาพ

การพรีทรีตเมนต์ชีวมวลลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในการกำจัดลิกนิน แต่ให้ประสิทธิภาพต่ำ โดยทำให้คาร์โบไฮเดรตเกิดการสูญเสียและใช้เวลามาก (Huang *et al*., 2011) การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีนี้ใช้จุลินทรีย์ในการย่อยลิกโนเซลลูโลส โดยใช้การทำงานของเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส แต่พบว่าเซลลูโลสเกิดการสูญเสียน้อยมากเนื่องจากเซลลูโลสมีความต้านทานการทำลายจากเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าส่วนอื่น (Sun and Cheng, 2002)

Yu *et al*. (2009) ได้พัฒนาการพรีทรีตเมนต์ 2 วิธีรวมกันสำหรับการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ในเปลือกข้าว การพรีทรีตเมนต์โดยการบดด้วยอัลตร้าโซนิคหรือใช้เปอร์ออกไซด์ แล้วใช้ *P. ostreatus* พบว่าการพรีทรีตเมนต์ร่วมกันมีผลต่อการเพิ่มการสลายลิกนิน เมื่อเปรียบเทียบกับการพรีทรีตเมนต์แบบเดียว ทำให้เวลาสั้นลงและลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต การกำจัดลิกนินเพิ่มขึ้นเพราะการใช้อัลตร้าโซนิคหรือเปอร์ออกไซด์ทำให้โครงสร้างชีวมวลแตกออก ทำให้จุลินทรีย์ผ่านเข้าภายในชีวมวลได้ง่ายขึ้น

เทคโนโลยีการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลลิกโนเซลลูโลสมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และยังต้องมีการปรับปรุงกระบวนการพรีทรีตเมนต์ให้มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าต่อไป ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการพรีทรีตเมนต์วิธีต่าง ๆ

ในอนาคตกระบวนการพรีทรีตเมนต์ยังมีความจำเป็น การรวมกันของวิธีพรีทรีตเมนต์ทางเคมี, กายภาพ และชีวภาพ จะทำให้ประสิทธิภาพในการไฮโดรลิซิสลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดฟอร์มิกกับแอมโมเนียเหลว, กรดฟอสฟอริกกับแอซีโตน, กรดซัลฟิวริก-เอทานอลกับบอลมิลล์ คลื่นไมโครเวฟกับสารละลายไอออนิก และเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) กับ *Pleurotusostreatus* เป็นต้น วิธีใหม่นี้มีข้อดีมาก เช่น การแตกตัวลิกโนเซลลูโลส, เซลลูโลสปริมาณสูง, ใช้เอนไซม์น้อย เป็นต้น (Huang *et al*., 2011)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 สรุปเทคโนโลยีการพรีทรีตเมนต์บางวิธีและผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางกายภาพของชีวมวลลิกโนเซลลูโลส

Pretreatment technology	Lignin	Hemicellulose	Accessibility	Crystallinity
Dilute sulfuric acid	+	++	++	-
Concentrated phosphoric acid	+	++	++	++
Soaking in aqueous ammonia	++	-	++	-
Ammonia recycle percolation	++	+	++	-
Lime	++	+	++	-
Lime+air	++	+	++	-
Hot water flow through	+	++	++	-
pH controlled hot water	+	++	++	-
Steam explosion (auto hydrolysis)	-	++	++	-
Acid-catalyzed steam explosion	-	++	++	-
Ammonia fiber explosion	++	+	++	++
Wet oxidation	+	+	++	-
Milling	-	-	++	++
Ultrasonic pretreatment	-	-	++	+
Extrusion pretreatment	-	-	++	++
Ethanol/sulfuric acid	-	++	++	-
Fungi	++	-	++	-

หมายเหตุ ++ คือมีผลมาก, + คือมีผลน้อย, - คือมีผลน้อยมาก

ที่มา: ดัดแปลงจาก Huang *et al.* (2011)

การรวมพรีทรีตเมนต์หลายวิธีเข้าด้วยกันนี้ทำให้กำจัดส่วนที่ไม่ใช่เซลลูโลสได้ง่ายและทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสเพื่อเปลี่ยนเป็นกลูโคสสำหรับการหมักได้ดีขึ้น ยิ่งกว่านั้นคือการทำให้มีปริมาณเซลลูโลสสูงในซับสเตรตซึ่งทำให้ได้กลูโคสและเอทานอลความเข้มข้นสูงในขั้นตอนการหมัก (Huang *et al*., 2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการไฮโดรลิซิส

การไฮโดรลิซิสทำให้โมเลกุลของเซลลูโลสแยกออกโดยการเติมโมเลกุลของน้ำ ดังสมการ

$$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \longrightarrow nC_6H_{12}O_6$$

ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วยกรดเจือจาง, กรดเข้มข้น หรือเอนไซม์ การใช้เอนไซม์มีข้อดีคือ สภาวะไม่รุนแรง (pH 4.8, อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส), ให้ผลได้สูง, การบำรุงรักษาต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการไฮโดรลิซิสด้วยด่างและกรด เพราะไม่มีปัญหาการกัดกร่อน (Balat *et al*., 2008) การไฮโดรลิซิสชีวมวลด้วยเอนไซม์ที่ไม่ผ่านพรีทรีตเมนต์ให้ผลได้ของน้ำตาลน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ชีวมวลที่ผ่านพรีทรีตเมนต์ทำให้ผลได้ของน้ำตาลสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Hamelinck *et al*., 2005)

กระบวนการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสเป็นกลูโคสได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง มีการใช้เอนไซม์หรือกรดซัลฟิวริกหลายความเข้มข้น การใช้เอนไซม์ในการผลิตเอทานอลจากชีวมวลยังมีต้นทุนสูง แต่การใช้กรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูงทำให้น้ำตาลเกิดการสลายตัว (Mosier *et al*., 2002) พบว่าการใช้กรดไฮโดรลิซิสให้ผลได้กลูโคสสูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์ ในกระบวนการแบบเบ็ดเสร็จ (Lee *et al*., 1999)

1. การไฮโดรลิซิสด้วยกรด (Acid hydrolysis)

จากการศึกษาพบว่าการใช้กรดไฮโดรลิซิสลิกโนเซลลูโลสทำให้เกิด ไซโลส, เซลลูโลส และลิกนินที่แตกออก การใช้กรดไฮโดรลิซิสชานอ้อยไซโลสจะเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วไปเป็นเฟอร์ฟูรอล และผลิตภัณฑ์อื่นๆ การสลายตัวนี้ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอล (HMF), แอซีเทต การใช้กรดเป็นตัวเร่งการไฮโดรลิซิสเป็นปฏิกิริยาที่มีหลายแบบ โดยกลไกของการไฮโดรลิซิสเซลลูโลส คือ การไปตัดพันธะ บีตา 1,4 ไกลโคซิดิก (ß 1,4 glycosidic) เกิดเป็นมอโนแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีทั้งการใช้กรดเจือจาง และกรดเข้มข้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 การไฮโดรลิซิสด้วยกรดเจือจาง (dilute acid hydrolysis)

การไฮโดรลิซิสด้วยกรดเจือจางทำให้เฮมิเซลลูโลสแตกออกที่อุณหภูมิต่ำกว่าเซลลูโลส ซึ่งการทำงานจะมี 2 ขั้นที่แตกต่างกันระหว่างเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส ขั้นแรกใช้อุณหภูมิต่ำเพิ่มผลได้น้ำตาล 5 คาร์บอนจากเฮมิเซลลูโลส ขั้นที่ 2 ใช้อุณหภูมิสูงกว่าเพื่อไฮโดรลิซิสเซลลูโลสภายใต้สภาวะที่รุนแรงเพื่อให้ได้น้ำตาล 6 คาร์บอน ข้อดีของกระการบวนการนี้คือ อัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วมาก แต่มีข้อเสียคือผลได้ของน้ำตาลต่ำ

1.2 การใช้กรดเข้มข้นไฮโดรลิซิส (concentrated acid hydrolysis)

กระบวนการนี้ทำให้เซลลูโลสถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสอย่างสมบูรณ์และรวดเร็ว เฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอน และสลายไปเล็กน้อย ตัวแปรสำคัญของวิธีนี้คือปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงในรูปสารละลาย และกรดที่นำกลับมาใช้ใหม่ วิธีนี้ใช้อุณหภูมิ ความดันไม่สูง เวลาทำปฏิกิริยานานกว่าการใช้กรดเจือจาง แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เวลา 2-4 ชั่วโมง การใช้อุณหภูมิและความดันต่ำทำให้น้ำตาลสลายน้อย แล้วนำน้ำตาลหลังจากการไฮโดรลิซิสในขั้นตอนแรกออกเพื่อป้องกันการเปลี่ยนรูปของน้ำตาล ขั้นตอนต่อไปคือการทำให้เซลลูโลสแตกออก โดยนำส่วนที่เหลือจากขั้นตอนแรกดึงน้ำออก และเติมกรดซัลฟิวริก 30-40 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 50 นาที เพื่อเป็นการไฮโดรลิซิสเซลลูโลส ข้อดีสำหรับวิธีนี้คือได้น้ำตาลสูง แต่มีข้อเสียคือยากในการทำงานและการนำกรดกลับมาใช้ใหม่

2. การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ (Enzyme hydrolysis)

การไฮโดรลิซิสวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการที่ช้ามากเพราะการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสจะถูกขัดขวางโดยโครงสร้างของซับสเตรตเอง เช่น ลิกนิน, เฮมิเซลลูโลส, พื้นที่ผิว และความเป็นผลึกของเซลลูโลส เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นเมื่อลิกโนเซลลูโลสได้รับการพรีทรีตเมนต์ ต้นทุนความเสื่อมสภาพของเครื่องมือในการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดเพราะการใช้เอนไซม์ในสภาวะสภาวะที่ไม่รุนแรง (พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส) ไม่มีปัญหาการกัดกร่อน และผลได้ของน้ำตาลดีกว่าการใช้กรด ในปัจจุบันมีการลดต้นทุนโดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

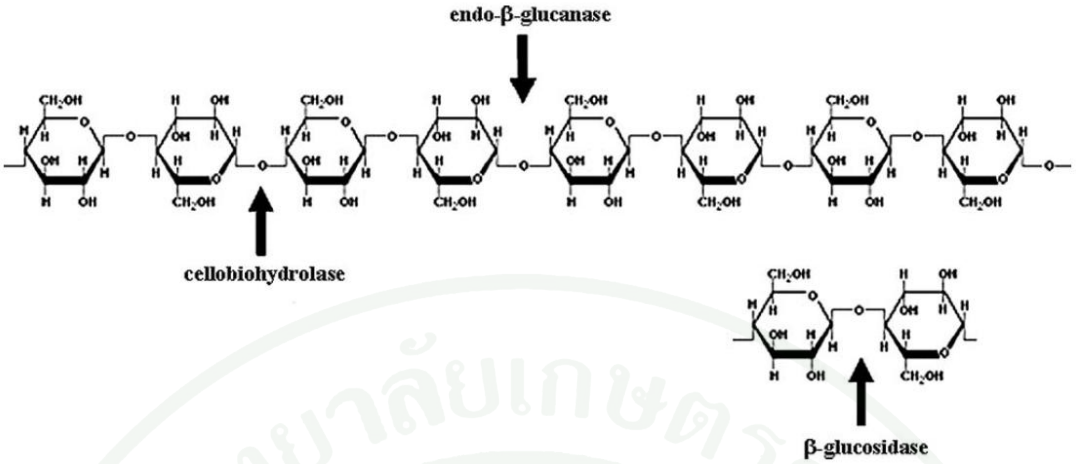
แบคทีเรียและราสามารถผลิตเซลลูเลสสำหรับการไฮโดรลิซิสลิกโนเซลลูโลส จุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแบบใช้อากาศหรือไม่ใช้อากาศ, เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางหรืออุณหภูมิสูง เป็นพวก *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonosrora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* และ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ ราเป็นจุลินทรีย์หลักในการผลิตเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส เช่น สายพันธุ์ *Trichoderma* sp (*T. viride*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*) ทั้งสายพันธุ์ตามธรรมชาติและสายพันธุ์ที่เกิดการผ่าเหล่า เซลลูเลสจากราให้ผลผลิตสูงที่สุดและทำลายโครงสร้างผลึกในเซลลูโลสได้ (Balat *et al*., 2008)

ในระหว่างการไฮโดรลิซิสลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยเอนไซม์ เซลลูโลสจะถูกแยกสลายเป็นกลูโคสด้วยชนิดของเอนไซมที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าทั้งหมดผลิตโดย *Trichoderma reesei* ซึ่งเป็นเชื้อราประกอบด้วย endoglucanase (EG, EC 3.2.1.4), exoglucanase หรือ cellobiohydrolase (CBH, EC 3.2.1.91) และ ß-glucosidase (BG, EC 3.2.1.21) เอนไซม์ทั้งหมดทำงานร่วมกันในการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสโดยการค้นหาจุดที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่าย อย่างไรก็ตาม *Trichoderma reesei* ผลิตเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสได้ในระดับต่ำ จึงทำให้การเปลี่ยนแปลงเซลโลไบโอส (cellobiose) เป็นกลูโคสได้ไม่สมบูรณ์ และเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส เพราะฉะนั้นจึงต้องเพิ่มเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสที่ผลิตได้จาก *Aspergillus niger* (เช่น Novozym 188) เพื่อให้สามารถเปลี่ยนเซลโลไบโอสเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ (Huang *et al*., 2011)

Han and Chen (2008) กล่าวว่าในระหว่างการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ กิจกรรมของเซลลูเลสถูกยับยั้งโดยเซลโลไบโอสและกลูโคส ซึ่งสามารถแก้ไขด้วยการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสแบ่งตามหน้าที่หลัก 3 กลุ่ม คือ 1) เอนโดกลูคาเนส เร่งการตัดแบบสุ่มภายในสายของเซลลูโลส 2) เซลโลไบโอไฮโดรเลส ตัดที่ปลายสายของเซลลูโลสปลดปล่อยเซลโลไบโอสหรือกลูโคส 3) บีตากลูโคซิเดส ทำให้กระบวนการไฮโดรลิซิสสมบูรณ์โดยการเปลี่ยนเซลโลไบโอสเป็นกลูโคส (Balat *et al*., 2008; Kumar *et al*., 2008) แสดงดังภาพที่ 8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสและตำแหน่งการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส, เซลโลไบโอไฮโดรเลส และบีตากลูโคซิเดส

ที่มา: Kumar *et al*. (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการหมัก

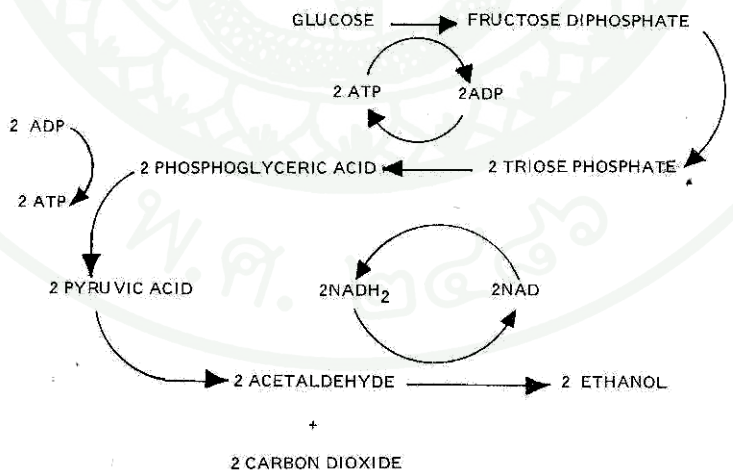
Hamelinck *et al*. (2005) กล่าวว่าผลได้สูงสุดของการผลิตเอทานอลทางทฤษฎีโดยเปรียบเทียบเป็นกิโลกรัมคือ 0.51 กิโลกรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.49 กิโลกรัมเมื่อใช้กลูโคส 1 กิโลกรัมเป็นซับสเตรต แสดงดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

การหมักโดยจุลินทรีย์ที่ใช้น้ำตาลเป็นอาหารในกระบวนการผลิตเอทานอล จุลินทรีย์จะใช้กลูโคสเป็นหลัก ชีวมวลประเภทเซลลูโลสมีกลูโคสในระดับสูงซึ่งง่ายต่อการเปลี่ยนเป็นเอทานอล (Demirbas, 2005)

1. ชีวเคมีของยีสต์

การหมักเกิดขึ้นในสภาวะไม่ใช้อากาศโดยยีสต์ที่มีชีวิตจะปลดปล่อยพลังงานจากการเปลี่ยนรูปกลูโคสเป็นเอทานอลโดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ซึ่งเกิดหลังจากกระบวนการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดไพรูวิก ดังภาพที่ 9

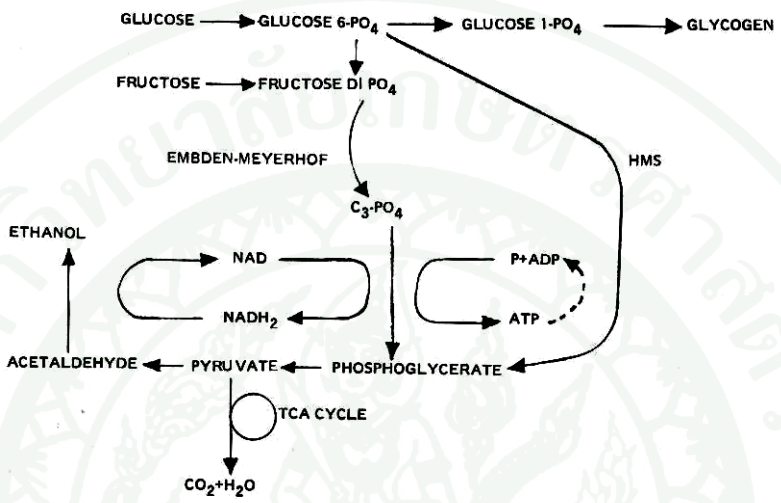


ภาพที่ 9 การผลิตเอทานอลโดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas

ที่มา: Reed and Peppler (1973)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีสต์ทั้งหมดมีเมแทบอลิซึมแบบใช้อากาศทำให้มีพลังงานสูงสำหรับกลไกของเซลล์ทำให้เกิด citric acid, tricarboylic acid (TCA) หรือวัฏจักรเครบเพื่อสังเคราะห์กรดอะมิโนและโครงสร้างคาร์บอนสำหรับโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ (Reed and Peppler, 1973) เป็นผลให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้น้อยลง ดังภาพที่ 10.



ภาพที่ 10 เมแทบอลิซึมแบบใช้อากาศของยีสต์

ที่มา: Reed and Peppler (1973)

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์

2.1 ความเข้มข้นของน้ำตาล

อาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาลสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ การหมักเอทานอลของยีสต์จะหยุดลง (Nagodawithana *et al*., 1976) ดังนั้นการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาวะเช่นนี้ทำให้การหมักเป็นไปได้ช้า และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerant yeast) เช่น *S. rouxii* พบว่าเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ข้อจำกัดของอัตราการเจริญของยีสต์

ในระหว่างการหมักต้องจำกัดการเจริญของยีสต์ด้วยอัตราการเจริญจำเพาะไม่ให้สูงกว่า 0.2 - 0.25 ต่อชั่วโมง แสดงว่าจำนวนของยีสต์ในถังหมักจะต้องไม่เพิ่มมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่า 0.25 ต่อชั่วโมง จะทำให้เซลล์ยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว (Meyenburg, 1969)

2.3 อิทธิพลของพีเอช

ยีสต์เจริญได้ดีในช่วงพีเอช 3.6-6.0 ให้ผลดีในช่วงพีเอช 4.5-5.0 ยีสต์เจริญได้ที่พีเอชต่ำจึงทำให้เกิดการปนเปื้อนน้อย การเริ่มต้นหมักควรมีพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 4.2-4.5 และพีเอชเมื่อสิ้นสุดการหมักคือ 4.8-5.2 (Reed and Peppler, 1973)

2.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิสำหรับการหมักของยีสต์จะสูงกว่าการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส (สาวิตรี, 2540) ยีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเซลล์ยีสต์ในระยะที่มีการเจริญมีจำนวนลดลงหากเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (Rose and Harrison, 1971)

2.5 การให้อากาศ

ในกระบวนการหมักของยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้โครงสร้างที่เป็นไขมันมีเสถียรภาพ และเพื่อรักษาสภาพของกระบวนการต่าง ๆ ที่มีทั่วไปในเซลล์ อย่างไรก็ตามการให้ออกซิเจนส่งเสริมให้เกิด Pasteur effect (Smart, 2000) ทำให้ยีสต์นำกลูโคสไปใช้ในการสร้างเซลล์มากกว่าการหมักเป็นผลให้เกิดเอทานอลต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

การหมักด้วยวิธีย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (SSF) เป็นอีกวิธีหนึ่งสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส โดยการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์พร้อมกับการหมักแทนที่วิธีการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักแยกกัน (Separate hydrolysis and fermentation, SHF) วิธี SSF จะช่วยลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย (กลูโคสและเซลโลไบโอส) และต้นทุนการผลิต ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานร่วมกันของเอนไซม์และยีสต์ (Olofsson *et al*., 2008) ในการหมักแบบ SHF ผลิตกลูโคสได้ต่ำกว่าวิธี SSF เนื่องจากการไฮโดรลิซิสโดยเอนไซม์ในวิธี SHF ถูกยับยั้งโดยกลูโคสและเซลโลไบโอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย แสดงว่าการหมักแบบ SSF จะทำให้ผลได้ของเอทานอลสูงกว่าเนื่องจากสามารถผลิตกลูโคสได้สูงกว่า และถูกใช้ในระหว่างการหมักได้ทันทีทำให้เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้ง วิธีนี้ทำให้ต้นทุนลดลงมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (Wingren *et al*., 2003)

ปัญหาสำคัญของการหมักแบบ SSF คือความแตกต่างของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์เซลลูเลสและยีสต์ โดย *S. cervisiae* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์เซลลูเลสถูกนำมาใช้ในการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50 องศาเซลเซียส (Kadar *et al*., 2004; Tomas-Pejo *et al*., 2009)

รายงานการทดลองที่เกี่ยวกับการหมักแบบ SSF มุ่งประเด็นไปที่การปรับปรุงกระบวนการโดยการเพิ่มปริมาณซับสเตรต (water insoluble solids, WIS), การลดปริมาณเอนไซม์และปริมาณยีสต์ และแปรผันอุณหภูมิ

3.1 ปริมาณซับสเตรต

Olofsson *et al*. (2008) กล่าวว่า ผลของการเพิ่มซับสเตรตทำให้ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายสูงขึ้น การใช้ซับสเตรตปริมาณสูงในรูปของ WIS เป็นตัวชี้ถึงความคุ้มค่าของกระบวนการ SSF ในการหมักเอทานอลแบบ SSF แบบเบ็ดเสร็จ เมื่อเพิ่มปริมาณ WIS พบว่าผลได้ (yield) เอทานอลลดลงเป็นสิ่งที่ยากเมื่อใช้ปริมาณ WIS ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์แล้วทำให้ผลได้เอทานอลสูง ดังตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลได้เอทานอลกับปริมาณ WIS โดยใช้ *S. cerevisiae* ในการหมักแบบ SSF

Raw material	Pretretment	Amount of solids	Temp (^{o}C)	Ethanol Conc. (g/L)	Ethanol yield (%)	Operation
Barley straw	Steam	7.5% WIS	35	22.4	80	Batch
Salix	Steam	9% WIS	37	32	76	Batch
Salix	Steam	11% WIS	37	33	62	Fed-batch
Spruce	Steam	10% WIS	37	44.5	84	Batch
Willow	Steam	10% dry matter	37	28.7	84.4	Batch

ที่มา: ดัดแปลงจาก Olofsson *et al*. (2008)

เมื่อใช้ปริมาณ WIS สูงทำให้เกิดความหนืดสูงทำให้เกิดปัญหากับการกวน (Taherzadeh *et al*., 1999) ซึ่งเป็นปัญหากับการส่งผ่านมวลและความร้อนในระบบ อาจแก้ปัญหาใช้วิธี fed-batch SSF เพื่อย่อยเซลลูโลสที่ถูกเติมลงไปทีละน้อย (Rudolf *et al*., 2005) อีกวิธีคือการพรีไฮโดรลิซิสก่อนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (prehydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation, PSSF) โดยการเติมเอนไซม์ลงไปก่อนในช่วงระยะเวลาหนึ่งก่อนการเติมจุลินทรีย์ที่ใช้หมัก วิธีนี้สามารถใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อให้เหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์ซึ่งจะทำให้ความหนืดเริ่มต้นเมื่อเริ่มหมักลดลง (Ohgren *et al*., 2007)

3.2 ปริมาณเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้มีความสำคัญในกระบวนการหมักแบบ SSF ซึ่งส่งผลต่อต้นทุนของกระบวนการ โดยพบว่าการลดปริมาณเอนไซม์ลง 50 เปอร์เซ็นต์จะทำให้เกิดประโยชน์ถ้าผลได้ลดลงไม่น้อยกว่า 6-7 เปอร์เซ็นต์ และเวลาที่ใช้ไม่เพิ่มขึ้นมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Sassner *et al*., 2007) จากการทดลองของ Linde *et al*. (2007) ได้แปรผันปริมาณ WIS (5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) และกิจกรรมเอนไซม์ (5, 10 และ 20 FPU ต่อกรัมเซลลูโลส) ในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวบาเลย์พบว่าการใช้เอนไซม์ 20 FPU ต่อกรัมเซลลูโลสทำให้เกิดกลูโคสได้เร็วที่สุดและการใช้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงเหมาะสมกับปริมาณWIS มาก กิจกรรมของเอนไซม์มีผลน้อยต่อการผลิตเอทานอลที่ปริมาณ WIS 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 ปริมาณยีสต์

การใช้ปริมาณของยีสต์ความเข้มข้นสูงในการหมักแบบ SSF ไม่ทำให้ผลได้ของเอทานอลเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของยีสต์ที่ต่ำเกินไปทำให้ผลผลิตต่ำลงและอาจทำให้การหมักหยุดลง (Sassner *et al*., 2007) ผลการทดลองของ Eklund and Zacchi (1995) พบว่าความเข้มข้นของ *S. cerevisiae* ที่เติมในการหมักแบบ SSF ในช่วง 0.3-3.0 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการหมักทำให้การผลิตเอทานอลสูงขึ้น แต่เมื่อเติมความเข้มข้น *S. cerevisiae* ระหว่าง 3.0-10.0 กรัมต่อลิตรไม่มีผลทำให้ได้เอทานอลสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

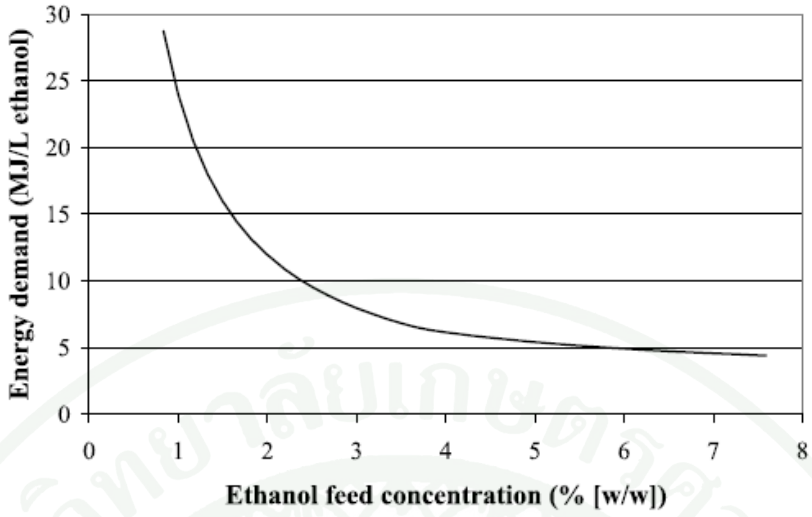
3.4 อุณหภูมิ

กระบวนการหมักแบบ SSF อุณหภูมิของระบบมีความสำคัญ จึงต้องหาสภาวะที่มีความเหมาะสมสำหรับการไฮโดรลิซิสและการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์พร้อมกันเพื่อให้สามารถผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปการหมักแบบ SSF จะใช้อุณหภูมิในการหมักตั้งแต่ 35-40 องศาเซลเซียส (เช่น *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*) (Ou *et al*., 2009) อย่างไรก็ตามยังมีวิธีการปรับปรุงการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เช่น *Kluyveromyces marxianus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส (Ballesteros *et al*., 2004)

4. ความต้องการทางด้านพลังงานของการกลั่นเอทานอล

พลังงานที่ใช้ในขั้นตอนการกลั่น เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นสำหรับการทำให้เอทานอลจากการหมักเข้มข้นขึ้นแสดงในภาพที่ 11 ขั้นตอนการกลั่นมี 2 ขั้นตอน คือการแยกเอทานอลออกจากของแข็งและสารที่ไม่ระเหย และขั้นตอนการทำเอทานอลให้มีความเข้มข้น ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งในกระบวนการหมักจำเป็นต้องได้เอทานอล 8 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และในลิกโนเซลลูโลสต้องได้เอทานอลอย่างน้อย 4-5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) จึงจะคุ้มค่าสำหรับต้นทุนทางด้านพลังงานในการกลั่น (Gablbe *et al*., 2007) เนื่องจากการใช้ลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลมีต้นทุนในขั้นตอนพรีทรีตเมนต์สูง และยังมีข้อจำกัดในการผลิต ความเข้มข้นเริ่มต้นที่คุ้มทุนในการกลั่นจึงต่ำกว่าการผลิตเอทานอลจากแป้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ความต้องการของพลังงานในการกลั่นจากเอทานอลเจือจางเป็นเอทานอลเข้มข้น 94.5 เปอร์เซ็นต์ (w/w)

ที่มา: Gablbe *et al*. (2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การออกแบบการทดลองแบบทะกุจิ (Taguchi Experimental Design)

การออกแบบการทดลองแบบทะกุจิเป็นวิธีที่พัฒนาโดย Dr. Genichi Taguchi เมื่อ ค.ศ. 1980 เพื่อการปรับปรุงคุณภาพสำหรับการหาสภาวะของกระบวนการผลิตลดความแปรผันต่าง ๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุด วิธีทะกุจิมีวัตถุประสงค์เพื่อลดจำนวนทรีตเมนต์โดยอาศัยหลักการออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array ได้เครื่องมือที่เรียกว่า orthogonal array ทำให้สะดวกในการวางแผนการทดลองเพื่อหาผลกระทบของปัจจัยและกำหนดค่าในการทดลองว่าปัจจัยและระดับใดมีผลต่อการทดลองมากที่สุด โดยแบ่งเป็น inner arry และ outer array ซึ่งเป็นเมตริกซ์การออกแบบของปัจจัยที่ควบคุมได้ (Signal variable) และปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ (Noise variable) แล้วนำเมทริกซ์ทั้งสองมาคำนวณหาค่าผลตอบสนองที่เรียกว่า อัตราส่วนสัญญาณต่อสิ่งรบกวน (Signal to noise ratio, S/N ratio) โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (Quality characteristic, QC) ได้ 3 ลักษณะ (ณธิดา, 2551)

กรณีมากกว่าดีกว่า (Bigger is better, QC = B) คือค่าตอบสนองที่เราต้องการมีค่ามากที่สุด

กรณีน้อยกว่าดีกว่า (Smaller is better, QC = S) คือค่าตอบสนองที่เราต้องการมีค่าน้อยกว่าค่าอื่น ๆ หรือตามทฤษฎีจะเท่ากับศูนย์

กรณีเป้าหมายดีที่สุด (Norminal is best, QC = N) คือผลการทดลองที่เบี่ยงเบนไปจากค่าเป้าหมายน้อยที่สุดดีที่สุด ซึ่งอาจจะเบี่ยงเบนไปทางบวกหรือลบขึ้นอยู่กับการพิจารณาความสำคัญเป็นหลัก

ขั้นตอนการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุจิ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (Roy, 2001)

1. การวางแผนการทดลอง (Planning experiment)

เป็นขั้นตอนกำหนดวัตถุประสงค์ที่ต้องการรวมทั้งพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การออกแบบการทดลอง (Designing experiment)

กำหนดหรือเลือก orthogonal array ที่เหมาะสมกับระบบรวมทั้งกำหนดปัจจัยและระดับของปัจจัย

3. การทำการทดลอง (Conducting experiment)

การทำการทดลองตามสภาวะสภาวะของปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนดใน orthogonal array

4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง (analyzing experiment)

4.1 การพิจารณาผลของปัจจัยและระดับของปัจจัยว่าปัจจัยใดมีผลกระทบกับระบบซึ่งทำให้บอกได้ถึงอิทธิพลของปัจจัยหลัก รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาสมของแต่ละปัจจัยของระบบที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงที่สุด

4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดผลจากความแปรปรวนของแต่ละปัจจัยออกไป ซึ่งมาจากผลของความแปรปรวนที่รับมาจากการทดลอง และสามารถอธิบายความแปรปรวนของแต่ละปัจจัย เพื่อให้ทราบว่ามีปัจจัยใด มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตมากกว่ากัน เป็นสาเหตุสำคัญของความแปรปรวนทั้งหมดที่สังเกตได้จากการผลทดลอง ซึ่งรูปแบบของความแปรปรวนบ่งบอกได้โดยการอธิบายในรูปแบบทางคณิตศาสตร์ ซึ่งสามารถนำค่าที่ได้ไปใช้ได้ หรืออาจพิจารณาได้จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

5. การทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง (Confirming or Predicted)

เป็นการพิสูจน์ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อระบบที่หาได้นั้นมีความเหมาะสม และได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ได้คาดหมายจริงหรือไม่ รวมทั้งใช้สภาวะนั้นศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อระบบ

วิธีทะกุจิสามารถสามารถศึกษาหลายปัจจัยได้พร้อมกันโดยใช้หน่วยการทดลองน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลดังตารางที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 จำนวนการทดลองโดยวิธีทะกุจิและแฟคทอเรียลในสภาวะการทดลองต่าง ๆ

สภาวะการทดลอง	จำนวนการทดลองแบบแฟคทอเรียล	จำนวนการทดลองวิธีทะกุจิ
3 ปัจจัย 2 ระดับ	8	4
7 ปัจจัย 2 ระดับ	128	8
11 ปัจจัย 2 ระดับ	2,048	12
15 ปัจจัย 2 ระดับ	32,768	16
4 ปัจจัย 3 ระดับ	81	9
7 ปัจจัย 3 ระดับ	2,187	18

ที่มา: Roy (2001)

ณธิดา (2551) กล่าวว่าขั้นตอนการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุจิเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยการกำหนดค่าระดับของปัจจัยของชุดการทดลองต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสม เพื่อหาผลกระทบของปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์ ซึ่งแสดงในรูปของอัตราส่วน S/N โดยชุดการทดลองที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N สูงที่สุดจะถูกเลือกเป็นสภาวะที่ดีที่สุด หากกำหนดค่าระดับของปัจจัยเป็นช่วงที่ไม่เหมาะสมแล้ว จะทำให้การเลือกชุดการทดลองตามวิธีทะกุจิไม่ใช่ระดับที่เหมาะสมที่สุดของกระบวนการที่ทำให้ได้ค่าผลตอบสนองดีที่สุด เนื่องจากการกำหนดค่าระดับของปัจจัยตามวิธีทะกุจิเป็นเพียงการเลือกจากระดับของปัจจัยที่กำหนดไว้ในแผนการทดลองที่ออกแบบมาเท่านั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สารเคมี

1.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH; J.T. Baker)

1.2 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl; UNIVAR)

1.3 โซเดียมคลอไรต์ ($NaClO_2$; UNIVAR)

1.4 โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$; UNIVAR)

1.5 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (C_2H_5OH; องค์การสุรา)

1.6 เบนซีน (C_6H_6; MERK)

1.7 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4; J.T. Baker)

1.8 กรดแอซีติก (CH_2COOH; J.T. Baker)

1.9 กรดไฮโดรคลอริก (HCl; J.T. Baker)

1.10 ออซีนโมโนไฮเดรต ($C_7H_8O_2$ H_2O; Fluka)

1.11 เฟอร์ริกคลอไรด์ ($C_7H_8O_2$ H_2O; POCH)

1.12 ดี-ไซโลส ($C_5H_{10}O_5$; Fluka)

1.13 แอซีโตน (C_3H_6O; Burdick & Jackson)

1.14 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7$; UNIVAR)

1.15 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก แอสิด ($C_7H_4N_2O_7$; Sigma)

1.16 ดี-กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$; UNIVAR)

1.17 โซเดียมแอซีเทต ($C_2H_3NaO_2$; UNIVAR)

1.18 พาราไนโตรฟีนิลบีตาดีกลูโคพาราโนไซด์ ($C_{12}H_{15}NO_8$; Sigma)

1.19 พาราไนโตรฟีนอล ($C_6H_5NO_3$; BDH)

1.20 เพปโทน (Peptone; HIMEDIA)

1.21 ยีสต์สกัด (Yeast extract; AES)

1.22 เซลโลไบโอส ($C_{12}H_{22}O_{11}$; Fluka)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. เครื่องมือ

2.1 เครื่องทำชิ้นไม้สับ (Chipper)

2.2 เครื่องคัดขนาดไม้

2.2 เครื่องทำผงไม้ (Wiley Mill)

2.3 ตะแกรงร่อน (sieve)

2.4 เครื่องระเบิดด้วยไอน้ำของบริษัท Nitto Koatsu ประเทศญี่ปุ่น ขนาด 2.5 ลิตร

2.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (OHAUS)

2.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Saterious)

2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert 29L)

2.8 ตู้ดูดควัน (Major)

2.9 พีเอชมิเตอร์ (METTLER TOLEDO)

2.10 เตาอบ (VISION)

2.11 เตาเผา (NEYO 2-525 series II)

2.12 สแปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo Spectronic)

2.13 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) (TOMY ES-315)

2.14 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (New Brunswick Scientific Edison, N.J., USA)

2.15 High performance liquid chromatography (HPLC) (SHIMADZU, Japan)

2.16 Gas chromatography (GC) (Chrompack CP 9002,USA)

2.17 โถดูดความชื้น (Dessicator)

2.18 Laminar

2.19 ถ้วยกรอง (Glass filter) เบอร์ 1, 2 และ 4

2.20 เครื่องแก้วและอุปกรณ์วิเคราะห์อื่นๆ

3. วัตถุดิบ

ลำต้นปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guneensis* Jacq.) ที่ใช้ศึกษาเป็นลำต้นปาล์มนั้นสดอายุ 28 ปีจากเกษตรกร อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่จำนวน 2 ต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาคือ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 จากองค์การสุรา ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดและทนเอทานอลได้ดี (วนิดา, 2553)

5. เอนไซม์

5.1 เอนไซม์เซลลูเลส Celluclast 1.5L ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเดนมาร์ก จากเชื้อ *Trichoderma reesei* ATCC 26921ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8

5.2 เอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส Novozym 188 ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเดนมาร์ก จากเชื้อ *Aspergillus niger* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 (Han and Chen, 2008)

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ

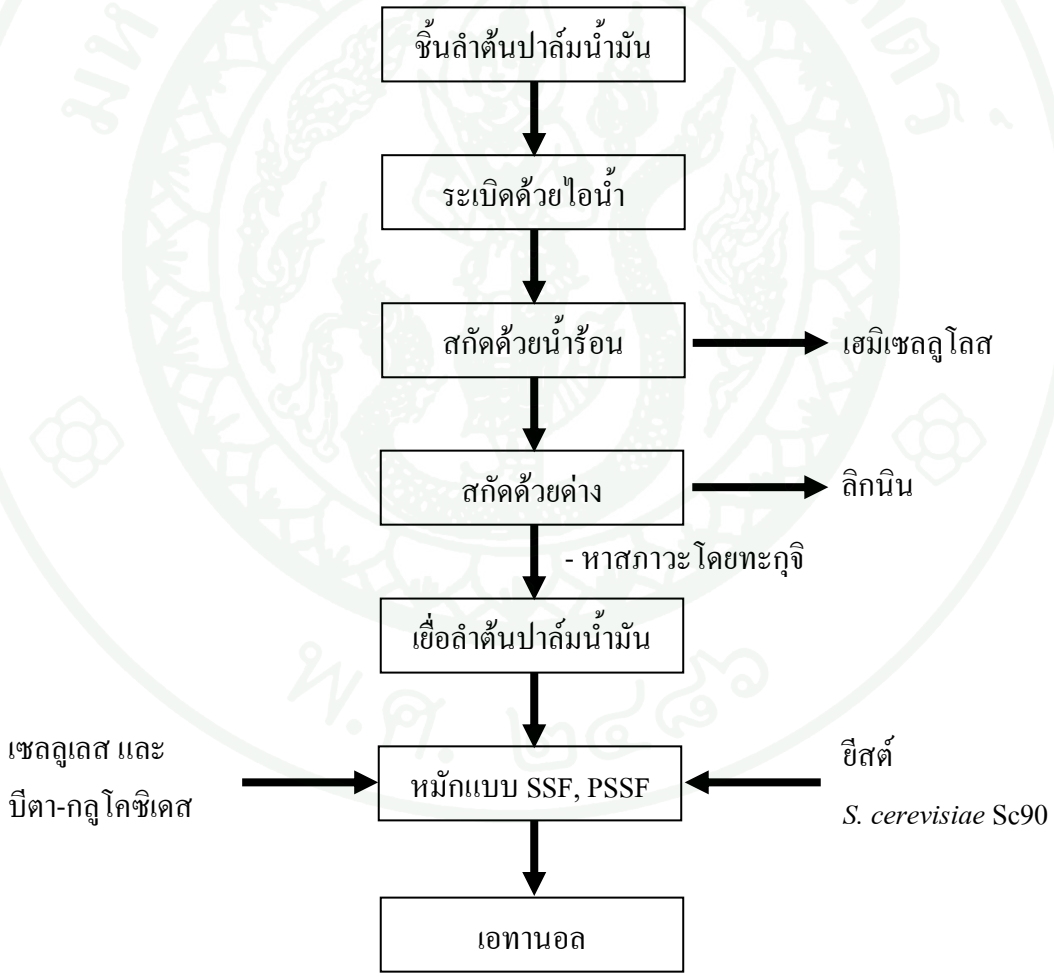
6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สำหรับเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น ใช้อาหารเหลว YPD (Yeast Peptone Dextrose) ที่มีส่วนประกอบของ ยีสต์สกัด 10 กรัม, เพปโตน 20 กรัม และกลูโคส 20 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 15 นาที

6.2 อาหารแข็งสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อ ใช้สูตรอาหารเดียวกับข้อ 6.1 และมีการเติมวุ้น (Agar) ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

กระบวนการผลิตไบโอเอทานอลจากลำต้นปาล์มน้ำมันเริ่มต้นจากการแปรรูปเป็นชิ้นมีขนาดเหมาะสมแล้วจึงนำเข้าสู่ขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำ, สกัดด้วยน้ำร้อน และสกัดด้วยด่างตามลำดับซึ่งเป็นการพรีทรีตเมนต์เพื่อให้ได้เซลลูโลสสูงและลดส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน หลังจากนั้นนำเยื่อมาทำการหมักแบบย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) และการพรีไฮโดรลิซิสและการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Prehydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation, PSSF) โดยใช้เอนไซม์และยีสต์ผลิตเอทานอล ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ขั้นตอนการทดลองการผลิตไบโอเอทานอลจากชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การเตรียมวัตถุดิบ

ลำต้นปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นลำต้นปาล์มน้ำมันสดอายุ 28 ปีจากเกษตรกรในอำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่จำนวน 2 ต้น โดยมีความชื้นเท่ากับ 367 เปอร์เซ็นต์ (dry basis) ปอกเปลือกและตัดให้เป็นชิ้นด้วยเครื่องทำชิ้นไม้สับ (chipper) นำไปตากแดดเป็นเวลา 5 วัน พลิกชิ้นลำต้นปาล์มทุกวันจนความชื้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลดโอกาสเกิดเชื้อรา นำชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันที่แห้งร่อนแยกขนาด ให้มีขนาด 20×20×5 mm^3 เพื่อให้สามารถบรรจุลงเครื่องระบิดด้วยไอน้ำได้ ดังภาพที่ 13 ส่วนหนึ่งบดด้วยเครื่องบด และร่อนให้มีขนาดระหว่าง 40 ถึง 60 mesh วิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีของสารแทรก เซลลูโลส โฮโลเซลลูโลส เพนโตแซน ลิกนิน และเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ของ Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) อีกส่วนหนึ่งนำไปบรรจุในถุงพลาสติกถุงละ 150 กรัมน้ำหนักแห้งเพื่อการระเบิดด้วยไอน้ำ

ภาพที่ 13 ชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการพรีทรีตเมนต์ชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ

นำชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันที่คัดขนาดแล้วตัวอย่างละ 150 กรัมน้ำหนักแห้ง เข้าเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำของบริษัท Nitto Koatsu ประเทศญี่ปุ่น ขนาด 2.5 ลิตร (ภาพที่ 14)โดยไม่มีการเติมตัวเร่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แปรผันสภาวะโดยมีอุณหภูมิและเวลาเป็นปัจจัยร่วมโดยมีค่า Log R_0 บ่งบอกถึงความรุนแรงของสภาวะ ดังตารางที่ 6

ขั้นตอนการทำงานของเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำคือ น้ำในถังถูกให้ความร้อนทำให้เกิดไอน้ำที่มีอุณภูมิและความดันสูง ไอน้ำจะถูกส่งต่อไปยังวาล์วซึ่งเป็นจุดความคุมความดันปล่อยเข้าสู่ถังทำปฏิกิริยาที่บรรจุตัวอย่าง เมื่อเปิดวาว์ลทำให้ไอน้ำเข้าสู่ถังทำปฏิริยา ควบคุมให้ได้ความดันหรืออุณหภูมิตามต้องการ และคงที่ หลังจากนั้นจับเวลา เมื่อครบกำหนดเวลา สับสวิตท์เปิดท่อวาล์วเพื่อเปลี่ยนแปลงความดันกลับสู่ความดันบรรยากาศอย่างรวดเร็ว ทำให้โครงสร้างภายในของชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันเกิดการแตกออกสู่ถังรองรับตัวอย่าง เก็บเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันดังภาพที่ 15 ใส่ถุงพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการนำไปสกัดด้วยน้ำร้อน แบ่งตัวอย่างอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีของ เซลลูโลส โฮโลเซลลูโลส เพนโตแซน ลิกนิน และเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ของ TAPPI เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำ

ภาพที่ 14 เครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำของชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	Log R_0
200	2	3.24
	4	3.55
	6	3.72
210	2	3.54
	4	3.84
	6	4.02

ภาพที่ 15 เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำ

3. การสกัดด้วยน้ำร้อนของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำ

เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำจะถูกนำไปสกัดด้วยน้ำร้อนโดยใช้น้ำกลั่นในอัตราส่วนของปริมาณเยื่อต่อน้ำ 1:8 (กรัมเยื่อต่อมิลลิลิตร) อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที คนโดยใช้แท่งแก้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บน้ำวิเคราะห์ เฟอร์ฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอล (HMF) หลังจากนั้นนำเยื่อมาล้างด้วยน้ำประปาจนน้ำที่ชะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ออกมามีสีจางลงเพื่อให้เฮมิเซลลูโลสและบางส่วนของลิกนินถูกกำจัดออก เก็บเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันดังภาพที่ 16 ใส่ถุงพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการนำไปสกัดด้วยด่าง แบ่งตัวอย่างอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลลูโลส โฮโลเซลลูโลส เพนโตแซน ลิกนิน และเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ของ TAPPI เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีหลังจากการสกัดด้วยน้ำร้อน

ภาพที่ 16 เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการสกัดด้วยน้ำร้อน

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่างของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน ออกแบบการทดลองโดยวิธีทะกุจิ

4.1 การออกแบบการทดลองโดยวิธีทะกุจิ

การออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีทะกุจิแบบ Three Level Orthogonal Array (L-9) ออกแบบเพื่อศึกษาหาระดับที่เหมาะสมของตัวแปร 3 ปัจจัย ซึ่งแต่ละปัจจัยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ โดยแบ่งออกเป็นความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ และเวลา ได้การทดลองทั้งหมด 9 ชุดการทดลองประกอบด้วยจำนวนการทดลองที่ขึ้นอยู่กับระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดดังแสดงในตารางที่ 7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ปัจจัยและระดับในการหาสภาวะการสกัดด้วยด่าง

ปัจจัย	ระดับ		
	1	2	3
1. ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)	15	20	25
2. อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	70	80	90
3. เวลา (นาที)	30	60	90

นำเยื่อเปียกหลังการสกัดด้วยน้ำร้อนมาทำการสกัดด้วยด่างโดยออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุจิ ซึ่งใช้ในการลดทรีตเมนต์คอมบิเนชั่น และประมาณค่าผลการทดลอง โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อัตราส่วนของเยื่อต่อด่าง 1:8 (กรัมเยื่อต่อมิลลิลิตร) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ดังตารางที่ 7 หลังจากนั้นนำเยื่อล้างน้ำประปาจนน้ำที่ออกมามี pH เป็นกลาง เก็บเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันดังภาพที่ 17 ใส่ถุงพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตเอทานอล แบ่งตัวอย่างอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลลูโลส โฮโลเซลลูโลส เพนโตแซน ลิกนิน และเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ของ TAPPI เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีหลังจากการสกัดด้วยน้ำร้อน หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองตามวิธีทะกุจิ เพื่อสรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่าง เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงประมาณค่าผลการทดลอง และทำการทดลองเพื่อยืนยันผล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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 ปัจจัยและระดับในการทดลองการหาสภาวะการสกัดด้วยด่างของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยน้ำร้อน ออกแบบด้วยวิธีทะกุจิ

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		
	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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 17 เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการสกัดด่าง

5. การผลิตเอทานอลจากการหมักโดยยีสต์

5.1 สภาวะการเจริญของยีสต์

Saccharomyces cerevisiae Sc90 จากองค์การสุราใช้ในการทดลองหมักแบบ SSF และ PSSF เตรียมโดยการสตรีกเพลตและเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 18 ชั่วโมง ในอาหาร YPD (เพปโทน 20 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร และดี-กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร)

5.2 การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ (Enzyme hydrolysis)

ไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ผสมระหว่าง Celluclast 1.5L 15 FPUต่อกรัมซับสเตรต และ Novozym 188 15 IUต่อกรัมซับสเตรต การย่อยด้วยเอนไซม์ทำในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรโดยมีปริมาตรสุดท้าย 300 มิลลิลิตร ใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร อาหาร YP (เพปโทน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร) ปรับพีเอชด้วยซิเทรตบัพเฟอร์ 0.05 M พีเอช 4.8 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม Celluclast 1.5L 15 FPUต่อกรัมซับสเตรต และ Novozym 188 15 IUต่อกรัมซับสเตรต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภายใต้สภาวะการหมักที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างระว่างการหมักที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์กลูโคส และเซลโลไบโอส

5.3 การหมักโดยการย่อยและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

ทำการผลิตเอทานอลโดยมีปริมาตรสุดท้าย 300 มิลลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร อาหาร YP (เพปโทน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร) ปรับพีเอชด้วยซิเทรตบัพเฟอร์ 0.05 M พีเอช 4.8 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม Celluclast 1.5L 15 FPUต่อกรัมซับสเตรต และ Novozym 188 15 IUต่อกรัมซับสเตรต ใช้ความเข้มข้นของยีสต์ 10 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะการหมักที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างระว่างการหมักที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิต กลูโคส เซลโลไบโอส และเอทานอล

5.4 การพรีไฮโดรลิซิสก่อนการหมักการย่อยและหมักพร้อมกัน (Prehydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation, PSSF)

การทำพรีไฮโดรลิซิสก่อนหมักแบบ SSF มีปริมาตรสุดท้าย 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ขั้นตอนของการทำพรีไฮโดรลิซิสใช้เวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงลดอุณหภูมิลงเป็น 40 องศาเซลเซียส และเติมเชื้อยีสต์ วิธีการทดลองเหมือนการหมักแบบ SSF

6. การวิเคราะห์

6.1 การวิคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไม้และเยื่อ ได้แก่ สารแทรก เซลลูโลส เพนโตแซน ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด เถ้า และโฮโลเซลลูโลส ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ของ Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) แสดงในภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี spread plate ลงบนอาหารวุ้น และนับจำนวนเซลล์ที่เจริญ แสดงในภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอลด้วย High Performance Liquid Chromatography คอลัมน์ Aminex HPX-87H Mobil phase กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.005 M Flow rate 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที Oven 65 องศาเซลเซียส

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส, ไซโลส และเซลโลไบโอสด้วย Hight Performance Liquid Chromatography คอลัมน์ Aminex HPX-87P Mobil phase น้ำกลั่น Flow rate 0.6 มิลลิตรต่อนาที Oven 80 องศาเซลเซียส แสดงในภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์

6.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วย Gas Chromatography คอลัมน์ VF-1MS อุณหภูมิ Injector 160 องศาเซลเซียส Detector 250 องศาเซลเซียส Oven 45 องศาเซลเซียส แสดงในภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยแบบจำลองเชิงเส้นตรง (General linear model หรือ GLM) แลการทดสอบความแตกต่างแบบ least significant difference หรือ LSD ที่ระดับความน่าเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SAS รุ่น 8.01 (SAS, 2000) ตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ง การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

8. สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ห้องปฏิบัติการภาควิชาวนผลิตภัณฑ์ คณะวนศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีเยื่อและกระดาษ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาทำการวิจัย ระยะเวลาวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2552 ถึงเดือนมิถุนายน 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. องค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมัน

ตารางที่ 10 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมันที่ใช้ศึกษาพบว่าสัดส่วนของเซลลูโลสและลิกนิน (40.83 และ 21.64 เปอร์เซ็นต์) มีค่าใกล้เคียงกับฟางข้าว (Linde *et al*., 2007) และชานอ้อย (Neureiter *et al*., 2002) ที่สามารถนำไปใช้ผลิตเอทานอล แสดงว่าลำต้นปาล์มน้ำมันสามารถนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล ดังนั้นจากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบจึงบอกได้ถึงแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมัน

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง
แอลฟาเซลลูโลส	40.83 ± 0.20
เพนโตแซน (เฮมิเซลลูโลส)	29.53 ± 0.48
ลิกนิน (ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด, AIL)	21.64 ± 0.37
สารแทรกที่ละลายในเบนซีน-เอทานอล	8.53 ± 0.65
เถ้า	2.40 ± 0.01

จากข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมันพบว่าองค์ประกอบหลักคือเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยวิเคราะห์เซลลูโลสในรูปแอลฟาเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลสในรูปเพนโตแซน (คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ในเฮมิเซลลูโลส) และลิกนินในรูปลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (Acid insoluble lignin, AIL) โดยจุดประสงค์ของการทดลองส่วนแรกต้องการทำให้เยื่อมีสัดส่วนของเซลลูโลสมากที่สุด แต่พบว่าส่วนประกอบของลำต้นปาล์มน้ำมันมีสัดส่วนที่ไม่ต้องการมาก (เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน) ซึ่งจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์เป็นผลให้ได้กลูโคสปริมาณต่ำ จึงต้องหาวิธีในการกำจัดออกให้มากที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการพรีทรีตเมนต์ชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ

การระเบิดด้วยไอน้ำเป็นการพรีทรีตเมนต์ทางเคมีกายภาพที่ไม่ใช้ตัวเร่ง โดยให้ความร้อนแก่ชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมันที่อุณหภูมิ 200 และ 210 องศาเซลเซียส (ความดัน 16 และ 19 กิโลกรัมต่อตารางเซ็นติเมตร) คงเวลาไว้ 2, 4 และ 6 นาที กับไอน้ำความดันสูงในขั้นตอนนี้จะทำให้เกิดกรดแอซีติกและกรดอื่น ๆ ซึ่งเฮมิเซลลูโลสจะถูกไฮโดรลิซิสด้วยกรดเหล่านี้ ทำให้บางส่วนกลายเป็นมอโนแลโอลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อครบกำหนดเวลาไอน้ำจะถูกปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการระเบิดของโครงสร้างของชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน ซึ่งแสดงผลได้และผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อหลังระเบิดด้วยไอน้ำตามสภาวะความรุนแรง (Log R_0) ที่แตกต่างกันดังตารางที่ 11 พบว่าสัดส่วนเพนโตแซนลดลงตามความรุนแรงของสภาวะ โดยสภาวะที่ทำให้สัดส่วนเพนโตแซนต่ำที่สุดคือ อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เวลา 6 นาที (Log R_0 เท่ากับ 4.02) เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสถูกทำลายได้ง่ายเมื่อใช้อุณหภูมิสูงในการเร่งการไฮโดรลิซิสและเวลาในการทำปฏิกิริยา (Ruiz *et al.*, 2008) และจุดประสงค์ของการระเบิดด้วยไอน้ำคือการทำให้โครงสร้างภายใน (เฮมิเซลลูโลส) ของลิกโนเซลลูโลสแตกออก (Dale and Moelhman, 2000) สัดส่วนเซลลูโลสมีการลดลงเล็กน้อยเนื่องจากอุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยา และพบว่าการระเบิดด้วยไอน้ำไม่มีผลต่อสัดส่วนลิกนินสอดคล้องกับ Glasser and Wright (1998) แต่พบว่าสัดส่วนของลิกนินเพิ่มขึ้นเนื่องจากองค์ประกอบอยู่ในรูปของสัดส่วนเมื่อมีการลดลงของบางองค์ประกอบจะเป็นผลให้สัดส่วนที่มีความแข็งแรงหรือไม่มีผลกระทบสูงขึ้น และเปอร์เซ็นต์ผลได้ของเยื่อมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 74-88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงเมื่อมีค่าความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำ

Log R_0	สภาวะ	ผลได้เยื่อ	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง)				
			เซลลูโลส	เพนโตแซน	ลิกนิน	เถ้า	อื่น ๆ
3.24	200°C, 2 นาที	88.84	38.45	18.45	21.12	3.38	18.60
3.54	210°C, 2 นาที	85.92	38.29	17.12	23.74	3.59	17.26
3.55	200°C, 4 นาที	85.92	39.02	15.77	26.74	3.39	15.08
3.72	200°C, 6 นาที	82.66	39.44	10.49	29.07	3.90	17.10
3.84	210°C, 4 นาที	77.40	38.14	9.16	28.94	3.99	19.77
4.02	210°C, 6 นาที	74.05	37.02	5.29	34.50	4.28	18.91

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 11 พบว่าสัดส่วนเพนโตแซนลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบลำต้นปาล์มน้ำมัน เนื่องจากเพนโตแซนเป็นตัวแทนของเฮมิเซลลูโลสซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมโยงระหว่างลิกนินและเซลลูโลสมีโครงสร้างอ่อนแอจึงถูกสลายได้ง่าย แสดงให้เห็นว่าการระเบิดด้วยไอน้ำมีผลทำให้สัดส่วนของเพนโตแซนลดลงอย่างเดียว และยังพบว่าการระเบิดด้วยไอน้ำทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำตาล 5 คาร์บอนและน้ำตาล 6 คาร์บอน ไปเป็นเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอลซึ่งเป็นสารพิษที่มีผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์ในกระบวนการหมักเอทานอล (Larsson et al., 1999) ปริมาณสารพิษที่เกิดขึ้นแสดงในตารางที่ 12 หลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อนสารต่าง ๆ ที่ยังคงตกค้างอยู่ในเยื่อจะถูกชะออกอยู่ในรูปสารละลาย เช่น น้ำตาลไซโลส, น้ำตาลกลูโคส, โอลิโกเมอร์, เฟอร์ฟูรอล, 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอล เป็นต้น ผลขององค์ประกอบทางเคมีหลังการสกัดด้วยน้ำร้อนแสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 12 ปริมาณเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอลในน้ำหลังการสกัดด้วยน้ำร้อน

logRo	สภาวะ	เฟอร์ฟูรอล (กรัมต่อลิตร)	5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอล (กรัมต่อลิตร)
3.24	200°C 2 นาที	0.63	0.66
3.54	210°C 2 นาที	0.80	1.23
3.55	200°C 4 นาที	0.74	1.14
3.72	200°C 6 นาที	0.90	1.87
3.84	210°C 4 นาที	1.18	2.33
4.02	210°C 6 นาที	1.38	2.96

ผลการทดลองจากตารางที่ 12 แสดงให้เห็นถึงปริมาณเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอล ในสารละลายหลังสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าแนวโน้มปริมาณเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอลเพิ่มขึ้นเมื่อมีสภาวะความรุนแรงเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของเวลาและอุณหภูมิจะทำให้ไซโลสและกลูโคสเกิดปฏิกิริยาการขจัดน้ำ (dehydration) กลายเป็นเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอลเกิดขึ้นตามลำดับ (วิทยา, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการสกัดด้วยน้ำร้อน

Log R_0	สภาวะ	ผลได้เยื่อ	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง)				
			เซลลูโลส	เพนโตแซน	ลิกนิน	เถ้า	อื่น ๆ
3.24	200°C, 2 นาที	69.43	50.69 [c]	15.73 [a]	24.41 [c]	0.68	8.49
3.54	210°C, 2 นาที	61.19	55.51 [b]	9.81 [b]	26.28 [b]	0.40	8.00
3.55	200°C, 4 นาที	64.39	56.03 [b]	8.17 [b]	26.74 [b]	0.52	8.54
3.72	200°C, 6 นาที	63.26	57.04 [a,b]	4.48 [c]	28.80 [a]	0.39	9.29
3.84	210°C, 4 นาที	65.68	58.83 [a]	4.03 [c]	27.12 [b]	0.34	9.68
4.02	210°C, 6 นาที	62.96	56.53 [b]	2.84 [c]	26.47 [b]	0.27	13.89

หมายเหตุ a,b,c: กลุ่มตัวอย่างทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ในขั้นตอนการสกัดด้วยน้ำร้อนมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดน้ำตาลโมโน, โอลิโกแซ็กคาไรด์และสารต่าง ๆ ที่ตกค้างในเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจาการระเบิดด้วยไอน้ำออกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยด่างในขั้นตอนต่อไป ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อหลังการสกัดด้วยน้ำร้อนแสดงดังตารางที่ 13 พบว่าสัดส่วนของเพนโตแซนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อหลังการระเบิดด้วยไอน้ำ เนื่องจากน้ำร้อนและระดับความรุนแรง (severity factor) มีคุณสมบัติในการละลายน้ำตาล 5 คาร์บอนที่ยังเหลืออยู่ในเยื่อ สัดส่วนของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น และสัดส่วนลิกนินบางสภาวะลดลง

จากการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยน้ำร้อนพบว่าสัดส่วนของเพนโตแซนต่ำที่สุดคือ 2.84 เปอร์เซ็นต์ที่ความรุนแรง 4.02 โดยสัดส่วนเซลลูโลสสูงที่สุดคือ 58.83เปอร์เซ็นต์ที่ความรุนแรง 3.84 และสัดส่วนลิกนินต่ำที่สุดคือ 24.41 เปอร์เซ็นต์ที่ความรุนแรง 3.24 ซึ่งสภาวะที่มีความเหมาะของการนำไปใช้อยู่คนละสภาวะกันจึงมีความจำเป็นต้องเลือกสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้การคำนวณความแตกต่างทางสถิติซึ่งบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

เมื่อคำนวณทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม (ภาพผนวกที่ ค1-ค3) จากตารางที่ 13 โดยเลือกผลจากเพนโตแซนที่ลดลงเป็นหลัก และใช้สัดส่วนของเซลลูโลสและลิกนินเป็นส่วนประกอบ พบว่าค่าสัดส่วนของเพนโตแซนที่น้อยที่สุดอยู่ในกลุ่มของความรุนแรง 3.72, 3.84 และ 4.02 ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงที่สุดคือ ความรุนแรง 3.84 และสัดส่วนลิกนินต่ำที่สุดคือ 3.24 แสดงให้เห็นว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สภาวะที่มีสัดส่วนเพนโตแซนต่ำที่สุด และมีสัดส่วนเซลลูโลสสูงที่สุดมีความสัมพันธ์กัน จึงเลือกสภาวะความรุนแรง 3.84 คือสภาวะของการระเบิดด้วยไอน้ำอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ขั้นต้นเพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกจากชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน โดยมีประสิทธิภาพทำให้เพนโตแซนลดลง 87.37% (จาก 29.53% เป็น 4.03%) พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของเยื่อหลังจากการสกัดด้วยน้ำร้อนมีค่าในช่วงระหว่าง 61-69 เปอร์เซ็นต์

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่างของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน ออกแบบการทดลองโดยวิธีทะกุจิ

ขั้นตอนการสกัดด้วยด่างมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อกำจัดลิกนินออกจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน อีกทั้งทำให้โครงสร้างของเยื่อเกิดการขยายตัวเป็นผลดีต่อการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ (Kim *et al*., 2003) หลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำร้อน แล้วผ่านการสกัดด้วยด่าง ณ สภาวะต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ซึ่งออกแบบการทดลองโดยวิธีทะกุจิ (ตารางที่ 9) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน ได้ผลดังตารางที่ 14

เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการสกัดด้วยด่างคือการกำจัดลิกนินออกให้มีสัดส่วนของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น การวิเคราะห์ผลการทดลองจึงใช้ค่าสัดส่วนเซลลูโลส และลิกนิน เป็นพารามิเตอร์หลัก เพนโตแซนเป็นพารามิเตอร์รอง ซึ่งการวิเคราะห์ผลจะแบ่งออกเป็น 1) การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อสัดส่วนเซลลูโลส, ลิกนิน และเพนโตแซน 2) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่าง 3) การประมาณค่าสัดส่วนเซลลูโลส และลิกนิน ที่ได้จากการสกัดด้วยด่างที่สภาวะที่เหมาะสม

3.1 การหาค่าอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อสัดส่วนเซลลูโลส, ลิกนิน และเพนโตแซนของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยและระดับที่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งเป็นค่าที่สามารถบอกได้ว่าปัจจัยที่ใช้ในการทดลองใดมีผลต่อการสกัดด้วยด่าง และมีอิทธิพลมากหรือน้อย ดังตารางที่ 15, 16 และ 17

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยด่าง ณ สภาวะที่แตกต่างกัน

การทดลอง	ผลได้เยื่อ	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง)				
		เซลลูโลส	ลิกนิน	เพนโตแซน	เถ้า	อื่น ๆ
1	25.07	79.92	7.03	3.04	0.74	9.27
2	24.37	86.67	7.34	3.00	0.62	2.37
3	22.74	87.61	6.63	3.00	0.64	2.12
4	25.52	81.21	8.82	2.19	0.89	6.89
5	23.53	84.40	9.36	2.27	0.69	4.19
6	23.66	82.31	8.89	2.28	0.78	5.74
7	22.51	83.28	9.68	1.91	1.06	4.07
8	24.49	84.24	11.03	2.08	0.84	1.81
9	22.49	83.08	9.25	1.72	0.83	5.01

หมายเหตุ ระดับของปัจจัยในแต่ละชุดการทดลองแสดงในตารางที่ 9

นอกจากนี้การวิเคราะห์ความแปรปรวนยังสามารถบอกได้ถึงระดับความเชื่อมั่นของปัจจัยการทดลองที่มีต่อการสกัดด้วยด่าง สามารถหาได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยจะแสดงถึงร้อยละอิทธิพลของปัจจัยการทดลอง (Percent contribution) ที่มีผลต่อการสกัดด้วยด่าง ได้ผลการวิเคราะห์สรุปดังตารางที่ 18, 19 และ 20

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัยในเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันในตารางที่ 15, 16 และ 17 พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสสูงที่สุดคือ อุณหภูมิ (44.56 เปอร์เซ็นต์) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อเซลลูโลสน้อยที่สุดคือ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (18.95 เปอร์เซ็นต์) ส่วนปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการลดสัดส่วนของลิกนินและเพนโตแซนสูงที่สุดคือ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (69.21และ 68.69 เปอร์เซ็นต์) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อลิกนินน้อยที่สุดคือ เวลาการสกัด (9.29 เปอร์เซ็นต์) และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อเพนโตแซนน้อยที่สุดคือ อุณหภูมิการสกัด (14.25 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งจากตารางอิทธิพลหลักสามารถบอกได้ปัจจัยและระดับที่ดีสุดด้วย เช่น จากตารางที่ 15 อิทธิพลหลักที่มีผลต่อเซลลูโลสมากที่สุดคือ ปัจจัยของอุณหภูมิที่ระดับที่ 2 (80 องศาเซลเซียส)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อสัดส่วนเซลลูโลสของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยด่าง

สัดส่วนเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)					
ปัจจัย	ระดับ			ค่าอิทธิพลหลัก[1]	ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก[2]
	1	2	3		
ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)	38.553	38.376	38.436	0.176	18.945
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	38.218	38.632	38.516	0.414	44.564
เวลา (นาที)	38.291	38.446	38.630	0.339	36.491

หมายเหตุ [1] ผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

[2] การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 16 อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อสัดส่วนลิกนินของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยด่าง

สัดส่วนลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)					
ปัจจัย	ระดับ			ค่าอิทธิพลหลัก[1]	ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก[2]
	1	2	3		
ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)	-16.902	-19.110	-19.970	3.068	69.208
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	-18.538	-19.199	-18.246	0.953	21.498
เวลา (นาที)	-18.931	-18.5190	-18.532	0.412	9.294

หมายเหตุ [1] ผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

[2] การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 17 อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อสัดส่วนเพนโตแซนของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยด่าง

สัดส่วนเพนโตแซน (เปอร์เซ็นต์)					
ปัจจัย	ระดับ			ค่าอิทธิพลหลัก[1]	ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก[2]
	1	2	3		
ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)	-9.576	-7.041	-5.884	3.692	68.688
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	-7.362	-7.953	-7.187	0.766	14.251
เวลา (นาที)	-7.992	-7.075	-7.434	0.917	17.060

หมายเหตุ [1] ผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด
[2] การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

Factor	DOF	SS	V	F	S'	Percent contribution (%)	Confidence (%)	Significant
NaOH (%)	2	0.048	0.024	1.076	0.003	0.633	51.83	-
Temperature (^{o}C)	2	0.272	0.136	6.080	0.227	42.122	85.88	-
Time (min)	2	0.175	0.087	3.904	0.130	33.164	79.61	-
Other Error	2	0.044	0.022			33.164		
Total	8	0.540				100		

หมายเหตุ การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการลดสัดส่วนลิกนินของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

Factor	DOF	SS	V	F	S'	Percent contribution (%)	Confidence (%)	Significant
NaOH (%)	2	15.027	7.513	359.184	14.985	89.037	99.72	**
Temperature (^{o}C)	2	1.431	0.715	34.211	1.389	8.255	97.16	*
Time (min)	2	0.330	0.165	7.890	0.288	1.712	88.75	-
Other Error	2	0.041	0.020			0.996		
Total	8	16.83				100		

หมายเหตุ * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$)

การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

เมื่อพิจารณาค่าร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) แต่ละปัจจัย จากผลการวิเคราะห์ ANOVA ในตารางที่ 18, 19 และ 20 พบว่า อุณหภูมิ มีค่าร้อยละอิทธิพลของเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด คือ 42.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจากระดับความเชื่อมั่นพบว่า อุณหภูมิไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงว่าการสกัดด้วยด่างของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันส่งผลในส่วนของเซลลูโลสน้อยแต่พบว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการลดลงของสัดส่วนลิกนินอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีค่าร้อยละอิทธิพลของการลดสัดส่วนลิกนินและเพนโตแซนสูงสุด คือ 89.04 และ 85.70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจากระดับความเชื่อมั่น พบว่าความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์มีอิทธิพลต่อการลดลงของสัดส่วนลิกนินอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และการลดลงของเพนโตแซนอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากผลการวิเคราะห์พบว่าความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์มีผลต่อการลดลงของสัดส่วนลิกนินและเพนโตแซนมากที่สุด แต่มีผลน้อยต่อการเพิ่มขึ้นสัดส่วนเซลลูโลส สอดคล้องกับคุณสมบัติของแอลฟาเซลลูโลสที่ไม่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ (วรณี และวิชัย, 2546)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการลดสัดส่วนเพนโตแซนของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

Factor	DOF	SS	V	F	S'	Percent contribution (%)	Confidence (%)	Significant
NaOH (%)	2	21.389	10.694	35.136	20.78	85.702	97.230	*
Temperature (^{o}C)	2	0.966	0.483	1.588	0.358	1.477	61.360	-
Time (min)	2	0.282	0.641	2.106	0.673	2.777	67.800	-
Other Error	2	0.608	0.304			10.044		
Total	8	24.247				100		

หมายเหตุ * ($p<0.05$)

การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

การพรีทรีตเมนต์ด้วยการสกัดด้วยด่างมีอิทธิพลต่อการลดลงของลิกนินและเพนโตแซนอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่พบว่าไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เพราะจุดประสงค์ของการสกัดด้วยด่างคือการกำจัดลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ซึ่ง Kim *et al.* (2003) ทำการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลโดยใช้แอมโมเนียไหลผ่านพบว่าสามารถลดปริมาณเฮมิเซลลูโลสลง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ทำให้เซลลูโลสเกิดการสลายตัว สอดคล้องกับงานวิจัยนี้

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่างของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

หลักในการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทะกุจิแบ่งประเภทของการทดลองออกเป็น 3 ประเภท คือ The Smaller is better, The Nominal is better และ The Bigger is better ซึ่งการทดลองนี้จัดอยู่ในทั้งประเภท The Bigger is better (B) และ The Smaller is better (S) โดยต้องการสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุดจึงใช้ประเภท The Bigger is better อีกด้าน ต้องการสัดส่วนลิกนิน เฮมิเซลลูโลสต่ำสุด จึงใช้ประเภท The Smaller is better การทดลองครั้งนี้สนใจที่ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และสัดส่วนลิกนินต่ำสุด จึงต้องหาสภาวะที่ให้ได้สัดส่วนดังกล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำค่าสัดส่วนเซลลูโลส, ลิกนิน และเพนโตแซน ของ 9 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ หาค่าอัตราส่วน Signal-to-Noise (S/N-Ratio) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดลอง การคำนวณหาค่าอัตราส่วน S/N แสดงในภาคผนวก ข โดยนำอัตรา S/N มาคำนวณร้อยละอิทธิพลหลักของปัจจัยของการทดลองในแต่ละระดับการทดลอง ซึ่งสรุปผลดังตารางที่ 21

นำอัตราส่วน S/N จากตารางที่ 21 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วน S/N กับปัจจัยของการทดลองในแต่ละระดับ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดด้วยด่าง โดยอัตราส่วน S/N มีความสัมพันธ์กับผลการทดลองคือ การทดลองที่มีค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูง ทำให้การทดลองนั้นมีอัตราส่วน S/N สูงด้วย เนื่องจากเป็นการออกแบบการทดลองแบบ QC=B (Bigger is better) การทดลองที่มีการลดสัดส่วนของลิกนินและเพนโตแซน ทำให้การทดลองนั้นมีอัตราส่วน S/N ต่ำ เนื่องจากเป็นการออกแบบการทดลองแบบ QC=S (Smaller is better) ผลแสดงดังภาพที่ 18, 19 และ 20

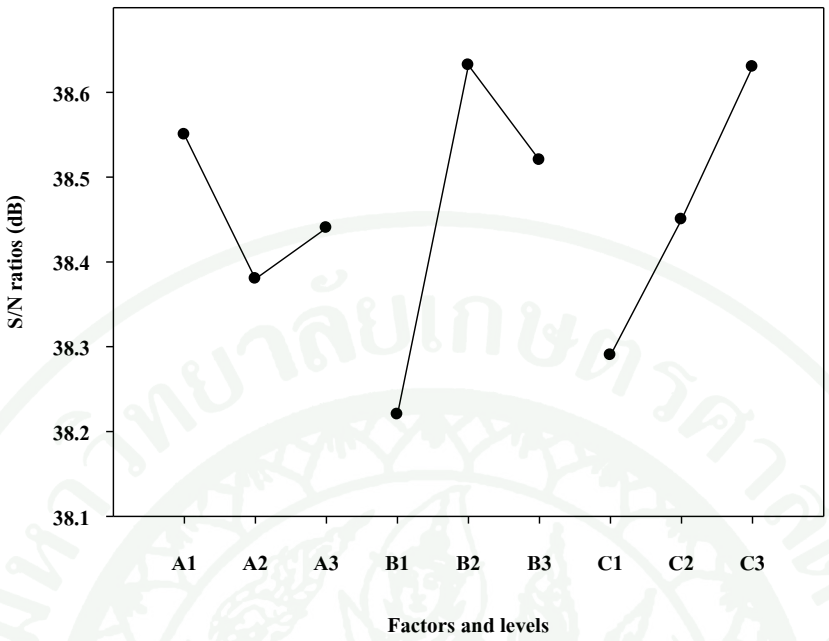
จากภาพที่ 18, 19 และ 20 การพิจารณาระดับของแต่ละปัจจัยที่มีอัตราส่วน S/N สูงสุด แสดงว่าเป็นสภาวะที่ดีที่สุด 3 สภาวะ คือ สภาวะที่ทำให้สัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และสภาวะที่ทำให้สัดส่วนลิกนิน และเพนโตแซนต่ำสุด จากการพรีทรีตเมนต์ขั้นต้นด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำทำให้สัดส่วนของเพนโตแซนลดลงอย่างมาก อีกทั้งการพรีทรีตเมนต์ด้วยการสกัดด่างมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินซึ่งทำให้สัดส่วนของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น จึงพิจารณาเลือกสภาวะที่ให้เซลลูโลสสูงสุดและทำให้ลิกนินเหลือน้อยที่สุดเพียงสภาวะเดียว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

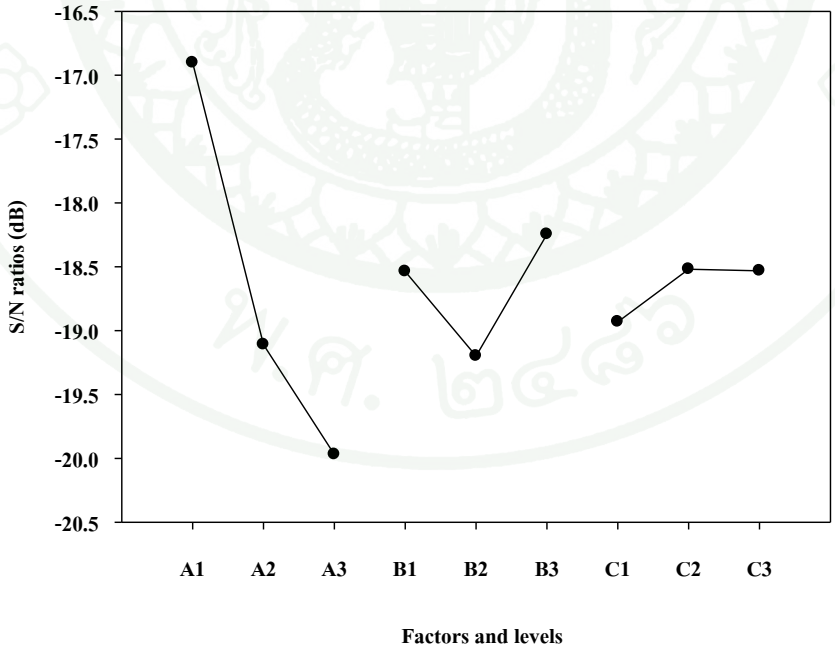
ตารางที่ 21 สรุปค่าสัดส่วน S/N ของค่าสัดส่วนเซลลูโลส ลิกนิน และเพนโตแซน จากการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการสกัดด้วยด่าง

ชุดการทดลอง	สัดส่วนเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)				สัดส่วนลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)				สัดส่วนเพนโตแซน (เปอร์เซ็นต์)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	อัตราส่วน S/N (เดซิเบล)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	อัตราส่วน S/N (เดซิเบล)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	อัตราส่วน S/N (เดซิเบล)
1	80.64	79.99	79.13	38.052	6.40	7.11	7.58	-16.960	3.13	2.96	3.02	-9.650
2	86.5	86.73	86.78	38.757	7.46	7.20	7.35	-17.311	2.94	3.03	3.02	-9.534
3	87.99	87.63	87.22	38.851	6.75	6.55	6.60	-16.436	2.96	3.03	3.01	-9.543
4	81.84	80.78	81.01	38.191	8.17	8.80	9.48	-18.923	2.12	2.23	2.23	-6.825
5	85.6	85.74	84.87	38.629	9.44	9.15	9.50	-19.43	2.36	2.08	2.38	-7.149
6	82.31	82.67	81.96	38.309	9.00	8.82	8.85	-18.979	2.33	2.17	2.33	-7.151
7	83.2	83.65	82.99	38.41	9.50	9.22	10.33	-19.731	1.95	1.95	1.82	-5.610
8	83.85	84.4	84.47	38.51	11.65	10.72	10.71	-20.856	2.26	2.21	2.38	-7.176
9	82.63	83.31	83.29	38.389	9.18	9.36	9.21	-19.324	2.16	1.63	1.37	-4.866

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

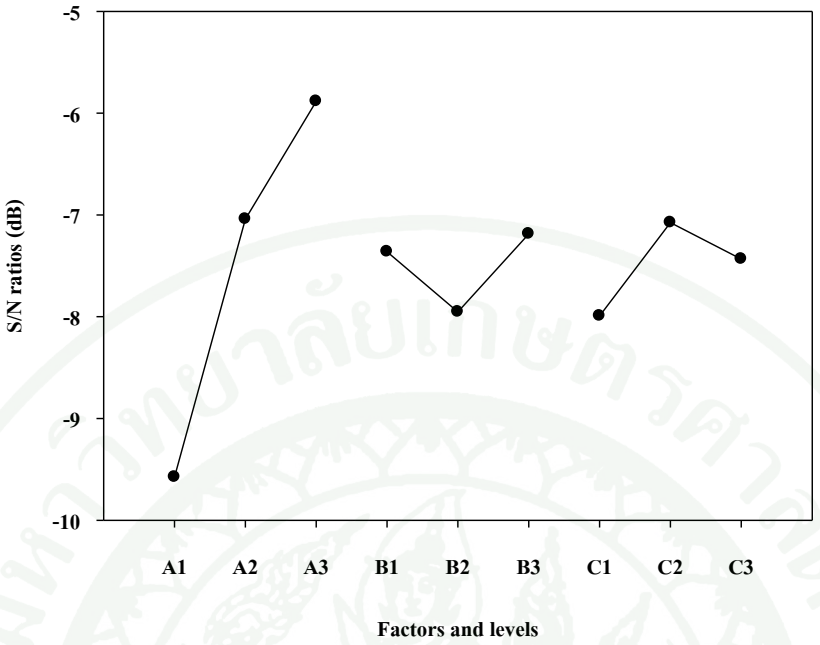


ภาพที่ 18 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 19 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการลดสัดส่วนลิกนินของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการลดสัดส่วนเพนโตแซนของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

จากภาพที่ 18 และ 19 พิจารณาปัจจัยแต่ละระดับที่มีอัตราส่วน S/N สูงสุดของการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และลดสัดส่วนลิกนินในเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน พบว่าปัจจัยความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (A) ทั้งสองสภาวะมีระดับเดียวกัน แต่พบว่าอุณหภูมิ (B) และเวลา (C) มีความแตกต่างกัน สรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ดังตารางที่ 22

จากตารางที่ 22 พิจารณาชุดการทดลอง A และ B เป็นสภาวะที่ไม่ได้อยู่ในการทดลองซึ่งข้อแตกต่างของสภาวะทั้งสองคือ อุณหภูมิและเวลา โดยชุดการทดลอง A สภาวะของอุณหภูมิต่ำ (80 องศาเซลเซียส) และเวลายาวนาน (90 นาที) ชุดการทดลอง B สภาวะของอุณหภูมิสูง (90 องศาเซลเซียส) และเวลาสั้น (60 นาที) ซึ่งผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสอดคล้องกับการทดลองของ Yang *et al.* (2007) ได้ศึกษาการสลายตัวของชีวมวลพบว่าลิกนินสลายตัวได้ยากต้องใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูงกว่าเซลลูโลส ที่สภาวะของชุดการทดลอง A จึงเป็นผลให้เส้นใยเซลลูโลสถูกทำลายน้อยจากการใช้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ทำให้สัดส่วนเซลลูโลสสูง และสภาวะของชุดการทดลอง B เป็นผลให้ลิกนินถูกกำจัดได้มากเนื่องจากใช้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ทำให้สัดส่วนลิกนินลดลงมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 22 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่างของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันคำนวณโดยวิธีทะกุจิ

ปัจจัยการทดลอง	ระดับการทดลอง	สภาวะ
ชุดการทดลอง A		
ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)	1	15
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	2	80
เวลา (นาที)	3	90
ชุดการทดลอง B		
ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)	1	15
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	3	90
เวลา (นาที)	2	60

หมายเหตุ ชุดการทดลอง A คือ สภาวะการสกัดด้วยด่างที่ให้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุดของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

ชุดการทดลอง B คือ สภาวะการสกัดด้วยด่างที่ให้ค่าสัดส่วนลิกนินต่ำสุดของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

3.3 การประมาณค่าสัดส่วนเซลลูโลส และลิกนินของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

การประมาณค่าของชุดการทดลอง A และ B เพื่อหาสัดส่วนเซลลูโลสและลิกนินด้วยวิธีทะกุจิ ทำการยืนยันผลเพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีจากสภาวะดังกล่าว ดังตารางที่ 23 และเปรียบเทียบค่าสัดส่วนเซลลูโลสและลิกนินจากการประมาณค่าและการยืนยันผลการทดลองดังตารางที่ 24

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 23 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันจากการทดลองยืนยันผลของชุดการทดลอง A และ B โดยวิธีทะกุจิ

สภาวะ	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง)				
	เซลลูโลส	ลิกนิน	เพนโตแซน	เถ้า	อื่น ๆ
ชุดการทดลอง A	87.89	7.53	1.29	0.81	2.48
ชุดการทดลอง B	87.14	6.13	1.40	0.75	4.58

หมายเหตุ ชุดการทดลอง A คือ สภาวะการสกัดด้วยด่างที่ให้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุดของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

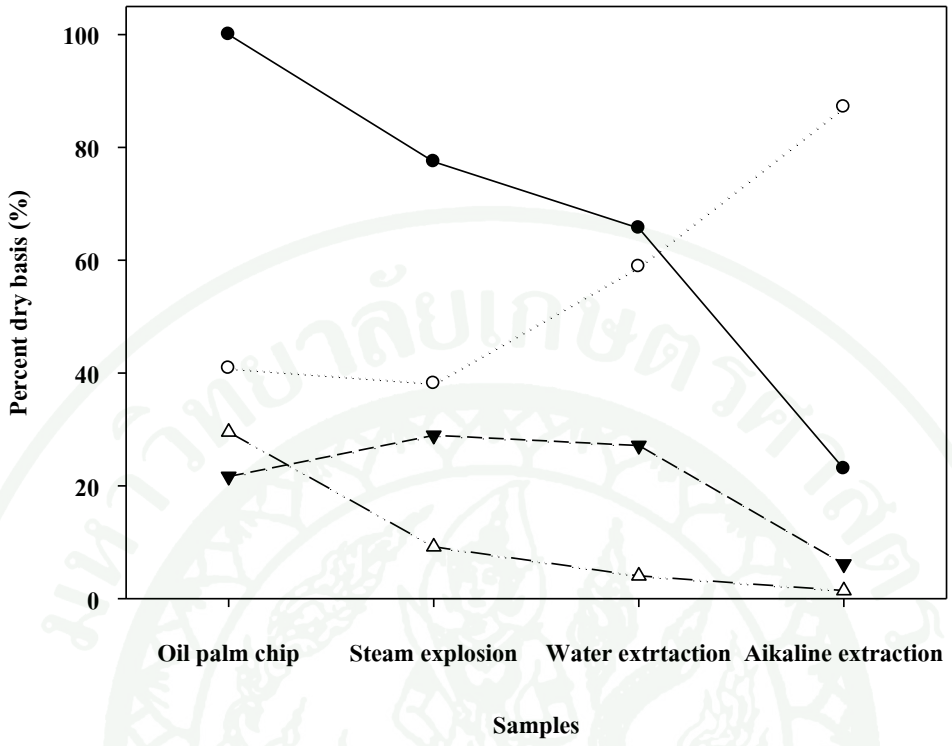
ชุดการทดลอง B คือ สภาวะการสกัดด้วยด่างที่ให้ค่าสัดส่วนลิกนินต่ำสุดของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน

ตารางที่ 24 ค่าสัดส่วนเซลลูโลสและลิกนินที่ได้จากการเปรียบเทียบการประมาณค่าและจากการยืนยันผลการทดลองของการสกัดด่างด้วยสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทะกุจิ

สภาวะการทดลอง	ค่าประมาณ	ยืนยันผลทดลอง
สัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด (ชุดการทดลอง A)	88.12 เปอร์เซ็นต์	87.89 เปอร์เซ็นต์
สัดส่วนลิกนินต่ำที่สุด (ชุดการทดลอง B)	6.57 เปอร์เซ็นต์	6.13 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่างจากสองชุดการทดลองจากสัดส่วนของเซลลูโลสและลิกนิน โดยพบว่าสัดส่วนเซลลูโลสชุดการทดลอง A (88.12 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงกว่าชุดการทดลอง B (87.14 เปอร์เซ็นต์) 0.75 เปอร์เซ็นต์ และสัดส่วนลิกนินชุดการทดลอง A (7.53 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงกว่าชุดการทดลอง B (6.13 เปอร์เซ็นต์) 1.40 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่าค่าสัดส่วนของเซลลูโลสทั้งสองชุดการทดลองมีความแตกต่างกันน้อยมาก อีกทั้งหากมีสัดส่วนลิกนินในปริมาณมากยังทำให้กิจกรรมเอนไซม์ต่ำลง โดยปริมาณลิกนินลดลงจะทำให้ผลได้ของน้ำตาลในการหมักเพิ่มขึ้น (Dien *et al*., 2009) เพราะฉะนั้นผู้ทำวิจัยจึงให้ความสำคัญกับการลดสัดส่วนของลิกนินในชุดการทดลอง B มากกว่าชุดการทดลอง A

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 ผลได้เยื่อและองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นและเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการพรีทรีตเมนต์ขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำ, สกัดด้วยน้ำร้อน และสกัดด้วยด่าง
(สัญลักษณ์ ●, ○, ▲ และ △ แสดงผลได้เยื่อ, สัดส่วนเซลลูโลส, ลิกนิน และเพนโตแซน ตามลำดับ)

จากภาพที่ 21 พบว่าผลได้เยื่อลดลงมากที่สุด 2 ช่วงคือ ช่วงการระเบิดด้วยไอน้ำ และการสกัดด้วยด่าง แสดงว่าการพรีทรีตเมนต์ทั้งสองวิธีมีความรุนแรงจนผลได้เยื่อลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งการลดลงของผลได้เยื่อจะสัมพันธ์กับสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีลำต้นปาล์มน้ำมัน ซึ่งจะต้องมององค์ประกอบในรูปสัดส่วน เมื่อสัดส่วนใดลดลง ก็จะทำให้สัดส่วนอื่นเพิ่มขึ้นมาแทนที่

ขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำทำให้สัดส่วนเพนโตแซนลดลงอย่างชัดเจนเนื่องจากเป็นโครงสร้างที่ถูกทำลายได้ง่ายที่สุดซึ่งส่วนหนึ่งจะเปลี่ยนรูปเป็นน้ำตาลมอโน, โอลิโกแซ็กคาไรด์, เฟอร์ฟูรอล และ5-ไฮดรอกซีเมทิล-เฟอร์ฟูรอล เป็นผลให้สัดส่วนลิกนินเพิ่มขึ้นเนื่องจากโครงสร้างลิกนินเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงที่สุด ความร้อนและแรงดันในระดับต่ำไม่สามารถละลายลิกนินออก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไปได้ เซลลูโลสลดลงเล็กน้อยเนื่องจากเซลลูโลสถูกทำลายได้ที่ความร้อนมากกว่า 100 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการสกัดด้วยน้ำร้อนไม่มีผลกับลิกนินเนื่องจากลิกนินไม่มีการแตกสลายออกเมื่อถูกความร้อนต่ำ มีผลเล็กน้อยต่อเพนโตแซนเนื่องจากเฮมิเซลลูโลสที่ถูกทำลายในขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำยังสะสมอยู่ในเยื่อ เมื่อมีการสกัดด้วยน้ำร้อน สารที่สะสมในเยื่อจะถูกชะออกมาอยู่ในรูปสารละลาย สัดส่วนเซลลูโลสจึงเพิ่มขึ้นมากเนื่องจากสัดส่วนของสารที่สะสมอยู่ในเยื่อได้ถูกชะออกไป สังเกตได้จากผลได้เยื่อที่ลดลงน้อย สัดส่วนลิกนินและเพนโตแซน เปลี่ยนแปลงไม่มาก

ขั้นตอนการสกัดด้วยด่างเป็นขั้นตอนที่มีความรุนแรงมากที่สุดสังเกตจากผลได้เยื่อที่ลดลงมากที่สุด หรืออาจเป็นผลจากการพรีทรีตเมนต์ต่อจากการระเบิดด้วยไอน้ำทำให้ประสิทธิภาพของขั้นตอนนี้เพิ่มขึ้น สัดส่วนของลิกนินและเพนโตแซนลดลง เนื่องจากทั้งลิกนินและเฮมิเซลลูโลสมีความสามารถละลายได้ในสารละลายด่างรวมทั้งการใช้อุณหภูมิเป็นการเร่งปฏิกิริยาอีกด้วย เป็นผลให้เซลลูโลสเพิ่มขึ้นมากที่สุด

ตารางที่ 25 สรุปค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นและเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการพรีทรีตเมนต์ในสภาวะที่เหมาะสม

ตัวอย่างปาล์มน้ำมัน	ผลได้	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง)				
	เยื่อ	เซลลูโลส	ลิกนิน	เพนโตแซน	เถ้า	อื่น ๆ
ชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน	100.00	40.83	21.64	29.53	2.40	5.60
เยื่อหลังการระเบิดด้วยไอน้ำ	77.44	38.14	28.94	9.16	3.99	19.77
เยื่อหลังการสกัดด้วยน้ำร้อน	65.68	58.83	27.12	4.03	0.34	9.68
เยื่อหลังการสกัดด้วยด่าง	23.01	87.14	6.13	1.40	0.75	4.58

หมายเหตุ เยื่อหลังการระเบิดด้วยไอน้ำสภาวะอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที
เยื่อหลังการสกัดด้วยน้ำร้อนสภาวะอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที
เยื่อหลังการสกัดด้วยด่างสภาวะ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที

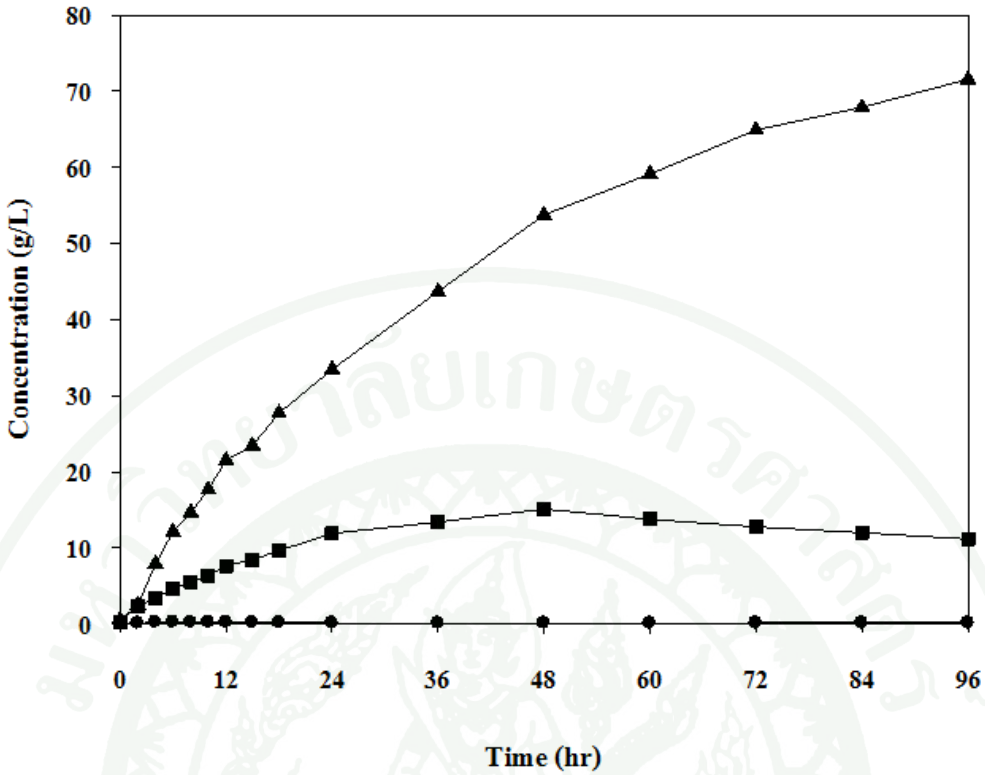
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 25 พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมันมีการเปลี่ยนแปลงจากวัตถุดิบ การระเบิดด้วยไอน้ำ การสกัดด้วยน้ำร้อน และการสกัดด้วยด่าง มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในส่วนของแอลฟาเซลลูโลสเพิ่มขึ้นและลดลิกนินให้เหลือน้อยที่สุด โดยสัดส่วนเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจาก 40.83 เป็น 87.14 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนลิกนินลดลงจาก 21.64 เป็น 6.13 เปอร์เซ็นต์ เพนโตแซนลดลงจาก 29.53 เป็น 1.40 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นประสิทธิภาพการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนเซลลูโลส การลดลงของสัดส่วนลิกนินและเพนโตเซนเท่ากับ 53.14, 71.67 และ95.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จากการพรีทรีตเมนต์หลายขั้นตอนทำให้ผลได้เยื่อลดลงเหลือ 23.01 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการพรีทรีตเมนต์ร่วมกันระหว่างการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยด่าง ทำให้ลำต้นปาล์มน้ำมันเป็นวัตถุดิบที่มีสัดส่วนของเซลลูโลสสูงเป็นการเพิ่มศักยภาพในการใช้เป็นซับสเตรตสำหรับการผลิตเอทานอล

4. การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์

ขั้นตอนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและบีตากลูโคซิเดสเป็นการทดสอบการทำงานและบ่งบอกถึงกิจกรรมเอนไซม์ว่ามีความเหมาะสมต่อเยื่อชนิดนั้นๆหรือไม่ การได้น้ำตาลจากการไฮโดรลิซิสของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของเยื่อ, ปริมาณเซลลูโลส, องค์ประกอบอื่นที่ขัดขวางและสารสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น เพราะฉะนั้นขั้นตอนที่สำคัญขั้นแรกคือการพรีทรีตเมนต์ให้ได้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่มีโครงสร้างที่ง่ายต่อการเข้าทำปฏิกิริยา และมีสัดส่วนเซลลูโลสสูง ทำให้ผลิตกลูโคสได้ในปริมาณมากเพื่อให้เซลล์ใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอลต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

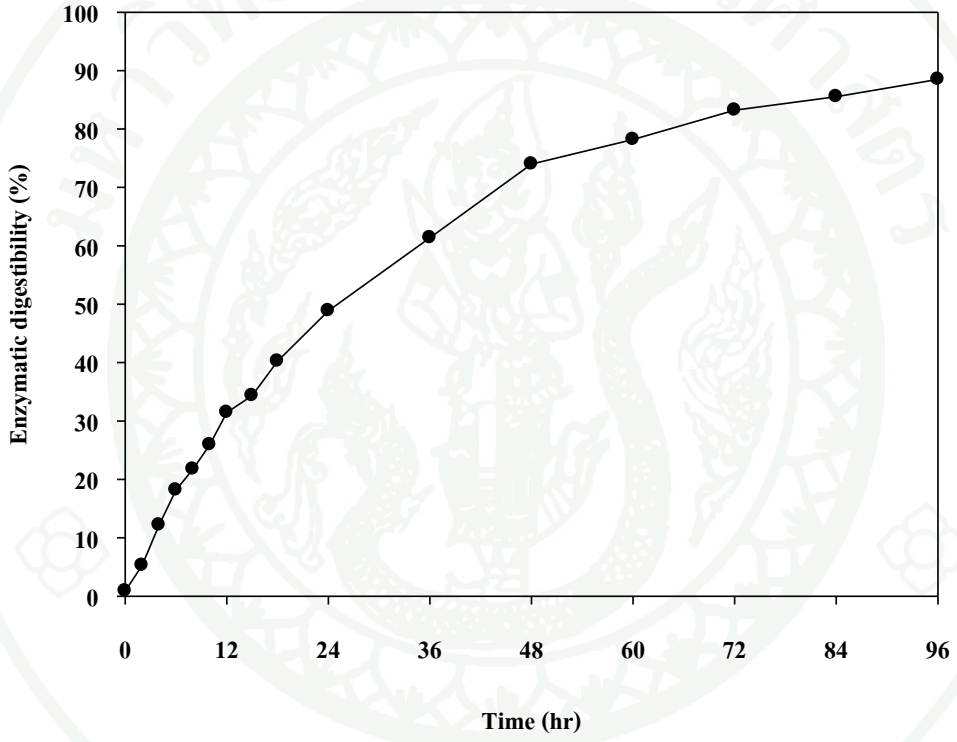


ภาพที่ 22 ความเข้มข้นของกลูโคส, เซลโลไบโอส และไซโลส ระหว่างการใช้เอนไซม์ไฮโดรลิซิสเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง ที่พีเอช 4.8, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง
(สัญลักษณ์ ▲, ■ และ ● แสดงความเข้มข้นกลูโคส, เซลโลไบโอสและไซโลส ตามลำดับ)

ผลการทดลองไฮโดรลิซิสเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยด่าง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Celluclast 1.5L) 15 FPU ต่อกรัมซับสเตรต และบีตากลูโคซิเดส (Novozym 188) 15 IU ต่อกรัมซับสเตรต พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยเติมอาหาร YP (เพปโทน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ดังภาพที่ 22 พบว่ามีอัตราการผลิตกลูโคสเพิ่มขึ้นในช่วงแรก และเมื่อเวลาผ่านไปอัตราการผลิตกลูโคสลดลงเรื่อย ๆ เป็นผลมาจากการยับยั้งเอนไซม์ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ สอดคล้องกับการทดลองของ Garcia-Aparicio *et al.* (2006) ได้ไฮโดรลิซิสฟางข้าวบาเลย์ด้วยเอนไซม์หลังจากพรีทรีตเมนต์โดยการระเบิดด้วยไอน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พบว่ากลูโคสความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตรทำให้อัตราการไฮโดรลิซิสลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าเมื่อมีไซโลส, อะราบิโนส, กาแลกโตส และแมนโนสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรทำให้อัตราการไฮโดรลิซิสลดลง 35, 13, 11.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ชั่วโมง 96 ทำให้เกิดกลูโคส 71.57 กรัมต่อลิตร เซลโลไบโอส 11.17 กรัมต่อลิตร และไซโลส 0.14 กรัมต่อลิตร เหลือเยื่อหลังการย่อย 7.78 กรัมน้ำหนักแห้ง จากเยื่อเริ่มต้น 30 กรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณเยื่อเหลือและเซลโลไบโอสที่ยังเหลืออยู่ในปริมาณมากแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ลดลง



ภาพที่ 23 เปอร์เซ็นต์ Digestibility ระหว่างการใช้เอนไซม์ไฮโดรลิซิสเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่พีเอช 4.8, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

จากภาพที่ 23 พบว่าได้ค่า Digestibility เท่ากับ 88.51 เปอร์เซ็นต์, ผลได้กลูโคส ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.75 กรัมกลูโคสต่อกรัมเซลลูโลส และอัตราการเกิดกลูโคส (Q_P) เท่ากับ 0.74 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อปรียบเทียบผลการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์กับ Jung *et al.* (2011) ที่ใช้ลำต้นปาล์มน้ำมัน

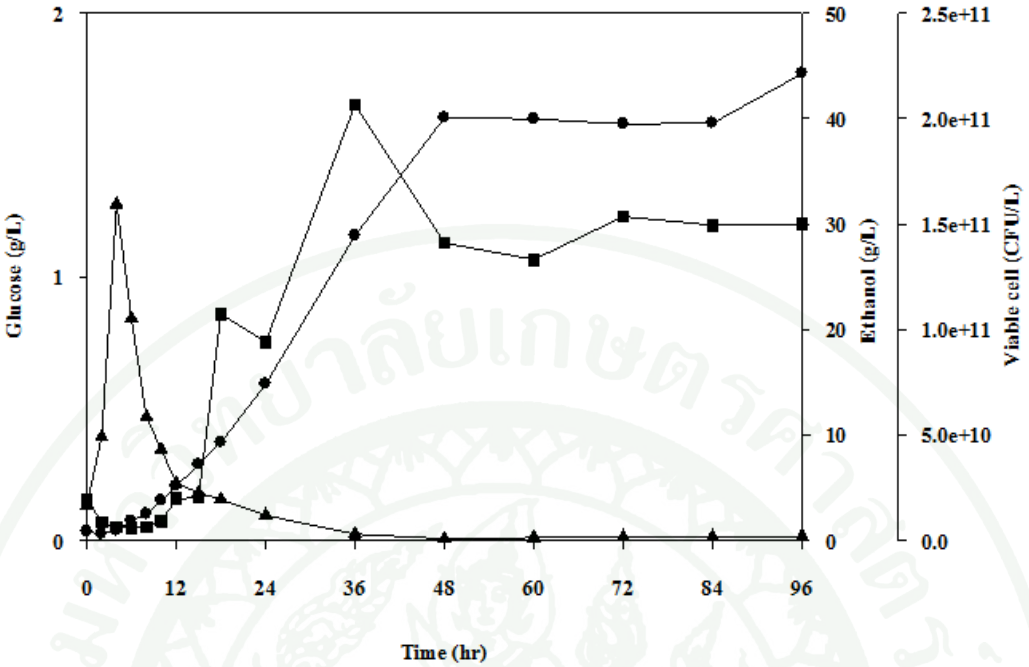
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นวัตถุดิบและพรีทรีตเมนต์โดยใช้แอมโมเนียเหลว (SAA) พบว่ามีค่าการย่อยด้วยเอนไซม์เท่ากับ 61.2 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าต่ำกว่างานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่างมีความเหมาะสมเป็นซับสเตรตในการหมักเพราะไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ได้ง่ายและให้กลูโคสปริมาณสูง

5. อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกัน

การผลิตเอทานอลโดยวิธีการย่อยและหมักพร้อมกัน (SSF) ในการทดลองนี้เป็นการหาสภาวะการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์และยีสต์ โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส จากวนิดา (2553) พบว่าสภาวะการย่อยและหมักพร้อมกัน ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดของไม้ยูคาลิปตัส คือเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในการทดลองจึงพิจารณาคงปริมาณเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ และเห็นว่า *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 จากองค์การสุรามีความสามารถในการทนอุณหภูมิจึงแปรผันอุณหภูมิดังกล่าว พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทั่วไปมีอัตราการเจริญดีที่สุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 30-36 องศาเซลเซียสซึ่งทำให้มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.30 ใช้เอนไซม์เซลลูเลส (Celluclast 1.5L) 15 FPU ต่อกรัมซับสเตรต และบีตากลูโคซิเดส (Novozym 188) 15 IU ต่อกรัมซับสเตรต พีเอช 4.8 โดยเติมอาหาร YP (เพปโทน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในกระบวนการผลิตเอทานอล ดังภาพที่ 24, 25 และ 26

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

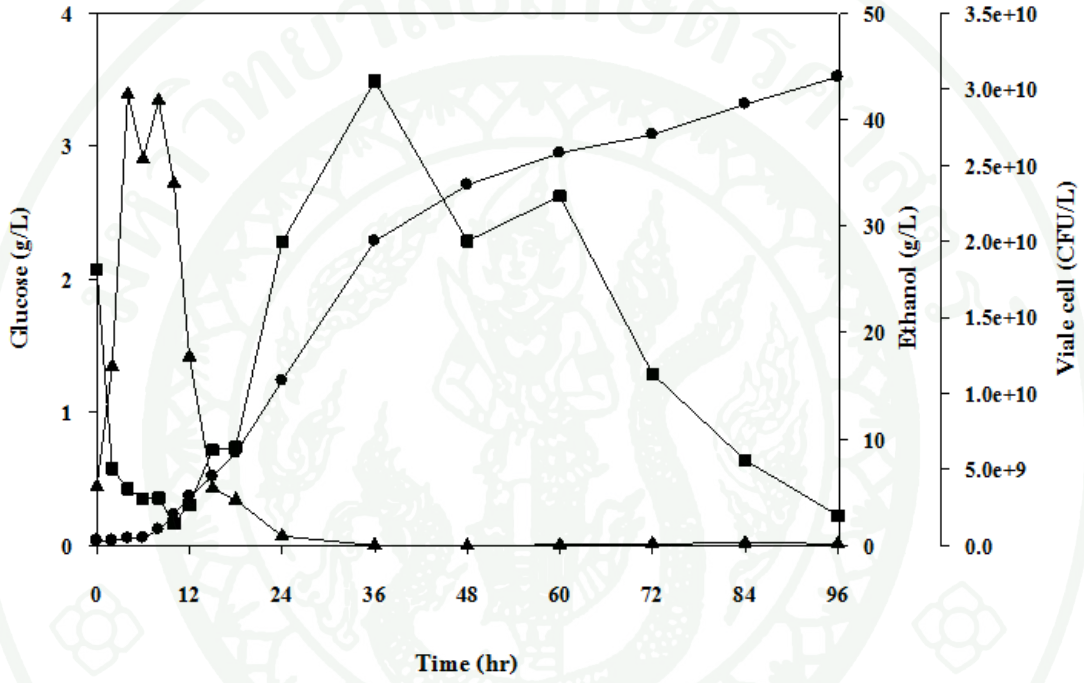


ภาพที่ 24 ความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8, เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (สัญลักษณ์ ●, ▲ และ ■ แสดงความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ตามลำดับ)

จากการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ดังภาพที่ 24 พบว่าในระยะ 8 ชั่วโมงแรกอยู่ในระยะที่เซลล์กำลังปรับตัว เพราะมีปริมาณกลูโคสน้อย และอุณหภูมิไม่เหมาะกับการเจริญ เซลล์จึงลดปริมาณลงเพื่อให้เพียงพอกับปริมาณกลูโคสที่มีอยู่อย่างจำกัด โดยยังมีการใช้กลูโคสและผลิตเอทานอลในปริมาณน้อย อีกทั้งลักษณะของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันมีลักษณะฟูซึ่งเป็นผลมาจากการพรีทรีตเมนต์ทำให้โครงสร้างที่เชื่อมโยงข้าม (cross link) ของลิกโนเซลลูโลสลดลง เกิดรูพรุนเพิ่มและการยึดจับของโครงสร้างน้อยลง และเกิดปัญหาทางกายภาพทำให้การผสมกันของเอนไซม์และเยื่อเป็นไปได้ยากซึ่งสอดคล้องการทดลองของ Cara *et al.* (2007) จึงทำให้ใช้เวลานานในการย่อยช่วงแรก แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ยังทำงานได้ไม่ดีพอที่จะผลิตกลูโคสให้ได้ตามความต้องการ หลังจาก 8 ชั่วโมงพบว่าเซลล์มีการเจริญได้ดีขึ้น เอทานอลเริ่มมีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลิตออกมาอย่างต่อเนื่อง และกลูโคสถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเอนไซม์เริ่มผลิตกลูโคสไม่ทันในชั่วโมงที่ 48 เป็นผลให้เซลล์เริ่มลดลงและคงที่ พบว่ากลูโคสเกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 96 ชั่วโมง เนื่องจากเซลล์ยังนำกลูโคสไปใช้ในการผลิตเอทานอล แสดงว่าเอนไซม์ยังมีกิจกรรม เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าความเข้มข้นกลูโคส เอทานอล และเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ 0.02, 44.25 กรัมต่อลิตร และ 1.50×10^{11} CFUต่อลิตร ตามลำดับ เยื่อเหลือจากการหมักเท่ากับ 5.84 กรัมน้ำหนักแห้ง จากเยื่อเริ่มต้น 30 กรัมน้ำหนักแห้ง



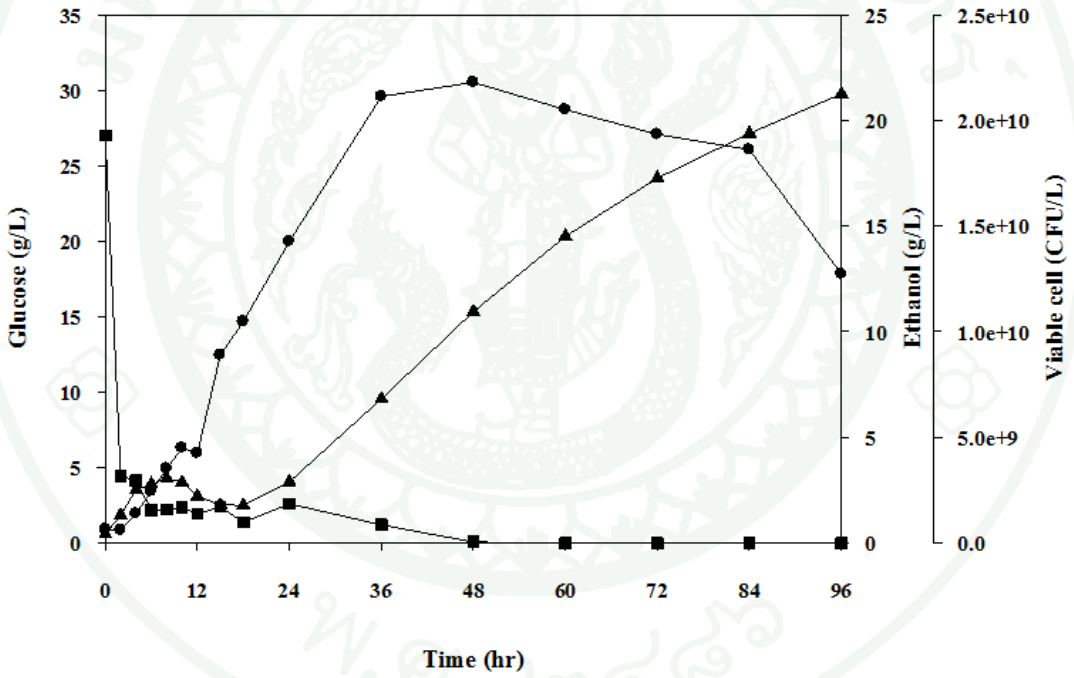
ภาพที่ 25 ความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสโดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8, อุณหภูมิ เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

(สัญลักษณ์ ●, ▲ และ ■ แสดงความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ตามลำดับ)

จากการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ดังภาพที่ 25 พบว่าในระยะ 10 ชั่วโมงแรกเซลล์อยู่ในระยะปรับตัว เนื่องจากมีกลูโคสน้อย และอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

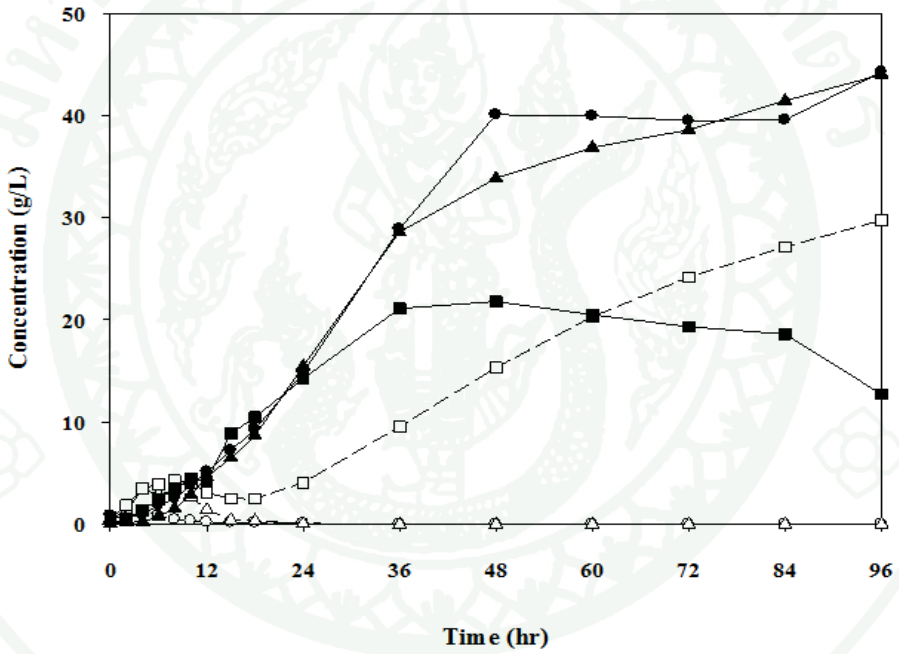
การเจริญ Reed and Peppler (1973) กล่าวว่าอุณหภูมิมีผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์พบว่าที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียสทำให้ช่วงเวลาที่ยีสต์แบ่งตัวแบบทวีคูณ (exponential growth phase) เพิ่มขึ้นเป็น 8 ชั่วโมง แสดงว่าอัตราการเจริญจำเพาะลดลงนั่นเอง หลังจาก 10 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เจริญได้ดีขึ้น มีการผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่อง และกลูโคสถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเอนไซม์เริ่มผลิตกลูโคสไม่ทันในชั่วโมงที่ 36 เป็นผลให้เซลล์เริ่มลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลล์เซียสเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญจึงทำให้อัตราการเกิดน้อยกว่าการตาย พบว่ากลูโคสเกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 96 ชั่วโมง เนื่องจากเซลล์ยังนำกลูโคสไปใช้ในการผลิตเอทานอล แสดงว่าเอนไซม์ยังมีกิจกรรม เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าความเข้มข้นกลูโคส เอทานอล และเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ 0.02, 44.00 กรัมต่อลิตร และ 1.98×10^{9} CFUต่อลิตร ตามลำดับ เยื่อเหลือจากการหมักเท่ากับ 4.03 กรัมน้ำหนักแห้ง จากเยื่อเริ่มต้น 30 กรัมน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 26 ความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8, เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (สัญลักษณ์ ●, ▲ และ ■ แสดงความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ตามลำดับ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ดังภาพที่ 26 พบว่าเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องเพราะอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักสูง ไม่เหมาะแก่การเจริญของเซลล์ สอดคล้องกับ Rose and Harrison (1971) ปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้นเนื่องจากความสามารถในการใช้กลูโคสลดลง เอทานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 เซลล์ไม่มีความสามารถผลิตเอทานอล และตายเกือบทั้งหมด พบว่ากลูโคสเกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 96 ชั่วโมง เนื่องจากเซลล์ยังนำกลูโคสไปใช้ในการผลิตเอทานอล แสดงว่าเอนไซม์ยังมีกิจกรรม เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าความเข้มข้นกลูโคส เอทานอล และเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ 29.74, 12.72 กรัมต่อลิตร และ 0.00 CFUต่อลิตร ตามลำดับ เยื่อเหลือจากการหมักเท่ากับ 6.80 กรัมน้ำหนักแห้ง จากเยื่อเริ่มต้น 30 กรัมน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 27 เปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอลและกลูโคส ระหว่างการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8 เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

(สัญลักษณ์ ●, ▲ และ ■ แสดงความเข้มข้นเอทานอลที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ ○, △ และ □ แสดงความเข้มข้นกลูโคสที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 27 เปรียบเทียบผลการทดลองการแปรผันอุณหภูมิในการหมักแบบ SSF ของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นเอทานอลเมื่อสิ้นสุดการหมัก 44.25, 44.00 และ 12.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การหมักที่ 40 องศาเซลเซียสให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนการหมักที่ 50 องศาเซลเซียส เซลล์ไม่มีความสามารถทนอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสได้เกิน 48 ชั่วโมงจึงทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลต่ำ

จากการทดลองพบว่าการใช้เยื่อลำต้นปาล์มในการทดลองเกิดช่วงการปรับตัวที่ยาวนาน (8-10 ชั่วโมง) เป็นผลให้เชื้อเจริญช้าผลิตเอทานอลได้ช้า ซึ่งมีสาเหตุจากลักษณะทางกายภาพของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันเองที่มีลักษณะเบาและฟูจึงทำให้เกิดการดูดซับของเหลว เช่น น้ำ อาหารเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์ เป็นต้น เข้าไปอยู่ในเยื่อเป็นผลให้ช่วงแรกของการหมักมีของแข็งมาก ยากต่อการผสมโดยเครื่องเขย่า เป็นผลให้ช่วงแรกของการหมักเกิดการปรับตัวโดยการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อปลดปล่อยน้ำตาล และเปลี่ยนของแข็ง (เยื่อเซลลูโลส) ให้กลายเป็นของเหลว ซึ่งทำให้ระบบการทำงานของเชื้อและเอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น

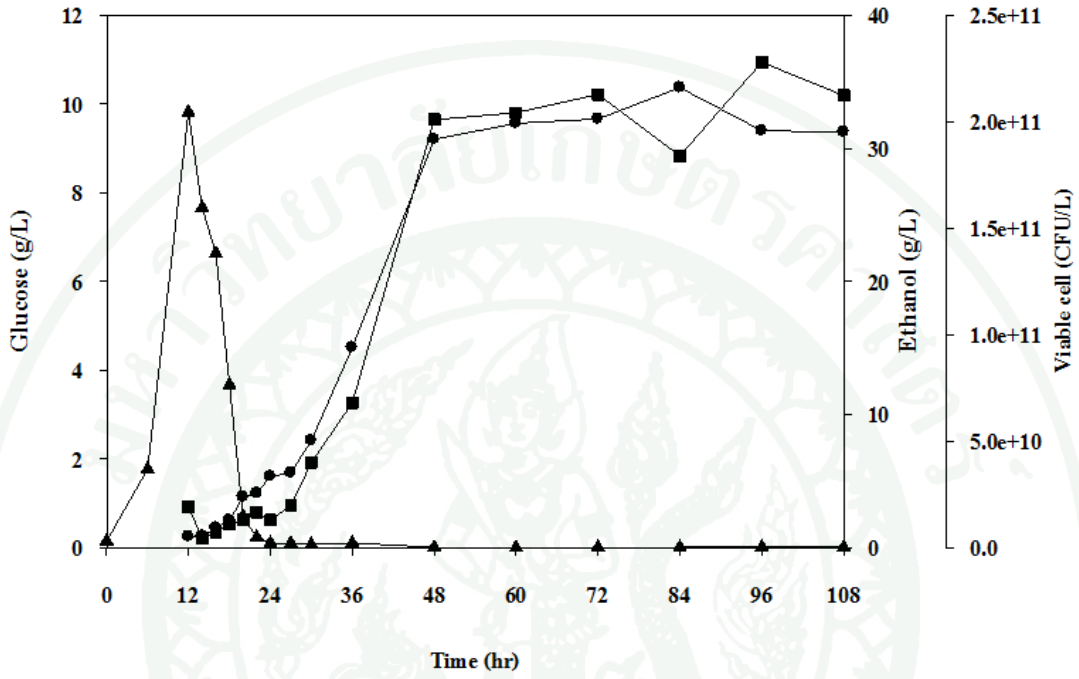
6. การพรีไฮโดรลิซิสก่อนการหมักการย่อยและหมักพร้อมกัน (Prehydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation, PSSF)

ระบบการทำงานแบบ PSSF มีลักษณะการทำงานคล้ายกับระบบ SSF ซึ่งจะไปปรับปรุงในกรณีที่เยื่อที่ใช้หมักมีปริมาณมากยากต่อการย่อยของเอนไซม์ ซึ่งอาจช่วยให้ระยะเวลาการปรับตัวของเซลล์น้อยลง ซึ่งจากการทำลองใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ทำการพรีไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงเหลือ 40 องศาเซลเซียสแล้วเติมเซลล์ เริ่มการหมักแบบ SSF

การการทำพรีไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ดังภาพที่ 28 พบว่าเซลล์เข้าสู่ระยะการปรับตัวใน 2 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเซลล์เริ่มเพิ่มจำนวน ใช้น้ำตาลและผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่องชั่วโมงที่ 36 เซลล์เริ่มคงที่ เอนไซม์ผลิตกลูโคสไม่พอกับความต้องการของเซลล์พบว่ากลูโคสเกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 96 ชั่วโมง เนื่องจากเซลล์ยังนำกลูโคสไปใช้ในการผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอทานอล แสดงว่าเอนไซม์ยังมีกิจกรรม เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าความเข้มข้นกลูโคส เอทานอล และเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ 0.01, 31.22 กรัมต่อลิตร และ 2.12×10^{11} เซลล์ต่อลิตร ตามลำดับ เยื่อเหลือจากการหมักเท่ากับ 5.65 กรัมน้ำหนักแห้ง จากเยื่อเริ่มต้น 30 กรัมน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 28 ความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักแบบ PSSF ที่อุณหภูมิของการย่อย 50 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของการหมัก 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยด่าง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 และเอนไซม์ ที่พีเอช 4.8, เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง
(สัญลักษณ์ ●, ▲ และ ■ แสดงความเข้มข้นเอทานอล, กลูโคส และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ตามลำดับ)

จากการทดลองพบว่าการหมักแบบ PSSF โดยใช้เยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มข้นเอทานอลต่ำกว่าการหมักแบบ SSF อาจเป็นเพราะการหมักแบบ PSSF เซลล์สามารถนำกลูโคสไปใช้ได้มากทำให้ช่วงการปรับตัวของเซลล์ในระบบ PSSF ใช้เวลาเพียง 2 ชั่วโมง ในขณะที่การหมักในระบบ SSF ใช้เวลาถึง 8 ชั่วโมงเพราะมีน้ำตาลเริ่มต้นน้อย เมื่อการหมักแบบ PSSF เซลล์นำกลูโคสไปใช้มากในการผลิตเซลล์ จึงเหลือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลูโคสที่จะนำไปใช้ผลิตเอทานอลน้อยกว่าการหมักแบบ SSF ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Manzanares *et al.* (2011) ได้เปรียบเทียบการหมักแบบ SSF และ PSSF ด้วยเยื่อไม้มะกอก 9 เปอร์เซ็นต์ ผ่านการพรีทรีตเมนต์โดยวิธี Liquid hot water พบว่าการหมักแบบ SSF ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่า PSSF 30 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์เยื่อเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการหมักแบบ PSSF ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่า 77.17 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการหมักแบบ SSF เหมาะสมกับการหมักที่มีเยื่อปริมาณน้อย และการหมักแบบ PSSF เหมาะสมกับการหมักที่มีปริมาณเยื่อมาก

ตารางที่ 26 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ด้วยการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และการหมักแบบ PSSF เมื่อสิ้นสุดการหมัก

สภาวะ	μ[1] (h^{-1})	C_P[2] (g/L)	Q_P (g/L h^{-1})	$Y_{P/S}$[3] (g/g)	Theoretical ethanol yield[4] (%)
SSF 40 องศาเซลเซียส	0.202	44.25	0.45	0.46	90.34
SSF 45 องศาเซลเซียส	0.171	44.00	0.45	0.46	90.61
SSF 50 องศาเซลเซียส	0.021	12.72	0.13	0.13	25.14
PSSF 40 องศาเซลเซียส	0.209	31.22	0.28	0.32	63.29

หมายเหตุ [1] การคำนวณโดยใช้ช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงดังนี้ การหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส: 8-18 ชั่วโมง, อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส: 10-24 ชั่วโมง, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส: 6-10 ชั่วโมง และการหมักแบบ PSSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส: 16-24 ชั่วโมง

[2] ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด

[3] ผลได้เอทานอลต่อเซลลูโลสในเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน (โดยแทนเซลลูโลสด้วยน้ำตาลกลูโคสจากการคำนวณ)

[4] ผลได้เอทานอลเทียบกับทางทฤษฎี (เอทานอล 0.51 กรัมต่อกลูโคส 1 กรัม)

ผลการผลิตเอทานอลด้วยเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันในการหมักแบบ SSF และ PSSF สามารถสรุปค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ดังตารางที่ 26 เมื่อเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่างๆ พบว่าการใช้ปริมาณเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ในการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมักแบบ SSF พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 ดีที่สุด โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.202 ต่อชั่วโมง เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงอุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญของยีสต์ที่สุด อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ให้ผลิตกลูโคสซึ่งเป็นอาหารของยีสต์ทำให้ยีสต์อยู่รอดได้อีกทางหนึ่ง ซึ่งการใช้เยื่อปริมาณสูง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นทางออกของการทดลองนี้ พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด (C_P) เท่ากับ 44.25 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเอทานอล (Q_P) เท่ากับ 0.45 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ผลได้เอทานอล ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลลูโลส เมื่อเปรียบเทียบผลได้เอทานอลกับทางทฤษฎี (Theoretical ethanol yield) มีค่าเท่ากับ 90.34 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่า *S. cerevisiae* Sc90 มีความสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 45 องศาเซลเซียส ส่วนการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ยีสต์ไม่สามารถทนได้เกิน 4 ชั่วโมง จึงทำให้อัตราการเจริญจำเพาะ(μ) มีค่าน้อย (0.021) เป็นผลให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด (C_P) ต่ำตามไปด้วย (12.72 กรัมต่อลิตร)

เมื่อเปรียบเทียบการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซลเซียส และการหมักแบบ PSSF โดยการพรีไฮโดรลิซิสที่ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงปรับสภาวะเป็นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติมยีสต์เริ่มต้นการหมักแบบ SSF พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของการหมักแบบ PSSF สูงกว่าเล็กน้อย ซึ่งไม่มีความแตกต่าง แต่พบว่าการหมักแบบ PSSF ให้ความเข้มข้นสูงสุด (C_P), อัตราการผลิตเอทานอล (Q_P) และผลได้เอทานอล ($Y_{P/S}$) ต่ำกว่าการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์สรุปดังตารางที่ 26 พบว่าการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการหมักแบบ SSF ที่ 40 องศาเซลเซียสให้ผลดีที่สุด เพราะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมทำให้เชื้อยีสต์และเอนไซม์ทำงานร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ โดยการระเบิดด้วยไอน้ำของชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน

การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการระเบิดด้วยไอน้ำของชิ้นลำต้นปาล์มน้ำมัน จุดประสงค์หลักของการระเบิดด้วยไอน้ำคือการกำจัดเฮมิเซลลูโลสซึ่งสังเกตการลดลงของเพนโตแซนที่ลดลงจากการทดลอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ การระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที วัตถุดิบเริ่มต้นมีสัดส่วนเพนโตแซนเท่ากับ 29.53 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อนสัดส่วนเพนโตแซนคงเหลือ 4.03 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นประสิทธิภาพการลดลงของสัดส่วนเพนโตแซนเท่ากับ 86.35 เปอร์เซ็นต์

2. การหาสภาวะที่เหาะสมของการสกัดด้วยด่าง (Alkaline extraction) ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วน้ำร้อน ออกแบบการทดลองโดยวิธีทะกุจิ

เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะที่เหมาะสม และการสกัดด้วยน้ำร้อน หาสภาวะของการสกัดด้วยด่างโดยวิธีทะกุจิ ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นโซเดียมไฮ-ดรอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที ได้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสและลิกนินจากการทดลองจริง 87.14 และ 6.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3. การผลิตเอทานอลจากการหมักโดยยีสต์

การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ celluclast 1.5L และ Novozym 188 เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยด่างพบว่าความเข้มข้นกลูโคสสูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 71.57 กรัมต่อลิตร คิดเป็น Digestibility เท่ากับ 88.51 เปอร์เซ็นต์ , ผลได้กลูโคส ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.75 กรัมกลูโคสต่อกรัมเซลลูโลส และอัตราการเกิดกลูโคส (Q_P) เท่ากับ 0.74 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหาสภาวะการหมักแบบย่อยและหมักพร้อมกัน (SSF) ด้วยเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยด่าง โดยการแปรผันอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส หมักโดย *Sacchromyces cerevisiae* Sc90 พบว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ให้ผลการผลิตเอทานอลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) จึงควรเลือกสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้วยเหตุผลต้นทุนทางด้านพลังงาน โดยพบว่าความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 44.25 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอล 0.45 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ที่อุณหภูมินี้ *S. cerevisiae* Sc90 ยังเจริญได้ดี (อัตราการเจริญจำเพาะ 0.202 ต่อชั่วโมง) คิดเป็นผลได้เอทานอลเทียบกับทฤษฎี เท่ากับ 90.34 เปอร์เซ็นต์

การหมักแบบพรีไฮโดรลิซิสก่อนการย่อยและหมักพร้อมกัน (PSSF) ใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยด่าง โดยการพรีไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทำการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* Sc90 หมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 31.22 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอล 0.28 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* Sc90 เจริญได้ดี (อัตราการเจริญจำเพาะ 0.209 ต่อชั่วโมง) เนื่องจากมีน้ำตาลเริ่มต้นในการหมัก คิดเป็นผลได้เอทานอลเทียบกับทฤษฎี เท่ากับ 63.29 เปอร์เซ็นต์ การหมักด้วยวิธีนี้ได้เอทานอลต่ำกว่าวิธี SSF

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

ขั้นตอนการระเบิดด้วยไอน้ำสามารถใช้เยื่อเปียก โดยการทดลองโดยการแช่น้ำข้ามคืนได้เป็นเพิ่มประสิทธิภาพการส่งผ่านความร้อนได้ดีขึ้น อีกกรณีคือการแช่กรดเป็นการทำให้การระเบิดด้วยไอน้ำทำงานได้ดีขึ้น แต่การแช่กรดทำให้เกิดสารพิษเพิ่มขึ้น ผลได้เยื่อลดลงซึ่งไม่เหมาะกับงานวิจัยที่ต้องนำส่วนเยื่อไปใช้ต่อ ในการใช้วัตถุดิบโดยไม่ตากแดดให้แห้งเป็นการลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง แต่หากวัตถุดิบมีมากเกินไปผลิตไม่ทันอาจทำให้เกิดเชื้อราเกิดขึ้นได้

ในขั้นตอนสกัดด้วยน้ำร้อน สามารถนำน้ำตาลที่กลับคืนมาในรูปสารละลายมาใช้ได้ ซึ่งจะมีน้ำตาลไซโลสเป็นส่วนใหญ่ ใช้ในการผลิตไซลิทอล หรือเอทานอลได้

ขั้นตอนการสกัดด้วยด่าง หลังจากการล้างเยื่อให้มีความเป็นกลางมีความสิ้นเปลืองน้ำเป็นอย่างมาก หากมีการใช้กรดสะเทินอาจใช้ลดปริมาณน้ำลง ผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากกระบวนการคือ ลิกนิน สามารถนำไปใช้ทำกาวไม้ และวานิลินได้

การผลิตเอทานอลแบบ SSF หากต้องการเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลสูงขึ้น (งานวิจัยนี้ 44.25 กรัมต่อลิตร) ต้องเพิ่มปริมาณเยื่อแต่การเพิ่มปริมาณเยื่อในการหมักแบบ SSF จะทำให้เกิดความหนืด (viscosity) เพิ่มขึ้นซึ่งมีผลกระทบต่อการส่งผ่านสารและความร้อน ต่อยีสต์และเอนไซม์ จึงเสนอให้เปลี่ยนการทดลองเป็น fed-batch และ continuous เพื่อให้สามารถส่งเยื่อลงไปเป็นซับสเตรตอย่างต่อเนื่อง

ในการผลิตเอทานอลแบบ PSSF ในงานวิจัยนี้ได้ความเข้มข้นเอทานอลต่ำเพราะปริมาณเยื่อน้อยไม่เพียงพอจึงอาจเพิ่มปริมาณเยื่อและเพิ่มเวลาในการไฮโดรลิซิสช่วงก่อนหมักอาจทำให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลเพิ่มขึ้นได้

การผลิตเอทานอลในการเก็บรักษาตัวอย่างมีความสำคัญ การวิเคราะห์จึงไม่ควรใช้เวลาเกิน 1 สัปดาห์ หลังจากเก็บตัวอย่างเนื่องจากเอทานอลอาจมีปริมาณลดลง และในการผลิตเอทานอลแบบ PSSF ในกรณีใช้เยื่อลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร พบว่ามีน้ำตาลไม่พอต่อการใช้ผลิตเอทานอลจึงควรเพิ่มปริมาณเยื่อโดยวิธีกล เช่น การบดให้ขนาดเล็กลงเพื่อให้เติมเยื่อลงไปได้มากขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิตติพงศ์ ตั้งกิจ. 2543. **ความเหมาะสมของการผลิตแผ่นใยไม้อัดจากทางใบ, ลำต้นและทะลายผลเปล่าของปาล์มน้ำมัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. **คัมภีร์ปาล์มน้ำมันพืชเศรษฐกิจเพื่อบริโภคและอุปโภค**. บริษัทมติชน, กรุงเทพฯ.

ณธิดา อารีย์. 2551. **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์โดยวิธีทากุชิ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิชชิมา สุพันธมาตย์. 2553. **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญอ้อม โฉมที. 2550. **สถิติการวางแผนการทดลอง: ทฤษฎีและการวิเคราะห์ด้วย SAS.** ภาควิชาสถิติ. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิรนาม. 2554. **ปาล์มน้ำมัน** (Micerosoft Office Exel). สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

พิชญา ภูมิภัทร. 2549. **การศึกษากระบวนการผลิตไฮโดรไลเสทจากการระเบิดต้นปาล์มน้ำมันด้วยไอน้ำสำหรับการหมักไซลิทอล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วนิดา ปานอุทัย. 2553**. การผลิตเอทานอลจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรณี แพ่งจันทึก และ วิชัย เพ็ชรดี. 2546. **การศึกษาการสกัดเอทานอลจากฟางข้าว**. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยา ปั้นสุวรรณ. 2543. **เอกสารคำสอนวิชาเรื่องเฉพาะทางเคมี: เคมีไม้และการใช้ประโยชน์**. ภาควิชาเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____2549. **เอทานอลและไซโลสจากลำต้นปาล์มน้ำมันโดยการระเบิดด้วยไอน้ำ**. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2551. **ปาล์มน้ำมัน ปี 2551.** สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. **ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2554. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. **รายงานผลการสำรวจปาล์มน้ำมัน ปี 2549**. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 416.

เอกชัย พฤกษ์อำไพ. 2548. **คู่มือปาล์มน้ำมัน**. บริษัทเพ็ท - แพล้น พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

Balat, M., H. Balat and C. Oz. 2008. Progress in bioethanol processing. **Prog. Energ. Combust**. 34: 554-573.

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

Bals, B., C. Rogers., M.J. Jin., V. Balan and B. Dale. 2010. Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. **Biotechnol. Biofuel.** 3:1.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Berghem, L.E.R., L.G. Pettersson and U. Axio-fredriksson. 1975. Mechanism of enzymatic cellulose degradation. **Eur. J. Biochem.** 53: 55-62.

Browning, B.L. and L.O. Bubnitz. 1983. **The Isolation of Holocellulose from Wood**. vol. 36. Technical Association of the Pulp and Paper Industry.

Cara, C., M. Moya., i. Ballesteros., M.J. Negro., A. Gonzalez and E. Ruiz. 2007. Influence of solid loadind on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochem**. 42: 1003-1009.

Chum, H.L.; L.J. Douglas, D.A. Feinberg and H.A. Schroeder. 1985. **Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose**. Solar Energy Research Institute: Golden, Colorado.

Chundawat, S.P., B. Venkatesh and B.E. Dale. 2007. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. **Biotechnol. Bioeng.** 96: 219-231.

Demirbas a. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energ. Sour**. 27: 327-37.

Dien, B.S., G. Sarath., J.F. Pedersen., S.E. Sattler., H. Chen., D.L. Funnell-Harris., N.N. Nichols and M.A. Cotta. 2009. Improved sugar conversion and ethanol yield for forage sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) lines with reduced lignin contents. **Bioenerg. Resour**. 2: 153-164.

_____, X.L. Li., L.B. Iten., D.B. Jordan., N.N. Nichols., P.J. O'Bryan and M.A. Cotta. 2006. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. **Enzyme. Microb. Technol.** 39: 1137-1144.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Eklund, R. and G. Zacchi. 1995. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. **Enzyme Microb. Technol**. 17: 255-259.

_____, M.Galbe and G. Zacchi. 1995. The influence of SO2 and H2SO4 impregnation of willow prior to steam pretreatment. **Bioresour. Technol.** 52: 225-229.

Fan, L.T., M.M. Gharpuray and Y.H. Lee. 1987. **Cellulose Hydrolysis**. Biotechnology Monographs; Springer, New York.

Galbe, M., P. Sassner., A. Wingren and G. Zacchi. 2007. Process engineering economics of bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng**. 108: 303-327.

Garcia-Aparicio, M.P., I. Ballesteros., A. Gonzalez., J.M. Oliva., M. Ballesteros and M.J. Negro. 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. **App. Biochem. Biotechnol**. 129-132: 278-288.

Gil, N., S. Ferreira., M.E. Amaral., F.C. Domingues and A.P. Duarte. 2010. The influence of dilute acid pretreatment conditions on the enzymatic saccharification of *Erica spp*. for bioethanol production. **Ind. Crop. Prod.** 32: 29-35.

Glasser, W.G. and R.S. Wright.1998 . Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources. **Biomass Bioenerg.** 14: 219–235.

Gomez, L.D., C.G. Steele-King and S.J. McQueen-Mason. 2008 . Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytol**.178: 473-485.

Halimahhton, H.M. and R. Abdul. 1990. Carbohydrate in the oil palm stem and theie protential use, pp. 25. *In* S. Khozirah, K.C. Khoo, and R. Abdul. **Oil Palm Stem Utilization Review of Research**. Forest Research Insitute Malaysia (FRIM), Kuala Lumpur.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hamelinck, C.N., G. van Hooijdonk and A.P.C. Faaij. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass Bioenerg.** 28: 384-410.

Han, Y. and H. Chen. 2008. Characterization of b-glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresour. Technol.** 99: 6081-6087.

Hartley, C.W.S. 1988. **The Oil Palm**. 3 th ed., Longman, London.

Holtzapple, M.T., J.H. Jun., G. Ashok., S.L. Patibandla and B.E. Dale. 1991. The ammonia freeze explosion (AFEX) process – A practical lignocellulose pretreatment. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 28: 59-74.

Huang, R., R. Su., W. Qi and Z. He. 2011. Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research. **Bioenerg. Res.** DOI 10.1007/s12155-011-9125-7. 03 May 2011.

Huang, R.L., W. Qi., R.X. Su and Z.M. He .2010. The optimization of fractionating lignocellulose by formic acid using response surface methodology. **Energ. Source.** 32:1282-1292.

Jung, Y.H., I.J. Kim., J.J. Kim., K.K. Oh., J. Han., I. Choi and K.H. Kim. 2011. Ethanol production from oil palm trunks ttreated wtith aqueous ammonia and cellulose. **Bioresour. Technol**. 102: 7307-7312.

Kadar, Zs., Zs. Szengyel and K. Reczy. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Indus. Crop. Prod**. 20: 103-110.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Khozirah, S., K.C. Khoo, and R. Abdul. 1991. **Oil Palm Stem Utilization-Review of Research**. Forest Research Insitute Malaysia (FRIM). Kepong, Kuala Lumpur.

Killman, W. and S.C. Lim. 1985. **Anatomy and Properties of oil palm stem**, pp. 26. *In* S. Khozirah, K.C. Khoo, and R. Abdul. **Oil Palm Stem Utilization Review of Research**. Forest Research Insitute Malaysia (FRIM), Kuala Lumpur.

Kim, S.H. 2004. **Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover**. Ph.D. Thesis, Texas A&M University.

Kim T.H. and Y.Y. Lee. 2007. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 137: 81-92.

_____, J.S. Kim., C. Sunwoo and Y.Y. Lee. 2003. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresour. Technol.** 90: 39-47.

Kumakura, M. and I. Kaetsu. 1983. Effect of radiation pretreatment of bagasse on enzymatic and acid hydrolysis. **Biomass** 3: 199-208.

Kumar, R., S. Singh and O.V. Singh. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 377-391.

Kumar, P., M.D. Barrett., M.J. Delwiche and P. Stroeve. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res.** 48: 3713-3729.

Larsson, S., E. Palmqvist., B. Hahn-Hagerdal., C. Tengborg., K. Stenberg., G. Zacchi and N. Nilvebrant. 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microb. Technol**. 24: 151-159.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lee Y.J. 2005. **Oxidation of sugarcane Bagasse using a combination of hypochlorite and peroxide.** MSThesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

Lee, Y., P. Iyer., and R. Torget: 1999. Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass, pp. 93-115. *In* **Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics**. Springer, Berlin / Heidelberg.

Lewin, M. and I.S. Goldstein. 1991. **Wood structure and composition**. Vol. 11. Marcel Dekker, Inc., New York.

Li, Y., R. Ruan., P.L. Chen., Z. Liu., X. Pan., X. Lin., Y. Liu., C.K. Mok and T. Yang. 2004. Enzymatic hydrolysis of corn Stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization. **Trans. ASAE**. 47:821-825.

Linde, M., M. Galbe and G. Zacchi. 2007. Simultaneous sacchrification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. **Enzyme Microb. Technol**. 40: 1100-1107.

Mamar, S.A.S. and A. Hadjadj. 1990. Radiation pretreatments of cellulose materials for the enhancement of enzymatic hydrolysis. **Radiat. Phys. Chem. 1990**, 35: 451-455.

Meyenburg, V.H.K. 1969. Energetics of the budding cycle of *S. cerevisiae* during glucose-limited aerobic growth. **Arch. Microbiol**. 66: 289-303.

Mohamad, H., Z.Z. Zin and H.H Abdul. 1985. Potentials of oil palm by products as raw material foragro-base industries, pp. 23. *In* S. Khozirah, K.C. Khoo, and R. Abdul. **Oil Palm Stem Utilization Review of Research**. Forest Research Insitute Malaysia (FRIM), Kuala Lumpur.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mohammad, J.T. and K. Karimi. 2008. Pretreatment of lignocellulosic waste to improve ethanol and biogas production: A review.**Int. J. Mol. Sci.** 9: 1621-1651.

Mohan, D., C.U. Pittman and P.H. Steele. 2006. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energ. Fuel.** 20: 848–889.

Mosier, N., C. Wyman., B. Dale., R. Elander., Y.Y. Lee., M. Holtzapple and M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol**. 96: 673-686.

Mosier, N.S., C.M. Ladisch and M.R. Ladisch. 2002. Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation. **Biotechnol. Bioeng.** 79:610–618.

Nagodawithana, T.W., C. Castellano and K.H. Steinkraus. 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in 'rapid fermentation' **. Appl. Environ. Microb**. 31: 158-162.

National Renewable Energy Laboratory (NREL). 2008a. **Measurement of Cellulase Activities.** Laboratory analytical procedure (LAP). Available Source: http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42628.pdf, December 10, 2010.

_____. 2008. **SSF Experimental Protocals: Lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation**. Laboratory analytical procedure (LAP). Available Source: https://wiki.umn.edu/pub/Cellulase/Literature/Lignocellulosic_Biomass_Hydrolysis_and_Fermentation_-_Lab_Analyitcal_ Procedure.pdf, December 10, 2010.

Neely, W.C. 1984. Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 59-65.

Neureiter, M., H. Danner., C. Thomasser., B. Saidi and R. Braun. 2002. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 98: 49-58.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ohgren, K., J. Vehmaanpera., M. Siika-Aho., M. Galbe., L. Viikari and G. Zacchi. 2007. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous sacchrification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. **Enzyme Microb. Technol**. 40(4): 607-613.

Olofsson, K., M. Bertilsson and G. Liden. 2008. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnol. Biofuel.** 1:7.

Ou, M.S., N. Mohammed., L.O. Ingram and K.T. Shanmugam. 2009. Thermophilc *Bacillus coagulans* requires less cellulases for simultaneous sacchrification and fermentation of cellulose to products than mesophilic microbial biocatalyst. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 155: 379-385.

Overend, R.P., E. Chornet. and J.A. Gascoigne.1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. A**. 321: 523-536.

Reed, G. and H.J. Peppler. 1973. **Yeast Technology**. The Avi Publi. Co. Inc., Connecticut.

Rose, A.H. and J.S. Harrison. 1971. **The Yeast**. Vol. 2. Physiology and Biochemistry of Yeast, Academic Press, London.

Roy, R.K. 2001. **Design of experiments using the Taguchi approach**. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Rudolf, A., M. Alkasrawi., G. Zacchi and G. Liden. 2005. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme Microb. Technol**. 37(2): 195-205.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ruiz, E., C. Cara., P. Manzanares., M. Ballesteros and E. Castro. 2008. Evaluation of steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme Microb. Technol.** 42: 160-166.

Sassner, P., C.G. Martensson., M. Galbe and G. Zacchi. 2008. Steam pretreatment of H_2SO_4-impregnated Salix for the production of bioethanol. **Bioresour. Technol.** 99: 137–145.

_____, M. Galbe and G. Zacchi. 2007. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. **Biomass Bioenerg**. Doi:10.1016/j.biombioe.2007.10.014.

Sendich, E., M. Laser., S. Kim., H. Alizadeh., L. Laureano-Perez., B. Dale., et al .2008. Recent process improvements for the ammonia fiber expansion (AFEX) process and resulting reductions in minimum ethanol selling price. **Bioresour. Technol**. 99: 8429–8435.

Shafizadeh, F. and A.G. W Bradbury.1979. Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. **J. Appl. Polym. Sci.** 23: 1431-1442.

Sjostrom, E. 1981.**Wood chemistry fundamentals and applications**. Academic press Inc., London.

Smart, K. 2000**. Brewing Yeast Fermentation Performance**. Oxford Bookes University, Oxford.

Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresour. Technol.** 83: 1-11.

Sun., X.F.; F. Xu,; R.C. Sun., Y.X. Wang., P. Fowler and M.S. Baird. 2004. Characteristics of degraded lignins obtained from steam exploded wheat straw. **Polym. Degrad. Stabil**. 86: 245-256.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Suomalainen, H. 1969. Trends in physiology ang biochemistry of yeasts. **Microb. Serol**. 35: 83-111.

Taherzadeh, M.J. and K. Karimi. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review**. Bioresour. Technol.** 2: 472-499.

_____, C. Niklasson and G. Liden. 1999. Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. **Bioresour. Technol**. 69 (1): 59-66.

TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry), 1984. **Pentosans in wood and pulp.** Officail Test Method T-223 om-84. Tappi press. Atlanta.

_____1988. **Preparation of wood for chemical analysis.** Officail Test Method T-264 om-88. Tappi press. Atlanta.

_____1992. **Alpha-, beta- and gama-cellulose in pulp and wood.** Officail Test Method T-203 om-88. Tappi press. Atlanta.

_____1993. **Ash in pulp and wood.** Officail Test Method T-211 om-93. Tappi press. Atlanta.

_____1998. **Acid insoluble lignin in pulp and wood.** Officail Test Method T-222 om-98. Tappi press. Atlanta.

Tomas-Pejo, E., M. Garcia-Aparicio., M.J. Negro., J.M. Oliva and M. Ballesteros. 2009. Effect of different cellulose dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF process. **Bioresour. Technol**. 100: 890-895.

Weil, J.R., A. Sarikaya., S.L. Rau., J. Goetz., C.M. Ladisch., M. Brewer., R. Hendrickson and M.R. Ladisch. 1997. Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water. **App. Biochem. Biotechnol.** 68 (1-2): 21–40.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wilfred A. Côté, JR. 1965. **Cellular Ultrastructure of Woody Plants**. Syracuse University Press, New York.

Wingren, A., M. Galbe and G. Zacchi. 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnol. Prog**. 19 (4): 1109-1117.

Yang, B. and C. Wyman. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuel. Bioprod. Bior**. 2: 26-40.

Yang, H., R. Yan., H. Chen., D.H. Lee and C. Zheng. 2007. Characteristics of hemicelluloses, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel** 86: 1781-1788.

Yu, J., J.B. Zhang., J. He., Z.D. Liu and Z.N. Yu. 2009. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresour.Technol.** 100: 903–908.

Zeng, M., N.S. Mosier., C.P. Huang., D.M. Sherman and M.R. Ladisch. 2007. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis**. Biotechnol. Bioeng.** 97: 265-278.

Zhang, M.J., F. Wang., R.X. Su., W. Qi and Z.M. He. 2010. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. **Bioresour. Technol.** 101: 4959–4964.

Zhang, Y.H.P., S.Y. Ding., J.R. Mielenz., J.B. Cui., R.T. Elander., M. Laser., M.E. Himmel., J.R. McMillan and L.R. Lynd. 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnol. Bioeng**. 97: 214-223.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Zhao, X.; L. Zhang and D. Liu. 2007. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. **Bioresour. Technol**. 99: 3729-3736.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไม้ (วิทยา, 2543)

สุ่มตัวอย่างวัตถุดิบที่เตรียมไว้มา 10 ถุง นำวัตถุดิบแต่ละชนิดมาบดย่อยให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องทำผงไม้ แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh จากนั้นเก็บผงวัตถุดิบแต่ละชนิดไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดปากถุงมิดชิด นำผงวัตถุดิบที่เตรียมไว้ดังกล่าวไปวิเคราะห์หาค่าต่าง ๆ ได้แก่ การหาปริมาณความชื้น ปริมาณลิกนินที่ละลายในกรด ปริมาณโฮโลเซลลูโลส ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส ปริมาณเพนโตแซน และปริมาณเถ้า

1.1 การสุ่มและการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ตามมาตรฐาน TAPPI T257 cm-85 และ มาตรฐาน TAPPI T264 om-88

การร่อน นำผงวัตถุดิบร่อนผ่านตะแกรงขนาดหมายเลข 40 mesh และตะแกรงขนาดหมายเลข 60 mesh เอาผงวัตถุดิบส่วนที่ผ่านตะแกรงหมายเลข 40 mesh และค้างอยู่บนตะแกรงหมายเลข 60 mesh ไว้เพื่อทำการวิเคราะห์

การหาปริมาณความชื้น ในผงตัวอย่างเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากการคำนวณปริมาณของสารแทรกในผงตัวอย่างคิดเป็นร้อยละของวัตถุดิบในสภาพอบแห้ง (Dry basis)

วิธีการ

1. ทำความสะอาด Platinum crucible แล้วอบแห้ง ชั่งน้ำหนักให้ทราบแน่นอน
2. ชั่งผงตัวอย่างใส่ Platinum crucible ตัวอย่างละ 2 ± 0.1 กรัม แล้วนำเข้าเตาอบ (Oven) ที่อุณหภูมิ 100 ± 5 องศาเซเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. นำออกจากเตาอบใส่โถดูดความชื้น ทิ้งให้ Platinum crucible เย็น และชั่งน้ำหนัก
4. ทำซ้ำจนน้ำหนักตัวอบแห้งคงที่ ชั่งน้ำหนักคำนวณปริมาณความชื้นได้จาก

$$\% \text{ ปริมาณความชื้น} = 100 (W1 - W2) / W2$$

W1 = น้ำหนักผงตัวอย่างสด (กรัม)
W2 = น้ำหนักผงตัวอย่างอบแห้ง (กรัม)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถหาน้ำหนักอบแห้งเมื่อรู้น้ำหนักเปียก และเปอร์เซ็นต์ความชื้นจาก

$$\text{น้ำหนักอบแห้ง} = \text{น้ำหนักเปียก} \,/\, \frac{1 + \%\text{ปริมาณความชื้น}}{100}$$

1.2 การเตรียมวัถุดิบที่ปราศจากสารแทรก ตามมาตรฐาน TAPPI T264 om-88 และมาตรฐาน TAPPI T264 cm-97

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ถ้วยกรอง (Extraction thimble)
2. เครื่องมือสกัดสารแทรก (Soxhlet extraction apparatus)
3. ขวดชั่ง
4. Filtering flask
5. Buchner funnel
6. ตู้ดูดควัน
7. เอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 95 โดยปริมาตร
8. เบนซีนบริสุทธิ์ (C_6H_6)
9. สารผสมเอทานอล-เบนซีน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเอทานอลร้อยละ 95 กับเบนซีนเท่ากับ 1:2 โดยปริมาตร
10. ผงตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง จำนวน 20 กรัม โดยน้ำหนักอบแห้ง

วิธีการ

1. ทำความสะอาดถ้วยแก้วสกัดสารแทรกและอบแห้ง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งผงตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักอบแห้ง 20 กรัม โดยเทียบกับน้ำหนักอบแห้งแล้วใส่ลงในถ้วยกรองพร้อมครอบด้วยตะแกรงละเอียดรูปกรวยแล้ว บรรจุใส่ในเครื่องมือสกัดสารแทรก
3. ติดตั้งเครื่องสกัดสารแทรก สกัดด้วยสารผสมเอทานอล-เบนซีน จำนวน 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง โดยรักษาระดับการชะล้างไม่น้อยกว่าชั่วโมงละ 4 ครั้ง
4. กรองผงตัวอย่างโดยเทลงใน Buchner funnel เพื่อดูดตัวทำละลายออก ล้างถ้วยกรองและผงตัวอย่างด้วยเอทานอลเพื่อไล่เบนซีนออก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. ใส่ผงดังกล่าวลงในถ้วยกรอง บรรจุใส่ในเครื่องมือสกัดสารแทรก

6. ติดตั้งเครื่องสกัดสารแทรก สกัดด้วยเอทานอล เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จน กระทั่งเอทานอลไม่มีสี

7. ถ่ายตัวอย่างลงใน Buchner funnel เพื่อดูดตัวทำละลายออก ล้างถ้วยกรองและตัวอย่างด้วย น้ำกลั่นเพื่อไล่เอทานอลออก

8. ถ่ายตัวอย่างลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นที่กำลังเดือด 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อนแก่ Flask เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอ่างน้ำร้อน รักษาน้ำที่จุดเดือดและ Flask อยู่ในอ่างน้ำเดือดด้วย กรองตัวอย่างด้วย Buchner funnel และล้างด้วยน้ำกลั่นที่เดือด จำนวน 500 มิลลิลิตร ผึ่งตัวอย่างทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง

9. คลุกเคล้าตัวอย่างและเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดมิดชิด หาค่าปริมาณความชื้นของวัตถุดิบที่ปราศจากสารแทรก และนำตัวอย่างที่เตรียมได้นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์หาองประกอบทางเคมี

%ปริมาณสารแทรกที่ละลายในเอทานอล-เบนซีน = 100(We-Wb)/Wp

We = น้ำหนักปริมาณสารที่สกัดได้อบแห้ง (กรัม)

Wb = น้ำหนัก Blank อบแห้ง (กรัม)

Wp = น้ำหนักผงตัวอย่างอบแห้ง (กรัม)

1.3 การหาปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรดในวัตถุดิบและเยื่อ ตามมาตรฐาน TAPPI T222 om-98

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องกรองลิกนินประกอบด้วย Filtering flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร และเครื่องทำสูญญากาศ

2. ถ้วยกรองเบอร์ 4 อบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักก่อนใช้

3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยให้มีอุณหภูมิอยู่ที่ 20 ± 1 องศาเซลเซียส

4. Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งแสดงเครื่องหมายการเติมสารละลาย 119 สำหรับผงตัวอย่างวัตถุดิบที่ปริมาตรเท่ากับ 575 มิลลิลิตร และสำหรับผงตัวอย่างเยื่อที่ระดับปริมาตรเท่ากับ 1,540 มิลลิลิตร โดยใช้ Erlenmeyer flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. Reflux condenser จะต้องสวมอยู่บน flask โดยมี Rubber stopper ยึดติดกันแน่น

6. ตู้อบ โดยให้มีอุณหภูมิอยู่ที่ 105 ± 3 องศาเซลเซียส

7. ตะเกียงบุนเซน แผ่นตะแกรง และฐานรองมีสามขา

8. Buret ขนาด 50 มิลลิลิตร

9. Beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร

10. แท่งแก้วคน

11. ตะแกรงขนาด 10 หรือ 20 mesh

12. กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 72 ซึ่งจะเป็นสารละลายมีความเข้มข้น 24 ± 0.1 นอร์มอล และมีความถ่วงจำเพาะ 1.6338 ที่อุณหภูมิ 20 ± 4 องศาเซลเซียส เตรียมได้โดยเทกรดซัลฟูริคเข้มข้น (95.5 – 96.5 %, ความถ่วงจำเพาะ 1.84) จำนวน 665 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร อย่างระมัดระวัง ทิ้งไว้ให้ของผสมเย็นลงเท่าอุณหภูมิปกติ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ของผสมมีปริมาตรทั้งหมด 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

13. สารผสมเอทานอล-เบนซีน โดยมีอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร

14. ผงตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง จากวัตถุดิบต้องปราศจากสารแทรกจำนวน 5 กรัม โดยเปรียบเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง จากเยื่อ 10 กรัม โดยเปรียบเทียบเป็นน้ำหนักอบแห้ง ยกเว้นถ้าเยื่อเปียกอยู่ทำให้แห้งโดยการผึ่งในบรรยากาศ หรืออบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วไปบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 10 – 20 mesh แต่เยื่อไม้บดจะมียางน้ำมันอยู่มาก ต้องสกัดด้วยเอทานอล-เบนซีน แล้วล้างด้วยเอทานอล น้ำร้อน และทำให้แห้งโดยการผึ่ง

วิธีการ

1. ชั่งผงตัวอย่างที่ปราศจากสารแทรก สำหรับวัตถุดิบ 1±0.1 กรัม สำหรับเยื่อ 2±0.1 กรัม โดยเทียบเป็นน้ำหนักอบแห้ง ถ่ายลงใน Beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. วาง Beaker ลงในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อยๆ เติม กรดซัลฟุริกความเข้มข้นร้อยละ 72 ที่แช่เย็น (10-15 องศาเซลเซียส) ไว้ในตู้เย็นลงไป 15 มิลลิลิตร พร้อมคนให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ (ด้วยแท่งแก้ว) โดยอุณหภูมิอยู่ที่ 20±1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผงตัวอย่างละลายหมด

3. เมื่อผงตัวอย่างกระจายดีแล้วปิดปาก Beaker ด้วยกระจกนาฬิกา นำมาตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 20±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมคนสารละลายอย่างสม่ำเสมอทุกๆ 15 นาที จนแน่ใจว่ามีการละลายสมบูรณ์

4. เติมน้ำกลั่น 300-400 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask แล้วเทสารละลายใน Beaker ลงใน Erlenmeyer flask ด้วย และให้เติมน้ำกลั่นลงไปอีกเพื่อให้กรดมีความเจือจางลดลงเหลือความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เข้มข้นร้อยละ 3 จนถึงระดับ 575 มิลลิลิตร ที่ได้ทำเครื่องหมายไว้สำหรับผงตัวอย่างวัตถุดิบ และระดับ 1540 มิลลิลิตร ที่ได้ทำเครื่องหมายไว้สำหรับผงตัวอย่างเยื่อ

5. Reflux สารละลายเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยการรักษาปริมาตรสารละลายใน Flask ให้คงที่

6. ปล่อยให้ตะกอนนอนก้น 1 คืน นำมาผ่านถ้วยกรองเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักแล้ว โดยกรองน้ำใสก่อนแล้วจึงกรองตะกอนลิกนิน

7. ล้างลิกนินให้ปราศจากกรดด้วยน้ำร้อน

8. นำถ้วยกรองที่มีลิกนินอยู่ใส่ในตู้อบอุณหภูมิ 105±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักที่ โดยทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นให้เย็นและชั่ง แล้วคำนวณหาปริมาณลิกนินเป็นร้อยละ

$$\% \text{ ปริมาณลิกนิน} = 100\ (W1/W2)$$

W1 = น้ำหนักของลิกนินอบแห้ง (กรัม)

W2 = น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

1.4 การหาปริมาณโฮโลเซลลูโลสโดยวิธี Acid chlorite ของ Browing in wood chemistry

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ผงตัวอย่างที่ปราศจากสารแทรกและทราบน้ำหนักแห้งแล้ว
2. อ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 70 – 80 องศาเซลเซียส
3. กระดาษฟอยล์
4. โถดูดความชื้น
5. ขวดรูปกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. ถ้วยกรองเบอร์ 2
7. เครื่องปั๊มลม พร้อมชุดแยกน้ำจากลม
8. กรดแอซีติก
9. โซเดียมคลอไรด์
10. น้ำแข็ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. ชั่งผงตัวอย่างลงในกระดาษฟอยล์ที่ปราศจากสารแทรกโดยน้ำหนักอบแห้ง 3 กรัม ถ่ายผงเยื่อใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำกลั่นลงในขวดรูปกรวย จำนวน 160 มิลลิลิตร และกรดแอซีติกเข้มข้นจำนวน 0.5 มิลลิลิตรกับโซเดียมคลอไรต์ 1.5 กรัม ลงไปด้วยตามลำดับ นำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 70-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการทดลองในตู้ดูดควันพิษ มีการเขย่าเป็นระยะจะได้ก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) เกิดขึ้นและมีการทำปฏิกิริยากับลิกนินในผงตัวอย่าง

3. เมื่อครบ 1 ชั่วโมง จะต้องเติมกรดแอซีติกเข้มข้นจำนวน 0.5 มิลลิลิตรกับโซเดียมคลอไรต์ 1.5 กรัมตามลำดับ ลงในขวดรูปกรวย ยังคงเขย่าขวดเป็นระยะ ทำเช่นนี้นาน 1 ชั่วโมง และทำในทำนองนี้ต่อไปอีกชั่วโมงที่ 2, 3 และ 4 หรือจนกว่าผงตัวอย่างจะมีสีขาว

4. เมื่อครบกำหนดเวลา นำขวดรูปกรวยไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อให้ก๊าซพิษลดการฟุ้งกระจายลงเป็นเวลา ½ ชั่วโมง

5. กรองผงเยื่อด้วยถ้วยกรองเบอร์ 1 ที่ทราบน้ำหนักอบแห้งละเอียดถึง 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องกรองที่มีแรงดูดจากการไหลผ่านของน้ำที่ปั๊มมาจากเครื่องปั๊มลมครบชุด ทำให้ก๊าซพิษที่ฟุ้งกระจายออกจากสารละลายจะได้ถูกดูดไปกับน้ำ

6. ล้างผงโฮโลเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งมีสีขาว จึงล้างด้วยแอซีโตน และดูดออกให้มากที่สุด

7. นำโฮโลเซลลูโลสไปผึ่งให้แห้งในบรรยากาศและทำให้แห้งในโถดูดความชื้นและชั่งหาน้ำหนักและเก็บตัวอย่างผงไว้วิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสต่อไป

8. นำถ้วยกรองพร้อมโฮโลเซลลูโลสบางส่วนไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105±3 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก

9. นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโฮโลเซลลูโลสเป็นร้อยละ

$$\% \text{ ปริมาณโฮโลเซลลูโลส} = 100\ (W1/W2)$$

W1 = น้ำหนักอบแห้งของโฮโลเซลลูโลส (กรัม)

W2 = น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.5 การหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสของวัตถุดิบ ตามมาตรฐาน T203 om-88

อุปกรณ์ละสารเคมี

1. เครื่องกระจายผงตัวอย่าง
2. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 0.2 องศาเซลเซียส
3. นาฬิกาจับเวลา
4. บีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
5. แท่งแก้วคน
6. Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร
7. บีกเกอร์ทรงสูง ขนาด 300 มิลลิลิตร
8. Filter crucible Por.2
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 เตรียมโดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์หนัก 87.5 กรัม ละลายในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่น จำนวน 300 มิลลิลิตร ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งทำให้มีอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เมื่อละลายสมบูรณ์แล้วถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ล้างบีกเกอร์ด้วยน้ำกลั่นและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร
10. กรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 10

วิธีการ

1. ชั่งโฮโลเซลลูโลสที่ทราบน้ำหนักอบแห้งแน่นอนแล้ว จำนวน 2±0.1 กรัม โดยน้ำหนักอบแห้งใส่ใน Beaker ทรงสูงขนาด 300 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 จำนวน 100 มิลลิลิตรลงไป และปรับอุณหภูมิของสารละลายโดยนำไปใส่นำอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25±0.2 องศาเซลเซียส
3. คนสารละลายด้วยเครื่องกระจายจนเกิดการกระจายอย่างสมบูรณ์ โดยมิให้เกิดฟองอากาศ 5 นาที
4. ล้างเครื่องกระจายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 จำนวน 25 มิลลิลิตร
5. คนสารละลายด้วยแท่งแก้วและนำไปแช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25±0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายจำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วคนด้วยแท่งแก้ว ทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิอีก 30 นาที

7. กรองสารละลายด้วยถ้วยกรองเบอร์ 2

8. ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่มีความเย็น 20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเป็นกลาง

9. ล้างตะกอนต่อไปอีกด้วยกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยให้แช่อยู่นาน 5 นาที จำนวน 40 มิลลิลิตร

10. ล้างตะกอนครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นจนน้ำที่ล้างนั้นไม่มีสภาพเป็นกรด

11. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วจึงนำออกมาใส่ในดูดความชื้น และทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งจนน้ำหนักคงที่ นำผลมาคำนวณหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

% ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส = 100(W1/W2)

W1 = น้ำหนักแอลฟาเซลลูโลสอบแห้ง (กรัม)

W2 = น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

1.6 การหาปริมาณเพนโตแซน ตามมาตรฐาน TAPPI T223 cm-84

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือกลั่น ประกอบด้วย Boiling flask, Graduated separatory funnel, A Grahamtype condenser, Volumetric flask และ Two and three ways connecting tubes.

2. เตาไฟฟ้าที่ปรับอุณหภูมิได้

3. อ่างน้ำแข็ง

4. เครื่อง Spectrophotometer ใช้วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และ Glass cuvettes

5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 0.1 องศาเซลเซียส

6. นาฬิกาจับเวลา

7. Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร

8. ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร

9. ปิเปต ขนาด 25 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 13.15 โดยน้ำหนัก (3.85 ± 0.05 นอร์มัล) นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นโดยความถ่วงจำเพาะ 1.18 – 1.19 จำนวน 315 มิลลิลิตร ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask จนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และตรวจสอบความเข้มข้น

11. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 11 นอร์มัล นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจำนวน 915 มิลลิลิตร ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นใน Volumetric flask จนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

12. Orcinol reagent โดยละลาย Orcine monohydrate ($C_7H_8O_2$ H_2O) จำนวน 0.4 กรัม กับ $FeCl_3.6H_2O$ จำนวน 0.5 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 11 นอร์มัล แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นไม่นานกว่าสองอาทิตย์

13. ผลึกโซเดียมคลอไรด์

14. แอลกอฮอล์ (C_2H_5OH) บริสุทธิ์มีความเข้มข้นร้อยละ 95

15. ไซโลส ($C_5H_{10}O_5$)

16. น้ำแข็ง

วิธีการ

1. ใส่ผงตัวอย่างปราศจากสารแทรกสำหรับเนื้อไม้ใบกว้าง 0.3 กรัม เนื้อไม้ใบแคบ 0.7 กรัม ใน Boiling flask และใส่ผลึกโซเดียมคลอไรด์จำนวน 20 กรัม กับสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.85 นอร์มอล จำนวน 100 มิลลิลิตร พร้อมด้วยลูกแก้ว (Boiling stone) 2-3 เม็ด

2. ติดตั้ง Boiling flask เข้ากับเครื่องกลั่น และทำเครื่องหมายของสารละลายกรดไว้ เติมสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.85 นอร์มอล จำนวน 250 มิลลิลิตรลงใน Sepatory funnel

3. ให้ความร้อนด้วยตะเกียงบุนเซนหรือเตาไฟฟ้าที่ทำให้กรดกลั่นตัวในอัตราเร็วสม่ำเสมอ นาทีละ 2.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่กลั่นได้ซึ่งมี Furfural ใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่วางอยู่ในอ่างน้ำแข็ง

4. ในระหว่างการกลั่น จะต้องรักษาระดับของสารละลายกรดใน Boiling flask ให้คงที่ โดยการหมั่นเติมสารละลายกรด HCl จาก Separatory funnel หรือเติมสารละลายลายกรดจาก Separatory funnel ทุก 10 นาที จำนวนครั้งละ 25 มิลลิลิตร กลั่นต่อไปจนครบเวลา 90±5 นาที จะได้ปริมาณของสารละลายที่กลั่นได้ 225±10 มิลลิลิตร

5. ปรับระดับอุณหภูมิของสารละลายที่กลั่นได้เป็น 20 องศาเซลเซียส เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.85 นอร์มอล ให้ครบปริมาตร 250 มิลลิลิตร ของ Volumetric flask ที่หมายระดับไว้ก่อน และผสมให้เข้ากันโดยตลอด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ดูดสารละลายที่กลั่นได้ด้วย Pipet ขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตรใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Orcinol จำนวน 25 มิลลิลิตร เขย่าและวาง Flask ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60±5 นาที

7. เติมเอทานอลใ ห้ครบระดับที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่า และนำไปไว้ในอ่างควบคุม อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 60±5 นาที

8. นำสารละลายที่เตรียมไว้ใส่ใน Cuvettes ที่มีฝาปิดป้องกันการระเหยของกรดที่จะกัดกร่อนเครื่องมือไปวัดค่าการดูดกืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

9. อ่านค่าไซเลนในตัวอย่างจากกราฟ Calibration ที่เตรียมไว้เป็นมิลลิลิตร แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเพนโตแซนเป็นร้อยละ

% เพนโตแซน = W1/10W2

W1 = น้ำหนัก Xylan ในผงตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

W2 = น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

10. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส

10.1 ทำไซโลสให้แห้งในตู้สูญญากาศ (vacuum oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

10.2 ชั่งไซโลสที่แห้งจำนวน 10, 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิกรัม จำนวน 5 ชุด

10.3 ใส่ไซโลสแต่ละนำหนักที่เตรียมไว้ลงใน Boiling flask และดำเนินการกลั่นในทำนองกับผงตัวอย่าง

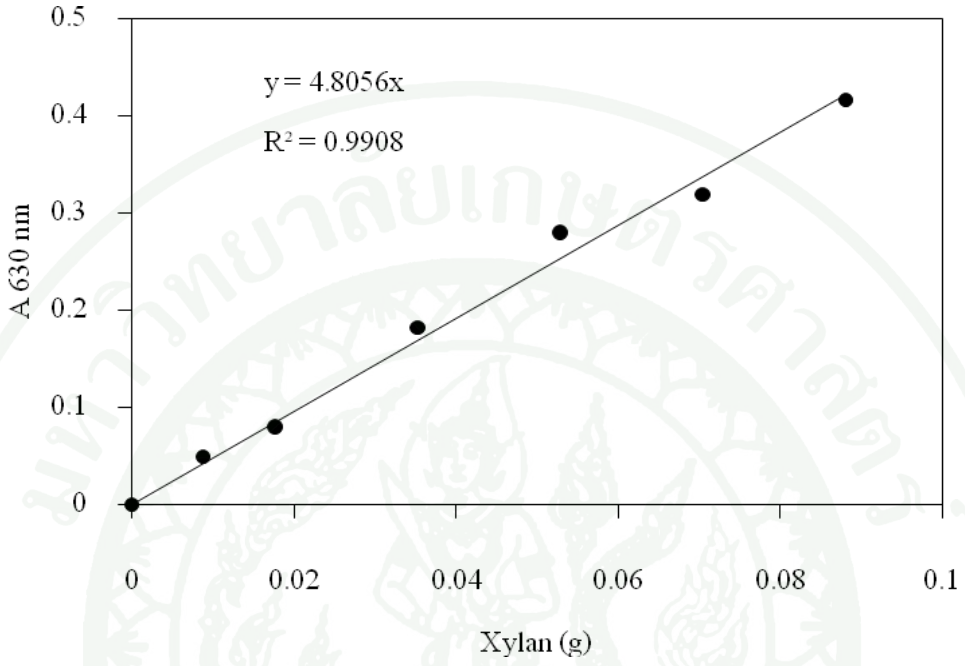
10.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่กลั่นได้แต่ละน้ำหนักที่แตกต่างกันของไซโลสที่ความยาวคลื่น 630 nm และให้ใช้ Blank เป็นารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.85 นอร์มอล จำนวน 5 มิลลิลิตร เป็น Reference solution

10.5 คำนวณไซเลนในตัวอย่างเป็นมิลลิกรัมจาก

Xylan (มิลลิกรัม) = Xylose × 0.88

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.6 เขียนกราฟจากปริมาณไซโลสต่างกัน 5 ค่าโดยความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณไซเลนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสในการวิเคราะห์เพนโตแซน

1.7 การหาปริมาณเถ้าในเนื้อไม้ ตามมาตรฐาน TAPPI T211 om-93

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ผงตัวอย่างอย่างน้อย 2 กรัมโดยน้ำหนักอบแห้ง
2. ถ้วยกระเบื้องซิลิกาพร้อมฝาปิด
3. เครื่องชั่ง ชั่งน้ำหนักได้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิลิตร
4. เตาเผาที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ 525 ± 25 องศาเซลเซียส

วิธีการ

1. ล้างถ้วยกระเบื้องให้สะอาด นำมาอบในตู้อบอุณหภูมิ 100±3 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. นำถ้วยกระเบื้องมาอบอีกที่อุณหภูมิ 525±25 องศาเซลเซียสในเตาเผา เป็นเวลา 30-40 นาที จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ และวนำมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักให้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

3. ชั่งผงเยื่อประมาณ 1 กรัมลงในกระทงฟอยล์แล้วนำไปอบแห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 105±3 องศาเซลเซียส อย่างน้อง 2 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จึงชั่งน้ำหนักอบแห้งให้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

4. เทผงเยื่อใส่ถ้วยกระเบื้อง แล้วชั่งน้ำหนักกระทงกระดาษฟอยล์

5. นำถ้วยกระเบื้องพร้อมผงเยื่อไปเผาโดยตรงด้วยเปลวไฟอ่อนจากตะเกียงบุนแซนโดยเปิดฝางลแง้วไว้แล้วใส่ในเตาเผาพร้อมนำฝาปิดออก โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 100 องศาเซลเซียส และทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 525±25 องศาเซลเซียสอย่างช้าๆ จนกระทั่งตัวอย่างเป็นถ่านปราศจากเปลวไฟ อย่างน้อย 6 ชั่วโมง

6. เมื่อครบเวลาและตัวอย่างเผาไม้สมบูรณ์โดยปราศจากเศษเหลือที่มีสีดำแล้วนำมาใส่โถดูดความชื้นอลูมิเนียม ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วชั่งหาน้ำหนักเถ้าให้ได้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

7. เผาซ้ำและชั่งซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักของเถ้าคงที่ ไม่แตกต่างกันเกิน 0.2 มิลลิกรัม ล้วนำข้อมูลมาหาปริมาณเถ้าเป็นร้อยละจาก

$$\%\text{ปริมาณเถ้า} = 100(W1/W2)$$

W1 = น้ำหนักเถ้าหลังเผา (กรัม)

W2 = น้ำหนักอบแห้งของผงตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

2. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลสตามวิธีของ NREL (2008a)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
3. กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1.0 x 6.0 เซนติเมตร (ประมาณ 50 มิลลิกรัม)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. 0.05 โมลาร์ ซิเทรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 เตรียมจาก 1 โมลาร์ซิเทรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 โดยชั่งกรดซิติกโมโนไฮเดรต ($C_6 H_8 O_7 . H_2O$) 210 กรัม ในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 50-60 กรัมจนมีค่าพีเอช 4.3 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0% เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassiumsodium tartrate (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

6. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1.0 - 3.35 มิลลิกรัม/ 0.5 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูด 0.05 M โซเดียมซิเทรต พีเอช 4.8 ปริมาณ 1.0 มิลลิกรัมลงในหลอดทดลอง

2. เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร (โดยเจือจางความเข้มข้นเอนไซม์ให้สามารถผลิตกลูโคสในช่วงมากกว่า และน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมเล็กน้อย)

3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใส่แผ่นกระดาษกรอง 1 แผ่น ผสมให้สารละลายซึมเข้าในสับสเทรทอย่างทั่วถึง (อย่าให้กระดาษอยู่บนผิวหน้าของของเหลว)

4. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

5. เติม DNS 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. ต้มในน้ำเดือดทันทีเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

7. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้จนตะกอนนอนก้นประมาณ 20 นาที แล้วนำส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

8. เตรียม Blank โดยเติมซิเทรตบัฟเฟอร์ 1.5 มิลลิลิตรโดยไม่ใส่เอนไซม์ และกระดาษกรองและใช้วิธีการวิเคราะห์เหมือนข้างต้น

9. เตรียม control โดยเติมซิเทรตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร และเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตรโดยไม่ใส่กระดาษกรอง และใช้วิธีการวิเคราะห์เหมือนข้างต้น

10. การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก1 การเตรียมสารมาตรฐานกลูโคสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	0.05 M ซิเตรตบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร)
1	1.0	4.0	1.0
2	1.0	2.0	1.65
3	1.0	1.0	2.5
4	1.0	0.5	3.35

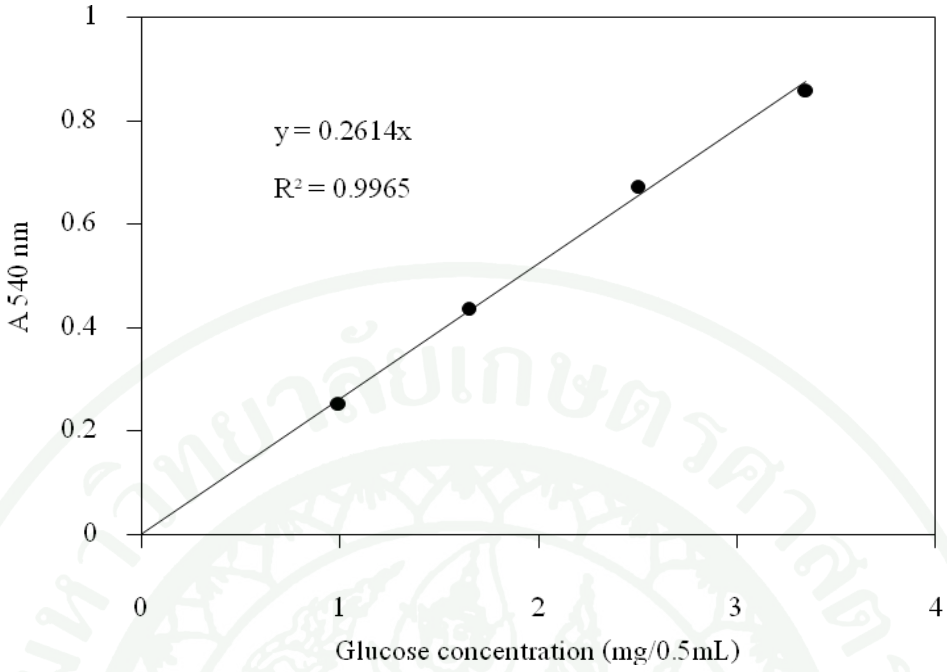
ใส่สารละลายกลูโคสตั้งแต่ 1.0-3.35 มิลลิกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตรแทนตัวอย่างเอนไซม์และไม่ใส่กระดาษกรอง ทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนเหมือนการวิเคราะห์ตัวอย่างเอนไซม์

การคำนวณ

1. สร้างกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสโดยใช้ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัม/0.5 มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
2. ใช้กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเป็นกลูโคส (มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยระหว่างปฏิกิริยา)
3. เปลี่ยนอัตราการเจือจางของตัวอย่างเป็นความเข้มข้นเอนไซม์ความเข้มข้น = 1/อัตราการเจือจาง (= ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเจือจาง/ ปริมาตรทั้งหมด)
4. คำนวณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยกลูโคสออกมา 2 มิลลิกรัมโดยใช้ความสัมพันธ์ของกลูโคสกับความเข้มข้นเอนไซม์ (ลอการิทึม)
5. คำนวณ FPU

$$\text{FPU} = \frac{0.37}{\text{ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยกลูโคสออกมา 2 มิลลิตร}} \text{ FPU/mL}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสดัดแปลงจากวิธีของ Bergham *et al.* (1975)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หลอดทดลองขนาด 13 x 78 มิลลิเมตร
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
3. โซเดียมอะซิเทรต 1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเทรตไตรไฮเดรต (CH3COONa.3H2O) 8.204 กรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร
4. กรดอะซิตริก 1 โมลาร์ เตรียมโดยดูดกรดแอซีติก 1.7 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
5. โซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 เตรียมโดยผสมโซเดียมอะซิเทรต 1 โมลาร์ กับกรดอะซิตริก 1 โมลาร์ ค่อย ๆ ปรับพีเอชด้วยกรดอะซิตริก 1 โมลาร์ จนมีค่า 4.8 แล้วดูดโซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้ 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. พาราไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-กลูโคพาราโนไซด์ (p-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside; pNPG) 3.3 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง pNPG 0.09 กรัมละลายด้วยโซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยบัฟเฟอร์เป็น 100 มิลลิลิตร

7. โซเดียมคาร์บอเนต (Na2CO3) 1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 105.99 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

8. การเตรียมสารละลายมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) 0.1927 มิลลิโมล เตรียมโดยชั่งพาราไนโตรฟีนอล 0.0268 กรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางความเข้มข้นดังนี้

ตารางผนวกที่ ก2 การเตรียมสารมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอล

สารละลายพาราไนโตรฟีนอลมาตรฐาน (ไมโครโมล)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายพาราไนโตรฟีนอล 0.1927 มิลลิโมล (มิลลิลิตร)
0	5	0
19.27	4.5	0.5
38.53	4	1
77.07	3	2
115.60	2	3
192.68	0	5

วิธีการ

1. ใส่พาราไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-กลูโคพาราโนไซด์ 3.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตรและสารละลายเอนไซม์เจือจาง 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง

2.. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

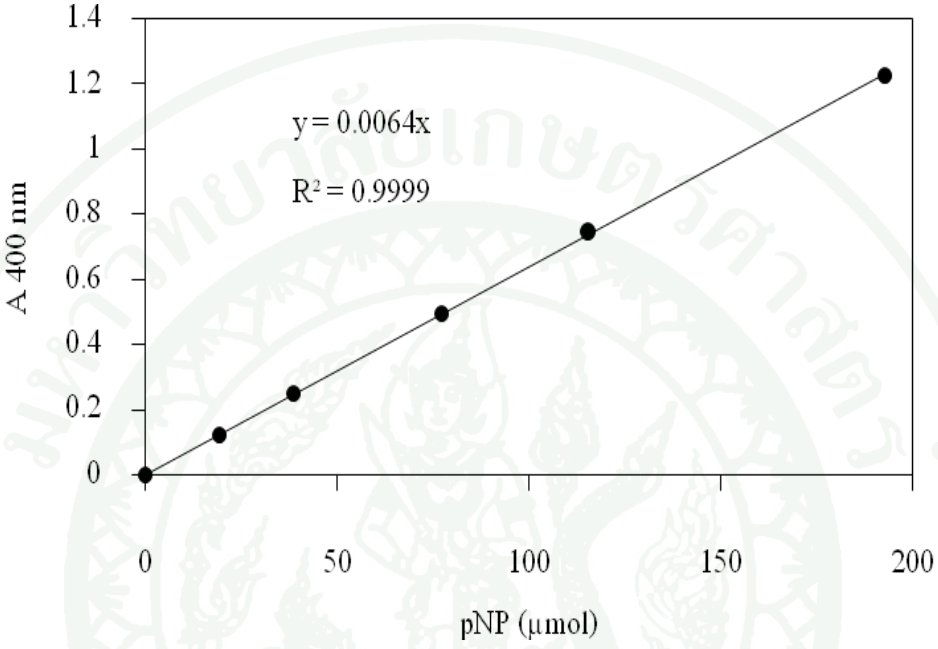
3. .เติมโซเดียมคาร์บอเนต 1 โมลาร์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตรและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตรของพาราไนโตรฟีนอลที่ถูกปลดปล่อยออกมา

ความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอล = (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร) x (อัตราการเจือจาง) / (ความชันของกราฟมาตรฐาน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมของบีตา-กลูโคซิเดส (IU/mL) = (ความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอล)

10 x 0.1 x 1000



ภาพผนวกที่ ก3 กราฟมาตรฐานพาราไนโตรกลูโคพาราโนไซด์

3. การหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (สาโรจน์และคณะ, 2544)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
3. น้ำกลั่นบรรจุในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสำหรับทำการเจือจาง
4. ปิเปต
5. spreader และแอลกอฮอล์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

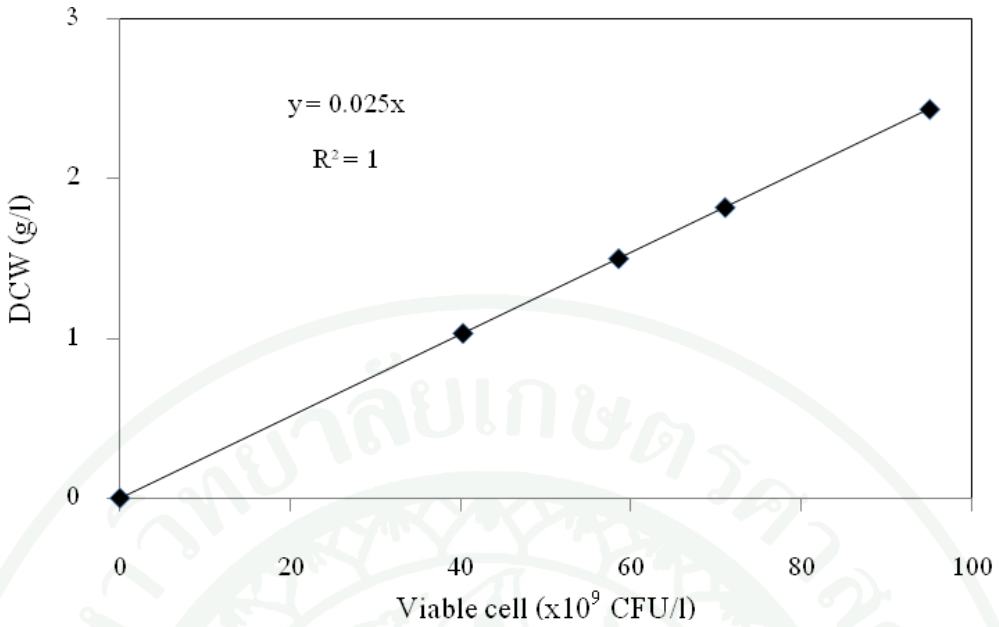
1. เก็บตัวอย่างด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ทำการเจือจางให้เหมาะสม โดยเลือกระดับการเจือจางตัวอย่างละ 3 ระดับ แต่ละระดับดูดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อ 3 ซ้ำ เกลี่ยด้วยแท่งแก้วตามเทคนิคการ spread plate

2. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีหาค่าเฉลี่ยจากระดับการเจือจางที่ให้จำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อตัวอย่าง 1 ลิตรดังนี้

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ลิตร) = จำนวนโคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ × dilution factor × 10000

สำหรับกราฟการเทียบมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) กับเซลล์ที่มีชีวิต (CFU ต่อลิตร) มีวิธีการดังนี้ นำตัวอย่างที่เก็บได้ในระยะการเติบโตเอกซ์โพเนลเชียลใส่ลงในหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว 3 หลอดๆ ละ 10 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที รินส่วนใสออกเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าและนำไปปั่นใหม่ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างเดียวกันนี้ให้ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปทำเทคนิค spread plate เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU ต่อลิตร) ดังแสดงในภาพผนวกที่ ก4 เพื่อใช้คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจากตัวอย่างที่วัดค่าเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

ที่มา: วนิดา (2553)

4. การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส, เซลโลไบโอส และไซโลส ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ตามวิธีของ Ballesteros et al. (2004)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. High Performance Liquid Chromatography
2. คอลัมน์ (Aminex) (ยี่ห้อ Biorad รุ่น Aminex HPX-87P)
3. Detector (RI)
4. Recorder
5. สารละลายกลูโคสมาตรฐานเตรียมโดยเจือจางกลูโคส, เซลโลไบโอส และไซโลส ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-5 กรัมต่อลิตร ดังตารางผนวกที่ ก3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. ทำการเตรียมตัวอย่างโดยกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง

2. ใช้น้ำกลั่นปราศจากอิออนเป็นเฟสเคลื่อนที่ ด้วยอัตราเร็ว 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส

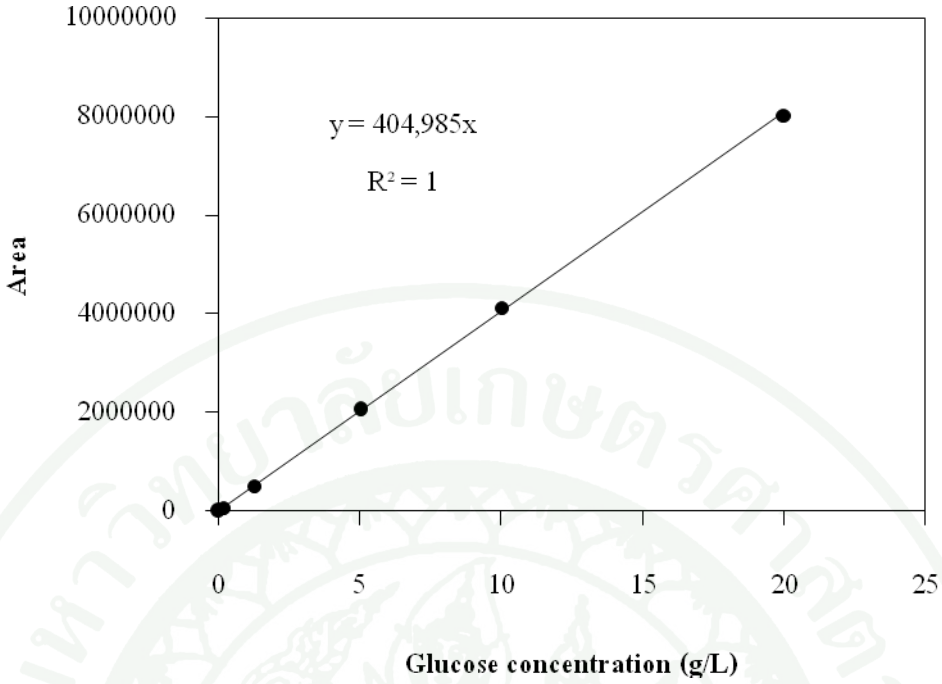
3. นำค่าที่ได้วิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\text{ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟกลูโคส}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

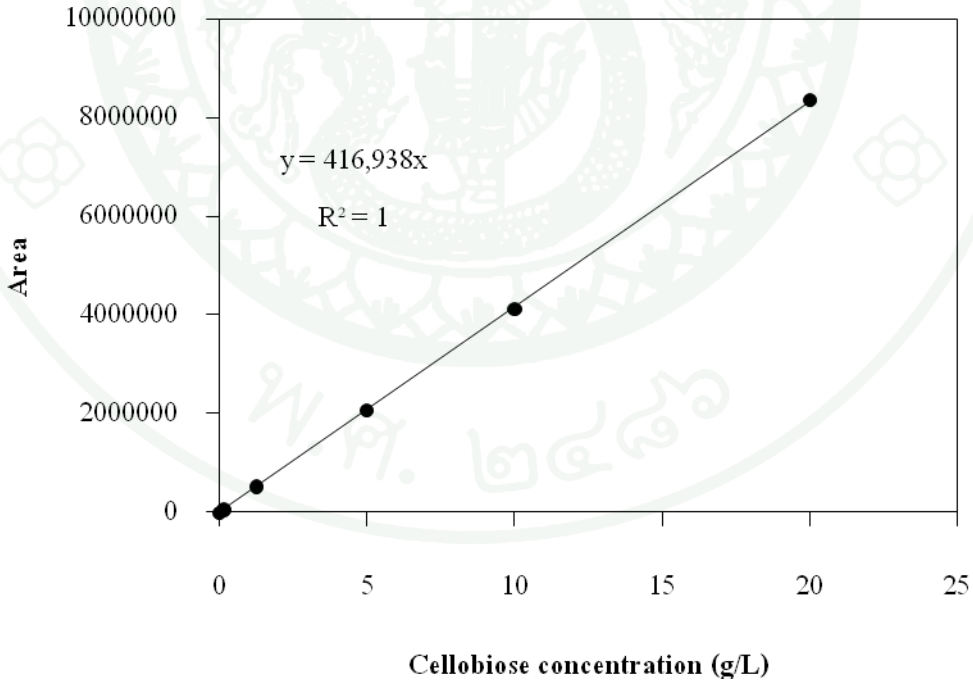
ตารางผนวกที่ ก3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส, เซลโลไบโอส และ ไซโลส

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	สารละลายกลูโคส, เซลโลไบโอส และไซโลส (10 กรัมต่อลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่นปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0.00	5.00
0.1	0.05	4.95
0.5	0.25	4.75
1.5	0.75	4.25
3	1.50	3.50
5	2.50	2.50
10	5.00	0.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

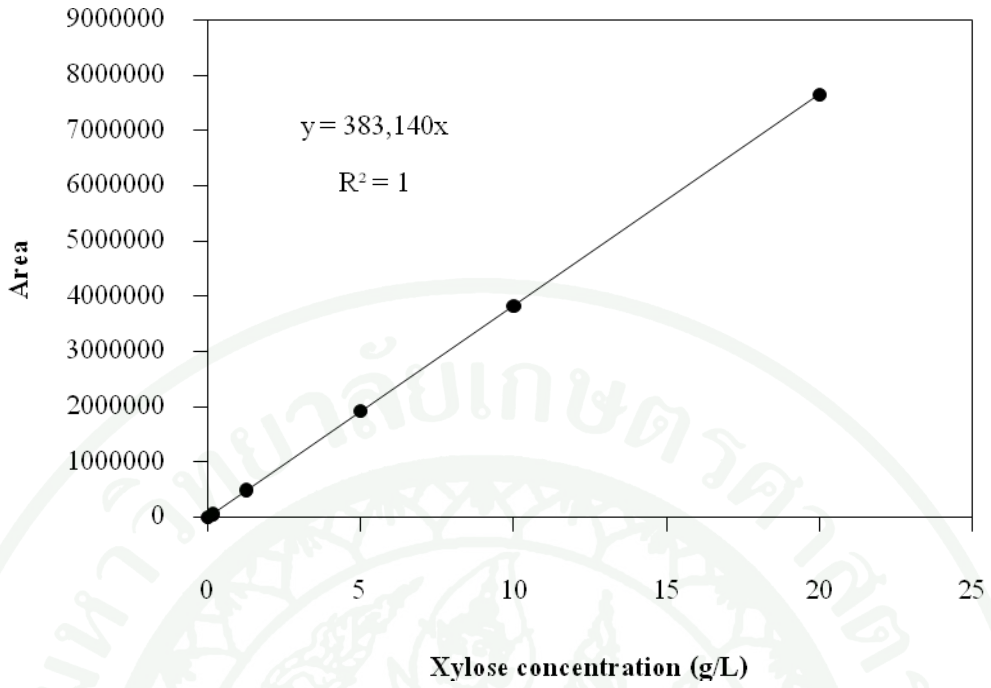


ภาพผนวกที่ ก5 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส



ภาพผนวกที่ ก6 กราฟมาตรฐานสารละลายเซลโลไบโอส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก7 กราฟมาตรฐานสารละลายไซโลส

5. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas Chromatography ตามวิธีของวนิดา (2553)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Gas Chromatography (ยี่ห้อ Chrompack)
2. คอลัมน์ (Capillary column) (ยี่ห้อ Varian, รุ่น Factor four capillary column) ขนาด 30 มิลลิเมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครลิตร)
3. Detector (Flame Ionization Detector, FID)
4. Recorder
5. เข็มฉีดตัวอย่าง (microsyringes, Hamilton; U.S.A.)
6. ตัวกรอง 13 mm Syring Filter Nylon, 0.2 µm (Filtrex; Thailand)
7. ถังแก๊สฮีเลียม ออกซิเจน และไฮโดรเจน
8. สารละลายเอทานอลมาตรฐานเตรียมโดยเจือจางเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ (HPLC grade) ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-20 กรัมต่อลิตร ดังตารางผนวกที่ ก4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. ค่าตัวแปรต่าง ๆ ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ในสภาวะที่ปฏิบัติงาน
อุณหภูมิในการฉีด 160 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิภายใน oven 45 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
อุณหภูมิที่ detector 250 องศาเซลเซียส

2. ทำการเตรียมตัวอย่างโดยกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร

3. ทำการฉีดสารละลายตัวอย่าง 0.2 ไมโครลิตรจะได้โครมาโทแกรมของเอทานอล คำนวณหาพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมเอทานอล

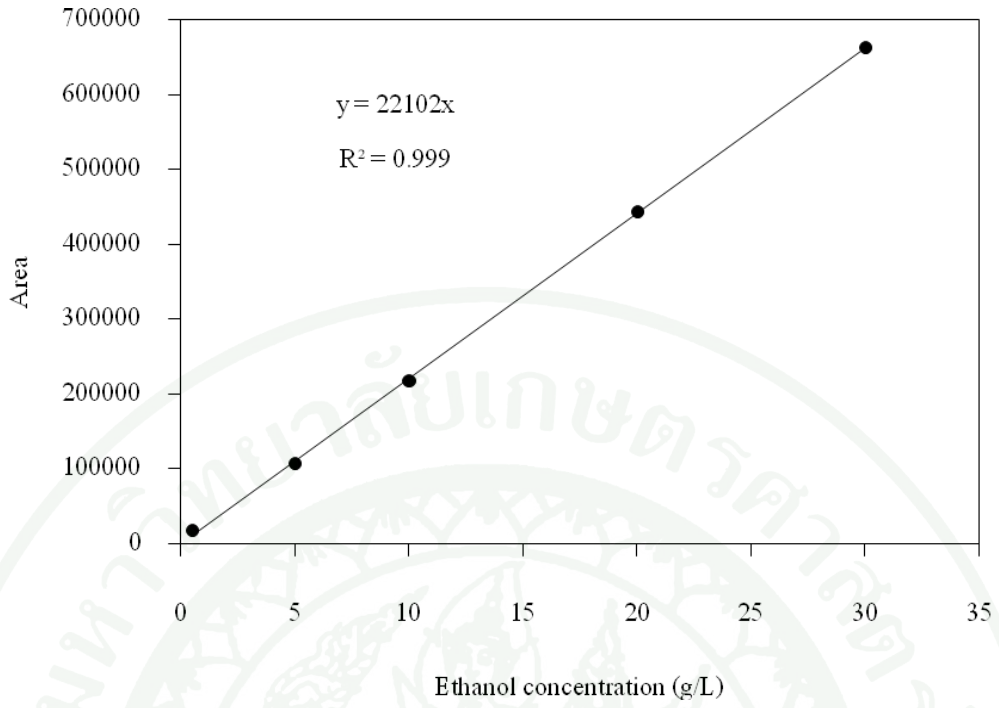
4. นำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมเอทานอลไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\text{เอทานอล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

ตารางผนวกที่ ก4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล

สารละลายเอทานอลมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	สารละลายเอทานอล (30 กรัมต่อลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่นปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0	5
0.5	0.08	4.92
5	0.83	4.17
10	1.67	3.33
20	3.33	1.67
30	5	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก8 กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การคำนวณค่าพารามิเตอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การคำนวณค่า severity factor (log R_0)

$$\log Ro = \log \{t \exp [(T-100)/14.75] \}$$

เมื่อ t คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด (นาที)

T คือ อุณหภูมิของไอน้ำ (องศาเซลเซียส)

2. การคำนวณในการออกแบบโดยวิธีทะกุจิ (Roy, 2001)

2.1 อัตราส่วน S/N

$$\text{S/N ratio} = -10\log (\text{MSD})$$

2.2 ค่ากลางเบี่ยงเบนมาตรฐาน (MSD)

Bigger is better; $\text{MSD} = (\sum(1 / y)_2) /N$

Smaller is better; $\text{MSD} = (\sum(y)_2) /N$

Nominal is bestter; $\text{MSD} = (\sum (y - y_0)_2) /N$

หมายเหตุ y, y_0 และ N หมายถึง ผลการทดลอง ผลการทดลองที่กำหนด และจำนวนการทดลอง ตามลำดับ

2.3 เปอร์เซ็นต์อิทธิพลหลัก (% main effect)

$$\% \text{ Main effect} = \frac{(\text{Max-Min})}{\text{Max}} * 100$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(y-\bar{y})^2}{N-1}}$$

2.5 ค่า factor sum of square (SS_{Factor})

edd

$$SS_{Factor} = \frac{N * r}{L}\sum_{k=1}^{L}(\bar{y}_k - \bar{y})^2$$

2.6 ค่า Error sum of square (SS_{Error})

$$SS_{ERROR} = \sum (SD)^2 * (r-1)$$

2.7 ค่าองศาอิสระของแฟคเตอร์ (DOF_{Factor})

$$DOF_{Factor} = L-1$$

2.8 ค่าองศาอิสระของข้อผิดพลาด (DOF_{Factor})

$$DOF_{ERROR} = N(r-1)$$

2.9 ค่าองศาอิสระรวม (DOF_{Total})

$$DOF_{Total} = (N*r)-1$$

2.10 ค่าความแปรปรวน (Variance, Var)

$$Var = \frac{SS}{DOF}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.11 ค่าสัดส่วนความแปรปรวน (variance ratio, F_{ratio})

$$F_{ratio} = \frac{Var}{Var_{ERROR}}$$

2.12 ค่าความน่าเชื่อมั่น confidence)

$$Confidence=100-F_{DIST}(F_{ratio}, DOF_{Factor}, DOF_{Error})*100$$

2.13 การหาค่าผลการทดลองที่คาดไว้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (result expected at optimum condition, Y_{OPT})

$$Y_{OPT} = \overline{T} + (\overline{A}_2 - \overline{T}) + (\overline{B}_2 - \overline{T}) + (\overline{C}_3 - \overline{T}) + (\overline{D}_3 - \overline{T}) + (\overline{E}_3 - \overline{T}) + (\overline{F}_3 - \overline{T}) + (\overline{G}_3 - \overline{T}) + (\overline{H}_2 - \overline{T})$$

2.14 ค่าประมาณ $Y_{expected}$

$$Y_{expected} = (MSD)^{1/2}$$

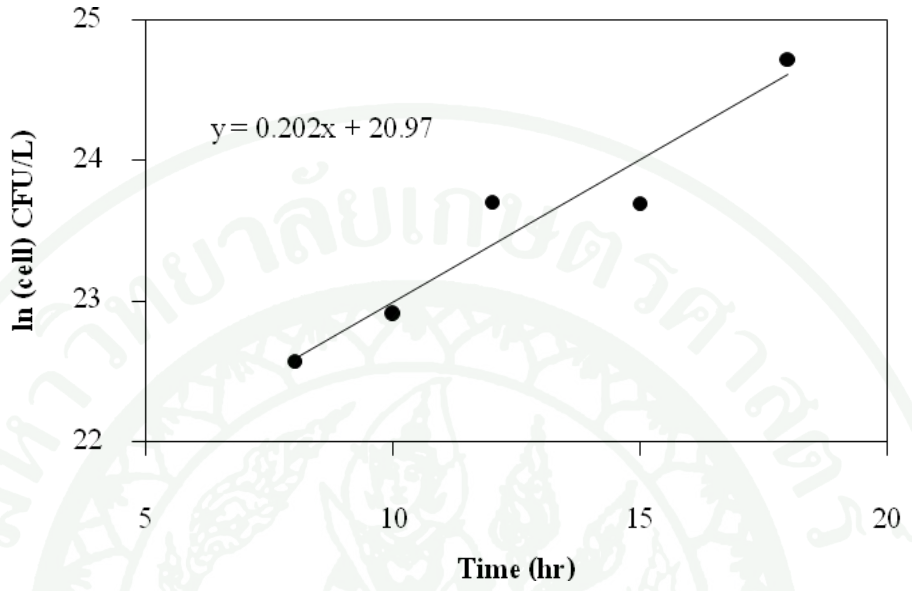
หมายเหตุ FDIST เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปในโปรมแกรม excel โดยเป็นความสัมพันธ์ระหว่างค่า Fratio, DOF_{Factor}, DOF_{Error} โดย y, y , N, r, L, k และ T หมายถึง ผลการทดลองค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง จำนวนระดับของแฟกเตอร์ ระดับของแฟกเตอร์ และ ค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดลองทั้งหมด ตามลำดับ และ 2 A , 2 B , 3 C , 3 D , 3 E , 3 F , 3 G และ 2 H หมายถึง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดลองของแต่ละระดับของแฟกเตอร์ที่เหมาะสมที่ได้

3. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมัก

3.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำนวณได้โดยการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ lnX อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสามารถหาได้จากความชันของกราฟ



ภาพผนวกที่ ข1 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

3.2 อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_P)

อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์สามารถคำนวณได้จากสมการ (สาโรจน์และคณะ, 2544)

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_t - P_0}{t_t - t_0} \quad \text{กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง}$$

โดยที่ P_t = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)

P_0 = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ชั่วโมงที่ 0 (กรัมต่อลิตร)

t_t = ระยะเวลาสุดท้ายในการเกิดผลิตภัณฑ์สูงสุด (ชั่วโมง)

t_0 = ระยะเวลาเริ่มต้น (ชั่วโมง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 ผลได้เอทานอล ($Y_{P/S}$)

ผลได้ของเอทานอลสามารถคำนวณได้จากสมการ (NREL, 2008b)

$$Y_{P/S} = \frac{[P_1 - P_0]}{f[Biomass]1.11} \quad \text{กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส}$$

โดยที่ P_t = ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

P_0 = ความเข้มข้นเอทานอลชั่วโมงที่ 0 (กรัมต่อลิตร)

f = ค่า cellulose fraction of dry biomass (กรัมเซลลูโลสต่อกรัมเยื่อ)

Biomass = ปริมาณเยื่อเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

1.11 = ค่าการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส

3.4 ผลได้ของเอทานอลเทียบกับทางทฤษฎี (Theoretical ethanol yield)

ผลได้ของเอทานอลเทียบกับทางทฤษฎีสามารถคำนวณได้จากสมการ (NREL, 2008b)

$$\text{Theoretical ethanol yield} = \frac{[P_t - P_0]}{0.51f[Biomass]1.11} \times 100 \quad \text{เปอร์เซ็นต์}$$

โดยที่ P_t = ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

P_0 = ความเข้มข้นเอทานอลชั่วโมงที่ 0 (กรัมต่อลิตร)

f = ค่า cellulose fraction of dry biomass (กรัมเซลลูโลสต่อกรัมเยื่อ)

Biomass = ปริมาณเยื่อเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

1.11 = ค่าการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส

0.51 = ค่าการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลบนพื้นฐานของปริมาณสัมพันธ์ (stoichiometric biochemistry) ของเซลล์ยีสต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5 ผลได้กลูโคส ($Y_{P/S}$)

ผลได้ของกลูโคสสามารถคำนวณได้จากสมการ (Kim, 2004)

$$Y_{P/S} = \frac{[G_t - G_0]}{f[Biomass]} \times \frac{162}{180} \quad \text{กรัมกลูโคสต่อกรัมเซลลูโลส}$$

โดยที่ G_t = ความเข้มข้นกลูโคสสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

G_0 = ความเข้มข้นกลูโคสชั่วโมงที่ 0 (กรัมต่อลิตร)

f = ค่า cellulose fraction of dry biomass (กรัมเซลลูโลสต่อกรัมเยื่อ)

Biomass = ปริมาณเยื่อเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

162 = น้ำหนักโมเลกุลของเซลลูโลส

180 = น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส

3.6 ผลได้กลูโคสเทียบกับทางทฤษฎี (Theoretical glucose yield or % digestibility)

ผลได้ของกลูโคสเทียบกับทางทฤษฎีหรือเปอร์เซ็นต์ที่ย่อยได้ (% digestibility) สามารถคำนวณได้จากสมการ (NREL, 2008b)

$$\text{\% Digestibility} = \frac{[Glucose] + 1.053[Cellobiose]}{1.111f[Biomass]} \times 100 \quad \text{เปอร์เซ็นต์}$$

โดยที่ *Glucose* = ความเข้มข้นกลูโคสที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)

Cellobiose = ความเข้มข้นเซลโลไบโอสที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)

f = ค่า cellulose fraction of dry biomass (กรัมเซลลูโลสต่อกรัมเยื่อ)

Biomass = ปริมาณเยื่อเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

1.11 = ค่าการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส

1.053 = ค่าการเปลี่ยนแปลงเซลโลไบโอสเป็นกลูโคส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cellulose W.E. Oil palm trunk

Class Level Information

Class	Levels	Values
trt	6	a b c d e f

Number of observations 18

Dependent Variable: y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	112.4417111	22.4883422	21.60	<.0001
Error	12	12.4920667	1.0410056		
Corrected Total	17	124.9337778			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	y Mean
0.900010	1.829436	1.020297	55.77111

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	5	112.4417111	22.4883422	21.60	<.0001

Duncan's Multiple Range Test for y

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	1.041006

Means with the same letter are not significantly different.

ภาพผนวกที่ ค1 output ANOVA ของเซลลูโลสเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน โดย SAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Duncan Grouping		Mean	N	trt
	A	58.8333	3	e
	A			
B	A	57.0400	3	d
B				
B		56.5300	3	f
B				
B		56.0233	3	c
B				
B		55.5067	3	b
	C	50.6933	3	a

ภาพผนวกที่ ค1 (ต่อ)

pentoxan W.E. Oil palm trunk

Class Level Information

Class	Levels	Values
trt	6	a b c d e f

Number of observations 18

Dependent Variable: y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	349.0582000	69.8116400	70.90	<.0001
Error	12	11.8150000	0.9845833		
Corrected Total	17	360.8732000			

ภาพผนวกที่ ค2 output ANOVA ของเพนโตแซนเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน โดย SAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

R-Square	Coeff Var	Root MSE	y Mean
0.967260	13.21254	0.992262	7.510000

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	5	349.0582000	69.8116400	70.90	<.0001

Duncan's Multiple Range Test for y

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.984583

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	15.7300	3	a
B	9.8067	3	b
B			
B	8.1700	3	c
C	4.4767	3	d
C			
C	4.0367	3	e
C			
C	2.8400	3	f

ภาพผนวกที่ ค2 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lignin W.E. Oil palm trunk

Class Level Information

Class	Levels	Values
trt	6	a b c d e f

Number of observations 18

Dependent Variable: y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	30.15600000	6.03120000	7.72	0.0019
Error	12	9.37120000	0.78093333		
Corrected Total	17	39.52720000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	y Mean
0.762918	3.318039	0.883704	26.63333

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	5	30.15600000	6.03120000	7.72	0.0019

Duncan's Multiple Range Test for y

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.780933

Means with the same letter are not significantly different.

ภาพผนวกที่ ค3 output ANOVA ของลิกนินเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยน้ำร้อน โดย SAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	28.7967	3	d
B	27.1233	3	e
B			
B	26.7267	3	c
B			
B	26.4667	3	f
B			
B	26.2833	3	b
C	24.4033	3	a

ภาพผนวกที่ ค3 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 การย่อยเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นเซลโลไบโอส (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นไซโลส (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นเซลลูโลสที่ถูกย่อย (เปอร์เซ็นต์)
0	0.54	0.29	0.01	0.89
2	2.47	2.36	0.10	5.25
4	7.92	3.38	0.23	12.19
6	12.14	4.71	0.23	18.16
8	14.65	5.53	0.22	21.75
10	17.69	6.38	0.22	25.93
12	21.54	7.66	0.21	31.45
15	23.45	8.43	0.19	34.34
18	27.70	9.66	0.17	40.22
24	33.46	11.92	0.16	48.88
36	43.69	13.40	0.13	61.39
48	53.75	15.11	0.12	74.00
60	59.13	13.76	0.13	78.19
72	64.92	12.76	0.14	83.23
84	67.89	11.99	0.14	85.53
96	71.57	11.17	0.14	88.51

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค2 การผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปริมาณเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFUต่อลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	1.93×10^{10}	0.87	0.14
2	8.88×10^{9}	0.62	0.39
4	6.38×10^{9}	0.97	1.27
6	6.18×10^{9}	1.87	0.84
8	6.42×10^{9}	2.53	0.47
10	9.22×10^{9}	3.82	0.35
12	1.98×10^{10}	5.16	0.22
15	2.05×10^{10}	7.22	0.18
18	1.07×10^{11}	9.30	0.16
24	9.42×10^{10}	14.83	0.10
36	2.07×10^{11}	28.89	0.02
48	1.41×10^{11}	40.06	0.01
60	1.33×10^{11}	39.95	0.01
72	1.54×10^{11}	39.48	0.01
84	1.50×10^{11}	39.56	0.01
96	1.50×10^{11}	44.25	0.02

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 การผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกันที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และปริมาณเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFUต่อลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	1.81×10^{10}	0.49	0.44
2	5.07×10^{9}	0.48	1.35
4	3.75×10^{9}	0.69	3.39
6	3.07×10^{9}	0.75	2.90
8	3.13×10^{9}	1.53	3.34
10	1.47×10^{9}	2.90	2.72
12	2.70×10^{9}	4.65	1.42
15	6.28×10^{9}	6.52	0.43
18	6.47×10^{9}	8.69	0.34
24	2.00×10^{10}	15.48	0.07
36	3.05×10^{10}	28.58	0.00
48	2.00×10^{10}	33.84	0.00
60	2.30×10^{10}	36.85	0.01
72	1.13×10^{10}	38.58	0.02
84	5.63×10^{9}	41.43	0.02
96	1.98×10^{9}	44.00	0.02

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค4 การผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการย่อยและหมักพร้อมกันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และปริมาณเยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFUต่อลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	1.93×10^{10}	0.65	0.59
2	3.15×10^{9}	0.61	1.86
4	2.97×10^{9}	1.39	3.53
6	1.57×10^{9}	2.45	3.91
8	1.58×10^{9}	3.53	4.28
10	1.71×10^{9}	4.50	4.03
12	1.38×10^{9}	4.25	3.10
15	1.72×10^{9}	8.89	2.52
18	9.87×10^{8}	10.47	2.49
24	1.86×10^{9}	14.27	4.07
36	8.63×10^{8}	21.12	9.55
48	5.33×10^{7}	21.79	15.33
60	0	20.50	20.30
72	0	19.33	24.17
84	0	18.60	27.13
96	0	12.72	29.74

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค5 การผลิตเอทานอลจากเยื่อลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนพรีไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 50 องศ าเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการย่อยและหมักพร้อมกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFUต่อลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	-	-	0.15
6	-	-	1.77
12	1.93×10^{10}	0.83	9.82
14	4.32×10^{9}	0.86	7.67
16	7.22×10^{9}	1.49	6.64
18	1.08×10^{10}	2.07	3.67
20	1.33×10^{10}	3.80	0.70
22	1.66×10^{10}	4.08	0.24
24	1.29×10^{10}	5.34	0.10
27	1.98×10^{11}	5.63	0.10
30	4.00×10^{11}	8.05	0.07
36	6.80×10^{11}	15.04	0.10
48	2.01×10^{11}	30.68	0.01
60	2.04×10^{11}	31.89	0.00
72	2.13×10^{11}	32.21	0.01
84	1.84×10^{11}	34.58	0.01
96	2.28×10^{11}	31.33	0.01
108	2.12×10^{11}	31.22	0.01

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายเกียรติพงษ์ สงพรหม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 28 พฤศจิกายน 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เคมี-ชีววิทยา)
	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
ประวัติการทำงาน	1 ปี 7 เดือน พนักงานควบคุมคุณภาพ บริษัท ยูนีซัน จำกัด
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุน จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
	ฝ่ายอุตสาหกรรม (ฝ่าย 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์