

ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ : การผลิตเอทานอลและการผลิตเอทานอล
ร่วมกับกากน้ำตาล



นายตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Steam Explosion Treated OPEFB Fiber : Ethanol Production and Supplementation in
Ethanol Production from Molasses

Mr. Trinset Weeraphan



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปลา่ที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ : การผลิตเอทานอลและการผลิตเอทานอลร่วมกับกากน้ำตาล
โดย	นายตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัสญา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิไล ลือพร้อมชัย)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัสญา)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ : ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ : การผลิตเอทานอลและการผลิตเอทานอลร่วมกับกากน้ำตาล (Steam Explosion Treated OPEFB Fiber : Ethanol Production and Supplementation in Ethanol Production from Molasses) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.อัญชริดา อัครจรัสญา, 64 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้หาภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าด้วยต่างร่วมกับวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ ผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ เส้นใยทะลายปาล์ม น้ำมันเปล่าขนาด 2 – 10 มิลลิเมตร แชนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ (10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) แล้วระเบิดด้วยไอน้ำโดยใช้ปริมาณเส้นใยฯ 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 200°ซ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อนำเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพที่ภาวะเหมาะสมมาย่อยด้วยเอนไซม์ เซลลูเลส 894 CMCs ยูนิต/กรัมเส้นใยฯ หรือเท่ากับ 232.35 PNG ยูนิต/กรัมเส้นใยฯ เป็นเวลา 6 ชม. ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 22.213 กรัม/ลิตร (0.22 กรัมต่อกรัมเส้นใยฯ) เป็นน้ำตาลกลูโคส 15.31 กรัม/ลิตร (0.15 กรัมต่อกรัมเส้นใยฯ) ผลการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลจากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพโดยยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1 ด้วยกระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยา (Separate Hydrolysis and Fermentation : SHF) เปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยา (Simultaneous Saccharification and Fermentation : SSF) พบว่าปริมาณเอทานอลสูงสุดจากกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยา (13.658 กรัม/ลิตร) สูงกว่าที่ได้จากกระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยา (8.09 กรัม/ลิตร) ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯ ซึ่งให้เห็นว่าไม่มีสารยับยั้งการหมักเอทานอลปนเปื้อนอยู่ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯ ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลผสมสารละลายน้ำตาลที่มีกากเส้นใยฯ แชนลอยอยู่ ได้เอทานอลสูงสุด 68.77 กรัม/ลิตร (0.44 กรัมเอทานอล/กรัม น้ำตาล) ที่ 72 ชั่วโมง สูงกว่าที่ได้จากการหมักกากน้ำตาลผสมสารละลายน้ำตาลที่ไม่มีกากเส้นใยฯ แชนลอย 10.43% โดยพบเซลล์ยีสต์เกาะติดอยู่ที่พื้นผิวของกากเส้นใยฯซึ่งมีลักษณะขรุขระและมีโพรงกระจายทั่วไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2558

5571984023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: OIL PALM EMPTY FRUIT BUNCH / STEAM EXPLOSION / ENZYMATICAL HYDROLYSIS

TRINSET WEERAPHAN: Steam Explosion Treated OPEFB Fiber : Ethanol Production and Supplementation in Ethanol Production from Molasses. ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D., 64 pp.

In this research, an optimum condition for oil palm empty fruit bunch (OPEFB) pretreatment by integrated alkaline - steam explosion was investigated. It was found that, the OPEFB (2 – 10 mm length) soaked in 2 M sodium hydroxide at 10% (w/v) for 16 h followed by steam explosion (3% w/v loading) at 200°C for 5 min was optimal pretreatment condition. Hydrolysis of the pretreated OPEFB by cellulase (894 CMCs units and 232.35 PNG units/g OPEFB) for 6 h gave maximum reducing sugar (22.213 g/l or 0.22 g/g OPEFB) or glucose (15.31 g/l or 0.15 g/g OPEFB). Ethanol production by Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) and Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) using *Kluyveromyces marxianus* (G2-16-1) revealed that maximum ethanol produced by the SSF process (13.658 g/l) was higher than SHF process (8.09 g/l). Ethanol production from molasses (22% (w/v) of total sugar) mixed with OPEFB hydrolysate indicated that there was no ethanol producing inhibitor in the OPEFB hydrolysate. Fermentation of molasses mixed with OPEFB hydrolysate contained residual OPEFB yield maximum ethanol 68.77 g/l at 72 h (0.44 g/g utilized sugar) which was 10.43% higher than those produced by molasses mixed with OPEFB hydrolysate without residual OPEFB.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Industrial Microbiology

Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาอบรมความรู้ ชี้แนะและให้คำปรึกษา แก่ข้าพเจ้า ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่ให้ความกรุณาเป็นประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา และรองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวิช กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการแนะนำและแก้ไข วิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ บริษัทไทยทาโลว์ แอนด์ ออยล์ จำกัด (จังหวัดสุราษฎร์ธานี) ที่ให้ความอนุเคราะห์ทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ว่าที่ร้อยเอก วีระเดช สุขเอียด เจ้าหน้าที่วิจัยจากสถาบันวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และ คุณสมคิด ทองศิลา เจ้าหน้าที่บริหารการศึกษา (ครูปฏิบัติการ) ภาควิชาวัสดุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกด้านเครื่องมือและ พื้นที่ในการเตรียมตัวอย่างทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่า

ขอขอบคุณ คุณจุฑารัตน์ เกษรสิทธิ์ สำหรับคำแนะนำให้ความรู้ทางงานปฏิบัติการ รวมถึงสมาชิกห้องปฏิบัติการ 1804/15 ที่คอยช่วยเหลือและสร้างบรรยากาศที่ดีในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาอนุมัติ “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช เพื่อใช้เป็นทุนสนับสนุนงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากงานวิจัย	2
บทที่ 2	3
ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ปาล์มน้ำมัน.....	3
2.2 ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า	5
2.3 ลิกโนเซลลูโลส	6
2.4 การผลิตเชื้อเพลิงชีวมวลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส	10
2.5 ขั้นตอนการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส.....	12
2.6 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ	15
2.7 การปรับสภาพทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า	18
2.8 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis).....	22

2.9 กากน้ำตาล.....	22
2.10 การหมักเอทานอล	23
บทที่ 3	26
วัตถุประสงค์และวิธีการดำเนินการทดลอง	26
3.1 ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า	26
3.2 กากน้ำตาล.....	26
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	26
3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
3.5 จุลินทรีย์	28
3.6 เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	28
3.7 การศึกษาลักษณะสมบัติของทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า.....	28
3.8 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าโดยวิธีการ ระเบิดด้วยไอน้ำ.....	29
3.9 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	29
3.10 การหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	29
3.10.1 การหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยา (Separate Hydrolysis and Fermentation).....	29
3.10.2 การหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยา (Simultaneous Saccharification and Fermentation).....	30
3.11 การหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกันกับกากน้ำตาล	30
3.12 วิธีการวิเคราะห์	31

บทที่ 4	32
ผลการทดลองและอภิปรายผล	32
4.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล้า	32
4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล้าโดยใช้ต่างร่วมกับ วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ	33
4.2.1 ขนาดเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล้าที่เหมาะสม	33
4.2.2 ปริมาณของเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล้าที่เหมาะสม (substrate loading).....	34
4.2.3 ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม	35
4.2.4 อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการระเบิดด้วยไอน้ำ	35
4.3 ลักษณะเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล้าหลังการปรับสภาพด้วยต่างร่วมกับวิธีการระเบิด ด้วยไอน้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	37
4.4 ภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล้าที่ผ่าน การปรับสภาพ.....	38
4.5 ผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล้า	39
4.6 ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลร่วมกับสารละลายที่ได้จากการย่อยเส้นใยทะเลลาย ปาล์มน้ำมันเปล้า	42
บทที่ 5	46
สรุปผลการทดลอง.....	46
รายการอ้างอิง	47
ภาคผนวก ก.....	54
สารเคมี	54
ภาคผนวก ข.....	57
กราฟสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน.....	57
ภาคผนวก ค.....	58

อาหารเลี้ยงเชื้อ	58
ภาคผนวก ง	59
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันปลาที่ผ่านการปรับสภาพ	59
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	64



สารบัญตาราง

ตารางที่ 4.1.1: องค์ประกอบทางเคมีของทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่า.....	32
ตารางที่ 4.5.1: ตัวอย่างเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วกับวัสดุชีวเซลลูโลสชนิดอื่นๆ.....	41



สารบัญรูป

รูปที่ 2.1.1: ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ <i>Elaeis guineensis</i>	3
รูปที่ 2.1.2: ทะลายปาล์มน้ำมันที่ถูกนึ่งด้วยไอน้ำร้อนก่อนจะเข้ากระบวนการสกัดเมล็ด	4
รูปที่ 2.1.3: ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าหลังจากการสกัดเมล็ดออกแล้ว มีปริมาณมากและมูลค่าต่ำ.....	4
รูปที่ 2.2.1: ลักษณะรูปร่างของทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า	5
รูปที่ 2.2.2: ผลึกซิลิกาที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า.....	6
รูปที่ 2.3.1.1: โครงสร้างของเซลลูโลส	7
รูปที่ 2.3.2.1: โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	7
รูปที่ 2.3.2.2: โครงสร้างของกาแล็กโทกลูโคแมนแนนในไม้เนื้ออ่อน.....	8
รูปที่ 2.3.2.3: โครงสร้างของอะราบินอกลูโครโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน.....	8
รูปที่ 2.3.2.4: โครงสร้างของกลูโครโนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง.....	8
รูปที่ 2.3.3.1: โครงสร้างของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ลิกนินของพืช	9
รูปที่ 2.4.1: การนำชีวมวลมาใช้ประโยชน์ โดยทำการสลายโครงสร้าง.....	10
รูปที่ 2.6.1: ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายกลูโครโนไซแลนและเซลลูโลสจากวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (1) น้ำตาลอะราบินอส (2) น้ำตาลไซโลส (3) โอลิโกเมอร์จากหมู่อะซีดีลของเฮมิเซลลูโลส (4) โอลิโกเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ (5) โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีกิ่งก้าน (6) น้ำตาลกลูโคส (7) เซลโลไบโอส (8) โอลิโกเมอร์จากเซลลูโลส (9) เพอร์ฟูรัล (10) ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล (11) กรดเลวูลินิก (12) น้ำตาลโครงสร้าง 5 เหลี่ยม (13) กรดคาร์บอกซิลิก และนอกจากนี้ยังพบกรดแอซีติกและกรดฟอร์มิกด้วย.....	16
รูปที่ 2.6.2: แผนภาพแสดงการนำวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำมาใช้ร่วมกับการปรับสภาพโดย	17
รูปที่ 2.9.1: แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล	23
รูปที่ 2.10.1: แผนภาพแสดงกระบวนการไกลโคไลซิส	24
รูปที่ 2.10.2: แผนภาพแสดงปฏิกิริยาเปลี่ยนไพรูเวทเป็นเอทานอล	25
รูปที่ 4.1.1: ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด, (A) พื้นผิวภายนอก (35X), (B) พื้นผิวภายใน (1,000X).....	32
รูปที่ 4.2.1.1: ผลของความยาวเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	34
รูปที่ 4.2.2.1: ผลของปริมาณเส้นใยฯในถังปฏิกรณ์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้.....	34
รูปที่ 4.2.3.1 : ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอนการแช่เส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าก่อนการปรับสภาพต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯที่ผ่าน	

การปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	35
รูปที่ 4.2.4.1 : ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	36
รูปที่ 4.2.4.2: ผลของเวลาในการระเบิดด้วยไอน้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	36
รูปที่ 4.3.1: ลักษณะของเส้นใยละลายปาล์มน้ำมันเปล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ กำลังขยาย 35 เท่า (A) ก่อนการปรับสภาพ (B) หลังการปรับสภาพ.....	37
รูปที่ 4.4.1: ผลของ pH ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยละลายปาล์มน้ำมันเปล่า ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	38
รูปที่ 4.4.2: ผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใย ละลายปาล์มเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	39
รูปที่ 4.5.1: ผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยละลายปาล์มเปล่าโดย.....	40
รูปที่ 4.6.1: ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	443
รูปที่ 4.6.2: ผลการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยละลายปาล์ม น้ำมันเปล่าร่วมกับกากน้ำตาลที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (A) สารละลาย น้ำตาลที่แยกกากเส้นใยออกแล้ว (B) สารละลายน้ำตาลที่มีกากเส้นใยแขวนลอยอยู่.....	44
รูปที่ 4.6.3: ลักษณะเส้นใยละลายปาล์มน้ำมันเปล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	45

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปาล์มน้ำมัน (Oil Palm) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยที่รัฐบาลให้การสนับสนุน เนื่องจากสามารถนำมาแปรรูปเป็นน้ำมันเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ ปัจจุบัน (พ.ศ. 2557) ประเทศไทยมีผลผลิตเป็นผลปาล์มน้ำมันมากถึง 12.5 ล้านตัน (สถานการณ์ปาล์มน้ำมัน เดือนกุมภาพันธ์ 2558 : ออนไลน์) เนื่องจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม ทะลายปาล์มที่มีผลปาล์มติดอยู่จะถูกนำมาอบด้วยไอน้ำเพื่อแยกเมล็ดปาล์มออกไปสกัดน้ำมัน เหลือทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าเหล่านี้โดยทั่วไปแล้วมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบถึง 62.9 % (w/w) (Law และคณะ, 2007) จึงมีแนวคิดที่จะนำทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าเหล่านี้มาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง ซึ่งเซลลูโลสที่พบในทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า นั้นอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าลิกโนเซลลูโลส โดยเซลลูโลสถูกปกคลุมด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน จึงต้องนำทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าเหล่านี้มาปรับสภาพเพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ออกจากเซลลูโลส เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลส สามารถย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ งานวิจัยนี้จะทำการปรับสภาพทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) ซึ่งเป็นวิธีการใช้ไอน้ำความร้อนสูง อุณหภูมิประมาณ 160 – 260 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสูงเป็นระยะเวลาสั้นๆ แล้วลดความดันลงอย่างเฉียบพลัน เพื่อทำให้องค์ประกอบต่างๆในโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสแยกออกจากกัน นอกจากนี้ที่อุณหภูมิสูง หมู่อะซิล (acetyl group) ในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก (acetic acid) ซึ่งสามารถละลายเฮมิเซลลูโลสออกจากลิกโนเซลลูโลส ข้อดีของการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ คือสามารถใช้ได้กับชีวมวลที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ จึงประหยัดพลังงานในขั้นตอนการลดขนาดของวัตถุดิบ ซึ่งเดิมนั้นเป็นขั้นตอนที่ต้องการพลังงานสูงมาก และเป็นระบบซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ง่าย

กากน้ำตาล (molasses) จัดเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอีกชนิดหนึ่ง เกิดขึ้นในกระบวนการการผลิตน้ำตาลจากอ้อย โดยเริ่มจากการที่บดสกัดเอาน้ำอ้อยและนำน้ำอ้อยมาเคี่ยวจนผลึกน้ำตาลตกตะกอน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเอาผลึกน้ำตาลออกจนเหลือแต่กากน้ำตาลซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวข้นเหนียวสีดำขี้ม องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลจะเป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึกจากการเคี่ยว ดังนั้นผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดที่จะนำเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่ามาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการหมักเอทานอลร่วมกับกากน้ำตาล เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทาง

การเกษตร เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าและเป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทะลายปาล์มเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์ มาหมักเป็นเอทานอลร่วมกับกากน้ำตาล

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 คำนวณข้อมูลและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- 1.3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า
- 1.3.3 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ
- 1.3.4 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้ได้เป็นสารละลายน้ำตาล
- 1.3.5 หมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกันกับกากน้ำตาล

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากงานวิจัย

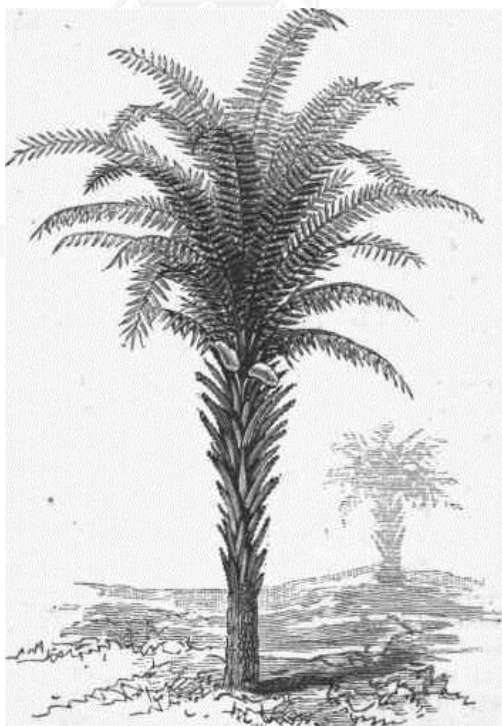
ทราบภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า โดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อนำทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เป็นน้ำตาลสำหรับการหมักเอทานอลเชื้อเพลิงและเป็นการทำให้ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่ามีมูลค่าเพิ่มขึ้น

บทที่ 2

ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา แบ่งเป็น 3 สายพันธุ์ คือ *Elaeis guineensis* (ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์แอฟริกา), *Elaeis oleifera* (ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์อเมริกาตอนใต้) และ *Elaeis odora* (ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์อเมริกา) ในเชิงการค้า สายพันธุ์ *Elaeis guineensis* นิยมปลูกเนื่องจากให้ผลผลิตตลอดปี ทนต่ออากาศแล้ง และความสูงลำต้นไม่สูงมากทำให้สะดวกต่อการเก็บเกี่ยวผล โดยในประเทศไทยได้ริเริ่มปลูกปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจตั้งแต่ปี พ.ศ. 2511 ซึ่งได้มีการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ปาล์มมาอย่างต่อเนื่อง โดยปัจจุบันได้มีการผสมสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันทางเศรษฐกิจที่กรมวิชาการเกษตรรับรอง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มให้ผลเมื่ออายุประมาณ 2 – 3 ปี และมีขนาดทะลายที่โตเต็มที่เมื่ออายุได้ 5 ปี โดยมีรอบการเก็บเกี่ยว 15 วันต่อครั้งจนถึงอายุประมาณ 25 ปี (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, 2558 : ออนไลน์)



รูปที่ 2.1.1: ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ *Elaeis guineensis*

(ที่มา : <http://chestofbooks.com/reference/American-Cyclopaedia-9/Palm-Oil.html#.VV5ZLvmqqko> : ออนไลน์)

ทะลายปาล์มน้ำมัน เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจ เนื่องจากสามารถนำมาเข้ากระบวนการเพื่อแยกเมล็ดปาล์มออกไปบดสกัดเป็นน้ำมันปาล์ม ที่ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง, อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง รวมไปถึงอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ด้วยเช่นกัน กระบวนการการผลิตน้ำมันปาล์มนั้นจะเริ่มจากการลำเลียงทะลายปาล์มน้ำมันสดเข้าสู่ขั้นตอนการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ด้วยไอน้ำ คัดแยกผลและเมล็ดเพื่อนำไปสกัดน้ำมัน เหลือทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งมีปริมาณมากและมีมูลค่าต่ำ



รูปที่ 2.1.2: ทะลายปาล์มน้ำมันที่ถูกนึ่งด้วยไอน้ำร้อนก่อนจะเข้ากระบวนการสกัดเมล็ด



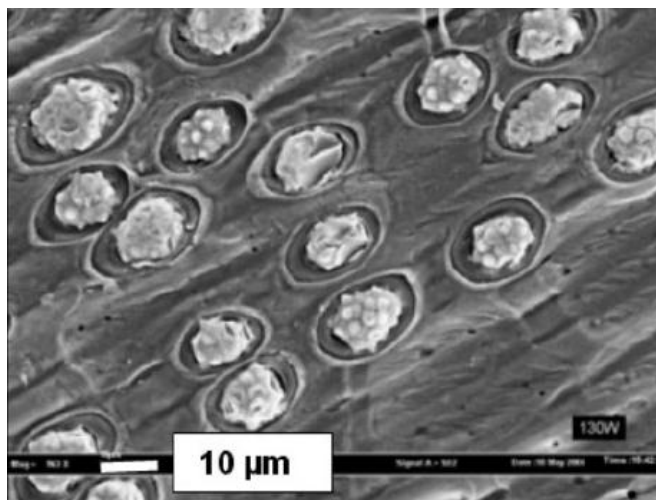
รูปที่ 2.1.3: ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าหลังจากการสกัดเมล็ดออกแล้ว มีปริมาณมากและมีมูลค่าต่ำ

2.2 ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า

ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าจัดเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ประกอบไปด้วยเส้นใยจำนวนมาก รวมตัวกัน มีลักษณะเหนียวและแข็ง ที่บริเวณผิวของเส้นใยมีผลึกซิลิกาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 – 15 ไมโครเมตร ฝังตัวอยู่จำนวนมาก แต่มีรายงานการวิจัยที่ระบุว่า การบดเส้นใย ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าด้วยเครื่องบดแบบค้อนเหวี่ยง (Hammer mill) และล้างด้วยน้ำสามารถช่วยลดปริมาณของผลึกซิลิกาบริเวณผิวเส้นใยลงได้ (Law และคณะ, 2007) ส่วนองค์ประกอบทางเคมีของทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า แม้ว่าจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์และพื้นที่เพาะปลูก แต่องค์ประกอบหลักจะเป็นลิกโนเซลลูโลสกว่า 70% ของมวลทั้งหมด รองลงมาจะเป็นสารแทรกชนิดต่างๆ เช่น แร่ธาตุ เถ้า เป็นต้น (Law และคณะ, 2007; Ariffin และคณะ, 2008; Simarani และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.2.1: ลักษณะรูปร่างของทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า



รูปที่ 2.2.2: ผลึกซิลิกาที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปลา

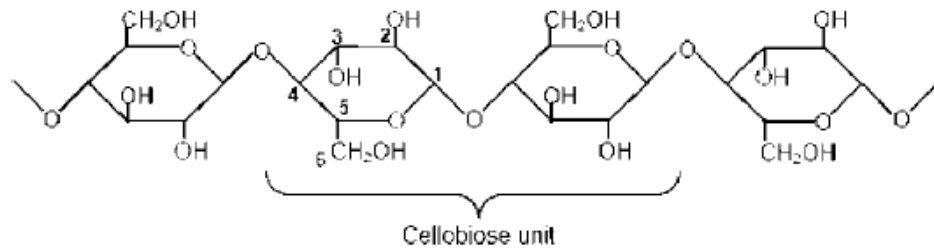
(ที่มา : Law และคณะ, 2007)

2.3 ลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสเป็นโครงสร้างพื้นฐานของพืช ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และ ลิกนิน (lignin)

2.3.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันแบบไม่มีกิ่งก้านสาขาด้วยพันธะเบต้า - (1,4) - ไกลโคซิดิก มีหน่วยซ้ำ (repeating unit) เรียกว่า เซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เกิดจากกลูโคส 2 โมเลกุลเชื่อมกันซ้ำๆ เป็นสายกลูแคน (glucan) ซึ่งแต่ละสายกลูแคนนั้นจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและพันธะแวนเดอร์วาลส์ (Vander Waals bond) ทำให้สายกลูแคนเรียงตัวกันแบบคู่ขนาน เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ส่วนที่เรียงตัวแน่นเป็นระเบียบจะเรียกว่า โครงสร้างแบบผลึก (crystalline structure) เป็นส่วนที่มีพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก ทำให้มีเส้นใยเซลลูโลสมีลักษณะที่ไม่ละลายน้ำและความไวต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายต่ำ ในทางกลับกันส่วนที่เรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบจะเรียกว่า โครงสร้างแบบอสัณฐาน (amorphous structure) ซึ่งจะมีความไวต่อสารเคมีและเอนไซม์มากกว่า

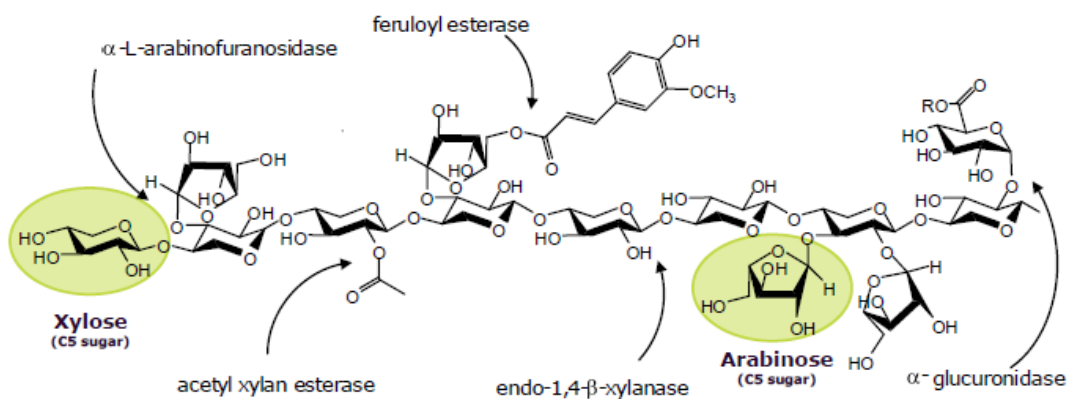


รูปที่ 2.3.1.1: โครงสร้างของเซลลูโลส

(ที่มา : Kumar และคณะ, 2009)

2.3.2 เฮมิเซลลูโลส

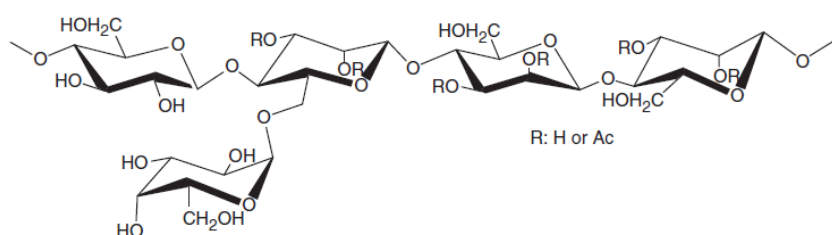
เฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนที่ยึดติดกับเซลลูโลส ช่วยเสริมสร้างโครงสร้างผนังเซลล์พืชให้หนาและแข็งแรงขึ้น เฮมิเซลลูโลสมีความแตกต่างที่ชัดเจนกับเซลลูโลสคือ เซลลูโลสนั้นเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ที่เชื่อมต่อกันด้วยน้ำตาลกลูโคสจนได้โครงสร้างเป็นเส้นตรง แต่เฮมิเซลลูโลสนั้นจัดเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็นสายโซ่ที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาของหน่วยย่อยต่างๆ เช่น น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (น้ำตาลเพนโทส) ได้แก่ ไซโลส (xylose), แรมโนส (rhamnose) และอะราบินโนส (arabinose) น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (น้ำตาลเฮกโซส) ได้แก่ กลูโคส, แมนโนส (mannose) และกาแล็กโทส (galactose) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ เช่น กรดยูโรนิก (uronic acid) อีกด้วย



รูปที่ 2.3.2.1: โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

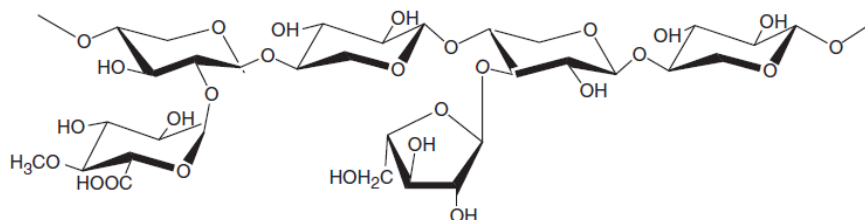
(ที่มา : เอกสารเผยแพร่ของบริษัท Novozyme : ออนไลน์)

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนมากกว่าเซลลูโลส อีกทั้งโครงสร้างยังแตกต่างกันในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน กล่าวคือ เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อนจะมีส่วนประกอบสำคัญคือ กาแล็กโทกลูโคแมนแนน (galactoglucomannans) อะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) ดังรูปที่ 2.3.2.2 และ 2.3.2.3 ตามลำดับ ส่วนในไม้เนื้อแข็งนั้นจะมีองค์ประกอบหลักคือ กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 2.3.2.4) (Pu และคณะ, 2008)



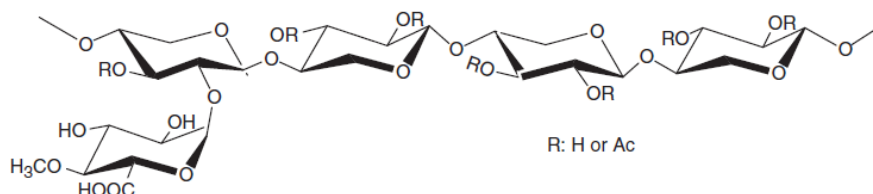
รูปที่ 2.3.2.2: โครงสร้างของกาแล็กโทกลูโคแมนแนนในไม้เนื้ออ่อน

(ที่มา : Pu และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.3.2.3: โครงสร้างของอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน

(ที่มา : Pu และคณะ, 2008)



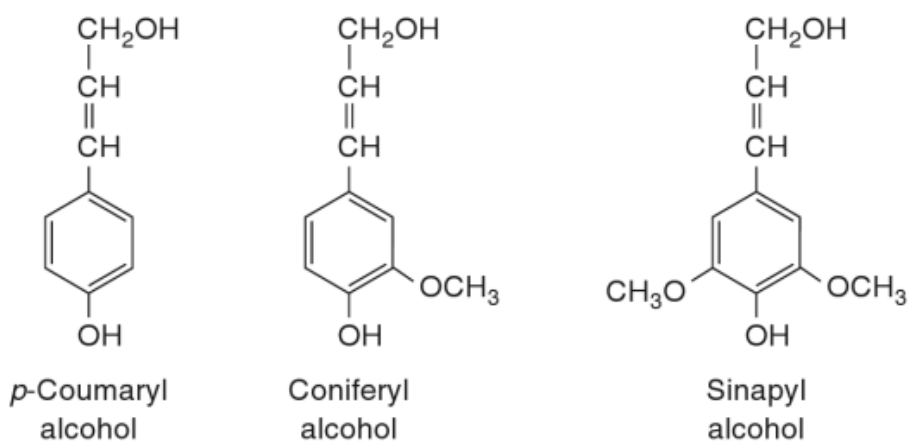
รูปที่ 2.3.2.4: โครงสร้างของกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง

(ที่มา : Pu และคณะ, 2008)

2.3.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นส่วนที่พบได้ในผนังเซลล์พืช ทำหน้าที่ป้องกันจุลินทรีย์หรือสารเคมีที่จะทำอันตรายต่อเซลล์ อีกทั้งลิกนินยังทำหน้าที่คล้ายกับกาวที่จะคอยยึดเชื่อมเส้นใยของพืช (wood fiber) เข้าด้วยกัน (Shamsudin และคณะ, 2012) ซึ่งเป็นผลให้เนื้อไม้มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อเทียบกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินจึงเป็นโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนมากที่สุด

โครงสร้างของลิกนินจะเป็น อะโรมาติกพอลิเมอร์ (aromatic polymer) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า ฟีนิลโพรพิโอนิกแอลกอฮอล์ (phenylpropionic alcohol) ได้แก่ coniferyl alcohol (guaiacyl propanol), coumaryl alcohol (hydroxyl phenyl propanol) และ sinapyl alcohol (syringyl alcohol) เป็นสารตั้งต้นที่จะเชื่อมต่อกันเป็นรูปแบบสามมิติด้วยพันธะชนิดต่างๆ กลายเป็นพอลิเมอร์ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น ซึ่งสัดส่วนของหน่วยย่อยแต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันในพืชแต่ละสายพันธุ์



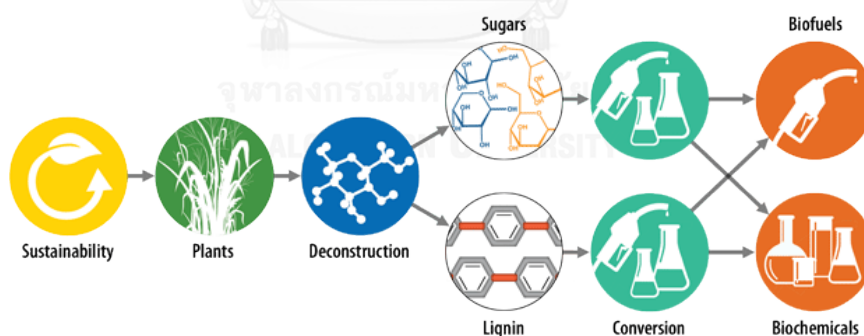
รูปที่ 2.3.3.1: โครงสร้างของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ลิกนินของพืช

(ที่มา : Glazer and Nikaido, 2007)

2.4 การผลิตเชื้อเพลิงชีวมวลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส

เนื่องด้วยการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโลกและการพัฒนาในด้านอุตสาหกรรมทำให้ความต้องการในการใช้เชื้อเพลิงซากดึกดำบรรพ์ หรือ เชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) เพิ่มสูงมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเมืองหลวงที่มีความเจริญทางเทคโนโลยีและคุณภาพประชากร ทว่าผลกระทบจากการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้เองทำให้เกิดปัญหาในด้านสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นระดับการปล่อยมลพิษทางอากาศที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ รวมไปถึงปรากฏการณ์เรือนกระจกที่เกิดขึ้นบนบรรยากาศโลก นอกจากนี้การนำเข้าน้ำมันปิโตรเลียมยังก่อให้เกิดค่าใช้จ่ายทางเศรษฐกิจสูง ดังนั้น เชื้อเพลิงชีวมวล (Biofuel) จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในฐานะเชื้อเพลิงที่ผลิตได้จากสารอินทรีย์ ที่มีข้อดีกว่าเชื้อเพลิงฟอสซิลคือ ช่วยลดการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์ในชั้นบรรยากาศ อีกทั้งยังมีส่วนประกอบของกำมะถันและโลหะหนักที่ปนเปื้อนในปริมาณที่น้อยกว่า (Demirbas, 2005) เป็นการลดมลภาวะทางอากาศและสารตกค้างได้

เชื้อเพลิงชีวมวล อาจผลิตทั้งทางตรงจากชีวมวลของพืชเช่น กิ่งไม้ ท่อนไม้ เรียกว่าเป็นแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน (renewable source) เนื่องจากสามารถปลูกเพื่อทดแทนได้ หรือทั้งทางอ้อมจากการนำของเสียจากโรงงานหรือเศษชิ้นส่วนการเกษตรเข้าสู่กระบวนการผลิตต่างๆ โดยอาจจะได้ในรูปแบบของแก๊สชีวภาพ (biogas) เช่น มีเทน (methane) ที่เกิดจากกระบวนการหมักเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหุงต้ม หรือรูปแบบของเหลว (liquid fuel) เช่น เมทานอล (methanol : CH_3OH) และเอทานอล (ethanol : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) เป็นต้น



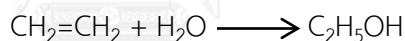
รูปที่ 2.4.1: การนำชีวมวลมาใช้ประโยชน์ โดยทำการสลายโครงสร้าง เพื่อผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมี

(ที่มา : <http://genomicscience.energy.gov/centers/glbr.html> : ออนไลน์)

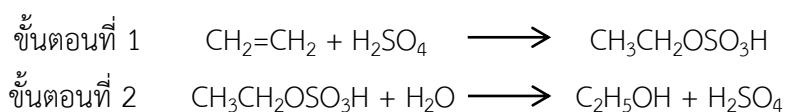
ในอุตสาหกรรมเชื้อเพลิง เมทานอลและเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์นั้น สามารถนำมาผสมกับน้ำมันเบนซิน (gasoline) เป็นน้ำมันสูตรใหม่ที่เรียกว่า น้ำมันแก๊สโซฮอล (gasohol) ซึ่งจะใช้เพิ่มค่าออกเทน (octane number) แทนที่สารเอ็มทีบีอี (MTBE : methyl tertiary butyl ether) ซึ่งเดิมทีใช้เป็นตัวเพิ่มค่าออกเทนแต่พบว่าสารเอ็มทีบีอีเป็นสารพิษต่อสิ่งแวดล้อมในแง่ของสารประกอบ

ไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่หมด และตกค้างในธรรมชาติ (Werner และคณะ, 2001) อีกทั้งในประเทศไทยไม่สามารถผลิตเองได้ จึงต้องพึ่งพาและเสียค่าใช้จ่ายในการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นการผลิตแอลกอฮอล์บริสุทธิ์เข้ามาใช้ร่วมกับน้ำมันเบนซินในประเทศไทย จึงเริ่มมีบทบาทสำคัญมากขึ้นในปี พ.ศ. 2528 โดย พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ ได้ทรงมีพระราชดำริให้โครงการส่วนพระองค์ฯ ศึกษาการนำอ้อยมาแปรรูปให้เป็นแอลกอฮอล์เพื่อใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินเป็นครั้งแรก (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2550) เนื่องจากมีรายงานการศึกษาที่ระบุว่าเมทานอลนั้นจัดเป็นสารพิษที่มีอันตรายต่อร่างกาย (Martin-Amat และคณะ, 1977) อีกทั้งอันตรายจากเปลวไฟไม่มีสีที่เกิดจากเมทานอลบริสุทธิ์ในกรณีที่ใช้กับเครื่องยนต์หนัก จึงทำให้เอทานอลกลายเป็นแอลกอฮอล์เชื้อเพลิงที่สำคัญที่ได้รับการยอมรับและนำไปใช้กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมนั้น มีสองประเภท คือ กระบวนการผลิตเอทานอลจากปฏิกิริยาเคมี และกระบวนการผลิตเอทานอลจากการหมัก

เอทานอลที่ถูกผลิตจากสารเคมีหรือเอทานอลสังเคราะห์ (synthetic ethanol) เกิดขึ้นจากกระบวนการไฮเดรชัน (hydration) ด้วยไอน้ำภายใต้อุณหภูมิและแรงดันสูง โดยใช้เอทิลีน (ethylene : $\text{CH}_2=\text{CH}_2$) เป็นสารตั้งต้น ดังสมการ (Nelson และ Courter, 1954)



หรืออาจสังเคราะห์ปฏิกิริยาเคมีระหว่างเอทิลีนกับกรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid : H_2SO_4) เพื่อให้ได้สารตัวกลางคือ เอทิลซัลเฟต (ethyl sulphate : $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{H}$) ก่อนจะทำปฏิกิริยาไฮเดรชันได้เป็นเอทานอล และนำกรดซัลฟิวริกกลับมาใช้อีกต่อเนื่อง ดังสมการ (Demirbas, 2005)



แม้ว่ากระบวนการสังเคราะห์เอทานอลจากสารเคมีจะทำให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์สูง และระบบปฏิบัติการยังเป็นแบบต่อเนื่อง (continuous process) จึงเป็นวิธีการที่รวดเร็ว ทว่ากระบวนการนี้กลับไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากสารตั้งต้นที่มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมนั้น ไม่ได้เป็นแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน (non-renewable source) อีกทั้งในกระบวนการการสังเคราะห์ยังจำเป็นต้องใช้พลังงานมากอีกด้วย (Polymers and ethanol from oil, 2015 : ออนไลน์)

ในทางกลับกัน เอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักนั้น เกิดจากกระบวนการที่จุลินทรีย์นำน้ำตาลเข้าสู่วิถีทางเกี่ยวกับเมตาบอลิซึม (Metabolic Pathways) และได้ผลผลิตออกมาเป็นเอทานอล ดังนั้นพืชจำพวกแป้ง-น้ำตาล เช่น มันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด ฯลฯ จึงถูกใช้เป็นวัตถุดิบหลัก ซึ่งจัดว่าเป็นการใช้วัตถุดิบจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนทางธรรมชาติที่สามารถปลูกทดแทนได้ แต่อย่างไรก็ตาม พืชจำพวกแป้ง-น้ำตาลเหล่านี้มีมูลค่าหลักอยู่แล้วในอุตสาหกรรมอาหาร จึงไม่ควรใช้พืชอาหาร แต่ควรใช้วัสดุเหลือใช้ที่ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร ที่มีปริมาณมาก และมีมูลค่าต่ำ เช่น ชังข้าวโพด ฟางข้าว ทะลายปาล์ม น้ำมันเปลา ฯลฯ มาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตเอทานอลแทน (Sarkar และคณะ, 2012) โดยวัสดุเหลือใช้เหล่านี้จัดเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส จึงสามารถนำเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายให้เซลลูโลสกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสสำหรับการหมักเอทานอลได้

กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส สามารถแบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอน (ดัดแปลงจาก Margeot และคณะ, 2009) ได้แก่

1. ขั้นตอนการปรับสภาพ (pretreatment step) เป็นขั้นตอนเพื่อทำลายโครงสร้างที่ซับซ้อนของลิกโนเซลลูโลส เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและเปิดโครงสร้างให้เซลลูโลสถูกทำปฏิกิริยาย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลได้ดีขึ้น
2. ขั้นตอนการย่อยสลาย (hydrolysis step) เป็นขั้นตอนที่ใช้เอนไซม์หรือสารเคมีเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสกลายเป็นน้ำตาล
3. ขั้นตอนการหมัก (fermentation step) เกิดจากการที่จุลินทรีย์นำน้ำตาลเข้าสู่วิถีทางเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมให้ได้เป็นเอทานอล
4. ขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ (distillation-rectification) คือการเก็บเกี่ยวเอทานอลที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์และมีคุณสมบัติที่เหมาะสมแก่การใช้เป็นเชื้อเพลิง

2.5 ขั้นตอนการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส

เนื่องจากวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลสนั้นมีโครงสร้างที่ซับซ้อนที่ประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน วิธีการปรับสภาพที่มีประสิทธิภาพจะสามารถแยกโครงสร้างหลักทั้งสามออกจากกัน ทำให้เอนไซม์หรือสารเคมีเข้าไปทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสได้ดียิ่งขึ้น วิธีการปรับสภาพนั้นมีหลายวิธีซึ่งสามารถจำแนกได้ดังนี้

2.5.1 วิธีการปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment)

การปรับสภาพทางกายภาพ เช่น การบด (grinding) การตัด (cutting) การโม่ละเอียด (milling) มีจุดประสงค์เพื่อลดขนาดของชีวมวลและเพิ่มพื้นที่ผิว และมีรายงานว่า

เมื่อนำทะเลาะลายปาล์มน้ำมันเปล่าเข้าไปบดด้วยเครื่องบดแบบค้อนเหรียญ (Hammer mill) และล้างด้วยน้ำสามารถช่วยลดปริมาณของผลิตภัณฑ์กาบริเวณผิวเส้นใยลงได้ (Law และคณะ, 2007)

นอกจากการลดขนาดของชีวมวลแล้ว วิธีการปรับสภาพทางกายภาพยังรวมถึงการใช้ความร้อน เช่น การแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) โดยใช้อุณหภูมิมากกว่า 300°C เพื่อสลายองค์ประกอบของชีวมวลให้กลายเป็นแก๊สและถ่าน (residual char) ก่อนจะปรับสภาพด้วยการชะน้ำ (leaching) หรือกรดอ่อน ให้ของเหลวที่ได้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ (Das และคณะ, 2004) หรือการให้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟที่มีลักษณะเด่นคือ สร้างจุดความร้อน (hot spot) ที่ศูนย์กลางของชีวมวลและทำให้พันธะภายในชีวมวลเกิดการสั่นสะเทือนเพื่อทำลายโครงสร้างจากภายใน (Hu and Wen, 2008)

2.5.2 วิธีการปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment)

ในการปรับสภาพโดยใช้สารเคมี สามารถแบ่งได้เป็นสองประเภทใหญ่ ได้แก่ การปรับสภาพโดยใช้สารละลายกรด และการปรับสภาพโดยใช้สารละลายด่าง

การปรับสภาพโดยใช้สารละลายกรด ซึ่งสำหรับสารละลายกรดนั้น มีกรดหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส เช่น กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) กรดไนตริก (nitric acid) กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) และกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) ในบรรดากรดเหล่านี้ กรดซัลฟิวริก ได้ถูกนำมาใช้มากที่สุด (Cardona และคณะ, 2009) โดยจะใช้สารละลายกรดในภาวะที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเฉพาะเฮมิเซลลูโลสที่ถูกละลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส (Sarkar และคณะ, 2012) แต่มีข้อเสียคือกรดเข้มข้นในอุณหภูมิสูงนั้น มีพิษกัดกร่อนเป็นอย่างมาก และต้องการระบบปฏิบัติการที่สามารถทนต่อสารละลายกรดเข้มข้นได้ มากไปกว่านั้นยังจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการบำบัดของเสียจากการปรับสภาพด้วยกรดเพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Kumar และคณะ, 2009) ต่อมามีการพัฒนารูปแบบการปรับสภาพโดยใช้สารละลายกรดเจือจาง (diluted acid) ในด้านประโยชน์ของการลดค่าใช้จ่ายและสิ่งแวดล้อม ซึ่งใช้ร่วมกับอุณหภูมิสูงเพื่อให้มีประสิทธิภาพ (McMillan, 1994) แต่อย่างไรก็ตาม จากปฏิกิริยาย่อยสลายของกรดทำให้เกิดสารบางชนิดขึ้น เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) กรดแอสติก และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural : HMF) ซึ่งเป็นสารยับยั้ง (inhibitor) การเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักได้

ในการปรับสภาพโดยใช้สารละลายต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นสารละลายที่เหมาะสมแก่การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Kumar และคณะ, 2009) เนื่องจากสามารถทำลายส่วนโครงสร้างภายในได้ด้วยการละลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เกิดช่องว่างภายในชีวมวล และมีข้อดีคือสามารถนำคุณสมบัติตรงนี้มาใช้ในการแยกส่วนลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกมาใช้ประโยชน์ เพื่อนำเข้ากระบวนการอื่นๆ เช่น การตกตะกอนแยกลิกนินออกมาด้วยกรด เพื่อใช้ในการผลิตสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆได้ (Ramos, 2003) การปรับสภาพด้วยสารละลายต่างยังมีข้อดีกว่าการใช้กรด คือ ไม่ทำปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำตาลกลายเป็นสารยับยั้งต่างๆ อีกทั้งยังสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง จึงเป็นวิธีการปรับสภาพที่ใช้อุณหภูมิและความดันน้อยที่สุด (Mosier และคณะ, 2005) แต่ต้องอาศัยระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานานในระดับชั่วโมงจนถึงวัน

ในสารละลายต่างทั้งหมดที่นำมาใช้ปรับสภาพนั้น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นสารละลายที่ได้รับการศึกษามากที่สุด อีกทั้งยังมีการทดลองเปรียบเทียบการปรับสภาพทะเลาะปาล์มน้ำมันเปล่าด้วยสารเคมีต่างๆ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก สารอีดีทีเอ (Ethylene diamine tetraacetic acid : EDTA) และ สารอีดีเอ (EDA) ก่อนที่จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งผลที่ได้พบว่าทะเลาะปาล์มเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะมีเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด และจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อนำไปให้ความร้อนโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที (Umikalsom และคณะ, 1998)

2.5.3 วิธีการปรับสภาพทางเคมีเชิงกายภาพ (physico-chemical pretreatment)

วิธีการปรับสภาพโดยใช้อุณหภูมิและความดัน จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากปฏิกิริยาทางเคมีภายในชีวมวล ซึ่งตัวอย่างการปรับสภาพทางเคมีกายภาพนี้ได้แก่

การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและนิยมนำไปใช้กับวัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดในหัวข้อลำดับถัดไป

การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion : AFEX) เป็นวิธีการที่นำแอมโมเนียมาใช้ร่วมกันกับวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำภายใต้ภาวะอุณหภูมิและแรงดันสูง (Balat และคณะ, 2008) มีประสิทธิภาพดีเมื่อใช้กับชีวมวลที่มีปริมาณของลิกนินต่ำ แต่มีข้อเสียคือแอมโมเนียนั้นมีราคาสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มขึ้นขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและใช้แอมโมเนียซ้ำ

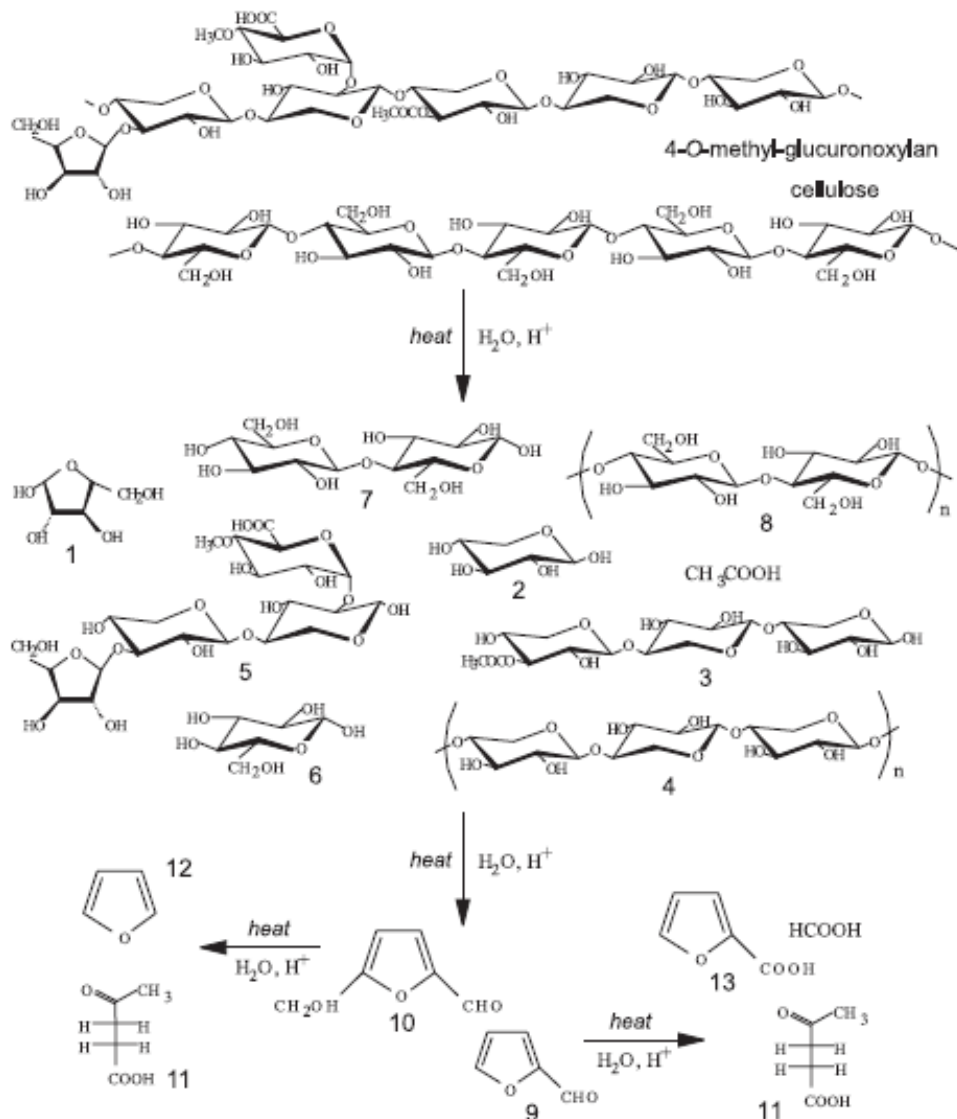
การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ explosion) มีความแตกต่างจากการระเบิดด้วยแอมโมเนียคือใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า โดยโมเลกุลของแก๊สจะกลายเป็นกรดคาร์บอนิก (carbonic acid) เมื่อละลายในน้ำ และเข้าทำปฏิกิริยาย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส

2.5.4 วิธีการปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment)

เป็นการย่อยสลายโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสด้วยจุลินทรีย์จำพวกเชื้อรา (fungi) ได้แก่ ราฟุสีน้ำตาล (brown rot fungi) ราฟุสีขาว (white rot fungi) และราผุอ่อน (soft rot fungi) ราฟุสีขาวยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีที่สุดใน เนื่องจากสามารถย่อยสลายเซลลูโลสและสามารถผลิตเอนไซม์ เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) และแลคเคส (laccase) เพื่อย่อยสลายพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนอย่างลิกนินได้ (Lee และคณะ, 2007) ในขณะที่ราฟุสีน้ำตาลสามารถย่อยได้เพียงเซลลูโลสเท่านั้น ดังนั้นวิธีการปรับสภาพทางชีวภาพจึงมีข้อดี คือ เป็นวิธีการที่ปลอดภัย ลดการใช้พลังงานจากเครื่องจักร ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมี แต่มีข้อเสียคืออัตราการย่อยสลายช้าและได้ผลผลิต (yield) ต่ำ (Balat และคณะ, 2008)

2.6 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ เป็นวิธีการปรับสภาพแบบเคมีเชิงกายภาพ ซึ่งนิยมใช้ทั่วไปกับวัสดุลิกโนเซลลูโลส (McMillan, 1994) มีหลักการคือ วัสดุลิกโนเซลลูโลสจะถูกปรับสภาพด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิสูง 140 - 260°C (Shamsudin และคณะ, 2012) ภายใต้แรงดัน 0.7 - 4.8 เมกะปาสกาล (Agbor และคณะ, 2011) คงภาวะไว้ระยะเวลาหนึ่งเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในลิกโนเซลลูโลส กล่าวคือที่ภาวะดังกล่าวนี้ จะเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำ (autohydrolysis) เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิดิกในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส เปลี่ยนเป็นกรดแอสติค และทำลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ของเซลลูโลส ทำให้ความเป็นผลึกลดลง ซึ่งกรดแอสติคนี้ จะเร่งการย่อยสลายโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสและปลดปล่อยกรดชนิดอื่นๆออกมา เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดเลวูลินิก (levulinic acid) เป็นต้น(รูปที่ 2.6.1) (Ramos, 2003) จากนั้นลดแรงดันกลับมาสู่แรงดันบรรยากาศ (atmospheric pressure) ซึ่งการลดแรงดันอย่างรวดเร็ว จะทำให้ความชื้นภายในวัตถุดิบขยายตัวและระเบิดออก ลิกนินที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างห่อหุ้มและยึดส่วนต่างๆของลิกโนเซลลูโลสถูกทำลาย บางส่วนได้เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (transformation) ไปเป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compound)

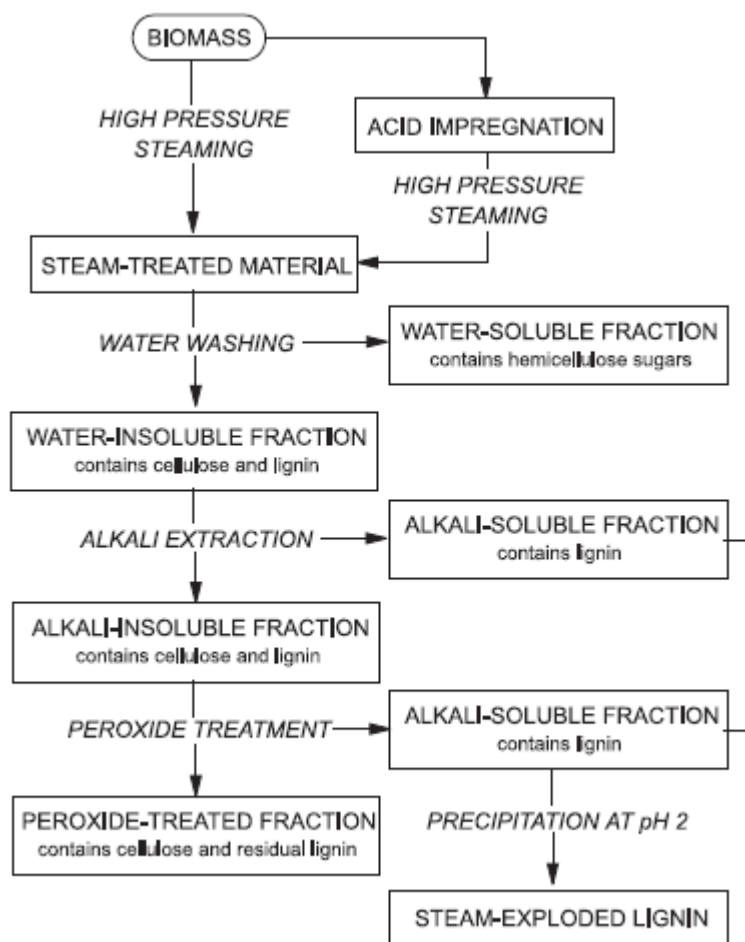


รูปที่ 2.6.1: ผลึกภัณฑ์จากการย่อยสลายกลูคูโรโนไซแลนและเซลลูโลสจากวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (1) น้ำตาลอะราบินอส (2) น้ำตาลไซโลส (3) โอลิโกเมอร์จากหมู่อะซีติลของเฮมิเซลลูโลส (4) โอลิโกเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ (5) โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีกิ่งก้าน (6) น้ำตาลกลูโคส (7) เซลโลไบโอส (8) โอลิโกเมอร์จากเซลลูโลส (9) เพอร์ฟูรัล (10) ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล (11) กรดเลวูลินิก (12) น้ำตาลโครงสร้าง 5 เหลี่ยม (13) กรดคาร์บอกซิลิก และนอกจากนี้ยังพบกรดแอสซิติคและกรดฟอร์มิกด้วย

(ที่มา : Ramos, 2003)

วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำมีข้อดีคือเป็นวิธีการที่ทำลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสได้ดี ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมี หรือมีการใช้สารเคมีน้อย เช่น การเติมสารละลายกรดเจือจางเพื่อเร่งปฏิกิริยา หรืออาจไม่ใช้สารเคมีเลย ดังนั้นจึงลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดของเสีย ไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในสภาพแวดล้อม และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดสารเคมีตกค้าง นอกจากนี้อุปกรณ์ที่ใช้ง่ายต่อกร

ขยายขนาดไปสู่ระดับอุตสาหกรรม อีกทั้งวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำนี้ สามารถนำไปใช้ร่วมกับการปรับสภาพโดยใช้สารละลายต่างเพื่อประโยชน์ในการแยกเอาส่วนของลิกนินออกมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์อื่นๆได้ (รูปที่ 2.6.2)



รูปที่ 2.6.2: แผนภาพแสดงการนำวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำมาใช้ร่วมกับการปรับสภาพโดยสารละลายต่าง เพื่อแยกเอาส่วนของลิกนินออกมาใช้ประโยชน์ได้

(ที่มา : Ramos, 2003)

แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำมีข้อเสียคือ ลิกนินไม่ได้ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์และยังคงเหลืออยู่ในโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่นิยมนำไปใช้กับไม้เนื้ออ่อนที่มีปริมาณของลิกนินสูงมากกว่าไม้เนื้อแข็ง อีกทั้งการที่ส่วนไซแลนของเฮมิเซลลูโลสนั้นถูกย่อยสลายจากการทำปฏิกิริยาของกรด จะทำให้ปลดปล่อยสารยับยั้งบางชนิด เช่น เฟอร์ฟูรัล ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล เป็นต้น แต่สามารถกำจัดออกได้โดยล้างชีวมวลด้วยน้ำ (McMillan, 1994)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ เช่น การศึกษาวิธีการปรับสภาพฟางข้าวสาธิตเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล ด้วยยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ CECT 10875 โดยทดลองเปรียบเทียบฟางข้าวสาธิตที่แช่ในน้ำและในสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง 0.9 % (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนจะทดลองหาภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำโดยแปรผันอุณหภูมิ (160 – 200 °C) เวลา (5, 10 และ 20 นาที) ผลการทดลองพบว่าฟางข้าวสาธิตที่แช่ในสารละลายกรดเจือจางก่อนจะนำไประเบิดด้วยไอน้ำที่ 180 °C เป็นเวลา 10 นาที นั้นให้ปริมาณเอทานอลมากที่สุด (12 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัตถุดิบ) (Ballesteros และคณะ, 2006)

Cara และคณะ (2008) ศึกษาการปรับสภาพกิ่งต้นมะกอกด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อนำไปผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผลการทดลองพบว่า การใช้วิธีระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะทำให้ได้ปริมาณของเอทานอล 7.2 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมวัตถุดิบ

2.7 การปรับสภาพทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล้า

สำหรับทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล้านั้น มีตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ เช่น

Ariffin และคณะ (2008) ได้ศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีการทางกายภาพ วิธีการทางเคมีและวิธีการให้ความร้อน ก่อนที่จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตเป็นน้ำตาล โดยวิธีการทางกายภาพเริ่มจากการเปรียบเทียบขนาดของเส้นใย 1 – 2 ซม. และ 1 – 2 มม. วิธีการทางเคมีคือแช่เส้นใยในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.5 โมลาร์ นาน 4 ชม. แล้วล้างน้ำ จากนั้นอบแห้งที่ 105°C วิธีการให้ความร้อนคือแช่เส้นใยขนาด 1 - 2 มม. ในน้ำ แล้วนึ่งที่ 121°C นาน 15 นาที หรือนึ่งที่ 240°C นาน 50 และ 60 นาที จากนั้นอบแห้งที่ 105°C ผลการทดลองพบว่าการลดขนาดของเส้นใยไม่ทำให้โครงสร้างของเส้นใยเปลี่ยนไป ความร้อนทำให้การอัดแน่นของโครงสร้างเส้นใยลดลง (loosened structure) เพราะโครงสร้างลิกนินถูกทำลาย (degradation) ซึ่งเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่าจึงมีปริมาณสัดส่วนของเซลลูโลสมากกว่า อีกทั้งสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถกำจัดลิกนิน ออกจากเส้นใยได้เช่นเดียวกัน เส้นใยที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จึงมีปริมาณสัดส่วนเซลลูโลสมากกว่าเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 0.1 โมลาร์ ผู้วิจัยยังได้ศึกษาการปรับสภาพแบบผสม กล่าวคือ แช่เส้นใย (1 - 2 มม.) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ นาน 4 ชม. แล้วนึ่งที่ 121°C นาน 15 นาที ล้างน้ำ แล้วจึงอบแห้งที่ 105°C พบว่าความอัดแน่นของเส้นใยลดลงมากขึ้น มีโพรงเกิดขึ้นในเส้นใย เป็นหลักฐานที่แสดงว่าทั้งเคมีเซลลูโลสและลิกนินถูกกำจัดออกจากเส้นใยเพิ่มมาก

ขึ้นกว่าวิธีข้างต้น และผลการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลสนาน 48 ชม. พบว่าเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพโดยวิธีการแบบผสมนี้ ให้กลูโคสมากที่สุด (0.53 กรัม/กรัมเส้นใย) ทั้งนี้เพราะสามารถทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสถูกกำจัดออกมากขึ้น โครงสร้างของเซลลูโลสมีความซับซ้อนน้อยลง

Sudiyani และคณะ (2010) นำทะลายปาล์มน้ำมันเปล่ามาปรับสภาพโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (ปริมาณทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่แช่ในสารละลายเท่ากับ 12.5% น้ำหนัก/ปริมาตร) แปรผันเวลา 30 – 150 นาที ในอุณหภูมิ 30 และ 60°ซ และนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า การปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 90 นาทีจะช่วยลดประมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสไปได้มากที่สุด 45.8% และ 35.6% ตามลำดับ เนื่องจากโซเดียมไฮดรอกไซด์นั้น นอกจากสามารถละลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้แล้ว ยังทำให้ส่วนของเซลลูโลสเกิดการบวมพอง เกิดการสลายตัว (depolymerization) ของโครงสร้างผลึก เพิ่มพื้นที่ผิวภายใน ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้น

Rashid และคณะ (2011) ทดลองนำเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่ามาเปรียบเทียบการปรับสภาพโดยวิธีการทางกายภาพ ได้แก่ การสับ การบด การนึ่งไอน้ำ และวิธีการทางเคมี ได้แก่การแช่เส้นใยในกรดไนตริก กรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จาก *Trichoderma reesei* สายพันธุ์ RUT C-30 เป็นเวลา 96 ชม. พบว่าการปรับสภาพเส้นใยโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3% ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.175 กรัม/กรัมเส้นใย

Millati และคณะ (2011) ปรับสภาพเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าโดยใช้สารละลายกรดสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการใช้กรดซัลฟิวริกเจือจาง ความเข้มข้น 0.8% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 190°ซ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อวิเคราะห์พบว่าปริมาณน้ำตาลส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นน้ำตาลไซโลส ซึ่งเมื่อแยกเอาสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพขั้นตอนแรกไปหมักเป็นเอทานอลด้วย *Mucor indicus* ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.45 กรัมเอทานอล/กรัมเส้นใย จากนั้นปรับสภาพขั้นตอนที่สองโดยแช่กากเส้นใยที่เหลือด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง ความเข้มข้น 0.8% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 210°ซ เป็นเวลา 5 นาที พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 62.70 กรัม/กิโลกรัมเส้นใย ซึ่งเมื่อนำไปหมักเป็นเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.46 กรัม/กรัมเส้นใย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้รายงานถึงสารยับยั้งต่างๆ เช่น เพอร์ฟูรัล กรดแอสซิติค และไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่น้ำตาลถูกย่อยสลายด้วยกรดภายใต้อุณหภูมิสูง เช่นเดียวกันกับ

Zhang และคณะ (2012) ใช้สารละลายกรดปรับสภาพเช่นกัน โดยใช้กรดซัลฟิวริกและกรดฟอสฟอริกเจือจางในการปรับสภาพเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าภายใต้อุณหภูมิ 140 - 160°ซ ที่

ระยะเวลาต่างๆ โดยผลการทดลองพบว่าการใช้สารละลายกรดรวมกันคือ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แชนเส้นใยขนาด 2 มม. ที่อุณหภูมิ 160°ซ เป็นระยะเวลา 10 นาที จะทำให้ได้ผลได้เป็นร้อยละของน้ำตาลไซโลสสูงที่สุด คือ 91.30%

Bahrin และคณะ (2012) ศึกษาการปรับสภาพโดยใช้ไอน้ำความร้อนสูง (superheated steam) โดยอบแห้งเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่า ที่ 105°ซ ชำมคืน จากนั้นทดลองปรับสภาพด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 140, 180 และ 210°ซ เป็นเวลา 20, 40, 60 และ 90 นาที พบว่าเมื่อย่อยเส้นใยที่ผ่านการอบไอน้ำที่ 180°ซ เป็นเวลา 60 นาที ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 48 ชม. สามารถให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเท่ากับ 0.504 กรัม/กรัมเส้นใยฯ อีกทั้งผลการสำรวจลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนหลังการปรับสภาพยังแสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิสูงขึ้น สามารถกำจัดผลึกซิลิกาที่ฝังตัวในบริเวณผิวของเส้นใยได้มากขึ้น และผลจากการวิเคราะห์โมเลกุลสารด้วยรังสีอินฟราเรด (Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)) พบว่าไอน้ำอุณหภูมิมีผลให้โครงสร้างของลิกนินเกิดการแตกตัว โดยพิสูจน์ได้จากสัดส่วนของพอลิเมอร์อะโรมาติกที่เพิ่มขึ้น

Shamsudin และคณะ (2012) นำเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าขนาด 2.5 ซม. ที่ผ่านกระบวนการหนึ่งเพื่อสลัดเมล็ดแล้ว ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าสดที่ถูกสับและบดขนาด 5 ซม. และ 2 มม. ตามลำดับ นำไปปรับสภาพด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 140°ซ โดยแปรผันเวลา พบว่าในตัวอย่างที่ผ่านการหนึ่งและลดขนาดเหลือ 2.5 ซม. ก่อนที่จะปรับสภาพที่ 140°ซ เป็นเวลา 15 นาทีนั้น เมื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วจะให้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุด

มีรายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการแยกส่วนของลิกนินออกจากทะเลลายปาล์มเปล่าด้วยวิธีการระเหิดด้วยไอน้ำ เมื่อใช้ร่วมกับการปรับสภาพโดยสารละลายต่างๆ เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอ็กระดาซ (Wang และคณะ, 2012) โดยทำการแช่เส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเข้ากระบวนการระเหิดด้วยไอน้ำที่ความดันสูง (15 กิโลกรัม/ตารางเมตร) เป็นระยะเวลา 8 นาที เมื่อศึกษาเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน พบว่าส่วนของผนังเซลล์ถูกทำลาย และลิกนินถูกกำจัดออก

Baharuddin และคณะ (2013) ปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าโดยไอน้ำความร้อนสูงในภาวะแรงดันสูงด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) แปรผันอุณหภูมิและแรงดัน 170/0.82, 190/1.32, 210/2.03 และ 230°ซ/3.00 MPa ตามลำดับ จากนั้นตรวจวิเคราะห์ลักษณะและโครงสร้างทางเคมีของเส้นใยด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การสำรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การวิเคราะห์โมเลกุลสารด้วยรังสีอินฟราเรด และการวิเคราะห์น้ำหนักของสารที่

เปลี่ยนแปลงโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน (Thermo gravimetric analysis) พบว่าการปรับสภาพที่ 210°ซ ได้แรงดัน 2.03 MPa สามารถกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกไปได้ ในขณะที่การใช้ไอน้ำอุณหภูมิ 230°ซ ได้แรงดัน 3.00 MPa เป็นเวลา 10 นาที สามารถทำลายส่วนโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสได้มากที่สุด

Duangwang และ Sangwichien (2013) ศึกษาประสิทธิภาพของการปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง โดยแช่เส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว เท่ากับ 1:10) ภายใต้อุณหภูมิ 100 - 130°ซ เป็นระยะเวลา 15 - 90 นาที ซึ่งเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วกับเส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพ พบว่าการแช่เส้นใยทะเลลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ 130°ซ เป็นเวลา 40 นาที จะทำให้สัดส่วนของเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้นจาก 52.6% เป็น 68.8% และเมื่อย่อยเส้นใยที่ปรับสภาพแล้วด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 6% ที่ 130°ซ เป็นเวลา 90 นาที จะได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 19.96 กรัม/ลิตร

Choi และคณะ (2014) ปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3% ร่วมกับไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 160°ซ เป็นเวลา 11 นาที 20 วินาที พบว่าได้ผลได้เป็นร้อยละของกลูแคนเท่ากับ 93% จากนั้นนำเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วหมักเป็นเอทานอลด้วยกระบวนการหมักโดยกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยาด้วย *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ L3262a ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 29.4 กรัม/ลิตร

Ying และคณะ (2014) ศึกษาการปรับสภาพทะเลลายปาล์มเปล่าด้วยไอน้ำความร้อนสูง โดยนำเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าปรับสภาพแช่ในน้ำ (อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็งเท่ากับ 12 ต่อ 1) ที่อุณหภูมิ 170°ซ เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับการแช่ในกรดซัลฟิวริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 120°ซ เป็นเวลา 60 นาที เมื่อนำเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 48 ชม. พบว่าเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำให้ผลได้เป็นร้อยละของน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุด คือ 34.9%

ดังนั้นแล้วจะเห็นได้ว่า ในการปรับสภาพทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่านั้น การใช้กระบวนการปรับสภาพแบบผสม คือใช้การปรับสภาพทั้งทางกายภาพ สารเคมี และความร้อนเข้าด้วยกัน จะทำให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด

2.8 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

ภายหลังจากการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการที่เหมาะสม ที่จะทำให้โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเสียสภาพหรือถูกกำจัดออกไป เซลลูโลสจะกลายเป็นวัตถุตั้งต้นที่สำคัญเพื่อย่อยสลายพอลิเมอร์ของเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลที่สามารถหมักเป็นเอทานอลได้ (fermentable sugar)

การย่อยสลายเซลลูโลสนั้น เติมที่จะใช้สารละลายกรด เช่น กรดซัลฟิวริก หรือ กรดไฮโดรคลอริกเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสในภาวะที่อุณหภูมิสูง แต่มีข้อเสียคือให้ปริมาณกลูโคสต่ำ เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการและมีค่าใช้จ่ายมาก ต่อมาจึงมีการพัฒนากระบวนการโดยนำเอนไซม์มาช่วยย่อยสลายเซลลูโลสแทนกรด ซึ่งมีข้อดีกว่าคือ ไม่จำเป็นต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 - 50°C ในระดับ pH 4 - 6 ทำให้ใช้พลังงานน้อยกว่าและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Neves และคณะ, 2007) อีกทั้งคุณสมบัติของเอนไซม์คือมีความจำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้น จึงได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นน้ำตาลกลูโคสมากกว่าการย่อยสลายโดยใช้กรด

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนที่นำมาช่วยย่อยเซลลูโลส สามารถผลิตได้ทั้งจากเชื้อราและแบคทีเรีย แต่เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อรานั้นเป็นเอนไซม์ที่ซับซ้อนมาจากนอกเซลล์และมีปริมาณมาก ดังนั้นงานวิจัยเกี่ยวกับการค้าจึงมุ่งเน้นไปที่การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราเป็นสำคัญ โดยเอนไซม์นี้ประกอบด้วยกลุ่มหลักที่สำคัญสามกลุ่ม ได้แก่

- (1) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสที่มีโครงสร้างความเป็นผลึกต่ำ โดยจะตัดพันธะเบต้า - (1,4) - ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม ทำให้สายโซ่ของเซลลูโลสสั้นลงอย่างต่อเนื่อง ทว่าเอนไซม์นี้จะไม่ย่อยเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเซลลูโลสที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสสองหน่วย
- (2) เอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในลักษณะโครงสร้างผลึก
- (3) เบต้า - กลูโคซิเดส (beta - glucosidase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสเป็นน้ำตาลกลูโคส

2.9 กากน้ำตาล

กากน้ำตาลจัดเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทหนึ่ง ลักษณะเป็นของเหลวเหนียวสีน้ำตาลเข้ม ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและกรรมวิธีในการตกตะกอนน้ำตาล แต่โดยทั่วไปแล้วจะมีองค์ประกอบหลักคือน้ำตาลซูโครส ตามด้วยน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น น้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส (fructose) เป็นต้น (รูปที่ 2.9.1) (Paturau, 1989) ดังนั้นแล้วกากน้ำตาลจึงสามารถใช้เป็นแหล่งน้ำตาลเพื่อหมักเอทานอลได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น

งานวิจัยของ Periyasamy และคณะ (2009) ที่ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทดลองหมักกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 50, 100, 200, 300 และ 400 กรัม/ลิตร พบว่าการหมักกากน้ำตาลเข้มข้น 300 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 35°C ที่ pH 4 ให้ปริมาณผลได้เป็นร้อยละของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 53% ที่ 72 ชม.

Elena และคณะ (2009) หมักกากน้ำตาลเป็นเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้าต่างๆที่ใช้สำหรับผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และขนมปัง โดยผลการทดลองพบว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เข้มข้นสูง (strong alcoholic drinks production) สามารถหมักกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 200 กรัม/ลิตร เป็นเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 2.33 กรัม/ลิตร ที่ 36 ชม.

% Molasses		
Usual range	Indicative average	Components
17-25	20	Water
30-40	35	Sucrose
4-9	7	Glucose
5-12	9	Fructose
1-5	3	Other reducing substances
2-5	4	Other carbohydrates
7-15	12	Ash
2-6	4.5	Nitrogenous compounds
2-8	5	Non-nitrogenous acids
0.1-1	0.4	Wax, sterols and phospholipids

รูปที่ 2.9.1: แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล

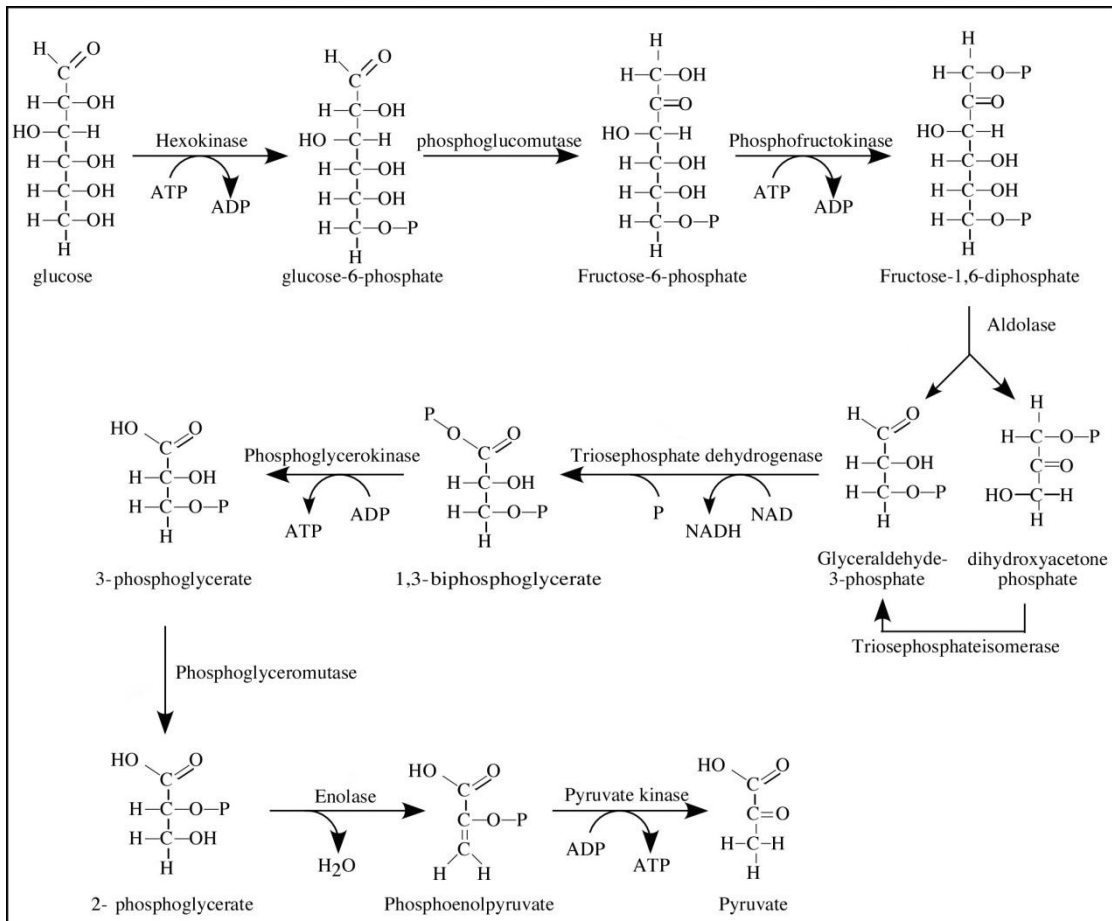
(ที่มา : Paturau, 1989)

2.10 การหมักเอทานอล

เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาทางเคมี การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการชีวภาพมีข้อดีกว่าในเรื่องของค่าใช้จ่ายและการใช้วัตถุดิบจากทรัพยากรหมุนเวียน ซึ่งเอทานอลได้จากกระบวนการหมักนั้น เกิดจากการหมักน้ำตาลที่ได้เข้าสู่วิถีทางเกี่ยวกับเมตาบอลิซึม (metabolic pathways) โดยจุลินทรีย์จำพวกยีสต์

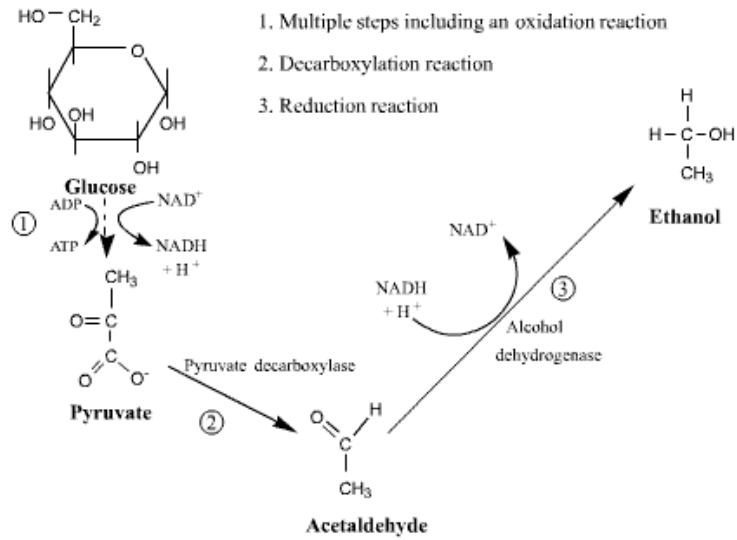
วิถีทางเมตาบอลิซึมสำหรับการหมักเอทานอลนั้น (alcoholic fermentation pathways) เกิดขึ้นโดยใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นในภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) เริ่มจากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล ผ่านเข้ากระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ไพรูเวท (pyruvate) ATP และ NADH อย่างละ 2 โมเลกุล (ดังรูปที่ 2.10.1) จากนั้นไพรูเวทจะถูกทำปฏิกิริยากับเอนไซม์

ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) ได้เป็น แอซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) จากนั้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอล (ดังรูปที่ 2.10.2)



รูปที่ 2.10.1: แผนภาพแสดงกระบวนการไกลโคไลซิส

(ที่มา : <https://biocuriousone.wordpress.com/> : ออนไลน์)



รูปที่ 2.10.2: แผนภาพแสดงปฏิกิริยาเปลี่ยนไพรูเวทเป็นเอทานอล

(ที่มา : <http://www.vet.ed.ac.uk/clive/ca/RUMENCAL/Frames/frmFerm.html> : ออนไลน์)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าจาก บริษัทไทยทาโลว์ แอนด์ ออยล์ จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี ค่าความชื้นเท่ากับ 7.7% ((w/w) น้ำหนักแห้ง) โดยนำ ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าไปบดเพื่อลดขนาดด้วยเครื่องบดแบบค้อนเหวี่ยง รongรับด้วยตะแกรงคัดแยก ขนาดและเก็บเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าความยาว 0.25 - 2 มม., 2 - 10 มม. และ 10 ซม. ตามลำดับ จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างเส้นใยในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

3.2 กากน้ำตาล

กากน้ำตาลได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท น้ำตาลครบุรี จำกัด (มหาชน) จังหวัด นครราชสีมา โดยเก็บในแกลลอนพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope : รุ่น CH30 บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : รุ่น JSM - 5410LV บริษัท JEOL ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate stirrer : รุ่น 502P-2 บริษัท PMC Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical Balance : รุ่น PG6002-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance : รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge : รุ่น Allegra™ 25R และ รุ่น Avanti™ J-30I บริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ (Eppendorf Centrifuge : รุ่น MIKRO 200R บริษัท Hettich ประเทศเยอรมนี)

เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer : รุ่น G560 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ (high pressure reactor : รุ่น 4523 บริษัท Parr Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เครื่องวัดค่า pH (pH meter : รุ่น S20 SevenEasy™ บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer : รุ่น Genesys™ 10S-Uv-VIS บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบหลายพารามิเตอร์ (Biochemistry Analyzer รุ่น 7100 บริษัท YSI ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ตู้ป่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker : รุ่น Innova™ 4330 บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven : บริษัท Contherm Scientific ประเทศนิวซีแลนด์)

ตู้อบความร้อนแบบสุญญากาศ (Vacuum oven : รุ่น INE 500 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี)

ไมโครปิเปตต์ (Micropipette : ขนาด 5 มล. บริษัท Mettler Toledo และขนาด 1 มล. บริษัท Gilson ประเทศสหรัฐอเมริกา)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave : รุ่น ES-215 และ รุ่น SS-325 บริษัท TOMY Digital Biology ประเทศญี่ปุ่น)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath : รุ่น SS40-D บริษัท Grant Instrument ประเทศอังกฤษ)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath shaker : รุ่น Gyromax™ 939XL บริษัท Amerex Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

กลูโคส (Glucose ($C_6H_{12}O_6$) : บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid (H_2SO_4) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid : บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper (II) sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate (Na_2SO_4) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide (NaOH) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต (di-Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ไดโซเดียมไฮโดรเจนอาร์เซเนต (di-Sodium hydrogen arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) : บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

ไตรโซเดียมซิเตรต (Tri-sodium citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เพปโตน (Polypeptone : บริษัท Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา)

โพแทสเซียมโซเดียมทาเทต [(Potassium sodium tartate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ฟีนอล (Phenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

วุ้นผง (Agar : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract : บริษัท Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เอทานอล (Ethanol : บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดตเตตระไฮเดรต (Ammonium heptamolybdate tetrahydrate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) : บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.5 จุลินทรีย์

Kluyveromyces marxianus สายพันธุ์ G2-16-1 แยกจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีลักษณะเด่นคือเป็นยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง (40°C) และสามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเพื่อย่อยเซลโลไบโอสเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ (Krisomdee, 2011)

3.6 เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

เอนไซม์เซลลูเลส (AccelleraseTM 1500 บริษัท Genecor) ประกอบด้วย

ค่า activity ของเอนโดกลูคาเนส	2,200-2,800 CMCs ยูนิต์ต่อกรัม
ค่า activity ของเบต้า – กลูโคซิเดส	525-775 PNG ยูนิต์ต่อกรัม

3.7 การศึกษาลักษณะสมบัติของทะเลาะปาล์มน้ำมันปลา

ตรวจสอบโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเส้นใยทะเลาะปาล์มน้ำมันปลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เปรียบเทียบลักษณะเส้นใยทะเลาะปาล์มน้ำมันปลาก่อนและหลังการปรับสภาพ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า ได้แก่ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน โดยกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตามมาตรฐานของ The Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI)

3.8 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

แช่เส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 16 ชม. (10% น้ำหนัก/ปริมาตร) กรองแยกเส้นใยไปปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 200°C เวลา 2 นาที โดยใช้ปริมาณเส้นใย (substrate loading) เท่ากับ 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ล้างเส้นใยที่ปรับสภาพแล้วจนมีค่า pH เป็นกลาง ย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว (10% น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณ 298 CMCs ยูนิต/กรัมเส้นใย ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต pH 6.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 6 ชม. ที่อุณหภูมิ 50°C จากนั้นปั่นเหวี่ยงนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การหาภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ ศึกษาโดยแปรผันตัวแปรต่างๆ ได้แก่ ความยาวของเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า (0.25 - 2 มม., 2 - 10 มม. และ 1 ซม.) ปริมาณเส้นใย (2, 3 และ 4% (น้ำหนัก/ปริมาตร) น้ำหนักแห้ง) ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แช่ทะลาย (0.5 - 2 โมลาร์) อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพ (160, 200 และ 240°C) และระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ (2, 5 และ 10 นาที) เลือกใช้ค่าปัจจัยซึ่งทำให้ได้เส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสให้น้ำตาลสูงสุด

3.9 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

แปรผันปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสและค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต เลือกใช้ภาวะซึ่งผลการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด

3.10 การหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

3.10.1 การหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยา (Separate Hydrolysis and Fermentation)

แขวนลอยเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 4.5 ปริมาตร 50 มล. (10% (น้ำหนัก/

ปริมาตร) น้ำหนักแห้ง) ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 6 ชม. หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใส เติมสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพปโตนปริมาณ 0.9% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำมาเติมกล้าเชื้อ *K. marxianus* G2-16-1 ปริมาณ 10^8 เซลล์/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 72 ชม. ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

3.10.2 การหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกริยา (Simultaneous Saccharification and Fermentation)

แขวนลอยเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ในสารละลาย บัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 5.0 ปริมาตร 50 มล. (10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) น้ำหนักแห้ง) เติมสารอาหารเสริม ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพปโตนปริมาณ 0.9% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 3 นาที เติมกล้าเชื้อ *K. marxianus* G2-16-1 (10^8 เซลล์/มล.) พร้อมกับ เอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 72 ชม. จากนั้นเก็บ ส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

3.11 การหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกันกับกากน้ำตาล

ผสมกากน้ำตาลให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใย ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า เพื่อเจือจางกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) เท่ากับ 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นเติมสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพปโตน ปริมาณ 0.9% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 0.6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปรับ pH เท่ากับ 5.0 นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อ *K. marxianus* G2-16-1 (10^8 เซลล์/มล.) บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 96 ชม. ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใสมาวิเคราะห์ ปริมาณเอทานอล

ทำการหมักเอทานอลโดยวิธีการเดียวกันกับข้างต้นแต่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อย เส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า ซึ่งไม่ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเส้นใยออก และเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้

ใช้กากน้ำตาลเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 5.0 (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) หมักเอทานอลที่ภาวะเดียวกัน เป็นการ ทดลองชุดควบคุม (control)

3.12 วิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas chromatography : รุ่น 7AG บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น) ใช้คอลัมน์ PQ ที่อุณหภูมิ 170°ซ และอุณหภูมิของตัววัดสัญญาณแบบ FID (Flame Ionization Detector) เท่ากับ 220°ซ โดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่อัตราการไหล 50 มล./นาที

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยเครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบหลายพารามิเตอร์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi - Nelson (Somogyi, 1952)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟินอล – ซัลฟิวริก (Dubois, 1956)

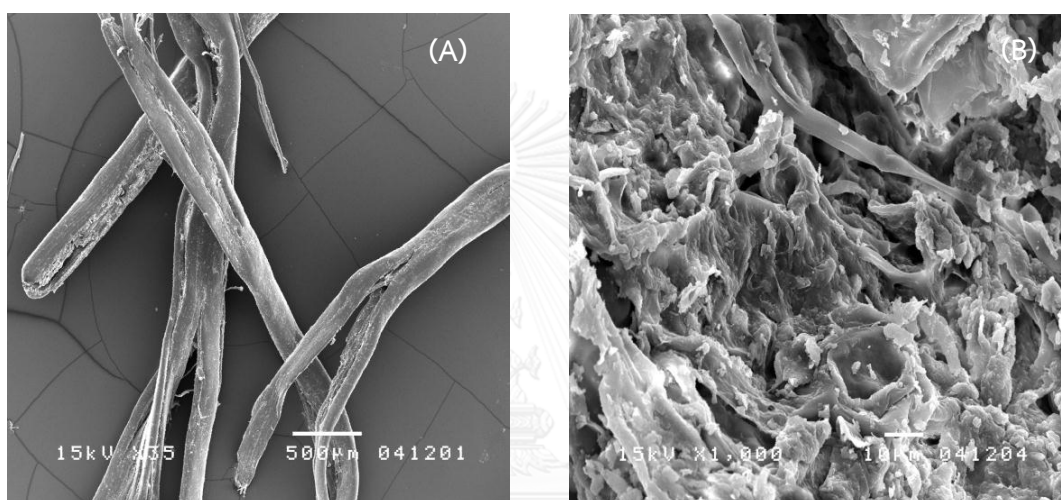


บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล้า

ผลการตรวจสอบลักษณะของเส้นใยทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าพื้นผิวภายนอกของเส้นใยมีลักษณะเรียบ พื้นผิวภายในมีลักษณะหยาบและขรุขระ (รูปที่ 4.1.1)



รูปที่ 4.1.1: ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด, (A) พื้นผิวภายนอก (35X), (B) พื้นผิวภายใน (1,000X)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล้า พบว่าในโครงสร้างประกอบด้วย แอลฟา-เซลลูโลส ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid-insoluble lignin) และเฮมิเซลลูโลส (16.8% (w/w)) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1.1)

ตารางที่ 4.1.1: องค์ประกอบทางเคมีของทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล้า

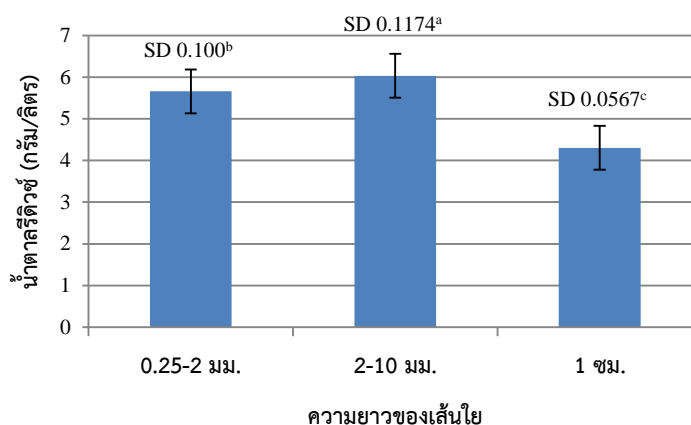
องค์ประกอบ	(% น้ำหนัก/น้ำหนัก)
แอลฟา-เซลลูโลส	47.9
ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด	18.3
เฮมิเซลลูโลส	16.8

จากองค์ประกอบของทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่า พบว่ามีแอลฟา-เซลลูโลสซึ่งเป็นเซลลูโลสที่มีความเป็นผลึกสูง ไม่ละลายในน้ำและในสารละลายต่างแก่ มีลักษณะที่ไม่ละลายในกรดมากกว่าเฮมิเซลลูโลสซึ่งละลายได้ดีในกรด ดังนั้นจึงเลือกปรับสภาพเส้นใยทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่าด้วยการใช้ต่างโดยแช่เส้นใยในสารละลายต่างเพื่อสกัดแยกกลีซินบางส่วนออกไป ซึ่งสารละลายต่างยังทำให้โครงสร้างผลึกของแอลฟา-เซลลูโลสบวมพองขึ้น เป็นลักษณะที่เอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำงานย่อยได้ดี (Kumar และคณะ, 2009) จากนั้นจึงปรับสภาพโดยวิธีการระเปิดด้วยไอน้ำในขั้นตอนถัดไป

4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเส้นใยทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่าโดยใช้ต่างร่วมกับวิธีการระเปิดด้วยไอน้ำ

4.2.1 ขนาดเส้นใยทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่าที่เหมาะสม

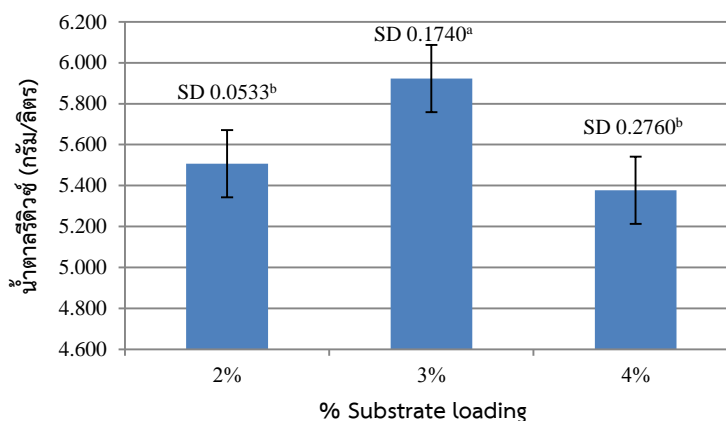
แช่เส้นใยทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่าที่ขนาดความยาวต่างๆ ได้แก่ 0.25 - 2 มม., 2 - 10 มม. และ 1 ซม. (10% น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 16 ชม. กรองแยกเก็บเส้นใยด้วยตะแกรงสแตนเลสแล้วนำไปปรับสภาพโดยวิธีการระเปิดด้วยไอน้ำ โดยใช้ปริมาณเส้นใยในถังปฏิกรณ์เท่ากับ 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 200°ซ เป็นเวลา 2 นาที ล้างเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วจนมีค่า pH เป็นกลางและย่อยเส้นใยในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต pH 6.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (10% น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (298 CMCs ยูนิต/กรัมเส้นใย) ที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 6 ชม. จากนั้นปั่นเหวี่ยงและวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใส พบว่าเส้นใยทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่าขนาด 2 - 10 มม. ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด (6.031 กรัม/ลิตร) ดังแสดงในรูปที่ 4.2.1.1 ทั้งนี้ อาจเนื่องจากเส้นใยขนาดสั้นกว่า 2 มม. เกิดการสูญเสียในระหว่างการกรองเก็บและการล้างเส้นใย หลังจากปรับสภาพ ในขณะที่เส้นใยที่มีความยาวตั้งแต่ 10 มม. เป็นต้นไป พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเส้นใยกับเอนไซม์เซลลูเลสจะลดลง ประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จึงลดลง การทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เส้นใยทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่าขนาด 2 - 10 มม.



รูปที่ 4.2.1.1: ผลของความยาวเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.2.2 ปริมาณของเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่เหมาะสม (substrate loading)

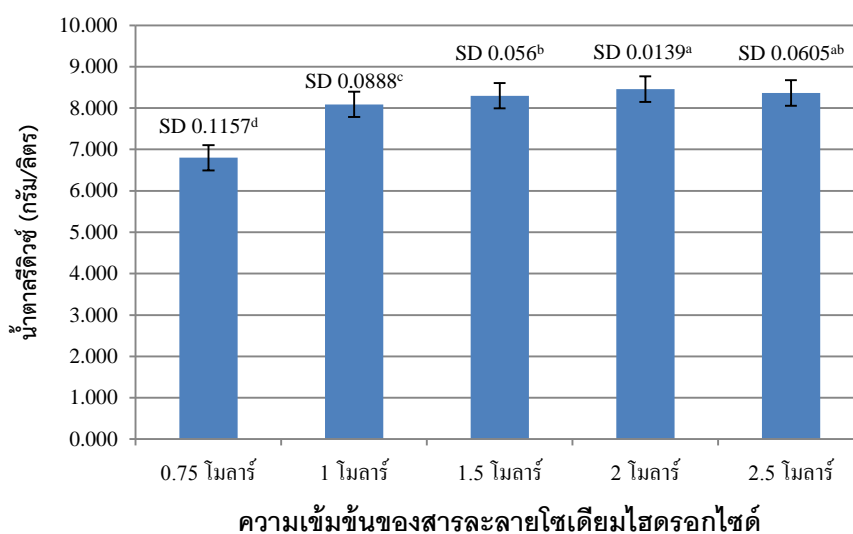
ทำการปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่า ตามวิธีข้อ 4.2.1 แต่แปรผันปริมาณเส้นใยฯในถังปฏิกรณ์ของเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ เป็น 2%, 3% และ 4% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผลการทดลองพบว่าการใช้ปริมาณเส้นใย 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด (รูปที่ 4.2.2.1) อาจเนื่องจากปริมาณเส้นใยฯที่มากเกินไปนั้น เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับลิกนินซึ่งได้ถูกทำให้แตกหักออกแล้วโดยการระเบิดด้วยไอน้ำสามารถเกาะติดกลับคืนมากขึ้น (reabsorb) นอกจากนี้ปริมาณเส้นใยฯที่มากเกินไปยังมีผลทำให้การถ่ายเทความร้อน (heat transfer) ลดลง ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของการระเบิดด้วยไอน้ำลดลงด้วย



รูปที่ 4.2.2.1: ผลของปริมาณเส้นใยฯในถังปฏิกรณ์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.2.3 ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม

ทำการปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปลา่ตามวิธีข้อ 4.2.2 กล่าวคือใช้เส้นใยขนาด 2 – 10 มม. ปริมาณ 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่แปรผันความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แช่เส้นใยก่อนการระเบิดด้วยไอน้ำเป็น 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 และ 2.5 โมลาร์ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 8.458 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.2.3.1) Choi และคณะ (2013) รายงานว่าปริมาณลิกนินของเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปลา่ที่แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าถูกกำจัดออกไปมากกว่าเส้นใยที่แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นต่ำกว่า ดังนั้นเส้นใยที่ผ่านการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าจึงสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้มากกว่าด้วย

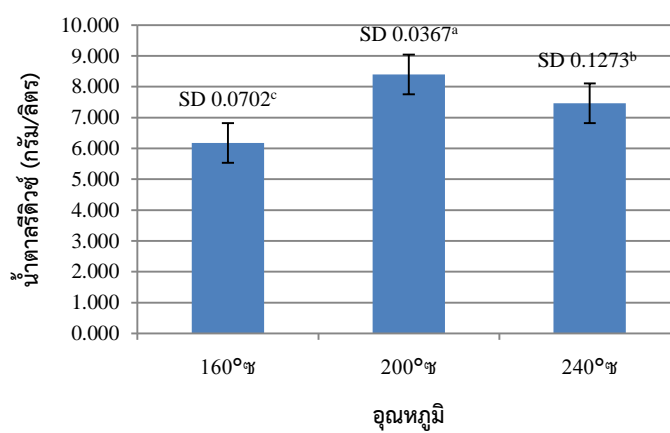


รูปที่ 4.2.3.1: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอนการแช่เส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปลา่ก่อนการปรับสภาพต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

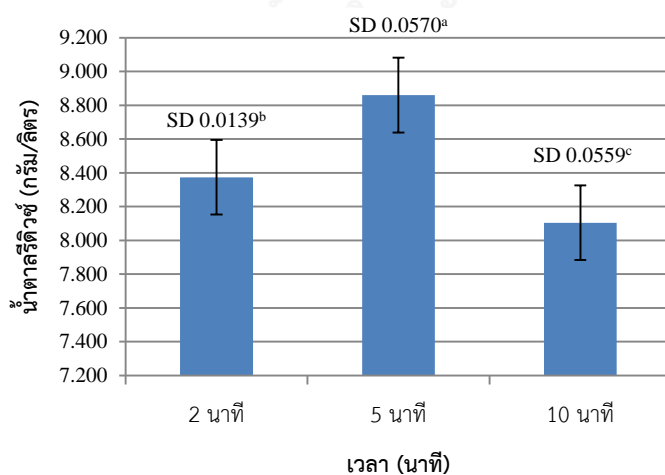
4.2.4 อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการระเบิดด้วยไอน้ำ

ปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปลา่โดยแช่เส้นใยขนาด 2 – 10 มม. ปริมาณ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 ชม. จากนั้นนำไปปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำโดยใช้ปริมาณเส้นใย 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่

แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำเป็น 160, 200 และ 240°ซ เป็นเวลา 2 นาที พบว่าเส้นใยฯซึ่งผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 200°ซ เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 8.398 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.2.4.1) แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการปรับสภาพโดยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเป็น 5 และ 10 นาที พบว่าเส้นใยฯที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 200°ซ นาน 5 นาที เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จะได้ปริมาณรีดิวซ์สูงที่สุด 8.86 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.2.4.2)



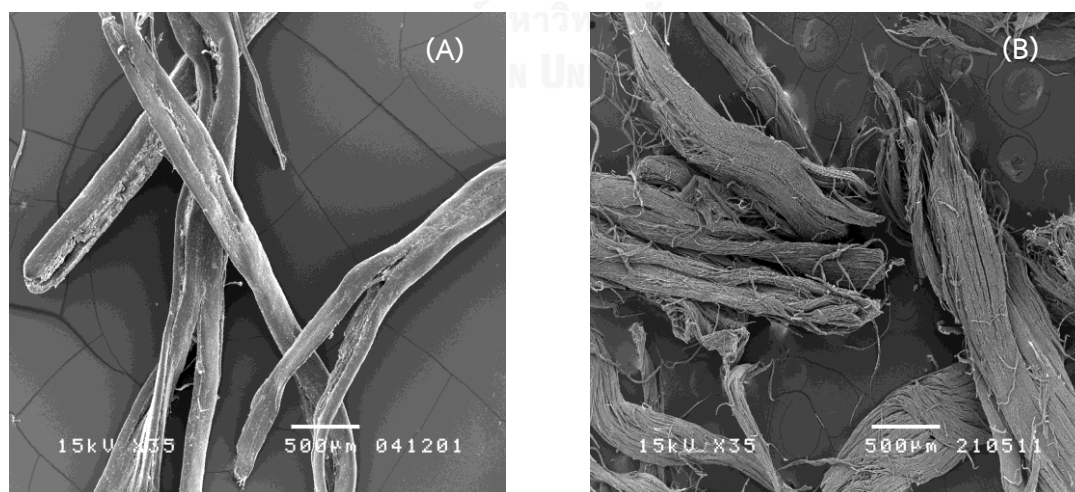
รูปที่ 4.2.4.1: ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



รูปที่ 4.2.4.2: ผลของเวลาในการระเบิดด้วยไอน้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.3 ลักษณะเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าหลังการปรับสภาพด้วยต่างร่วมกับวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

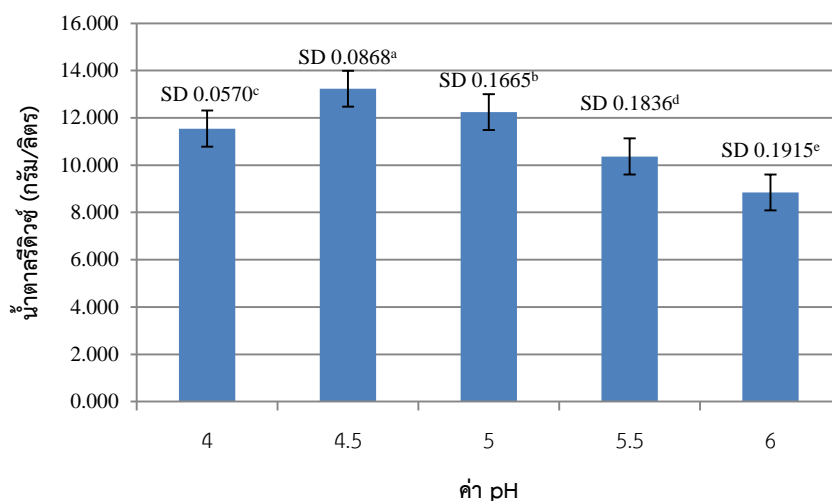
จากผลการทดลองข้างต้น ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าคือ แช่เส้นใยขนาด 2 – 10 มม. (ปริมาณ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 16 ชม. และนำเส้นใยมาปรับสภาพต่อด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ ใช้ปริมาณเส้นใย 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 200°ซ เป็นเวลา 5 นาที เส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพที่ภาวะที่เหมาะสมนี้ เมื่อนำมาล้างจนเป็นกลางแล้วย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ปริมาณ 298 CMCs ยูนิท/กรัมเส้นใย) ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต pH 6.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชม. จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 8.86 กรัม/ลิตร เมื่อนำเส้นใยก่อนและหลังการปรับสภาพที่ภาวะที่เหมาะสมที่สุดมาตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยหลังการปรับสภาพสอดคล้องกับรายงานของ Shamsudin และคณะ (2012) ซึ่งทำการปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าด้วยไอน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 140°ซ ภายใต้ความดัน 0.28 MPa เป็นเวลา 15 – 60 นาที พบว่าเส้นใยก่อนการปรับสภาพมีลักษณะผิวเรียบหนา เป็นชั้นที่เกิดจากลิกนินและซีลิ่งซึ่งทำหน้าที่ปกป้องผิวของพืชจากจุลินทรีย์ภายนอก และทำหน้าที่ป้องกันการสูญเสียน้ำจากภายใน ทั้งยังพบผลึกซิลิกาที่บริเวณผิวของเส้นใย ส่วนเส้นใยหลังการปรับสภาพ ผิวของเส้นใยมีรูพรุนจำนวนมาก ซึ่งเกิดจากการหลุดออกของผลึกซิลิกา เส้นใยมีลักษณะของการถูกทำลายด้วยความร้อนแล้วความดัน เป็นผลให้พื้นที่ผิวของเส้นใยเพิ่มมากขึ้น เอนไซม์เซลลูเลสจึงสามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสได้มากขึ้น



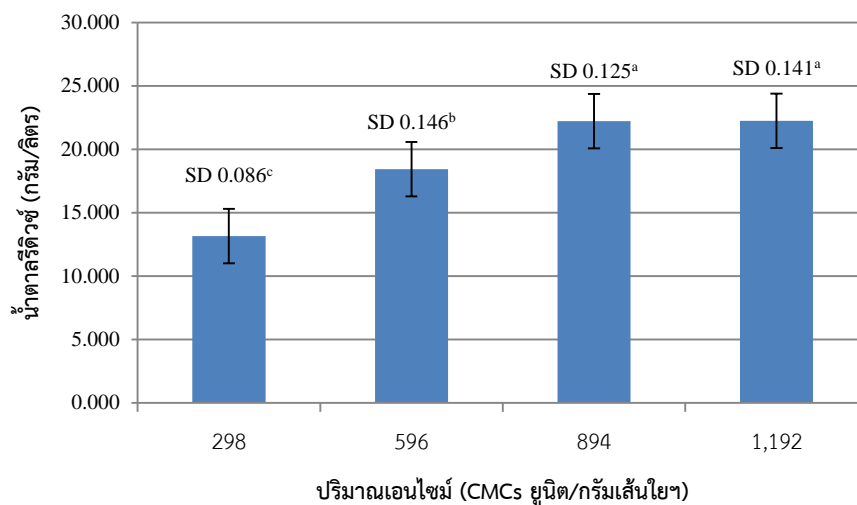
รูปที่ 4.3.1: ลักษณะของเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 35 เท่า (A) ก่อนการปรับสภาพ (B) หลังการปรับสภาพ

4.4 ภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันปลาที่ผ่านการปรับสภาพ

ผลการแปรผันค่า pH ที่ใช้ในการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันปลาที่ผ่านการปรับสภาพที่ภาวะเหมาะสมแล้ว ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซिटเรตเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 6 ชม. ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 298 CMCs ยูนิต/กรัมเส้นใยฯ พบว่าการย่อยเส้นใยฯ ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด (13.229 กรัม/ลิตร) (รูปที่ 4.4.1) และเมื่อย่อยเส้นใยฯที่ pH 4.5 ตามวิธีเดิมแต่แปรผันปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ พบว่าปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมคือ 894 CMCs ยูนิต/กรัมเส้นใยฯ หรือเท่ากับ 232.35 PNG ยูนิต/กรัมเส้นใยฯ โดยจะให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 22.213 กรัม/ลิตร (0.22 กรัมต่อกรัมเส้นใย) (รูปที่ 4.4.2) และเมื่อนำสารละลายน้ำตาลนี้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบหลายพารามิเตอร์ พบว่าเป็นน้ำตาลกลูโคส 15.31 กรัม/ลิตร (0.15 กรัมต่อกรัมเส้นใยฯ)



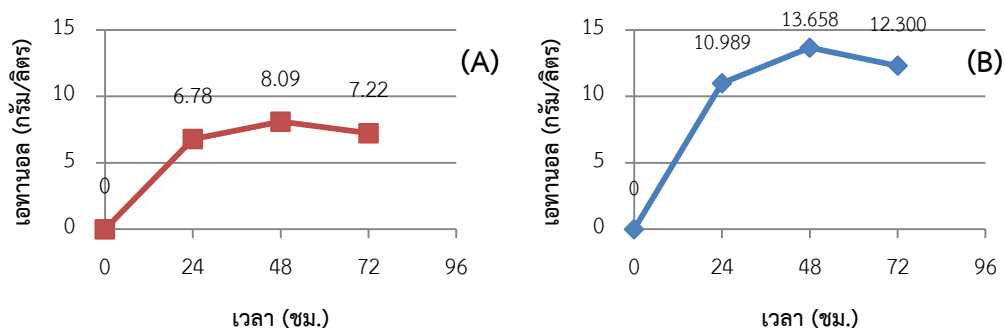
รูปที่ 4.4.1: ผลของ pH ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันปลาที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



รูปที่ 4.4.2: ผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ได้จากการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.5 ผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่า

ผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าโดยกระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยาโดยย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพที่ภาวะที่เหมาะสมแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 894 CMCs ยูนิต/กรัมเส้นใย ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 6 ชม. เติมน้ำสารสกัดจากยีสต์และเพปโตนลงในสารละลายน้ำตาลที่ได้ จากนั้นหมักเป็นเอทานอลโดย *K. marxianus* G2-16-1 ปริมาณ 10⁸ เซลล์/มล. ที่ 40°C พบว่าได้เอทานอลสูงสุด 8.09 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับ 0.08 กรัมเอทานอล/กรัมเส้นใยที่ 48 ชม. (0.168 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง) และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยด้วยกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยาโดยแขวนลอยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต pH 5.0 ที่เติมน้ำสารสกัดจากยีสต์และเพปโตน จากนั้นหมักเป็นเอทานอลโดยการเติมเอนไซม์เซลลูเลส (894 CMCs ยูนิต/กรัมเส้นใย หรือเท่ากับ 232.35 PNG ยูนิต/กรัมเส้นใย) พร้อมกับ *K. marxianus* G2-16-1 (10⁸ เซลล์/มล.) หมักที่อุณหภูมิ 40°C พบว่าได้เอทานอลสูงสุด 13.658 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับ 0.136 กรัมเอทานอล/กรัมเส้นใยที่ 48 ชม. (0.284 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง) (รูปที่ 4.5.1)



รูปที่ 4.5.1: ผลการหมักเอทานอลจากเส้นใยทะเลลายปาล์มเปล่าโดย

(A) กระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยา (B) กระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยา

ผลการหมักเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าข้างต้นนั้นปริมาณเอทานอลค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับตัวอย่างวัสดุลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 4.5.1) ทั้งนี้เนื่องจากได้น้ำตาลกลูโคสจากการย่อยเส้นใยสูงสุดเพียง 0.15 กรัมต่อกรัมเส้นใยฯ เป็นปริมาณที่อยู่ในระดับต่ำสำหรับงานอุตสาหกรรม ซึ่งถือว่าไม่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยฯเป็นส่วนเสริมของการหมักกากน้ำตาลเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับเส้นใยฯ

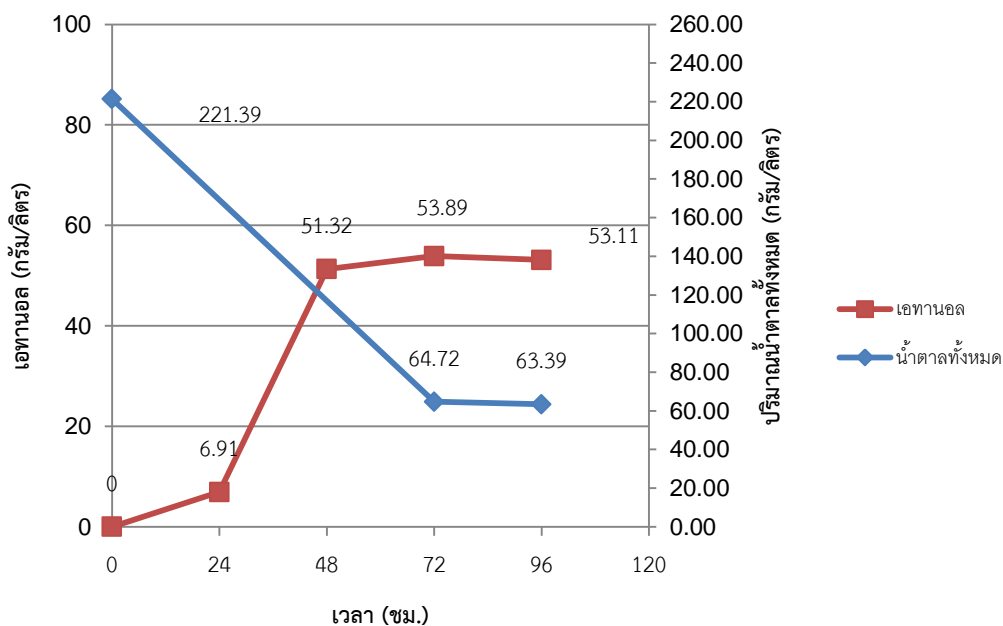
ตารางที่ 4.5.1: ตัวอย่างเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วกับวัสดุลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นๆ

วัตถุดิบ	วิธีการปรับสภาพ	ผลผลิตเอทานอลสูงสุด
ทะเลสาบปาล์มน้ำมันเปล่า	แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ก่อนระเบิดด้วยไอน้ำที่ 200°ซ เวลา 5 นาที	0.136 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
ดอกไม้สายพันธุ์ <i>Cistus ladaniferus</i> (Ferro และคณะ, 2015)	ระเบิดด้วยไอน้ำที่ 235°ซ เวลา 1 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% เวลา 15 นาที	0.221 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
ไม้ซีดาร์ (Asada และคณะ, 2015)	ระเบิดด้วยไอน้ำที่ 258°ซ เวลา 5 นาที	0.155 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
อาร์ติโชค (artichokes) (Fernades คณะ, 2015)	ระเบิดด้วยไอน้ำที่ 235°ซ เวลา 1 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% เวลา 15 นาที	0.266 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
ก้านผักกาดก้านขาว (rapeseed straw) (Lopez คณะ, 2015)	ระเบิดด้วยไอน้ำที่ 215°ซ เวลา 7.5 นาที	0.124 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
กิ่งของต้นองุ่น (Buratti และคณะ, 2014)	ระเบิดด้วยไอน้ำที่ 210°ซ เวลา 10 นาที	0.089 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
กากถั่วเหลือง (Asada และคณะ, 2010)	ระเบิดด้วยไอน้ำที่ 181°ซ เวลา 5 นาที	0.052 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
หญ้าทะเล (eel grass) (Viola และคณะ, 2008)	ระเบิดด้วยไอน้ำที่ 180°ซ เวลา 5 นาที	0.243 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
กิ่งของต้นมะกอก (Cara และคณะ, 2008)	ระเบิดด้วยไอน้ำที่ 230°ซ เวลา 5 นาที	0.072 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
ฟางข้าวสาลี (Ballesteros และคณะ, 2006)	แช่ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.9% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ 45°ซ เป็นเวลา 18 ชม. ก่อนระเบิดด้วยไอน้ำที่ 180°ซ เวลา 10 นาที	0.12 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ
เส้นใยข้าวโพด (Bura และคณะ, 2002)	ระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์เข้มข้น 6% ที่ 190°ซ เป็นเวลา 5 นาที	0.49 กรัมเอทานอล/กรัมวัตถุดิบ

4.6 ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลร่วมกับสารละลายที่ได้จากการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์ม น้ำมันปลา

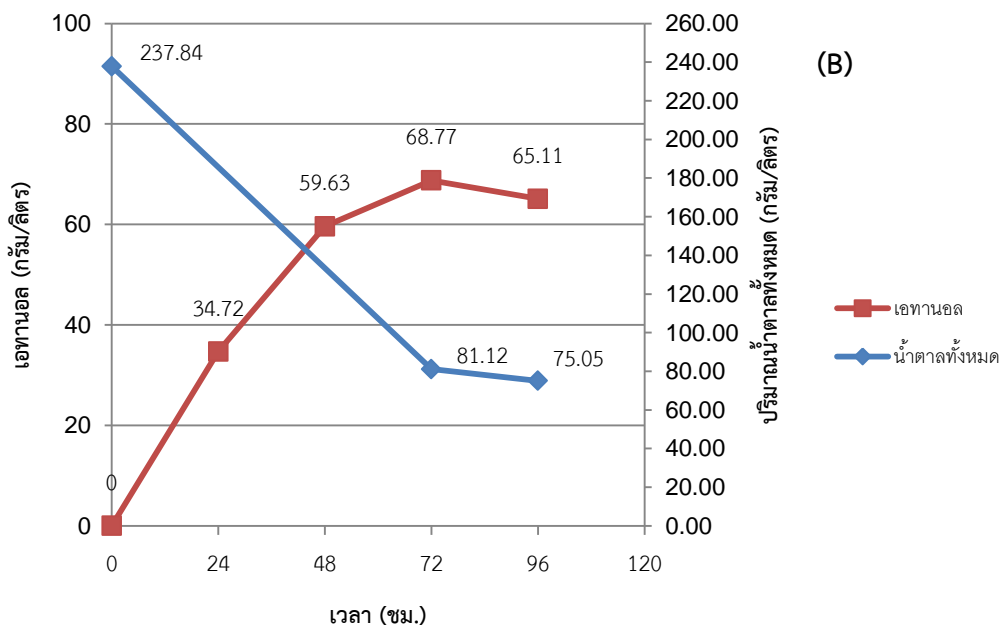
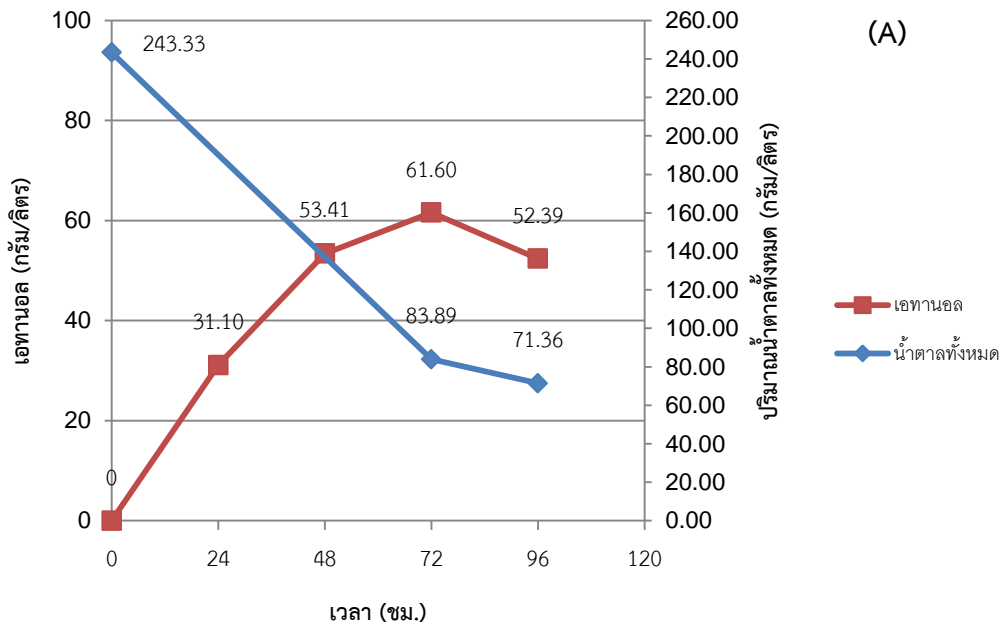
ย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันปลาที่ผ่านการปรับสภาพที่ภาวะเหมาะสมแล้ว (ผลจากข้อ 4.2) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ภาวะเหมาะสม (ผลจากข้อ 4.4) ปั่นเหวี่ยงแยกกากเส้นใยออกจากสารละลายน้ำตาล จากนั้นนำสารละลายน้ำตาลที่ได้มาผสมกับกากน้ำตาลเพื่อหมักเอทานอล โดยเติมกากน้ำตาล (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) ลงในสารละลายน้ำตาลที่ปั่นเหวี่ยงแยกกากเส้นใยออกแล้ว เติมแอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดจากยีสต์และเพปโตน ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.0 จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อ และหมักเป็นเอทานอลโดย *K. marxianus* G2-16-1 (10^8 เซลล์/มล.) ที่ 40°C เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้กับสารละลายน้ำตาลที่ไม่ได้ปั่นเหวี่ยงแยกกากเส้นใยออกไปซึ่งผสมกับกากน้ำตาล (กากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) และกากน้ำตาลที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 5.0 (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) ซึ่งเติมแอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดจากยีสต์และเพปโตนในปริมาณเดียวกัน

ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต พบว่าได้เอทานอลสูงสุด 53.89 กรัม/ลิตร ที่ 72 ชม. (0.784 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง) (รูปที่ 4.6.1) แต่ในการทดลองที่ใช้กากน้ำตาลผสมสารละลายน้ำตาลที่ปั่นเหวี่ยงแยกกากเส้นใยออกแล้ว พบว่าได้เอทานอลสูงสุด 61.60 กรัม/ลิตร ที่ 72 ชม. (0.855 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง) (รูปที่ 4.6.2A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยนั้นไม่มีสารที่มีผลการยับยั้งการผลิตเอทานอลปนเปื้อนอยู่ จึงสามารถใช้เป็นส่วนเสริมของการหมักกากน้ำตาลเพื่อเพิ่มปริมาณเอทานอลได้



รูปที่ 4.6.1: ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต

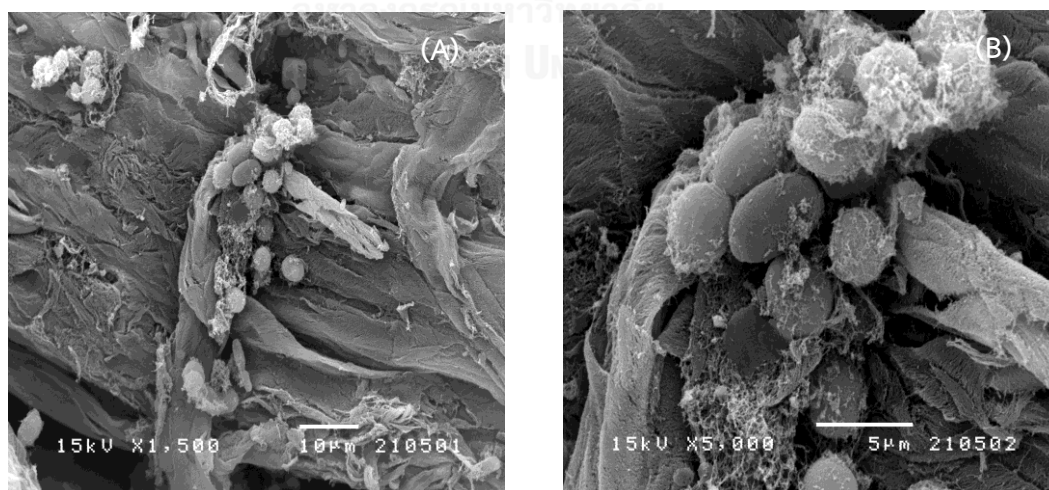
ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลซึ่งผสมในสารละลายน้ำตาลที่ยังคงมีกากเส้นใยแขวนลอยอยู่ ได้เอทานอลสูงสุด 68.77 กรัม/ลิตร ที่ 72 ชม. (0.955 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง) (รูปที่ 4.6.2B) หรือเท่ากับ 0.44 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาล ซึ่งมากกว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากกากน้ำตาลซึ่งผสมกับสารละลายน้ำตาลที่ปั่นเหวี่ยงแยกเส้นใยออกแล้ว 7.10 กรัม/ลิตร



รูปที่ 4.6.2: ผลการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยทะเลสาปาล์มน้ำมัน เปล่าร่วมกับกากน้ำตาลที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (A) สารละลายน้ำตาลที่แยกกากเส้นใยออกแล้ว (B) สารละลายน้ำตาลที่มีกากเส้นใยแขวนลอยอยู่

เมื่อนำกากเส้นใยฯที่แขวนลอยอยู่หลังกระบวนการหมักเอทานอลมาตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์ยีสต์เกาะติดอยู่กับพื้นผิวภายนอกและภายในโครงสร้างของเส้นใยฯ (รูปที่ 4.6.3) ซึ่งมีลักษณะที่ถูกทำลายจากการปรับสภาพด้วยต่างร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำและการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส กล่าวคือกากเส้นใยฯมีลักษณะขรุขระ มีโพรงกระจายอยู่ ลักษณะดังกล่าวนี้ช่วยปกป้องเซลล์ยีสต์จากภาวะเครียดซึ่งเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในขั้นตอนการหมักได้เป็นอย่างดี จึงน่าจะเป็นสาเหตุให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้น

Riansa-ngawong และคณะ (2012) รายงานว่าเส้นใยของทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่านั้นสามารถนำมาใช้เป็นตัวพุงตามธรรมชาติ (natural supporter) ในการตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับ (adsorption) สำหรับการหมักเอทานอลโดย *Candida shehatae* สายพันธุ์ TISTR5843 ได้ และมีรายงานการศึกษาจากพะวงศ์รัตน์ (2556) ที่ได้เปรียบเทียบผลของการตรึงเซลล์ยีสต์ 2 วิธี คือ วิธีการดูดซับโดยธรรมชาติโดยใช้ชานอ้อย และวิธีการห่อหุ้ม (entrapment) โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนต ผลการทดลองพบว่าการใช้เซลล์ตรึงรูปแบบดูดซับบนชานอ้อยให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด เนื่องจากกระบวนการตรึงเซลล์แบบดูดซับมีข้อดีคือเซลล์ยีสต์จะเกาะตัวที่พื้นผิวของตัวพุงอย่างอิสระและสัมผัสกับอาหารได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการห่อหุ้มเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์ยีสต์สัมผัสอาหารได้ไม่เต็มที่ ทั้งยังเกิดปัญหาในเรื่องการยับยั้งการเจริญเติบโตจากเอทานอลที่เซลล์ยีสต์ผลิตออกมาซึ่งสะสมอยู่ภายในแคลเซียมอัลจิเนต ดังนั้นเซลล์ตรึงรูปจากวัสดุทางธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและสมควรแก่การศึกษาต่อไป



รูปที่ 4.6.3: ลักษณะเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าหลังจากการหมักร่วมกันกับกากน้ำตาล

(A) กำลังขยาย 1,500 เท่า (B) กำลังขยาย 5,000 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า ทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้ แต่ด้วยโครงสร้างเส้นใยที่แข็งแรงซึ่งประกอบไปด้วยพอลิเมอร์ของลิกโนเซลลูโลส จึงจำเป็นต้องใช้วิธีการต่างๆในการปรับสภาพเพื่อเปิดโครงสร้างเส้นใยเสียก่อน ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการปรับสภาพทั้งทางกายภาพร่วมกับการปรับสภาพทางเคมี กล่าวคือ ลดขนาดเส้นใยเป็น 2 – 10 มม. แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ (ปริมาณ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) แล้วระเบิดด้วยไอน้ำโดยใช้ปริมาณเส้นใย 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 200°C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (894 CMCs ยูนิต/กรัมเส้นใย หรือเท่ากับ 232.35 PNG ยูนิต/กรัมเส้นใย) ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต pH 4.5 เป็นเวลา 6 ชม. จะได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 22.213 กรัม/ลิตร (0.22 กรัมต่อกรัมเส้นใย) หรือน้ำตาลกลูโคส 15.31 กรัม/ลิตร (0.15 กรัมต่อกรัมเส้นใย)

การนำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยมาผสมกับกากน้ำตาลเพื่อหมักเป็นเอทานอล ไม่ควรแยกกากเส้นใยออก ซึ่งจะได้เอทานอลสูงสุด 68.77 กรัม/ลิตร (0.44 กรัมเอทานอล/กรัม) ที่ 72 ชม. ผลการหมักเอทานอลและการตรวจสอบกากเส้นใยหลังการหมักเอทานอลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์ยีสต์ยึดเกาะและฝังตัวอยู่ตามผิวและภายในกากเส้นใย จึงเป็นไปได้ว่ากากเส้นใยสามารถทำหน้าที่เป็นตัวพุง (supporter) ซึ่งจะช่วยปกป้องเซลล์ยีสต์จากสภาวะเครียดต่างๆในระหว่างขั้นตอนการหมักเอทานอล

รายการอ้างอิง

- ธงชัย พรรณสวัสดิ์. (2550). น้ำมันแก๊สโซฮอล: บริษัท กราฟิคคัล จำกัด.
- รัชพล พะวงค์รัตน์. (2556). การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน. วารสารวิชาการ *Veridian E-Journal*, 6(2), 1025 – 1036.
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29, 675–685.
- Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N., Srinorakutara, T., Kitpreechavanich, V., & Tolieng, V. (2011). Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation. *Annals of Microbiology*, 61, 431-436.
- Ariffin, H., Hassan, M. A., Umikalsom, M. S., Abdullah, N., & Shirai, Y. (2008). Effect of physical, chemical and thermal pretreatments on the enzymatic hydrolysis of oil palm empty fruit bunch (OPEFB). *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 36(2), 259-268.
- Asada, C., Kondo, Y., Sasaki, C., & Nakamura, Y. (2010). Bioconversion of Soy Sauce Residue Treated with Steam Explosion into Ethanol by Meicelase and *Mucor indicus*. *Journal of Food Technology*, 8(4), 187-190.
- Asada, C., Sasaki, C., Takamatsu, T., & Nakamura, Y. (2015). Conversion of steam-exploded cedar into ethanol using simultaneous saccharification, fermentation and detoxification process. *Bioresource Technology*, 176, 203-209.
- Baharuddin, A. S., Sulaiman, A., Kim, D. H., Mokhtar, M. N., Hassan, M. A., Wakisaka, M., Nishida, H. (2013). Selective component degradation of oil palm empty fruit bunches (OPEFB) using high-pressure steam. *Biomass and Bioenergy*, 55, 268-275.
- Bahrin, E. K., Baharuddin, A. S., Ibrahim, M. F., & Razak, M. N. A. (2012). Physicochemical property changes and enzymatic hydrolysis enhancement of

- oil palm empty fruit bunches treated with superheated steam. *Bioresource*, 7(2), 1784-1801.
- Balat, M., Balat, H., & Oz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551–573.
- Ballesteros, I., Negro, M. J., Oliva, J. M., Cabanas, A., Manzanares, P., & Ballesteros, M. (2006). Ethanol production from steam explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 6, 496–508.
- Biocuriousone. (2014). <https://biocuriousone.wordpress.com/2014/03/16/glycolysis-part-1/>. Retrieved 10 June 2015
- Bura, R., Mansfield, S. D., Saddler, J. N., & Bothast, R. J. (2002). SO₂-Catalyzed Steam Explosion of Corn Fiber for Ethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98(100), 59-72.
- Buratti, C., Barbanera, M., & Lascaro, E. (2014). Ethanol Production from Vineyard Pruning Residues with Steam Explosion Pretreatment. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34(3), 802-809.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., & Castro, E. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87, 692–700.
- Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Paz, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13), 4754–4766.
- Choi, W., Park, J. Y., Lee, J. P., Oh, Y. K., Park, Y. C., Kim, J. S., . . . Lee, J. S. (2013). Optimization of NaOH-catalyzed steam pretreatment of empty fruit bunch. *Biotechnology for Biofuels*, 6(170), 1-8.
- Das, P., Ganesh, A., & Wangikar, P. (2004). Influence of pretreatment for deashing of sugarcane bagasse on pyrolysis products. *Biomass and Bioenergy*, 27(5), 445–457.
- Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., & Jones, K. M. (1986). *Data for Biochemical Research*. United States: Oxford University Press.
- Demirbas, A. (2005). Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, 27, 327-337.

- Duangwang, S., & Sangwichien, C. (2013). Optimizing Alkali Pretreatment of Oil Palm Empty Fruit Bunch for Ethanol Production by Application of Response Surface methodology. *Advanced Materials Research*, 622-623, 117-121.
- DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Elena, P., Gabriela, R., Camelia, B., & Traian, H. (2009). Bioethanol production from molasses by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Paper presented at the the International Symposium Euro - aliment 2009, Galati – ROMANIA.
- Fernandes, M. C., Ferro, M. D., Paulino, A. F. C., Mendes, J. A. S., Gravitis, J., Evtuguin, D. V., & Xavier, A. M. R. (2015). Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. *Bioresource Technology*, 186, 309-315.
- Ferro, M. D., Fernandes, M. C., Paulino, A. F. C., Prozil, S. O., Gravitis, J., Evtuguin, D. V., & Xavier, A. M. R. (2015). Bioethanol production from steam explosion pretreated and alkaliextracted *Cistus ladanifer* (rockrose). *Biochemical Engineering Journal*.
- Glazer, A. N., & Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology : Fundamentals of Applied Microbiology*. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<http://genomicscience.energy.gov/centers/glbrc.shtml>. Retrieved 1 June 2015
<http://www.vet.ed.ac.uk/clive/cal/RUMENCAL/Frames/frmFerm.html>. Retrieved 10 June 2015
- Hu, Z., & Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering*, 38(3), 369-378.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*.
- Law, K. N., Wan Daud, W. R., & Ghazali, A. (2007). Morphological and Chemical nature of fiber strands of oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). *Bioresources Technology*, 2(3), 351-362.

- Lee, J. W., Gwak, K. S., Park, J. Y., Park, M. J., Choi, D. H., Kwon, M., & Choi, I. G. (2007). Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *Journal of Microbiology*, *45*(6), 485–491.
- López-Linares, J. C., Ballesteros, I., Tourán, J., Cara, C., Castro, E., Ballesteros, M., & Romero, I. (2015). Optimization of uncatalyzed steam explosion pretreatment of rapeseed straw for biofuel production. *Bioresource Technology*, *190*, 97–105.
- Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., & Monot, F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Biotechnology*, *20*, 372–380.
- Martin-Amat, G., Mcmartin, K. E., Hayreh, S. S., Hayreh, M. S., & Tephly, T. R. (1978). Methanol Poisoning: Ocular Toxicity Produced by Formate. *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY*, *45*, 201–208.
- McMillan, J. D. (2009). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In M. E. Himmel, J. O. Baker & R. P. Overend (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production* (Vol. 566, pp. 292–324). Washington, DC: American Chemical Society.
- Millati, R., Wikandari, R., Trihandayani, E. T., Cahyanto, M. N., Taherzadeh, M. J., & Niklasson, C. (2011). Ethanol from Oil Palm Empty Fruit Bunch via Dilute-Acid Hydrolysis and Fermentation by *Mucor indicus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural Journal*, *6*(2), 54–59.
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, *40*, 3941–3994.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzappple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *96*, 673–686.
- Nelson, C. R., & Courter, M. L. (1954). Ethanol by hydration of ethylene. *Chemical engineering progress*, *50*, 526–532.
- Neves, M. A., Kimura, T., Shimizu, N., & Nakajima, M. (2007). State of the art and future trends of bioethanol production. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, *1*(1), 1–14.

- Paturau, J. M. (1989). *By-products of the cane sugar industry: An introduction to their industrial utilization*. Amsterdam: Elsevier.
- Periyasamy, S., Venkatachalam, S., Ramasamy, S., & Srinivasan, V. (2009). Production of Bio-ethanol from Sugar Molasses Using *Saccharomyces Cerevisiae*. *Modern Applied Science*, 3(8), 32-37.
- Pu, Y., Zhang, D., Singh, P. M., & Ragauskas, A.J. (2008). The new forestry biofuels sector. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2, 58–73.
- Ramos, L. P. (2003). The chemical involved in the steam treatment of lignocellulosic material. *Química Nova*, 26(6), 863-871.
- Rashid, S. S., Alam, M. Z., Karim, M. I. A., & Salleh, M. H. (2011). Development of pretreatment of empty fruit bunches for enhanced enzymatic saccharification. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(81), 18728-18738.
- Riansa-ngawong, W., Suwansaard, M., & Prasertsan, P. (2012). Application of palm pressed fiber as a carrier for ethanol production by *Candida shehatae* TISTR5843. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(6), 1-11.
- Sarkar, N., Kumar G.S., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes : An overview. *Renewable Energy*, 37 19-27.
- Shamsudin, S., UmiKalsom, M. S., Zainudin, H., Abd-Aziz, S., Kamal, S. M. M., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2012). Effect of steam pretreatment on oil palm empty fruit bunch for the production of sugars *Biomass and Bioenergy*, 36, 280-288.
- Simarani, K., Hassan, M. A., Abd-Aziz, S., Wakisaka, M., & Shirai, Y. (2009). Effect of oil palm mill sterilization process on the physicochemical characteristics and enzymatic hydrolysis of empty fruit bunch. *Asian Journal of Biotechnology*, 1(2), 57-66.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 19-23.
- Sudiyani, Y., Sembiring, K. C., Hendarsyah, H., & Alawiyah, S. (2010). Alkaline pretreatment and enzymatic saccharification of oil palm empty fruit bunch fiber for ethanol production. *Menara Perkebunan*, 78(2), 70-74.

- Suhaimi, M., & Ong, H. K. (2001). Composting empty fruit bunches of oil palm. *Extension Bulletin - Food & Fertilizer Technology Center*, 505, 1-8.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.
- Umikalsom, M. S., Ariff, A. B., & Mohamed, I. A. (1998). Saccharification of pretreated oil palm empty fruit bunch fiber using cellulase of *Chaetomium globosum*. *Food Chemistry*, 46, 3359-3364.
- Viola, E., Cardinale, M., Santarcangelo, R., Villone, A., & Zimbardi, F. (2008). Ethanol from eel grass via steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 32, 613-618.
- Wang, X., Hu, J., & Zeng, J. (2012). Steam explosion pulping of oil palm empty fruit bunch fiber. *Bioresources Technology*, 7(1), 1008-1015.
- Werner, I., Koger, C. S., Deanovic, L. A., & Hinton, D. E. (2001). Toxicity of methyl-tert-butyl ether to freshwater organisms. *Environmental Pollution*, 111, 83-88.
- Ying, T. Y., Teong, L. K., Abdullaha, W. N. W., & Peng, L. C. (2014). The effect of various pretreatment methods on oil palm empty fruit bunch (EFB) and kenaf core fibers for sugar production. *Procedia Environmental Sciences*, 20, 328 – 335.
- Zhang, D., Ong, Y. L., Li, Z., & Wu, J. C. (2012). Optimization of dilute acid-catalyzed hydrolysis of oil palm empty fruit bunch for high yield production of xylose. *Chemical Engineering Journal*, 181-182, 636-642.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สารเคมี

1. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi – Nelson (Somogyi, 1952)

1.1 เตรียมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent)

ประกอบด้วย

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	71	กรัม
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40	กรัม
NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์	100	มล.
(เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.)		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	80	มล.
(เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 8 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มล.)		
Na_2SO_4	180	กรัม

ละลายสารเคมีทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

1.2 เตรียมสารละลายเนลสัน (Nelson's reagent)

ประกอบด้วย

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	53.2	กรัม
H_2SO_4	21	มล.
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 12% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	50	มล.
(เตรียมโดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนอาร์เซนเนต 6 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มล.)		

ละลายสารเคมีทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

1.3 กระบวนการวิเคราะห์

เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 1 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ 1 มล. ต้มหลอดทดลองในน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และเติมสารละลายเนลสัน 1 มล. ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มล. และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล – ชัลฟิวริก (Dubois, 1956)

2.1 เตรียมสารละลายฟินอลเข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ละลายฟินอล 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. เก็บในขวดสีชา

2.2 กระบวนการวิเคราะห์

เติมสารละลายฟินอลเข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณ 1 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด 1 มล. เติมกรดชัลฟิวริกเข้มข้น 5 มล. จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

1. สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 1 มก./มล. จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180 และ 200 ไมโครกรัม/มล. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลดังกระบวนการข้างต้น จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานโดยแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นน้ำตาลกับค่าดูดกลืนแสง

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์ม น้ำมันปลา

จากสูตรคำนวณ

$$\frac{g}{MW} = \frac{CV}{1000}$$

ต้องการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 150 มล.

ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยละลาย NaOH 3 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มล.

ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ เตรียมโดยละลาย NaOH 4.5 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มล.

ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยละลาย NaOH 6 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มล.

ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เตรียมโดยละลาย NaOH 9 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มล.

ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมโดยละลาย NaOH 12 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มล.

ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ เตรียมโดยละลาย NaOH 15 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มล.

3. สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิติเรต ที่ค่า pH ต่างๆ

ประกอบด้วย

ซิติริกแอซิกโมโนไฮเดรต เข้มข้น 0.1 โมลาร์

(เตรียมโดยละลายซิติริกแอซิกโมโนไฮเดรต 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.)

ไตรโซเดียมซิติเรต เข้มข้น 0.1 โมลาร์

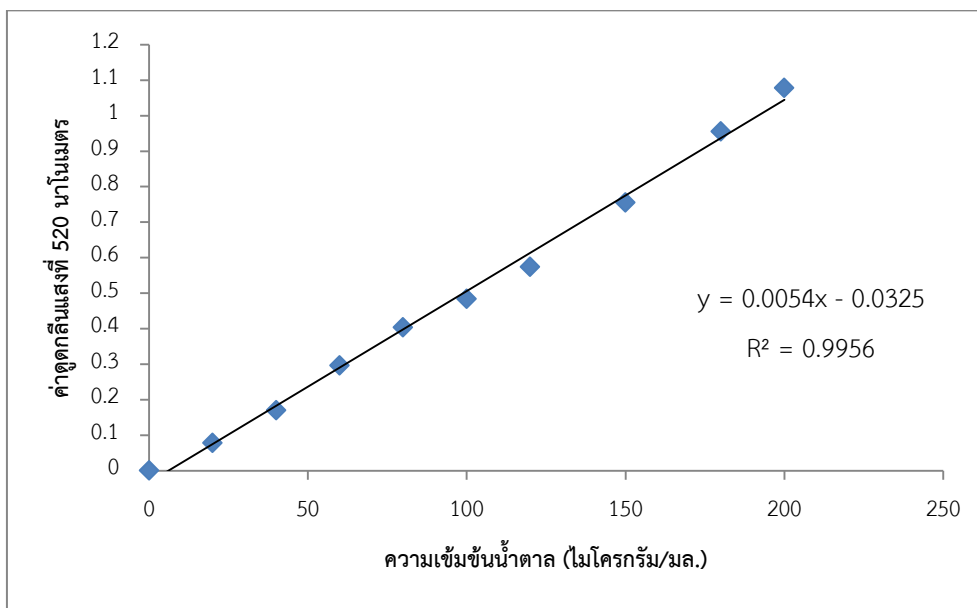
(เตรียมโดยละลายไตรโซเดียมซิติเรต 29.41 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.)

ละลายสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันโดยใช้สัดส่วนดังตาราง (Dawson และคณะ, 1986)

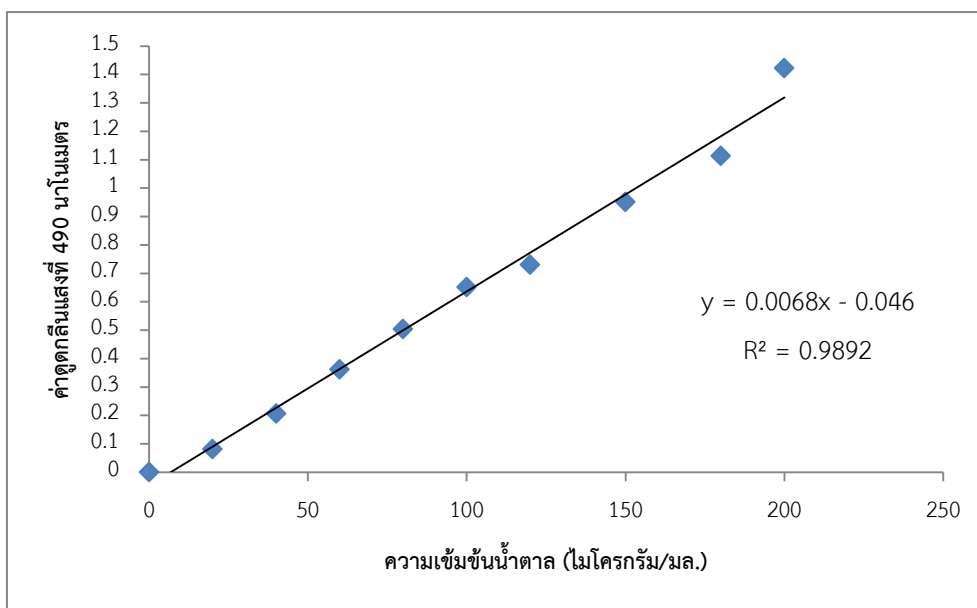
ค่า pH ที่ต้องการ	ปริมาณของ ซิติริกแอซิกโมโนไฮเดรต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (มล.)	ปริมาณของ ไตรโซเดียมซิติเรต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (มล.)
4.0	59.0	41.0
4.2	54.0	46.0
4.4	49.5	50.5
4.6	44.5	55.5
4.8	40.0	60.0
5.0	35.0	65.0
5.2	30.5	69.5
5.4	25.5	74.5
5.6	21.0	79.0
5.8	16.0	84.0
6.0	11.5	88.5

ภาคผนวก ข
กราฟสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

1. กราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐานจากการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi - Nelson



2. กราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐานจากการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล - ซัลฟิวริก



ภาคผนวก ค
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ G2-16-1
ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

เพปโตน ปริมาณ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

สารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

วุ้นผง ปริมาณ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับค่า pH 5.0 และนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้งาน



ภาคผนวก ง

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปลา่ที่ผ่านการปรับสภาพ

1. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพโดยแปรผันความยาวเส้นใย

ปรับสภาพเส้นใยขนาดความยาว 0.25 – 2 มม. 2 – 10 มม. และ 1 ซม. โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) เป็นเวลา 16 ชม. และระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 200°C เป็นระยะเวลา 2 นาที โดยใช้ปริมาณเส้นใย 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 275 CMCs ยูนิท/กรัมเส้นใย ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต pH 6.0 เป็นเวลา 6 ชม. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$, Duncan's MRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD

ตารางที่ 1.1 : ผลของความยาวเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปลา่ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

ความยาวของเส้นใย	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0.25 - 2 มม.	5.66 ^b	± 0.100
2 - 10 มม.	6.031 ^a	± 0.117
1 ซม.	4.302 ^c	± 0.056

2. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพโดยแปรผันปริมาณของเส้นใย

ปรับสภาพเส้นใยขนาด 2 - 10 มม. โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) เป็นเวลา 16 ชม. และระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 200°C เป็นระยะเวลา 2 นาที โดยใช้ปริมาณเส้นใยในถังปฏิกรณ์ของเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำเท่ากับ 2%, 3% และ 4% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 275 CMCs ยูนิท/กรัมเส้นใย ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต pH 6.0 เป็นเวลา 6 ชม. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$, Duncan's MRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD

ตารางที่ 2.1 : ผลของปริมาณเส้นใยในถังปฏิกรณ์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

ปริมาณเส้นใย (น้ำหนัก/ปริมาตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2%	5.507 ^b	± 0.053
3%	5.922 ^a	± 0.174
4%	5.378 ^b	± 0.276

3. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพโดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ใช้เส้นใยขนาด 2 – 10 มม. แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) เป็นเวลา 16 ชม. และระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 200°ซ เป็นระยะเวลา 2 นาที โดยใช้ปริมาณเส้นใย 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 275 CMCs ยูนิท/กรัมเส้นใย ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต pH 6.0 เป็นเวลา 6 ชม. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$, Duncan's MRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD

ตารางที่ 3.1 : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปลาโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0.7 โมลาร์	6.800 ^d	± 0.1157
1 โมลาร์	8.089 ^c	± 0.088
1.5 โมลาร์	8.298 ^b	± 0.056
2 โมลาร์	8.458 ^a	± 0.0139
2.5 โมลาร์	8.364 ^{ab}	± 0.0605

4. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพโดยแปรผันอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการระเบิดด้วยไอน้ำ

ปรับสภาพเส้นใยทะเลลายปาล์มน้ำมันเปล่าขนาด 2 – 10 มม. โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ (10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) เป็นระยะเวลา 16 ชม. จากนั้นระเบิดด้วยไอน้ำโดยใช้ปริมาณเส้นใยฯ 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แปรผันอุณหภูมิที่ใช้เป็น 160, 200 และ 240°C นาน 2 นาที ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 275 CMCs ยูนิท/กรัมเส้นใยฯ ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซีเตรต pH 6.0 เป็นเวลา 6 ชม. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$, Duncan's MRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD

ตารางที่ 4.1 : ผลของอุณหภูมิในการระเบิดด้วยไอน้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

อุณหภูมิ	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
160°C	6.180 ^c	± 0.0702
200°C	8.398 ^a	± 0.0367
240°C	7.464 ^b	± 0.1273

จากนั้นปรับสภาพโดยใช้เส้นใยขนาดเดียวกับการทดลองข้างต้น แต่ปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 200°C เป็นระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 2, 5 และ 10 นาที ย่อยด้วยเอนไซม์ที่ภาวะเดียวกัน เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$, Duncan's MRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD

ตารางที่ 4.2 : ผลของเวลาในการระเบิดด้วยไอน้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

เวลา	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2 นาที	8.373 ^b	± 0.0139
5 นาที	8.86 ^a	± 0.0570
10 นาที	8.104 ^c	± 0.0559

5. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการแปรผันค่า pH และปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

ปรับสภาพเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าขนาด 2 – 10 มม. โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ (10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) เป็นระยะเวลา 16 ชม. จากนั้นระเบิดด้วยไอน้ำ โดยใช้ปริมาณเส้นใยฯ 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 200°ซ เวลา 5 นาที จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 275 CMCs ยูนิท/กรัมเส้นใยฯ ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต ที่ pH ต่างๆกัน เป็นระยะเวลา 6 ชม. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$, Duncan's MRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD

ตารางที่ 5.1 : ผลของ pH ต่อการย่อยเส้นใยทะลายปาล์มเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ค่า pH	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
4.0	11.547 ^c	± 0.057
4.5	13.229 ^a	± 0.086
5.0	12.247 ^b	± 0.166
5.5	10.369 ^d	± 0.183
6.0	8.849 ^e	± 0.191

จากนั้นปรับสภาพโดยใช้ภาวะและตัวแปรการทดลองเดียวกับข้างต้น แต่ย่อยด้วยเอนไซม์โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ที่ค่า pH 4.5 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$, Duncan's MRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD

ตารางที่ 5.2 : ผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยเส้นใยทะเลลายปาล์มเปล่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ pH 4.5 ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาณเอนไซม์ (CMCs ยูนิท/กรัมเส้นใย)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
298	13.153 ^c	± 0.086
596	18.427 ^b	± 0.146
894	22.213 ^a	± 0.125
1,192	22.238 ^a	± 0.141



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ เกิดวันที่ 9 มกราคม พ.ศ. 2533 จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาตรีจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิทยาศาสตร์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากนั้นเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทในปีการศึกษา 2555 ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

การนำเสนอผลงาน

Weeraphan, T. & Akaracharanya, A. (2014). Steam explosion pretreatment of Oil Palm Empty Fruit Bunch. Paper presented at the The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference Mae Fah Lunag University, Chiang rai, Thailand.