



สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2

Optimization for Production of Ethanol from Palm Oil Mill Effluent using

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2

พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์

Pongsak Noparat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยเชื้อ <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2
ผู้เขียน	นายพงษ์ศักดิ์ นพรัตน์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์เป็นสองในสามแหล่งน้ำทิ้งที่สำคัญของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เมื่อวิเคราะห์ลักษณะน้ำทิ้งทั้งสองแหล่ง พบว่า มีค่าต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ มีพีเอช 5.1 และ 4.3 ซีไอดี 80,000 และ 95,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งทั้งหมด 47,696 และ 64,600 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งแขวนลอย 19,066 และ 27,332 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมันและกรีส 1,850 และ 1,090 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมด 8,550 และ 6,860 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟีนอล 1.85 และ 3.54 มิลลิกรัมต่อลิตร และแร่ธาตุต่าง ๆ เมื่อใช้น้ำทิ้งทั้งสองแหล่งนี้ (ปรับพีเอชเป็น 6.5) ในการเลี้ยงเชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 ที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อเป็นแหล่งสารอาหารได้ดีกว่าน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.58 และ 0.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ลดค่าซีไอดีได้ 32.5 และ 28.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ พบว่า เชื้อเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในน้ำทิ้งที่ไม่มีสารเจือจาง (80 กรัมต่อลิตร) และมีค่าที่เหมาะสมดังนี้ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร, methylene blue (สารรีดิวซ์) 0.05 มิลลิโมลาร์ และ NH_4NO_3 0.6 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.61, 1.25, 1.05, 0.98 และ 1.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลผลิตเอทานอล (Yp/s) เท่ากับ 0.16, 0.23, 0.20, 0.20 และ 0.22 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป ตามลำดับ อัตราการผลิตเอทานอล เท่ากับ 0.025, 0.052, 0.044, 0.041 และ 0.048 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง ตามลำดับ การใช้สารอาหารของเชื้อทำให้ค่าซีไอดีลดลง 33.6, 29.0, 30.2, 29.8 และ 28.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ โดยใช้วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (RSM) พบว่า มีค่าที่เหมาะสม ดังนี้ ความเข้มข้นของซีไอดี, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เท่ากับ 65, 0.25 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ methylene blue

เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ และ NH_4NO_3 เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อผลิตเอทานอลสูงสุด 1.42 กรัมต่อลิตร จากการที่แบคทีเรียชอบร็อนสายพันธุ์ PSU-2 สามารถใช้ซูโครสได้ดี จึงทดสอบการใช้แหล่งซูโครสราคาถูก คือ กากน้ำตาลเป็นสารอาหารเพื่อผลิตเอทานอลในอาหารสังเคราะห์ พบว่าเชื้อผลิตเอทานอลสูงสุด 4.52 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 30 และ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าเอทานอลสูงสุด 3.68, 3.06 และ 2.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเติมกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตรในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่สภาวะเหมาะสมจากการศึกษาแบบธรรมดา (ค่าซีไอดี 80 กรัมต่อลิตร $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัมต่อลิตร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัมต่อลิตร methylene blue 0.05 มิลลิโมลาร์ NH_4NO_3 0.6 เปอร์เซ็นต์) กับการเติมกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตรในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาแบบ RSM (ค่าซีไอดี 65 กรัมต่อลิตร $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 กรัมต่อลิตร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 กรัมต่อลิตร methylene blue 1.0 มิลลิโมลาร์ NH_4NO_3 0.5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ 5.47 และ 5.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลผลิตเอทานอล (Yp/s) มีค่าเท่ากับ 0.33 และ 0.35 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ตามลำดับ มีอัตราการผลิตเอทานอล เท่ากับ 0.152 และ 0.163 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และค่าซีไอดีลดลง 45.7 และ 48.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำแอลกอฮอล์ที่ได้ไปกลั่น พบว่า ที่เวลา 5 นาที เอทานอลที่กลั่นได้มีความเข้มข้นสูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 12.5 กรัมต่อลิตร และพบเมทานอล 4.65 กรัมต่อลิตร โดยไม่พบ โพรพานอล บิวทานอล และเพนทานอล เมื่อนำเอทานอลที่กลั่นได้ไปศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ พบว่า มีค่าจุดเดือดที่ 99.16 องศาเซลเซียส มีความหนาแน่น 0.9252 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.9440 และความหนืด 1.32 เซนติพอยด์

Thesis Title	Optimization for Production of Ethanol from Palm Oil Mill Effluent using <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2
Author	Mr.Pongsak Noparat
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2008

Abstract

Sterilizer condensate and decanter effluent are two out of the three major effluent sources of palm oil mill. They had pH 5.1 and 4.3, 80,000 and 95,000 mg/l COD, 47,696 and 64,600 mg/l total solid with 19,066 and 27,332 mg/l suspended solid, 1,850 and 1,090 mg/l oil & grease, 8,550 and 6,860 mg/l total sugar, 1.85 and 3.54 mg/l total phenol with some mineral salts, respectively. These two effluent sources (adjusted the initial pH to 6.5) were used for cultivation of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 at 60 °C for 24 h. Sterilizer condensate was found to be a better source than decanter effluent with the highest ethanol concentrations of 0.58 and 0.35 g/l, respectively and COD removals of 32.5% and 28.0%, respectively. Studies on individual parameters on ethanol production from sterilizer condensate revealed the optimum values of 80 g/l COD (without dilution), 0.2 g/l ZnSO₄·7H₂O, 0.2 g/l FeSO₄·7H₂O, 0.05 mM methylene blue (reducing agent) and 0.6% NH₄NO₃, giving the highest ethanol production of 0.61, 1.25, 1.05, 0.98 and 1.15 g/l, respectively. Their yields (Yp/s) were 0.16, 0.23, 0.20, 0.20 and 0.22 g ethanol/g total sugar utilized, respectively, while the ethanol productivities were 0.025, 0.052, 0.044, 0.041 and 0.048 g/l/h, respectively. The COD removals were 33.6, 29.0, 30.2, 29.8 and 28.5%, respectively. The effect of interaction of these parameters on ethanol production from sterilizer condensate was studied using the response surface methodology (RSM). Results revealed that the optimum values of COD, ZnSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O and NH₄NO₃ were 65, 0.25, 0.25 and 0.5 g/l, respectively, with the optimum concentration of methylene blue at 1.0 mM giving the highest ethanol concentration of 1.42 g/l. Since the thermophilic bacteria PSU-2 could utilize sucrose very well, therefore, cheap source of sucrose as molasses was tested as substrate for ethanol production using synthetic medium.

The highest ethanol production of 4.52 g/l was achieved in the presence of 40 g/l molasses followed by 50, 30 and 20 g/l molasses with the highest ethanol production of 3.68, 3.06 and 2.18 g/l, respectively. Comparison on supplementation of 40 g/l molasses in sterilizer condensate under the optimum condition from the conventional studies (80 g/l COD, 0.2 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 mM methylene blue and 0.6% NH_4NO_3) with the supplementation of 40 g/l molasses in sterilizer condensate under the optimum condition from RSM studies (65 g/l COD, 0.25 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mM methylene blue and 0.5% NH_4NO_3) revealed the highest ethanol production of 5.47 and 5.85 g/l, respectively. Their yields (Y_p/s) were 0.33 and 0.35 g ethanol/g total sugar utilized with the ethanol productivities of 0.152 and 0.163 g/l/h and COD removals of 45.7 and 48.3%, respectively. After distillation for 5 min, the ethanol concentration increased to 12.5 g/l and 4.65 g/l methanol was detected but no presence of propanol, butanol and pentanol. The properties of the distilled ethanol were as following ; boiling point at 99.16 °C, density of 0.9252 kg/m³, specific gravity of 0.9440 and viscosity of 1.32 cP.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(3)
Abstract.....	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
LIST OF TABLES.....	(9)
LIST OF FIGURES.....	(11)
บทที่	
1 บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	19
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ.....	20
วัสดุและอุปกรณ์.....	20
วิธีการวิเคราะห์.....	21
วิธีการทดลอง.....	23
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	30
4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	73
เอกสารอ้างอิง.....	76
ภาคผนวก.....	82
ประวัติผู้เขียน.....	91

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Characteristics of effluent from various steps during palm oil extraction and mixed effluent of a palm oil mill.....	4
2. Proximate composition of a palm oil mill effluent.....	4
3. Composition of the mineral in sterilizer condensate and mixed effluent of a palm oil mill.....	5
4. Characteristics of mixed effluent of a palm oil mill.....	5
5. Thermophilic bacteria that produced ethanol at temperature higher than 55 °C.....	8
6. pH during cultivation of thermophilic bacteria for ethanol production.....	13
7. Independent variable and there factor levels.....	26
8. Central composite experimental design matrix defining substrate concentration (X ₁), Zn as ZnSO ₄ .7H ₂ O (X ₂), Fe as FeSO ₄ .7H ₂ O (X ₃), Redox (X ₄) and N as NH ₄ NO ₃ (X ₅) on ethanol production from <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2.....	26
9. Characteristics and chemical composition of sterilizer condensate and decanter effluent of a palm oil mill after filtration.....	31
10. Effect of sources of POME on growth and ethanol production of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 cultivated at 60 °C for 24 h.....	35
11. Effect of COD concentration in sterilizer condensate on growth, ethanol production and COD removal of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 at 60 °C for 24 h.....	38
12. Effect of ZnSO ₄ .7H ₂ O concentration on ethanol production and COD removal of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.....	42
13. Effect of FeSO ₄ .7H ₂ O concentration on ethanol production and COD removal of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.....	45
14. Effect of Dye concentration on ethanol production and COD removal of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.....	49
15. Effect of nitrogen sources on ethanol production and COD removal of <i>T.thermosaccharolyticum</i> PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.....	52

LIST OF TABLES (Continued)

Table	Page
16. Effect of NH ₄ NO ₃ concentration on ethanol production and COD removal of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.....	56
17. Central composite experimental design matrix defining substrate concentration (X ₁), ZnSO ₄ .7H ₂ O (X ₂), FeSO ₄ .7H ₂ O (X ₃), Redox (X ₄) and NH ₄ NO ₃ (X ₅) on ethanol production from <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 at 60°C.....	57
18. Analysis of variance (ANOVA) for the experimental results of the central composite design (cubic model).....	59
19. Regression coefficient (R ²) and regression equation for ethanol concentration.....	60
20. Optimized medium composition for ethanol production by <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 at 60°C.....	61
21. Effect of molasses concentration on ethanol yield and molasses consumption of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 cultivation in DSMZ No.211 at 60 °C.....	66
22. Effect of addition of molasses (40 g/L) in sterilizer condensate on ethanol production and COD removal of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 at 60 °C for 48 h.....	70
23. Characteristics of ethanol from <i>T. thermosaccharolyticum</i> - PSU-2 cultivated in palm oil mill effluent supplemented with molasses (40 g/l) and distilled using fraction collector for 5 min.....	71
24. Type of alcohol from <i>T. thermosaccharolyticum</i> - PSU-2 cultivated in palm oil mill effluent supplemented with molasses (40 g/l) and distilled using fraction collector for 5 min.....	72
25. Optimum condition for ethanol production and COD removal by <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 in sterilizer condensate at 60°C for 24 h.....	73
26. Effect of addition of molasses (40 g/L) in palm oil mill effluent on ethanol production of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 at 60 °C for 48 h.....	74

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Palm oil milling process.....	3
2. Suggested metabolic pathway deduced for carbohydrate fermentation by <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 under organic nitrogen added medium and organic nitrogen deficient medium.....	17
3. Effect of sources of POME on growth of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	33
4. Effect of of sources of POME on utilization of sugar of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	34
5. Effect of COD concentration of sterilizer condensate on growth of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	36
6. Effect of COD concentration of sterilizer condensate on utilization of sugar of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	37
7. Effect of ZnSO ₄ .7H ₂ O concentration in sterilizer condensate on growth of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	40
8. Effect of ZnSO ₄ .7H ₂ O concentration in sterilizer condensate on utilization of sugar of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	41
9. Effect of FeSO ₄ .7H ₂ O concentration in sterilizer condensate on growth of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	43
10. Effect of FeSO ₄ .7H ₂ O concentration in sterilizer condensate on utilization of sugar of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	44

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure	Page
11. Effect of Dye concentration on on total cell protein of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.....	47
12. Effect of Dye concentration on total sugar of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.....	48
13. Effect of nitrogen source in sterilizer condensate on growth of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	50
14. Effect of nitrogen source in sterilizer condensate on utilization of sugar of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	51
15. Effect of NH ₄ NO ₃ concentration in sterilizer condensate on growth of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	54
16. Effect of NH ₄ NO ₃ concentration in sterilizer condensate on utilization of sugar of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.....	55
17. Response surface plot of ethanol production by <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 as a function of Redox and Substrate (A), as a function Fe and Zn (B), as a function Redox and Zn (C) and as a function Redox and Fe (D).....	62
18. Effect of molasses concentration on growth of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation in DSMZ No.211 at 60 °C.....	64
19. Effect of molasses concentration on total sugar utilization of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation in DSMZ No.211 at 60 °C.....	65

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure		Page
20.	Effect of addition of molasses (40 g/L) in sterilizer condensate on growth of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 48 h.....	68
21.	Effect of addition of molasses (40 g/L) in sterilizer condensate on total sugar utilization (a) and ethanol production (b) from cultivation of <i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2 at 60 °C for 48 h.....	69
22.	Ethanol concentrations after distillation using fraction collector at 78 C ^o	71
Figure-Appendix		
1.	Standard curve of standard solution protein BSA analysis by Lowry method	83
2.	Standard curve of standard solution glucose analysis by Anthrone method.....	85
3.	Standard curve of phenol solution.....	89

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันประเทศไทยได้สนับสนุนการผลิตไบโอดีเซลจากปาล์มน้ำมัน ทำให้ปาล์มน้ำมันยังทวีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจของประเทศ ในปี พ.ศ. 2541 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มทั้งหมดประมาณ 1,800,000 ไร่ (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และคณะ, 2546) และมีโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 66 โรง ในกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานจะมีน้ำทิ้งออกมามาก ส่วนใหญ่มาจากขั้นตอนการอบทะเลลายปาล์มในรูปน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันทะเลลายปาล์ม (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533) ส่วน Hwang และคณะ (1978) รายงานว่าปริมาณน้ำทิ้งทั้งหมดคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณทะเลลายปาล์ม และน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบมีปริมาณมาก คิดเป็น 0.87 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะเลลายปาล์มสด น้ำทิ้งมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม มีปริมาณสารอินทรีย์สูง โดยมีค่าซีโอดีและบีโอดีเท่ากับ 58,000 และ 110,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ของแข็งทั้งหมดและของแข็งแขวนลอย เท่ากับ 70,000 และ 40,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีน้ำมันในปริมาณ 25,600 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.5 เปอร์เซ็นต์) และมี pH ต่ำ (4.5) (Pechsuth *et al.*, 2001) ค่าต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้น้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งที่จะก่อให้เกิดปัญหาทางน้ำได้ง่าย ขณะเดียวกันก็สามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่ดีในกระบวนการหมัก (Hipolito *et al.*, 2008) ดังนั้นการนำน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบมาผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มด้วยกระบวนการหมักจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ โดยเฉพาะการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน

มีรายงานผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียชอบร้อนที่แยกได้จากระบบ Anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) สายพันธุ์ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม และสามารถผลิตเอทานอลได้ 0.50 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ขาดแหล่งสารอินทรีย์ในโตรเจน แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถใช้สับสเตรทได้หลากหลาย รวมทั้งสับสเตรทที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ไชแลน แป้ง และเซลลูโลส (O-thong *et al.*, 2008) การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีอุณหภูมิหลังการทิ้งสูงถึง 70 องศาเซลเซียส จึงเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการลดอุณหภูมิ โดยนำมาใช้ผลิตเอทานอลได้โดยตรง นอกจากนี้การหมักที่อุณหภูมิสูงมีผลให้

สามารถเก็บเกี่ยวเอทานอลได้ง่าย ลดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากความเข้มข้นของเอทานอล น้ำที่ผ่านกระบวนการหมักปราศจากเชื้อก่อโรคสามารถปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมได้ (Knudton *et al.*, 1999) การใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญและหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากใช้เวลาในการหมักสั้นกว่าและไม่ต้องใช้ระบบหล่อเย็น ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง (Singh *et al.*, 1998; Abdel-fattah *et al.*, 2000)

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยใช้แหล่งวัตถุดิบที่มีอุณหภูมิสูงจึงสนใจแบคทีเรียชอปร็อน *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 เพื่อเป็นแหล่งของเอทานอลอีกแหล่งหนึ่ง

การตรวจเอกสาร

1. แหล่งที่มา ปริมาณ และลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน มีการใช้น้ำในการผลิตมากและก่อให้เกิดน้ำทิ้งในขั้นตอนการแยกน้ำมัน เมื่อน้ำมันถูกค้ำเค้นเข้าถังพักหรือถังลอย ส่วนของน้ำมันซึ่งเบากว่าน้ำจะลอยตัวอยู่ด้านบน และถูกแยกออกไป ส่วนด้านล่างจะเป็นของผสมลักษณะเหลวข้น เรียกว่า น้ำสลัดจ์ ถูกส่งเข้าถังตกจม (settling tank) และผ่านเข้าเครื่องแยกกรวดทราย (desander) ก่อนจะนำเข้าไปในเครื่องแยกน้ำมัน โดยใช้ separator หรือ decanter ต่อไป ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะกระบวนการใช้เครื่องแยกแบบ decanter (Figure 1) อาจมีการปรับน้ำเข้าผสมเล็กน้อยก่อนการแยก สำหรับ decanter เมื่อใช้งานไประยะหนึ่งต้องมีการล้างทำความสะอาดในขั้นตอนนี้จะมือน้ำทิ้งออกมา 200-250 ลิตรต่อครั้ง จากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานจะมีน้ำทิ้งออกมามาก ส่วนใหญ่มาจากขั้นตอนการอบทะเลลายปาล์มในรูปน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent)

ลักษณะของน้ำทิ้งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำทิ้ง ได้แก่ น้ำทิ้งจากบ่อรวมน้ำเสีย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (Table 1) จะเห็นว่า น้ำทิ้งจากบ่อรวมน้ำเสียของโรงงานมีค่าบีโอดีและซีโอดี อยู่ในปริมาณสูง รวมทั้งค่ากรดไขมัน ปริมาณของแข็งทั้งในรูปแบบสารที่ระเหยได้ และสารแขวนลอย (พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ, 2533) ต่อมา อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และคณะ (2537) ศึกษาลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 4 โรง พบว่าน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีปริมาณสารแขวนลอยต่ำ (เฉลี่ย 10.30 กรัมต่อลิตร) และมีน้ำมันค่อนข้างสูง (เฉลี่ย 14.57 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้ยังมีรายงานองค์ประกอบของน้ำทิ้ง และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่สำคัญ ดังแสดง Table 2, Table 3 (Hwang *et al.*, 1987) และ Table 4 (Mustar *et al.*, 2001)

จะเห็นว่าแร่ธาตุที่มีมากที่สุด คือ โพแทสเซียม (K) ซึ่งมีสูงถึง 3475 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แมกนีเซียม (Mg) และแคลเซียม (Ca) ในปริมาณ 212 และ 185 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

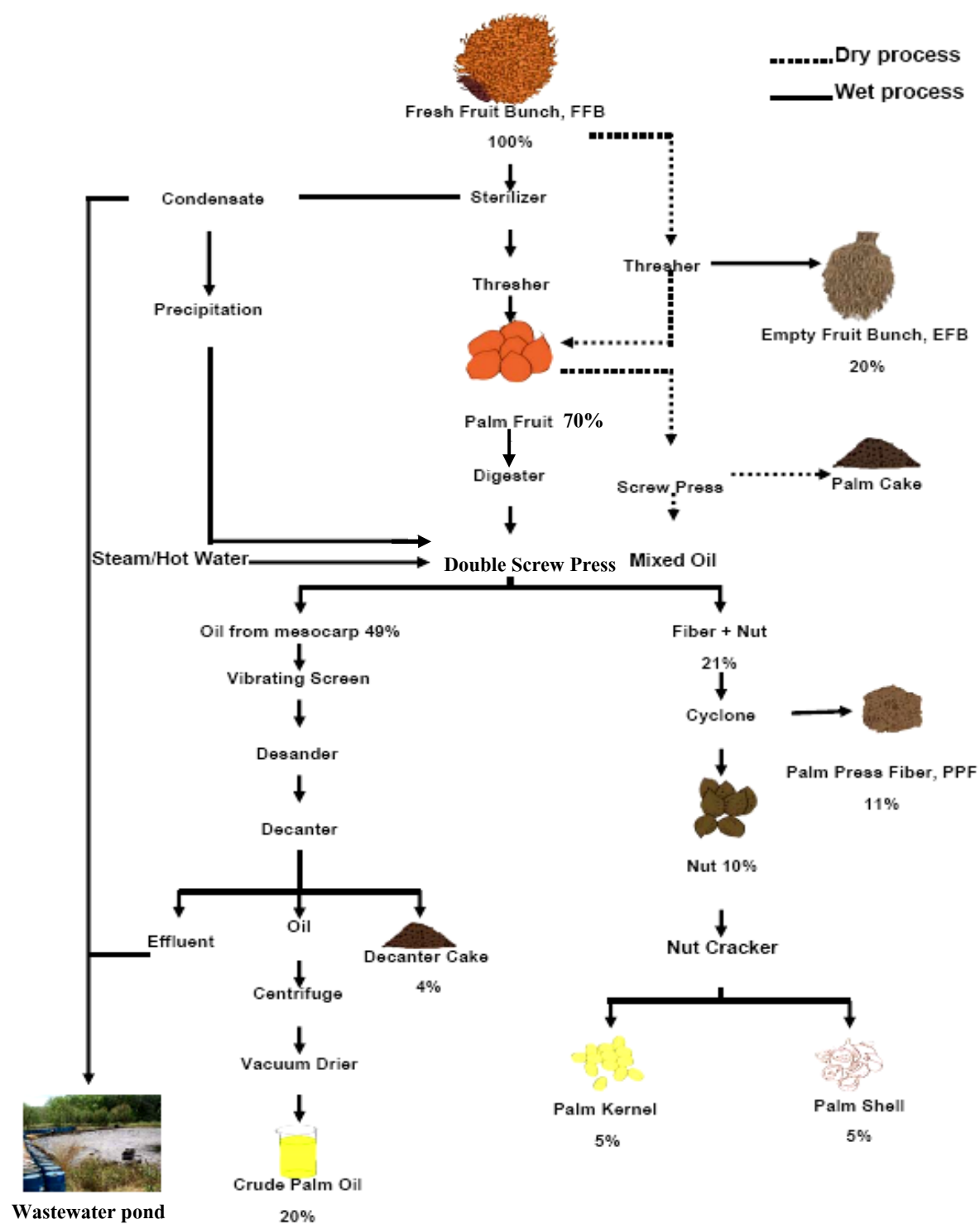


Figure 1. Palm oil milling process.

ที่มา : คัดแปลงจากพูนสุข ประเสริฐสรณ์ และคณะ (2533)

Table 1. Characteristics of effluent from various steps during palm oil extraction and mixed effluent of a palm oil mill.

Parameters ^a	Sterilizer condensate	Decanter effluent	Mixed effluent
Color	Dark Brown	Brown	Brown-Blackish Brown
pH	4.05-4.62	4.84-5.35	4.61-4.89
BOD	54,750-60,000	22,800-41,985	21,000-45,375
COD	80,523-115,934	45,360-80,146	38,246-67,567
Volatile acid	3,128-5,870	998-7,125	1,838-2,273
Alkalinity	68-200	37-1,576	86-480
Grease	16-2,449	20-1,165	4
Total solids (TS)	49,063-88,508	26,367-76,733	25,634-47,242
Suspended solids (SS)	18,500-52,000	2,600-6,100	2,900-20,300
Nitrogen			
- ammonia	27-61	7-66.3	22-23
- organic	551-1,172	22-1,287	518

^aExcept for color and pH all other parameters are in mg/L

ที่มา : ดัดแปลงจากพูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ (2533)

Table 2. Proximate composition of a palm oil mill effluent.

Composition	Mixed effluent		Sterilizer condensate	
	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)
Total solids	-	4.6	-	6.0
Crude protein (N×6.25)	10.9	0.5	8.8	0.5
Ether extract	25.6	1.2	34.6	2.1
Ash	11.4	0.5	14.2	0.9
Crude fibre	9.7	0.5	3.3	0.2
Nitrogen-free extract	42.4	1.9	39.1	2.3

ที่มา : Hwang และคณะ (1987)

Table 3. Composition of the mineral in sterilizer condensate and mixed effluent of a palm oil mill.

Mineral	Mixed effluent		Sterilizer condensate	
	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)
N	689	1.73	944	1.83
P	160	0.31	152	0.36
K	1645	3.19	1300	3.09
Na	31	0.06	22	0.05
Mg	970	1.88	1020	2.42
Ca	110	0.21	140	0.33
Fe	50	0.10	18	0.04
Zn	13	0.025	15	0.035

ที่มา : Hwang และคณะ (1987)

Table 4. Characteristics of mixed effluent of a palm oil mill.

Parameters	Concentrations
Total solids	44.6 g/l
Total suspended solids	14.1 g/l
Total dissolved solids	19.8 g/l
Total carbohydrates	9.0 g/l
Reducing sugars	3.0 g/l
Total phosphate	203 mg/l
Mg	212 mg/l
Ca	185 mg/l
Na	14.5 mg/l
Zn	12.0 mg/l
K	3475 mg/l
Fe	27.4 mg/l

ที่มา : Mustar และคณะ (2001)

2. การผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้ง

2.1 น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำตาล

Khan และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำตาลที่เจือจาง โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.8 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.138 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของซีโอดี เท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของซีโอดีเพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 6 กรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.225 และ 2.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.2 น้ำทิ้งจากชุมชน

Alam และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากสลัดจ์ของน้ำทิ้งชุมชน โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 9.8 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดค่าซีโอดี ทองแดง (Cu) และโครเมียม เท่ากับ 68, 68 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากเวลา 72 ชั่วโมง

2.3 น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอก

Massadeh และ Modallal (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก ที่มีค่าบีโอดีเริ่มต้น เท่ากับ 47,500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อย่อยน้ำทิ้งด้วย *Pleurotus sajor-caju* เป็นเวลา 20 วัน สามารถลดปริมาณฟีนอลได้ 68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นของบีโอดี เท่ากับ 11875, 23750, 35625 และ 47500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงสุด 14.20 กรัมต่อลิตร ในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นของบีโอดี 23,750 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.4 น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Hipolito และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.8 เป็นเวลา 7 วัน พบว่า มีความสามารถในการผลิตบิวทานอล และสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 2.33 กรัมต่อลิตร จากสลัดจ์น้ำทิ้งที่มีน้ำตาลทั้งหมด 8 กรัมต่อลิตร

O-thong และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีค่าซีโอดี เท่ากับ 80,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มได้เท่ากับ 183 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และสามารถผลิตเอทานอลได้ 0.5 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ขาดแหล่งสารอินทรีย์ในไฮโดรเจน

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

3.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

ปกติแบคทีเรียที่ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง (40°C) มีเพียงสายพันธุ์เดียว คือ *Zymomonas mobilis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* (Benschoter and Ingram., 1986) แต่จากรายงานหลายฉบับกล่าวว่า มีแบคทีเรียชอบร้อนหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้โดยความสามารถในการชอบร้อนและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง (70°C) ของแบคทีเรียมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ซึ่งแบคทีเรียชอบร้อนส่วนใหญ่มักพบอยู่ในสกุล *Thermoanaerobacter*, *Clostridium* และ *Thermoanaerobacterium* (Sommer *et al.*, 2003) ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงในช่วง 0.50-6.50 กรัมต่อลิตร (Table 5)

Abate และคณะ (1996) ศึกษาเปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ และเชื้อผสมระหว่างเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. และแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร fermentation media ที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) ซูโครส 200 ยีสต์สกัด 10 เปปโตน 5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 KH_2PO_4 1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่า พบว่าเมื่อทำการหมักเฉพาะแบคทีเรีย *Z. mobilis* เพียงชนิดเดียว สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด โดยใช้ระยะเวลาหมักนานกว่า 60 ชั่วโมง แต่ผลผลิต ($Y_{x/s}$) ของเอทานอล (0.47 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลซูโครสที่ถูกใช้ไป) มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. (0.50 กรัมต่อกรัม) แต่เชื้อยีสต์จะใช้เวลาในการหมักนานกว่าแบคทีเรียถึง 11 ชั่วโมง หรือผลิตเอทานอลได้สูงกว่าแบคทีเรียประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ แต่เชื้อยีสต์เจริญและให้มวลเซลล์สูงกว่าแบคทีเรียมากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของมวลเซลล์ที่ผลิตได้ อย่างไรก็ตามอัตราจำเพาะของการผลิตเอทานอลของแบคทีเรียจะมีค่าสูงกว่ามากถึง 25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเลี้ยงเชื้อผสม แต่ผลผลิต ($Y_{x/s}$) ของเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.50 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลซูโครสที่ถูกใช้ไป ซึ่งใกล้เคียงกับการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยว ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีสารลิแวนเกิดขึ้น

Sudha และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากชีวมวลพวกเซลล์ูโลสในธรรมชาติ โดย *Clostridium thermocellum* สายพันธุ์ SS21 และ SS22 พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.37 และ 0.35 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสับสเตรท 8 กรัมต่อลิตร สายพันธุ์ SS21 เปลี่ยนกระดาศกรองจาก 71 กรัม ไปเป็นเอทานอล 18.46 กรัมต่อลิตร และสายพันธุ์ SS22 หมักกระดาศกรอง 75.4 กรัม ได้เอทานอล 20.36 กรัมต่อลิตร ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเจริญต่ำในสารพวกพอลิเมอร์แต่ทำการหมักได้ง่ายเมื่อย่อยด้วยค่า

Table 5. Thermophilic bacteria that produced ethanol at temperature higher than 55 °C.

Strains	Type and substrate concentration (g/l)	Temperature (°C) and pH during cultivation	Maximum ethanol (g/l)	Y _{p/s} (g/g)	Reference
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	glucose, 10	65, 7	-	0.40	Lacis and Lawford (1998)
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW200	sucrose, 20	65, 7.5	5.04	0.46	Avci and Donmez (2006)
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. (65-2)	molasses, 40	65, 7.5	6.50	-	Avci and Donmez (2006)
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. (65-2)	sucrose, 20	65, 7.5	4.88	0.43	Avci and Donmez (2006)
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> (70-1)	sucrose, 20	65, 7.5	2.93	0.31	Avci and Donmez (2006)
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> (70-1)	molasses, 40	65, 7.5	2.65	-	Avci and Donmez (2006)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> P262	lactose, 50	55, 5	2.80	0.26	Maddox <i>et al</i> (1995)
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	pectin, 15	58, 6	5.20	-	Rijssel and Hansen (2002)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	sucrose, 10	60, 6.5	0.50	-	O-thong <i>et al</i> (2008)
<i>Clostridium + Thermoanaerobacterium</i>	glucose, 10	60, 6.8	4.60	0.46	Miyazaki <i>et al</i> (2008)
thermophilic anaerobic Strains A3	xylose, 15	70, 7	4.40	0.29	Sommer <i>et al</i> (2003)

Sommer และคณะ (2003) ศึกษาความสามารถในการใช้เชื้อแบคทีเรียชอบร้อน และไม่ชอบออกซิเจนสำหรับการผลิตเอทานอลจากเฮมิเซลลูโลส พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียชอบร้อนที่สามารถเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสหรือพวกน้ำตาลไซโลสไปเป็นเอทานอลและผลิตภัณฑ์อื่นๆ ในปริมาณน้อย ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาทดสอบจำนวนของเชื้อที่ชอบอุณหภูมิสูง และทำการแยกเชื้อพวกแบคทีเรียชอบร้อนในสภาพที่ไร้ออกซิเจน ซึ่งสามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียสที่ใช้สำหรับผลิตเอทานอลจากไซโลส โดยเชื้อที่แยกได้มาจากบริเวณที่ต่างกัน เช่น บ่อน้ำพุร้อน น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ และน้ำทิ้งจากโรงงานต้มเบียร์ โดยทำการทดสอบเชื้อดังนี้ (1) ทดสอบการเปลี่ยนแปลงของไซโลสไปเป็นเอทานอล (2) ทดสอบความเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ (3) ทดสอบความต้านทานต่อความเข้มข้นของไซโลส ซึ่งจากการทดลองพบว่า มีทั้งหมด 86 สายพันธุ์ที่เจริญในสภาวะที่ดี และ 58 สายพันธุ์ เป็นเชื้อเดี่ยว และจากการเลือกมา 5 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อทั้งหมดที่เลือกมาสามารถผลิตเอทานอลได้ดีเมื่อใช้ไซโลสเป็นสับสเตรท โดยทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ thermophilic bacteria สายพันธุ์ A3, A5, A10, X5B และ X7B สามารถผลิตเอทานอลได้ เท่ากับ 151.2, 129.7, 126.2, 91.3 และ 93.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

Miyazaki และคณะ (2008) ศึกษาแบคทีเรียชอบร้อนที่แยกได้จากกากเต้าหู้ พบว่า มีแบคทีเรียชอบร้อนที่ผลิตเอทานอลได้ 2 สกุล คือ *Clostridium* และ *Thermoanaerobacterium* ทั้งคู่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ แต่ไม่ย่อยเซลลูโลส เมื่อทำการเลี้ยงแบบ Co-culture ของทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า ได้ผลผลิตเอทานอล 1.35 กรัมต่อลิตร จาก 1% (w/v) ของกากเต้าหู้ แต่เมื่อใช้กากเต้าหู้ 10 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตเอทานอล 1.24 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสอย่างเดียว 9 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตเอทานอลถึง 4.6 กรัมต่อลิตร

3.2 ชนิดและความเข้มข้นของสับสเตรท

การใช้สับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนนั้นมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และการผลิตเอทานอล การใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้น สูง ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล การยับยั้งส่วนหนึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิส ทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซิสเมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 14% โดยน้ำหนัก และมีผลยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง

สำหรับการใช้น้ำทิ้งเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต้องมีการพิจารณาให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อป้องกันสารยับยั้งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เฟอร์ฟูรัล (furfural) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-hydroxymethylfurfural) ซึ่งส่วนใหญ่สารกลุ่มนี้จะมีมากในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก (Massadeh and

Modallal, 2008) มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

Maddox และคณะ (1995) ศึกษาผลของความเข้มข้นของแลคโตส (50, 160, 180 และ 200 กรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* P262 พบว่า แลคโตสที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 2.8 กรัมต่อลิตร

Bravo และคณะ (2000) ศึกษาผลของรูปแบบสำหรับใช้ในการเติมน้ำตาลกลูโคสระหว่างการหมัก ที่มีต่อมวลเซลล์สุดท้ายและความเข้มข้นของเอทานอล โดยใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* CP4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) กลูโคส 100 ยีสต์สกัด 10 KH_2PO_4 1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวน 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช เท่ากับ 6 การเติมอาหารเลี้ยงเชื้อมี 2 แบบคือ 1) อัตราการป้อนคงที่ โดยแปรผันอัตราการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ระดับ คือ 0.11 0.22 0.43 และ 0.55 ลิตรต่อชั่วโมง และ 2) อัตราการป้อนที่เพิ่มเป็น 2 เท่า โดยใช้อัตราการป้อนเริ่มต้นเท่ากับ 0.015 ลิตรต่อชั่วโมง และเพิ่มเป็น 2 เท่า ที่เวลา 0.5 1.0 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าผลผลิตของมวลเซลล์สูงสุดที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.018 กรัมมวลเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป และผลผลิตของเอทานอลสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.188 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป เมื่อใช้อัตราการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ 0.5 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ผลผลิตของมวลเซลล์และเอทานอลมีค่าลดลง (0.0102 กรัมต่อกรัม และ 0.085 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ) เมื่อเกิดการสะสมของน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร ในทางตรงกันข้าม พบว่าความเข้มข้นของมวลเซลล์และเอทานอลมีค่าสูงสุดเท่ากับ 5 และ 39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร และป้อนแบบอัตราการป้อนคงที่ และอัตราการป้อนที่เพิ่มเป็น 2 เท่า

Stenberg และคณะ (2000) ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นและเอนไซม์เซลลูโลสต่อการผลิตเอทานอลจากไม้เนื้ออ่อนซึ่งผ่านการแปรสภาพด้วยไอน้ำ โดยใช้กระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) พบว่าผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และการใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 68 เปอร์เซ็นต์ (ต่อกลูโคสและแมนโนส) ในไม้เนื้ออ่อน นอกจากนี้การทดลองเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการผลิตเอทานอลโดยแยกการไฮโดรไลซิสก่อนแล้ว จึงทำการหมักกับ วิธีการSSF ปรากฏว่า SSF ให้ผลผลิตเอทานอล 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าวิธีแยกไฮโดรไลซิสที่ให้ผลผลิตเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์

Sommer และคณะ (2003) ศึกษาผลของความเข้มข้นของไซโลส (5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้แบคทีเรีย thermophilic anaerobic Strains A3 พบว่า ไซโลสที่ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 4.4 กรัมต่อลิตร

Avci และ Donmez (2006) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาล (30, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของซูโครส (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยใช้แบคทีเรีย *Thermoanaerobacter* sp. (65-2) พบว่า กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 6.50 กรัมต่อลิตร และซูโครสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 4.88 กรัมต่อลิตร

Cazetta และคณะ (2007) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาล (150, 200 และ 250 กรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 55.8 กรัมต่อลิตร

3.3 แหล่งไนโตรเจน

แบคทีเรียต้องการแหล่งไนโตรเจนในการเจริญและผลิตเอทานอล เนื่องจากเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการสร้างโปรตีนของเซลล์ ยีสต์สกัดและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ แต่ในทางปฏิบัติจะใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4NO_3 สำหรับเปปโตเนและแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในสภาวะไร้อากาศ

Sreenath และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากไม้ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดร คลอริก โดยใช้ *Candida shehatae* FPL - Y - 049 พบว่า ให้ผลผลิตเอทานอลสูงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูง และการเติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งประกอบด้วย yeast nitrogen base (YNB) ยูเรีย และเปปโตเน ช่วยให้ปริมาณเอทานอลที่ได้สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

Rijssel และ Hansen (2002) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Clostridium thermosaccharolyticum* ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารที่มีเพคตินเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4NO_3 พบว่า NH_4NO_3 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 2.55 กรัมต่อลิตร

Daniel และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Pichia stipitis* ในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , ยีสต์สกัด พบว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ให้

ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น 57% และมีผลผลิตเอทานอลสูงสุด 113% เมื่อเปรียบเทียบกับ NH_4NO_3 และยีสต์สกัด

Hipolito และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Clostridium saccharoperbutyl-aceticum* N1-4 (ATCC 13564) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อสามารถใช้ NH_4NO_3 ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ โดยให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 3.50 กรัมต่อลิตร

O-thong และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยใช้ไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ พบว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ NH_4Cl จะให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ เปปโตน ให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.125 กรัมต่อลิตร

3.6 พีเอชเริ่มต้นของอาหาร

การเลือกพีเอชที่จะใช้ในการหมักซึ่งไม่มีระบบควบคุมพีเอช ระหว่างการหมักนั้นขึ้นอยู่กับ buffering capacity ของอาหารสำหรับหมัก ในอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำ พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมควรใช้ประมาณ 5.5 แต่ถ้าอาหารนั้นมีบัฟเฟอร์สูงพีเอชที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5-4.7 ดังนั้นค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ใช้จะต่างกันขึ้นอยู่กับสัณฐานและชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำมาทดลอง (Table 6)

3.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของจุลินทรีย์ และมีผลทางอ้อมต่อปริมาณเอทานอล และมีผลกับสารประกอบอโรแมติกต่างๆ อุณหภูมิส่วนมากที่ใช้ในการหมักจะอยู่ประมาณ 10 – 30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงมาก ๆ จะทำให้เอนไซม์ในจุลินทรีย์บางชนิดเกิดการ denature ความว่องไวของปฏิกิริยาลดลงในระหว่างที่อุณหภูมิ 55 – 85 องศาเซลเซียส (แบคทีเรียชอบร้อนเจริญได้ดี) การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง มีผลให้สามารถเก็บเกี่ยวเอทานอลได้ง่าย ลดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากความเข้มข้นของเอทานอล (Knudton *et al.*, 1999) ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียชอบร้อนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ทำมาทดลอง (Table 5)

Nigam (1999) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องจากของเสียโรงงานสับปะรดกระป๋อง โดยเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24553 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5 ในถัง Continuous stirred tank reactor (CSTR) มีการกวน 450 รอบต่อนาที ได้ผลผลิตของเอทานอล 0.466 กรัมต่อกรัมสับปะรด และผลผลิตทางทฤษฎี (theoretical yield) เท่ากับ 92.50%

Table 6. pH during cultivation of thermophilic bacteria for ethanol production.

Strains	Substrate	pH	Reference
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	glucose	7	Lacis and Lawford (1998)
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW200	sucrose	7.5	Avci and Donmez (2006)
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. (65-2)	molasses	7.5	Avci and Donmez (2006)
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. (65-2)	sucrose	7.5	Avci and Donmez (2006)
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> (70-1)	sucrose	7.5	Avci and Donmez (2006)
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> (70-1)	molasses	7.5	Avci and Donmez (2006)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> P262	lactose	5	Maddox <i>et al</i> (1995)
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	pectin	6	Rijssel and Hansen (2002)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	sucrose	6.5	O-thong <i>et al</i> (2008)
<i>Clostridium + Thermoanaerobacterium</i> thermophilic anaerobic Strains A3	glucose	6.8	Miyazaki <i>et al</i> (2008)
	xylose	7	Sommer <i>et al</i> (2003)

Kadar และคณะ (2004) เปรียบเทียบการใช้ยีสต์ขนมปัง คือ *S. cerevisiae* กับยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* Y01070 ผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักแบบการเปลี่ยนกลีโคซิลโนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลและการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล จากการใช้กระดาษลอนเก่า ๆ โคลนกระดาษ และผงเซลลูโลสบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกันในทุกสับสเตรทที่ทดสอบ โดย *S. cerevisiae* และ *K. marxianus* Y01070 ผลิตเอทานอลได้ 17.8 และ 16.6 จากผงเซลลูโลส 14.1 และ 14.2 จากกระดาษลอน และ 8.8 และ 9 กรัมต่อลิตรจากโคลนกระดาษ ตามลำดับ

Cazetta และคณะ (2007) ศึกษาผลของอุณหภูมิ (25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส) ต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 55.8 กรัมต่อลิตร

3.6 ผลของการแปรสภาพวัตถุดิบ

การแปรสภาพวัตถุดิบก่อนนำไปหมักเพื่อผลิตเอทานอล ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบได้ง่ายขึ้นและทำให้ผลผลิตเอทานอลสูงขึ้น

Nigam (2000) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวสาลี โดยใช้ *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 พบว่า เมื่อมีการเตรียมวัตถุดิบโดยการต้มและใช้ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ในการย่อยฟางข้าวสาลี ทำให้ *Pichia stipitis* ให้ผลผลิตเอทานอลและผลผลิตมวลเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2.4 และ 5.7 เท่า ตามลำดับ และผลผลิตของเอทานอลสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัม

Sreenath และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากไม้ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบว่า เชื้อยีสต์ที่ใช้ผลิตเอทานอลได้ดีคือ *Candida shehatae* FPL - Y - 049 ซึ่งให้ผลผลิตเอทานอลสูงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูง ความเข้มข้นของอะซิเตทเป็นตัวยับยั้งต่ำ และการเติมสารอาหารซึ่งประกอบด้วย yeast nitrogen base (YNB) ยูเรีย และเปปโติน ช่วยให้ปริมาณเอทานอลที่ได้สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่า การนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ ช่วยลดเวลาในการผลิตเอทานอลลงได้ประมาณ 20 ชั่วโมง และค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5 – 6

Sreenath และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากพีชอัลฟัลฟาโดยผ่านการ Saccharification และการหมักโดยใช้เชื้อ *Candida shehatae* FPL-702 พบว่าการไฮโดรไลซิสแยกกับการหมัก (separate hydrolysis and fermentation : SHF) และ การย่อยสลายน้ำตาลร่วมกับการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation : SSF) ที่มีการแปรสภาพ โดยใช้ น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส 2 นาที ได้ปริมาณเอทานอล 9.6 และ 18.0 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตเท่ากับ 0.45 และ 0.47 กรัมเอทานอลต่อกรัม น้ำตาล ตามลำดับ และเมื่อไม่มีการแปรสภาพ ได้ปริมาณเอทานอล 5 และ 6.4 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตเท่ากับ 0.25 และ 0.16 กรัมเอทานอลต่อกรัม น้ำตาล ตามลำดับ แสดงว่าพีชอัลฟัลฟาที่ไม่มีการแปรสภาพให้ผลผลิตเอทานอลต่ำ

3.7 สังกะสี

การเจริญและการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของแบคทีเรียที่ต้องการธาตุอาหารบางอย่างเพิ่มเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญได้ และผลิตเอทานอลได้ปริมาณที่สูงขึ้น เช่น การใช้สังกะสี เพื่อให้การทำงานของเอนไซม์ alcohol dehydrogenases สามารถทำงานได้ดีขึ้น (Avci and Donmez, 2006) โดยพบว่าการเติมสังกะสี 0.22 กรัมต่อลิตร ทำให้แบคทีเรีย *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (70-1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 5.8 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเติมความเข้มข้นของสังกะสีมากกว่านี้จะทำให้การผลิตเอทานอลลดลง เช่น ถ้าเติมสังกะสี 0.28 กรัมต่อลิตร จะทำให้การผลิตเอทานอลลดลงเหลือ 4.8 กรัมต่อลิตร

Avci และ Donmez (2006) ศึกษาผลของสังกะสีต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียชอบร้อน *Thermoanaerobacter* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Thermoanaerobacter ethanolicus* (JW200) , *Thermoanaerobacter* (65-2) และ *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (70-1) โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 แหล่ง คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเลี้ยงแบบกะ (batch) ผลที่ได้คือแบคทีเรียมีการเจริญและผลิตเอทานอลได้ดี ดังนั้น ผลของ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ต่อการผลิตเอทานอล โดยเติม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.17 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มี *T. ethanolicus* (JW200) ทำให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น 39% และ 23% สำหรับ *Thermoanaerobacter* strain 65-2. เมื่อเติม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22 กรัมต่อลิตร ทำให้อัตราส่วนของผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 80% โดยเชื้อ *T. thermohydrosulfuricus* (70-1) อัตราส่วนผลผลิตที่สูงขึ้นได้มาจากความเข้มข้นของซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร โดยผลิตจากแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา โดยที่ *T. ethanolicus* (JW200) ผลิตเอทานอล 5.04 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และ *Thermoanaerobacter* strain (65-2) ผลิตเอทานอล 6.50 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร *T. ethanolicus* (JW200) ให้ผลผลิตเอทานอล ($Y_{x/s}$) สูงขึ้นเป็น 0.47 ที่ความเข้มข้นของซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

3.8 เหล็ก

การเติมเหล็กลงในอาหารที่ใช้ในการหมักเอทานอล จะทำให้แบคทีเรียไปส่งเสริมการผลิตเอทานอลจากกรดอะซิติก โดยเหล็กจะเป็นตัวเร่งทำให้กลูโคสเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและไฮโดรเจน แล้วถ้าที่เอซต์กรดอะซิติกและไฮโดรเจน จะเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล (Balusu *et al.*, 2005)

3.9 Redox dyes

การเติม Redox dyes ลงในกระบวนการหมักเอทานอล ได้แก่ neutral red (NR), methyl viologen (MV), benzyl viologen (BV) และ methylene blue (MB) มีจุดประสงค์เพื่อต้องการเพิ่มความเข้มข้นและผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมัก โดย Redox dyes ทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอน หลังจากที่มีการแบ่งอัตราส่วนของ $NADH/NAD^+$ ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์โดยตรง (Hipolito *et al.*, 2008) เหตุผลที่เลือก Methylene blue (MB) เพราะว่า MB เป็น redox dye ที่มีค่า E_h เท่ากับ +71 mV (มีค่าบวกสูงสุด) ทำให้สามารถเป็นตัว oxidized state ได้ดีที่สุด จึงทำให้ค่า redox potential เท่ากัน โดย MB จะทำหน้าที่เป็น reducing agent ช่วยกระตุ้นการเจริญเจริญโดยเข้าร่วมใน

ปฏิกิริยา oxidation-reduction โดยจะใช้กับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้อากาศ ทำให้ NADH/NAD⁺ ที่เหลือจากการเจริญของเชื้อไปส่งเสริมให้มีการผลิตเอทานอลมากขึ้น

3.10 เกลือ

Lynd และคณะ (2001) ศึกษาการสะสมเกลือ (NaCl) ที่มีผลจากการเติมต่างสำหรับการควบคุมพีเอช ในการเจริญของ *T. thermosaccharolyticum* HG-8 ที่มีความเข้มข้นของไซโลส 50 และ 75 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่า ที่อัตราการเจือจางของอาหาร ($D_f = 0.0053$ 1/h) และพีเอชเท่ากับ 7 การเติม KOH มีผลทำให้ไซโลสมีคงตัวมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อกรดอะซิติกเท่ากับ 2:1 การหมักแบบต่อเนื่องของ *T. thermosaccharolyticum* HG-8 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 50 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้ 22.4 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเริ่มต้นให้อาหารที่สภาวะคงตัวที่มีไซโลส 75 กรัมต่อลิตร และค่า $D_f = 0.0053$ 1/h ทำให้ความเข้มข้นของไซโลสเพิ่มเป็น 87.5 กรัมต่อลิตร จึงเป็นข้อจำกัดของการเจริญของเชื้อที่ใช้ไซโลส

4. ลักษณะทั่วไปของ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2

T. thermosaccharolyticum PSU-2 เมื่อจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน เซลล์จะมีลักษณะเป็นรูปแท่งขนาดยาว 0.3-2.3 ไมครอน มักอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ มีสปอร์ ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นแบคทีเรียที่ชอบเจริญในสภาพไร้ออกซิเจนและที่อุณหภูมิสูงไม่ย่อยสลายโปรตีน แต่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตสามารถใช้สับสเตรทได้หลากหลาย ได้แก่ อะราบีโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส แมนโนส แรมโนส ไซโลส เซลโลไบโอส แลคโตส มอลโตส ซูโครส และราฟฟิโนส รวมทั้งสับสเตรทที่ย่อยสลายได้ยากอย่างเช่น ไซแลน แป้ง และ เซลลูโลส โดยสามารถใช้ซูโครสได้ดีที่สุด แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตไฮโดรเจนและเอทานอลได้ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.5 (O-thong *et al.*, 2008) และมี Suggested metabolic pathway ของการหมักคาร์โบไฮเดรตโดย *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ภายใต้การเติมแหล่งสารอินทรีย์ในโตรเจน ในอาหาร และในอาหารที่ขาดแหล่งสารอินทรีย์ในโตรเจน ดังแสดงใน Figure 2 จะเห็นว่าถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน เชื้อมีการผลิตเอทานอลได้ดี แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนเชื้อไปส่งเสริมให้มีการผลิตบิวทิเรตและไฮโดรเจนมากขึ้น

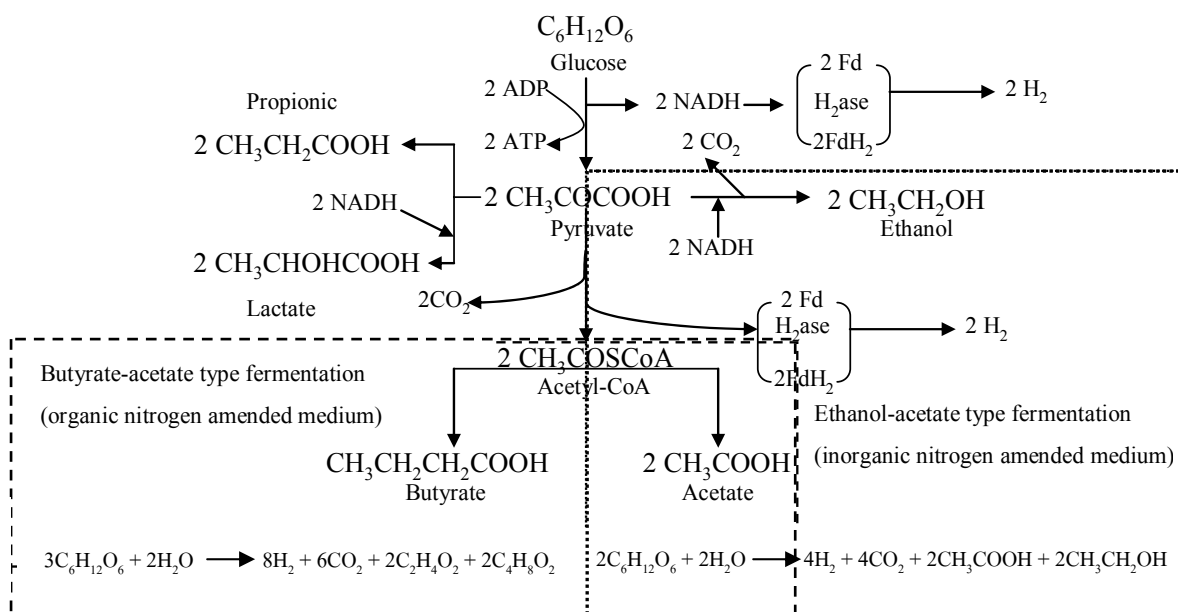


Figure 2. Suggested metabolic pathway deduced for carbohydrate fermentation by *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 under organic nitrogen added medium and organic nitrogen deficient medium.

ที่มา : O-thong และคณะ (2008)

5. วิธีพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) และการใช้ในการทดลองเพื่อผลิตเอทานอล

วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง หรือ RSM เป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์ และสถิติ มาใช้เพื่อช่วยในการหาผลตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด ได้มีการประยุกต์ใช้ RSM อย่างกว้างขวางในงานด้านอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในสถานการณ์ที่ตัวแปรต้น (input variable) หลาย ๆ ตัวมีผลต่อคุณสมบัติบางประการหรือปริมาณของผลผลิตที่ได้ ซึ่งจะเรียกคุณสมบัติหรือลักษณะบางประการของผลผลิตนี้ว่า ผลตอบสนอง (response) และตัวแปรต้นดังกล่าวมักจะเรียกว่า ตัวแปรอิสระ (independent variable) (Myers, 1995)

จุดมุ่งหมายของวิธีการ RSM คือ การประมาณพื้นผิวผลตอบสนอง ซึ่งตัวแบบที่ใช้แทนพื้นผิวผลตอบสนอง ได้แก่ ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่ง (First-Order Model) หรือถ้าใช้ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่งไม่เพียงพอที่จะประมาณพื้นผิวผลตอบสนอง ก็จะมีการใช้ตัวแบบอันดับสูงขึ้นไป เช่น ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง (Second-Order Model) เป็นต้น โดยมีขั้นตอนหลัก ๆ ในวิธี RSM (Khuri and Cornell, 1987) ดังนี้

1. การทดลองเพื่อหาตัวแบบที่เหมาะสมบนขอบเขตของระดับปัจจัยเริ่มต้น
2. การหาขอบเขตของระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด
3. การทดลองเพื่อหาตัวแบบที่เหมาะสมบนขอบเขตของระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด
4. การหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

ในขั้นตอนที่ 3 ของวิธี RSM คือ การทดลองเพื่อหาตัวแบบที่เหมาะสมบนขอบเขตของระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดนั้น มีแผนการทดลองที่นิยมใช้อยู่ 2 แผนการทดลอง คือ

1. แผนการทดลองแบบบ็อกซ์ – วิลสัน (Box – Wilson Experimental Design)
2. แผนการทดลองแบบบ็อกซ์ – เบ็นเคน (Box – Behnken Design)

ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะแผนการทดลองแบบ บ็อกซ์ – วิลสัน

แผนการทดลองแบบบ็อกซ์ – วิลสัน หรือมีอีกชื่อหนึ่งว่าแผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า CCD นำเสนอโดย Box และ Wilson เมื่อปี ค.ศ. 1951 ซึ่งเป็นแผนการทดลองที่ใช้ในการหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง (Second-Order Model) ซึ่งมีตัวแบบดังนี้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij} \chi_i \chi_j$$

โดย β_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย โดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

แผนการทดลองแบบ CCD นี้พัฒนามาจากแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2^k Factorial design) หรือแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลเชิงส่วน (Fractional Factorial design) เนื่องจากว่าแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับนั้นไม่สามารถใช้หาตัวแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสองได้ โดยที่แผนการทดลองที่สามารถจะใช้ได้จะต้องมีระดับของปัจจัยอย่างน้อย 3 ระดับ เช่น แผนการทดลองแบบ 3^k แฟคทอเรียล แต่เนื่องจากแผนการทดลองดังกล่าวจะต้องมีการซ้ำ (replicate) ที่แต่ละปัจจัยเพื่อใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของตัวแบบ (lack of fit test) ซึ่งในกรณีที่มีปัจจัยจำนวนมากจะทำให้จำนวนครั้งของการทดลองมีมาก ซึ่งจะทำให้สิ้นเปลืองทรัพยากรจำนวนมาก

แผนการทดลองแบบ 2^k แฟคทอเรียล จะมีระดับของปัจจัย 2 ระดับ ซึ่งโดยมากจะเรียกว่าระดับต่ำ (low, -) และระดับสูง (high, +) โดยที่แผนการทดลองแบบ CCD จะเพิ่มการทดลองที่จุดศูนย์กลางหรือที่ระดับ 0 และการทดลองตามแนวแกน (axis) ขึ้นมาเพื่อใช้ในการหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง โดยจะกำหนดค่าแต่ละระดับของปัจจัยด้วยตัวแปรรหัส (code variable)

Bandaru และคณะ (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแป้งสาเกโดยใช้วิธีการตรึงเอนไซม์ amyloglucosidase ร่วมกับเชื้อ *Zymomonas mobilis* โดยใช้แป้งสาเก 150 กรัม ต่อลิตรเป็นสับสเตรทด้วยวิธี RSM โดยกำหนดให้ตัวแปรอิสระ คือ อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส พีเอช 4-6 และเวลาในการผลิตเอทานอล 15-20 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) เพื่อศึกษาผลของตัวแปรอิสระต่อการผลิตเอทานอลจากแป้งสาเก พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ อุณหภูมิ 32.4 องศาเซลเซียส พีเอช 4.93 และเวลา 17.24 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 55.3 กรัมต่อลิตร

Balusu และคณะ (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสโดยใช้เชื้อ *Clostridium thermocellum* SS19 ด้วยวิธี RSM โดยวางแผนการทดลอง central composite design (CCD) ตัวแปรอิสระที่ศึกษา 5 ตัวแปรคือ ระยะเวลา 10-50 กรัมต่อลิตร น้ำแซ่ข้าวโพด 2-10 กรัมต่อลิตร cysteine HCl 0.1-0.5 กรัมต่อลิตร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01-0.05 กรัมต่อลิตร และ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5-2.5 กรัมต่อลิตร พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ ระยะเวลา 45 กรัมต่อลิตร น้ำแซ่ข้าวโพด 8.0 กรัมต่อลิตร cysteine HCl 0.25 กรัมต่อลิตร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัมต่อลิตร และ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.0 กรัมต่อลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 13.06 กรัมต่อลิตร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 2 แหล่ง คือ น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์
2. เพื่อคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้ในการผลิตเอทานอล
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยใช้แบคทีเรียชอบร็อน *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2 เป็นแบคทีเรียชอบร้อนที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (O-thong *et al.*, 2008) เก็บรักษาเชื้อโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร DSMZ No.211 (Avci and Donmez, 2006) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหาร DSMZ No.211 ที่มีแป้ง (starch) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อใหม่ทุกเดือน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ DSMZ No.211 ประกอบด้วย (ต่อลิตร): โซลอส 10 กรัม ยีสต์สกัด 1 กรัม NH_4Cl 1 กรัม KH_2PO_4 1.0 กรัม K_2HPO_4 0.75 กรัม $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 กรัม และ Trace elements solution 1 มิลลิลิตร สำหรับ Trace elements solution (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย H_3BO_3 0.05 ZnCl_2 0.05 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.038 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 $(\text{NH}_2)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 AlCl_3 0.05 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.092 EDTA 0.5 $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.066 (Avci and Donmez, 2006)

3. น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท เอเชียน น้ำมันปาล์ม จำกัด จังหวัดกระบี่ บรรจุในแกดลอนขนาด 10 ลิตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์ค่าซีไอดี, บีไอดี, น้ำมันและกรีส และสารฟีนอล

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Universal 32/32R บริษัท Universal 32R

3. ตู้อบ (hot air oven) รุ่น UML 500 บริษัท Sanyo
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) รุ่น SS325 บริษัท Tomy
5. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 500 บริษัท Schwabach
6. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น HK-7E บริษัท Tokyo TOA Electronic
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210-s บริษัท Sartorius
8. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D Company, Ltd
9. เครื่องผสม (vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc
10. เครื่องให้ความร้อน (hot plate) รุ่น HS 115 บริษัท Ika Labotechnic
11. เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น RO 5 บริษัท Ika Labotechnic
12. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
13. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100 series HPLC บริษัท Shimadzu
14. เครื่อง Gas Chromatography (GC) รุ่น HP 6890 series บริษัท Shimadzu
15. เครื่องกลั่นลำดับส่วน (Fractionation Distillation) รุ่น 2200 บริษัท FOSS TECATOR

วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดการเจริญและการหาปริมาณโปรตีนในเซลล์

วัดการเจริญของเชื้อโดยนำน้ำหมักมาวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) สำหรับโปรตีนในเซลล์ (total cell protein) หาได้โดยนำน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่งใน microtube นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้เซลล์แตกด้วย 0.1 N NaOH ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หลังจากนั้นล้างตะกอนด้วย 0.85% NaCl แล้วส่วนใส 0.5 มิลลิลิตร ของตัวอย่างที่เจือจาง ใส่งในหลอดทดลอง นำสารละลาย 2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH 50 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ใน 1% potassium sodium tartrate 1 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu's reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำวางทิ้งไว้ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm หลังจากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง (Lowry *et al.*, 1951)

2. วิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลที่เชื้อผลิตได้

นำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 50% H_3PO_4 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเข็นน้ำแข็ง 10 นาที นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดเอาเฉพาะส่วนใส 1 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (GC) รุ่น HP 6890 series บริษัท Shimadzu (ดัดแปลงจาก Miyazaki *et al.*, 2007)

3. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธี Anthrone (Dreywood, 1946 อ้างโดย O-thong *et al.*, 2008)

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส วิธีการมีดังนี้ นำสารละลายแอนโทรน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำตาลละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่เย็นทันที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง

4. วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

วิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ได้แก่ อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส และฟรุคโตส โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100 series HPLC บริษัท Shimadzu ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5. วิเคราะห์แร่ธาตุชนิดต่าง ๆ

วิเคราะห์หาแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ได้แก่ โพแทสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) และสังกะสี (Zn) โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry; ICP ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. การวิเคราะห์ค่าซีไอดี, บีไอดี, ของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอย, น้ำมันและกรีส และสารฟีนอล

วิเคราะห์หาค่าซีไอดี, บีไอดี, ของแข็งทั้งหมด, ของแข็งแขวนลอย, น้ำมันและกรีส และสารฟีนอลในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์โดยวิธีมาตรฐาน (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

7. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธีของ A.O.A.C (1990)

การวิเคราะห์ข้อ 1-7 แสดงรายละเอียดใน Figure-Appendix 1-12

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตเอทานอลจากเชื้อ

T. thermosaccharolyticum PSU-2

1.1 วิเคราะห์ลักษณะของน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

วิเคราะห์ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (บริษัท เอเชียขน้ำมันปาล์ม จำกัด) โดยนำน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ มาผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ โดยกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนชิ้นใหญ่ แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าพีเอช, อุณหภูมิ, ซีโอดี (chemical oxygen demand, COD), บีโอดี (biochemical oxygen demand, BOD), ของแข็งทั้งหมด (total solid, TS), ของแข็งแขวนลอย (suspended solid, SS), น้ำมันและกรีส (oil&grease, O&G) โดยใช้วิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเสีย (APAH, AWWA and WCPF, 1985) วิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมด (A.O.A.C., 1990) น้ำตาลทั้งหมด (Dreywood, 1946) ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไซโลส อะราบีโนส กลูโคส และฟรุคโตส วิเคราะห์ค่าแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี สารประกอบฟีนอลิก (ดัดแปลงจาก APAH, AWWA and WCPF, 1985)

1.2 การเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

ศึกษาการเจริญของ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ เติมห้วเชื้อ 10 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์) (เตรียมโดยการเขี่ยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DSMZ No.211 เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ลงในขวด serum ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ DSMZ No.211 พีเอช 6.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ โดยพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจน ($N_2:CO_2=80:20$ เป็นเวลา 2 นาที) หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางให้มีค่า OD_{660} เท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเติมห้วเชื้อ 10 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์) ลงในขวด serum ที่มีน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากดีแคนเตอร์ที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนชิ้นใหญ่ และผ่านการฆ่าเชื้อรวมทั้งปรับ พีเอชเป็น 6.5 ลงในขวด serum ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ โดยพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจน ($N_2:CO_2=80:20$ เป็นเวลา 2 นาที) หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างที่

เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด โปรตีนทั้งหมดและความเข้มข้นของเอทานอล พร้อมนำไปหาค่าซีโอดีที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกน้ำทิ้งจากกระบวนการของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่แบคทีเรียเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงสุด (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม)

2. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2

เลี้ยงแบคทีเรีย *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในแหล่งน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะไร้อากาศ โดยพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจน ($N_2:CO_2=80:20$ เป็นเวลา 2 นาที) หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โปรตีนทั้งหมด และเอทานอล รวมทั้งค่าซีโอดี และพีเอช (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม) คัดเลือกชุดการทดลองที่ผลิตเอทานอลได้สูงสุดของแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษา ดังนี้

2.1 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ของน้ำทิ้ง

เลี้ยงแบคทีเรียในแหล่งน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้โดยปรับระดับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งโดยการเจือจางในอัตราส่วน 1:0, 1:1 และ 1:2 คำนวณค่าซีโอดีของแต่ละความเจือจาง

2.2 ผลของ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1) โดยมีการเติม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร

2.3 ผลของ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1) โดยมีการเติม $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร

2.4 ผลของ redox dyes

เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1) โดยมีการเติม methylene blue ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิโมลาร์

2.5 ผลของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่นำมาศึกษาในครั้งนี้คือ ไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl และ NH_4NO_3 เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1) โดยปรับไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำทิ้งให้เป็น 0.2% ด้วยไนโตรเจนอนินทรีย์แต่ละชนิด

2.6 ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนที่คัดเลือกได้

เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทิ้งโดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 2.5) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.2, 0.6, และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้ Response surface methodology (RSM)

วิธีพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) สามารถใช้หาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดได้ วิธีพื้นผิวผลตอบสนองเป็นวิธีที่สร้างสมการของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ระดับของปัจจัย) กับตัวแปรตอบสนอง (response) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์การถดถอย (regression) เพื่อหาค่าความเหมาะสมของระดับในแต่ละปัจจัยที่สนใจ (Montgomery, 1999; Montgomery, 2001)

ในการออกแบบพื้นผิวผลตอบสนอง การทดลองนี้เลือกใช้การออกแบบส่วนประสมกลางแบบหมุนได้ (central composite rotatable design, CCRD) ซึ่งมีพื้นฐานมาจาก 2^k แฟกตอเรียล ($\text{factorial } 2^k$) โดยเพิ่มการทดลองในแนวแกนและที่จุดศูนย์กลาง สำหรับการทดลองนี้มีตัวแปรต้น 5 ตัวแปร โดยใช้ตัวแปรจากการผลการทดลองในข้อ 2 คือ ความเข้มข้นของซีโอดี 20-80 กรัมต่อลิตร, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0-0.50 กรัมต่อลิตร (ในรูป Zn), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0-0.50 กรัมต่อลิตร (ในรูป Fe), Methylene blue 0-2.00 มิลลิโมลาร์ และ NH_4NO_3 0-1.00 เปอร์เซ็นต์ (ในรูป N) ซึ่งช่วงของความเข้มข้นที่เลือกครอบคลุมจากการทดลองในข้อ 2.1-2.6 โดยแปรระดับของตัวแปรอิสระ 5 ระดับ ประกอบด้วย -1.0, -0.5, 0, 0.5 และ 1.0 ดังแสดงใน Table 7 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเลือกสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด ดังนั้นตัวแปรตามในการทดลอง คือ ความเข้มข้นของเอทานอล ใช้การทดลองทั้งสิ้น 32 การทดลอง โดยศึกษาค่าต่ำสุดและสูงสุดของแต่ละปัจจัย (Table 8) ได้แก่ ความเข้มข้นของซีโอดี (20 และ 80 กรัมต่อลิตร), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0 และ 0.50 กรัมต่อลิตร) (ในรูป Zn), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0 และ 0.50 กรัมต่อลิตร) (ในรูป Fe), Methylene blue (0 และ 2.00 มิลลิโมลาร์) และ NH_4NO_3 (0 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์) (ในรูป N)

เลี้ยงเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในแหล่งน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้ที่มีความเข้มข้นของซีโอดี, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Methylene blue และ NH_4NO_3 แสดงใน Table 8 โดยเลี้ยงในขวด serum ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ใช้ น้ำทิ้ง 90 มิลลิลิตร เติมเชื้อ 10 มิลลิลิตร เลี้ยงภายใต้สภาวะไร้อากาศโดยพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจน ($\text{N}_2:\text{CO}_2=80:20$ เป็นเวลา 2 นาที) หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาเอทานอล (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม)

Table 7. Independent variables and their factor levels.

Independent variable	symbol	code factor levels				
		- 1.0	- 0.5	0	0.5	1.0
COD concentration (g/l)	X ₁	20.00	35.00	50.00	65.00	80.00
Zn as ZnSO ₄ .7H ₂ O (g/l)	X ₂	0.00	0.12	0.25	0.38	0.50
Fe as FeSO ₄ .7H ₂ O (g/l)	X ₃	0.00	0.12	0.25	0.38	0.50
Methylene blue (mM)	X ₄	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00
N as NH ₄ NO ₃ (%)	X ₅	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00

Table 8. Central composite experimental design matrix defining substrate concentration (X₁), Zn as ZnSO₄.7H₂O (X₂), Fe as FeSO₄.7H₂O (X₃), Redox (X₄) and N as NH₄NO₃ (X₅) on ethanol production from *T. thermosaccharolyticum* PSU-2.

Trials	Parameters				
	X ₁ (g/l)	X ₂ (g/l)	X ₃ (g/l)	X ₄ (mM)	X ₅ (%)
1	65.00 (0.5)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
2	80.00 (1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	1.00 (1)
3	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
4	50.00 (0)	0.25 (0)	0.12 (-0.5)	1.00 (0)	0.50 (0)
5	80.00 (1)	0.00 (-1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	1.00 (1)
6	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.75 (0.5)
7	20.00 (-1)	0.50 (1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	1.00 (1)
8	50.00 (0)	0.12 (-0.5)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
9	20.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	1.00 (1)
10	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
11	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
12	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	0.50 (-0.5)	0.50 (0)
13	35.00 (-0.5)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
14	50.00 (0)	0.25 (0)	0.38 (0.5)	1.00 (0)	0.50 (0)
15	20.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	2.00 (1)	0.00 (-1)

Table 8. Central composite experimental design matrix defining substrate concentration (X_1), Zn as $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_2), Fe as $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_3), Redox (X_4) and N as NH_4NO_3 (X_5) on ethanol production from *T. thermosaccharolyticum* PSU-2. (Continued)

Trials	Parameters				
	X_1 (g/l)	X_2 (g/l)	X_3 (g/l)	X_4 (mM)	X_5 (%)
16	80.00 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)
17	80.00 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	2.00 (1)	1.00 (1)
18	20.00 (-1)	0.50 (1)	0.50 (1)	2.00 (1)	0.00 (-1)
19	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.50 (0.5)	0.50 (0)
20	20.00 (-1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)
21	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
22	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
23	20.00 (-1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	2.00 (1)	1.00 (1)
24	80.00 (1)	0.00 (-1)	0.50 (1)	2.00 (1)	0.00 (-1)
25	80.00 (1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	2.00 (1)	0.00 (-1)
26	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
27	80.00 (1)	0.50 (1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)
28	20.00 (-1)	0.00 (-1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)
29	20.00 (-1)	0.00 (-1)	0.50 (1)	2.00 (1)	1.00 (1)
30	80.00 (1)	0.50 (1)	0.50 (1)	2.00 (1)	1.00 (1)
31	50.00 (0)	0.38 (0.5)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)
32	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.25 (-0.5)

เมื่อทำการทดลองตามที่ออกแบบแล้ว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ โดยใช้ Design Expert Version 5.0 version (State Ease, Minneapolis, MN) เนื่องจากวิธีการพื้นผิวตอบสนองให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับผลตอบสนอง ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถแสดงในแบบจำลองพหุนามกำลังสองที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ แสดงดังสมการ (Myers, 1995)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij} \chi_i \chi_j$$

โดย B_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยโดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

4. ผลของการเติมกากน้ำตาลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการผลิตเอทานอล

เลี้ยงแบคทีเรีย *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในกากน้ำตาลและกากน้ำตาลผสมกับแหล่งน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้ที่มีสถานะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย (ผลการทดลองจากข้อ 2) และกากน้ำตาลผสมน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้ที่มีสถานะที่เหมาะสมของ RSM (ผลการทดลองจากข้อ 3) เพื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้ที่มีสถานะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยและน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้ที่มีสถานะที่เหมาะสมของ RSM ภายใต้สภาวะไร้อากาศ โดยพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจน ($N_2:CO_2=80:20$) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และเอทานอล รวมทั้งค่า COD และพีเอช (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม) ศึกษาชุดการทดลองที่ผลิตเอทานอลได้สูงสุด ปัจจัยที่ทำการศึกษา มีดังนี้

4.1 ผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลในอาหารสังเคราะห์

เลี้ยงแบคทีเรีย *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ DSMZ No.211 โดยเติมกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 0, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร แทนไซโลส 10 กรัมต่อลิตร

4.2 ผลของการเติมกากน้ำตาลในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีสถานะที่เหมาะสมจากข้อ 2

เลี้ยงแบคทีเรีย *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร โดยเติม Zn ในรูป $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร Fe ในรูป $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร methylene blue 0.05 มิลลิโมลาร์ N ในรูป NH_4NO_3 0.6 เปอร์เซ็นต์ และกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 4.1)

4.3 ผลของการเติมกากน้ำตาลในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีสถานะที่เหมาะสมจากข้อ 3

เลี้ยงแบคทีเรีย *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 65 กรัมต่อลิตร โดยเติม Zn ในรูป $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัมต่อลิตร Fe ในรูป $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัมต่อลิตร methylene blue 1.0 มิลลิโมลาร์ N ในรูป NH_4NO_3 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 4.1)

5. การแยกเอทานอลออกจากร้าน้ำหมักและศึกษาสมบัติ

ทำการเก็บเกี่ยวเอทานอลโดยใช้กระบวนการกลั่น โดยนำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักมากลั่นด้วยเครื่องกลั่นแบบลำดับส่วนโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทำให้เอทานอลที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยกลั่นที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส ในระหว่างการกลั่นสุ่มตัวอย่างผลผลิตที่กลั่นได้จากเครื่องกลั่นที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 นาที เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล พยายามทำการกลั่นหลายครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด (เป้าหมาย 95%) (तालिका युवमपितक्य, 2548) และนำเอทานอลที่กลั่นได้ ณ เวลาที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดมาศึกษาสมบัติของเอทานอลที่ได้เทียบกับคุณสมบัติพื้นฐานของเอทานอล โดยหาค่าจุดเดือด ความหนาแน่น ความถ่วงจำเพาะ และความหนืด และวิเคราะห์หาชนิดของแอลกอฮอล์ที่ได้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และเพนทานอล

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตเอทานอลจากเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2

1.1 ลักษณะของน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีความแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มาของน้ำทิ้ง ผลการวิเคราะห์น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์แสดงใน Table 9 จะเห็นว่า มีความเป็นกรดสูง (พีเอช 5.1 และ 4.3 ตามลำดับ) เนื่องจากน้ำมันบางส่วนแตกตัวเป็นกรดไขมัน ค่า บีโอดีและซีโอดีมีค่าใกล้เคียงกัน (77,000 และ 80,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ H- kittikul และคณะ (1996) และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ และคณะ (2533) ที่มีค่าบีโอดีประมาณครึ่งหนึ่งของค่าซีโอดี ปริมาณของแข็งแขวนลอยมีค่าเป็น 40 และ 42 เปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีปริมาณไนโตรเจน (700 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่ำกว่าในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (1,101 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยค่าไนโตรเจนในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์จะใกล้เคียงกับรายงานของปรีชา มุณีศรี (2539) และหัตถินดา บินมะแอ (2548) คือ 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่มีปริมาณน้ำตาลสูงกว่า (มีค่า 8,550 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6,860 มิลลิกรัมต่อลิตร) ชนิดของน้ำตาลจากแหล่งน้ำทิ้งทั้งสองแหล่งแตกต่างกัน คือ น้ำตาลไซโลส (600 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบเฉพาะในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ ส่วนน้ำตาลฟรุคโตส (2,580 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบเฉพาะในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ สำหรับน้ำตาลอะราบิโนส (3,500 และ 7,910 มิลลิกรัมต่อลิตร) และน้ำตาลกลูโคส (30 และ 780 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบในน้ำทิ้งทั้งสองแหล่ง สำหรับองค์ประกอบของแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ พบว่า มีโพแทสเซียม (K) สูงสุด (1,624 และ 1,779 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ แมกนีเซียม (Mg) (673 และ 798 มิลลิกรัมต่อลิตร), ฟอสฟอรัส (P) (171 และ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร), แคลเซียม (Ca) (140 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร), เหล็ก (Fe) (82 และ 135 มิลลิกรัมต่อลิตร), โซเดียม (Na) (22 และ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสังกะสี (Zn) (17.5 และ 1.60 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ สำหรับปริมาณฟีนอล พบว่า น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีปริมาณฟีนอล (1.85 มิลลิกรัมต่อลิตร) น้อยกว่าน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (3.54 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยค่าฟีนอลในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์จะใกล้เคียงกับการรายงานของโสภารวรรณ รัตนพันธ์ (2547) คือ 3.60 มิลลิกรัมต่อลิตร จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าลักษณะน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของ

โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการสูมตัวอย่างแต่ละครั้งจะมีความแตกต่างกันในเรื่องคุณภาพของ
 วัตถุดิบ กระบวนการผลิต ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง เป็นต้น

Table 9. Characteristics and chemical composition of sterilizer condensate and decanter effluent
 of a palm oil mill after filtration.

Parameters ^a	Sterilizer condensate	Decanter effluent
Color	Dark brown	brown
pH	5.1	4.3
BOD	77,000	93,000
COD	80,000	95,000
Total solids (TS)	47,696	64,600
Suspended solids (SS)	19,066	27,332
Oil&Grease	1,850	1,090
Total nitrogen	700	1,101
Total protein	4,375	6,881
Total phenol	1.85	3.54
Total sugar	8,550	6,860
Xylose	600	0
Arabinose	7,910	3,500
Glucose	30	780
Fructose	0	2,580
Mineral	2731.70	3091.00
P	171.85	220.70
K	1624.25	1779.00
Na	22.00	35.50
Ca	140.25	120.35
Mg	673.00	798.75
Fe	82.80	135.10
Zn	17.55	1.60

^aExcept for color and pH all other parameters are in mg/L

1.2 การเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งที่เหมาะสมที่แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดและผลิตเอทานอลได้สูงสุด (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีน้ำทิ้งที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม) พบว่า เชื้อสามารถใช้น้ำทิ้งจากทั้งสองแหล่งเป็นสารอาหารสำหรับการเจริญโดยเชื้อมีการเจริญได้ดีที่สุดให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.55 กรัมต่อลิตร ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (Figure 3) และผลิตเอทานอลได้สูงสุด (0.58 กรัมต่อลิตร) ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (Figure 4) และนอกจากนี้ยังมีค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการทดลอง (Table 10) ได้แก่ ผลผลิตเอทานอล (Yp/s) เท่ากับ 0.17 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 20 ชั่วโมง เท่ากับ 0.024 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สามารถลดค่าซีไอดีได้ 32.5 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ O-thong และ คณะ (2008) ที่พบว่าแบคทีเรียชอบร้อน *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.5 กรัมต่อลิตรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ Hipolito และคณะ (2008) ที่พบว่าเชื้อ *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 2.33 กรัมต่อลิตร ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ส่วนในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์เชื้อเจริญและผลิตเอทานอลได้น้อยกว่า (ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.45 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอทานอล 0.35 กรัมต่อลิตร และลดค่าซีไอดีได้ 28.0 เปอร์เซ็นต์) จะเห็นว่า *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 เจริญในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อได้ดีกว่าในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ อาจเนื่องจากน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (8.55 กรัมต่อลิตร) สูงกว่าในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (6.86 กรัมต่อลิตร) และมีปริมาณฟีนอลเพียงประมาณครึ่งหนึ่งจึงมีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื่อน้อยกว่า ดังนั้นจึงเลือกน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลต่อไป

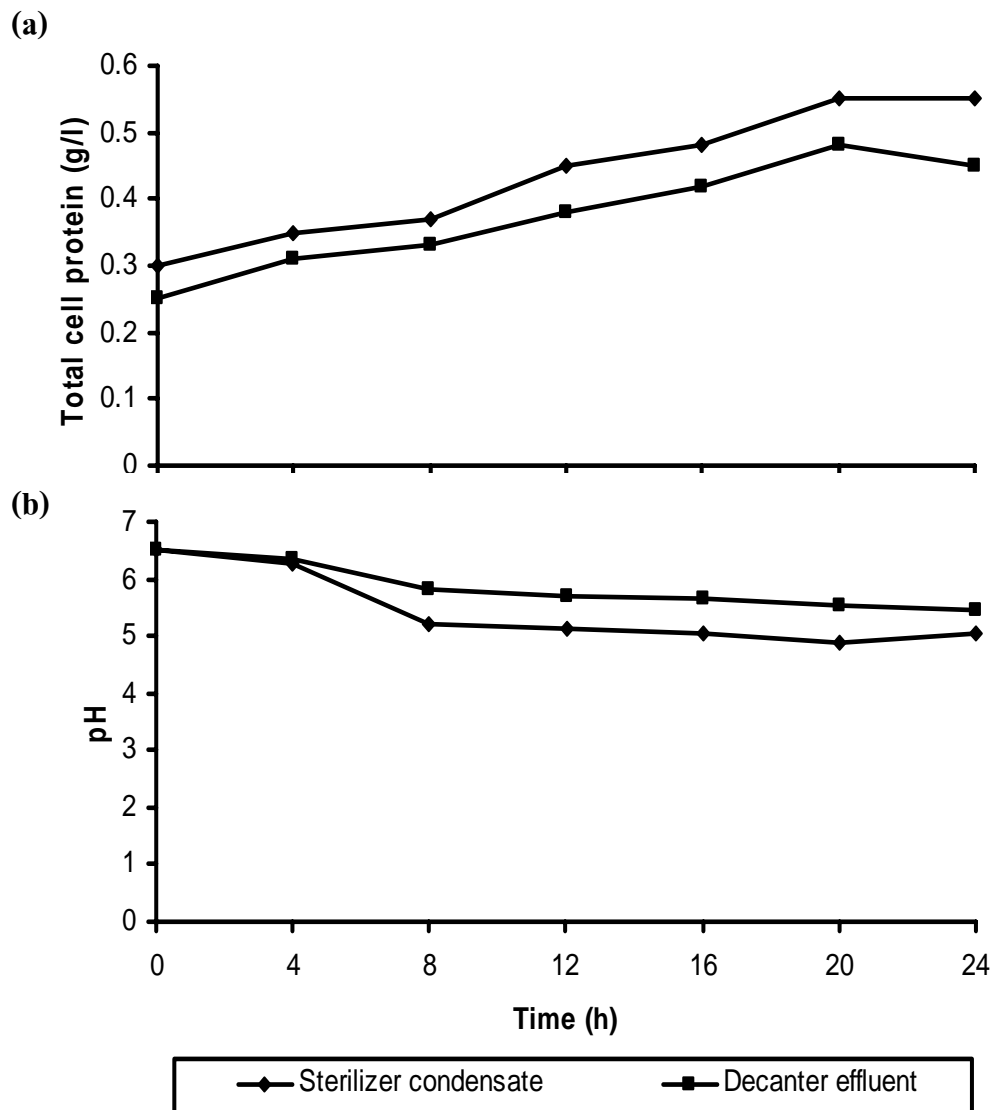


Figure 3. Effect of sources of POME on growth of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

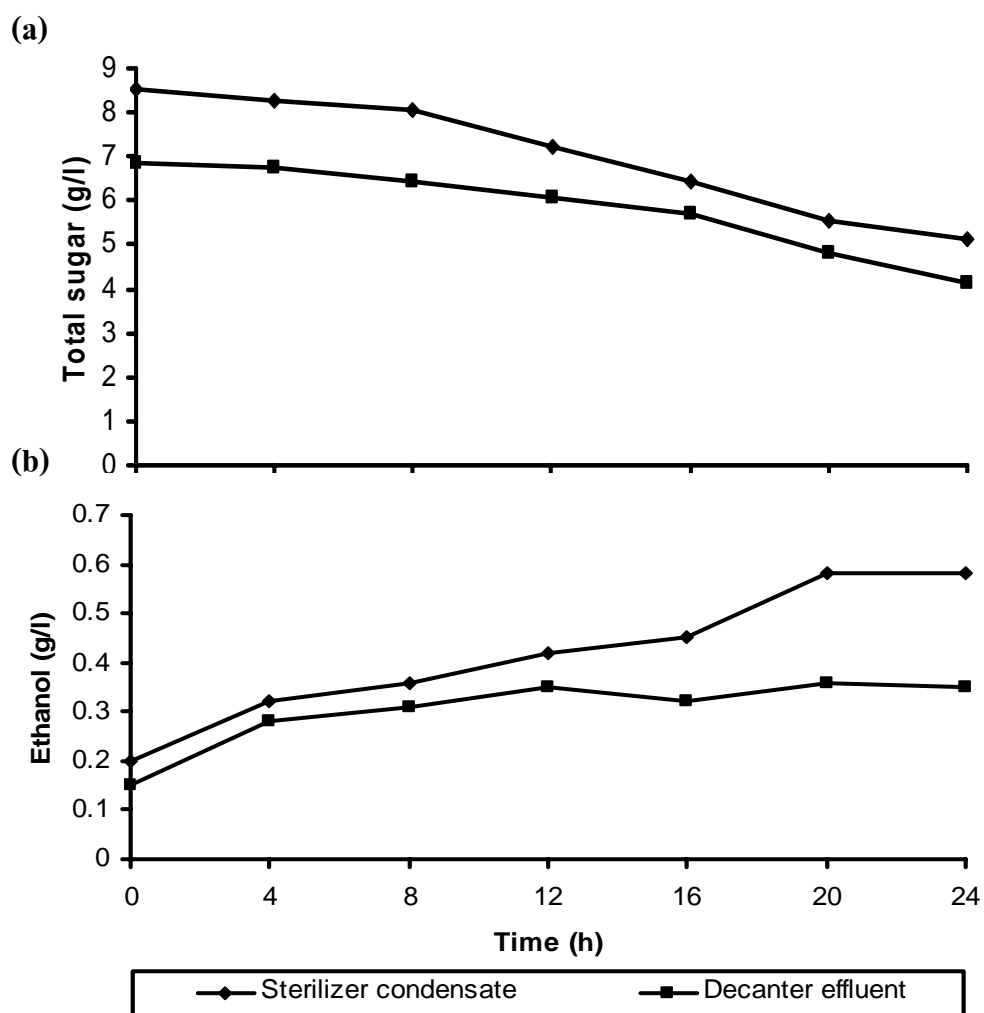


Figure 4. Effect of of sources of POME on utilization of sugar of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

Table 10. Effect of sources of POME on growth and ethanol production of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 cultivated at 60 °C for 24 h.

Parameters	Sterilizer condensate	Decanter effluent
Initial pH	6.50	6.50
Final pH	5.03	5.45
Initial total sugar (g/l)	8.55	6.86
Residual total sugar (g/l)	5.14	4.15
Total cell protein (g/l)	0.55	0.45
COD removal (%)	32.5	28.0
Ethanol (g/l)	0.58	0.35
$Y_{p/s}$ (g ethanol/g total sugar)	0.17	0.13
Ethanol productivity (g/l/h)	0.024	0.015

2. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2

2.1 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ

จากการเลี้ยง *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีการเจือจางในอัตราส่วน 1:0, 1:1 และ 1:2 ได้ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ระดับต่าง ๆ โดยมีค่าซีโอดีเท่ากับ 80000, 45000 และ 32500 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.5 (Figure 5) จะเห็นว่าน้ำทิ้งที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 80,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อเจริญสูงสุดได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้งผลิตเอทานอลสูงสุด (0.61 กรัมต่อลิตร) (Figure 6b) สำหรับการใช้น้ำตาล (8.55 กรัมต่อลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่า เชื้อสามารถใช้น้ำตาลทั้งหมดได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์ (Figure 6a) โดยมีน้ำตาลเหลืออยู่เท่ากับ 4.65 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเกิดจากการลดลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยงเชื้อ (Kannan and Mutharasan, 1985) จึงทำให้เชื้อมีการเจริญน้อยลง เพราะถ้าค่าพีเอชต่ำกว่า 5 จะเป็นพิษต่อเชื้อที่ทำให้เชื้อมีการเจริญลดลง (O-thong *et al.*, 2008) และนอกจากนี้ยังมีค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการทดลอง (Table 11) ได้แก่ ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.16 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 20 ชั่วโมง เท่ากับ 0.025 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าซีโอดีลดลง 23.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 45,000 และ 32,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อมีการเจริญและผลิตเอทานอลได้ต่ำกว่า รวมทั้งลดค่าซีโอดีได้ต่ำกว่าด้วยโดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงสุด 0.32 และ

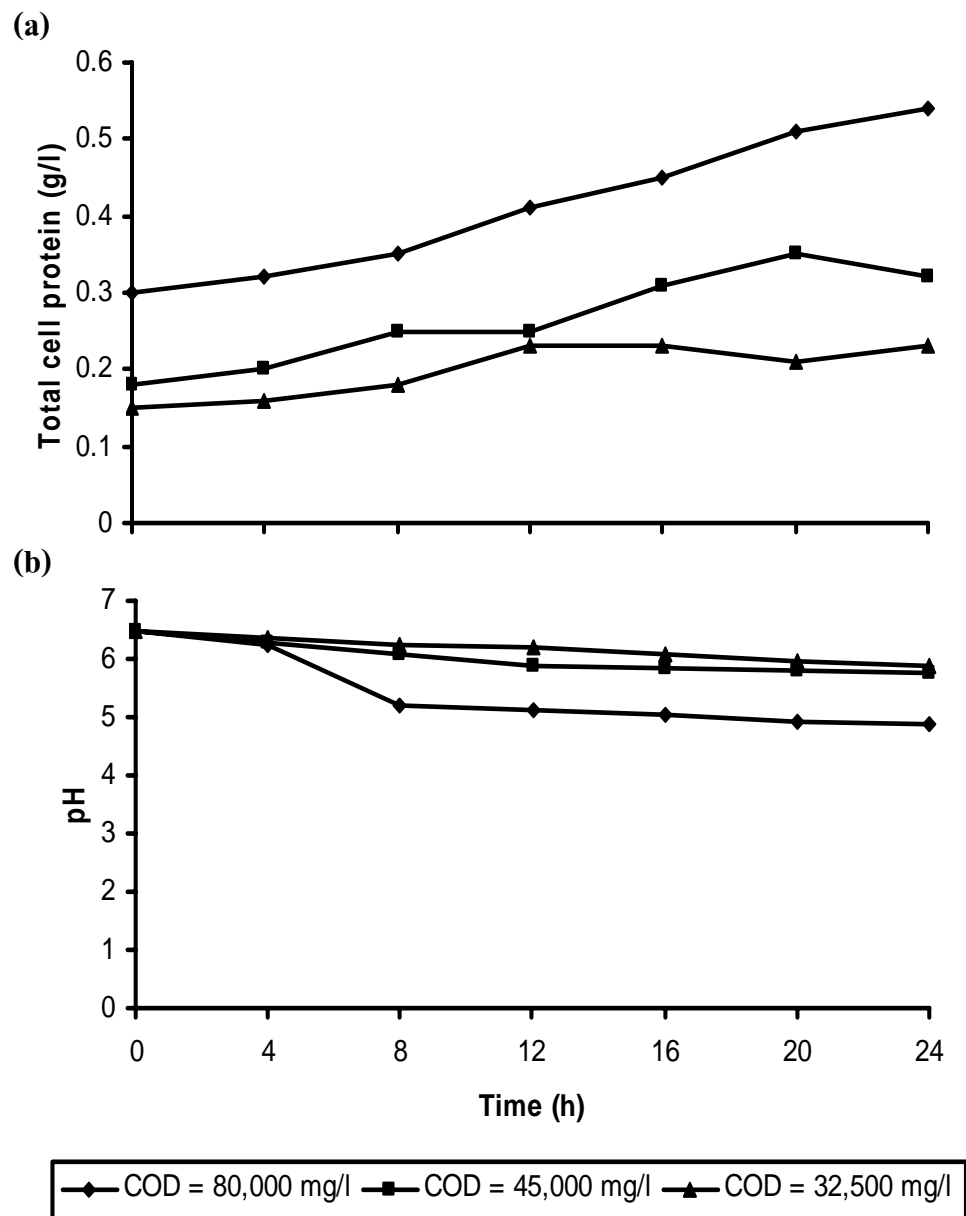


Figure 5. Effect of COD concentration of sterilizer condensate on growth of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

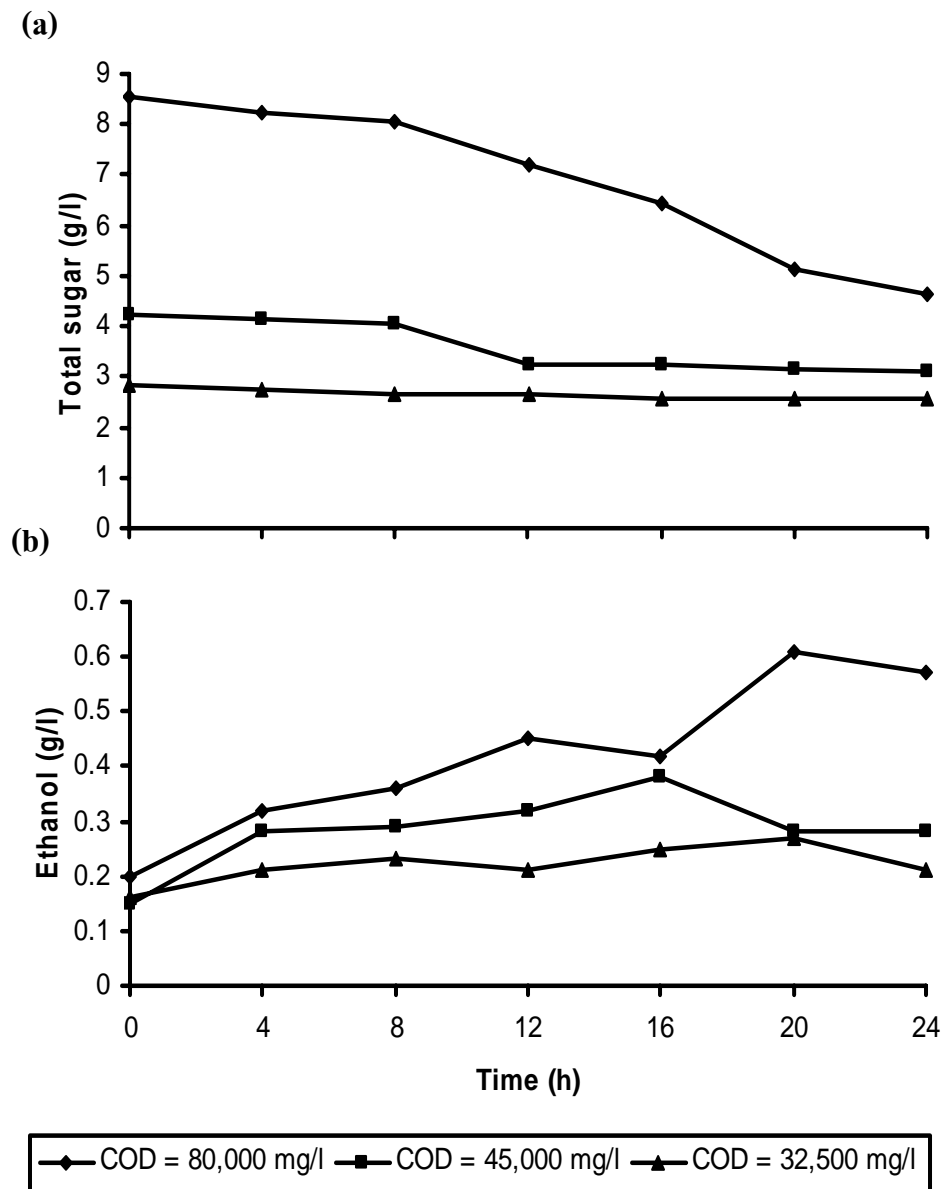


Figure 6. Effect of COD concentration of sterilizer condensate on utilization of sugar of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

0.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าซีโอดีลดลง 16.7 และ 11.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Mustar และคณะ (2001) ที่พบว่า ยีสต์ *C. utilis* สามารถเจริญในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ต้องมีการเจือจางได้ ในการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่า *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 เจริญและผลิตเอทานอลในน้ำทิ้งที่มีสารอินทรีย์สูงโดยไม่ต้องเจือจาง (ซีโอดี เท่ากับ 80,000 กรัมต่อลิตร) และมีปริมาณฟีนอล 0.185 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าปริมาณของโพลีฟีนอล (1-1.24 เปอร์เซ็นต์) ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก (Tsonis and Grigoropoulos, 1993) โดยทั่วไป สารประกอบฟีนอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลาย (Hamdi, 1991) ซึ่งมีผลตรงกันข้ามกับการทดลองนี้ ดังนั้น จึงสามารถใช้ น้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์มในการผลิตเอทานอลจาก *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 โดยตรง

Table 11. Effect of COD concentration in sterilizer condensate on growth, ethanol production and COD removal of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 at 60 °C for 24 h.

Parameters	COD concentrations (mg/l)		
	80,000	45,000	32,500
Initial pH	6.50	6.50	6.50
Final pH	4.87	5.75	5.90
Initial total sugar (g/l)	8.55	4.25	2.85
Residual total sugar (g/l)	4.65	3.12	1.75
Total cell protein (g/l)	0.54	0.32	0.23
COD removal (%)	33.6	16.7	11.4
Ethanol (g/l)	0.61	0.28	0.21
$Y_{p/s}$ (g ethanol/g total sugar)	0.16	0.24	0.19
Ethanol productivity (g/l/h)	0.025	0.012	0.0008

2.2 ผลของ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

การเจริญและการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของแบคทีเรียที่ต้องการธาตุอาหารบางอย่างเพิ่มเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญได้ และผลิตเอทานอลได้ปริมาณที่สูงขึ้น เช่น การใช้สังกะสี เพื่อให้การทำงานของเอนไซม์ alcohol dehydrogenases สามารถทำงานได้ดีขึ้น (Avci and Donmez, 2006) มีรายงานการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ alcohol dehydrogenases (ADHs) จาก thermophiles และ hyperthermophiles ซึ่งเอนไซม์นี้จะมีกิจกรรมที่สูงและมีความคงตัวในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง

Radianingtyas และ Wright (2003) ศึกษาคลุ่มของ ADHs ของจุลินทรีย์ชอบร้อน และ NAD(P)-dependent group ซึ่งพวก thermophilic ADHs จะจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนซึ่งประกอบด้วย zinc-dependent ADHs, สายสั้นของ ADHs และองค์ประกอบของเหล็กต่อการทำงานของ ADHs นอกจากนี้ Bryant และคณะ (1988) ศึกษาแต่ละหน่วยของ primary และ secondary alcohol dehydrogenases ของเชื้อ *T. ethanolicus* มี Zn ประมาณ 4 อะตอม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาถึงผลของสังกะสี ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโดยมีการเติม Zn as $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร (เริ่มต้นในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมี Zn เท่ากับ 0.0175 กรัมต่อลิตร) โดยปรับพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6.5 (ใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีการเติม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็นชุดควบคุม) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Figure 7) พบว่า การเติม Zn ในรูป $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตรในน้ำทิ้งมีผลต่อการเจริญ โดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.54, 0.48, 0.65, 0.32, 0.41 และ 0.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.57, 0.84, 1.25, 0.42, 0.18 และ 0.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณที่เหมาะสมของ Zn ในรูป $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ คือ 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อเจริญได้ดีที่สุดโดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงสุด 0.65 กรัมต่อลิตร และผลิตเอทานอลสูงสุด 1.25 กรัมต่อลิตร (Figure 8) นอกจากนี้ ผลผลิตเอทานอล (Yp/s) เท่ากับ 0.23 กรัมเอทานอลต่อกรัม น้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 20 ชั่วโมง เท่ากับ 0.035 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าซีไอลดลง 35.2 เปอร์เซ็นต์ (Table 12) ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Zn ในรูป $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ จากการทดลองนี้ (0.2 กรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Avci และ Donmez (2006) ที่พบว่าการเติมสังกะสี 0.22 กรัมต่อลิตร ทำให้แบคทีเรีย *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (70-1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 5.8 กรัมต่อลิตร

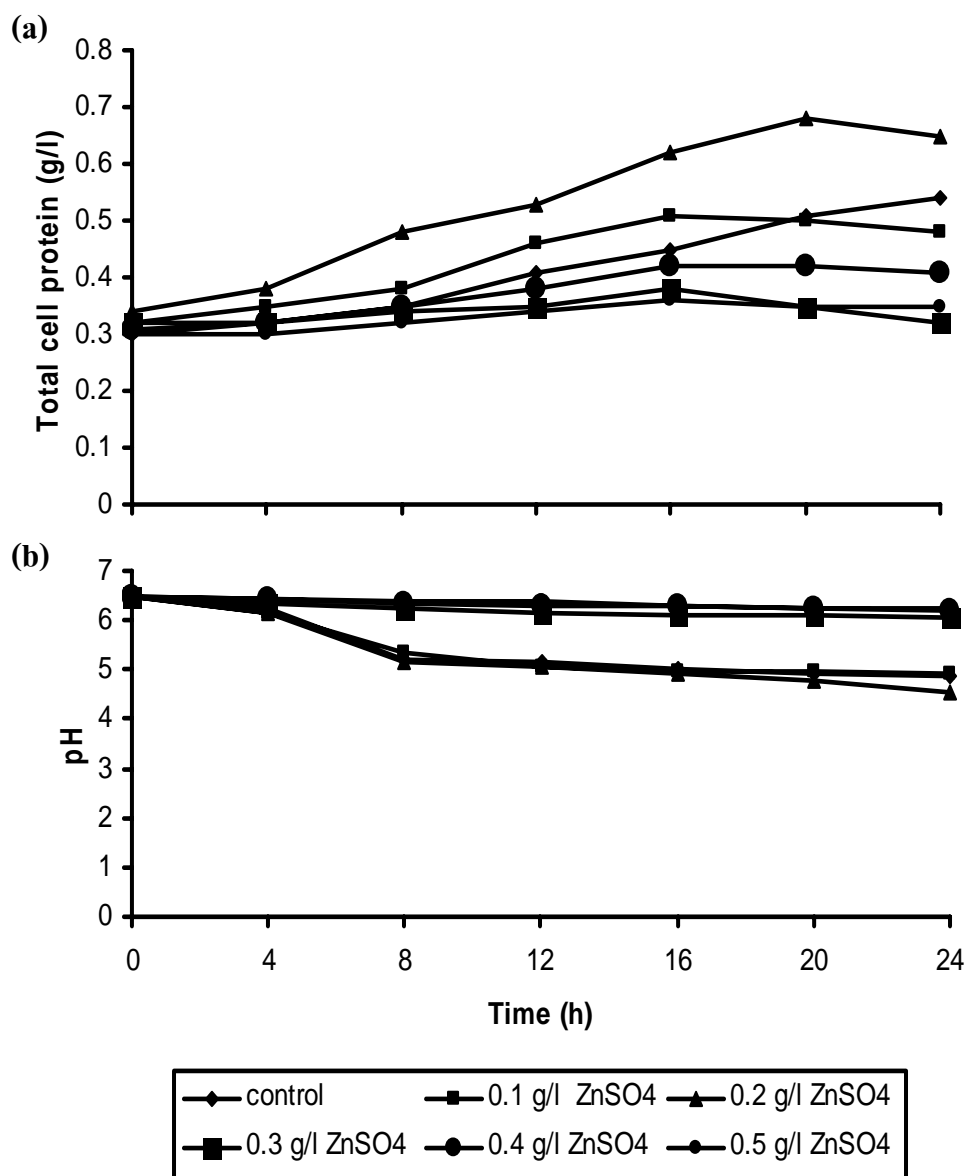


Figure 7. Effect of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration in sterilizer condensate on growth of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60°C for 24 h.

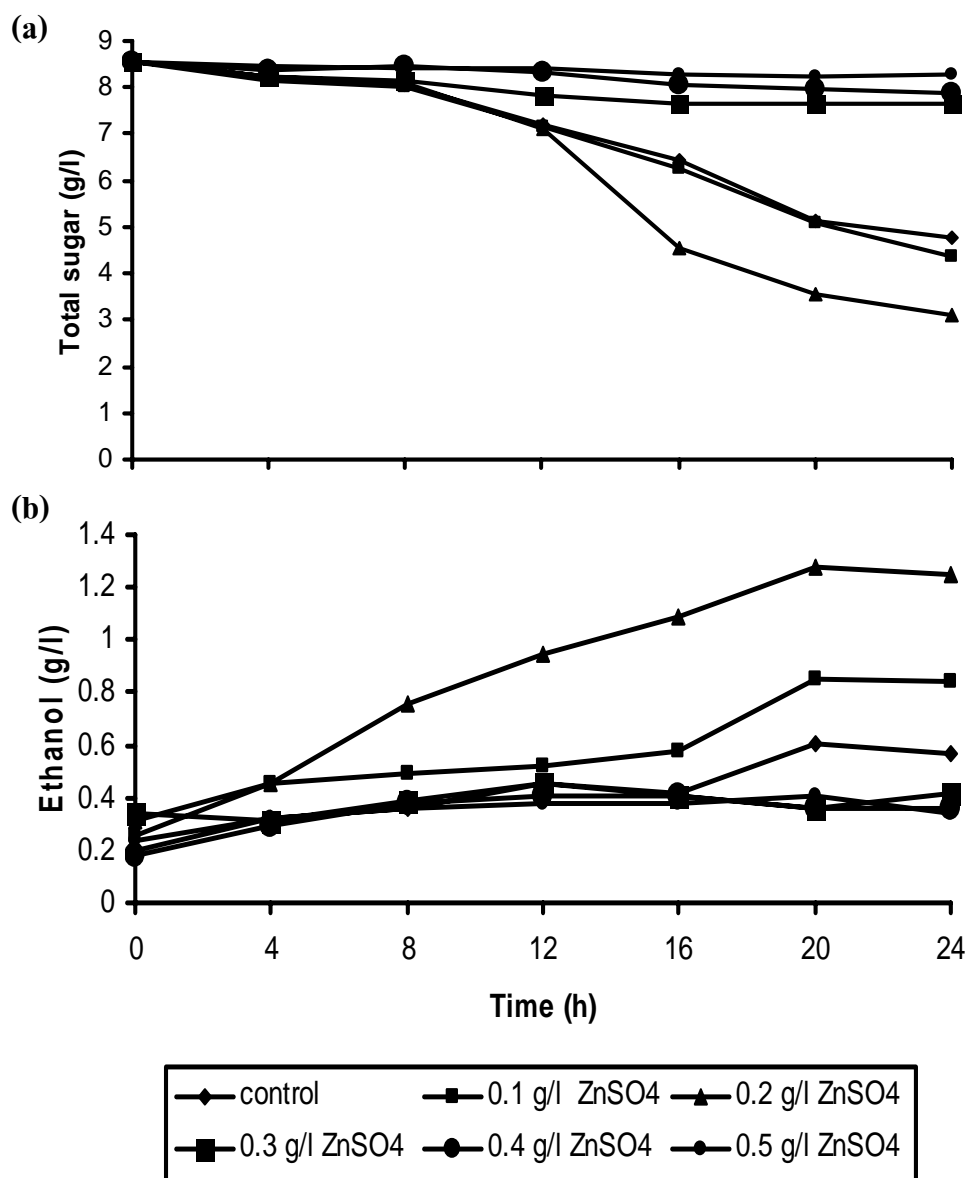


Figure 8. Effect of ZnSO₄·7H₂O concentration in sterilizer condensate on utilization of sugar of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

Table 12. Effect of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration on ethanol production and COD removal of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 in sterilizer condensate at 60°C for 24 h.

Parameters	Zn as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ final concentrations ^a (g/l)					
	control	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Initial pH	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Final pH	4.86	4.90	4.55	6.07	6.18	6.25
Initial total sugar (g/l)	8.55	8.55	8.55	8.55	8.55	8.55
Residual total sugar (g/l)	4.74	4.35	3.11	5.65	6.84	7.12
Total cell protein (g/l)	0.54	0.48	0.65	0.32	0.41	0.35
COD removal (%)	25.4	29.0	35.2	23.5	18.6	1.75
Ethanol (g/l)	0.57	0.84	1.25	0.42	0.18	0.15
$Y_{p/s}$ (g ethanol/g total sugar)	0.15	0.20	0.23	0.14	0.11	0.10
Ethanol productivity (g/l/h)	0.024	0.035	0.052	0.018	0.0008	0.006

^a g/l of Zn as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2.3 ผลของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของ Fe ในรูป $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 โดยเติม Fe ในรูป $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ระดับ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร (เริ่มต้นในน้ำที่จกหม้อฆ่าเชื้อมี Fe เท่ากับ 0.0828 กรัมต่อลิตร) ปรับพีเอชน้ำที่เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Figure 9) พบว่า เชื้อเจริญดีที่สุดและผลิตเอทานอลสูงสุดในน้ำที่เติม Fe ในรูป $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงสุด 0.58 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 1.05 กรัมต่อลิตร (Figure 10) ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.20 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.044 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าซีไอลดลง 30.2 เปอร์เซ็นต์ (Table 13) สำหรับการเติม Fe ในรูป $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0, 0.1, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่ พบว่า เชื้อเจริญได้น้อยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.54, 0.48, 0.32, 0.41 และ 0.35 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.57, 0.64, 0.54, 0.28 และ 0.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองโดยมีเหตุผลดังนี้ การเติมเหล็กลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งเสริมให้แบคทีเรียผลิตเอทานอลจากกรดอะซิติก โดยเหล็กจะเป็นตัวทำให้กลูโคสเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกและไฮโดรเจน และถ้าพีเอชต่ำกรด

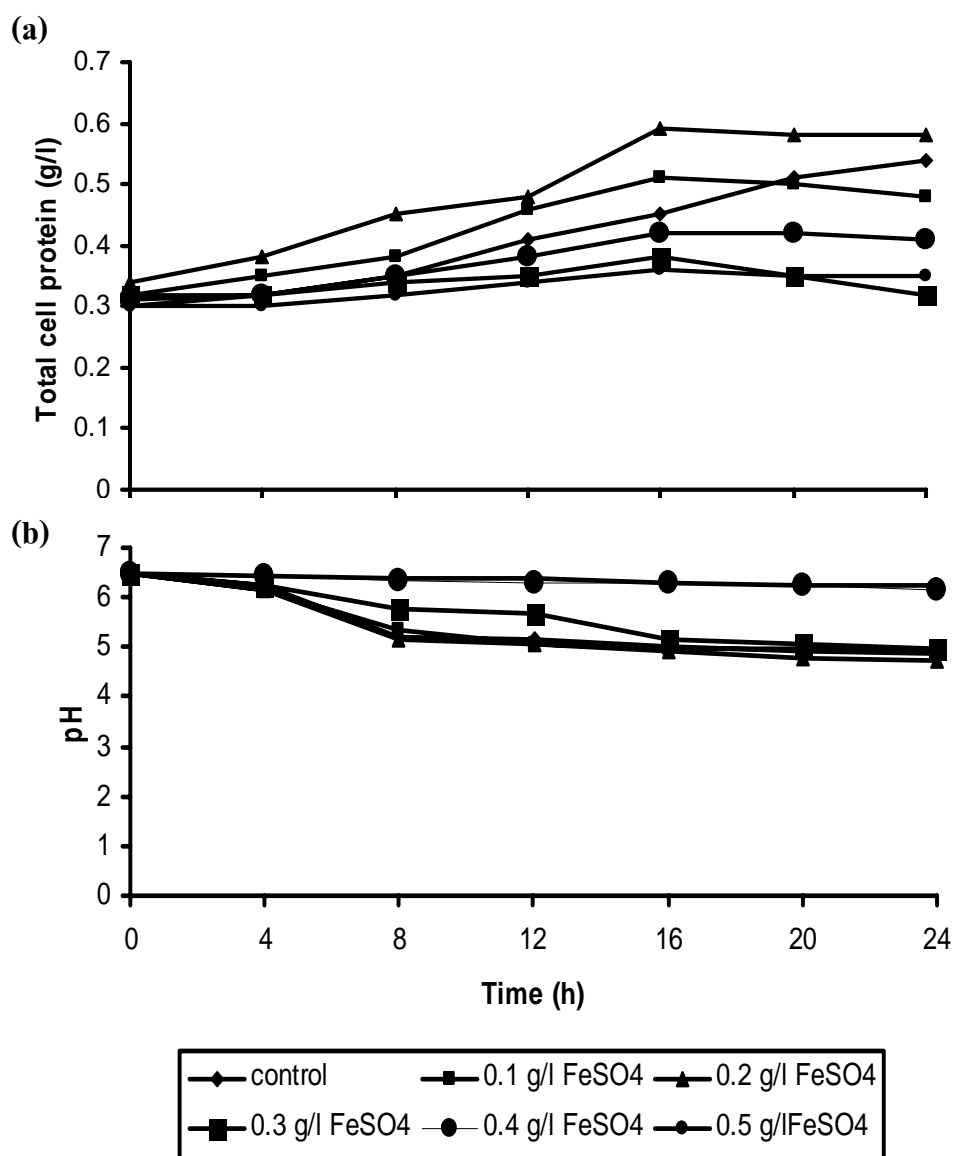


Figure 9. Effect of FeSO₄·7H₂O concentration in sterilizer condensate on growth of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

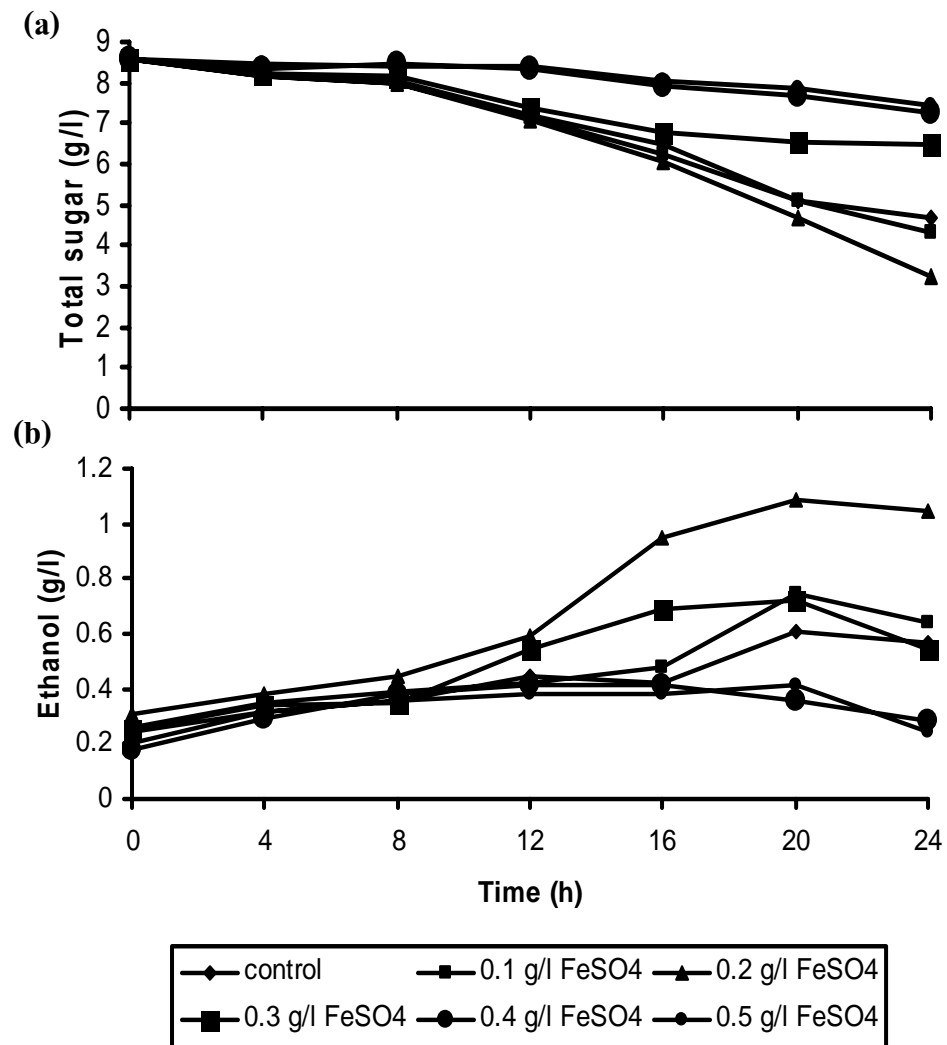


Figure 10. Effect of FeSO₄·7H₂O concentration in sterilizer condensate on utilization of sugar of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

อะซิดิกและไฮโดรเจน จะเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล (Balusu *et al.*, 2005) ดังนั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Fe ในรูป $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ คือ 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าค่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของเชื้อ *C. thermocellum* SS19 ในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งมีค่า $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร ให้เอทานอลสูงสุด 8 กรัมต่อลิตร (Balusu *et al.*, 2005)

Table 13. Effect of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration on ethanol production and COD removal of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.

Parameters	Fe as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ final concentrations ^a (g/l)					
	control	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Initial pH	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Final pH	4.87	4.90	4.75	4.95	6.15	6.25
Initial total sugar (g/l)	8.55	8.55	8.55	8.55	8.55	8.55
Residual total sugar (g/l)	4.65	4.35	3.25	5.45	6.95	7.15
Total cell protein (g/l)	0.54	0.48	0.58	0.32	0.41	0.35
COD removal (%)	26.7	28.4	30.2	23.5	19.8	16.7
Ethanol (g/l)	0.57	0.64	1.05	0.54	0.28	0.24
$Y_{p/s}$ (g ethanol/g total sugar)	0.15	0.15	0.20	0.17	0.17	0.17
Ethanol productivity (g/l/h)	0.024	0.027	0.044	0.023	0.012	0.010

^a g/l of Fe as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2.4 ผลของ redox dyes

การเติม redox dyes ลงในกระบวนการหมักเอทานอล ได้แก่ neutral red (NR), methyl viologen (MV), benzyl viologen (BV) และ methylene blue (MB) มีจุดประสงค์เพื่อต้องการเพิ่มความเข้มข้นและผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมัก โดย redox dyes ทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอน หลังจากที่มีการแบ่งอัตราส่วนของ NADH/NAD^+ ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์โดยตรง (Hipolito *et al.*, 2008) เหตุผลที่เลือก methylene blue (MB) เพราะว่า MB เป็น redox dye ที่มีค่า E'_h เท่ากับ +71 mV (มีค่าบวกสูงสุดในบรรดา dyes ทั้งหมด) มีสถานะตัว oxidized state ดีที่สุด โดย MB ทำหน้าที่เป็น reducing agent ช่วยกระตุ้นการเจริญของเชื้อโดยเข้าร่วมในปฏิกิริยา oxidation-reduction ซึ่งใช้กับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้อากาศ ทำให้ NADH/NAD^+ ที่เหลือจากการใช้เพื่อการ

เจริญของเชื้อ ไปส่งเสริมให้มีการผลิตเอทานอลมากขึ้นเมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลของเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่ปรับพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6.5 โดยเติม MB ที่ระดับ 0, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 และ 2.00 มิลลิโมลาร์ (ใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีการเติม MB เป็นชุดควบคุม) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Figure 11) พบว่า เชื้อเจริญได้ดีที่สุดในน้ำทิ้งที่เติม MB ที่ระดับ 0.10 มิลลิโมลาร์ โดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงสุด 0.65 กรัมต่อลิตร และผลิตเอทานอลได้ดีในน้ำทิ้งที่มีการเติม methylene blue ที่ระดับ 0.05 มิลลิโมลาร์ (Figure 12) โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 0.98 กรัมต่อลิตร ผลผลิตเอทานอล (Yp/s) เท่ากับ 0.20 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.041 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าซีไอคิดลง 29.8 เปอร์เซ็นต์ (Table 14) ในขณะที่สามารถเจริญในน้ำทิ้งที่เติม MB 0, 0.05, 0.50, 1.00 และ 2.00 มิลลิโมลาร์ ได้น้อย โดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.45, 0.58, 0.48, 0.40 และ 0.38 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.58, 0.98, 0.75, 0.65 และ 0.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นระดับความเข้มข้นของ MB ที่ให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด คือ 0.05 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ neutral red คือ 0.05 มิลลิโมลาร์ ที่ให้ค่าเอทานอลสูงสุด 0.46 กรัมต่อลิตร (Hipolito *et al.*, 2008)

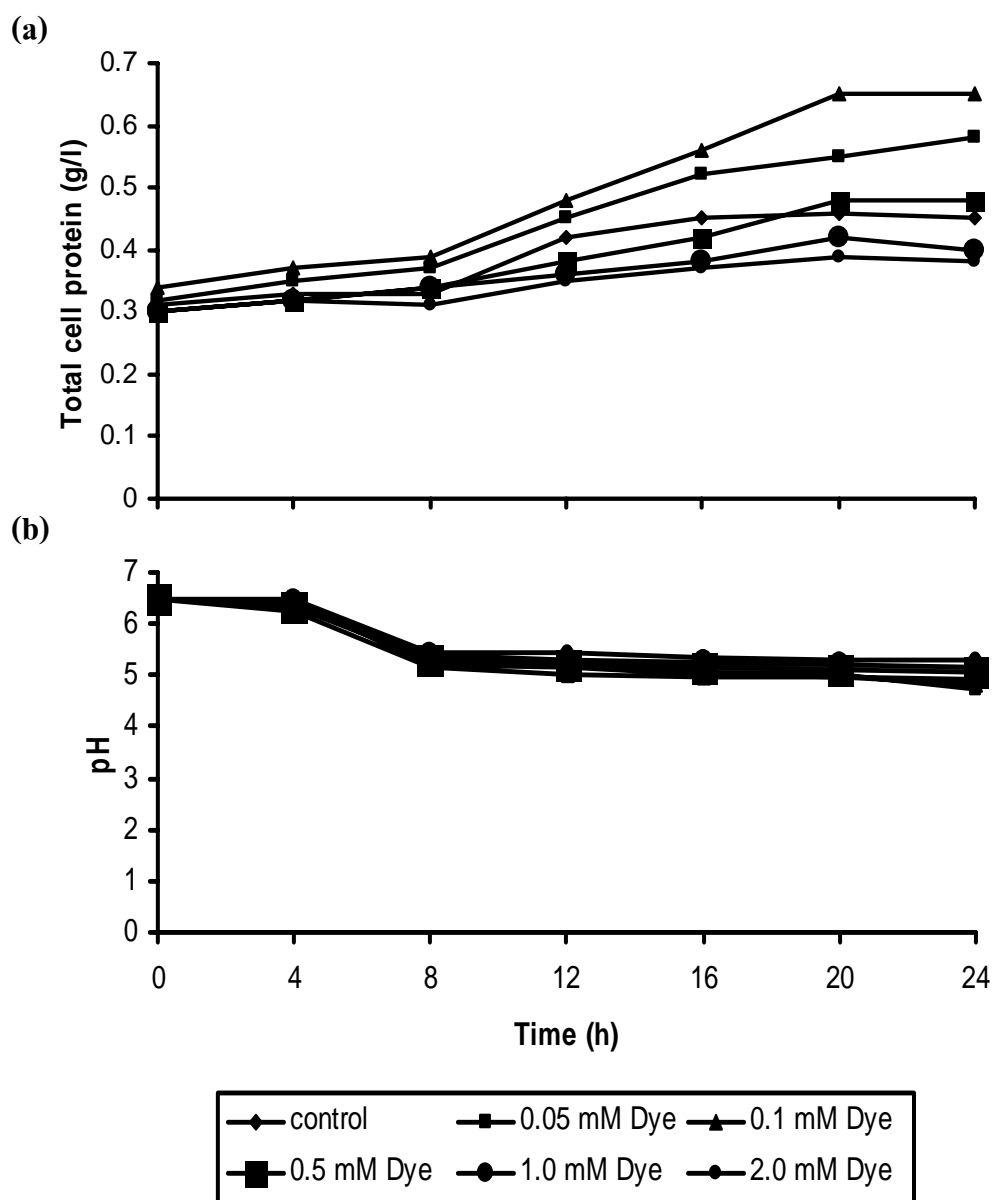


Figure 11. Effect of Dye concentration on on total cell protein of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.

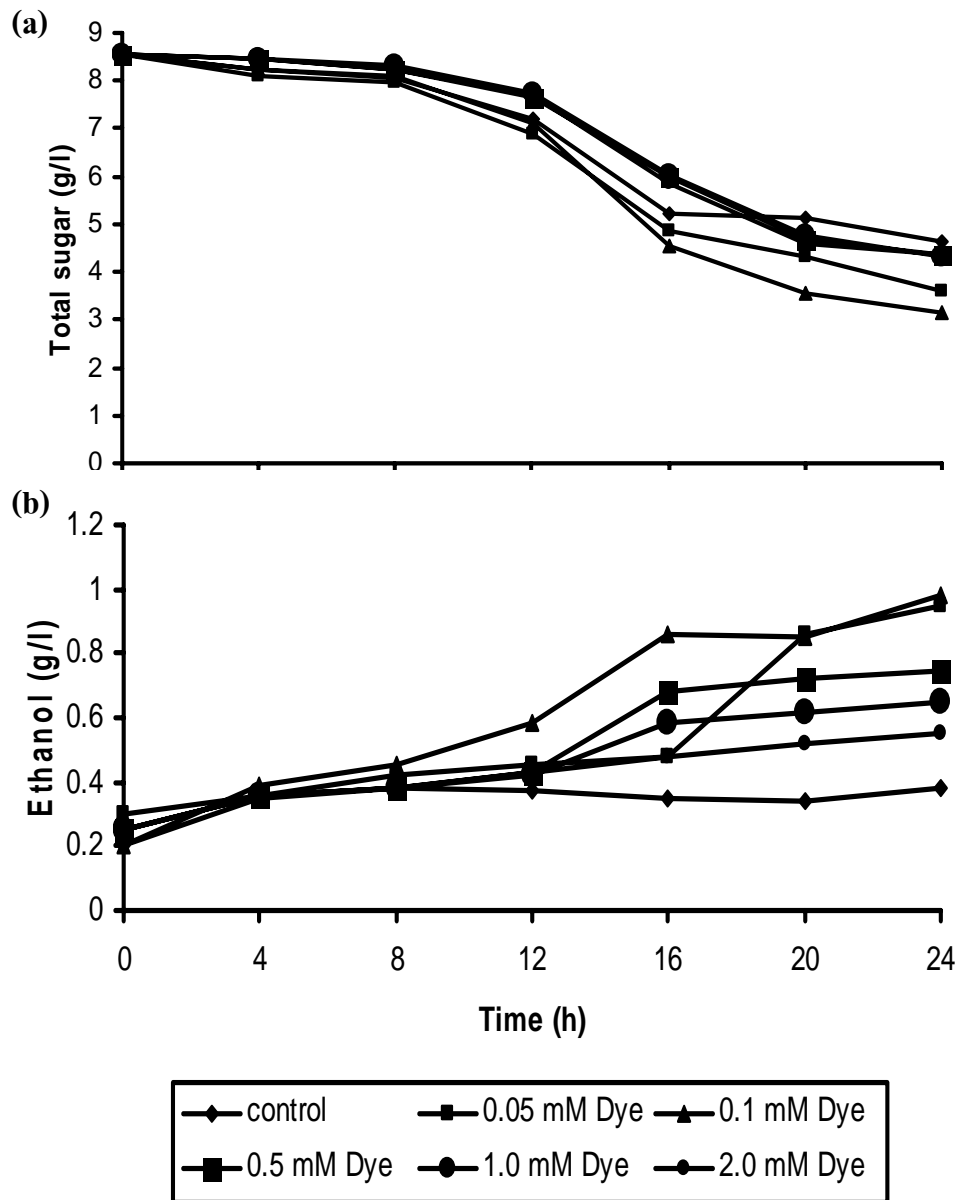


Figure 12. Effect of Dye concentration on total sugar of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.

Table 14. Effect of Dye concentration on ethanol production and COD removal of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.

Parameters	Dye concentrations (mM)					
	0	0.05	0.10	0.50	1.00	2.00
Initial pH	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Final pH	4.92	4.75	4.82	5.05	5.15	5.29
Initial total sugar (g/l)	8.55	8.55	8.55	8.55	8.55	8.55
Residual total sugar (g/l)	4.62	3.58	3.15	4.35	4.31	4.35
Total cell protein (g/l)	0.45	0.58	0.65	0.48	0.40	0.38
COD removal (%)	24.7	29.8	29.5	26.4	25.7	23.1
Ethanol (g/l)	0.58	0.98	0.92	0.75	0.65	0.55
$Y_{p/s}$ (g ethanol/g total sugar)	0.15	0.20	0.18	0.18	0.15	0.13
Ethanol productivity (g/l/h)	0.024	0.041	0.040	0.031	0.027	0.023

2.5 ผลของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลของเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (ที่ไม่เจือจาง) ปรับพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6.5 และเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl และ NH_4NO_3 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโดยปรับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำทิ้งเป็น 0.2% เพื่อให้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากันในแต่ละชุดการทดลอง (ใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนใด ๆ เป็นชุดควบคุม) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า เชื้อเจริญ (Figure 13) และผลิตเอทานอล (Figure 14) ได้ดีในน้ำทิ้งที่มีการเติม NH_4NO_3 โดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงสุด 0.59 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 0.85 กรัมต่อลิตร ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.17 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.035 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าซีไอคิดลดลง 34.8 เปอร์เซ็นต์ (Table 15) ส่วนการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีการเจริญน้อยโดยได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.45 และ 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

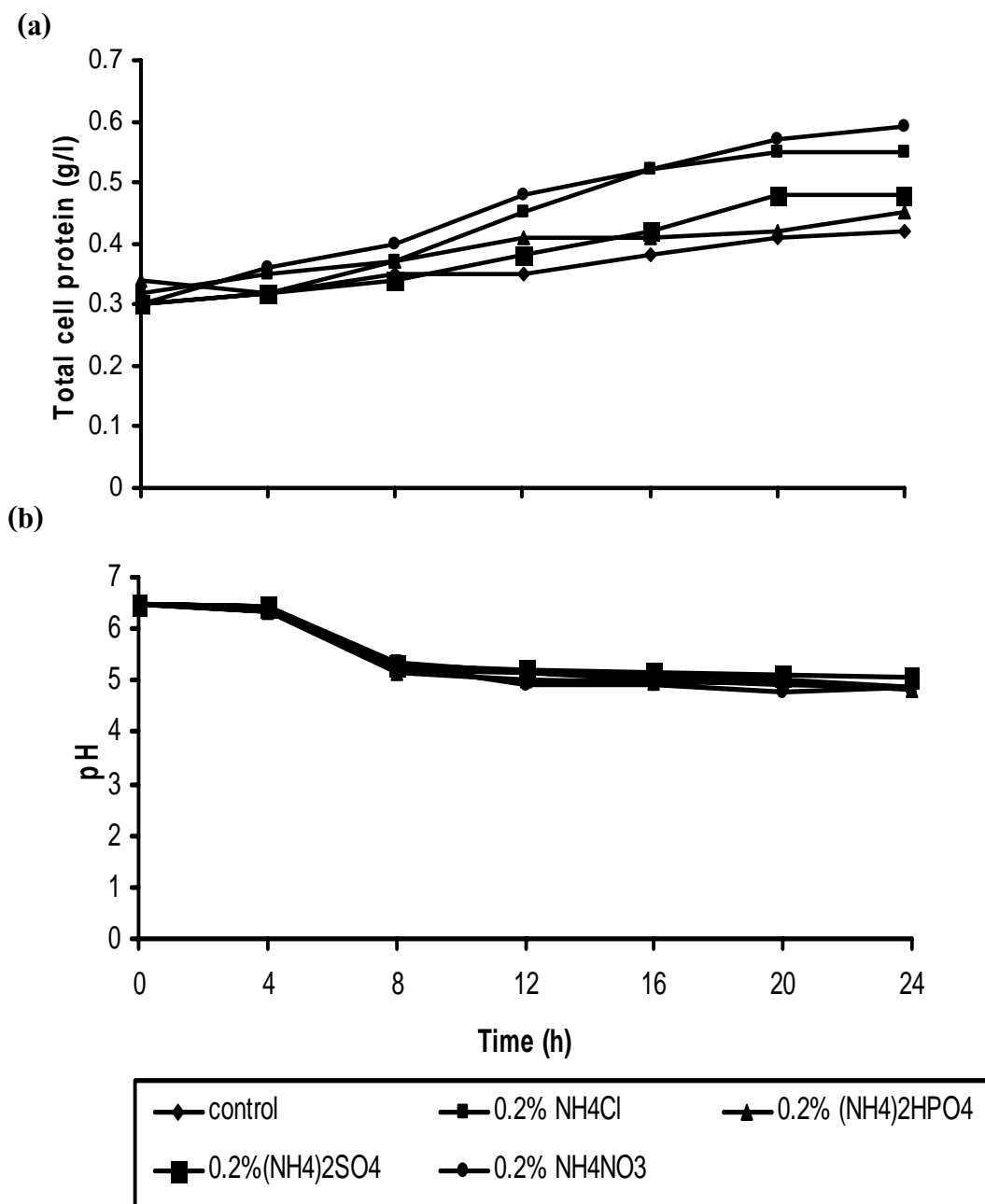


Figure 13. Effect of nitrogen source in sterilizer condensate on growth of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

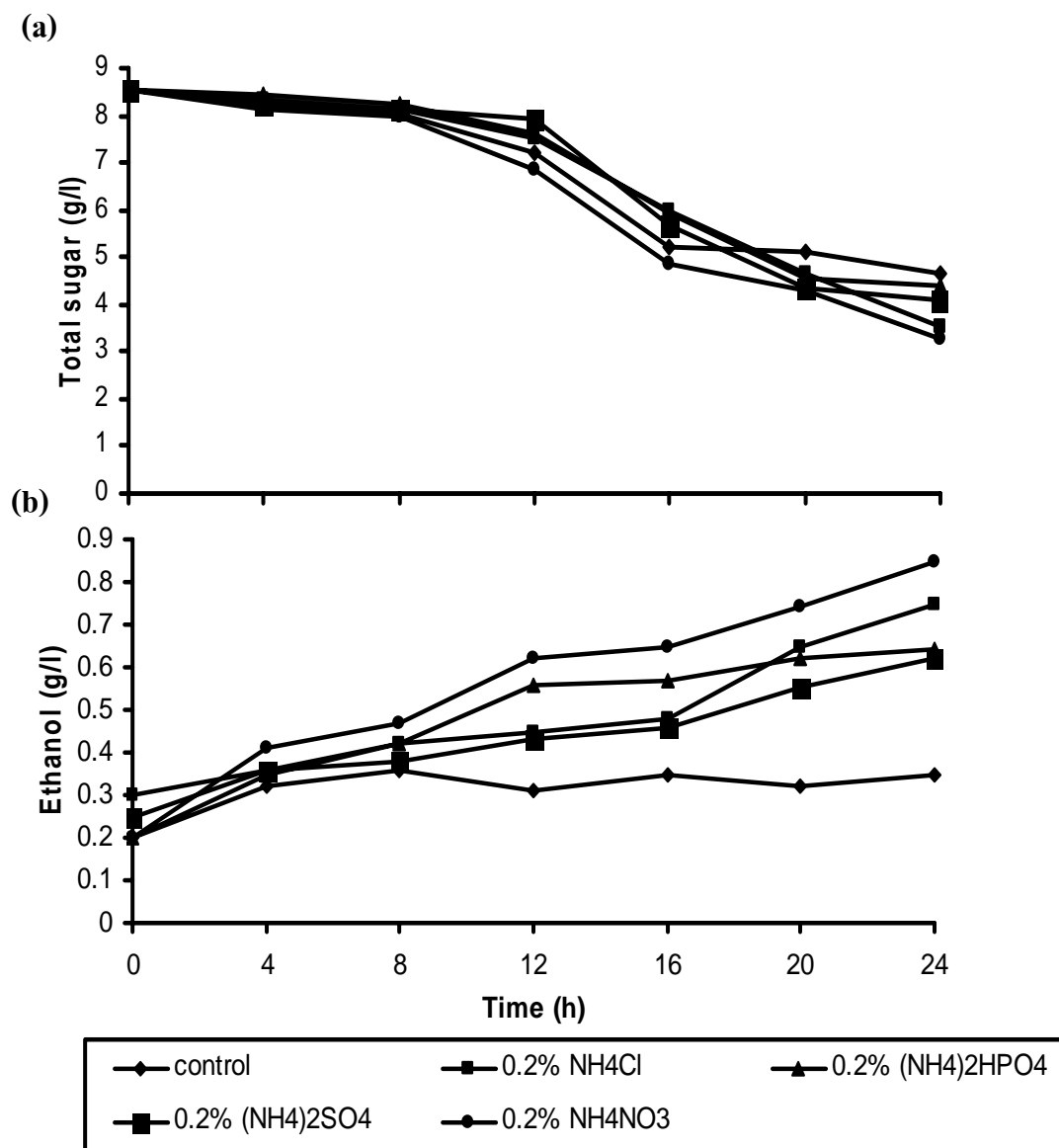


Figure 14. Effect of nitrogen source in sterilizer condensate on utilization of sugar of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

Table 15. Effect of nitrogen sources on ethanol production and COD removal of *T.thermosaccharolyticum* PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.

Parameters	Nitrogen sources ^a				
	control	NH ₄ Cl	(NH ₄) ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ NO ₃
Initial pH	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Final pH	5.87	4.85	4.82	5.05	4.85
Initial total sugar (g/l)	8.55	8.55	8.55	8.55	8.55
Residual total sugar (g/l)	4.12	3.54	3.65	3.58	3.42
Total cell protein (g/l)	0.42	0.55	0.45	0.48	0.59
COD removal (%)	29.8	31.5	30.2	31.6	34.8
Ethanol (g/l)	0.35	0.75	0.64	0.62	0.85
Y _{p/s} (g ethanol/g total sugar)	0.08	0.15	0.13	0.12	0.17
Ethanol productivity (g/l/h)	0.015	0.031	0.027	0.026	0.035

^a 0.2% of N for every nitrogen sources

และความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 0.64 และ 0.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลผลิตเอทานอล (Y_{p/s}) เท่ากับ 0.13 และ 0.12 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป ตามลำดับ การที่แบคทีเรียสามารถใช้ NH₄NO₃ ได้ดีที่สุด อาจเกิดจากแบคทีเรียมีการเจริญและใช้แอมโมเนียมไอออน และอนุมูลไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ในการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไร้อากาศไนเตรตจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Hipolito *et al.*, 2008) ดังนั้นอนุมูลไนเตรตที่ได้จาก NH₄NO₃ ในการทดลองครั้งนี้ น่าจะมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียและส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Hipolito และคณะ (2008) ที่เลี้ยง *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อสามารถใช้ NH₄NO₃ ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄ และ (NH₄)₂SO₄ เช่นเดียวกับ Rijssel และ Hansen (2002) พบว่า เชื้อ *Clostridium thermosaccharolyticum* ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีเพคตินเป็นแหล่งคาร์บอน และมี NH₄NO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอทานอล เนื่องจากไนโตรเจนมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์โปรตีนและเซลล์ และการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้อากาศอนุมูลไนเตรตจะส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้ดี ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไป จะช่วยให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้น

2.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้

เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตเอทานอลของ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จึงศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ โดยเติม NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจน 0, 0.2, 0.6 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชน้ำทิ้งเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อเจริญ (Figure 15) และผลิตเอทานอลได้ดี (Figure 16) ในน้ำทิ้งที่มีการเติม NH_4NO_3 ที่ระดับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 0.65 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเอทานอล 1.15 กรัมต่อลิตร ผลผลิตเอทานอล (Yp/s) เท่ากับ 0.22 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.048 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าซีโอดีลดลง 28.5 เปอร์เซ็นต์ (Table 16) ในขณะที่น้ำทิ้งที่มีการเติม 0.2 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนใน NH_4NO_3 (ชุดควบคุม) ได้ผลผลิตเอทานอล 0.95 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำทิ้งที่ไม่เติม NH_4NO_3 พบว่าได้ผลผลิตเอทานอลต่ำกว่าครึ่งหนึ่ง (0.56 กรัมต่อลิตร) รวมทั้งน้ำทิ้งที่เติม NH_4NO_3 ที่ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (0.75 กรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตาม การเติม NH_4NO_3 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนเท่ากับ 0, 0.2, 0.6, และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.45, 0.58, 0.65 และ 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และส่งเสริมการผลิตเอทานอลให้ได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.35, 0.95, 1.15 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นไนโตรเจนที่มากเกินไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญได้โดย Hill และ Thommel (1982) พบว่า การเติมแอมโมเนียมที่มากเกินไป ทำให้ปริมาณโปรตีนในเซลล์ของเชื้อลดลง เนื่องจากแอมโมเนียมยับยั้งการใช้กรดอะมิโนของเชื้อ ดังนั้น การเติม NH_4NO_3 ที่เหมาะสมจะทำให้เชื้อเจริญได้ดี จากการทดลองจะเห็นว่า เติมน้ำทิ้งที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.7 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มระดับไนโตรเจน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (2 กรัมต่อลิตร) ทำให้มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 2.7 กรัมต่อลิตร เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.6 เปอร์เซ็นต์ (6 กรัมต่อลิตร) (มีไนโตรเจนทั้งหมด 6.7 กรัมต่อลิตร) การเจริญของเชื้อยังคงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระดับของไนโตรเจน 1.0 เปอร์เซ็นต์ (มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 10.7 กรัมต่อลิตร) ทำให้การเจริญของเชื้อลดลง โดยให้โปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.48 กรัมต่อลิตร

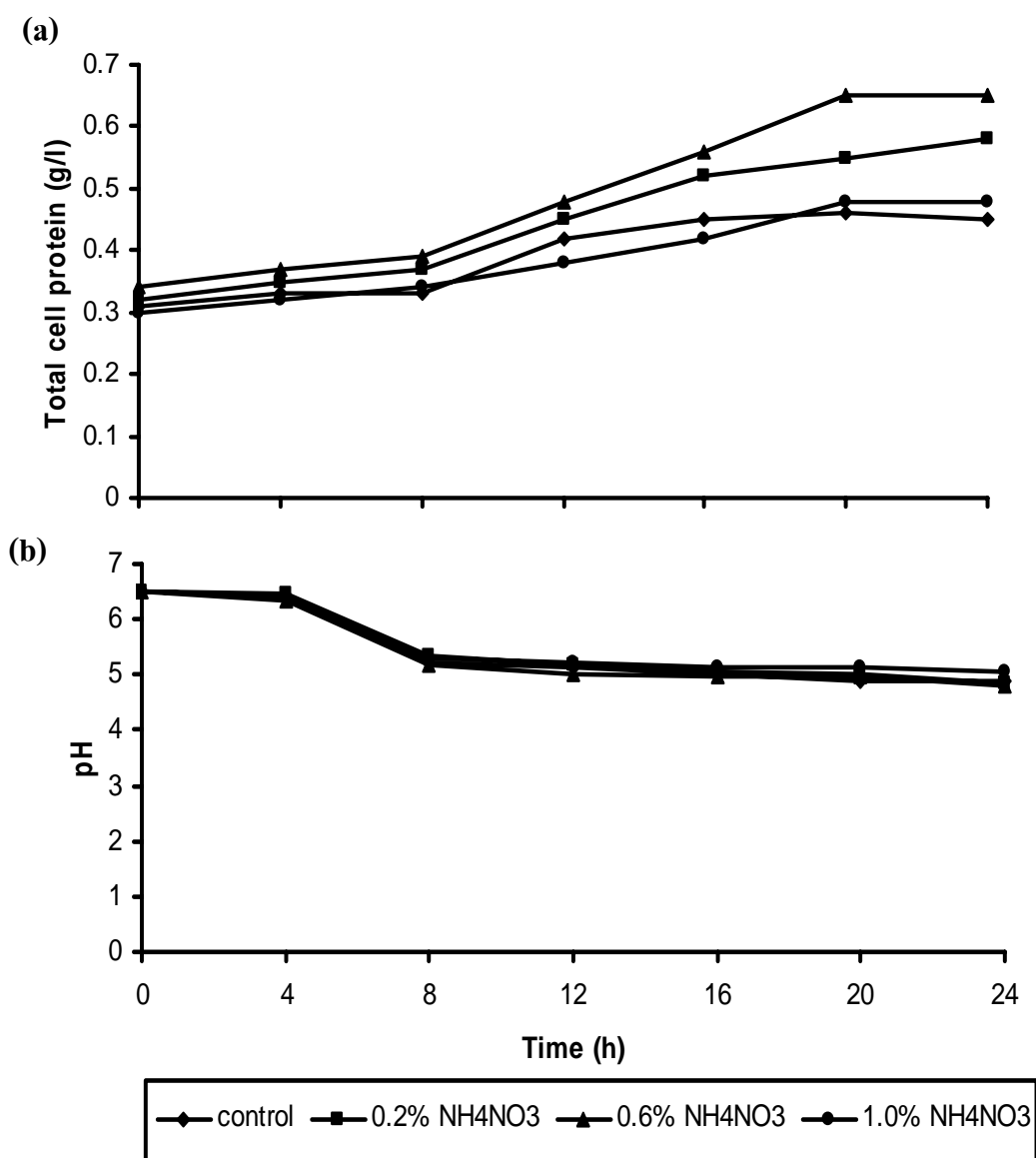


Figure 15. Effect of NH₄NO₃ concentration in sterilizer condensate on growth of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 24 h.

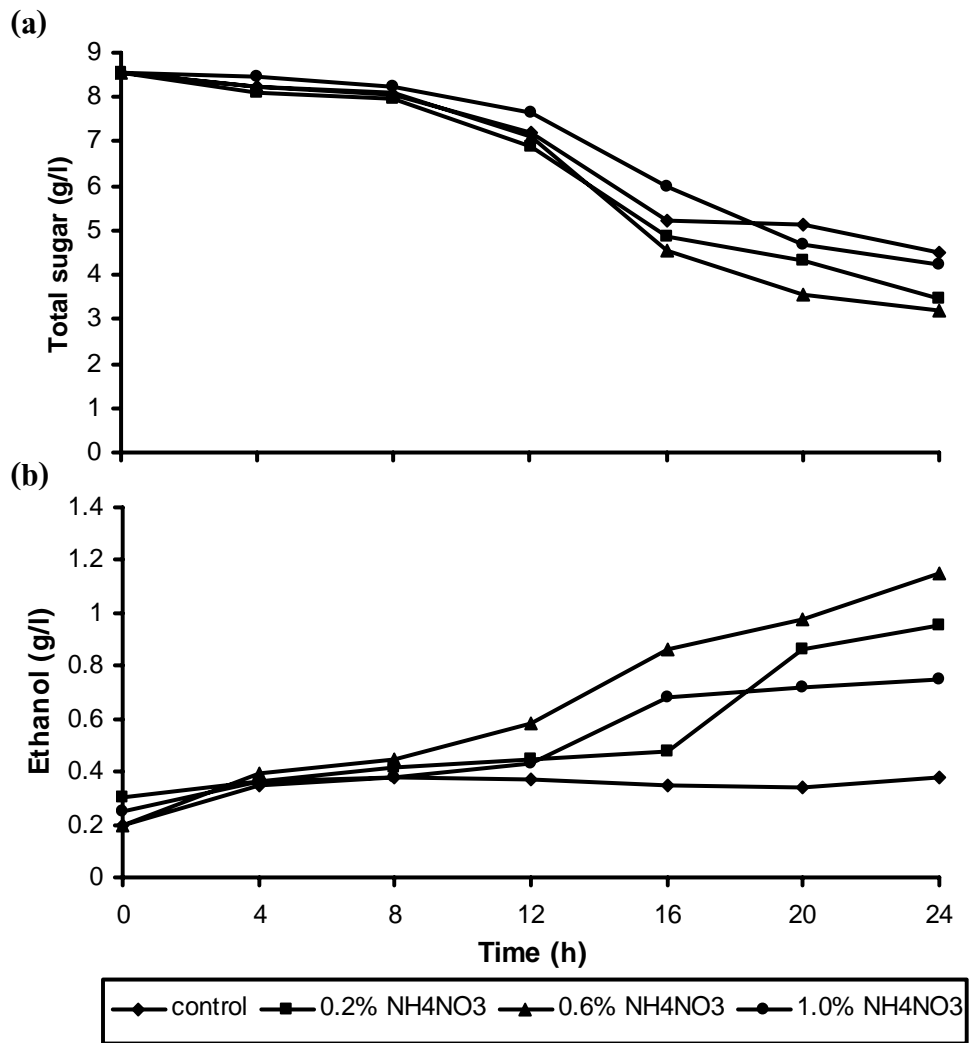


Figure 16. Effect of NH_4NO_3 concentration in sterilizer condensate on utilization of sugar of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation at 60°C for 24 h.

Table 16. Effect of NH_4NO_3 concentration on ethanol production and COD removal of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 in sterilizer condensate at 60 °C for 24 h.

Parameters	NH_4NO_3 final concentrations ^a (%)			
	0	0.2	0.6	1.0
Initial pH	6.50	6.50	6.50	6.50
Final pH	4.87	4.82	4.95	5.08
Initial total sugar (g/l)	8.55	8.55	8.55	8.55
Residual total sugar (g/l)	4.20	3.47	3.25	3.87
Total cell protein (g/l)	0.45	0.58	0.65	0.48
COD removal (%)	23.6	29.0	28.5	20.6
Ethanol (g/l)	0.35	0.95	1.15	0.75
$Y_{p/s}$ (g ethanol/g total sugar)	0.08	0.19	0.22	0.16
Ethanol productivity (g/l/h)	0.015	0.040	0.048	0.031

^a % of N as NH_4NO_3

หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรีย *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีปกติ (conventional method) โดยมีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร เติม Zn ในรูป $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัมต่อลิตร Fe ในรูป $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัมต่อลิตร methylene blue 0.05 มิลลิโมลาร์ N as NH_4NO_3 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.72 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเอทานอล 1.38 กรัมต่อลิตร ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.25 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.038 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าซีโอดีลดลง 32.7 เปอร์เซ็นต์

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้ Response surface methodology (RSM)

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 โดยใช้ Response surface methodology (RSM) ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วยความเข้มข้นของซีโอดี (20, 35, 50, 65 และ 80 กรัมต่อลิตร), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0, 0.12, 0.25, 0.38 และ 0.50 กรัมต่อลิตร) (ในรูป Zn), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0, 0.12, 0.25, 0.38 และ 0.50 กรัมต่อลิตร) (ในรูป Fe), Methylene blue (0, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 มิลลิโมลาร์) และ NH_4NO_3 (0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์)

(ในรูป N) ผลดังแสดงใน Table 17 พบว่า มีค่าที่เหมาะสมดังนี้ ความเข้มข้นของซีไอดี, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เท่ากับ 65, 0.25 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ methylene blue (สารรีดิวซ์) เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ และ NH_4NO_3 เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อผลิตเอทานอลสูงสุด 1.42 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการทดลองแต่ละปัจจัยในข้อ 2 พบว่า เชื้อเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในน้ำทิ้งที่ไม่มีการเจือจาง (80 กรัมต่อลิตร) และมีค่าที่เหมาะสมดังนี้ Zn ในรูป $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร, Fe ในรูป $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร, methylene blue 0.05 มิลลิโมลาร์ และ N ในรูป NH_4NO_3 0.6 เปอร์เซ็นต์ ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.61, 1.25, 1.05, 0.98 และ 1.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Table 17. Central composite experimental design matrix defining substrate concentration (X_1), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_2), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_3), Redox (X_4) and NH_4NO_3 (X_5) on ethanol production from *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 at 60°C.

Trials	Parameters					Ethanol (g/l)	
	X_1 (g/l)	X_2 (g/l)	X_3 (g/l)	X_4 (mM)	X_5 (%)	Predict	Experiment
1	65.00 (0.5)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.41	1.42
2	80.00 (1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	1.00 (1)	0.48	0.48
3	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.25	1.21
4	50.00 (0)	0.25 (0)	0.12 (-0.5)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.19	1.20
5	80.00 (1)	0.00 (-1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	1.00 (1)	0.43	0.43
6	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.75 (0.5)	1.18	1.19
7	20.00 (-1)	0.50 (1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	1.00 (1)	0.17	0.17
8	50.00 (0)	0.12 (-0.5)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.19	1.20
9	20.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	1.00 (1)	0.45	0.45
10	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.25	1.22
11	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.25	1.23
12	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	0.50 (-0.5)	0.50 (0)	1.19	1.20
13	35.00 (-0.5)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.15	1.15
14	50.00 (0)	0.25 (0)	0.38 (0.5)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.17	1.18
15	20.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	2.00 (1)	0.00 (-1)	0.27	0.27
16	80.00 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.75	0.75
17	80.00 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	2.00 (1)	1.00 (1)	0.38	0.38
18	20.00 (-1)	0.50 (1)	0.50 (1)	2.00 (1)	0.00 (-1)	0.18	0.18
19	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.50 (0.5)	0.50 (0)	1.19	1.20

Table 17. Central composite experimental design matrix defining substrate concentration (X_1), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_2), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_3), Redox (X_4) and NH_4NO_3 (X_5) on ethanol production from *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 at 60°C. (Continued)

Trials	Parameters					Ethanol (g/l)	
	X_1 (g/l)	X_2 (g/l)	X_3 (g/l)	X_4 (mM)	X_5 (%)	Predict	Experiment
20	20.00 (-1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.27	0.27
21	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.25	1.22
22	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.25	1.21
23	20.00 (-1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	2.00 (1)	1.00 (1)	0.18	0.18
24	80.00 (1)	0.00 (-1)	0.50 (1)	2.00 (1)	0.00 (-1)	0.23	0.23
25	80.00 (1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	2.00 (1)	0.00 (-1)	0.24	0.24
26	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.25	1.30
27	80.00 (1)	0.50 (1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.19	0.19
28	20.00 (-1)	0.00 (-1)	0.50 (1)	0.00 (-1)	0.00 (-1)	0.24	0.24
29	20.00 (-1)	0.00 (-1)	0.50 (1)	2.00 (1)	1.00 (1)	0.15	0.15
30	80.00 (1)	0.50 (1)	0.50 (1)	2.00 (1)	1.00 (1)	0.27	0.27
31	50.00 (0)	0.38 (0.5)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.50 (0)	1.17	1.18
32	50.00 (0)	0.25 (0)	0.25 (0)	1.00 (0)	0.25 (-0.5)	1.19	1.20

^aReadings are average of three determinations.

^bValues in parentheses are coded variables.

จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (Table 18) พบว่า ปัจจัยที่มีผลร่วมกัน โดยมีค่า $p < 0.05$ นั้นมี 4 ปัจจัย คือ Redox กับ Substrate, Fe กับ Zn, Redox กับ Zn และ Redox กับ Fe ซึ่งจะเห็นว่า N เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลร่วมกันกับปัจจัยอื่น เพราะว่ามีค่า $p > 0.05$ โดยสมการที่ใช้ทำนายผลผลิตของเอทานอลใน Table 18 โดยให้ค่า regression coefficient ที่สูง ($R^2 = 0.99$) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม หรือตัวแปรตอบสนอง (response variable) ทั้งหมด 4 กราฟ ซึ่งแสดงความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ กับตัวแปรอิสระสองตัวคือ Redox และสับสเตรท (Figure 17A), Fe และ Zn (Figure 17B), Redox และ Zn (Figure 17C) และ Redox และ Fe (Figure 17D) จะเห็นว่าภาพของผลตอบสนองมีลักษณะเป็นพื้นผิว จึงมักเรียกรูปที่แสดงค่าของผลตอบสนองที่เปลี่ยนไปตามค่าของตัวแปรอิสระว่า พื้นผิวผลตอบสนอง (response surface)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองก่อนศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และสภาวะที่เหมาะสม (Table 20) พบว่า ก่อนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นของซีโอดี 80 กรัมต่อลิตร มีสังกะสี เหล็ก และไนโตรเจน ในน้ำทิ้งอยู่แล้ว เท่ากับ 0.0828, 0.01755 และ

0.11 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.58 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว โดยใช้น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นของซีโอดี, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เท่ากับ 65, 0.25 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ methylene blue เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ และ NH_4NO_3 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 1.42 กรัมต่อลิตร สำหรับจุดศูนย์กลาง (composition of center points) พบว่า น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นของซีโอดี, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ และ NH_4NO_3 เท่ากับ 50, 0.25, 0.25 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ methylene blue เท่ากับ 1.0 มิลลิ โมลาร์ พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 1.23 กรัมต่อลิตร

Table 18. Analysis of variance (ANOVA) for the experimental results of the central composite design (cubic model).

Factor ^a	Coefficient estimate	Standard error	DF ^b	P ^c
Intercept	1.25	0.009840	1	-
X ₁	0.34	0.072	1	0.0033
X ₂	-0.0075	0.072	1	0.9204
X ₃	-0.0025	0.072	1	0.9734
X ₄	0.022	0.072	1	0.7651
X ₅	-0.016	0.072	1	0.8288
X ₁ ²	0.10	0.096	1	0.3253
X ₂ ²	-0.28	0.096	1	0.0285
X ₃ ²	-0.28	0.096	1	0.0285
X ₄ ²	-0.24	0.096	1	0.0496
X ₅ ²	-0.26	0.096	1	0.0375
X ₁ X ₂	-0.019	0.009531	1	0.0967
X ₁ X ₃	-0.019	0.009531	1	0.0967
X ₁ X ₄	-0.024	0.009531	1	0.0470
X ₁ X ₅	0.010	0.009531	1	0.3345
X ₂ X ₃	0.027	0.009531	1	0.0279
X ₂ X ₄	0.037	0.009531	1	0.0077
X ₂ X ₅	0.019	0.009531	1	0.0967
X ₃ X ₄	0.042	0.009531	1	0.0043
X ₃ X ₅	0.014	0.009531	1	0.1992

Table 18. Analysis of variance (ANOVA) for the experimental results of the central composite design (cubic model). (Continued)

Factor ^a	Coefficient estimate	Standard error	DF ^b	P ^c
X ₄ X ₅	-0.00125	0.009531	1	0.8999
X ₁ ³	-0.27	0.073	1	0.0098
X ₂ ³	-0.050	0.073	1	0.5190
X ₃ ³	-0.070	0.073	1	0.3747
X ₄ ³	-0.090	0.073	1	0.2638
X ₅ ³	0.025	0.073	1	0.7437

^aX₁ = COD concentration (g/l)

X₂ = ZnSO₄·7H₂O, (g/l)

X₃ = FeSO₄·7H₂O (g/l)

X₄ = Redox (mM)

X₅ = NH₄NO₃ (%)

^b=Degree of freedom

^c=*p < 0.05 are significant, R² = 0.99.

Table 19. Regression coefficient (R²) and regression equation for ethanol concentration.

R ²	regression equation
0.99	$\text{ethanol} = 1.25 + (0.34X_1) - (0.0075X_2) - (0.0025X_3) + (0.022X_4) - (0.016X_5) +$ $(0.10X_1^2) - (0.28X_2^2) - (0.28X_3^2) - (0.24X_4^2) - (0.26X_5^2) - (0.019X_1X_2) -$ $(0.019X_1X_3) - (0.024X_1X_4) + (0.010X_1X_5) + (0.027X_2X_3) + (0.037X_2X_4) +$ $(0.019X_2X_5) + (0.042X_3X_4) + (0.014X_3X_5) - (0.00125X_4X_5) - (0.027X_1^3) -$ $(0.050X_2^3) - (0.070X_3^3) - (0.090X_4^3) + (0.025X_5^3)$

X₁ = Substrate concentration (g/l)

X₂ = ZnSO₄·7H₂O (g/l)

X₃ = FeSO₄·7H₂O (g/l)

X₄ = Redox (mM)

X₅ = NH₄NO₃ (%)

Table 20. Optimized medium composition for ethanol production by *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 at 60°C.

No	Parameters					Ethanol production (g/l)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
1 ^a	80	0.08280	0.01755	0	0.11	0.58
2 ^b	80	0.2	0.2	0.05	0.6	1.38
3 ^c	50	0.25	0.25	1.0	0.5	1.23
4 ^d	65	0.25	0.25	1.0	0.5	1.42
5 ^e	65	0.25	0.25	1.0	0.5	1.41

X₁ = COD concentration (g/l)

X₂ = ZnSO₄.7H₂O, (g/l)

X₃ = FeSO₄.7H₂O (g/l)

X₄ = Redox (mM)

X₅ = NH₄NO₃ (%)

^a The values before optimization.

^b The optimization values derived from conventional method

^c The composition of center points.

^d The optimized values derived from RSM regression and ethanol production in this study.

^e The predicted optimum values and predicted maximum ethanol production derived from RSM regression in this study

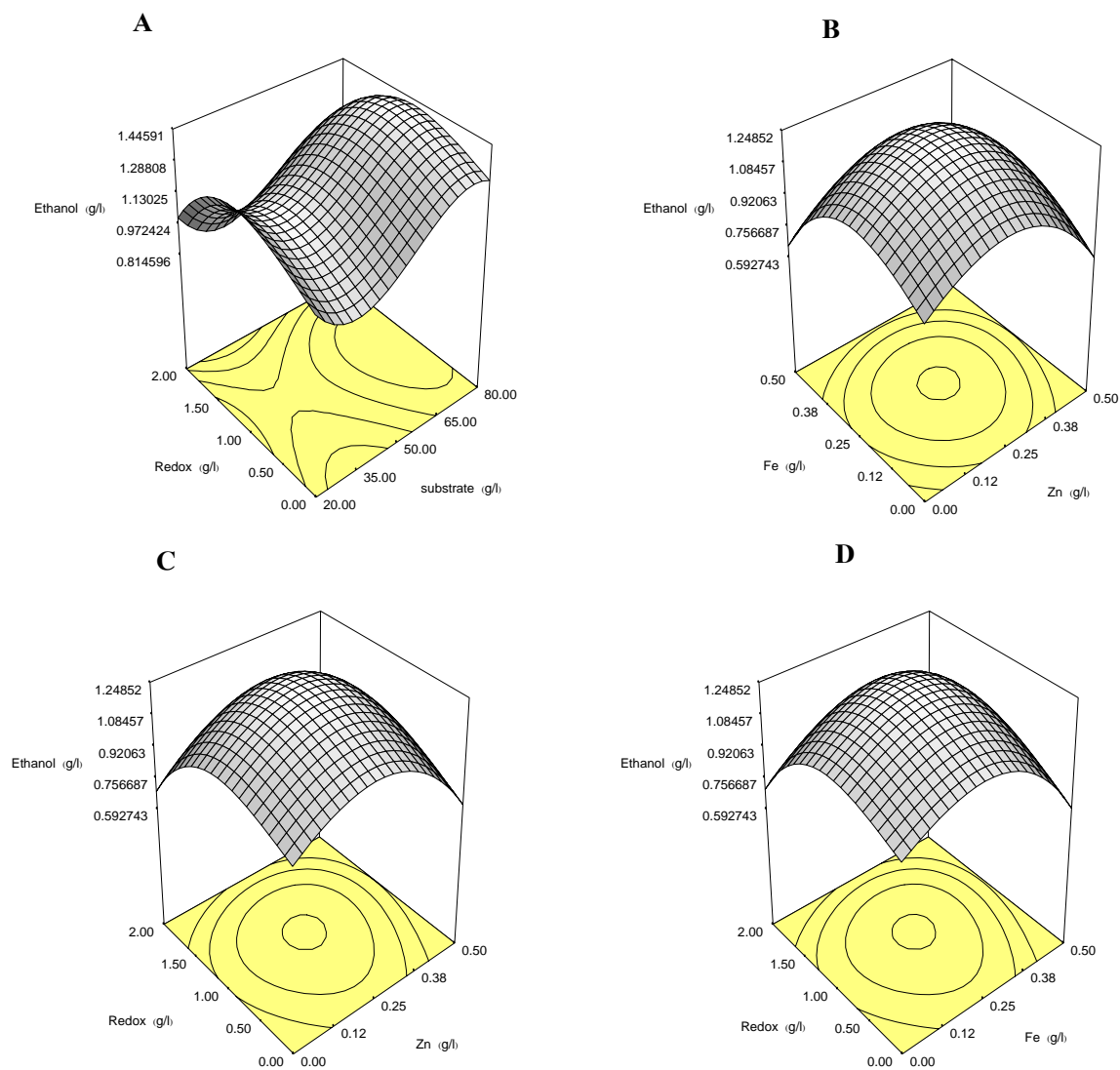


Figure 17. Response surface plot of ethanol production by *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 as a function of Redox and Substrate (A), as a function Fe and Zn (B), as a function Redox and Zn (C) and as a function Redox and Fe (D).

4. ผลของการเติมกากน้ำตาลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการผลิตเอทานอล

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย (ข้อ 2) และ RSM (ข้อ 3) นั้น พบว่า ได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 1.25 และ 1.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งยังต่ำ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ พบว่ามีสับสเตรทหลายชนิดได้แก่ อะราบีโนส กลูโคส และไซโลส ในปริมาณ 7.91, 0.60 และ 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดนี้เชื้อสามารถใช้ได้ แต่ใช้ได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมัก พบว่า น้ำตาลที่เหลือคือ อะราบีโนส เท่ากับ 3.5 กรัมต่อลิตร ดังนั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล จึงใช้วิธีการเติมสับสเตรทที่เชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 สามารถใช้ได้คือ ซูโครส (O-thong *et al.*, 2008) โดยการเติมกากน้ำตาลซึ่งประกอบด้วยซูโครสเป็นส่วนใหญ่ (30 เปอร์เซ็นต์) จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 48.8 เปอร์เซ็นต์

4.1 ผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการผลิตเอทานอล

เลี้ยงเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในอาหาร DSMZ No.211 พีเอช 6.5 ที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 0, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะไร้อากาศ โดยพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจน ($N_2:CO_2=80:20$) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าพีเอช และหาการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่น (OD_{600}) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและเอทานอล ผลการวิเคราะห์พบว่ากากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด คิดเป็น 48.7 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 9.75, 14.60, 19.50 และ 24.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 4 ระดับ คือ ที่ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร (Figure 18) จะเห็นว่า *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลาการเลี้ยงเชื้อ 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญลดลง ระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลในช่วง 20-50 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร (น้ำตาลทั้งหมด 19.5 กรัมต่อลิตร) ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 4.52 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 50, 30 และ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อผลิตเอทานอลได้สูงสุด 3.68, 3.06 และ 2.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 36 ชั่วโมง (Figure 19) ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองที่ใช้เชื้อ *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 ซึ่งเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 60 และ 30 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 6.50, 3.50 และ 2.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Avcı and Donmez, 2006)

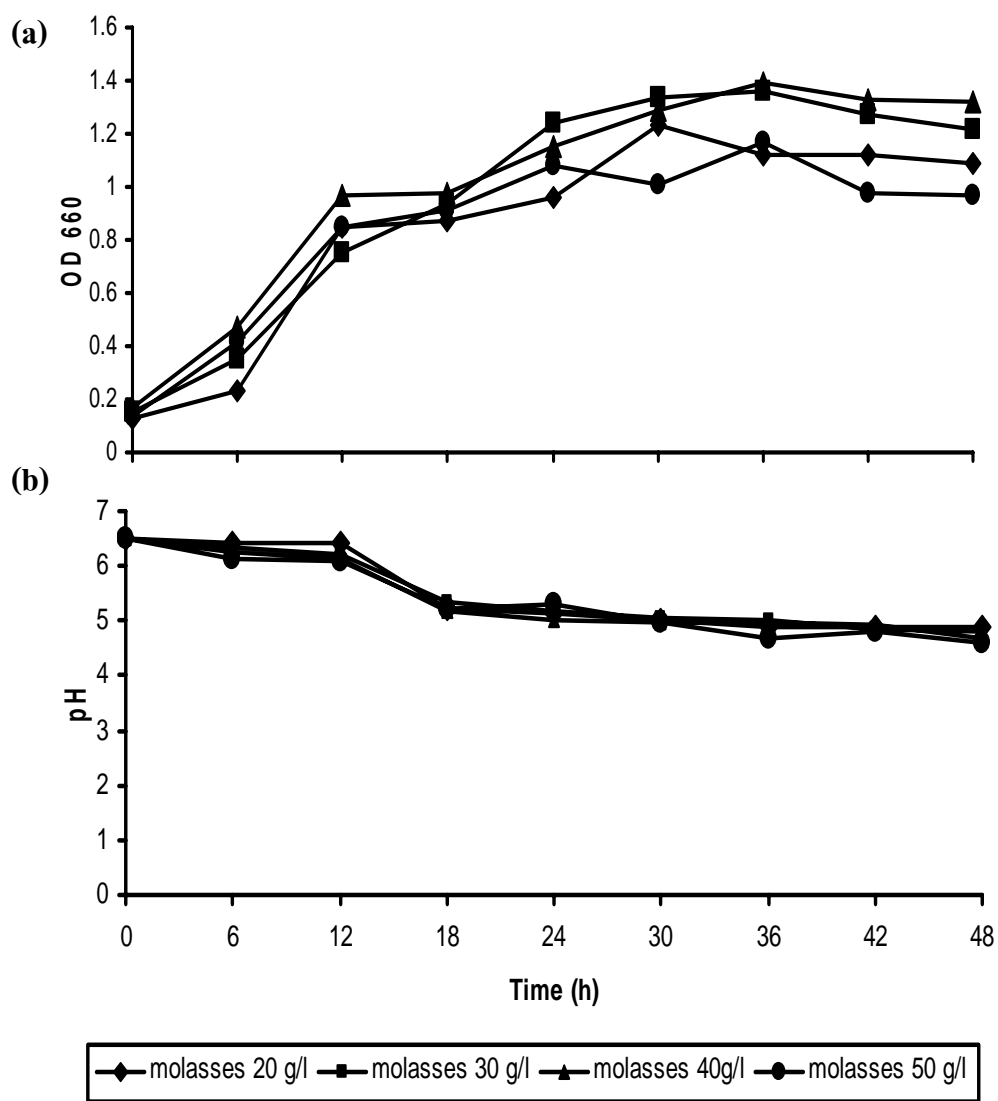


Figure 18. Effect of molasses concentration on growth of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation in DSMZ No.211 at 60 °C.

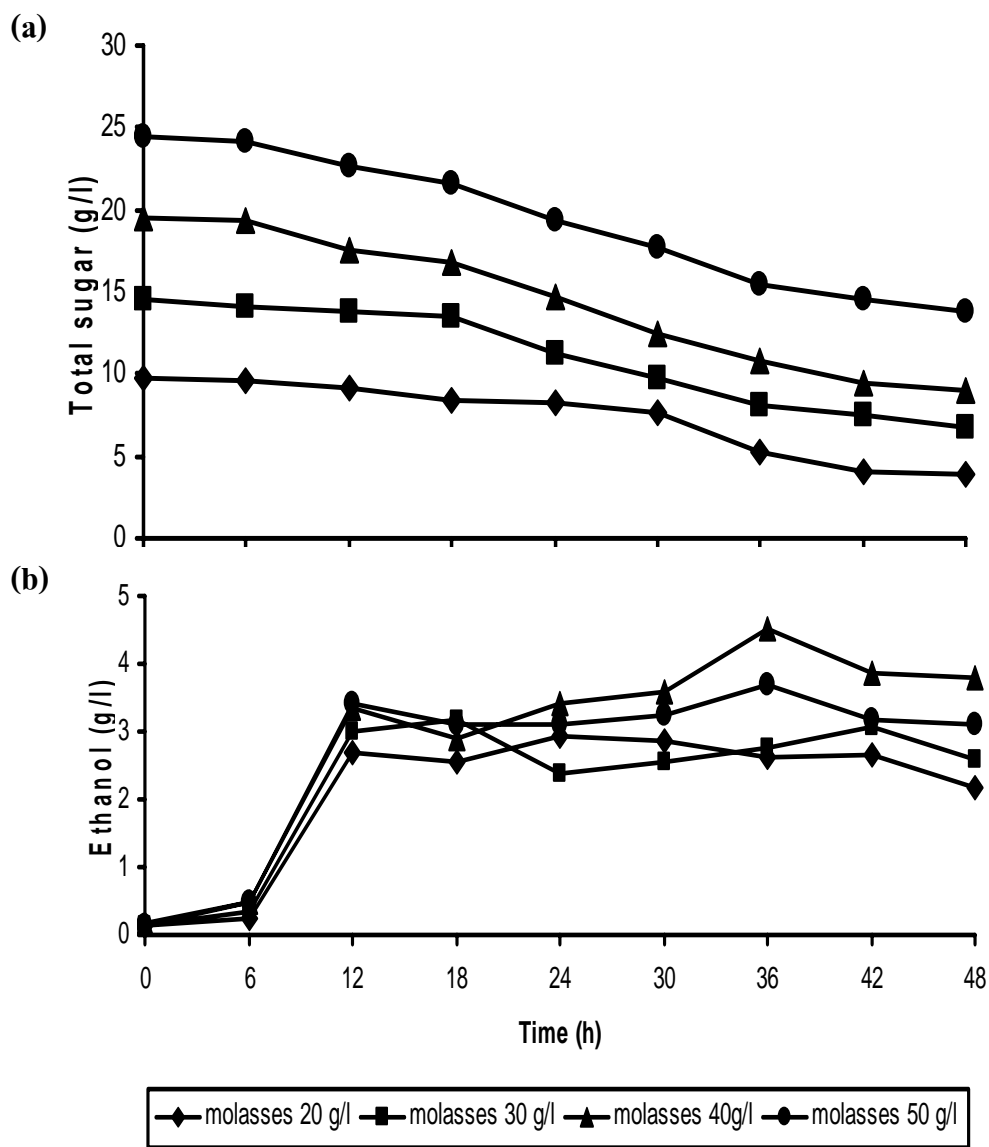


Figure 19. Effect of molasses concentration on total sugar utilization of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and ethanol production (b) during cultivation in DSMZ No.211 at 60 °C.

Table 21. Effect of molasses concentration on ethanol yield and molasses consumption of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 cultivation in DSMZ No.211 at 60 °C.

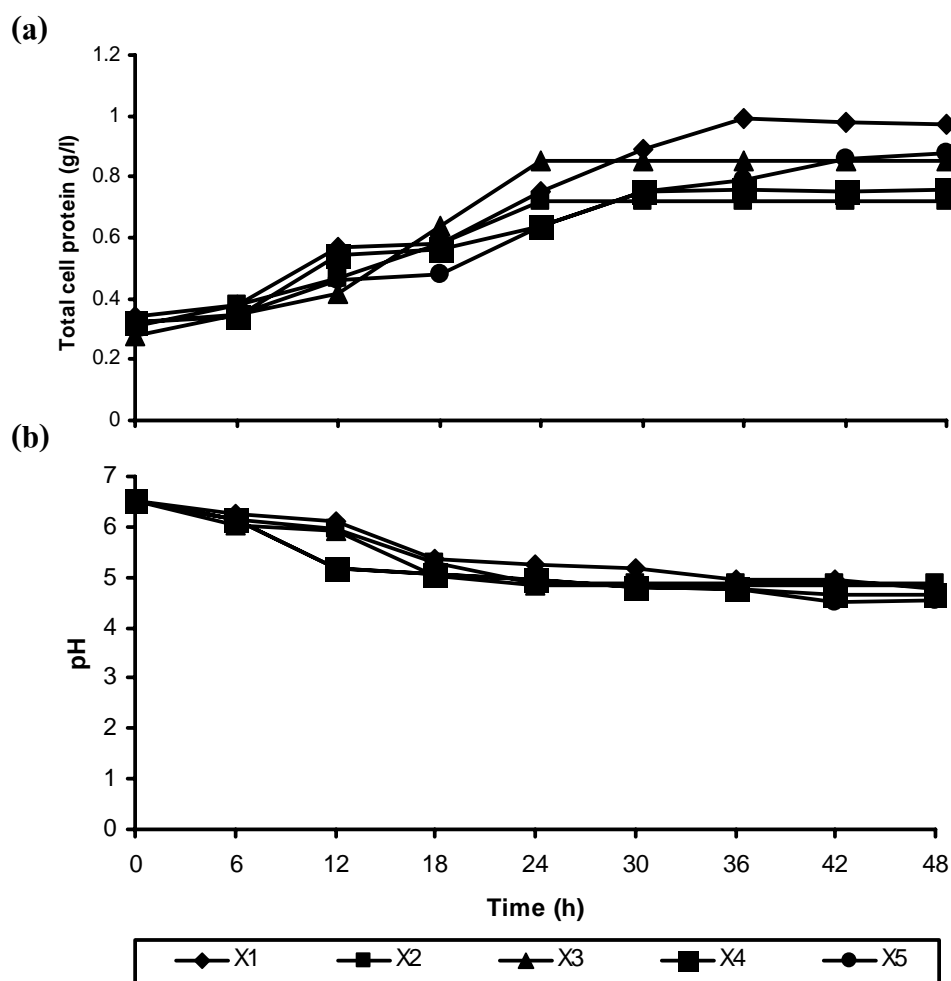
Molasses (total sugar) (g/l)	Total sugar consumed (g/l)	Total sugar utilization (%)	Ethanol (g/l)	$Y_{p/s}$ (g ethanol/g total sugar)	Ethanol productivity (g/l/h)
20 (9.75)	5.79	59.38	2.18	0.38	0.060
30 (14.6)	7.85	53.77	3.06	0.33	0.085
40 (19.5)	10.55	54.10	4.52	0.43	0.126
50 (24.5)	10.70	43.67	3.68	0.34	0.102

นอกจากนี้ยังมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดลองใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร (Table 21) ได้แก่ ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.38, 0.33, 0.43 และ 0.34 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป ตามลำดับ และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 0.060, 0.085, 0.126 และ 0.102 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ การใช้น้ำตาลคิดเป็น 59.4, 53.8, 54.10 และ 43.67 เปอร์เซ็นต์

4.2 ผลของการเติมกากน้ำตาลในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีสถานะที่เหมาะสมจากข้อ 2 และ 3

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีสถานะที่เหมาะสมจากวิธีปกติ (conventional method) โดยมีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร เติม Zn ในรูป $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร Fe ในรูป $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร methylene blue 0.05 มิลลิโมลาร์ N as NH_4NO_3 0.6 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม) (ชุด X_2) และชุดที่มีการเติมกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร (ชุด X_4) เปรียบเทียบกับน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่มีสถานะที่เหมาะสมจากการศึกษา RSM โดยมีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 65 กรัมต่อลิตร โดยเติม Zn ในรูป $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัมต่อลิตร Fe ในรูป $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัมต่อลิตร methylene blue 1.0 มิลลิโมลาร์ N ในรูป NH_4NO_3 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม) (ชุด X_3) และชุดที่มีการเติมกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร (ชุด X_5) เปรียบเทียบทั้ง 4 ชุดการทดลองนี้กับการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ DSMZ No.211 ที่มีกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร (ชุด X_1) โดยปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อเจริญและใช้กากน้ำตาลได้ แต่เจริญได้ดีที่สุดในชุด X_1 (Figure 20) แต่เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดในชุด X_5 (Figure 21) โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 5.85 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดลองของชุด X_1 , X_2 ,

X_3 , X_4 และ X_5 (Table 22) ได้แก่ ผลผลิตเอทานอล (Yp/s) เท่ากับ 0.43, 0.25, 0.24, 0.33 และ 0.35 กรัมต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป ตามลำดับ และอัตราการผลิตเอทานอล (Ethanol productivity) ที่ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 0.124, 0.038, 0.040, 0.152 และ 0.163 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการลดลงของค่าซีไอดี พบว่า เชื้อสามารถลดค่าซีไอดีในชุด X_5 โดยลดค่าซีไอดีได้ 48.3 เปอร์เซ็นต์ (Table 21) เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2 และ 3 กับการเติมกากน้ำตาลในน้ำทิ้ง ปรากฏว่า การเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2 ที่เติมกากน้ำตาล สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นจาก 1.38 กรัมต่อลิตร เป็น 5.47 กรัมต่อลิตร หรือเพิ่มขึ้น 4 เท่า และการเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3 ที่เติมกากน้ำตาล สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นจาก 1.44 กรัมต่อลิตร เป็น 5.85 กรัมต่อลิตร หรือเพิ่มขึ้น 4 เท่าเช่นกัน ทั้งนี้ คาดว่าเชื้ออาจมีการปรับตัวโดยการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนก่อนหลังจากนั้นจึงใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญและผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น 4 เท่าจากการเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมกากน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Vijayaraghavan และ Ahmad (2006) ที่เลี้ยงเชื้อผสมจากมูลวัว ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผสมกลูโคสลงไปด้วย พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีและผลิตเอทานอลแก่สีขาวภาพได้สูงสุดเท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ และลดค่าซีไอดีได้ 67 เปอร์เซ็นต์



X₁ = 40 g/l of molasses in DSMZ No.211

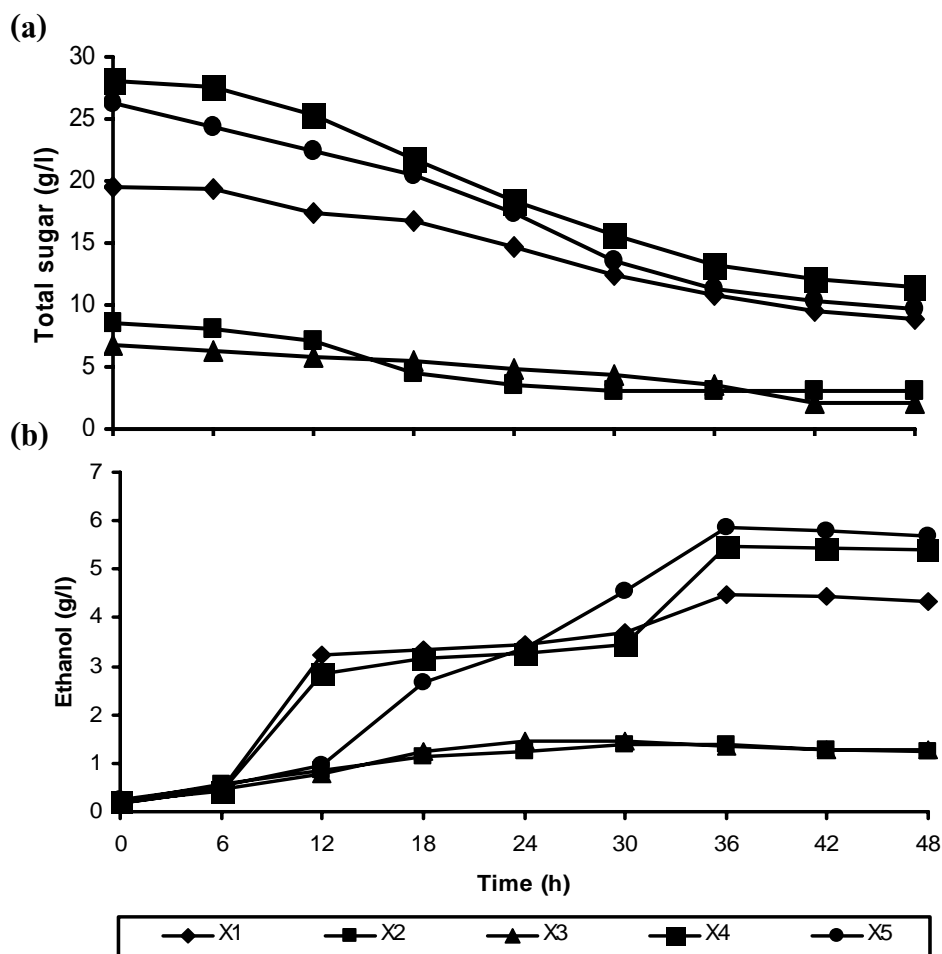
X₂ = Sterilizer condensate (80 g/l of COD + 0.2 g/l of Zn + 0.2 g/l of Fe + 0.05 mM of methylene blue + 0.6% of N)

X₃ = Sterilizer condensate (65 g/l of COD + 0.25 g/l of Zn + 0.25 g/l of Fe + 1.0 mM of methylene blue + 0.5% of N)

X₄ = Sterilizer condensate (80 g/l of COD + 0.2 g/l of Zn + 0.2 g/l of Fe + 0.05 mM of methylene blue + 0.6% of N + 40 g/l of molasses)

X₅ = Sterilizer condensate (65 g/l of COD + 0.25 g/l of Zn + 0.25 g/l of Fe + 1.0 mM of methylene blue + 0.5% of N + 40 g/l of molasses)

Figure 20. Effect of addition of molasses (40 g/L) in sterilizer condensate on growth of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (a) and pH changes (b) during cultivation at 60 °C for 48 h.



X₁ = 40 g/l of molasses in DSMZ No.211

X₂ = Sterilizer condensate (80 g/l of COD + 0.2 g/l of Zn + 0.2 g/l of Fe + 0.05 mM of methylene blue+0.6% of N)

X₃ = Sterilizer condensate (65 g/l of COD + 0.25 g/l of Zn + 0.25 g/l of Fe + 1.0 mM of methylene blue+0.5% of N)

X₄ = Sterilizer condensate (80 g/l of COD + 0.2 g/l of Zn + 0.2 g/l of Fe + 0.05 mM of methylene blue+0.6% of N + 40 g/l of molasses)

X₅ = Sterilizer condensate (65 g/l of COD + 0.25 g/l of Zn + 0.25 g/l of Fe + 1.0 mM of methylene blue+0.5% of N + 40 g/l of molasses)

Figure 21. Effect of addition of molasses (40 g/L) in sterilizer condensate on total sugar utilization (a) and ethanol production (b) from cultivation of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 at 60 °C for 48 h.

Table 22. Effect of addition of molasses (40 g/L) in sterilizer condensate on ethanol production and COD removal of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 at 60 °C for 48 h.

Parameters	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
Initial pH	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Final pH	4.75	4.87	4.84	4.65	4.52
Initial sugar (g/l)	19.50	8.55	6.85	28.05	26.35
Residual sugar (g/l)	8.95	3.03	2.15	11.47	9.64
Total cell protein (g/l)	0.97	0.72	0.85	0.76	0.88
COD removal (%)	30.5	32.7	35.6	45.7	48.3
Ethanol (g/l)	4.49	1.38	1.44	5.47	5.85
Y _{p/s} (g ethanol/g total sugar)	0.43	0.25	0.24	0.33	0.35
Productivity (g/l/h)	0.124	0.038	0.040	0.152	0.163

X₁ = 40 g/l of molasses in DSMZ No.211

X₂ = Sterilizer condensate (80 g/l of COD + 0.2 g/l of Zn + 0.2 g/l of Fe + 0.05 mM of methylene blue+0.6% of N)

X₃ = Sterilizer condensate (65 g/l of COD + 0.25 g/l of Zn + 0.25 g/l of Fe + 1.0 mM of methylene blue+0.5% of N)

X₄ = Sterilizer condensate (80 g/l of COD + 0.2 g/l of Zn + 0.2 g/l of Fe + 0.05 mM of methylene blue+0.6% of N + 40 g/l of molasses)

X₅ = Sterilizer condensate (65 g/l of COD + 0.25 g/l of Zn + 0.25 g/l of Fe + 1.0 mM of methylene blue+0.5% of N + 40 g/l of molasses)

5. การแยกเอทานอลออกจากน้ำหมักและการศึกษาสมบัติ

จากการกลั่นเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ พบว่า ที่เวลา 5 นาที สิ่งที่ได้กลั่นได้มีเอทานอลความเข้มข้นสูงสุด (12.5 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ ที่เวลา 10 นาที (11.0 กรัมต่อลิตร)หลังจากนั้นความเข้มข้นของเอทานอลจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป จนกระทั่งไม่มีเอทานอลเหลืออยู่เลย ที่เวลา 40 นาที (Figure 22) สำหรับการศึกษสมบัติของเอทานอลที่ผลิตได้ เพื่อเปรียบเทียบกับสมบัติพื้นฐานของเอทานอล โดยหาค่าจุดเดือด ความหนาแน่น ความถ่วงจำเพาะ และความหนืด (Table 23) พบว่าเอทานอลที่ได้มีสมบัติ (จุดเดือด ความหนาแน่น ความถ่วงจำเพาะ และความหนืด) แตกต่างจากเอทานอล 99

เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากเอทานอลที่ผลิตได้ยังมีเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลอยู่ต่ำมาก (2%) และมี ส่วนผสมของน้ำปนอยู่ปริมาณมาก จึงทำให้ค่าต่าง ๆ มีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำ เช่น จุดเดือด ความหนาแน่น เมื่อนำสิ่งที่กลั่นได้ ณ เวลา 5 นาที ไปวิเคราะห์หาชนิดของแอลกอฮอล์ พบว่ามี แอลกอฮอล์อยู่ 2 ชนิด คือ เอทานอล (12.45 กรัมต่อลิตร) และเมทานอล (4.65 กรัมต่อลิตร) โดยไม่พบ โพรพานอล บิวทานอล และเพนทานอล (Table 24) จะเห็นว่าตัวอย่างที่กลั่นได้ไม่ได้มีแค่เอทานอลอย่างเดียว จึงอาจส่งผลให้สมบัติของ เอทานอลที่ได้จากการทดลองมีค่าต่าง ๆ ที่สูงกว่าเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์

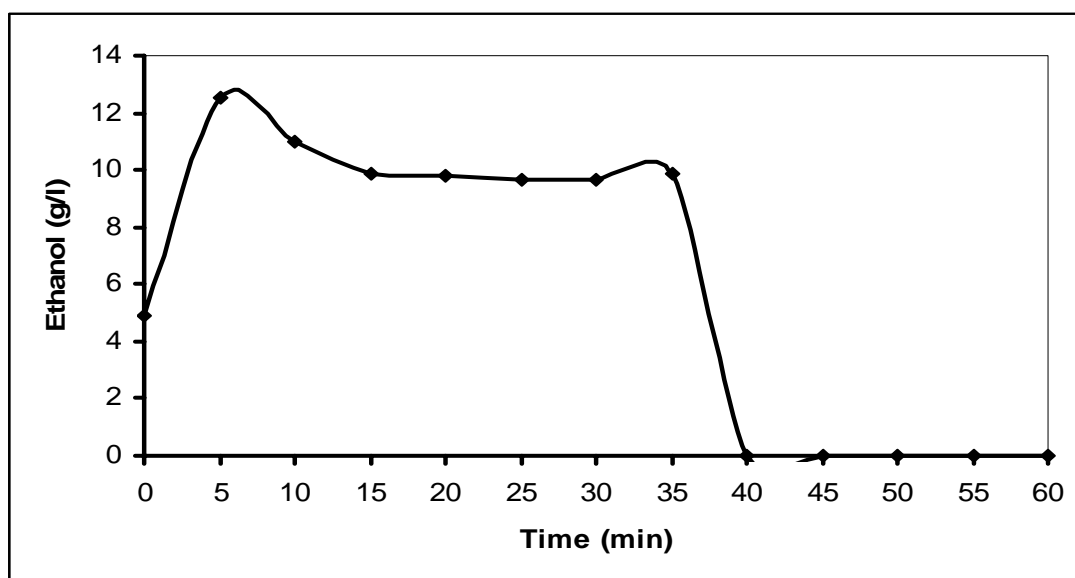


Figure 22. Ethanol concentrations after distillation using fraction collector at 78 C⁰.

Table 23. Characteristics of ethanol from *T. thermosaccharolyticum*- PSU-2 cultivated in palm oil mill effluent supplemented with molasses (40 g/l) and distilled using fraction collector for 5 min.

Property	Ethanol (99%)	Distillate
Boiling point (°C)	78.2	99.16
Specific gravity (at 20°C)	0.7905	0.94
Density (kg/m ³)	0.7890	0.92
Viscosity (cP)	1.08	1.32

Table 24. Type of alcohol from *T. thermosaccharolyticum*- PSU-2 cultivated in palm oil mill effluent supplemented with molasses (40 g/l) and distilled using fraction collector for 5 min.

Type of alcohol	Concentration (g/l)
Methanol	4.65
Ethanol	12.45
Propanol	0.00
Butanol	0.00
Pentanol	0.00

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อเจริญได้ดีที่สุด (ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.55 กรัมต่อลิตร) และผลิตเอทานอลได้สูงสุด (0.58 กรัมต่อลิตร) ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และลดค่าซีไอดีได้ 32.5 เปอร์เซ็นต์ จึงคัดเลือกน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อเพื่อการทดลองต่อไป

2. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2

ค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 สรุปดังแสดงใน Table 25

Table 25. Optimum condition for ethanol production and COD removal by *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 in sterilizer condensate at 60°C for 24 h.

Parameter	Optimum	Ethanol (g/l)	% COD removal
COD concentration (g/l)	80	0.61	33.6
N as NH_4NO_3 (%)	0.6	1.15	28.5
Zn as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	0.2	1.25	35.2
Fe as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	0.2	1.05	30.2
Methylene blue (mM)	0.05	0.98	29.8
Mixed component	-	1.38	32.7

3. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้ Response surface methodology (RSM)

สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้ RSM คือ ความเข้มข้นของซีไอดี, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 65, 0.25 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับ NH_4NO_3 เท่ากับ

0.5 เปอร์เซ็นต์ และ Methylene blue เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 1.42 กรัมต่อลิตร

4. ผลของการเติมกากน้ำตาลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการผลิตเอทานอล

ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 สรุปดังแสดงใน Table 26

Table 26. Effect of addition of molasses (40 g/L) in palm oil mill effluent on ethanol production of *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 at 60 °C for 48 h.

Parameters	X ₁	X ₄	X ₅
COD removal (%)	30.5	45.7	48.3
Ethanol (g/l)	4.49	5.47	5.85
Y _{p/s} (g ethanol/g total sugar)	0.43	0.33	0.35
Productivity (g/l/h)	0.124	0.152	0.163

X₁ = 40 g/l of molasses in DSMZ No.211

X₂ = Sterilizer condensate (80 g/l of COD + 0.2 g/l of Zn + 0.2 g/l of Fe + 0.05 mM of methylene blue+0.6% of N + 40 g/l of molasses)

X₃ = Sterilizer condensate (65 g/l of COD + 0.25 g/l of Zn + 0.25 g/l of Fe + 1.0 mM of methylene blue+0.5% of N + 40 g/l of molasses)

5. การแยกเอทานอลออกจากน้ำหมักและการศึกษาสมบัติ

เอทานอลที่ผ่านการกลั่นเป็นเวลา 5 นาที มีความเข้มข้นสูงสุด 12.5 กรัมต่อลิตร เอทานอลที่กลั่นมีสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ จุดเดือดที่ 99.16 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นเท่ากับ 0.9252 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ความถ่วงจำเพาะ 0.9440 และความหนืด 1.32 เซ็นติพอยด์ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ พบว่า แอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ประกอบด้วยเอทานอล 12.45 กรัมต่อลิตร และมีเมทานอล 4.65 กรัมต่อลิตร โดยไม่พบโพรพานอล บิวทานอล และเพนทานอล

ข้อเสนอแนะ

1. น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีลักษณะหลายชนิดได้แก่ อะราบิโนส กลูโคส และไซโลส โดยมีปริมาณ 7.91, 0.60 และ 0.03 กรัมต่อลิตร จะเห็นว่ามีอะราบิโนสมากที่สุด ดังนั้นในการผลิตเอทานอลจึงควรคัดเลือกเชื้อที่สามารถใช้อะราบิโนสได้ดี
2. เชื้อ *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 มีความสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดี จึงควรวัดไฮโดรเจนที่ได้จากการหมักเอทานอลด้วย

เอกสารอ้างอิง

- จินตนา แก้วบริษัท. 2541. การปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการดูดซับในชั้นตริง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ตาลีตา ยูอมพิทักษ์. 2548. บทความทางวิชาการ เรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพกับพลังงาน. คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม : 18 หน้า.
- ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ชีรพงศ์ จันทนิยม, ประกิจ ทองคำ และวรรณณา เลี้ยววาริณ. 2546. คู่มือปาล์มน้ำมันและการจัดการสวน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา : 72 หน้า.
- ปรีชา มุณีศรี. 2539. การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกุล, วีระศักดิ์ ทองลิ้มปี. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือทิ้ง และคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์ 12 (2) : 169-176.
- โสภารวรรณ รัตนพันธ์. 2547. การบำบัดและกำจัดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเส้นใยเห็ด *Lentinus* spp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- หัสลินดา บินมะแอ. 2548. การบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อรัญ หันพงศ์กิตติกุล, พูนสุข ประเสริฐสรรพ, กัลยา ศรีสุวรรณ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และวีระศักดิ์ ทองลิ้มปี. 2537. การลดการสูญเสียน้ำมันในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

- Abate, C., Callieri, D., Rodríguez, E and Garro, O. 1996. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. Appl. Microbiol. Biot. 45: 580-583.
- Abdel-Fattah, W.R., Fadil, M., Nigam, P. and Banat, I.M. 2000. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in Egyptian distillery. Biotechnol. Bioeng. 68: 531-535.
- Alam, Z.N., Kabbashi, N.A. and Razak, A.A. 2007 . Liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge for bioethanol production. IFMBE Proceedings. 15: 479-482.
- Angelidaki, I. and Sanders, W. 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. Rev Environ Sci Biotechnol. 3: 117–129.
- A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. The Association of Official Analytical Chemists Ins.
- APHA, AWWA and WPCF. 1985. Standard Method of the Examination of the Water and Wastewater. 16th ed. American Public Health Association, Wastington, DC.
- Avcı, A. and Donmez, S. 2006. Effect of zinc on ethanol production by two *Thermoanaerobacter* strains. Process Biochem. 41: 984–989.
- Bandaru, V.V.R., Somalanka, S.R., Mendu, D.R., Madicherl, N.R. and Chityala, A. 2006. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. Enz. Microb. Technol. 38: 209-214.
- Balusu, R., Paduru, R.R., Kuravi, S.K., Seenayya, G. and Reddy, G. 2005. Optimization of critical medium components using response surface methodology for ethanol production from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* SS19. Process Biochem. 40: 3025–3030.

- Benschoter, A.S. and Ingram, L.O. 1986. Thermal tolerance of *Zymomonas mobilis* : Temperature-induced changes in membrane composition . Appl. Environ. Microb. 51: 1278-1284.
- Bravo, S., Mahn, A. and Shene, C. 2000. Effect of feeding strategy on *Zymomonas mobilis* CP4 fed-batch fermentations and mathematical modeling of the system. Appl. Microbiol. Biot. 54: 487-493.
- Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B. and Scarmino, I.S. 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. Bioresource Technol. 98: 2824–2828.
- Dubios, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances . Analytical Chemistry. 28: 350-356.
- Guebel, D.V., Cordenons, A., Cascone, O., Giulietti, A.M. and Nudel, C. 2005. Influence of the nitrogen source on growth and ethanol production by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. Biotechnol Lett. 14: 1193-1198.
- Hipolito, C.N., Crabbe, E., Badillo, C.M., Zarrabal, O.C., Mora, M.A.M., Flores, G.P., Cortazar, M.A.H. and Ishizaki, A. 2008. Bioconversion of industrial wastewater from palm oil processing to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). J. Cleaner Production. 16(5): 632-638.
- Hwang, T.K., Ong, S.M., C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluents. Planter, Kuala Lumpur. 54: 749-756.
- Khan, E., Yang, P.Y. and Kinoshita, C.M. 1994. Bioethanol production from dilute feedstock. Bioresource Technol. 47(1): 29-36
- Khuri, A.I. and Cornell, J.A. 1987. Response surface. Marcell Dekker. New York.

- Knutson, B.L., Strobel, H.J., Nokes, S.E., Dawson, K.A., Berberich, J.A. and Jones, C.R. 1999. Effect of pressurized solvents on ethanol production by the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *Supercritical Fluids*. 16: 149–156.
- Lacis, L.S. and Lawford, H.G. 1998. Effect of growth rate on ethanol production by *Thermoanaerobacter ethanolicus* in glucose or xylose-limited continuous culture. *Biot. Lett.* 10: 603–608.
- Lynd, L.R., Baskaran, R. and Casten, S. 2001. Salt accumulation resulting from base added for pH control, and not ethanol, limits growth of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8 at elevated feed xylose concentrations in continuous culture. *Biot. Progress*. 17: 118-125.
- Maddox, I.S., Qureshi, N. and Roberts-Thomson, K. 1995. Production of acetone-butanol-ethanol from substrate concentration using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochem.* 30(3): 209-215.
- Massadeh, M.I. and Modallal, N. 2008. Ethanol production from olive mill wastewater (OMW) pretreated with *Pleurotus sajor-caju*. *Energy & Fuels*. 22(1): 150-154.
- Miyazaki, K., Irbis, C., Takada, J. and Matsuura, A. 2008. An ability of isolated strains to efficiently cooperate in ethanolic fermentation of agricultural plant refuse under initially aerobic thermophilic conditions: Oxygen deletion process appended to consolidated bioprocessing (CBP). *Bioresource Technol.* 99(6): 1768-1775.
- Montgomery, D.C. 1999. *Experimental Design for Product and Process Development*. The Statistician: 48(2): 159-177.
- Montgomery, D.C. 2001. *Design and Analysis of Experiments*. Fifth Edition. John Wiley & Sons Inc.
- Mustar, S., Mohd, M.A., Noor., Ahmad, R. and Amin, A.M. 2001. Single cell protein from palm oil mill effluent. *Proc. NSF Workshop, Kuala Lumpur*.

- Myers, R.H. 1995. Response Surface Methodology: Process and Production Optimization Using Designed Experiments. New York : John Wiley & Sons Inc.
- Nigam, J.N. 1999. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. *J. Biotechnol.* 72 (3): 197-202.
- Nigam, J.N. 2000. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. Biotechnol.* 87: 17–27.
- O-thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D. and Angelidaki, I. 2008. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *Int. J. Hydrogen Energy.* 33(4): 1204-1214.
- Pechsult, M., Prasertsan, P. and Ukita, M. 2001. Biopretreatment of palm oil mill effluent by thermotolerant polymer-producing fungi. *Songklanakarin J. Science. technol.* 23(Suppl.): 771-777.
- Rijssel, M.V. and Hansen, T.A. 2002. Fermentation of pectin by a newly isolated *Clostridium thermosaccharolyticum* strain. *FEMS Microbios. Lett.* 61(1-2): 41-46.
- Singh, D., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R. and Mchale, A.P. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentration : Part II-use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *World J. Microb. Biotechnol.* 14: 823-834.
- Sommer, P., Georgieva, T. and Ahring, B.K. 2003. Potential for using thermophilic anaerobic bacteria for bioethanol production from hemicellulose. *Biochem. Society Transactions.* 32(2): 283-289.
- Sreenath, H.K. and Jeffries, T.W. 2000. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresource Technol.* 72: 261 – 266.
- Sreenath, H.K., Koegel, R.G., Moldes, A.B., Jeffries, T.W. and Straub, R.J. 2001. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. *Process Biochem.* 36: 1199-1204.

- Stenberg, K., Bollok, M., Reczey, K., Galbe, M. and Zacchi, G. 2000. Effect of substrate and cellulase concentration on Simultaneous Saccharification and Fermentation of steampretreated softwood for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 204 – 210.
- Sudha Rani, K., Swamy, M.V. and Seenayya, G. 1998. Production of ethanol from various pure and natural cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* strains SS21 and SS22. *Process Biochem.* 33(4): 435-440.
- Tao, F., Miao, J.Y., Shi, G.Y. and Zhang, K.C. 2003. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobiles* under non-sterilized condition. *Process Biochem.* 40: 183–187.
- Tsoinis, S. P. and Grigoropoulos, S. G. 1993. Anaerobic treatability of olive oil mill waste-water . *Water Science. Technol.* 28: 35-44
- Vijayaraghavan, K. and Ahmad, D. 2006. Biohydrogen generation from palm oil mill effluent using anaerobic contact filter. *Int. J. Hydrogen Energy.* 31: 1284-1291.

ภาคผนวก

1. ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้วิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายด้วย Folin-ciocatus phenol สามารถวัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวกว่าวิธีไบยูเรต ประมาณ 60 เท่า สีโบลินดีนัมบลูที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายกรดฟอสฟอรัสทั้งสติกฟอสโฟโบลินดิกด้วยฟีนอล โปรตีนแต่ละชนิดจะให้ความเข้มสีไม่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนตัวสำคัญ 2 ตัว คือ ไทโรซีนและทริปโทเฟน เป็นเทคนิคการวัดโดยวัดโปรตีนที่มีวงแหวนเบนซีน แล้ววัดสีโบลินดีนัมบลูที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เครื่องมือ

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi

สารเคมี

1. สารละลาย Na_2CO_3 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 % ใน Sodium potassium tartrate 1.0%
3. สารละลาย alkali copper เตรียมโดยผสมสารละลาย (ในข้อ 1) 30 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร
4. สารละลาย Folin-ciocatus phenol reagent เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:2 ก่อนใช้
5. สารละลาย bovine serum albumen (BSA) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ใช้สารละลาย BSA ที่ระดับความเข้มข้น เท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่มีความเจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ
2. เติมสารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วจึงทำให้เย็น
3. เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. เติมสารละลาย Folin-ciocatus phenol reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับโปรตีน

เตรียมโดยใช้สารละลาย BSA ที่ระดับความเข้มข้น เท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีข้างต้น

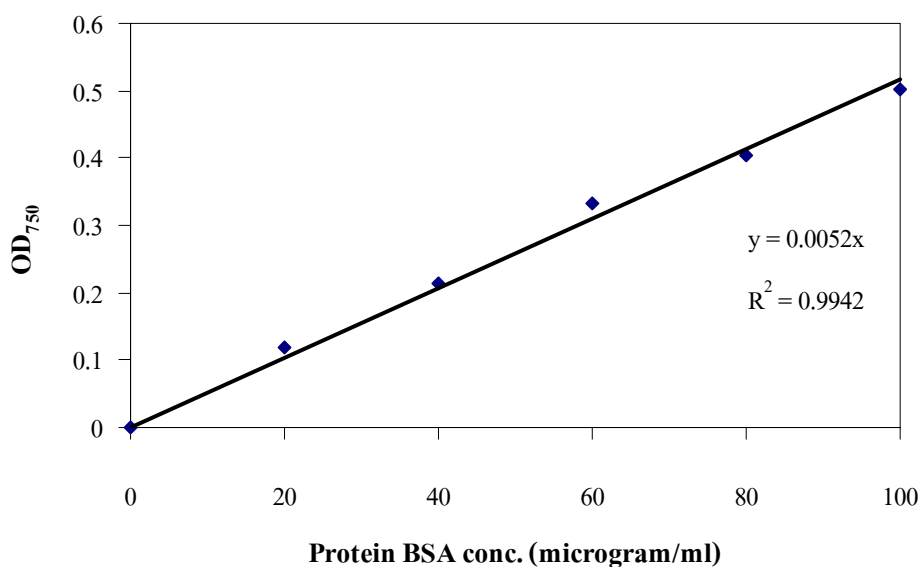


Figure-Appendix 1. Standard curve of standard solution protein BSA analysis by Lowry method.

2. ความเข้มข้นของเอทานอล (ดัดแปลงจาก Miyazaki *et al.*, 2007)

เครื่องมือ

Gas Chromatography (GC) รุ่น HP 6890 series บริษัท Shimadzu

สารเคมี

1. 50% H₃PO₄
2. Acetone
3. Ethanol 99 %

วิธีการ

1. นำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 50% H₃PO₄ 0.1 มิลลิลิตร
2. เขย่าให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที
3. นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ดูดเอาเฉพาะส่วนใน 1 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (GC) รุ่น HP 6890 series บริษัท Shimadzu

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column	: DB-FFAP
Column description	: ท่อเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 320 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร
Column Temperature	: 250 องศาเซลเซียส (50 องศาเซลเซียส จนถึง 250 องศาเซลเซียส)
Inject Temperature	: 200 องศาเซลเซียส
Detector	: FID (flame-ionized detector)
Carrier gas	: Helium
Flow rate	: 15 มิลลิลิตรต่อนาที

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธี Anthrone (Dreywood, 1946 อ้างโดย O-thong *et al.*, 2008)

เครื่องมือ

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi

สารเคมี

สารละลายแอนโทรน (anthrone) เตรียมโดยชั่งสารแอนโทรนมา 0.8 กรัม แล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) อย่างช้า ๆ จนครบปริมาตร 300 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการ

1. นำสารละลายแอนโทรน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. แช่เย็นทันที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
5. นำค่า OD ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับน้ำตาล

เตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีเดียวกับข้างต้นแต่จะใช้กลูโคสแทนสารละลายตัวอย่าง

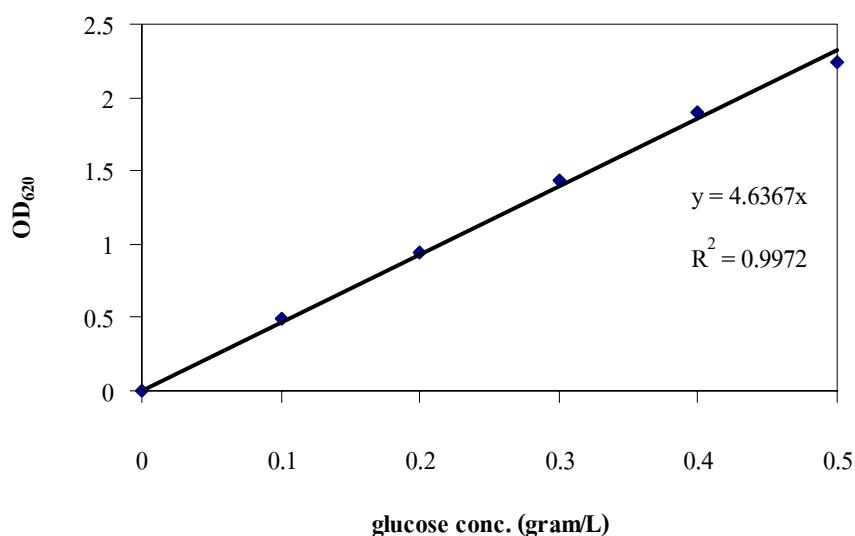


Figure-Appendix 2. Standard curve of standard solution glucose analysis by Anthrone method.

4. ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

วิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในน้ำที่ทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำที่ทิ้งจากเครื่องดีแคเตอร์ ได้แก่ อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100 series HPLC บริษัท Shimadzu ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column	: Aminex -87P 300X7.8 มิลลิเมตร
Mobile phase	: Water
Flow rate	: 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
Detector	: Refractive Index
Column Temperature	: 80 องศาเซลเซียส
Injection volumne	: 20 ไมโครลิตร

5. แร่ธาตุชนิดต่าง ๆ

วิเคราะห์หาแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ในน้ำที่มาจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำที่จากเครื่องดีแคนเตอร์ ได้แก่ โพแทสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) และสังกะสี (Zn) วิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวัดค่าการกลับคืนสู่สถานะพื้นของธาตุในกระบวนการ อิมิตชัน (emission) ด้วยเครื่องมือ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry; ICP แพลตฟอร์มด้วยโปรแกรมปฏิบัติการ Win lab 32 ตามวิธีมาตรฐาน AOAC. (1999) ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. การวิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical oxygen Demand, COD) (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

การหาปริมาตรน้ำตัวอย่าง

ปิเปตน้ำเสีย x มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ (เริ่มจากปริมาตรน้อย ๆ) เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 10 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันสังเกตให้สีของสารละลายเป็นสีส้มเหมือนสีของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$)

วิธีการ

ปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตรที่เหมาะสมจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 มิลลิลิตรใส่ขวดสำหรับวิเคราะห์ซีโอดี เติมเมอร์คิวริซัลเฟต ($HgSO_4$) 0.4 กรัม ใส่ลูกแก้ว 3-5 เม็ด เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 10 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเอเจนต์ (sulfuric reagent) 30 มิลลิลิตร นำขวดซีโอดีไปต่อกับ reflux condenser บนเตาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในที่มืด แล้วนำมาไทเทรตกับ $(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ โดยใช้ Ferroin เป็นอินดิเคเตอร์และใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างเป็นชุดควบคุม โดยจุดยุติจะได้สารละลายสีน้ำตาลแดง

$$\text{การคำนวณค่าซีโอดี (mg/L)} = [(a-b) \times N \times 1,000] / \text{ml Sample}$$

a : ปริมาตรของ $(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ใช้ในการไทเทรตชุดควบคุม

b : ปริมาตรของ $(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ใช้ในการไทเทรตน้ำตัวอย่าง

N : นอร์มัลลิตีของ $(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$

7. การวิเคราะห์ค่าบีโอดี (Biochemical oxygen demand, BOD) (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

การเตรียมน้ำเจือจาง

นำน้ำกลั่นที่แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส มาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 1 ลิตร) สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 1 ลิตร) สารละลาย

แคลเซียมคลอไรด์ (ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร) ตามลำดับ เทใส่ขวดบีโอดีแล้วเติมน้ำเสียตามช่วงเปอร์เซ็นต์การเจือจางที่เหมาะสมจนครบ 300 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดเพื่อให้ภายในเกิดการอิมัลชันด้วยออกซิเจนนำขวดที่วิเคราะห์ DO_0 มาไทเทรตด้วยโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) ความเข้มข้น 0.025 N สำหรับ DO_5 นำขวดบีโอดีที่มีน้ำอยู่ไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำมาไทเทรต (เติมน้ำบนฝาขวดทุกวันให้น้ำแห้ง)

การไทเทรต

นำขวดบีโอดีที่มีน้ำอยู่เติมมาเติมสารแมงกานีสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย alkali-iodide azide 2 มิลลิลิตร (ให้ปลายปิเปตจุ่มอยู่ในตัวอย่าง) ปิดจุกเขย่ากลับขวดไปมา วางทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่ก้นขวด เมื่อได้สารละลายส่วนใสด้านบนประมาณ 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร (ค่อย ๆ ปล่อยให้กรดลงเป็นสายข้างขวด) ปิดขวดเขย่าไปมาจนตกตะกอนละลายหมด รินสารละลายส่วนใสมา 203 มิลลิลิตร ลงในพลาสติก นำมาไทเทรตด้วยโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) ความเข้มข้น 0.025 N จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแข็ง 1-2 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตต่อจนได้สารละลายสีใส (ไม่มีสี)

$$\text{การคำนวณค่าบีโอดี (mg/L)} = (D_1 - D_2) / P$$

เมื่อ $D_1 =$ ค่า DO ของน้ำหลังการเตรียม (DO_0)

$$D_2 = \text{ค่า DO ของน้ำหลังการเพาะเลี้ยง 5 วัน (} DO_5 \text{)}$$

$P =$ Decimal fraction ของน้ำตัวอย่างที่ใช้

$$P = \% \text{ sewage in dilute sample} / 100$$

8. การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

นำถ้วย crucible มาล้างให้สะอาด นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของถ้วย จากนั้นเปิดน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยนำไปประเหยแห้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก นำค่าน้ำหนักถ้วยที่มรดกอนอยู่ลบด้วยน้ำหนักถ้วยในตอนแรก จะได้น้ำหนักของแข็ง

$$\text{Total solid (mg/L)} = [\text{mg Solid} \times 1,000] / \text{ml Sample}$$

9. การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended solid, SS) (APHA, AWWA and WPCF, 1988)

นำกระดาษกรองสำหรับการหาของแข็งแขวนลอยวางในกรวยกรอง (gooch crucible) ผ่านน้ำกลั่นลงไป ใช้เครื่องดูดอากาศดูดให้แห้ง นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมา

วางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาวางในกรวยกรองแล้วเปิดน้ำตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดอากาศดูดให้แห้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก นำกระดาษกรองหลังจากการอบครั้งที่สองซึ่งมีของแข็งแขวนลอยอยู่ลงน้ำหนักกระดาษกรองจะได้ปริมาณของแข็งแขวนลอย

$$\text{Suspended solid (mg/L)} = [\text{mg Solid} \times 1,000] / \text{ml Sample}$$

10. น้ำมันและกรีส ตามวิธี APHA, AWWA and WPCF (1988)

เครื่องมือ

อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus)

สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)
2. Diatomaceous-silica filter and suspension 10 กรัมต่อลิตรน้ำกลั่น

วิธีการ

1. วางกระดาษกรองใน Buchner funnel แล้วเทสารละลาย filter acid ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแห้ง
2. กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วดูดให้แห้ง
3. กีบกระดาษกรองออกมา แล้วม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกันแล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. ใส่ลงในชอคเลต
5. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา
6. ประกอบอุปกรณ์สกัด พร้อมทั้งน้ำอุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดสวิตช์ให้ความร้อน
7. ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำตัวอย่างที่ใส่ในหลอดตัวอย่างออกจากชอคเลต
8. นำขวดสกัดนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที
9. ชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำมันและกรีสจากสูตร

$$\text{ปริมาณของน้ำมันและกรีส (mg/L)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้} \times 1,000}{\text{มิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$

11. สารฟีนอล (Substances Reducing Folin's Phenol) (จินตนา แก้วบริสุทธิ์ (2541) ดัดแปลงจากวิธีการหาแทนนิน APHA AWWA and WEF (1998))

1. นำน้ำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. เติมฟอลินส์ฟีนอล 0.1 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำยาคาร์บอนेट-ทาร์เทรต 1.0 มิลลิลิตร
4. รอให้เกิดสี 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เทียบหาความเข้มข้นฟีนอลจากกราฟมาตรฐาน blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ
6. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายฟีนอลที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-15 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1-5

การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

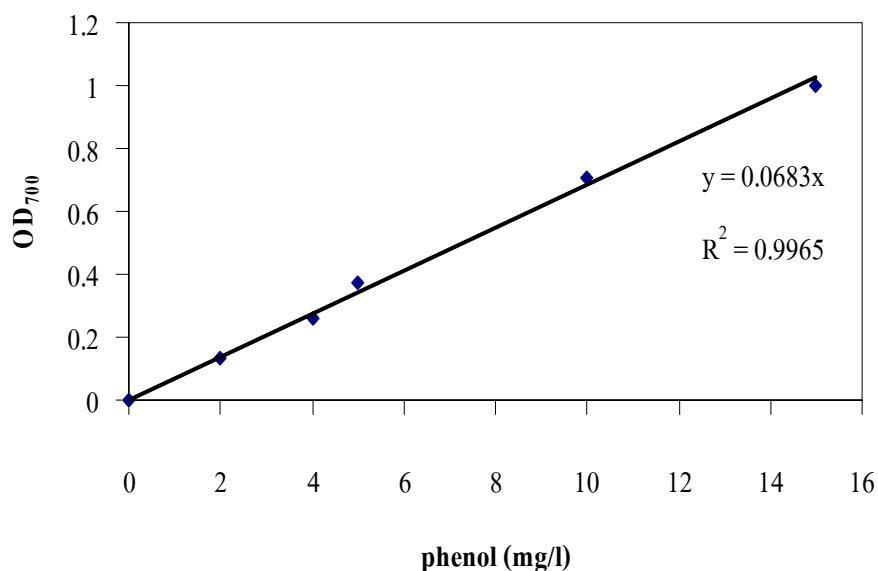


Figure-Appendix 3. Standard curve of phenol solution.

12. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธีของ A.O.A.C (1990)

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ สามารถวิเคราะห์ได้ตามวิธีของ Kjeldahl ซึ่งเป็นการให้ความร้อนพร้อมกับการใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นใช้ด่างพร้อมกับการกลั่นด้วยไอน้ำ และดักจับแอมโมเนียมที่กลั่นออกมาแล้วนำไปไทเทรตมี 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนการย่อย

นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดย่อย จากนั้นใส่สารผสม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ K_2SO_4 ปริมาณ 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 20 มิลลิลิตร วางหลอดย่อยในเตาย่อยแล้วประกบสายยางระหว่างฝาครอบขวดใส่ด่างและเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย เปิดสวิตช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อย แล้วตั้งอุณหภูมิที่ 200 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 400 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็น นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วใช้น้ำกลั่นล้างหลอดย่อยให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้กลั่นต่อไป

ขั้นตอนการกลั่นและไทเทรต

จัดอุปกรณ์การกลั่นและเปิดสวิตช์ให้ความร้อน เปิดน้ำหล่อเย็นและเครื่องควบแน่น จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้น 4%) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มอยู่ในสารละลายกรด จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้มา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เข้มข้น 40%) ลงไป 20 มิลลิลิตร กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่น ไทเทรตสารละลายที่ได้ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 N จนได้สารละลายสีม่วงคำนวณค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ปริมาณกรด} \times \text{นอร์มัลลิตี} \times 14}{\text{ปริมาณตัวอย่าง}}$$