การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในทะลายปาล์มด้วยวิธี Separation Hydrolysis and Fermentation

Ethanol Production from Cellulose in Oil Palm Empty Fruit Bunch by Separation Hydrolysis and Fermentation

สายฤดี ด้วงหวัง

Sairudee Duangwang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering
Prince of Songkla University
2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในทะลายปาล์มด้วยวิธี Separation Hydrolysis and Fermentation

ชื่อผู้เขียน นางสาวสายฤดี ด้วงหวัง

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

...

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชญานุช แสงวิเชียร)

คณะกรรมการสอบ

…...ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพงษ์ พุทธิวิสุทธิศักดิ์)

……...……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุภวรรณ ฏิระวณิชย์กุล)

.....……..……..……..กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ราม แย้มแสงสังข์)

.....……..……..……..กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชญานุช แสงวิเชียร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจาการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ_____

(_____)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ_____

(_____)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ_____

(_____)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในทะลายปาล์มด้วยวิธี Separation Hydrolysis and Fermentation
ชื่อผู้เขียน นางสาวสายฤดี ด้วงหวัง
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี
ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

ทะลายปาล์ม เป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล ในปัจจุบันมีการสนใจในการใช้เซลลูโลส เพื่อผลิตเป็นน้ำมันเชื้อเพลิง ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้เป็นวัตถุดิบที่มีราคาต่ำ และเป็นแหล่งของน้ำตาลสามารถนำมาหมักให้เป็นเอทานอลได้ สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในทะลายปาล์มด้วยวิธี Separation Hydrolysis and Fermentation (SHF) โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยแบ่งย่อยออกเป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง ศึกษาผลของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับกรดซัลฟิวริกเจือจาง อุณหภูมิและเวลาในการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อเพิ่มปริมาณเซลลูโลส วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ถูกใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์คือ อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 61.94 สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง คือ อุณหภูมิ 119 องศาเซลเซียส เวลา 50 นาที และความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 43.28 ผลของการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับกรดซัลฟิวริกเจือจาง พบว่า ได้ปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 54.7 และเพื่อหาสารที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพวัตถุดิบ จึงทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบระหว่างกรดซัลฟิวริก

ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที พบว่าการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงกว่ากรดและน้ำตามลำดับ ดังนั้นโซเดียมไฮดรอกไซด์จึงเป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพวัตถุดิบ ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาผลของการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาล โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาล พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้สำหรับการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลส คือ อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส คือ อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 110 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และในส่วนที่ 3 เป็นการศึกษาผลของเวลาในการหมัก ปริมาณเชื้อยีสต์ในการหมักเอทานอล และเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ขนมปังและลูกแป้ง พบว่า ยีสต์ขนมปังให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าลูกแป้งประมาณ 56 เท่า โดยยีสต์ขนมปังให้ปริมาณเอทานอลในช่วง 6.23 – 8.49 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ ลูกแป้งให้ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 0.05 – 0.21 กรัมต่อลิตร และพบว่าได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 8.49 กรัมต่อลิตร โดยเติมยีสต์ขนมปัง 1.5 กรัม และเวลาในการหมัก 3 วัน

Thesis Title Ethanol Production from Cellulose in Oil Palm Empty Fruit Bunch by Separation Hydrolysis and Fermentation

Author Miss Sairudee Duangwang

Major Program Chemical Engineering

Academic Year 2012

ABSTRACT

Oil palm empty fruit bunch (OPEFB) is a potential source of lignocelluloses (cellulose, hemicelluloses and lignin) which can serve as a promising raw material for the production of ethanol. The increasing interest on use of lignocellulosic waste for bioconversion to fuels and chemicals are justifiable as these materials are low cost, renewable and widespread sources of sugars. Therefore objective of this study was to investigate the production of ethanol from cellulose in oil palm empty fruit bunch by Separation Hydrolysis and Fermentation (SHF) was divided into three parts: the first part is to find the optimal conditions for pretreatment. Subdivided by the effect of sodium hydroxide concentration (Alkali pretreatment), Effect of sulfuric acid concentration (Acid pretreatment), Effect of sodium hydroxide pretreatment accompany with sulfuric acid pretreatment, Temperature and time to pretreated. Response Surface Methodology (RSM) was followed to optimize the pretreatment process in order to obtain high amount of cellulose (%). The optimum reaction temperature, reaction time and sodium hydroxide concentration were found to be 130 $^{\circ}$C, 40 min and 15% (w/v), respectively. The maximum value of cellulose was obtained 61.94% by using the above condition. For acid pretreatment, the optimum condition was 119 $^{\circ}$C as the reaction temperature, 50 as the reaction time min and 0.1% (w/v) sulfuric acid. The maximum value of cellulose was obtained 43.28% by using the above condition. And after that use both conditions to pretreated OPEFB by boiling the alkali first, washed and followed by the acid. The value of cellulose was obtained 54.7%. Comparison of

cellulose prepared by acid, alkali and water at the same reaction temperature, reaction time and chemical concentration were 130 °C, 40 min and 15% (w/v), respectively. Found that the maximum value of cellulose was 68.8 % by alkali pretreatment. The second part is optimizing hydrolysis pretreated OPEFB with acid in order to get sugar. The optimum conditions for hydrolysis to xylose of this research was 140 °C for 90 minutes and 7 % (w/v) sulfuric acid. The optimum conditions for hydrolysis to glucose was 140 ° C for 110 minutes and 7 % (w/v) sulfuric acid. In the third part was to optimize and study the effect of time to ferment, amount of yeast and compare amount of ethanol from fermentation between baker's yeast and Loogpang. The results show that baker's yeast gave more amount of ethanol than Loogpang about 56 times. The optimum fermentation time was 3 days and 1.5 g of baker's yeast.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชญานุช แสงวิเชียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย แนวทางในการค้นคว้าหาข้อมูลและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ดำเนินไปอย่างสมบูรณ์ รวมถึงการขัดเกลากระบวนการคิด การแก้ไขปัญหาและแนวทางในการดำเนินชีวิต

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพงษ์ พุทธิวิสุทธิศักดิ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สุภวรรณ ฏิระวณิชย์กุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ราม แย้มแสงสังข์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณโครงการสาขาความเป็นเลิศทางวิศวกรรมเคมีที่ให้ทุนการศึกษาและค่าครองชีพตั้งแต่ปีการศึกษา 2553 ถึงปีการศึกษา 2555

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และบัณฑิตวิทยาลัย ที่จัดสรรเงินทุนในการวิจัย ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ที่ให้สถานที่ในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ และเพื่อนๆ ที่สนับสนุนให้กำลังใจและทุนทรัพย์ในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนขอขอบคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้ให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

สายฤดี ด้วงหวัง

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (10)

รายการตาราง (14)

รายการภาพประกอบ (15)

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

ตรวจเอกสาร

1.2 ปาล์มน้ำมัน 3

1.3 ลูกแป้ง 5

1.4 องค์ประกอบของเซลพืช 7

1.5 เอทานอล 12

1.6 ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเศษเหลือซึ่งเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส 13

1.7 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment) 14

1.8 กระบวนการย่อย (Hydrolysis) 17

1.9 กระบวนการหมัก (Fermentation) 19

1.10 ลักษณะของลิกโนเซลลูโลส หรือสารตั้งต้น 22

1.11 วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) 23

1.12 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 25

1.13 ขอบเขตการวิจัย 26

1.14 ประโยชน์ที่ได้รับจากการทำงานวิจัย 26

บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ 27

2.2 อุปกรณ์ 27

2.3 วิธีการทดลอง 27

2.4 ศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 28

2.5 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและลิกนิน 34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 ศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง 36
2.7 ศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์กับกรดซัลฟิวริกเจือจาง 38
2.8 การย่อยเซลลูโลส (Hydrolysis) 39
2.9 การหมัก (Fermentation) 42
บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล
3.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของทะลายปาล์ม 43
3.2 ผลการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 43
3.3 ผลการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง 50
3.4 ผลการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Alkali pretreatment ร่วมกับการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Acid pretreatment 56
3.5 ผลการศึกษาองค์ประกอบในทะลายปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก น้ำ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี 57
3.6 ผลการศึกษาการย่อยเซลลูโลส (Hydrolysis) 58
3.7 ผลการศึกษาการหมัก (Fermentation) 65
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง
5.1 สรุปผลการวิจัย 69
5.2 ข้อเสนอแนะ 71
เอกสารอ้างอิง 72
ภาคผนวก 76
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์ 77
ภาคผนวก ข เครื่องมือวิเคราะห์ 80

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน 83
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Essential Regression 85
ภาคผนวก จ ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์ 94

ประวัติผู้เขียน 105

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในทะลายปาล์มเปล่า Cellulose hemicellulose and lignin contents in oil palm empty fruit bunch	9
2	ช่วงการทดลองและระดับของปัจจัย Experimental range and levels of independent process	29
3	รหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design (CCD) Code of variables from Central composite experimental design	31
4	แปลงรหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design Decode of variables from Central composite experimental design	32
5	ช่วงการทดลองและระดับของปัจจัย Experimental range and levels of independent process	36
6	รหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design (CCD) Code of variables from Central composite experimental design	37
7	แปลงรหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design Decode of variables from Central composite experimental design	38
8	ช่วงการทดลองและระดับของปัจจัย Experimental range and levels of independent process	39
9	รหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design (CCD) Code of variables from Central composite experimental design	40
10	แปลงรหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design Decode of variables from Central composite experimental design	41
11	ผลการทดลองการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่สภาวะต่างๆ The results of pretreatment with sodium hydroxide solution at various conditions	45

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการคำนวณโดยใช้แบบจำลอง The amount of cellulose were compared with values obtained from calculations using the model	46
13	ผลการทดลองการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่สภาวะต่างๆ The results of pretreatment with diluted sulfuric acid solution at various conditions	51
14	ผลการทดลองการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่สภาวะต่างๆ The results of pretreatment with diluted sulfuric acid solution at various conditions	59
15	กลูโคสและไซโลสที่ได้จากการทดลองการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่สภาวะต่างๆ The results of glucose and xylose with diluted sulfuric acid solution at various conditions	64

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 1	ทะลายปาล์มเปล่า	4
Figure 1	Oil palm empty fruit bunch	
ภาพที่ 2	เส้นใยจากทะลายปาล์มเปล่า	4
Figure 2	Fiber of oil palm empty fruit bunch	
ภาพที่ 3.	โครงสร้างของเซลลูโลส	7
Figure 3	The structure of cellulose	
ภาพที่ 4	การแยกองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช	8
Figure 4	Cell wall compositions	
ภาพที่ 5	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	10
Figure 5	The structure of hemicelluloses	
ภาพที่ 6	โครงสร้างของลิกนิน	11
Figure 6	The structure of lignin	
ภาพที่ 7	สูตรโครงสร้างของเอทาอล	13
Figure 7	The Structure formula of ethanol	
ภาพที่ 8	กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส	14
Figure 8	Ethanol production process from lignocelluloses material	
ภาพที่ 9	ผลของการสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)	15
Figure 9	The result of pretreatment	
ภาพที่ 10	กลไกการย่อยของ β-1-4 glucan ด้วยกรด	18
Figure 10	Mechanism of acid catalyzed hydrolysis of β-1-4 glucan.	
ภาพที่ 11	หน้าต่างของโปรแกรม Essential Regression	29
Figure 11	Window of Essential Regression program	
ภาพที่ 12	ทะลายปาล์มที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์	33
Figure 12	OPEFB soaked in Sodiumhydroxide solution	
ภาพที่ 13	ทะลายปาล์มที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ถูกให้ความร้อน	33
Figure 13	OPEFB soaked in Sodiumhydroxide solutions were heated by oil bath	

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 14	ตัวอย่างที่เติมสารละลาย Acid detergent และ Decahydronapthalene แล้วนำมาให้ความร้อน	34
Figure 14	The treated of OPEFB was heated	
ภาพที่ 15	ตัวอย่างถูกกรองผ่านครูซิเบิล และล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อน	35
Figure 15	The treated of OPEFB filtered through crucible and washed by hot water	
ภาพที่ 16	ตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด้วยกรด ถูกนำไปล้างแล้วอบ	35
Figure 16	The treated of OPEFB soaked with acid was washed and dried in oven	
ภาพที่ 17	ความสัมพันธ์ในรูปกราฟเชิงเส้นระหว่างปริมาณเซลลูโลสจากการทดลองและปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการคำนวณตามแบบจำลอง	47
Figure 17	Linear relationships between the amount of cellulose in experiment and the amount of cellulose were calculated by the model	
ภาพที่ 18	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส	48
Figure 18	Surface plots showing the relationship between temperature and time effect the amount of cellulose	
ภาพที่ 19	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส	49
Figure 19	Surface plots showing the relationship between temperature and concentration effect the amount of cellulose	
ภาพที่ 20	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส	50
Figure 20	Surface plots showing the relationship between time and concentration effect the amount of cellulose	
ภาพที่ 21	ความสัมพันธ์ในรูปกราฟเชิงเส้นระหว่างปริมาณเซลลูโลสจากการทดลองและปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการคำนวณตามแบบจำลอง	53
Figure 21	Linear relationships between the amount of cellulose in experiment and the amount of cellulose were calculated by the model	

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 22	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส	54
Figure 22	Surface plots showing the relationship between temperature and concentration effect the amount of cellulose	
ภาพที่ 23	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส	55
Figure 23	Surface plots showing the relationship between temperature and time effect the amount of cellulose	
ภาพที่ 24	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส	55
Figure 24	Surface plots showing the relationship between time and concentration effect the amount of cellulose	
ภาพที่ 25	ผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Alkali pretreatment ร่วมกับการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Acid pretreatment	56
Figure 25	The result of Alkali pretreatment together with Alkali pretreatment	
ภาพที่ 26	องค์ประกอบในทะลายปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอก ไซด์ และน้ำ ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที ความเข้มข้นของสารร้อยละ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี	57
Figure 26	Component in OPEFB after pretreated by chemical methods and untreated 130°C, reaction time of 40 minutes and 15 %wt of chemical.	
ภาพที่ 27	ความสัมพันธ์ในรูปกราฟเชิงเส้นระหว่างปริมาณกลูโคสที่ได้จากการทดลองและปริมาณกลูโคสที่ได้จากการคำนวณตามแบบจำลอง	60
Figure 27	Linear relationships between the amount of glucose in experiment and the amount of glucose were calculated by the model	

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 28	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส	61
Figure 28	Surface plots showing the relationship between temperature and concentration effect the amount of glucose	
ภาพที่ 29	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส	62
Figure 29	Surface plots showing the relationship between temperature and time effect the amount of glucose	
ภาพที่ 30	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส	63
Figure 30	Surface plots showing the relationship between time and concentration effect the amount of glucose	
ภาพที่ 31	ปริมาณเอทานอลจากการหมักด้วยยีสต์ขนมปังเปรียบเทียบกับลูกแป้งข้าวหมาก	66
Figure 31	Amount of ethanol fermented with baker’s yeast compared with Loogpang	
ภาพที่ 32	ปริมาณเอทานอลจากการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	67
Figure 32	Amount of ethanol from fermentation with baker’s yeast	

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากการที่รัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมให้มีการศึกษาและพัฒนาพลังงานทดแทนที่มาจากชีวมวลโดยมีการดำเนินการให้นโยบายด้านพลังงานทดแทนเป็นวาระแห่งชาติ ซึ่งจะสนับสนุนการผลิตและการใช้พลังงานทดแทน โดยเฉพาะการพัฒนาเชื้อเพลิงชีวมวล เช่น แก๊สโซฮอล์ อี 10 อี 20 และอี 85 เป็นต้น เพื่อเสริมสร้างความมั่นคงด้านพลังงาน ลดภาวะมลพิษ และเพื่อประโยชน์ของเกษตรกรโดยสนับสนุนให้มีการผลิตและใช้พลังงานหมุนเวียนภายใต้มาตรการสร้างแรงจูงใจที่เหมาะสม ตลอดจนส่งเสริมและวิจัยพัฒนาพลังงานทดแทนทุกรูปแบบอย่างจริงจังและต่อเนื่อง ประจวบกับการจัดทำแผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปีของ กระทรวงพลังงานได้ตั้งเป้าหมายเพิ่มสัดส่วนการใช้พลังงานทดแทนทุกรูปแบบเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 20 ของการใช้พลังงานขั้นสุดท้ายของประเทศในปี พ.ศ. 2565 จากเดิมที่มีการกำหนดเป้าหมายเพิ่มการใช้พลังงานทดแทนจากร้อยละ 0.5 เป็นร้อยละ 8 ในปี พ.ศ. 2554 เท่านั้น (ปัจจุบันมีการใช้พลังงานร้อยละ 5.8 ประหยัดเงินได้ 94,000 ล้านบาทต่อปี) เพื่อผลักดันให้เกิดการพัฒนาพลังงานทดแทน เป็นแหล่งพลังงานหลักของประเทศจะช่วยให้ประเทศไทยประหยัดการนำเข้าพลังงานได้ 608,000 ล้านบาท ต่อปี รวมทั้งยังช่วยลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจกได้ปีละ 42 ล้านตัน ภายในปี 2565 ประเทศไทยจะเป็นผู้นำด้านพลังงานทดแทนระดับแนวหน้าของเอเชียที่มีศักยภาพสูง รวมทั้งสนับสนุนให้ประเทศไทยเป็นศูนย์ส่งออกเชื้อเพลิงชีวภาพ เคมีภัณฑ์และส่งออกเทคโนโลยีพลังงานทดแทนในภูมิภาคเอเชีย ดังนั้นการศึกษาและวิจัยพลังงานทดแทนจึงเป็นเรื่องเร่งด่วนและควรสนับสนุนให้หน่วยงานที่มีความพร้อมดำเนินการอย่างรวดเร็ว

พลังงานชีวมวลที่ผลิตจากเอทานอลมีศักยภาพสูงในการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แม้ว่าจะมีแหล่งทรัพยากรปิโตรเลียมและก๊าซธรรมชาติเป็นของตนเอง แต่ก็ไม่เพียงพอกับปริมาณความต้องการ ทำให้ต้องนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ ซึ่งในระยะหลังประสบปัญหาเรื่องราคาน้ำมันสูงขึ้น ทำให้ต้องเผชิญกับความเสียเปรียบทางด้านเศรษฐกิจ เพื่อลดปริมาณการนำเข้าน้ำมัน จึงมีการพิจารณาแหล่งพลังงานอื่นเพื่อทดแทนน้ำมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งการพิจารณาถึงวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีอยู่ในประเทศที่สามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนได้

เอทานอล เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นหอม ติดไฟง่าย ซึ่งเอทานอลมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ เป็นพลังงานทดแทนที่มีการเผาไหม้สะอาด ไม่สร้างก๊าซพิษ ช่วยลดการเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งยัง ช่วยทดแทนสารเพิ่มค่าออกเทน MTBE (methyl tertiary butyl ether) ช่วยประหยัดเงินตราต่างประเทศในการนำเข้า MTBE และน้ำมันได้ไม่น้อยกว่า 13,000 ล้านบาทต่อปี นอกจากนี้ในปี 1991 สหรัฐอเมริกายังได้ออกกฎหมายอากาศบริสุทธิ์ (Clean Air Act) โดยพยายามลดการใช้สาร MTBE ซึ่งเป็นสารเพิ่มออกเทน ที่ผสมในน้ำมันเบนซิน และเป็นสารก่อมะเร็ง เอทานอลจึงเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่มีคุณค่ามากในปัจจุบันนี้ โดยวัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตเอทานอลส่วนใหญ่มี 3 ชนิด คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้งและลิกโนเซลลูโลส ประเทศไทยสามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพตั้งแต่อดีตจวบจนปัจจุบัน และได้พัฒนาการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังอย่างต่อเนื่อง ซึ่งยังคงได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงมากขึ้นในปัจจุบัน สำหรับการนำเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบนั้น ยังอยู่ระหว่างการพัฒนาจากระดับเครื่องต้นแบบสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นการสนับสนุนการศึกษาวิจัยในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสดูจะมีความสำคัญมากที่สุดในขณะนี้ รองลงมาคือการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรสามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ โดยวัสดุเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมากในภาคใต้ของประเทศไทยคือ ผลพลอยได้จากจากปาล์มน้ำมัน ซึ่งปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ปลูกมากในภาคใต้ของประเทศไทย ประกอบด้วย ต้นปาล์ม เส้นใยปาล์ม ทางใบปาล์ม และทะลายปาล์ม ซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ เซลลูโลส ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์

โดยงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในทะลายปาล์มด้วยวิธีSeparation Hydrolysis and Fermentation (SHF) เพื่อทำให้มีการนำชีวมวลปาล์มซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำมันปาล์มมาใช้ให้เกิดประโยชน์ แทนที่จะนำชีวมวลปาล์มไปทิ้งทำให้เกิดขยะเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เหตุผลที่ใช้ทะลายปาล์มเนื่องจาก จากงานวิจัยโดยความร่วมมือของประเทศมาเลเซียและเดนมาร์ก พบว่า ทะลายปาล์ม ต้นปาล์มและทางใบปาล์ม มีปริมาณเซลลูโลสที่ใกล้เคียงกัน เมื่อนำมาผลิตเอทานอล ทะลายปาล์มให้ปริมาณเอทานอลที่มากกว่าทางใบปาล์มแต่ใกล้เคียงกับต้นปาล์ม งานวิจัยนี้จึงเลือก ผลิตเอทานอลจากทะลายปาล์มเนื่องจากต้นปาล์มมีส่วนของลิกนิน อยู่ในปริมาณสูง ทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณในการกำจัดลิกนินออก ประกอบกับทะลายปาล์มเปล่าเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มอีกด้วย

ตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมัน

ชื่อสามัญ ปาล์มน้ำมัน (Oil palm) น้ำมันปาล์ม (crude palm oil) เรียกย่อว่า CPO

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name): *Elaeis guineensis* Jacq.

วงศ์ (Family): Palmae หรือ Recaceae

จีนัส (Genus): Elaeis

สปีชีส์ (Species): guineensis

ถิ่นกำเนิด อยู่แถบแอฟริกา แพร่กระจายพันธุ์ปลูกอยู่ในเขตภูมิอากาศร้อนชื้น ที่เส้นรุ้ง 10 องศาเหนือ-ใต้ แหล่งผลิตใหญ่ของโลก อยู่ในมาเลเซีย อินโดนีเซีย พื้นที่ปลูกประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของโลก แหล่งปลูกปัจจุบันอยู่ในมาเลเซีย อินโดนีเซีย ไนจีเรีย ไทย โคลัมเบีย อินเดีย และแหล่งปลูกใหม่ของประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า กัมพูชา ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูง ทำให้มีต้นทุนการผลิตและราคาต่ำกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่นๆ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายทั้งในสินค้าอุปโภคและบริโภค ส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันพืชของโลกจึงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วแต่ ภายใต้ข้อตกลงการค้าระหว่างประเทศที่ทุกประเทศพยายามที่จะให้มีการเปิดเสรีการค้าระหว่างประเทศซึ่งกันและกัน ส่งผลให้น้ำมันปาล์มเป็นสินค้าหนึ่งที่ไทยมีความเสียเปรียบ ซึ่งปาล์มน้ำมันเหมาะสมกับภาพอากาศร้อนชื้น จัดอยู่บริเวณใกล้เคียงกับเส้นศูนย์สูตร

1.1 พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเจริญเติบโตได้ดีในภาคใต้ของประเทศบริเวณพื้นที่ที่ปลูกมากที่สุด คือจังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูลและตรัง โดยจังหวัดกระบี่ ปลูกมากที่สุดจำนวน 537,637 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 39.40 และรองลงมาได้แก่จังหวัดสุราษฎร์ธานี 405,213 ไร่ และจังหวัดชุมพร 216798 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 29.70 และ 15.89 ของพื้นที่ปลูกทั้งประเทศตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากผลตอบแทนการปลูกปาล์มน้ำมันดีกว่าการปลูกพืชชนิดอื่นเช่นยางพาราและการทำนาข้าว จึงเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูกประกอบกับมีโครงการเปลี่ยนพื้นที่ปลูกปาล์มทั่วประเทศ คาดว่าปริมาณความต้องการน้ำมันปาล์มภายในเพิ่มขึ้นมากทั้งนี้เพราะราคาน้ำมันปาล์มในตลาดโลกมีแนวโน้มสูงขึ้น ทำให้ความแตกต่างของราคาภายในและภายนอกประเทศไม่จูงใจให้มีการลักลอบเข้ามาบริโภคทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงเช่นกัน

จากการสอบถามผู้ประกอบการโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพบว่า ทะลายปาล์ม 100% ภายหลังจากแยกผลออกแล้ว จะได้ผลปาล์มประมาณ 75% ที่เหลือ 25% เป็นทะลายปาล์ม

เปล่า ส่วนผลปาล์มจะเข้ากระบวนการหีบน้ำมัน จะได้เส้นใยประมาณ 13% โดยในปี 2554 มีปริมาณปาล์มน้ำมันที่ผลิตได้ประมาณ 4 ล้านตัน

ภาพที่ 1 ทะลายปาล์มเปล่า

Figure 1 Oil palm empty fruit bunch

ภาพที่ 2 เส้นใยจากทะลายปาล์มเปล่า

Figure 2 Fiber of oil palm empty fruit bunch

1.2 การใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน

เส้นใยปาล์ม กะลาปาล์ม เป็นต้น ซึ่งของเสียเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในส่วนของหม้อนึ่งไอน้ำของกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มและก่อให้เกิดของเสียในรูปของเถ้าเป็นจำนวนมากในที่สุด เถ้าที่เกิดขึ้นมีขนาดอนุภาคเล็กน้ำหนักเบา อาจจะเกิดการฟุ้งกระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดอย่างถูกวิธีเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดมลพิษทางอากาศซึ่งอาจทำให้เป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ การนำเถ้ามาเป็นตัวดูดซับเป็นวิธีและมาตรการหนึ่งที่สำคัญและถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย อาทิเช่น การนำเถ้าไปใช้ประโยชน์ในการเป็นตัวดูดซับโลหะหนักในกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่มีโลหะหนักโดยใช้กระบวนการดูดซับเพราะอนุภาคของเถ้ามีพื้นที่ผิวและขนาดของรูพรุนที่เหมาะสม นอกจากนี้เนื่องจากเถ้ามีส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ SiO_2, CaO, Al_2O_3 และ Fe_2O_3 ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของวัสดุปอซโซลาน ซึ่งวัสดุปอซโซลานนั้นสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการปรับเสถียร/การทำให้เป็นก้อนแข็งรวมกับซีเมนต์ได้ ดังนั้นเถ้าจึงถูกนำไปใช้เป็นวัสดุปอซโซลานสำหรับการปรับเสถียร/การทำให้เป็นก้อนแข็งของกากตะกอนของโลหะหนัก ซึ่งทำให้ได้ก้อนแข็งที่มีเสถียรภาพซึ่งเมื่อทดสอบค่ารับแรงอัดและค่าการชะละลายของโลหะหนักแล้วสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นวัสดุก่อสร้างได้ดี (Boonma, 2011)

2. ลูกแป้ง

ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักข้าวหมาก อุ และสาโท และแม้แต่น้ำส้มสายชูและขนมถ้วยฟู ในลูกแป้งสำหรับการหมักสาโทจะมีเชื้อราและเชื้อยีสต์ผสมกันอยู่ ทำหน้าที่ในการหมักข้าวให้เป็นน้ำตาล และ เกิด แอลกอฮอล์ขึ้นตามลำดับ สูตรการทำลูกแป้ง เป็นสูตรที่ถ่ายทอดกันมาในครอบครัว และมักปิดเป็นความลับ อย่างไรก็ตาม ได้มีผู้ตีพิมพ์สูตรลูกแป้งไว้หลายแห่ง และรวบรวมไว้โดยศาสตราจารย์นภา โล่ห์ทอง ในหนังสือกล้าเชื้ออาหารหมัก

ความเชื่อที่ว่าสมุนไพรในลูกแป้ง เป็นสิ่งที่ทำให้เกิดกลิ่นรสของสาโทนั้น ไม่มีหลักฐานยืนยันทางวิทยาศาสตร์ อย่างไรก็ตาม การใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการหมักสาโท ยังให้กลิ่นรสแตกต่างจากการใช้ลูกแป้ง ซึ่งอาจเกิดจากใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์เพียง 2 ชนิด คือ ราและยีสต์ แต่ในการหมักจากลูกแป้ง อาจมีจุลินทรีย์หลายชนิด มีส่วนร่วมในการหมักด้วย

เป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ในรูปเชื้อแห้ง คนในสมัยโบราณคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ในรูปของลูกแป้ง จุลินทรีย์ที่พบมากในลูกแป้งมีทั้งราและยีสต์ ลูกแป้งมีหลายชนิด เช่น ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งข้าวหมาก เนื่องจากรัฐบาลมีกฎหมายห้ามผลิตครอบครองและจำหน่ายโดยไม่ได้รับอนุญาต ทำให้เชื้อรา ยีสต์ และสูตรลูกแป้งดีๆสูญหายไปอย่างน่าเสียดาย โดยลูกแป้งแต่ละพื้นที่จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน

ลูกแป้งข้าวหมากมีลักษณะเป็นก้อนแห้งครึ่งวงกลม สีขาวนวล เนื้อแป้งโปร่งมีเส้นใยของเชื้อราเกาะอยู่ทั่วไป เมื่อมีอายุมากจะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น ลูกแป้งจะมีเชื้อราและยีสต์ต่างสายพันธุ์กัน ลูกแป้งที่ดีจะต้องใช้แป้งเชื้อที่ดี มีการรักษาความสะอาด ควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นขณะทำลูกแป้งให้พอเหมาะ ส่วนประกอบที่สำคัญของลูกแป้ง ได้แก่ เครื่องเทศ น้ำ และแป้งเชื้อลูกแป้ง

เชื้อราที่พบในลูกแป้ง

1. Group I (สร้างเอนไซม์ที่มีแอคติวิตี้สูง,กรดฟูมาลิค ซิตริค แลคติค)

   Class Zygomycetes

   Order Mucorales

   Family Mucoraceae

   Genus Rhizopus sp., Mucor sp., Amylomyces

2. Group II (ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า)

   Class Deuteromycetes

   Order Moniliales

   Family Moniaceae

   Genus Aspergillus sp.

ยีสต์ที่พบในลูกแป้ง

1. **Ascomycetous yeast**

   Class Ascomycetes

   Subclass Hemiascomycetidae

   Order Endomycetales

   Family Saccharomycetideae

   Genus Saccharomyces sp., Endomycopsis sp., Hansenula sp.

2. **Blastomycetes yeast**

   Class Blastomycetes

   Family Cryptococcaceae

   Genus Tolulopsis sp.

3. **Saccharomyces yeast**

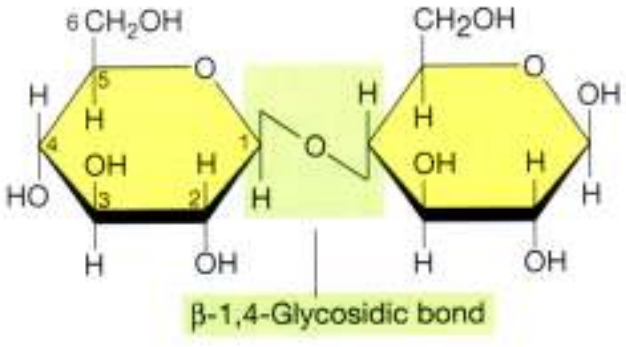
ยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมปัง โดยทั่วไป คือ *Saccharomyces cerevisiae* ในงานวิจัยนี้จะใช้ยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมากและยีสต์จากขนมปังในการหมักเอทานอล

3. องค์ประกอบของเซลพืช

3.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลเป็น $(C_6H_{10}O_5)_n$ เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) ในพืช เกิดจากกลูโคสประมาณ 50,000 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว แต่ละสายของสายของเซลลูโลสเรียงขนานกันไป มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสาย ทำให้มีลักษณะเป็นเส้นใย สะสมไว้ในพืชไม่พบในเซลล์สัตว์เซลลูโลสไม่ละลายน้ำและร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถย่อยสลายได้

เซลลูโลสเมื่อถูกย่อยจะแตกตัวออก ให้น้ำตาลกลูโคสจำนวนมาก เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ (structural carbohydrate) ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือโมเลกุลของกลูโคส (glucose subunits) 1,000-10,000 โมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 200,000-2,000,000 หน่วยย่อยพื้นฐาน (basic subunit) คือ เซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุล ต่อกันด้วยพันธะ β-(1-4)-glycosidic (Johnson, 2006) โดยที่ไม่มีการแตกแขนง เซลลูโลสใน primary cell wall ประกอบด้วยกลูโคสยาวประมาณ 2,000 โมเลกุล และอย่างน้อย 14,000 โมเลกุลใน secondary cell wall โดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะเกาะกันเป็นคู่ตามยาวและเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คู่ เรียกว่า microfibril ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ของพืช ปริมาณของเซลลูโลสอาจพบน้อยมากในส่วนที่สะสมอาหาร เช่น ในอินทผาลัมมีเพียง 0.8% ขณะที่ในส่วนของเส้นใยฝ้าย (cotton fibers) มีมากถึง 98% โดยเซลลูโลสสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ สามารถแตกออกเป็นหน่วยของกลูโคสได้โดยการเตรียมทางเคมีใช้กรดเข้มข้น และอุณหภูมิสูง

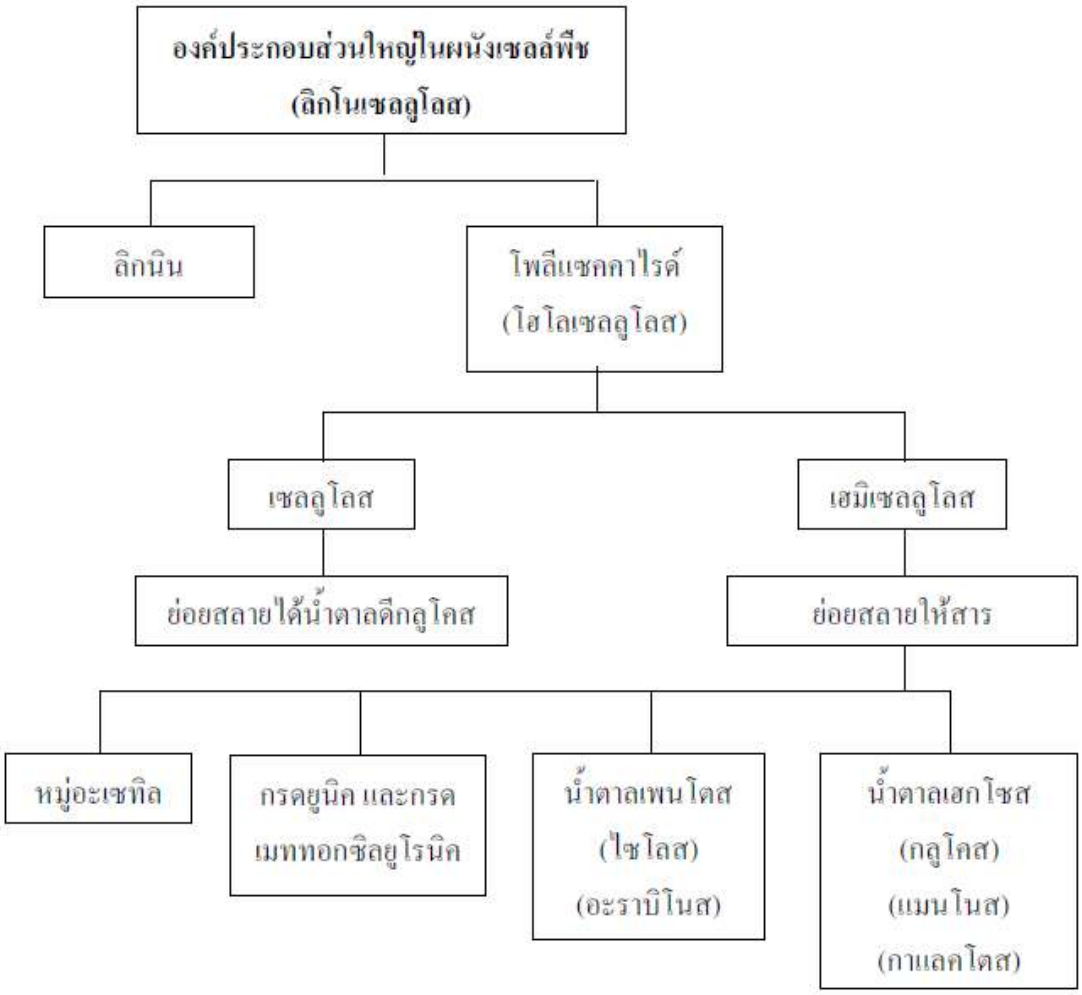


ภาพที่ 3. โครงสร้างของเซลลูโลส

Figure 3 The structure of cellulose

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulose

ในเส้นใยของพืชจะประกอบไปด้วยเซลลูโลสร้อยละ 30 ถึง 60 โดยน้ำหนักแห้ง (Chiaramonti, 2007) เมื่อเทียบกับแป้งแล้ว เซลลูโลสมีความเป็นผลึกมากกว่า แป้งมีการสลายตัวของผลึกที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส ส่วนเซลลูโลสต้องใช้อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส ความดัน 25 เมกะปาสคาล (Lee, 1997)



ภาพที่ 4 การแยกองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช

Figure 4 Cell wall compositions.

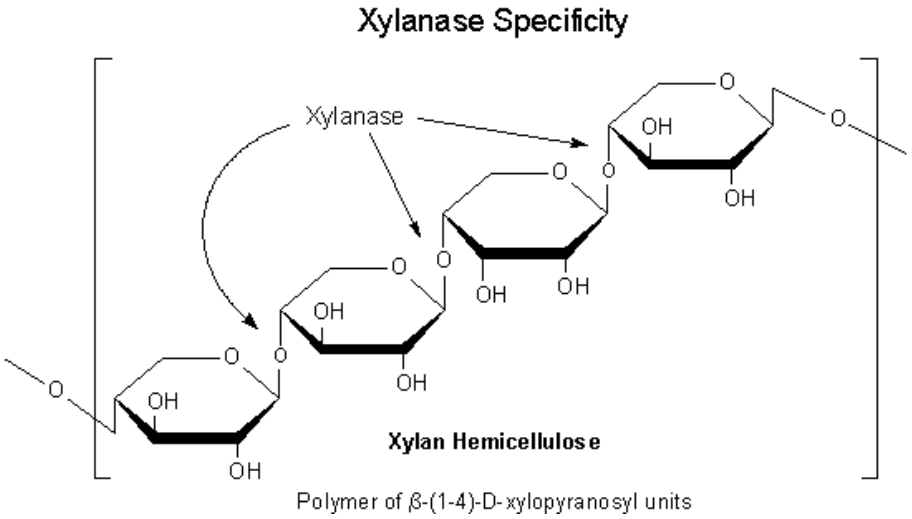
ตารางที่ 1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในทะลายปาล์มเปล่า

Table 1 Cellulose hemicellulose and lignin contents in oil palm empty fruit bunch

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		
	Loboguerrero และคณะ (2007)	Abdul และคณะ (2002)	Rahman และคณะ (2006)
เซลลูโลส	46.77	15.47	42.85
เฮมิเซลลูโลส	17.92	11.73	24.01
ลิกนิน	4.15	7.14	11.70
เถ้า	-	0.67	0.52
น้ำมัน	-	-	-
ความชื้น	-	65.00	-
อื่นๆ	-	-	20.92

3.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสเป็น Heteropolymer ซึ่งคล้ายเซลลูโลสแต่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยรวมอยู่กับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน เซลลูโลส เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ พบมากในแกลบ ซังข้าวโพด เฮกโซแซน สูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{12}O_5)_{2n}$ โครงสร้างทางเคมีหลายๆชนิด เช่น arabinoxylans ซึ่งพบเฮมิเซลลูโลสอยู่ติดกับเซลลูโลสในโครงสร้างผนังของเซลพืช ในขณะที่เซลลูโลสมีความเป็นผลึก แข็งแรง ยากต่อการไฮโดรไลซีส แต่เฮมิเซลลูโลสจะมีโครงสร้างไม่แน่นอน ง่ายต่อการไฮโดรไลซีสด้วยกรดหรือด่างเจือจาง โดยเฮมิเซลลูโลสจะมีมอนอเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิด เช่น xylose mannose galactose rhamnose และ arabinose จะประกอบไปด้วยน้ำตาล D-pentose เป็นส่วนใหญ่ ส่วน xylose จะเป็นมอนอเมอร์ของน้ำตาลที่พบมากที่สุด



ภาพที่ 5 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

Figure 5 The structure of hemicellulose

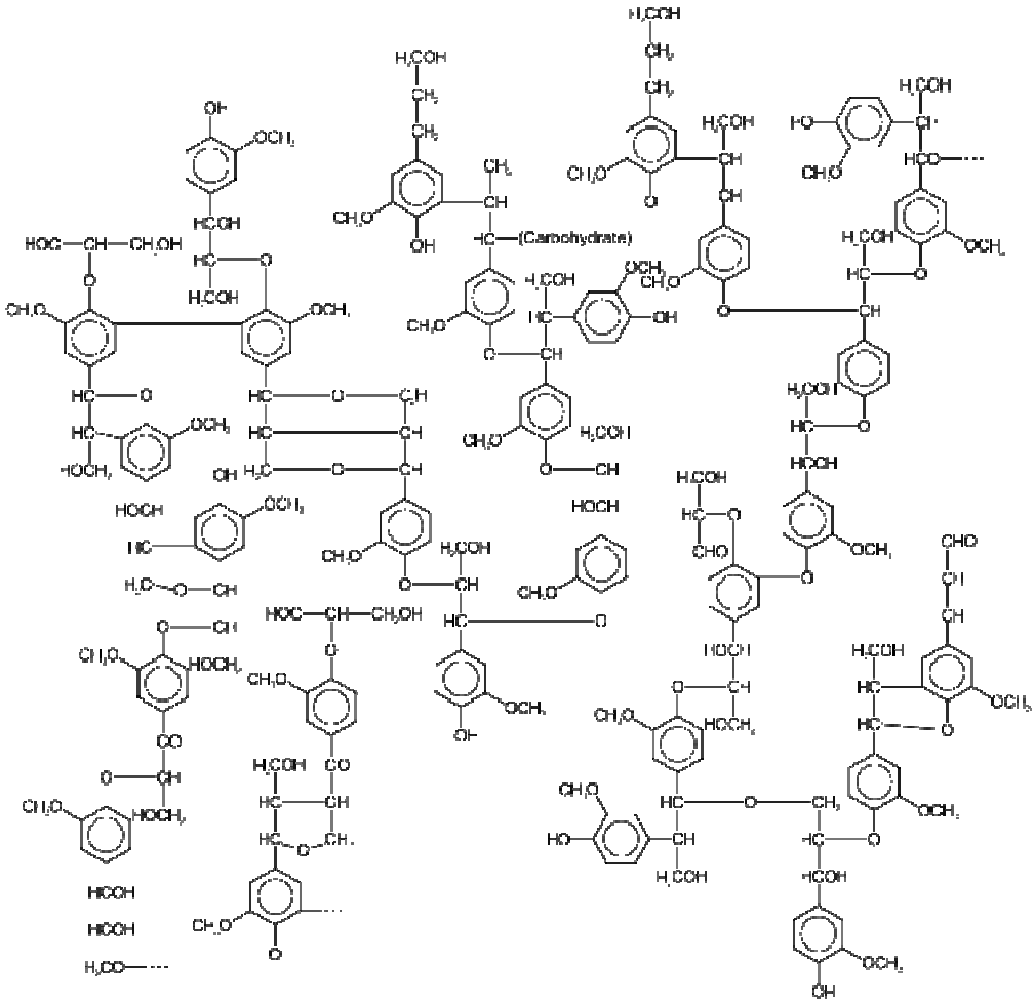
ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-ii.html

Xyloglucan เป็นชนิดของเฮมิเซลลูโลสซึ่งปัจจุบันส่วนใหญ่อยู่ในผนังเซลล์ของพืชในดิน มีน้ำตาลไซโลสและกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ (Graham et al., 2006)

เฮมิเซลลูโลสเกิดจากห่วงโซ่สั้นๆเมื่อเทียบกับเซลลูโลสซึ่งเฮมิเซลลูโลสเกิดจาก 200 หน่วยของน้ำตาลกลูโคส แต่เซลลูโลสมีน้ำตาลกลูโคสมากถึง 7,000 ถึง 15,000 โมเลกุล

3.3 ลิกนิน (Lignin)

เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช ทำให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรง จะเป็นส่วนประกอบของเปลือก ซัง หรือส่วนที่เป็นเยื่อใยของราก ลำต้น และจะถูกสร้างจากส่วนโคนต้นไปสู่ยอด เมื่อพืชมีอายุมากขึ้น ปริมาณลิกนิน จะเพิ่มมากขึ้นด้วย



ภาพที่ 6 โครงสร้างของลิกนิน

Figure 6 The structure of lignin

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lignin_structure.svg

จากการที่ลิกนินเป็นสารที่ไม่มีสัตว์ชนิดใดใช้ประโยชน์ได้เลย ในขณะเดียวกับการที่ลิกนิน อยู่ร่วมกับเซลลูโลส และhemicellulose ทำให้การย่อยได้ของ เซลลูโลส และ hemicellulose ลดลงด้วย ดังนั้นปริมาณลิกนิน เซลลูโลส และ hemicellulose มีความสำคัญต่อการประเมินคุณภาพของพืชอาหารสัตว์ ที่ใช้สำหรับเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง ม้า และกระต่าย

4. เอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) มีสูตรเคมี คือ C_2H_5OH เป็นสารที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เป็นพลังงานทดแทนที่มีการเผาไหม้สะอาด ไม่สร้างก๊าซพิษ ช่วยลดการเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เอทานอล เป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ได้จากการย่อยสลายแป้งและน้ำตาลด้วยเอนไซม์ ในการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์เบนซิน ต้องทำการกลั่นเอทานอลจนมีความบริสุทธิ์สูงถึงร้อยละ 99.5 จึงสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์เบนซินได้ หากเอทานอลที่ใช้มีน้ำปะปนอยู่มาก จะเกิดปัญหาทำให้เครื่องยนต์น็อก และชิ้นส่วนและอุปกรณ์ของเครื่องยนต์เกิดสนิม

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. วัตถุดิบประเภทแห้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น

2. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีตรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

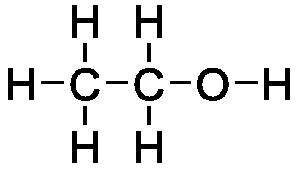
แม้จะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณาคือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดปี หาได้ง่าย ราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบและต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์

สำหรับประเทศไทยวัตถุดิบที่ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอลมีเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลังสด

เอทานอลถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เหล้า ไวน์ และเบียร์ ใช้ในอุตสาหกรรมยา ใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เช่น สี แล็กเกอร์ ยาเคลือบน้ำมันและขี้ผึ้ง (ครีมขัดรองเท้า) เรซิน ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและชีวเคมี ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซินที่เรียกว่าแก๊สโซฮอล์ ใช้เป็นอาหาร เช่น น้ำส้มสายชู เจลาติน ใช้ทางด้านการแพทย์ เช่น ใช้เช็ด

แผล ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นตัวรีเอเจนต์ในห้องปฏิบัติการและอื่นๆ เป็นต้น มีสูตรโครงสร้างเป็นดังภาพที่ 7



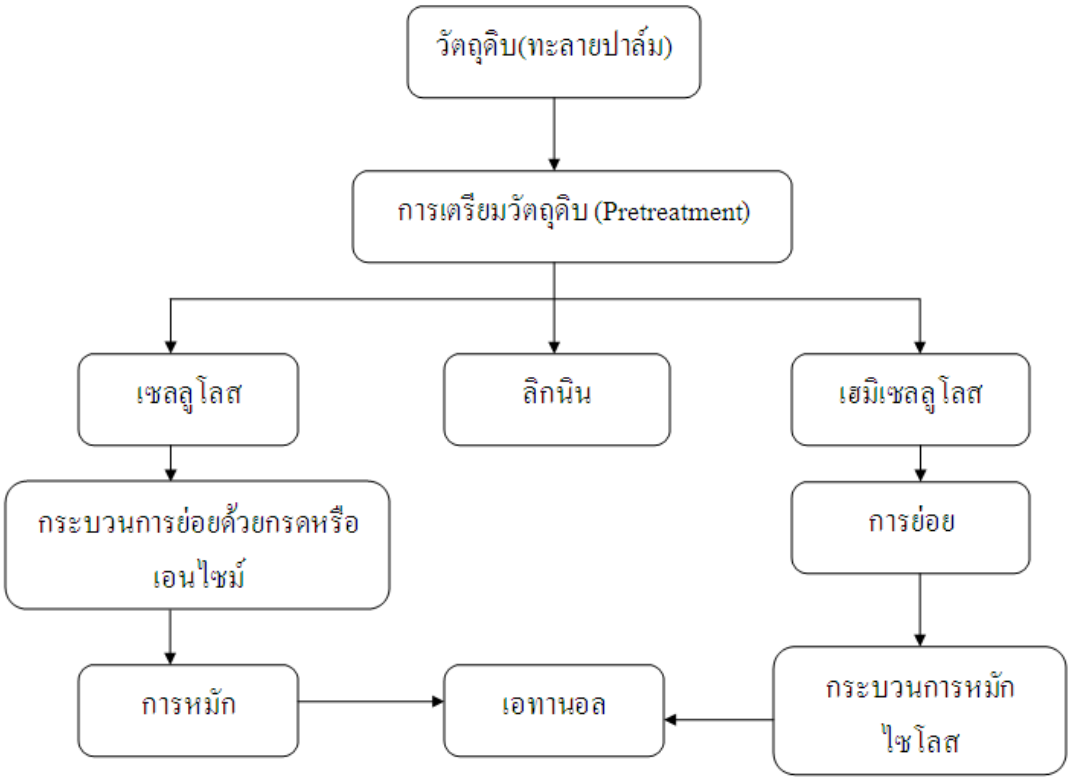
ภาพที่ 7 สูตรโครงสร้างของเอทาอล

Figure 7 The Structure formula of ethanol

การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพดและเศษไม้ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และ อะราบิโนส (Arabinose) เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก

5. ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเศษเหลือซึ่งเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

โดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ ขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment) การย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล (Hydrolysis) และการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (Fermentation) ดังแสดงในภาพที่ 8

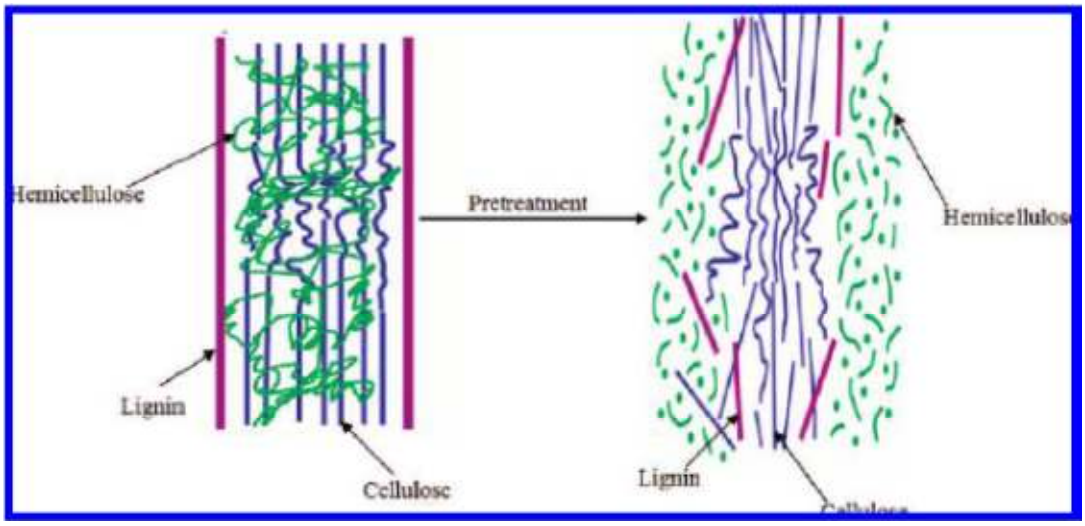


ภาพที่ 8 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

Figure 8 Ethanol production process from lignocelluloses material

5.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

เนื่องจากวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อนการปรับสภาพจะช่วยให้โครงสร้างซับซ้อนน้อยลง เซลลูโลสถูกนำไปย่อยสลายเป็นน้ำตาลได้ง่ายขึ้น ซึ่งภาพที่ 8 แสดงผลของการสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)



ภาพที่ 9 ผลของการปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

Figure 9 The result of pretreatment

ที่มา : Mosier และคณะ (2005)

สิ่งที่ต้องการสำหรับการปรับสภาพวัตถุดิบ คือ

1). เพิ่มปริมาณการผลิตน้ำตาล

2). ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต

3). หลีกเลี่ยงการเกิดตัวยับยั้งในขั้นตอน การไฮโดรไลซีส และการหมัก

4). ลดต้นทุนในการผลิต

ในการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากสารพวกลิกโนเซลลูโลสเป็นสารที่ยากต่อการย่อยสลาย จึงต้องมีการปรับสภาพเพื่อทำให้อ่อนนุ่ม ให้เอนไซม์เข้าถึง และปฏิกิริยาได้ดี (Sun และ Cheng 2002)

โดยวิธีการปรับสภาพมีหลายวิธี ทั้งทางกายภาพ ทางเคมีกายภาพและเคมีดังนี้

วิธีการปรับสภาพทางกายภาพ (Physio pretreatment)

1. Mechanical comminution เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบโดยวิธีการตัด การบด เพื่อลดการเป็นผลึกของเซลลูโลส ขนาดที่เกิดจากการตัดประมาณ 10-30 มิลลิเมตร ขนาดที่เกิดจากการบดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร การบดสามารถทำลายความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มการย่อยสลายได้

2. Pyrolysis เป็นกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบที่อุณหภูมิสูงประมาณ 200-600 องศา เซลเซียส ภายใต้ความดันบรรยากาศ

วิธีการปรับสภาพทางเคมีกายภาพ (Physio - Chemical pretreatment)

1. Steam explosion วิธีนี้วัตถุดิบจะถูกปรับสภาพที่ความดันไอน้ำสูง แล้วลดความดันอย่างรวดเร็ว ทำให้วัตถุดิบระเบิดแล้วเกิดการสลายตัว การระเบิดด้วยไอน้ำเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 160-260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69-4.83 MPa เป็นเวลาหลายวินาที ถึงสองหรือสามนาที หลังจากนั้นเอาออกมาที่อุณหภูมิปกติ

2. Ammonia fiber explosion (AFEX) เป็นการนำวัตถุดิบใส่ลงไปในสารละลายแอมโมเนียที่อุณหภูมิและความดันสูงแล้วลดความดันอย่างรวดเร็ว ซึ่งคล้ายกับการระเบิดด้วยไอน้ำ

วิธีการเตรียมทางเคมี (Chemical pretreatment)

1. Ozonolysis โอโซนสามารถที่จะสลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสได้ การสลายจะจำเพาะกับลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ส่วนเซลลูโลสจะมีความแข็งแรง ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ แต่ต้นทุนสูงเพราะราคาแพง

2. Acid pretreatment ได้มีการใช้กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส แม้ว่ากรดเป็นสารเคมีที่ไฮโดรไลซีสเซลลูโลสได้ดี แต่ความเข้มข้นของกรดเป็นพิษ กัดกร่อน และเป็นอันตราย

Kumar และคณะ (2009) ได้ศึกษาวิธีต่างๆในการปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment) โดย พบว่า Acid Pretreatment ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 4% สามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ ส่วน Alkali Pretreatment ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถกำจัดลิกนินออกได้ใกล้เคียงกันแต่แคลเซียมไฮดรอกไซด์มีราคาแพงกว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นโซเดียมไฮดรอกไซด์จึงเป็นที่นิยมในการใช้มากกว่า

Umikalsonm และคณะ (1997) ได้ศึกษาองค์ประกอบของทะลายปาล์ม โดยทำการแช่ใน 0.5 % HNO_3 , 0.5 % NaOH และ 0.5% HCl พบว่าการปรับสภาพทะลายปาล์มด้วยการแช่ในสารละลายกรดไนตริก (HNO_3) ที่ความเข้มข้น 0.5%โดยปริมาตร เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง นำไปต้มที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ใช้เวลา 5 นาทีแล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบ ในทะลายปาล์มเปล่าจะมีปริมาณเซลลูโลสสูงสุด 62.9 ± 0.9% โดยน้ำหนัก ปริมาณเฮมิเซลลูโลส 4.6 ± 0.2%โดยน้ำหนัก และปริมาณลิกนิน 4.5 ± 0.4% โดยน้ำหนัก

3. Alkaline pretreatment เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้ด่าง ปัจจัยในการปรับสภาพวัตถุดิบขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัตถุดิบ การเตรียมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะช่วยลดปริมาณลิกนินในเนื้อไม้แข็งจาก 24-25% ให้เหลือเพียง 20% ซึ่งโครงงานนี้ใช้วิธีนี้ในการ Pretreatment

Hamisan และคณะ (2009) ได้ศึกษาการกำจัดลิกนินออกจะทะลายปาล์ม พบว่าแช่ทะลายปาล์มด้วย 2 % NaOH อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาณลิกนินเหลืออยู่ 5.93% เปรียบเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ในการ Pretreatment ปรากฏว่าต้องใช้เวลา 3 วันจึงจะมีปริมาณลิกนินเหลือน้อยใกล้เคียงกับ Alkali Pretreatment ดังนั้น Alkali Pretreatment จึงเหมาะสมกว่า

5.2 กระบวนการย่อย (Hydrolysis)

เนื่องจากวัสดุชนิดลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นเมื่อทำการย่อยจะได้น้ำตาลออกมา สำหรับการย่อยมีอยู่ด้วยกัน 2 วิธี คือ วิธีการย่อยทางเคมี และวิธีการย่อยทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ ในที่นี้จะกล่าวถึง วิธีการย่อยทางเคมีสามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง

Hydrolysis เป็นปฏิกิริยาเคมี ซึ่งโมเลกุลของสารแตกออกเป็นสองส่วน โดยการเติมด้วยโมเลกุลของน้ำ ปลายด้านหนึ่งเป็นหมู่ของไฮโดรเจนไอออน (H^+) และอีกด้านหนึ่งเป็นหมู่ของไฮดรอกซิลไอออน (OH^-) หลังจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสถูกปรับสภาพแล้ว จะได้เป็นเซลลูโลสที่เหมาะสำหรับการไฮโดรไลซีส ซึ่งเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซีสได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ดังปฏิกิริยาที่แสดงดังต่อไปนี้

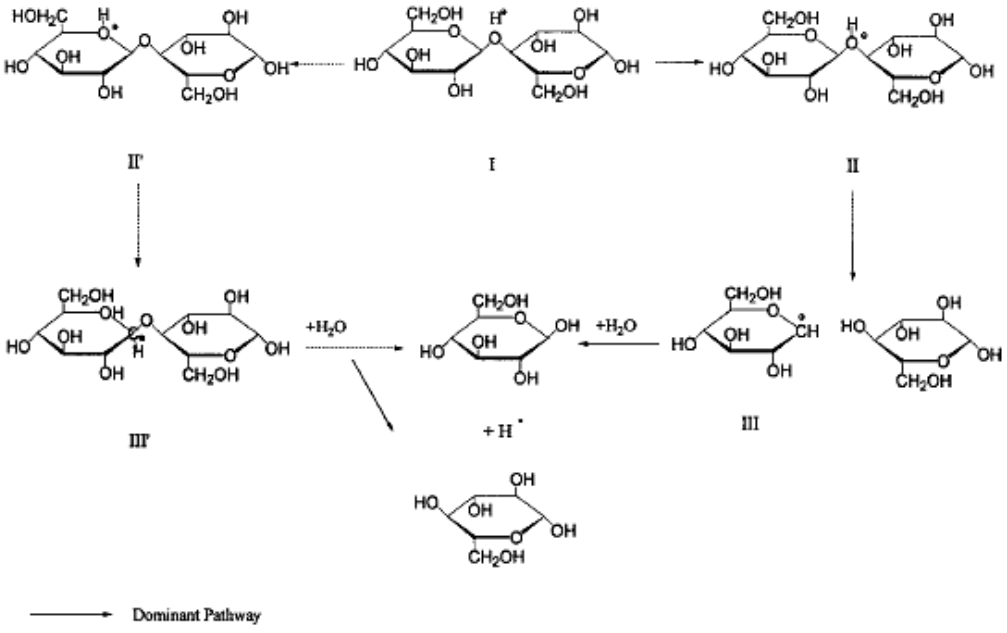
$$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \longrightarrow nC_6H_{12}O_6 \qquad \text{..... (1)}$$

การย่อยทางเคมีเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรงแต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไปทำให้ได้ผลพลอยได้อื่นๆ เช่น Furfural และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 70% ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40% ขึ้นไป ซัลฟิวริกเจือจาง 1% เป็นต้น และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรง และไม่จำเพาะเจาะจง น้ำทิ้งจากการย่อยก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

การย่อยสลายพันธะ glycosidic linkages ในคาร์โบไฮเดรตด้วยกรด ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล ซึ่งการย่อย เป็นการแตกออกของพันธะ glucosidic พร้อมกับการเติมโมเลกุลของน้ำไปยังโมเลกุล 2 ส่วนคือ ส่วนที่รับ ไฮโดรเจนไอออน และอีกส่วนหนึ่งรับไฮดรอกไซด์ไอออน ปฏิกิริยาของกรดในการย่อย (Harris, 1952, Fengel และ Wegener, 1984) จะประกอบด้วย

(1) การกระจายตัวของ Proton ไปยังส่วนที่เป็น Lignocellulosic matrix (2) ออกซิเจนให้ Proton ไปยังพันธะ Heterocyclic ether ระหว่าง Sugar monomers แต่ละตัว (3) ทำลายพันธะ Ether (4) สร้างคาร์บอนเพื่อเป็นสาร Intermediate (5) คาร์บอนถูกละลายด้วยน้ำ (6) Proton จะถูกสร้างขึ้นมาใหม่เพื่อสร้างพันธะ Etherได้เป็น Sugar monomer, Oligomer หรือ Polymer ขึ้นกับตำแหน่งของพันธะ Ether (7) การเข้าทำปฏิกิริยาจะขึ้นกับรูปร่าง และขนาดของวัตถุดิบ (8) จะเริ่มที่ขั้นตอนที่ 2 อีกครั้ง

ข้อดีของวิธีการ Acid hydrolysis ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้เอนไซม์ คือ ประหยัด และสะดวกกว่าเนื่องจากขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์นั้นอาจมีขั้นตอน Pretreatment ซึ่งต้องใช้เวลานานในการ Breakdown วัตถุดิบให้กลายเป็นน้ำตาล วิธีการ Acid hydrolysis ใช้ปริมาณกรดเพียงเล็กน้อย และยังมีราคาที่ถูกกว่าเอนไซม์ อีกทั้งเวลาในการย่อยสั้นกว่า (Iranmahboob และคณะ, 2002) การย่อยเซลลูโลสด้วยกรดเป็นปฏิกิริยาที่เรียกว่า heterogeneneous reaction ซึ่งอาศัยปัจจัยทางกายภาพเช่นเดียวกับปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยสารเคมีทั่ว ๆ ไป กลไก acid hydrolysis ของเซลลูโลส ดังภาพ



ภาพที่ 10 แสดงกลไกการย่อยของ β-1-4 glucan ด้วยกรด

Figure 10 Mechanism of acid catalyzed hydrolysis of β-1-4 glucan.

ที่มา : Fengel และ Wegener (1984)

Rahman และคณะ (2005) ศึกษาการได้น้ำตาลไซโลสจากทะลายปาล์มโดยใช้กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ไฮโดรไลซีสในถังปฏิกรณ์แบบแบทช์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส โดยมีการปรับระดับความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกจาก 2 – 6% โดยน้ำหนัก และปรับเปลี่ยนเวลา 0 - 90 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 6% โดยน้ำหนัก และใช้เวลา 15 นาที พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลไซโลสและกลูโคส 29.4, 2.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการไฮโดรไลซีส

Umikalsom และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาโดยนำทะลายปาล์มที่แช่ในสารเคมีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ไปให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 5 นาที มาทำการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ผลปรากฏว่า การแช่ด้วย 0.5 % NaOH จะทำให้การเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลมากที่สุดทั้งที่ ปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการปรับสภาพด้วย 0.5 % HNO_3 มีปริมาณสูงสุด (62.9%) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็น 2 % และ 5 % ในการปรับสภาพด้วย 2 % จะสามารถละลายลิกนินได้มากกว่า 0. 5 % และ 5 %

5.3 กระบวนการหมัก (Fermantation)

กระบวนการหมัก (Fermentation) เป็นการผลิตแอลกอฮอล์ (เอทานอล) จากน้ำตาลโดยยีสต์ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) เป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 100% จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล เท่ากับ 48.89% และ 51.11% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่น ๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ของยีสต์

มีหลายวิธีแต่ที่นิยมมี 2 วิธี คือ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) เป็นการรวมการไฮโดรไลซีสในขั้นตอนเดียวกับการหมัก และ Separation Hydrolysis Fermentation (SHF) เป็นการแยกขั้นตอนการไฮโดรไลซีสและการหมักจากกัน

Separation Hydrolysis Fermentation (SHF) จะมีขั้นตอนของการ Hydrolysis เพื่อได้น้ำตาลกลูโคส จากนั้นหมักน้ำตาล โดยการหมักเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลด้วยยีสต์หรือจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ ในการหมักจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ จะเป็นยีสต์ตระกูล *Saccharomyces cerevisiae*

Hardyen (2006) ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากทะลายปาล์มโดยแยกขั้นตอนกระบวนการไฮโดรไลซีสออกจากกระบวนการหมัก หรือ Separation Hydrolysis and Fermentation (SHF) โดยในขั้นตอนของการ Pretreatment ทำโดยวิธีทางกายภาพ คือ การบดให้มี

ขนาดเล็กลง จากนั้นทำการ Pretreated ต่อ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง ตามด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้ว Hydrolysis ด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง สุดท้ายทำการหมักด้วยยีสต์ Saccharomyces cerevisiae พบว่าได้ปริมาณเอทานอล 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของกลูโคส คิดเป็น 13.8% โดยน้ำหนัก

การสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic respiration)

การสลายสารอาหารไม่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนเสมอไป สิ่งมีชีวิตบางชนิด เนื้อเยื่อบางอย่างได้พลังงานมาจากการสลายอาหารโดยไม่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ พยาธิตัวตืด ยีสต์ เมล็ดพืช แบคทีเรียบางชนิด ส่วนกล้ามเนื้อลายเป็นตัวอย่างของเนื้อเยื่อสัตว์ชั้นสูงที่สามารถสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้

การสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic respiration) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1. ไกลโคลิซีส (Gycolysis)
2. การหมัก (Fermentation)

การหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะให้ผลลัพธ์ จากปฏิกิริยาบางขั้นตอนไม่เหมือนกัน เช่น

การหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนในเซลล์ยีสต์ ในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจนหรือแก๊สออกซิเจนไม่เพียงพอจะทำให้ NADH และ $FADH_2$ ถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนต่าง ๆ ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียได้ เนื่องจากขาดแก๊สออกซิเจนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในขั้นตอนสุดท้าย จึงไม่สามารถสร้าง ATP ได้ และมีการสะสม NADH และ $FADH_2$ มากขึ้นจึงทำให้ขาดแคลน NAD^+ และ FAD มีผลให้ปฏิกิริยาไกลโคลิซีส วัฏจักรเครบส์ และการถ่ายทอดอิเล็กตรอนดำเนินต่อไปไม่ได้ และยังทำให้เซลล์ขาด ATP เซลล์จึงมีกระบวนการผันกลับให้ NADH กลายเป็น NAD^+ เพื่อให้กระบวนการไกลโคลิซีสไม่หยุดชะงัก และสามารถสร้าง ATP ต่อไปได้ กระบวนการนี้ เรียกว่า กระบวนการหมัก (Fermentation)

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation) โดยเริ่มจากไกลโคลิซีส เช่นเดียว กับการสลายกลูโคสโดยใช้ออกซิเจน และได้กรดไพรูวิก 2 โมเลกุล พร้อมปล่อย ATP 2 โมเลกุล และ 4 ไฮโดรเจน อะตอม เช่นกัน แต่ $NADH + H^+$ จะถ่ายทอดอะตอมของไฮโดรเจนไปยัง acetaldehyde ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอม ทำให้ไม่สามารถใช้พลังงานจากอิเล็กตรอนที่มีอยู่ในอะตอมของไฮโดรเจนมาสร้าง ATP ได้อีก ดังนั้นการสลายกลูโคส 1 โมเลกุลจึงได้ ATP เพียง 2 โมเลกุล เอทิลแอลกอฮอล์เป็นสารพิษเป็นอันตรายต่อเซลล์ ถ้ามีเอทิลแอลกอฮอล์มากๆ ยีสต์อาจทนไม่ได้และตายในที่สุด

รวมสมการไกลโคลิซีส

$$C_6H_{12}O_6 + 2ATP + 2\ ADP + 2Pi + 2\ NAD^+ \xrightarrow{\text{Enzyme}} 2\ C_3H_4O_3 + 4ATP + 2NADH + 2H^+ \ldots (2)$$

ต่อจากนั้นกรดไพรูวิกจะเปลี่ยนเป็นแอซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอม และได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซีเลส (Pyruvate decarboxylase)
ดังสมการ

$$2C_3H_4O_3 \xrightarrow{\text{Pyruvate decarboxylase}} 2\ C_2H_4O + 2CO_2 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

ปฏิกิริยาต่อไป แอซิทิลดีไฮด์จะถูกออกซิไดซ์ด้วย NADH + H^+ เป็นเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase)

$$2\ C_2H_4O + 2NADH + 2H^+ \xrightarrow{\text{Alcohol dehydrogenase}} 2\ C_2H_5OH + 2\ NAD^+ + 2CO_2 \ldots\ldots\ldots (4)$$

สรุปกระบวนการหมัก การหมักเป็นการปลดปล่อยพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม โดยใช้ไพรูเวตจากไกลโคลิซีสเป็นสารตั้งต้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการหมักจะมีการสร้าง NAD^+ ขึ้นมาใหม่ แต่จะไม่มีการสร้าง ATP เพิ่มอีก ดังนั้นการสลายกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจนจึงสร้าง ATP ได้เพียง 2 โมเลกุล จากไกลโคลิซีสเท่านั้น

การหมักแอลกอฮอล์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ ในการผลิตเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ สุรา ไวน์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งกรรมวิธีแตกต่างกันไป ในปัจจุบันได้มีการนำความรู้นี้ไปผลิตแอลกอฮอล์จากของเหลือใช้ เช่น การผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล มีผลทำให้ลดปัญหามลภาวะจากกากน้ำตาลได้เป็นจำนวนมาก แอลกอฮอล์ยังเป็นสารที่มีพลังงานแฝงอยู่มาก สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ ยีสต์จะหมักแอลกอฮอล์ได้สูงสุดประมาณ 12 % (ถ้าสูงกว่านี้จะเป็นอันตรายต่อเซลล์)

ยีสต์สามารถสลายสารอาหารได้ทั้งในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนยีสต์จะเจริญเติบโตได้ดีกว่า เพราะจะนำออกซิเจนไปสลายสารอาหารให้ได้พลังงานมากกว่า ยีสต์ชนิดที่ใช้ในการทำขนมปังมีชื่อว่า *Saccharomyces cercvisiae* ในระหว่างการหมักแป้งยีสต์จะเกิดปฏิกิริยาการหมักแอลกอฮอล์ และ

เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นทำให้แป้งพองฟู เมื่อนำไปอบแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกไล่ออกไปพร้อมกับแอลกอฮอล์

สมการรวม Alcoholic fermentation ของ ราและยีสต์ จากกลูโคส 1โมเลกุล

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2Pi \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ ATP + 2CO_2 \quad \text{..... (5)}$$

6. ลักษณะของลิกโนเซลลูโลส หรือสารตั้งต้น Moller (2006)

6.1 ขนาดของอนุภาค หรือพื้นที่ผิวสัมผัส

เอนไซม์สามารถเกิดการย่อยได้ก็ต่อเมื่อเอนไซม์สัมผัสกับสารตั้งต้น ถ้าทำให้สารตั้งต้นมีขนาดเล็กลง หรือมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อน้ำหนักสูงขึ้น จะทำให้เอนไซม์สามารถดูดซับ หรือสัมผัสกับสารตั้งต้นได้มากขึ้น นำไปสู่ การเกิดไฮโดรไลซีสเร็วขึ้น อย่างเช่น ในการเตรียมสารตั้งต้นที่เป็นใบไม้ พบว่า อัตราการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้นด้วยการลดขนาดของอนุภาค และการเตรียมยังเป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสารตั้งต้นเพื่อการไฮโดรไลซีสได้ดี Wen และคณะ (2004) รายงานว่าในการลดขนาดของ animal manure จาก 840-590 ไมโครเมตร เป็น 590-350 ไมโครเมตร จะได้เพิ่ม Glucose yield 29 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม การลดขนาดต่ำกว่า 590 ไมโครเมตร จะทำให้ Glucose yield ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก

6.2 ความเป็นผลึกของเซลลูโลส

ในส่วนที่เป็นผลึกของเซลลูโลสจะมีความแข็งแรง และต้านทานต่อการไฮโดรไลซีส โดยในการไฮโดรไลซีส ส่วนที่ไม่เป็นผลึกจะมีการไฮโดรไลซีสก่อน ตามด้วยส่วนที่เป็นผลึกบ้างเล็กน้อย Mansfield และคณะ (1999) มีการรายงานว่า ถ้าระดับความปีนผลึกสูงขึ้น จะทำให้อัตราการไฮโดรไลซีสลดลง Sangseethong และคณะ (2006)

6.3 ความเป็นพอลิเมอร์

ระดับของการเป็นพอลิเมอร์จะมาก หรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนของ glucosyl ที่มีอยู่ในสายเซลลูโลส Mansfield และคณะ (1999) ดังนั้นวัตถุดิบที่มีความเป็นพอลิเมอร์ต่ำจะมีปลายสายเซลลูโลสมาก ซึ่งระดับความเป็นพอลิเมอร์จะขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นแต่ละชนิด และผลจากการเตรียมวิธีต่างๆ Cao และ Tan (2002) ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ Cellulase, Endoglucanase และ Cellobiohydrolase ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นพอลิเมอร์ของเซลลูโลส ผลปรากฏว่า Cellulase และ Endoglucanase สามารถความเป็นพอลิเมอร์ของเซลลูโลสได้ดี และได้มากกว่า Cellobiohydrolase ที่ปีนเช่นนี้เพราะว่าเอนไซม์ Cellobiohydrolase จะสลายเซลลูโลสที่ปลายสายของพอลิเมอร์ ทำให้สามารถลดระดับการเป็นพอลิเมอร์ของเซลลูโลสได้น้อย

6.4 Cellulose reactivity

จากการรายงานของ Yang และคณะ (2006) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลที่เกิดจากการไฮโดรไลซีส Avicel cellulose ด้วยเอนไซม์ พบว่า อัตราการไฮโดรไลซีสของเซลลูโลสจะเกิดขึ้นช้าลงเมื่อใช้ระยะเวลานานขึ้น เขาสันนิฐานว่า สารตั้งต้นมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการไฮโดรไลซีส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถได้ หรืออาจจะเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น หรือเกิดจากการที่เอนไซม์ไปเป็นตัวปิดกั้นพื้นที่ผิวหน้าของสารตั้งต้น

6.5 ปริมาณลิกนิน

ปริมาณลิกนินในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นสิ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซีสลดลง โดยลิกนินจะกีดขวางไม่ให้เอนไซม์สัมผัสกับพอลิเมอร์ของน้ำตาล การแยกลิกนินออกจากเซลลูโลสระหว่างการเตรียมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซีสสูงขึ้น แต่ลิกนินจะไม่สามารถแยกออกอย่างสมบูรณ์ได้ Lu และคณะ (2002)

7. วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM)

วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง หรือ RSM เป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์ และสถิติ มาใช้เพื่อช่วยในการหาผลตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด ได้มีการประยุกต์ใช้ RSM อย่างกว้างขวางในงานด้านอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในสถานการณ์ที่ตัวแปรต้นหลายๆตัวมีผลต่อคุณสมบัติบางประการหรือปริมาณของผลที่ได้ ซึ่งจะเรียกคุณสมบัติหรือลักษณะบางประการของผลผลิตนี้ว่า ผลตอบสนอง (response) และตัวแปรต้นดังกล่าวมักจะเรียกว่า ตัวแปรอิสระ (independent variable) (Myers, 1995)

จุดมุ่งหมายของวิธีการ RSM คือการประมาณพื้นผิวผลตอบสนอง ซึ่งตัวแบบที่ใช้แทนพื้นผิวผลตอบสนอง ได้แก่ ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่ง (First-Order Model) หรือถ้าใช้ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่งไม่เพียงพอที่จะประมาณพื้นผิวผลตอบสนอง ก็จะมีการใช้ตัวแบบอันดับสูงขึ้นไป เช่น ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง (Second-Oder Model) เป็นต้น โดยมีขั้นตอนหลักๆในวิธี RSM (Khuri and Cornell, 1987) ดังนี้

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

ในขั้นที่ 3 ของวิธี RSM คือ การทดลองเพื่อหาตัวแบบที่เหมาะสมบนขอบเขตของระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดนั้น มีแผนการทดลองที่นิยมใช้อยู่ 2 แผนการทดลอง คือ

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

ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะแผนการทดลองแบบบ็อกซ์ – วิลสัน หรือมีอีกชื่อเรียกหนึ่งว่า แผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design) หรือเรียกย่อๆว่า CCD นำเสนอโดย Box และ Wilson เมื่อปี ค.ศ. 1951 ซึ่งเป็นแผนการทดลองที่ใช้หาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง (Second – Order Model) ซึ่งมีตัวแบบดังนี้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{4} \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^{4} \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i,j=1}^{4} \beta_{ij} \chi_i \chi_j \qquad \text{..... (6)}$$

โดย ß $_{ij}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย โดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

แผนการทดลองแบบ CCD นี้พัฒนามาจากแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2^k Factorial design) หรือแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลเชิงส่วน (Fractional Factorial design) เนื่องมาจากว่าแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับนั้นไม่สามารถใช้หาตัวแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสองได้ โดยที่แผนการทดลองที่ สามารถใช้ได้จะต้องมีระดับของปัจจัยอย่างน้อย 3 ระดับ เช่น แผนการทดลองแบบ 3^k แฟคทอเรียล แต่เนื่องจากแผนการทดลองดังกล่าวจะต้องมีการซ้ำที่แต่ละปัจจัย (replicate) เพื่อใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของตัวแบบ (lack of fit test) ซึ่งในกรณีที่มีปัจจัยจำนวนมากจะทำให้จำนวนครั้งของการทดลองมีมาก ซึ่งจะทำให้สิ้นเปลืองทรัพยากรจำนวนมาก แผนการทดลองแบบ 2^k แฟคทอเรียล จะมีระดับของปัจจัย 2 ระดับ ซึ่งโดยมากจะเรียกว่าระดับต่ำและระดับสูง โดยที่แผนการทดลองแบบ CCD จะเพิ่มการทดลองที่จุดศูนย์กลางหรือที่ระดับ 0 และการทดลองตามแนวแกนขึ้นมาเพื่อใช้ในการหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง โดยจะกำหนดค่าแต่ละระดับของปัจจัยด้วยตัวแปรรหัส (code variable)

Bandaru และคณะ (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแป้งสาคูด้วยวิธี RSM โดยกำหนดให้ตัวแปรอิสระ คือ อุณหภูมิ 20-40 องศาเซียลเซียส พีเอส 4-6 และเวลาในการผลิตเอทานอล 15-20 ชั่วโมง โดยวางแผนแบบ central composite design (CCD) เพื่อศึกษาผลของตัวแปรอิสระต่อการผลิตเอทานอลจากแป้งสาคู พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือ อุณหภูมิ 32.4 องศาเซลเซียส พีเอช 4.39 และเวลา 17.24 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 55.3 กรัมต่อลิตร

Balusu และคณะ (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสโดยเชื้อ *Clostridium Thermocellum SS19* ด้วยวิธี RSM โดยวางแผนแบบ central

composite design (CCD) ศึกษาตัวแปรอิสระ 5 ตัวแปร คือ กระดาษกรอง 10-50 กรัมต่อลิตร น้ำแช่ข้าวโพด 2-10 กรัมต่อลิตร Cysteine HCl 0.1-0.5 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01-0.05 กรัมต่อลิตร และ MgCl2.6H2O 0.5-2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือ กระดาษกรอง 45 กรัมต่อลิตร น้ำแช่ข้าวโพด 8.0 กรัมต่อลิตร Cysteine HCl 0.25 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร และ $MgCl_2.6H_2O$ 2.0 กรัมต่อลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 13.06 กรัมต่อลิตร

Rahman และคณะ (2006) ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสทะลายปาล์มที่ไม่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารเคมี โดยศึกษาผลของการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) อุณหภูมิ และเวลาในการไฮโดรไลซีส โดยใช้ RSM (Response Surface Methodology) พบว่า ได้ปริมาณกลูโคสสูงสุด 7.61 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และเวลาในการไฮโดรไลซีสเป็น 130 องศาเซลเซียส 6% H_2SO และเวลา 90 นาที

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในทะลายปาล์มโดยแยกระบวนการไฮโดรไลซีสออกจากการหมักหรือ Separation Hydrolysis and Fermentation (SHF)
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากด้วยวิธี SHF
3. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมากและยีสต์ขนมปัง

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาผลของการปรับสภาพวัตถุดิบและศึกษาสภาวะที่เหมาะสม โดยแบ่งย่อยออกเป็น

1.1 การปรับสภาพด้วยวิธี Alkali pretreatment คือ เลือกใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในการปรับสภาพวัตถุดิบ

1.2 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Acid pretreatment คือ เลือกใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (H_2SO_4) การปรับสภาพวัตถุดิบ

1.3 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Alkali pretreatment ร่วมกับการเตรียมวัตถุดิบด้วยวิธี Acid pretreatment

1.4 ปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) สารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (H_2SO_4) และน้ำ เปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสทะลายปาล์มด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง
   - ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 2-6 โดยน้ำหนัก
   - อุณหภูมิ 110-130 องศาเซลเซียส
   - เวลา 15-90 นาที

3. ศึกษาการหมักเอทานอล
   - เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากการหมักด้วยเชื้อยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก และยีสต์ขนมปัง
   - ปริมาณเชื้อยีสต์ 1-2 กรัม
   - อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
   - เวลา 7 วัน
   - pH 5

ประโยชน์ที่ได้รับจากการทำงานวิจัย

1. นำเอาทะลายปาล์มซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือใช้นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์
2. สามารถผลิตเอทานอลเพื่อใช้ผสมในน้ำมันเบนซินซึ่งผลิตเป็นพลังงานทดแทนอีกทางเลือกหนึ่ง
3. เพื่อลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงจากเครื่องยนต์

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

ทะลายปาล์มเปล่าในพื้นที่ อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง

2. จุลินทรีย์

2.1 ลูกแป้งข้าวหมากในพื้นที่ อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง

2.2 ยีสต์ขนมปังซื้อจากห้างเทสโก้โลตัส

3. สารเคมี

3.1 NaOH (lab grade)

3.2 H_2SO_4 (lab grade)

3.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและลิกนิน

3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC)

อุปกรณ์

1. เครื่องให้ความร้อน (Heater)
2. ชุดกรองแบบสุญญากาศ (suction vacuum)
3. เครื่องบด Hammer mill
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
5. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC)
6. เครื่องชั่ง (weighing machine)
7. กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper)
8. โถดูดความชื้น(desiccator)
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)
10. ขวดรูปชมพู่ (flask)
11. ตู้อบ (oven)
12. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

13. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
14. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph, 1100,Hewlett Packard, Germany
15. อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กิจกรรมหลัก คือ ขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment) ขั้นตอนการย่อยเซลลูโลส (Hydrolysis) และขั้นตอนการหมัก (Fermentation) โดยมีกิจกรรมย่อยและรายละเอียดวิธีการทดลองดังนี้

กิจกรรมที่ 1 ขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

ทำการศึกษาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน ของวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยศึกษาผลของการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 วิธีดังนี้

กิจกรรมที่ 1.1 ศึกษาผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ชั่งทะลายปาล์มที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและตากจนแห้งแล้วมาปริมาณ 30 กรัม เติมสารละลายปริมาณ 300 มิลลิลิตร (1- 15% NaOH) ให้ความร้อนโดยการต้มให้เดือดที่ 100-130 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15-90 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารเคมีหลังจากนั้นทำการกรองและล้างน้ำให้มีสภาวะเป็นกลาง นำไปอบแห้ง ชั่งน้ำหนักก่อนบด แล้วบดด้วย Hammer mill ชั่งน้ำหนักหลังบด ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส

ในการวางแผนการทดลอง วิธีการ RSM ถูกใช้เพื่อทำให้กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีสภาวะเหมาะสม และ การออกแบบ 2^3 rotatable central composite design (CCD) ถูกนำมาใช้เพื่อให้เหมาะสมกับแบบจำลองลำดับที่สอง

การออกแบบการทดลองการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดำเนินการโดยใช้เทคนิคพื้นผิวผลตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้หลักการทางสถิติในการออกแบบการทดลองหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อหาความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งหมดด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) การออกแบบนี้สามารถศึกษาผลของหลายๆ ปัจจัยพร้อมกันในเวลาเดียวกันด้วยวิธีใช้จำนวนการทดลองน้อยกว่าการศึกษาทีละปัจจัย การออกแบบการทดลองจึงเป็นวิธีการเก็บข้อมูลที่มีประสิทธิภาพโดยการเปลี่ยนแปลงหรือปรับค่าของ Input (factors) อย่างมีจุดมุ่งหมายที่จะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ Output (response) ที่เกิดขึ้น ด้วยโปรแกรม Essential Regression ดังแสดงไว้ตามภาพที่ 11

ภาพที่ 11 หน้าต่างของโปรแกรม Essential Regression

Figure 11 Window of Essential Regression program

ตัวแปรที่ทำการศึกษาในการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในงานวิจัยนี้จึงประกอบด้วย ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ และเวลา โดยแสดงรายละเอียดของขั้นตอนในการออกแบบการทดลองดังต่อไปนี้

1. กำหนดตัวแปรและช่วงของการดำเนินการที่ศึกษา ประกอบด้วย

(1) ตัวแปรอิสระ (independent variable) ประกอบด้วย 3 ตัวแปร คือ ความความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อยู่ในช่วงร้อยละ 1-15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 100-130 $^{\circ}$C และเวลา 15-90 นาที กำหนดให้ x แทนตัวแปรอิสระ ระดับขอบเขตและสัญลักษณ์แทนการออกแบบการทดลองแสดงไว้ดังตารางที่ 2

(2) ตัวแปรตอบสนอง (response) มี 1 ตัวแปร คือ ปริมาณเซลลูโลส ในแต่ละการทดลอง กำหนดให้ y เป็นตัวแปรตาม

ตารางที่ 2 ช่วงการทดลองและระดับของปัจจัย

Table 2 Experimental range and levels of independent process

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	ช่วงและระดับของปัจจัย				
		-α	-1	0	1	+α
อุณหภูมิ ($^{\circ}$C)	X_1	100	106	115	124	130
เวลา (min)	X_2	15	30	53	75	90
ความเข้มข้นของ NaOH (%)	X_3	1	4	8	12	15

2. กำหนดรหัส (code) ของช่วงดำเนินการออกแบบการทดลองของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการออกแบบภาวะที่ใช้ในการทดลองด้วยเทคนิคของ Central Composite Design (CCD) และทำการแปลงค่ารหัสตัวแปรอิสระ (coded variables) โดยใช้สมการที่ 4 และผลการออกแบบการทดลองแสดงไว้ดังตารางที่ 3

$$x = \left[\frac{z - \frac{z_{\max} + z_{\min}}{2}}{\frac{z_{\max} - z_{\min}}{2}} \right] \qquad \text{.....(7)}$$

เมื่อ x = Coded variables

z = ตัวแปรอิสระ

z_{max} = ค่าสูงสุดของตัวแปรอิสระ

z_{min} = ค่าต่ำสุดของตัวแปรอิสระ

3. แปลงรหัส (decode) จากการออกแบบการทดลองด้วยเทคนิคของ Central Composite Design (CCD) ในตารางที่ 3 ทำการแปลงค่าตัวแปรให้เป็นค่าดำเนินการของตัวแปรอิสระและตัวแปรตามในแต่ละตัวในการดำเนินการทดลอง เพื่อหาค่าตัวแปรตอบสนองของกระบวนการ โดยการแปลงค่าตัวแปรแสดงดังตารางที่ 4

การออกแบบประกอบไปด้วยการทดลอง 18 ชุดการทดลอง ดังตารางที่ 3 เมื่อทำการทดลองตามที่ได้ออกแบบแล้ว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ โดยใช้ Essential regression (David D. Steppan, Joachim Werner, Robert P. Yeater) เนื่องจากวิธีการพื้นผิวตอบสนองให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับผลตอบสนอง ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถแสดงในแบบจำลองพหุนามกำลังสองที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ ดังแสดงในสมการที่ 8

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \qquad \text{..... (8)}$$

เมื่อ Y แทนตัวแปร response variable (เซลลูโลสที่ได้) $ß_0$ คือค่าสัมประสิทธิ์ของจุดตัด $ß_1$ และ $ß_2$ เป็นตัวแปรเชิงเส้นตรง $ß_{11}$, $ß_{22}$ และ $ß_{33}$ เป็นตัวแปรควอเดรติก และ X_1, X_2 และ X_3 เป็นตัวแปรอิสระที่ศึกษา (อุณหภูมิ เวลาในการการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์)

ตารางที่ 3 รหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design (CCD)

Table 3 Code of variables from Central composite experimental design

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ผลตอบสนอง
	X_1	X_2	X_3	Y (%)
1	-1.000	1.000	-1.000	
2	-1.000	-1.000	-1.000	
3	1.000	1.000	1.000	
4	0.000	0.000	0.000	
5	0.000	-0.594	0.000	
6	-1.000	1.000	1.000	
7	1.000	-1.000	-1.000	
8	1.000	-1.000	1.000	
9	0.000	0.000	0.000	ปริมาณ
10	-1.000	-1.000	1.000	เซลลูโลส
11	-0.594	0.000	0.000	
12	1.000	1.000	-1.000	
13	0.000	0.000	0.000	
14	0.000	0.000	0.000	
15	0.000	+0.594	0.000	
16	+0.594	0.000	0.000	
17	0.000	0.000	-0.594	
18	0.000	0.000	+0.594	

หมายเหตุ : $+\alpha$ คือ ขอบเขตช่วงการทดลองด้านบวก (+0.594) และ

$-\alpha$ คือ ขอบเขตช่วงการทดลองด้านลบ (-0.594)

y = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

x_1= อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2= เวลา (นาที)

x_3= ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

ตารางที่ 4 แปลงรหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design

Table 4 Decode of variables from Central composite experimental design

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ผลตอบสนอง
	X_1	X_2	X_3	Y (%)
1	115	90	8	
2	106	30	12	
3	124	30	12	
4	124	30	4	
5	124	75	12	
6	106	75	12	
7	115	53	8	
8	115	53	1	
9	115	53	8	ปริมาณ
10	106	30	4	เซลลูโลส
11	115	53	15	
12	115	53	8	
13	124	75	4	
14	100	53	8	
15	106	75	4	
16	130	53	8	
17	115	53	8	
18	115	15	8	

หมายเหตุ : y = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

x_1= อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2= เวลา (นาที)

x_3= ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

การทดลองขั้นที่ 1

ทะลายปาล์มปริมาณ 30 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 300 มิลลิลิตร (1- 15% NaOH)

ภาพที่ 12 ทะลายปาล์มที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

Figure 12 OPEFB soaked in Sodiumhydroxide solution

การทดลองขั้นที่ 2

ให้ความร้อนโดยการต้มให้เดือดที่ 100-130 ˚C เป็นเวลา 15-90 นาที

ภาพที่ 13 ทะลายปาล์มที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ถูกให้ความร้อน

Figure 13 OPEFB soaked in Sodiumhydroxide solutions were heated by oil bath

การทดลองขั้นที่ 3

ทำการกรองและล้างน้ำให้มีสภาวะเป็นกลาง นำไปอบแห้ง ชั่งน้ำหนักก่อนบด แล้วบดด้วย Hammer mill ชั่งน้ำหนักหลังบด ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส และ ลิกนิน

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและลิกนิน

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตรมาประมาณ 1 กรัม ใส่ใน บีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Acid detergent ปริมาณ 100 มิลลิลิตร และ Decahydronapthalene ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อน และให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นลดความร้อนให้เหลือเบาๆ เป็นเวลา 60 นาที

ภาพที่ 14 ตัวอย่างที่เติมสารละลาย Acid detergent และDecahydronapthalene แล้วนำมาให้ความร้อน

Figure 14 The treated of OPEFB was heated

2. กรองผ่านครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว โดยใช้แรงดึงดูดสุญญากาศเบาๆ ล้าง ตัวอย่างที่ติดอยู่ในครูซิเบิลด้วยน้ำร้อน 3-5 ครั้ง ขณะล้างให้เขี่ยก้อนเยื่อใยที่อยู่ในครูซิเบิลให้ กระจายออก โดยใช้แท่งแก้ว หลังจากนั้นให้ดูดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศและล้างต่อด้วยอะซิโตนปริมาณเล็กน้อยประมาณ 2-3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ

ภาพที่ 15 ตัวอย่างถูกกรองผ่านครูซิเบิล และล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อน

Figure 15 The treated of OPEFB filtered through crucible and washed by hot water

3. นำครูซิเบิลไปวางในถาดก้นตื้น เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 72 (ก่อนใช้ให้แช่เย็นที่ 15 °C) ลงในครูซิเบิลเติมกรดเพิ่มไปทุกชั่วโมง พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 3 ชั่งโมง นำครูซิเบิลไปกรองเอากรดออก ล้างด้วยน้ำร้อน แล้วนำไปอบแล้วชั่งน้ำหนัก

ภาพที่ 16 ตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด้วยกรด ถูกนำไปล้างแล้วอบ

Figure 16 The treated of OPEFB soaked with acid was washed and dried in oven

4. นำครูซิเบิลไปเผาที่อุณหภูมิ 500 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

กิจกรรมที่ 1.2 ศึกษาผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง

ชั่งทะลายปาล์มที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและตากจนแห้งแล้วมาปริมาณ 30 กรัม เติมสารละลายปริมาณ 300 มิลลิลิตร (0.1-1.0 % H_2SO_4) ให้ความร้อนโดยการต้มที่ 110-130°C เป็นเวลา 30 - 90 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารเคมีและการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังจากนั้นทำการกรองและล้างน้ำให้มีสภาวะเป็นกลาง นำไปอบแห้ง ชั่งน้ำหนักก่อนบด แล้วบดด้วย Hammer- mill ชั่งน้ำหนักหลังบด ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส

ตารางที่ 5 ช่วงการทดลองและระดับของปัจจัย

Table5 Experimental range and levels of independent process

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	ช่วงและระดับของปัจจัย				
		-α	-1	0	1	+α
อุณหภูมิ (°C)	X_1	110	114	120	126	130
เวลา (min)	X_3	30	42	60	78	90
ความเข้มข้นของ H_2SO_4 (%)	X_2	0.1	0.3	0.6	0.8	1

การออกแบบประกอบไปด้วยการทดลอง 18 ชุดการทดลอง ดังตารางที่ 8 สามารถแสดงในแบบจำลองพหุนามกำลังสองที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ ดังแสดงในสมการที่ 8 ข้างต้นเมื่อ Y แทนตัวแปร response variable (เซลลูโลสที่ได้)

ตารางที่ 6 รหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design (CCD)

Table 6 Code of variables from Central composite experimental design

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ผลตอบสนอง
	X_1	X_2	X_3	Y (%)
1	-1.000	1.000	-1.000	
2	-1.000	-1.000	-1.000	
3	1.000	1.000	1.000	
4	0.000	0.000	0.000	
5	0.000	-0.594	0.000	
6	-1.000	1.000	1.000	
7	1.000	-1.000	-1.000	
8	1.000	-1.000	1.000	
9	0.000	0.000	0.000	ปริมาณเซลลูโลส
10	-1.000	-1.000	1.000	
11	-0.594	0.000	0.000	
12	1.000	1.000	-1.000	
13	0.000	0.000	0.000	
14	0.000	0.000	0.000	
15	0.000	+0.594	0.000	
16	+0.594	0.000	0.000	
17	0.000	0.000	-0.594	
18	0.000	0.000	+0.594	

หมายเหตุ : $+\alpha$ คือ ขอบเขตช่วงการทดลองด้านบวก (+0.594) และ

$-\alpha$ คือ ขอบเขตช่วงการทดลองด้านลบ (-0.594)

y = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

x_1= อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2= ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

x_3= เวลา (นาที)

ตารางที่ 7 แปลงรหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design

Table 7 Decode of variables from Central composite experimental design

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ผลตอบสนอง
	X_1	X_2	X_3	Y (%)
1	120	0.6	30	
2	114	0.8	42	
3	120	0.6	90	
4	110	0.6	60	
5	130	0.6	60	
6	114	0.3	78	
7	120	0.6	60	
8	126	0.3	42	
9	114	0.8	78	ปริมาณ
10	126	0.8	42	เซลลูโลส
11	120	0.6	60	
12	126	0.3	78	
13	120	0.6	60	
14	120	1.0	60	
15	114	0.3	42	
16	120	0.1	60	
17	126	0.8	78	
18	120	0.6	60	

หมายเหตุ : y = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

x_1= อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2= ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

x_3= เวลา (นาที)

กิจกรรมที่ 1.3 ศึกษาผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์กับกรดซัลฟิวริกเจือจาง

ทำการทดลองปรับสภาพวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (จากกิจกรรมที่ 1.1 เลือกสภาวะที่เหมาะสมมา) หลังจากล้างน้ำให้มีสภาวะเป็นกลางแล้ว ทดลองต่อโดยใช้กรดซัลฟิวริกเจือจาง (จากกิจกรรมที่ 1.2 เลือกสภาวะที่เหมาะสมมา) ทำการกรองและล้างน้ำให้มีสภาวะเป็นกลางนำไปอบแห้ง ชั่งน้ำหนักก่อนบด แล้วบดด้วย Hammer mill และวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส

กิจกรรมที่ 1.4 ศึกษาผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริก น้ำ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

จากการทดลองทั้งกิจกรรมที่ 1.1, 1.2 และ 1.3 เลือกสภาวะที่มีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด นำมาทดลองที่สภาวะนั้นอีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟิวริก น้ำ และวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี เปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ได้ เพื่อศึกษาว่าสารใดเหมาะแก่การปรับสภาพวัตถุดิบมากที่สุด โดยชั่งทะลายปาล์มที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและตากจนแห้งแล้วมาปริมาณ 30 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาณ 300 มิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยการต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ เวลาและ ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปอบแห้ง ชั่งน้ำหนักก่อนบด แล้วบดด้วย Hammer mill ชั่งน้ำหนักหลังบด ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสม และสารที่เหมาะสมแล้วก็นำวัตถุดิบที่ผ่านการเตรียมด้วยสารและสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไปทำการย่อยเพื่อหาปริมาณน้ำตาลนำไปสู่การหมักต่อไป

กิจกรรมที่ 2 การย่อยเซลลูโลส (Hydrolysis)

ทำการทดลองโดยนำวัตถุดิบมาทำการไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดซัลฟิวริกเจือจางที่ความเข้มข้นร้อยละ 2-6 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 110 -130 $^{\circ}$C เวลา 15-90 นาที วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ออกแบบการทดลองแบบ 2^3 rotatable central composite design (CCD) เพื่อให้เหมาะสมกับแบบจำลองลำดับที่สอง

ตารางที่ 8 ช่วงการทดลองและระดับของปัจจัย

Table 8 Experimental range and levels of independent process

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	ช่วงและระดับของปัจจัย				
		-α	-1	0	1	+α
อุณหภูมิ ($^{\circ}$C)	X_1	90	100	115	130	140
เวลา (min)	X_2	10	30	60	90	110
ความเข้มข้นของ H_2SO_4 (%)	X_3	1	2	4	6	7

ตารางที่ 9 รหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design (CCD)

Table 9 Code of variables from Central composite experimental design

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ผลตอบสนอง
	X_1	X_2	X_3	Y (g/l)
1	0.000	0.000	0.000	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส
2	1.000	1.000	1.000	
3	1.000	-1.000	-1.000	
4	-1.000	-1.000	1.000	
5	-1.000	-1.000	-1.000	
6	0.000	0.000	1.682	
7	-1.682	0.000	0.000	
8	1.000	-1.000	1.000	
9	0.000	0.000	-1.682	
10	0.000	0.000	0.000	
11	0.000	-1.682	0.000	
12	-1.000	1.000	-1.000	
13	1.000	1.000	-1.000	
14	0.000	0.000	0.000	
15	0.000	1.682	0.000	
16	-1.000	1.000	1.000	
17	1.682	0.000	0.000	
18	0.000	0.000	0.000	

หมายเหตุ : $+\alpha$ คือ ขอบเขตช่วงการทดลองด้านบวก (+1.682) และ

$-\alpha$ คือ ขอบเขตช่วงการทดลองด้านลบ (-1.682)

y = ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)

x_1= อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2= ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

x_3= เวลา (นาที)

ตารางที่ 10 แปลงรหัสตัวแปรจากการออกแบบการทดลองตามแบบ Central composite design

Table 10 Decode of variables from Central composite experimental design

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ปริมาณกลูโคส
	X_1	X_2	X_3	Y (g/l)
1	100	6	30	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส
2	115	7	60	
3	115	4	110	
4	115	4	10	
5	115	4	60	
6	130	6	30	
7	115	1	60	
8	140	4	60	
9	130	2	30	
10	100	2	30	
11	100	2	90	
12	130	6	90	
13	115	4	60	
14	90	4	60	
15	115	4	60	
16	115	4	60	
17	130	2	90	
18	100	6	90	

หมายเหตุ : y = ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)

x_1= อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2= ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

x_3= เวลา (นาที)

กิจกรรมที่ 3 การหมัก (Fermentation)

กิจกรรมที่ 3.1 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากการหมักด้วยยีสต์ขนมปังและลูกแป้งข้าวหมาก

นำตัวอย่างที่ผ่านการไฮโดรไลซีสแล้วไปกรองเพื่อแยกเอาน้ำตาลและกากที่หลงเหลือออกจากกัน จะได้สารละลายใส ไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อน เพื่อนำไปหมัก ไปฆ่าเชื้อแล้วเติมลูกแป้งข้าวหมาก 1.5 กรัม เพื่อผลิตเอทานอล ปรับ pH ให้เป็น 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่อง GC เปรียบเทียบกับการหมักด้วยยีสต์ขนมปังที่สภาวะเดียวกัน

กิจกรรมที่ 3.2 ศึกษาผลของเวลา และปริมาณเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการหมัก

จากกิจกรรมย่อยที่ 3.1 เลือกยีสต์หมักได้ปริมาณเอทานอลมากที่สุด ทำการหมักโดยเติมเชื้อยีสต์ 1.0, 1.5 และ 2 กรัม เพื่อผลิตเอทานอล ปรับ pH ให้เป็น 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่อง GC

บทที่ 3

ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการศึกษาองค์ประกอบของทะลายปาล์ม

จากการศึกษาองค์ประกอบของทะลายปาล์มที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการทางเคมี แต่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการทางกายภาพโดยการบด และผ่านการร่อนตะแกรงขนาด 24 เมช พบว่ามีปริมาณเซลลูโลส และลิกนินร้อยละ 52.6 และ 9.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Umikalson และคณะ (1997) รายงานไว้โดยปริมาณเซลลูโลส และลิกนินในทะลายปาล์มร้อยละ 50.4 และ 10.0 โดยน้ำหนักตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสจะเห็นได้ว่า ทะลายปาล์มมีปริมาณที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นๆ ตัวอย่างเช่น ซังข้าวโพดซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 41.2 โดยน้ำหนัก ปริมาณลิกนินร้อยละ 21.3 โดยน้ำหนัก (Zhu และคณะ, 2006) ฟางข้าวมีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 38.6 โดยน้ำหนัก ปริมาณลิกนินร้อยละ 13.6 โดยน้ำหนัก (Zhu และคณะ, 2005) และต้นมันสำปะหลังมีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 32.2 โดยน้ำหนัก ปริมาณลิกนินร้อยละ 26.96 โดยน้ำหนัก (Martin และคณะ, 1991) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าปริมาณลิกนินของทะลายปาล์มเปรียบเทียบกับลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นๆ พบว่ามีปริมาณที่น้อยที่สุด

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าทะลายปาล์มเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล และอาจจะส่งผลให้ผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง โดยมีต้นทุนในการผลิตต่ำ

2. ผลการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบ (Preatment)

2.1 ผลการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Alkali pretreatment)

เทคนิค Response Surface Methodology (RSM) เป็นการรวบรวมข้อมูลทางสถิติและเทคนิคทางคณิตศาสตร์ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการออกแบบการทดลองและการหาภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการ ซึ่งเทคนิค RSM ประกอบด้วยกลุ่มของตัวแปรตามหลักการทางคณิตศาสตร์และสถิติ ใช้เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการตอบสนองและตัวแปรอิสระ แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เป็นการออกแบบการทดลองทุกระดับของ

แต่ละปัจจัยห่างจาก Center ของการออกแบบเท่ากัน และทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง แต่ละปัจจัยจะมีระดับการทดลอง 5 ระดับ ($-\alpha$, -1, 0, 1, α) งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิค RSM แบบ CCD มาใช้ศึกษาการออกแบบและวิเคราะห์ผลการทดลองในการปรับสภาพทะลายปาล์มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสให้มีปริมาณผลได้ของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มมากขึ้น เหมาะสำหรับการหมักเอทานอลต่อไป

จากการออกแบบการทดลองโดยใช้โปรแกรม RSM ที่กำหนดตัวแปรต้น 3 ตัวแปร คือ อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยมีตัวแปรตามคือ ปริมาณเซลลูโลส ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้ โดยใช้โปรแกรม Essential regression ซึ่งสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรในการทดลองที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลสได้ ดังแสดงในสมการที่ 9

$$y = -253.95 + 4.383x_1 + 2.217x_2 - 1.857x_3 - 0.01707x_1^2 - 0.01921x_2^2 - 0.00538x_1x_2 + 0.01665x_1x_3 \quad \text{.... (9)}$$

กำหนดให้ y = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

x_1 = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2 = เวลา (นาที)

x_3 = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

จากสมการที่ 9 แสดงให้เห็นถึงตัวแปรที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส ซึ่งเมื่อพิจารณาจาก P value ที่ได้จากแบบจำลองในแต่ละเทอมเพื่อดูถึงความเหมาะสมของแบบจำลองที่ได้ โดยเทอมที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญจะให้ P value ที่ต่ำกว่า 0.05 และจะมีผลต่อปริมาณเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญมากขึ้นถ้า P value มีค่าต่ำมากๆ ซึ่งจากแบบจำลองเทอมที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด คือ เวลา ซึ่งมี P value = 3.18434×10^{-7} ดังแสดงในภาคผนวก ง โดยแบบจำลองที่ได้มีค่า R^2 และ R^2 adjusted เท่ากับ 0.967 และ 0.944 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 จะบอกถึงความน่าเชื่อถือของแบบจำลองที่ได้ หากค่า R^2 มีค่าใกล้เคียงกับค่า R^2 adjusted แสดงว่าแต่ละเทอมในแบบจำลองที่ได้มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่าปริมาณเซลลูโลส จากข้อมูลของแบบจำลองที่ได้สามารถแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆกับค่าปริมาณเซลลูโลส ในรูปของกราฟพื้นผิว (surface plot) ดังภาพที่ 18 ถึง 20

ตารางที่ 11 ผลการทดลองการเตรียมวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่สภาวะต่างๆ

Table 11 The results of pretreatment with sodium hydroxide solution at various conditions

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ผลตอบสนอง
	X_1	X_2	X_3	Y (%)
1	115	90	8	17.98 ± 2.39
2	106	30	12	52.13 ± 0.94
3	124	30	12	57.94 ± 0.89
4	124	30	4	57.00 ± 0.96
5	124	75	12	35.28 ± 0.67
6	106	75	12	31.22 ± 2.39
7	115	53	8	55.60 ± 0.33
8	115	53	1	57.54 ± 0.31
9	115	53	8	55.60 ± 1.01
10	106	30	4	51.13 ± 1.89
11	115	53	15	57.74 ± 0.32
12	115	53	8	55.60 ± 0.78
13	124	75	4	32.28 ± 2.03
14	100	53	8	46.69 ± 0.76
15	106	75	4	33.22 ± 0.63
16	130	53	8	60.19 ± 0.49
17	115	53	8	55.00 ± 0.48
18	115	15	8	42.55 ± 1.37

เมื่อคำนวณค่าปริมาณเซลลูโลสจากแบบจำลองในสมการที่ 9 เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการทดลอง พบว่าค่าส่วนใหญ่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 12

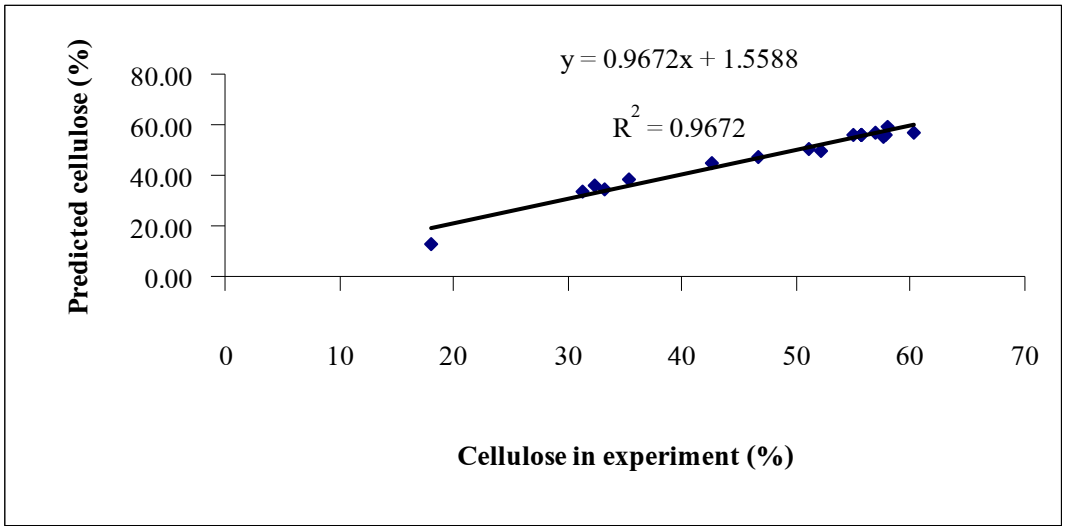
ตารางที่ 12 ปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการคำนวณโดยใช้แบบจำลอง

Table 12 The amount of cellulose were compared with values obtained from calculations using the model

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ผลตอบสนองจากการทดลอง	ผลตอบสนองจากการทำนาย
	X_1	X_2	X_3	Y (%)	Y (%)
1	115	90	8	17.98 ± 2.39	13.04
2	106	30	12	52.13 ± 0.94	50.00
3	124	30	12	57.94 ± 0.89	58.86
4	124	30	4	57.00 ± 0.96	57.15
5	124	75	12	35.28 ± 0.67	38.05
6	106	75	12	31.22 ± 2.39	33.46
7	115	53	8	55.60 ± 0.33	55.76
8	115	53	1	57.54 ± 0.31	55.36
9	115	53	8	55.60 ± 1.01	55.76
10	106	30	4	51.13 ± 1.89	50.75
11	115	53	15	57.74 ± 0.32	56.16
12	115	53	8	55.60 ± 0.78	55.76
13	124	75	4	32.28 ± 2.03	36.33
14	100	53	8	46.69 ± 0.76	47.30
15	106	75	4	33.22 ± 0.63	34.22
16	130	53	8	60.19 ± 0.49	56.54
17	115	53	8	55.00 ± 0.48	55.76
18	115	15	8	42.55 ± 1.37	44.45

จากข้อมูลในตารางที่ 12 เมื่อนำมาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลลูโลสจากการทดลองและค่าที่ได้จากการคำนวณในรูปกราฟเชิงเส้น พบว่าค่า R^2 เท่ากับ 0.967 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงดังภาพที่ 17 แสดงว่าสมการแบบจำลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปคำนวณหา

สภาวะการดำเนินการที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ค่าปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด โดยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมซึ่งให้ค่าปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 61.94 โดยน้ำหนัก คืออุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ในรูปกราฟเชิงเส้นระหว่างปริมาณเซลลูโลสจากการทดลองและปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการคำนวณตามแบบจำลอง

Figure 17 linear relationships between the amount of cellulose in experiment and the amount of cellulose were calculated by the model

2.1.1 ผลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณเซลลูโลสจากการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ผลการปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างตัวแปรอิสระทั้ง 3 ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อปริมาณเซลลูโลสที่ได้ ที่ประเมินจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ได้นำเสนอในรูปกราฟพื้นผิวตอบสนองมีลักษณะเป็นกราฟ 3 มิติ โดยใช้แบบจำลองที่เหมาะสมจากการวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองของตัวแปรที่มีความแตกต่างกัน กราฟพื้นผิวตอบสนองสามารถนำมาใช้ในการอธิบายและระบุผลกระทบของตัวแปรแต่ละตัวในด้านปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างตัวแปร ซึ่งจะแสดงผลของตัวแปรอิสระครั้งละ 2 ตัว มีรายละเอียดดังนี้

1. ผลของอุณหภูมิและเวลา

กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 18 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างอุณหภูมิ (x_1) และเวลา (x_2) ต่อปริมาณเซลลูโลสที่ได้ ซึ่งพบว่าปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยการเพิ่มอุณหภูมิ และปริมาณเซลลูโลสสูงสุดที่ร้อยละ 61.94 โดยน้ำหนัก จากกราฟจะเห็นได้ว่าที่ที่ปริมาณเซลลูโลสสูงสุดนั้นต้องใช้อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที เมื่อพิจารณาจากกราฟปริมาณเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนมีปริมาณเซลลูโลสสูงสุดจากเวลา 15 นาที จนถึงเวลา 40 นาที และจะค่อยลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในระยะเวลาช่วง 15 ถึง 40 นาที สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะไปละลายเอาส่วนที่เป็นลิกนินออกมาจากโครงสร้างของทะลายปาล์ม แต่เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มีน้ำเป็นตัวทำละลาย) จะไปทำปฏิกิริยากับโครงสร้างส่วนที่อยู่ถัดเข้ามาด้านในนั่นคือ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ทำให้เซลลูโลสเกิดการย่อยออกมาส่งผลให้ปริมาณเซลลูโลสลดลงเมื่อใช้เวลานานเกินไปในการปรับสภาพวัตถุดิบ

ure

ภาพที่ 18 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส

Figure 18 Surface plots showing the relationship between temperature and time affect the amount of cellulose

จากงานวิจัยของ Mosier และคณะ (2005) พบว่าการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยการทดลองที่อุณหภูมิห้อง เวลาในการปรับสภาพจะนานกว่าการปรับสภาพวัตถุดิบที่อุณหภูมิสูงๆ ซึ่งแตกต่างกับการปรับสภาพโดยมีกรดเป็นตัวเร่ง เนื่องจาก

การปรับสภาพด้วยด่างจะถูกจำกัดการเกิดปฏิกิริยา เพราะส่วนหนึ่งของด่างที่ใช้ทำปฏิกิริยาจะเกิดเป็นเกลือที่ผิวของวัตถุดิบ

2. ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 19 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างอุณหภูมิ (x_1) และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (x_3) ต่อปริมาณเซลลูโลสที่ได้ ซึ่งพบว่าปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยการเพิ่มอุณหภูมิ ส่วนความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีนัยสำคัญน้อยมากต่อปริมาณเซลลูโลส

emperature

(ºC)

ภาพที่ 19 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส

Figure 19 Surface plots showing the relationship between temperature and concentration affect the amount of cellulose

3. ผลของเวลาและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 20 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่าง เวลา (x_2) และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (x_3) ผลสอดคล้องกันกับแสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างอุณหภูมิ (x_1) และเวลา (x_2) ซึ่งพบว่าปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยการเพิ่มเวลาและความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยเวลาจะมีผลต่อ

ปริมาณเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เมื่อพิจารณาจากกราฟปริมาณเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนมีปริมาณเซลลูโลสสูงสุดที่เวลา 40 นาที และจะค่อยลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในระยะเวลาช่วง 15 ถึง 40 นาที สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะไปละลายเอาส่วนที่เป็นลิกนินออกมาจากโครงสร้างของทะลายปาล์ม โดยที่ลิกนินเป็นสารประกอบ polyhydroxy aromatic ซึ่งมี หมู่ -OH ที่สามารถเกิดเป็น Ether linkage กับ OH ของเซลลูโลสได้ ซึ่งจะเพิ่มความแข็งแกร่งกับโพลิเมอร์ได้ การกำจัดลิกนินออกโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เข้มข้นประมาณร้อยละ 20-30 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักทำปฏิกิริยากับวัตถุดิบ โดยที่เกิดเป็น Phenoxide salt ของลิกนินออกมา จากกราฟจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้น เวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ปริมาณเซลลูโลสก็จะน้อยลง เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงๆจะไปเกิดเป็น Phenoxide salt ของลิกนินออกมาจากโครงสร้างของทะลายปาล์มได้มากขึ้นดังนั้น แต่เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มีน้ำเป็นตัวทำละลาย) จะไปทำปฏิกิริยากับโครงสร้างส่วนที่อยู่ถัดเข้ามาด้านในนั่นคือ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ทำให้เซลลูโลสเกิดการย่อยออกมาส่งผลให้ปริมาณเซลลูโลสลดลงอย่างมากเมื่อใช้เวลานานเกินไปในการปรับสภาพวัตถุดิบ

centration

(%)

ภาพที่ 20 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส

Figure 20 Surface plots showing the relationship between time and concentration affect the amount of cellulose

2.2 ผลการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบการเตรียมด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (Acid pretreatment)

จากการออกแบบการทดลองโดยใช้โปรแกรม RSM ที่กำหนดตัวแปรต้น 3 ตัวแปร คือ อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง โดยมีตัวแปรตามคือ ปริมาณเซลลูโลส ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการทดลองการเตรียมวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่สภาวะต่างๆ

Table 13 the results of pretreatment with diluted sulfuric acid solution at various conditions

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ผลตอบสนอง
	X_1	X_2	X_3	Y (%)
1	120	0.6	30	38.80 ± 1.37
2	114	0.8	42	35.00 ± 2.36
3	120	0.6	90	35.00 ± 0.97
4	110	0.6	60	36.80 ± 0.35
5	130	0.6	60	35.00 ± 0.58
6	114	0.3	78	38.95 ± 0.52
7	120	0.6	60	39.86 ± 1.17
8	126	0.3	42	41.40 ± 0.55
9	114	0.8	78	32.50 ± 0.60
10	126	0.8	42	34.00 ± 1.88
11	120	0.6	60	40.00 ± 2.03
12	126	0.3	78	39.50 ± 0.51
13	120	0.6	60	39.90 ± 1.16
14	120	1.0	60	33.90 ± 1.00
15	114	0.3	42	41.34 ± 0.18
16	120	0.1	60	42.45 ± 0.67
17	126	0.8	78	33.05 ± 2.70
18	120	0.6	60	39.87 ± 1.35

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้โดยใช้โปรแกรม Essential regression ซึ่งสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรในการทดลองที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลสได้ ดังแสดงในสมการที่ 10

$$y = -516.03 + 9.383x_1 - 0.03995\, x_1^2 - 10.09x_2^2 - 0.00330\, x_3^2 + 0.00282x_1x_3 \ldots\ldots. (10)$$

กำหนดให้ y = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

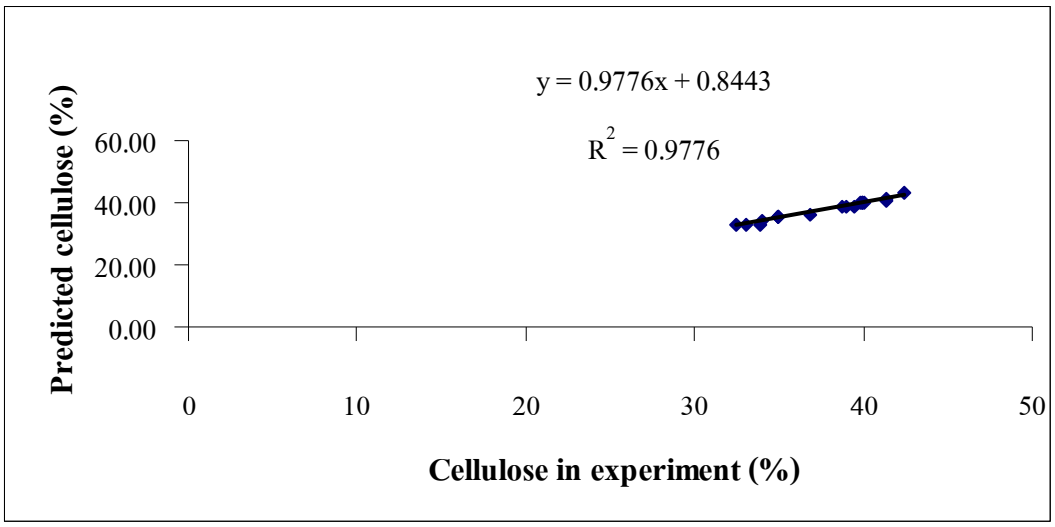
x_1 = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2 = ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

x_3 = เวลา (นาที)

จากสมการที่ 10 แสดงให้เห็นถึงตัวแปรที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส ซึ่งเมื่อพิจารณาจาก P value ที่ได้จากแบบจำลองในแต่ละเทอมเพื่อดูถึงความเหมาะสมของแบบจำลองที่ได้ดังแสดงในภาคผนวก ง จากแบบจำลองเทอมที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง ซึ่งมี P value = 1.61835×10^{-10} โดยแบบจำลองที่ได้มีค่า R^2 และ R^2 adjusted เท่ากับ 0.978 และ 0.968 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 จะบอกถึงความน่าเชื่อถือของแบบจำลองที่ได้ หากค่า R^2 มีค่าใกล้เคียงกับค่า R^2 adjusted แสดงว่าแต่ละเทอมในแบบจำลองที่ได้มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่าปริมาณเซลลูโลส จากข้อมูลของแบบจำลองที่ได้สามารถแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆกับค่าปริมาณเซลลูโลส ในรูปของกราฟพื้นผิว (surface plot) ดังภาพที่ 22 ถึง 24

จากข้อมูลในตารางที่ 13 เมื่อนำมาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลลูโลสจากการทดลองและค่าที่ได้จากการคำนวณในรูปกราฟเชิงเส้น พบว่าค่า R^2 เท่ากับ 0.967 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงดังภาพที่ 20 แสดงว่าสมการแบบจำลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปคำนวณหาสภาวะการดำเนินการที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ค่าปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด โดยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมซึ่งให้ค่าปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 43.28 โดยน้ำหนัก คืออุณหภูมิ 119 องศาเซลเซียส เวลา 50 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ในรูปกราฟเชิงเส้นระหว่างปริมาณเซลลูโลสจากการทดลองและปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการคำนวณตามแบบจำลอง

Figure 21 linear relationships between the amount of cellulose in experiment and the amount of cellulose were calculated by the model

2.2.1 ผลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณเซลลูโลสจากการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง

ผลการปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างตัวแปรอิสระทั้ง 3 ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง ต่อปริมาณเซลลูโลสที่ได้ ที่ประเมินจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ได้นำเสนอในรูปกราฟพื้นผิวตอบสนองมีลักษณะเป็นกราฟ 3 มิติ โดยใช้แบบจำลองที่เหมาะสมจากการวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองของตัวแปรที่มีความแตกต่างกัน กราฟพื้นผิวตอบสนองสามารถนำมาใช้ในการอธิบายและระบุผลกระทบของตัวแปรแต่ละตัวในด้านปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างตัวแปร ซึ่งจะแสดงผลของตัวแปรอิสระครั้งละ 2 ตัว มีรายละเอียดดังนี้

1. ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง

กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 22 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างอุณหภูมิ (x_1) และความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง (x_2) ต่อปริมาณเซลลูโลสที่ได้ ซึ่งพบว่าปริมาณเซลลูโลสลดลงอย่างมีนัยสำคัญด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง เนื่องจากการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ ในช่วงของอุณหภูมิ

สูงๆ และความเข้มข้นต่ำๆ และไม่สามารถละลายลิกนินออกมาได้ แต่สามารถทำให้ลิกนินแตกพันธะออกได้ ทำให้ง่ายต่อการย่อยเซลลูโลส (Mohammad และคณะ, 2008) ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจางนอกจากจะไปกำจัดเอาเฮมิเซลลูโลสออกแล้วยังไปย่อยเอาส่วนของเซลลูโลสออกมาได้ง่ายด้วย จึงส่งผลให้ปริมาณเซลลูโลสที่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาปริมาณเซลลูโลสสูงสุดที่ร้อยละ 43.28 โดยน้ำหนัก จากกราฟจะเห็นได้ว่าที่ที่ปริมาณเซลลูโลสสูงสุดนั้นต้องใช้อุณหภูมิ 119 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ɪerature (°c)

ภาพที่ 22 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส

Figure 22 Surface plots showing the relationship between temperature and concentration affect the amount of cellulose

2. ผลของอุณหภูมิและเวลา

กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 23 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างอุณหภูมิ (x_1) และเวลา (x_3) ต่อปริมาณเซลลูโลสที่ได้ ซึ่งพบว่าปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยการเพิ่มอุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยาสั้นลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun และ Chang (2005) ซึ่งกล่าวว่า การเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดเจือจางจะได้ผลดีในช่วงเวลาสั้นๆ และช่วงอุณหภูมิสูงๆ ในการทำปฏิกิริยา

ภาพที่ 23 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส

Figure 23 Surface plots showing the relationship between temperature and time affect the amount of cellulose

3. ผลของเวลาและความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง

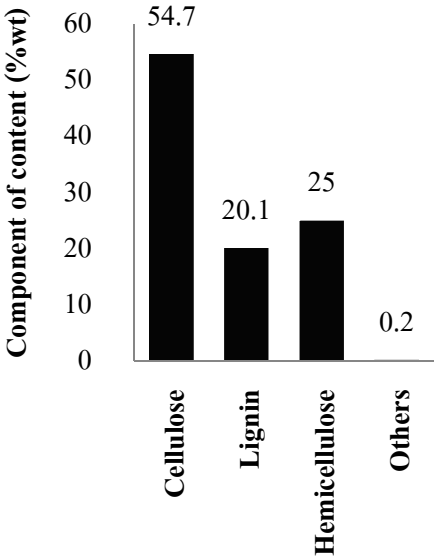
กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 24 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่าง เวลา (x_3) และความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง (x_2) ซึ่งพบว่าปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง และเวลาสั้นๆในการทำปฏิกิริยา

ภาพที่ 24 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลส

Figure 24 Surface plots showing the relationship between time and concentration affect the amount of cellulose

2.3 ผลการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Alkali pretreatment ร่วมกับการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Acid pretreatment

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Alkali pretreatment) และการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง (Acid pretreatment) ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 119 องศาเซลเซียส เวลา 50 นาที สำหรับความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการทดลองด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่สภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อน จากนั้นล้างให้สะอาดแล้วทำการทดลองต่อด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางที่สภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 25

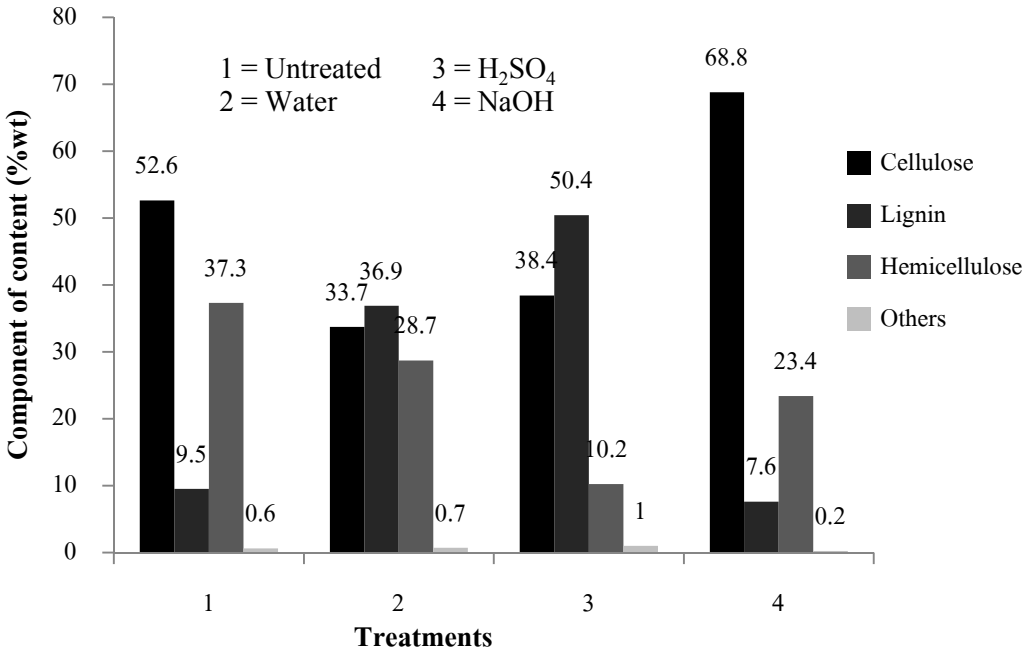


ภาพที่ 25 ผลการปรับสภาพวัตถุดิบการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Alkali pretreatment ร่วมกับการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Acid pretreatment

Figure 25 The result of Alkali pretreatment together with Alkali pretreatment

2.4 ผลการศึกษาองค์ประกอบในทะลายปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก น้ำ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

จากผลการทดลองทั้ง 3 กิจกรรมข้างต้น พบว่าได้ปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 61.94 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 43.28 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 119 องศาเซลเซียส เวลา 50 นาที สำหรับความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และได้ปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 54.7 โดยน้ำหนัก ที่สภาวะของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และร่วมกับสภาวะของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง ดังนั้นจึงเลือกที่สภาวะที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที ความเข้มข้นของสารร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 26 องค์ประกอบในทะลายปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำ ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียสเวลา 40 นาที ความเข้มข้นของสารเคมีร้อยละ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

Figure 26 Component in OPEFB after pretreated by chemical methods and untreated 130 °C, reaction time of 40 minutes and 15 %wt of chemical.

ทำการทดลองด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟิวริก และน้ำ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ได้เพื่อศึกษาว่าสารใดเหมาะแก่การปรับสภาพวัตถุดิบมากที่สุด ซึ่งพบว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากเมื่อพิจารณาจากภาพที่ 26 จะเห็นได้ว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุด

3. ผลการศึกษาการย่อยเซลลูโลส (Hydrolysis)

จากการออกแบบการทดลองโดยใช้โปรแกรม RSM ที่กำหนดตัวแปรต้น 3 ตัวแปร คือ อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง โดยมีตัวแปรตามคือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ทำการทดลองโดยนำวัตถุดิบมาทำการไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดซัลฟิวริกเจือจางที่ความเข้มข้นร้อยละ 2-6 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 110 -130 $^{\circ}$C เวลา 15-90 นาที ออกแบบการทดลองแบบ 2^3 rotatable central composite design (CCD) เพื่อให้เหมาะสมกับแบบจำลองลำดับที่สอง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้โดยใช้โปรแกรม Essential regression ซึ่งสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรในการทดลองที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ ดังแสดงในสมการที่ 11

$$y = 93.15 - 1.64x_1 - 0.57x_3 + 0.007\,x_1^2 + 0.005x_1x_3 + 0.0168x_2x_3 \ldots\ldots (11)$$

กำหนดให้ y = ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)

x_1 = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

x_2 = ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

x_3 = เวลา (นาที)

จากสมการที่ 11 แสดงให้เห็นถึงตัวแปรที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเมื่อพิจารณาจาก P value ที่ได้จากแบบจำลองในแต่ละเทอมเพื่อดูถึงความเหมาะสมของแบบจำลองที่ได้ดังแสดงในภาคผนวก ง จากแบบจำลองเทอมที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากที่สุด คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง ซึ่งมี P value = 0.000209 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahman และ คณะ (2007) โดยแบบจำลองที่ได้มีค่า R^2 และ R^2 adjusted เท่ากับ 0.949 และ 0.928 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 จะบอกถึงความน่าเชื่อถือของแบบจำลองที่ได้ หากค่า R^2 มีค่าใกล้เคียงกับค่า R^2

adjusted แสดงว่าแต่ละเทอมในแบบจำลองที่ได้มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากข้อมูลของแบบจำลองที่ได้สามารถแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆกับค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคส ในรูปของกราฟพื้นผิว (surface plot) ดังภาพที่ 28 ถึง 30

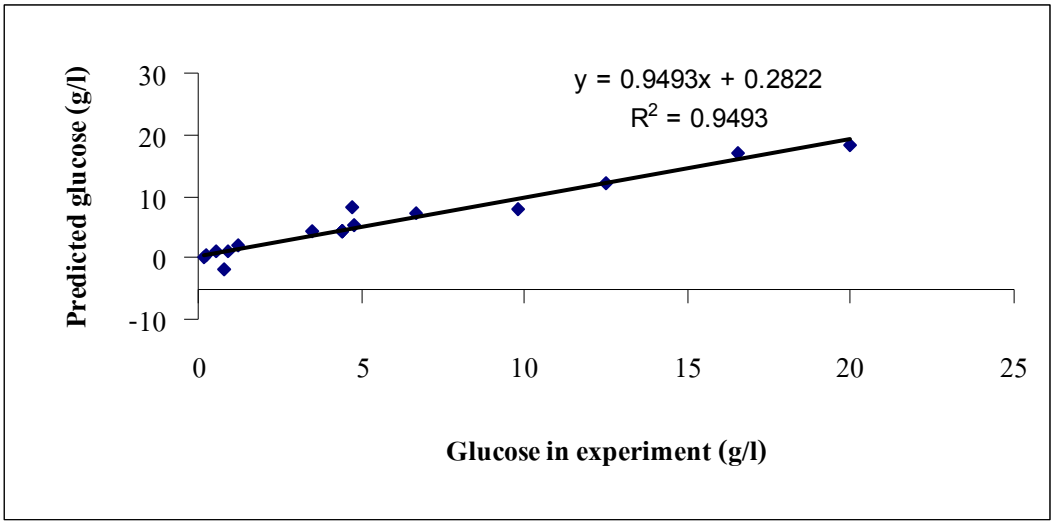
ตารางที่ 14 ผลการทดลองการเตรียมวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่สภาวะต่างๆ

Table 14 the results of pretreatment with diluted sulfuric acid solution at various conditions

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ปริมาณกลูโคส
	X_1	X_2	X_3	Y (g/l)
1	100	6	30	1.196 ± 1.21
2	115	7	60	9.791 ± 2.44
3	115	4	110	4.733 ± 0.35
4	115	4	10	0.222 ± 1.81
5	115	4	60	4.415 ± 4.09
6	130	6	30	6.700 ± 0.87
7	115	1	60	0.928 ± 0.17
8	140	4	60	16.542 ± 1.05
9	130	2	30	4.787 ± 1.02
10	100	2	30	0.200 ± 1.21
11	100	2	90	0.794 ± 0.42
12	130	6	90	19.960 ± 2.08
13	115	4	60	4.415 ± 4.09
14	90	4	60	0.581 ± 2.18
15	115	4	60	4.415 ± 4.09
16	115	4	60	4.415 ± 4.09
17	130	2	90	12.500 ± 0.84
18	100	6	90	3.520 ± 0.37

จากข้อมูลในตารางที่ 14 เมื่อนำมาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการคำนวณในรูปกราฟเชิงเส้น พบว่าค่า R^2 เท่ากับ

0.949 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงดังภาพที่ 27 แสดงว่าสมการแบบจำลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปคำนวณหาสภาวะการดำเนินการที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากที่สุด โดยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมซึ่งให้ค่าปริมาณกลูโคสร้อยละ 33.45 โดยน้ำหนัก คืออุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 110 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ในรูปกราฟเชิงเส้นระหว่างปริมาณกลูโคสที่ได้จากการทดลองและปริมาณกลูโคสที่ได้จากการคำนวณตามแบบจำลอง

Figure 27 showing linear relationships between the amount of glucose in experiment and the amount of glucose were calculated by the model

3.1 ผลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ผลการปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างตัวแปรอิสระทั้ง 3 ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง ต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ ที่ประเมินจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ได้นำเสนอในรูปกราฟพื้นผิวตอบสนองมีลักษณะเป็นกราฟ 3 มิติ โดยใช้แบบจำลองที่เหมาะสมจากการวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองของตัวแปรที่มีความแตกต่างกัน กราฟพื้นผิวตอบสนองสามารถนำมาใช้ในการอธิบายและระบุผลกระทบของตัวแปรแต่ละตัวในด้านปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างตัวแปร ซึ่งจะแสดงผลของตัวแปรอิสระครั้งละ 2 ตัว มีรายละเอียดดังนี้

1. ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง

กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 28 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างอุณหภูมิ (x_1) และความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง (x_2) ต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยการของเพิ่มขึ้นอุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง เนื่องจากการย่อยเซลลูโลสด้วยน้ำและมีกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งจะเป็นการเร่งให้มีการสลายพันธะ glycosidic เพื่อให้ได้โมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส ยิ่งเพิ่มตัวเร่งและเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสก็จะยิ่งง่ายต่อง่ายสลายพันธะ ดังนั้นปริมาณน้ำตาลกลูโคสจึงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก

Temperature
(°c)

ภาพที่ 28 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส

Figure 28 Surface plots showing the relationship between temperature and concentration affect the amount of glucose

2. ผลของอุณหภูมิและเวลา

กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 29 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่างอุณหภูมิ (x_1) และเวลา (x_3) ต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยการเพิ่มอุณหภูมิ และเมื่อใช้เวลานานในการย่อยเซลลูโลสจะส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahman และ คณะ (2007) ซึ่งกล่าวว่า การใช้เวลานานในการย่อย

จะเป็นการทำให้เกิดผลพลอยได้ที่มากขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของกลูโคสถูกย่อยสลายต่อจนกลายเป็นกรดอะซิติก และ เฟอร์ฟิวรัล ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง และจากงานวิจัยของ Ria Milati และคณะ (2011) ทำการย่อยทะลายปาล์มด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส เกิดฟิวเฟอรัล และกรดอะซิติกมากที่สุด ที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เกิด HMF มากที่สุดที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มเวลาในการย่อยจาก 5 นาทีเป็น 15 นาทีส่งผลให้ปริมาณกลูโคสที่ได้น้อยลง และในทางตรงกันข้ามปริมาณฟิวเฟอรัล กรดอะซิติก และ HMF กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เพราะเมื่อใช้เวลานานขึ้นส่งผลให้เกิดการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสไปเป็นผลพลอยได้ (ฟิวเฟอรัล กรดอะซิติก และ HMF) มากขึ้น

`emperature

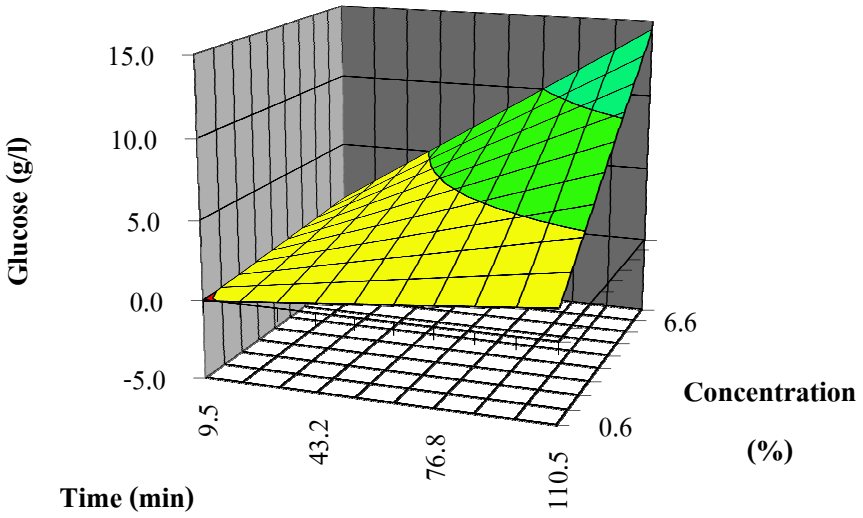
(ºc)

ภาพที่ 29 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส

Figure 29 Surface plots showing the relationship between temperature and time affect the amount of glucose

3. ผลของเวลาและความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง

กราฟ 3 มิติ ในภาพที่ 30 แสดงปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่าง เวลา (x_3) และความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง (x_2) ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเจือจาง และเวลาในการทำปฏิกิริยา



ภาพที่ 30 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส

Figure 30 Surface plots showing the relationship between time and concentration affect the amount of glucose

3.2 ผลของตัวยับยั้งที่เกิดขึ้นต่อปริมาณกลูโคสและไซโลส

ระหว่างฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ลิกโนเซลลูโลสจะถูกย่อยไปเป็นน้ำตาลและผลพลอยได้ต่างๆ ดังนี้

Cellulose » Glucan » Glucose » HMF » Formic acid, Levulinic acid

Hemicellulose » Xylan » Xylose » Furfural » Formic acid

» Mannan » Mannose » HMF » Formic acid, Levulinic acid

» Acetyl groups » Acetic acid

Lignin » Phenolic compounds

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 ปริมาณกลูโคสสูงสุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงกว่า 130 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าไซโลสซึ่งเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ria Millati และคณะ (2011) พบว่า ได้ปริมาณกลูโคสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 210 องศา

เซลเซียส ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 5 นาที และได้ปริมาณไซโลสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 5 นาที

ตารางที่ 15 กลูโคสและไซโลสที่ได้จากการทดลองการเตรียมวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่สภาวะต่างๆ

Table 15 the results of glucose and xylose with diluted sulfuric acid solution at various conditions

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ปริมาณกลูโคส	ปริมาณไซโลส
	X_1	X_2	X_3	Y (g/l)	Y (g/l)
1	100	6	30	1.196 ± 1.21	6.9557 ± 0.50
2	115	7	60	9.791 ± 2.44	44.7000 ± 0.33
3	115	4	110	4.733 ± 0.35	19.8000 ± 0.02
4	115	4	10	0.222 ± 1.81	6.7679 ± 1.81
5	115	4	60	4.415 ± 4.09	22.3000 ± 4.13
6	130	6	30	6.700 ± 0.87	23.1000 ± 0.31
7	115	1	60	0.928 ± 0.17	10.1000 ± 1.20
8	140	4	60	16.542 ± 1.05	40.0000 ± 1.04
9	130	2	30	4.787 ± 1.02	35.8000 ± 0.95
10	100	2	30	0.200 ± 1.21	4.4550 ± 1.21
11	100	2	90	0.794 ± 0.42	7.7220 ± 0.001
12	130	6	90	19.960 ± 2.08	39.5200 ± 4.91
13	115	4	60	4.415 ± 4.09	22.3000 ± 4.13
14	90	4	60	0.581 ± 2.18	4.1987 ± 2.48
15	115	4	60	4.415 ± 4.09	22.3000 ± 4.13
16	115	4	60	4.415 ± 4.09	22.3000 ± 4.13
17	130	2	90	12.500 ± 0.84	36.6600 ± 0.10
18	100	6	90	3.520 ± 0.37	9.2492 ± 0.17

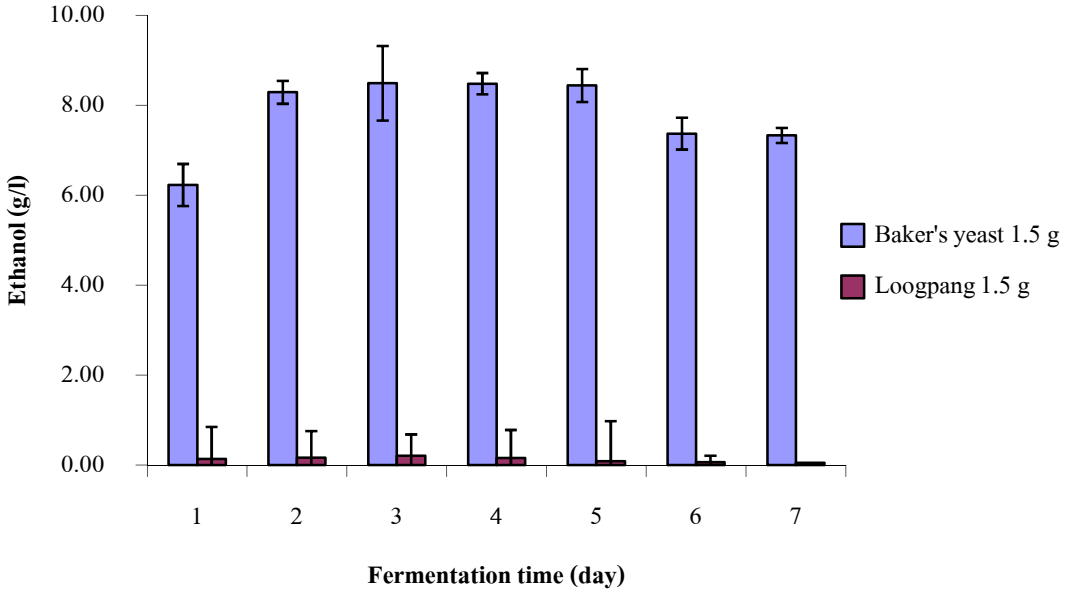
กลูโคสเป็นโมโนเมอร์ของเซลลูโลส ไซโลสเป็นโมนอเมอร์หนึ่งของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสเป็นผลึกที่มีลักษณะซับซ้อนต้านทานต่อปฏิกิริยาเคมี ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (Amorphous) ง่ายต่อการย่อยสลายเป็นโมนอเมอร์เล็กๆ ดังนั้นจึงทำให้เข้าใจได้ว่าเซลลูโลสต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่าเฮมิเซลลูโลสในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้น้ำตาล

ในส่วนของผลพลอยได้ต่างๆ ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งสำหรับการหมักน้ำตาลเพื่อเป็นเอทานอล ดังนั้นเวลาในการไฮโดรไลซีสจึงเป็นตัวแปรที่สำคัญ เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิสูงๆ ความเข้มข้นของกรดสูงๆ ปริมาณกลูโคสจะสูงขึ้นในขณะที่ปริมาณไซโลสลดลง เหตุที่ไซโลสลดลงเนื่องจากเมื่อเวลาใช้ในการไฮโดรไลซีสนานไซโลสได้ถูกย่อยสลายต่อจนเกิดเป็นผลพลอยได้ เช่น กรดอซิติก เฟอร์ฟิวรัล เป็นต้น ดังนั้น เพื่อให้เหมาะสมต่อการหมักจึงต้องใช้เวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีส โดยสภาวะที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้สำหรับการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลส คือ อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส คือ อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 110 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4. ผลการศึกษาการหมัก (Fermentation)

4.1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากยีสต์ขนมปังและลูกแป้งข้าวหมาก

จากการทดลองนำตัวอย่างที่ผ่านการไฮโดรไลซีสแล้วไปกรองเพื่อแยกเอาน้ำตาลและกากที่หลงเหลือออกจากกัน จะได้สารละลายใส ไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อน มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เพื่อนำไปหมัก ทำการทดลองหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังและลูกแป้งข้าวหมากโดยใช้ปริมาณเชื้อยีสต์ 1.5 กรัม มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้เป็น 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่อง GC ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 ปริมาณเอทานอลจากการหมักด้วยยีสต์ขนมปังเปรียบเทียบกับลูกแป้งข้าวหมาก

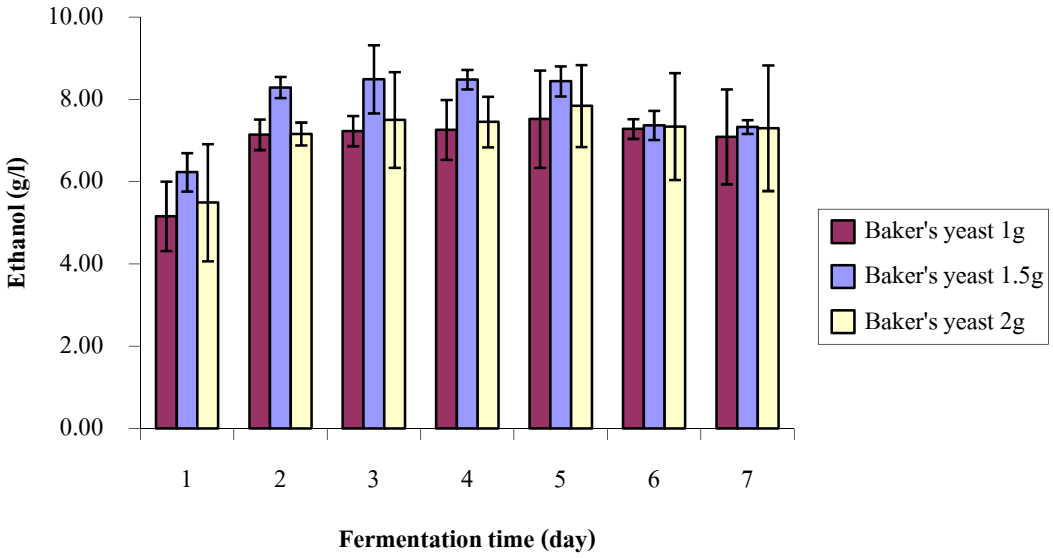
Figure 31 Amount of ethanol from fermentation with baker's yeast compared with Loogpang

พิจารณาดังภาพที่ 31 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ายีสต์ขนมปังให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าลูกแป้งประมาณ 56 เท่า โดยยีสต์ขนมปังให้ปริมาณเอทานอลในช่วง 6.23 – 8.49 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ ลูกแป้งให้ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 0.05 – 0.21 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลจากลูกแป้งน้อยกว่าเนื่องจากใน 1.5 กรัมของลูกแป้งมียีสต์อยู่หลายชนิดซึ่งยีสต์ที่เหมาะในการหมักเอทานอลอาจมีอยู่น้อย จึงส่งผลให้ได้ปริมาณเอทานอลน้อย โดยในลูกแป้งจะมีทั้งยีสต์และรา มีเชื้อราสกุล Mucor sp., Amylomyces rouxii , Rhizopus oryae ที่เป็นคุณ เป็นประโยชน์ ไม่ใช่เชื้อราที่เป็นโทษ เชื้อราทำหน้าที่ สร้างเอนไซม์อมิเลสออกมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล และมียีสต์ ในสกุล Sacchacomyces sp., saccharomycopsis fibuligera , hansenula anomala , Endomycopsis ที่หมักน้ำตาลให้กลายเป็น แอลกอฮอล์ แต่ก็มีไม่มาก และจากงานวิจัยของ มณชัย (2003) พบว่าจากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ Saccharomycopsis fibuligera (แยกจากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า จากแหล่งลูกแป้ง 10 แหล่ง) จำนวน 20 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับ Saccharomyces cerevisiae RIT I (แยกได้ในระหว่างการหมักสาโท) พบว่า S. fibuligera ทุกไอโซเลทให้ลักษณะการเจริญคล้ายกัน และเจริญได้ช้ากว่า S. cerevisiae RIT I ในทุกปัจจัยการทดลอง และพบว่า อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของกลูโคส ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ S. fibuligera คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 และความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร การศึกษาผลของอุณหภูมิ (10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส) ต่อการเจริญและการมีชีวิตของ

S. fibuligera เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเอทานอลต่างกัน (ร้อยละ 0. 5, 10 และ 15โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าอุณหภูมิสูงช่วยให้ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงขึ้น ส่วนอุณหภูมิต่ำช่วยให้ยีสต์ทนเอทานอลได้ดีขึ้น

4.2 ผลของเวลา และปริมาณเชื้อยีสต์ในการหมักเอทานอล

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า การหมักด้วยยีสต์ขนมปังได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าลูกแป้งข้าวหมาก ดังนั้นจึงศึกษาผลของเวลา และปริมาณเชื้อยีสต์ โดยทำการหมักเอทานอลด้วยการเติมยีสต์ขนมปัง 1.0, 1.5 และ 2 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ˚C เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่อง GC ผลที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 32 จากผลการทดลองการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (Saccharomyces cerevisiae) ดังภาพที่ 32 จะเห็นได้ว่าที่เวลาในการหมัก 5 วัน ได้ปริมาณเอทานอลมากที่สุดสำหรับทุกๆ แต่เมื่อพิจารณาจากผลดังแสดงในรูปที่ 32 ในการหมัก 3 วัน 4 วัน และ 5 วัน ได้ปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมทางเศรษฐศาสตร์ ดังนั้น เวลาที่เหมาะสมในการหมัก คือ 3 วัน และพบว่าเชื้อยีสต์ 1.5 กรัมได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าเชื้อยีสต์ 2 กรัม และ 1 กรัม ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบได้ว่าปริมาณเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก เวลาในการหมัก pHเริ่มต้น อุณหภูมิในการหมัก ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก รวมทั้งผลพลอยได้จากการไฮโดรไลซีส ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก จากการทดลองได้กำหนดให้ pHเริ่มต้น อุณหภูมิในการหมัก และปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักให้คงที่



ภาพที่ 32 ปริมาณเอทานอลจากการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง

Figure 32 Amount of ethanol from fermentation with baker’s yeast

เพื่อศึกษาผลของปริมาณเชื้อยีสต์เริ่มต้นและเวลาในการหมักต่อปริมาณเอทานอลที่ได้ พบว่าปริมาณเอทานอลจะค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ จึงมีการย่อยน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอล และพบว่าได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 8.49 กรัมต่อลิตร ใช้เชื้อยีสต์ 1.5 กรัม และเวลาในการหมัก 3 วัน เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นน้ำตาลได้ถูกใช้เพื่อการเจริญเติบโตของยีสต์จนหมดทำให้ยีสต์ตายลงในที่สุด ปริมาณเอทานอลที่ได้หลังจาก 3 วันจึงมีปริมาณค่อนข้างคงที่ ในทางทฤษฎี 100 กรัมของน้ำตาลกลูโคส จะได้เอทานอล 51.4 กรัม จากการทดลองปริมาณเอทานอลที่ได้ควรจะต้องเป็น 10.28 กรัม แต่เนื่องจากมีผลของตัวยับยั้ง โดยจากงานวิจัยของ Aziz และคณะ (2002) ระบุว่าระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส จะมีการเกิดตัวยับยั้ง เช่น กรดอะซิติก สารประกอบฟีโนลิก เฟอร์ฟิวรัล และ HMF (5-Hydroxymethyl Furfural) เหล่านี้จะไปลดอัตราการเกิดเอทานอลในขั้นตอนการหมัก และจากงานวิจัยของ Chung และ Lee (1985) พบว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์เริ่มต้นจะมีชีวิตรอด และอีกครึ่งจะตาย ด้วยตัวยับยั้ง (กรดอะซิติก สารประกอบฟีโนลิก เฟอร์ฟิวรัล และ HMF (5-Hydroxymethyl Furfural)) เหล่านี้เป็นตัวทำลาย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาองค์ประกอบของทะลายปาล์ม

สำหรับงานวิจัยนี้ ทะลายปาล์มได้จากอำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง โดยนำทะลายปาล์มมาผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการทางกายภาพโดยการบด แต่ไม่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีการทางเคมี ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 24 เมช พบว่า มีปริมาณเซลลูโลส และลิกนินร้อยละ 52.6 และ 9.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

2. การศึกษาผลการปรับสภาพวัตถุดิบ (Preatment)

2.1 การศึกษาผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Alkali pretreatment)

สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Alkali pretreatment) คืออุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.2 การศึกษาผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (Acid pretreatment)

สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัตถุดิบการเตรียมด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (Acid pretreatment) คืออุณหภูมิ 119 องศาเซลเซียส เวลา 50 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.3 การศึกษาผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Alkali pretreatment ร่วมกับการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธี Acid pretreatment

ทำการทดลองปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส และเวลา 40 นาที จากนั้นล้างจนมีสภาวะเป็นกลางแล้ว ทำการปรับสภาพวัตถุดิบต่อด้วย กรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 119 องศาเซลเซียส และเวลา 50 นาที พบว่าได้ปริมาณเซลลูโลส และลิกนินร้อยละ 54.7 และ 20.1 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

2.4 การศึกษาองค์ประกอบในทะลายปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟิวริก น้ำ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี

ทำการทดลองด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เพื่อศึกษาว่าสารใดเหมาะแก่การปรับสภาพวัตถุดิบมากที่สุด และเปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี พบว่า โซเดียมไฮดรอกไซด์เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

3. การศึกษาผลการย่อยเซลลูโลส (Hydrolysis)

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส คืออุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 110 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลส คือ อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4. การศึกษาการหมัก (Fermentation)

ยีสต์ขนมปังให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าลูกแป้งประมาณ 56 เท่า โดยยีสต์ขนมปังให้ปริมาณเอทานอลในช่วง 6.23 – 8.49 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ ลูกแป้งให้ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 0.05 – 0.21 กรัมต่อลิตร

การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (Saccharomyces cerevisiae) เชื้อยีสต์ 1.5 กรัม ได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าเชื้อยีสต์ 2 กรัม และ 1 กรัม ตามลำดับ และใช้เวลาในการหมัก 5 วัน

5. การคาดการณ์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากทะลายปาล์มโดยรวมทั้งประเทศ

จากข้อมูลของกรมวิชาการเกษตร พบว่าประเทศไทยมีปริมาณปาล์มน้ำมันที่ผลิตได้ประมาณ 4 ล้านตันต่อปี และจากข้อมูลของผู้ประกอบการโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าทะลายปาล์ม 100% ภายหลังจากแยกผลออกแล้ว จะได้ผลปาล์มประมาณ 75% ที่เหลือ 25% เป็นทะลายปาล์มเปล่า ประกอบกับในงานวิจัยนี้ พบว่าการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในทะลายปาล์มสามารถให้ปริมาณเอทานอลค่อนข้างสูงคือ ทะลายปาล์ม 5 กรัมทำการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการ

Separation Hydrolysis and Fermentation ได้ปริมาณเอทานอล 8.49 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงปริมาณทะลายปาล์มทั้งประเทศประมาณ 1 ตัน จะสามารถผลิตเอทานอลได้มากถึง 1.7 ล้านตันต่อลิตร ซึ่งมีประมาณที่ค่อนข้างสูงสามารถช่วยทดแทนการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศได้อย่างมีศักยภาพ

ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนการไฮโดรไลซีส อาจจำเป็นต้องมีการแยกเอาน้ำตาลออกจากผลพลอยได้อื่นๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของยีสต์ในการหมัก ซึ่งจะส่งผลให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้นด้วย

ในขั้นตอนของการหมักควรมีการศึกษาส่วนของ pH ระหว่างการทำการหมัก เนื่องจากสามารถควบคุมให้คงที่ทุกการทดลองได้เพียงแค่ pH เริ่มต้นเท่านั้น และอุณหภูมิระหว่างที่ทำการหมัก เพราะถึงแม้จะทำในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิได้ แต่ภายในขวดหมักอาจมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่ได้ด้วย

สำหรับลูกแป้งเพื่อให้ได้ประสิทธิผลในการผลิตเอทานอลที่มากขึ้นอาจจำเป็นต้องแยกเชื้อ เพราะในลูกแป้งมีทั้งยีสต์และราหลายชนิด อาจมีต้นทุนที่ถูกกว่าการใช้ยีสต์บริสุทธิ์

เอกสารอ้างอิง

ไกรยศ แซ่ลิ้ม. 2550. การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อยีสต์จากลูกแป้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มณชัย เดชสังกรานนท์. 2546. คุณสมบัติของยีสต์และราที่มีบทบาทในการหมักข้าวหมากและสาโท.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยุทธศักดิ์ สุบการี. 2551. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยใช้วิธี Simultaneous Sacchrification and Fermentation (SSF). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาสงขลานครินทร์.

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. 2538. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชา เคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2546. ปาล์มน้ำมัน (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.arda.or.th [14 มีนาคม2555]

ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์. 2009. (ออนไลน์)
สืบค้นจาก: http://msds.pcd.go.th/name.asp [14 มีนาคม2555]

อรุณวรรณ นุชพ่วง. 2547. การย่อยสลายหญ้าแฝกห้อม Vetiveria zizanioides nash โดยใช้เชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Abdul A, Husin M, Mokhtar A. 2002. Preparation of cellulose from oil palm empty fruit bunches via ethanol digestion: effect of acid and alkali catalysts. J Oil Palm Res. 9-14.

Aziz, A. A., Das, K., Husin, M. and Mokhtar, A. 2002. Effect of physical and chemical Pretreatment on xylose and glucose production from oil palm pressed fiber. J.Oil Palm Res. 14 : 10-17.

Bandaru, V.V.R., Somalanka, S.R., Mendu, D.R., Madicherl, N.R. and Chityala, A. 2006. Optimization of fermentation condition for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cell 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.

Boonma, C. 2011. Effects of particle size of oil palm ash as adsorbent for chromium removal and water-to-solid ratio in combination with cement:oil palm ash:ash-sludge ratio for stabilization/solidification of ash-sludge. Master Thesis in Environmental Technology, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.

Chiaramonti, D. 2007. Bioethanol: role and production technologies. Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses. 209–251.

Delgenes ,J.P.,Moletta,R. and Navarro,J.M. 1996. Effect of lignocellulose degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by Saccharomyces cerevisiae,Zymommonase mobiliss, Pichia stipitis, and Candida shehatae.Enzyme Microb. Tech. 19:220-225.

Gerald R. Cysewski, Charles R. Wilke. 1976. Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis. I. Fermentation of hydrolysate to ethanol and single-cell protein. Biotechnology and Bioengineering. 8:1297–1313.

Gupta .R. et al. 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of Prosopis juliflora, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis-NCIM 3498 .Bioresource Technology. 100: 1214-1220.

Graham, L. E., Graham, J. M., and Wilcox, L. W. (2006). Plant Biology, 2nd Edition. 58-79. Person Education Inc.

Johnson, G. B. 2006. Essential of the Living World. 41-68. Mc Graw Hill Inc.

Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Journal of Biotechnology. 56: 1-24.

Mohammad J. Taherzadeh and Keikhosro Karimi. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. Int. J. Mol. Sci. 9 : 1621-1651.

Miller,G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyt. Chem. 31: 426-428.

Montgometry, D.C. 1997. Design and Analysis of Experiments. New York: John Wiley and Sons.

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

P.C. Badger. 2002. Ethanol From Cellulose: A General Review. ASHS Press, Alexandria, VA: 17-21

Rahman, S. H. A., Choudhury, J. P. and Ahmad, A. L. 2006. Production of xylose from oil palm empty fruit bunch. Biochemical Engineering Journal. 30: 97-103.

Ria Millati and Rachma Wikandari. 2011. Ethanol from oil palm empty fruit bunch via dilute-acid and fermentation by Mucor indicus and Saccharomyces cerevisiae. Agricultural Journal. 6 (2) : 54-59.

Ryohei Tanaka et al. 2002. Preparation of cellulose pulp from oil palm empty fruit bunches (EFB) by processes including prehydrolysis and ozone bleaching. Proceedings of USM-JIRCAS joint International Symposium - Lignocellulose - Material of the Millennium: Technology and Application, Penang, Malaysia, Universiti Sains Malaysia.

Sigma-Aldrich. 2001. Hemicellulose. (Online)

Search from: http://www.sigmaaldrich.com/life- science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-ii.html

[14 March 2012]

Sun F.Xu,R.C. Sun,P.Fower and M.S.Baird. 2005. Characteristics of degradedhemicellulosic Polymers obtained fromsteamexplodedwheatstraw. CarbohydratePolymers. 60:15-26.

Sun,Y.and Cheng,J.2002.Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresourse Technology. 83:1-11.

Umikalsom,M.S.,Ariff,A.B.,Zulkifli,H.S.,Tong,C.C.,Hass,.M.A. andKarim,M.I.A. 1997. The treatment of oil palm empty fruit bunch for subsequent as substratefor cellulose production by Chaetomium globosum . Bioresourse Technology. 62:1-9.

Wan Zahari M, Alimon AR. 2004. Use of palm kernel cake and oil palm byproducts in compound feed. Palm Oil Develop. 40: 5-9.

Wikipedia, the free encyclopedia. 2012. Cellulose. (Online)
Search from: http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulose [14 March 2012]

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Liao, J. and Zhange, Y. 2005. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. Proc Biochem. 40 : 3082-3086.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C., Yu, F., Jin, S. 2006. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. Proc. Biochem. 41 : 869-873.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน (A.O.A.C., 1999)

สารเคมีที่ใช้

- อะซิโตน หรือแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 โดยน้ำหนัก
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 75 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.00 นอร์มัล
- Decahydronapthalene
- Acid detergent solution

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตรมาประมาณ 1 กรัม ใส่ใน บีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Acid detergent ปริมาณ 100 มิลลิลิตร และ Decahydronapthalene ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อน และให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นลดความร้อนให้เหลือเบาๆ เป็นเวลา 60 นาที
3. กรองผ่านครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว (w_1) โดยใช้แรงดึงดูดสุญญากาศเบาๆ ล้าง ตัวอย่างที่ติดอยู่ในครูซิเบิลด้วยน้ำร้อน 3-5 ครั้ง ขณะล้างให้เขี่ยก้อนเยื่อใยที่อยู่ในครูซิเบิลให้ กระจายออก โดยใช้แท่งแก้ว หลังจากนั้นให้ดูดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศและล้างต่อด้วยอะซิโตนปริมาณเล็กน้อยประมาณ 2-3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ
4. นำครูซิเบิลไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งน้ำหนักที่ชั่งได้คงที่ (w_2)
5. นำครูซิเบิลไปวางในถาดก้นตื้น เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 72 (ก่อนใช้ให้แช่เย็นที่ 15 °C) ลงในครูซิเบิลประมาณครึ่งหนึ่งแล้วคนด้วยแท่งแก้วคนเพื่อให้เยื่อใยเปียกทั่วถึง เติมกรดเพิ่ม ลงไปทุกชั่วโมง พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 3 ชั่งโมง
6. นำครูซิเบิลไปกรองเอากรดออก โดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ แล้วล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด

7. อบครูซิเบิลที่ได้จากข้อ 6 อุณหภูมิ 100 °C เพื่อกำจัดความชื้นทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้ว ชั่งน้ำหนัก (w_3)
8. นำครูซิเบิลไปเผาที่อุณหภูมิ 500 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก (w_4)

การคำนวณ

$$ADF = ((w_2 - w_1) \times 100)/S$$

$$L = ((w_3 - w_4) \times 100)/S$$

$$C = ADF - L$$

โดยที่ ADF = Acid detergent fiber (ร้อยละ)

L = ปริมาณลิกนิน (ร้อยละ)

C = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละ)

w_1 = น้ำหนักครูซิเบิลเปล่า (กรัม)

w_2 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังย่อยด้วย Acid detergent (กรัม)

w_3 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังผ่านกรดซัลฟิวริก (กรัม)

w_4 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังการเผา (กรัม)

S = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

2. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสโดยใช้เครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Test Method Used:	Refer to WI-RES-HPLC-001
Test Equipment:	High Performance Liquid Chromatograph, 1100, Hewlett Packard, Germany
Test technique:	Reverse phase high performance liquid chromatograph
Mobile phase:	Acetronitrile:Water (75:25,v/v), 1 ml/min
Detector:	Refractive index detector (RID)
Injection volume:	10 µL 5µm, temperature 35 ° C

3. วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column:	HP-INNOWAX 19091 N-133
Column description:	ท่อเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 0.251 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร
Column temperature:	120 องศาเซลเซียส (15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 120 องศาเซลเซียส)
Inject temperature	220 องศาเซลเซียส
Detector:	Flame - ionized detector (FID)
Carier gas, flow rate:	Helium, 2 มิลลิลิตรต่อนาที

ภาคผนวก ข

เครื่องมือวิเคราะห์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

หลักการทำงาน

HPLC หรือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลว เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่นในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ทางด้านการแพทย์ สมุนไพร และทางด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณต่ำๆได้ในระดับไมโครกรัม (μg) ถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมแบบใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram)

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC

1. Mobile phase / Solvent: หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

2. Degaser: ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector

3. Pump: ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก จึงทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

4. Injector / Autosampler: ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC

5. Column: หรือจะเรียกว่า stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยการบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase แต่สำหรับ HPLC : Agilent 1100 มีอุปกรณ์เพิ่มเติมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ Column จึงเรียกว่า column thermostat

Column มี 2 ชนิดคือ

1. Analytical column มีความยาวประมาณ 10 - 30 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 4 - 10 มิลลิเมตร วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ เช่น stainless steel polyethylene แก้ว PEEK เป็นต้น สำหรับส่วนที่เป็น packing material ที่บรรจุอยู่ภายใน ได้แก่ silica based resins gels bonded phases เป็นต้น
2. Guard column นิยมต่อระหว่างส่วน injector และส่วนของ analytical column ซึ่งจะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับสารตัวอย่างรวมทั้งตัวทำละลาย เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของ analytical column ส่วนที่เป็น packing material จะคล้ายคลึงกับ analytical column

6. Detector: คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี

ตัวอย่างการทดสอบด้วย HPLC เช่น หาปริมาณ

-วิตามินซี ในเลือด น้ำผลไม้

- วิตามินอี ในอาหารสัตว์
- น้ำตาลในน้ำผลไม้
- กลีเซอร์ไรด์ ในน้ำมัน

2. Gas Chromatography (GC)

เป็นเทคนิคใช้สำหรับแยกสารผสมที่มีคุณสมบัติที่สามารถเป็นแก๊สได้ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊สเช่นกันแต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารผสม เช่น ฮีเลียม จะทำหน้าที่เป็นตัวพา (Carrier) สารผสม ส่วนเฟสอยู่กับที่อาจจะเป็นของแข็งหรือของเหลวที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ เมื่อทั้งตัวพาและสารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์นี้ เฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์จะดึงดูดด้วยแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตตามความเป็นขั้วของสารกับโมเลกุลในสารผสมทำให้องค์ประกอบในสารผสมถูกพาไปด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน สารผสมก็จะแยกออกจากกัน เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊สนี้มักใช้ในการวิเคราะห์ทั้ง

คุณภาพและปริมาณในหลายด้าน อาทิเช่น ทางด้านอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง น้ำมันหอมระเหย ทางการแพทย์ ปิโตรเลียม และทางสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

องค์ประกอบหลักที่สำคัญของเครื่อง GC สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ

Injector คือ ส่วนที่สารผสมตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าสู่เครื่องมือ และระเหยกลายเป็นไอก่อนที่จะเข้าสู่ column อุณหภูมิที่เหมาะสมของ injector ควรเป็นอุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้ตัวอย่างระเหยได้แต่ต้องไม่ทำให้สารสลายตัว เช่น Split, Splitless injector, On column injector เป็นต้น

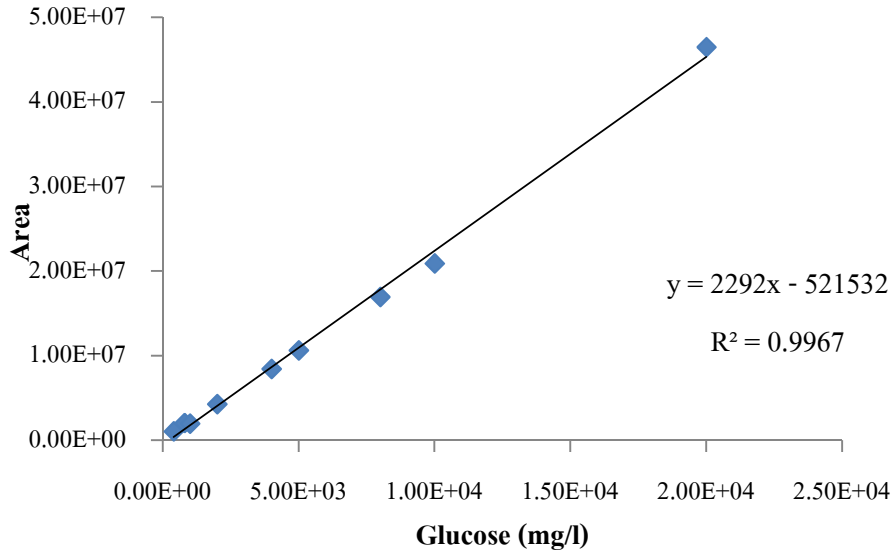
Oven คือ ส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุ column และเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของ column ให้เปลี่ยนไปตามความเหมาะสมกับวิธีการที่ต้องการวิเคราะห์สารผสม การควบคุมอุณหภูมิของ oven นั้นมี 2 แบบ คือ Isothermal จะใช้อุณหภูมิเดียวตลอดการวิเคราะห์ และแบบ temperature program จะสามารถเปลี่ยนอุณหภูมิได้ในระหว่างการวิเคราะห์ มักจะนิยมใช้กับสารผสมที่มีช่วงของจุดเดือดกว้าง ทำให้ chromatogram ที่ได้มี peak shape ไม่ broad และยังช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์

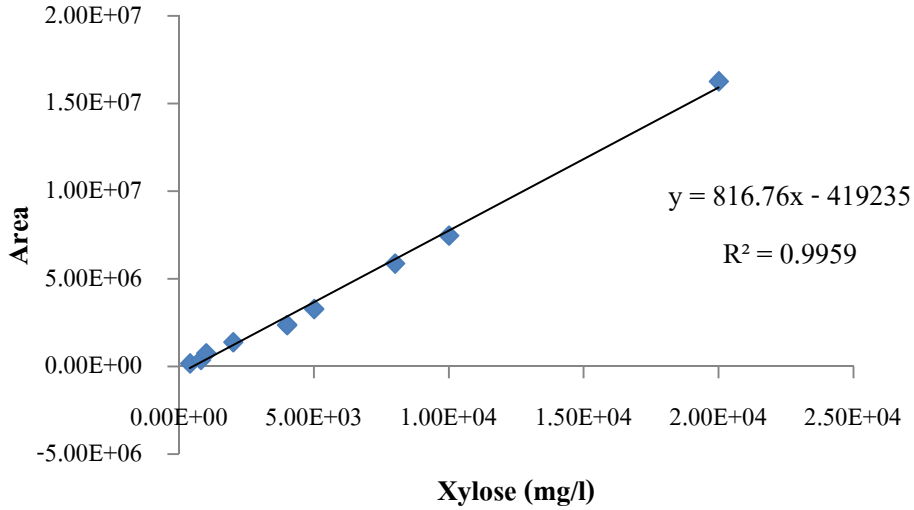
Detector คือ ส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง และดูว่าสารตัวอย่างที่สนใจมีปริมาณอยู่เท่าใด

ภาคผนวก ค

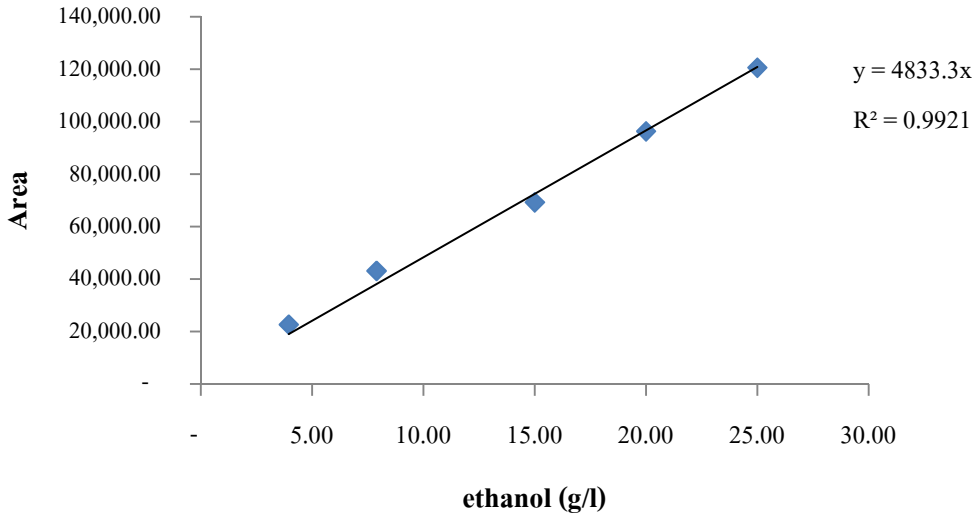
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสจากเครื่อง HPLC





2. กราฟมาตรฐานเอทานอลจากเครื่อง GC



ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Essential Regression และข้อมูลดิบ

1. ข้อมูลทางสถิติของเซลลูโลสจากการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.1 ข้อมูลทางสถิติของแบบจำลอง

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลทางสถิติของแบบจำลองผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อปริมาณเซลลูโลส

		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	-253.95	0.09987	140.05	-566.01	58.10	-1.813	
b1	4.383	0.09187	2.351	-0.855	9.621	1.864	703.23
b2	2.217	0.00515	0.622	0.831	3.603	3.564	307.79
b3	-1.857	0.575	3.206	-9.001	5.288	-0.579	284.90
b4	-0.01707	0.122	0.01010	-0.03957	0.00543	-1.690	687.48
b5	-0.01921	3.18434E-07	0.00162	-0.02281	-0.01561	-11.89	23.92
b6	-0.00538	0.325	0.00520	-0.01696	0.00619	-1.036	294.37
b7	0.01665	0.563	0.02783	-0.04537	0.07866	0.598	291.21

1.2 ตาราง ANOVA

ตารางที่ 17 แสดง ANOVA ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อปริมาณเซลลูโลส โดยใช้โปรแกรม Essential Regression

Source	SS	SS%	MS	F	F Signif	Df
Regression	2514.9	97	359.27	42.09	1.25198E-06	7
Residual	85.36	3	8.536			10
LOF Error	85.09	3 (100)	12.16	135.0666	0.000962	7
Pure Error	0.270	0 (0)	0.09000			3
Total	2600.2	100				17

2. ข้อมูลทางสถิติของเซลลูโลสที่ได้จากการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง

2.1 ข้อมูลทางสถิติของแบบจำลอง

ตารางที่ 18 แสดงข้อมูลทางสถิติของแบบจำลองผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางต่อปริมาณเซลลูโลส

		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	-516.03	3.26734E-06	63.63	-654.66	-377.40	-8.110	
b1	9.383	1.33983E-06	1.062	7.070	11.70	8.836	1669.4
b2	-0.03995	1.11242E-06	0.00444	-0.04963	-0.03027	-8.994	1683.5
b3	-10.09	1.61835E-10	0.511	-11.21	-8.981	-19.75	1.004
b4	-0.00330	1.62729E-05	0.000478	-0.00435	-0.00226	-6.910	44.84
b5	0.00282	7.95667E-05	0.000483	0.00177	0.00387	5.840	46.06

2.2 ตาราง ANOVA

ตารางที่ 19 แสดง ANOVA ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางต่อปริมาณเซลลูโลส โดยใช้โปรแกรม Essential Regression

Source	SS	SS%	MS	F	F Signif	Df
Regression	170.49	98	34.10	104.56	1.81777E-09	5
Residual	3.913	2	0.326			12
LOF Error	3.901	2 (100)	0.433	105.9338	0.00135	9
Pure Error	0.01228	0 (0)	0.00409			3
Total	174.40	100				17

3. ข้อมูลทางสถิติของกลูโคสได้จากการย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก

3.1 ข้อมูลทางสถิติของแบบจำลอง

ตารางที่ 20 แสดงข้อมูลทางสถิติของแบบจำลองผลการย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกต่อปริมาณกลูโคส

		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	93.15	0.00338	25.58	37.41	148.88	3.641	
b1	-1.642	0.00243	0.429	-2.577	-0.706	-3.822	243.18
b2	-0.567	0.00154	0.139	-0.871	-0.264	-4.075	102.22
b3	0.00721	0.00202	0.00184	0.00321	0.01121	3.925	236.35
b4	0.00502	0.00127	0.00120	0.00240	0.00763	4.181	108.18
b5	0.01684	0.000209	0.00322	0.00983	0.02384	5.237	1.872

3.2 ตาราง ANOVA

ตารางที่ 21 แสดง ANOVA ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลการย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกต่อปริมาณกลูโคส โดยใช้โปรแกรม Essential Regression

Source	SS	SS%	MS	F	F Signif	Df
Regression	523.27	95	104.65	44.90	2.34102E-07	5
Residual	27.97	5	2.331			12
Total	551.24	100				17

4. ข้อมูลดิบ

4.1 ข้อมูลผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

4.2 ข้อมูลผลการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง

4.3 ข้อมูลผลการย่อยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส

4.4 ข้อมูลผลการหมักเอทานอล

จำนวนการทดลอง	อุณหภูมิ	เวลา	ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์	ปริมาณเซลลูโลส (ครั้งที่1)	ปริมาณเซลลูโลส (ครั้งที่2)	ปริมาณเซลลูโลส (ครั้งที่3)	ปริมาณเซลลูโลส (เฉลี่ย)	S	%RSD
1	115	90	8	17.32	18.10	18.52	17.98	0.43	2.39
2	106	30	12	52.88	52.01	51.51	52.13	0.49	0.94
3	124	30	12	57.12	58.20	58.51	57.94	0.52	0.89
4	124	30	4	57.34	57.55	56.11	57.00	0.55	0.96
5	124	75	12	35.67	35.12	35.50	35.28	0.24	0.67
6	106	75	12	31.76	31.90	30.01	31.22	0.74	2.39
7	115	53	8	55.72	55.78	55.30	55.60	0.18	0.33
8	115	53	1	57.32	57.49	57.82	57.54	0.18	0.31
9	115	53	8	55.10	55.18	56.52	55.60	0.56	1.01
10	106	30	4	51.98	51.86	49.56	51.13	0.96	1.89
11	115	53	15	57.90	57.89	57.44	57.74	0.19	0.32
12	115	53	8	55.12	55.39	56.29	55.60	0.43	0.78
13	124	75	4	32.67	32.95	31.22	32.28	0.66	2.03
14	100	53	8	46.13	46.85	47.10	46.69	0.36	0.76
15	106	75	4	33.56	33.11	33.00	33.22	0.21	0.63
16	130	53	8	60.59	60.23	59.76	60.19	0.29	0.49
17	115	53	8	55.35	55.04	54.61	55.00	0.26	0.48
18	115	15	8	42.09	42.06	43.50	42.55	0.58	1.37

จำนวนการทดลอง	อุณหภูมิ	เวลา	ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง	ปริมาณเซลลูโลส (ครั้งที่1)	ปริมาณเซลลูโลส (ครั้งที่2)	ปริมาณเซลลูโลส (ครั้งที่3)	ปริมาณเซลลูโลส (เฉลี่ย)	S	%RSD
1	1	120	0.6	38.21	38.54	39.65	38.80	0.53	1.37
2	2	114	0.8	35.46	35.87	33.67	35.00	0.83	2.36
3	3	120	0.6	35.23	35.32	34.45	35.00	0.34	0.97
4	4	110	0.6	36.99	36.78	36.63	36.80	0.13	0.35
5	5	130	0.6	35.21	35.12	34.67	35.00	0.20	0.58
6	6	114	0.3	38.94	38.67	39.24	38.95	0.20	0.52
7	7	120	0.6	39.25	39.77	40.56	39.86	0.47	1.17
8	8	126	0.3	41.23	41.20	41.77	41.40	0.23	0.55
9	9	114	0.8	32.18	32.66	32.66	32.50	0.20	0.60
10	10	126	0.8	34.78	34.21	33.01	34.00	0.64	1.88
11	11	120	0.6	40.76	40.56	38.68	40.00	0.81	2.03
12	12	126	0.3	39.46	39.24	39.80	39.50	0.20	0.51
13	13	120	0.6	39.95	39.22	40.53	39.90	0.46	1.16
14	14	120	1.0	33.88	33.43	34.39	33.90	0.34	1.00
15	15	114	0.3	41.23	41.44	41.35	41.34	0.07	0.18
16	16	120	0.1	42.89	42.11	42.35	42.45	0.28	0.67
17	17	126	0.8	33.90	33.65	31.60	33.05	0.89	2.70
18	18	120	0.6	39.45	39.41	40.75	39.87	0.54	1.35

จำนวนการทดลอง	ตัวแปร			ปริมาณกลูโคส	ปริมาณไซโลส
	อุณหภูมิ	ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก	เวลา	Y (g/l)	Y (g/l)
1	100	6	30	1.196 ± 1.21	6.9557 ± 0.50
2	115	7	60	9.791 ± 2.44	44.7000 ± 0.33
3	115	4	110	4.733 ± 0.35	19.8000 ± 0.02
4	115	4	10	0.222 ± 1.81	6.7679 ± 1.81
5	115	4	60	4.415 ± 4.09	22.3000 ± 4.13
6	130	6	30	6.700 ± 0.87	23.1000 ± 0.31
7	115	1	60	0.928 ± 0.17	10.1000 ± 1.20
8	140	4	60	16.542 ± 1.05	40.0000 ± 1.04
9	130	2	30	4.787 ± 1.02	35.8000 ± 0.95
10	100	2	30	0.200 ± 1.21	4.4550 ± 1.21
11	100	2	90	0.794 ± 0.42	7.7220 ± 0.001
12	130	6	90	19.960 ± 2.08	39.5200 ± 4.91
13	115	4	60	4.415 ± 4.09	22.3000 ± 4.13
14	90	4	60	0.581 ± 2.18	4.1987 ± 2.48
15	115	4	60	4.415 ± 4.09	22.3000 ± 4.13
16	115	4	60	4.415 ± 4.09	22.3000 ± 4.13
17	130	2	90	12.500 ± 0.84	36.6600 ± 0.10
18	100	6	90	3.520 ± 0.37	9.2492 ± 0.17

ยีสต์ขนมปัง 1 กรัม

เวลาหมัก	เอทานอล (ครั้งที่ 1)	เอทานอล (ครั้งที่ 2)	เอทานอล (ครั้งที่ 3)	เอทานอล (เฉลี่ย)	S	%RSD
1	5.11	5.18	5.19	5.16	0.043589	0.84
2	7.15	7.11	7.16	7.14	0.026458	0.37
3	7.26	7.22	7.21	7.23	0.026458	0.37
4	7.28	7.30	7.20	7.26	0.052915	0.73
5	7.55	7.59	7.42	7.52	0.088882	1.18
6	7.27	7.30	7.27	7.28	0.017321	0.24
7	7.00	7.11	7.16	7.09	0.081854	1.15

ยีสต์ขนมปัง 1.5 กรัม

เวลาหมัก	เอทานอล (ครั้งที่ 1)	เอทานอล (ครั้งที่ 2)	เอทานอล (ครั้งที่ 3)	เอทานอล (เฉลี่ย)	S	%RSD
1	6.20	6.25	6.25	6.23	0.029155	0.47
2	8.27	8.31	8.28	8.29	0.021213	0.26
3	8.42	8.50	8.56	8.49	0.070356	0.83
4	8.46	8.48	8.50	8.48	0.020103	0.24
5	8.41	8.45	8.47	8.44	0.030822	0.37
6	7.34	7.38	7.39	7.37	0.026042	0.35
7	7.32	7.34	7.34	7.33	0.012247	0.17

ยีสต์ขนมปัง 2 กรัม

เวลาหมัก	เอทานอล (ครั้งที่ 1)	เอทานอล (ครั้งที่ 2)	เอทานอล (ครั้งที่ 3)	เอทานอล (เฉลี่ย)	S	%RSD
1	5.440	5.450	5.5800	5.49	0.078102	1.423
2	7.140	7.180	7.1600	7.16	0.020000	0.279
3	7.540	7.560	7.4000	7.50	0.087178	1.162
4	7.440	7.500	7.4100	7.45	0.045826	0.615
5	7.880	7.890	7.7500	7.84	0.078102	0.996
6	7.390	7.400	7.2300	7.34	0.095394	1.300
7	7.320	7.400	7.1800	7.30	0.111355	1.525

ลูกแป้ง 1.5 กรัม

เวลาหมัก	เอทานอล (ครั้งที่ 1)	เอทานอล (ครั้งที่ 2)	เอทานอล (ครั้งที่ 3)	เอทานอล (เฉลี่ย)	S	%RSD
1	0.141	0.139	0.140	0.140	0.0010	0.714
2	0.169	0.170	0.171	0.170	0.0010	0.588
3	0.211	0.210	0.209	0.210	0.0010	0.476
4	0.161	0.160	0.159	0.160	0.0010	0.625
5	0.090	0.091	0.089	0.090	0.0008	0.889
6	0.070	0.070	0.070	0.070	0.0001	0.143
7	0.050	0.050	0.050	0.050	0.0000	0.000

ภาคผนวก จ

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์

PSU
NS
ICET-2011
Faculty of Engineering
Prince of Songkla University
The 5th PSU-UNS International Conference on Engineering and Technology (ICET-2011)
May 2-3, 2011 : Merlin Beach Resort Hotel, Tritrang Beach, Phuket, Thailand
ICET-2011
http://www.icet.eng.psu.ac.th
NSTDA
HARIKLE SCIENCE

UTILIZATION OF CELLULOSE FOR ETHANOL PRODUCTION FROM OIL PALM EMPTY FRUIT BUNCH BY USING SEPARATION HYDROLYSIS AND FERMENTATION PROCESS (SHF)

Sairudee duangwang[1]*, Chayanoot Sangwichien[1]
[1]Prince of Songkla University, Department of chemical engineering, Faculty of Engineering, Thailand
*email: D.Sairudee@yahoo.com

Abstract: *Oil palm empty fruit bunch is a potential source of cellulose which can serve as a promising raw material for the production of ethanol. The hydrolysis and ethanol production was investigated by using separation hydrolysis and fermentation process (SHF), in which yeast from Look Pang (a traditional starter culture for production alcoholic foods in Thailand) was used as a biocatalyst. After alkali pretreatment with 10% NaOH for 15 min, the amount of cellulose was 54.13% (on dry weight basis). The concentration of glucose was 0.18 g/l after cellulose was hydrolyzed by 6% H_2SO_4 at 121 °C for 90 min under the operating pressure of 15 psi. The resulting aqueous phase rich in glucose was fermented by yeast from Look Pang 1.5 grams to produce ethanol. Total yeild of ethanol was 2.89% with the ethanol concentration of 3.61 g/l. Therefore, implementation of empty oil palm fruit bunch for the development of alternative source of energy could be an effective approach and key enabler to the billion-ton biofuel vision.*

Key Words: ethanol, oil palm empty fruit bunch, cellulose, Separation Hydrolysis and Fermentation .

1. INTRODUCTION

The rising price of crude petroleum, accelerated depletion of fossil resources, global warming, and the lack of alternatives to replace fuels and chemicals derived from fossil resources all drive a growing interest in conversion of agricultural waste material into bio-fuels and bioproducts. Although Thailand is blessed with resources of petroleum and natural gas, large population and growing economy demanding higher energy consumption and thus putting the huge pressure on countries limited resources. The present major biomaterial materials in Thailand are sugarcane molasses and starch from cassava. Therefore, ethanol production from non-food resources such as oil palm empty fruit bunch might be one of new alternative sources.

Oil palm empty fruit bunch are agricultural residues and lignocellulosic material which can used for production of ethanol.

The basic steps for the production of ethanol are microbial (yeast) fermentation of sugars. Prior to fermentation, some crops require pretreatment and saccharification or hydrolysis of cellulose or starch into sugars

Pretreatment is an important tool for practical cellulose conversion processes, and is the subject of this article. Pretreatment is required to alter the structure of cellulosic biomass to make cellulose more accessible to the enzymes that convert the carbohydrate polymers into fermentable sugars as represented in the schematic diagram of Fig. 1.

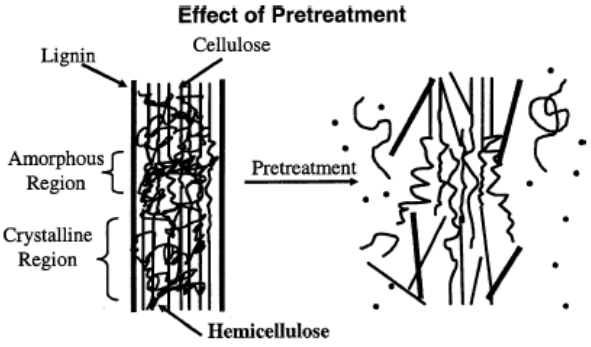


Figure 1. *Schematic of goals of pretreatment on lignocellulosic material (adapted from Hsu et al., 1980).*

Look Pang is starter culture of microorganism include mold and yeast. The productions of ethanol are yeast fermentation of sugars.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Raw material

oil palm empty fruit bunch (OPEFB) fiber was collected from local palm oil , sun-dried and ground to a particle size <1 mm.

2.2. Alkali pretreatment

30 g of OPEFB was soaked in NaOH (1, 5 ,10 and 15%) with a OPEFB:NaOH ratio of 1:10 (w/v). The alkaline treated OPEFB was heated at 100^{o}C for 15 min, and then filtered and neutralized by extensive washing. The neutralized sample of OPEFB was dried in oven at 60-70 ^{o}C for 24 h. The dried product of OPEFB was crushed to mesh size of 0.75-1 mm by the Hammer mill machine. Cellulose and lignin were then determined by the AOAC method. The maximum cellulose and minimum lignin content was selected to study the effect of heat at 100^{o}C for various time intervals of 15, 30, 60 and 90 min.

2.3. Acid hydrolysis

Acid hydrolysis of OPEFB biomass was carried out in 125 ml Erlenmeyer flasks by 6% of H_2SO_4 at 121 °C for 90 min under the operating pressure of 15 psi. After hydrolysis, the hydrolysate was separated from aqueous solution by filtration. The filtrate was then analyzed for determination of glucose.

2.4. Fermentation

The ethanol production from the hydrolysates obtained after acid hydrolysis was investigated. The acid hydrolysate was supplemented with nutrients and fermentation was carried out in 25 ml Erlenmeyer flasks containing 15 ml of fermentation media incubated at 30°C in a rotary shaker at 150 rpm for 5 days. Fermentation was inoculated with Look Pang (yeast) for ethanol production at different levels varying from 1- 2 g/flask. Aliquots were withdrawn every 24 h for the analysis of sugar and ethanol determination.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The first step of the present research consisted of Alkali pretreatment. As can be seen in Table 1, The amount of cellulose in oil palm empty fruit bunch increased with all condition of sodium hydroxide solution compared with the amount of cellulose were not pretreated by chemical. Indicated that sodium hydroxide solution can be dissolved the compositions of oil palm empty fruit bunch. They are hemicellulose and lignin. After pretreatment the amount of lignin increased, but increased only slightly may be the result from sodium hydroxide solution were not able to remove lignin directly, but through the removal of soluble hemicellulose because of Lignocellulose material structure (lignin and hemicellulose bonding). The result found that, alkali pretreatment conditions 10% weight by volume of sodium hydroxide at 100^{o}C for 15 min provided maximum cellulose and minimum lignin were 54.13% and 20.48%, respectively.

Table 1. *Amount of OPEFB component varying quantities of sodium hydroxide*

% NaOH	OPEFB obtained after pretreatment (% dry weight)	OPEFB component (% dry weight)			
		cellulose	lignin	moisture	others
No Pretreatment	87.25	29.82	17.79	9.53	42.86
1% NaOH	66.06	41.21	21.75	8.70	28.34
5% NaOH	53.27	47.74	19.75	9.22	23.26
10% NaOH	48.55	54.13	20.48	9.02	16.37
15% NaOH	45.59	47.96	22.50	8.73	20.81

The amount of cellulose does not depend on heating time as can be seen in Table 2.

Table 2. *Amount of OPEFB component varying heating time*

Time (min)	OPEFB component (% dry weight)			
	cellulose	lignin	moisture	others
15	54.13	20.48	9.02	16.37
30	46.05	18.73	8.71	26.51
60	49.39	20.00	8.72	21.89
90	44.22	19.69	8.97	27.12

The main objectives of the present research were converted from cellulose to reducing sugar by hydrolysis. The result found that glucose was 0.18 g/l.

Effect of time fermentation and the amount of Look pang used in the fermentation shown in Figure 2. The results indicated that the time to ferment for 3 days and the amount of Lookpang 1.5 grams. Highest amount of ethanol was 3.61 g / l was ethanol yield was 2.89% and productivity was 0.05 g ethanol / l / hour.

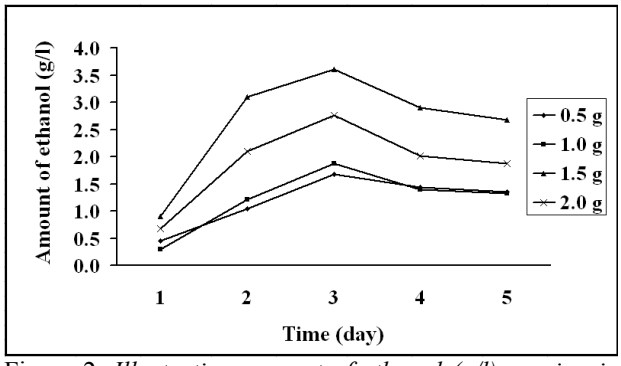


Figure 2. *Illustration amount of ethanol (g/l) varying in time to fermentation.*

4. CONCLUSION

Ethanol production from OPEFB using separation hydrolysis and fermentation process (SHF), in which yeast from Look Pang. After alkali pretreatment with 10% NaOH for 15 min cellulose was hydrolyzed by 6% H_2SO_4 at 121 °C for 90 min under the operating pressure of 15 psi. Glucose was fermented by yeast from Look Pang 1.5 grams to produce ethanol. In hydrolysis processing would be use enzyme to convert cellulose into sugar for higher ethanol yield.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Faculty of Engineering, Prince of Songkla University for financially support.

6. REFERENCES

[1] G.L Miller, "Use of DinitrosaIicyIic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Analytical Chemistry*., 1959, Vol. 31, No. 3, pp. 426-428.

[2] J. P. Delgenes, R. Moletta, and J. M. Navarro, "Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*", *Enzyme and Microbial Technology*., 1996, Vol. 19, pp. 220-225.

[3] MJ. Taherzadeh, K. Karimi, "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review", *International Journal of Molecular Sciences*., 2008, Vol. 9, pp. 1621-1651.

[4] Rebecca A. Silverstein, Ye Chen, Ratna R. Sharma-Shivappa, Michael D. Boyette and Jason Osborne "A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks", *Bioresourse Technology*., 2007, Vol. 98, pp. 3000-3011.

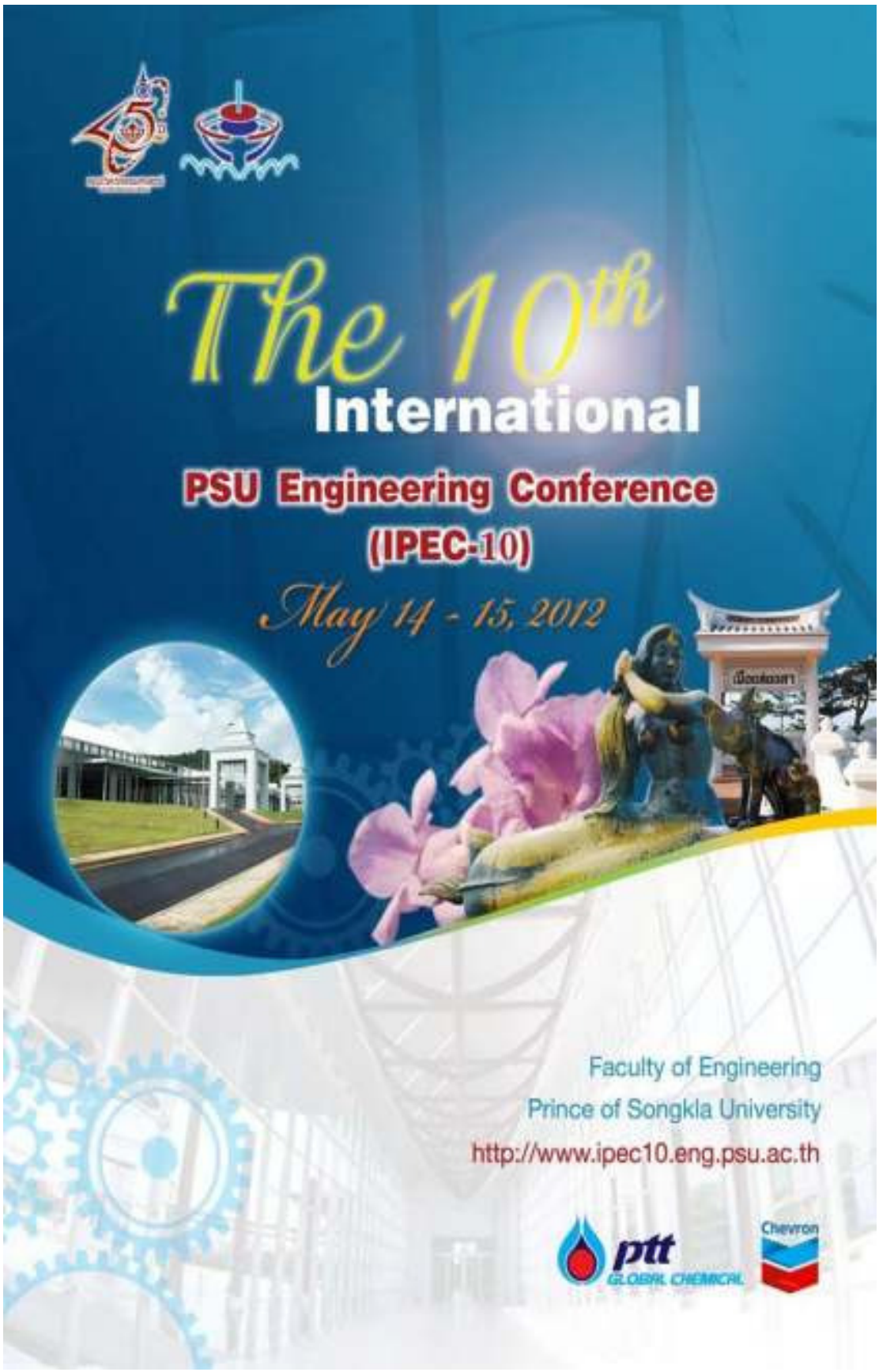
[5] R. Gupta, "Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of Prosopis juliflora, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis-NCIM 3498", *Bioresource Technology*., 2009, Vol. 100, pp. 1214-1220.

[6] S.H.A. Rahman, J.P. Choudhury, A.L. Ahmad, A.H. Kamaruddin, "Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose", *Bioresource Technology*., 2007, Vol. 98, pp. 554-559.

[7] S. Zhu, Y. Wu, Z. Yu, Q. Chen, G. Wu, F. Yu, C. Wang and S. Jin, "Microwave-assisted Alkali Pre-treatment of Wheat Straw and its Enzymatic Hydrolysis", *Biosystems Engineering*., 2006, Vol. 94, pp. 437-442.

[8] M. S. Umikalsom, A. B. Ariff, H. S. Zulkifli, C. C. Tong, M. A. Hassan and M. I. A. Karim, "The treatment of oil palm empty fruit bunch for subsequent as substratefor cellulose production by *Chaetomium globosum*", *Bioresourse Technology*., 1997, Vol. 62, pp. 1-9.

[9] Y. Sun, J. Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review", *Bioresource Technology*., 2002, Vol. 83, pp. 1-11.


The 10th
International
PSU Engineering Conference
(IPEC-10)
May 14 - 15, 2012
Faculty of Engineering
Prince of Songkla University
http://www.ipec10.eng.psu.ac.th
ptt
GLOBAL CHEMICAL
Chevron

The 10th International PSU Engineering Conference
May 14-15, 2012

Optimization Studies on Alkali Pretreatment for Ethanol Production of Oil Palm Empty Fruit Bunch

Sairudee duangwang[1]*, Chayanoot Sangwichien[1]
[1]Prince of Songkla University, Department of chemical engineering, Faculty of Engineering, Thailand
*email: sasai_td@hotmail.co.th

Abstract

Oil palm empty fruit bunch (OPEFB) is a potential source of cellulose which can serve as a promising raw material for the production of ethanol. The increasing interest on use of lignocellulosic waste for bioconversion to fuels and chemicals are justifiable as these materials are low cost, renewable and widespread sources of sugars. The objective of the present study was to determine the effect of NaOH concentration, reaction temperature and reaction time for alkali pretreatment to increase the amount of cellulose for hydrolysis to achieve high glucose yield. Batch reactions were carried out under various reaction temperatures, reaction times and NaOH concentrations. Response Surface Methodology (RSM) was followed to optimize the alkali pretreatment in order to obtain high amount of cellulose (%). The optimum reaction temperature, reaction time and NaOH concentration were found to be 130 ˚C, 40 min and 15% (w/v), respectively. The maximum value of cellulose was obtained 68.8% by using the above condition. 19.96 g/L glucose was achieved when reaction was carried out at 130 ˚C for time period of 90 min when 6% (w/v) of H_2SO_4 concentration maintained.

Keywords: alkali pretreatment, cellulose, glucose, Response Surface Methodology (RSM), optimization.

1. Introduction

The rising price of crude petroleum, accelerated depletion of fossil resources, global warming, and the lack of alternatives to replace fuels and chemicals derived from fossil resources all drive a growing interest in conversion of agricultural waste material into bio-fuels and bioproducts. Although Thailand is blessed with resources of petroleum and natural gas, large population and growing economy demanding higher energy consumption and thus putting the huge pressure on countries limited resources. The present major biomaterial materials in Thailand are sugarcane molasses and starch from cassava. Therefore, ethanol production from non-food resources such as oil palm empty fruit bunch might be one of new alternative sources.

Lignocellulosic biomass is the most abundant organic material on earth and also promising raw material for bioenergy production. OPEFB, an agricultural residue in the process of bio-oil extraction, is an abundant and low-cost lignocellulosic material in many European and Asian countries similar to US corn stover. Utilization of the OPEFB gives an added value for this material and a solution for the removal of this abundant waste, solving a problem of the bio-oil industry and increasing the economical yield of the process. Therefore, a double effect is obtained, economic and ecologic. The most frequent use for OPEFB is energy production by combustion in many Asian countries. This adds to the problem of air pollution, increasing the emissions of CO_2. Other alternative uses of OPEFB are the production of chemical compounds such as acetic acid, furfural, or 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and the biotechnological production of ethanol. OPEFB is formed by three main fractions (cellulose, hemicelluloses, and lignin). Cellulose and hemicelluloses are both polymers built up by long chains of sugar monomers, which after pretreatment and hydrolysis can converted into fermentable sugars and produce a myriad of fuels and chemicals by microbial fermentation.

The basic steps for the production of ethanol are microbial (yeast) fermentation of sugars. Prior to fermentation, some crops require pretreatment and saccharification or hydrolysis of cellulose or starch into sugars.

Effective pretreatment technologies need to meet several important criteria, essentially minimal energy, high sugar yield, high sugar concentration, and acceptable capital and operating costs. Alkali pretreatment refers to the application of alkaline solutions such as NaOH, $Ca(OH)_2$ (lime) or ammonia to remove lignin and a part of the hemicellulose, and efficiently increase the accessibility of enzyme to the cellulose. The alkali pretreatment can result in a sharp increase in saccharification, with manifold yields. Pretreatment can be performed at low temperatures but with a relatively long time and high concentration

of the base. Hydrothermal pretreatments, including steam explosion, hot water autocatalyzed pretreatments, and dilute-acid pretreatment, have been extensively studied in the literature and typically employ hot water or dilute acid to hydrolyze the hemicellulose. For the case of dilute-acid pretreatment, it typically employs 0.4–2% (w/v) of acid (nitric, sulfur dioxide, phosphoric acid, and mainly sulfuric acid) at temperatures of 160–220 °C to recover hemicelluloses and enhance digestion of cellulose.

In this work, the alkali pretreatment of OPEFB was optimized through the utilization of statistical experimental design. Evaluation criteria for optimization of the pretreatment conditions were based on high value of cellulose. The purpose of this study was to gain a more accurate understanding of the quantities of NaOH required for effective hydrolysis and the reactivity trade-offs with reaction time and temperature that will enable overall process optimization.

2. Materials and Methods

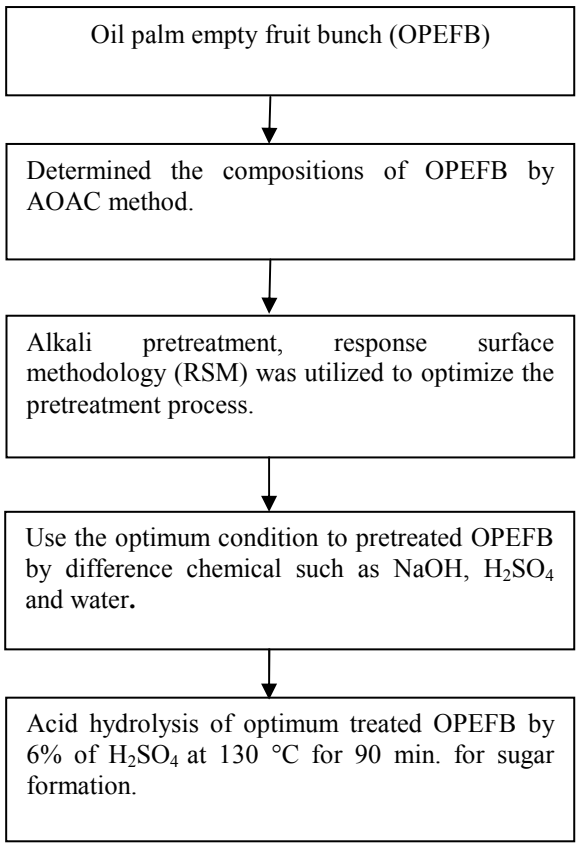


Figure1. Flow diagram of this research.

2.1 Raw material

Oil palm empty fruit bunch (OPEFB) fiber was collected from local palm oil , sun-dried and ground to a particle size <1 mm.

2.2 Alkali pretreatment

30 g of OPEFB was soaked in NaOH (1-15% (w/v) or 0.01-0.15 g/ml) with a OPEFB:NaOH ratio of 1:10 (w/v). The reaction conditions tested were temperature (100-130 °C) and reaction time (15–90 min). And then filtered and neutralized by extensive washing. The neutralized sample of OPEFB was dried in oven at 60-70 °C for 24 h. The dried product of OPEFB was crushed to mesh size of 0.75-1 mm by the Hammer mill machine. Cellulose and lignin were then determined by the AOAC method. The temperature, NaOH concentration, and residence time for the experimental design are given in Table 1. A total of 18 runs were carried out. After that use the optimum condition to pretreated OPEFB by difference chemical such as NaOH, H_2SO_4 and water**.**

2.3 Experimental design and RSM

In the experimental plan, response surface methodology (RSM) was utilized to optimize the pretreatment process and a 2^3 rotatable central composite design (CCD) was adopted in order to fit a second order model and the design consisted of 18 sets of experiments. The basic theoretical aspects, the fundamental assumptions and the experimental implications of RSM have been discussed elsewhere (Montgomery, 2001).

2.4 Acid hydrolysis

Acid hydrolysis of OPEFB biomass was carried out in 125 ml Erlenmeyer flasks by 6% of H_2SO_4 at 130 °C for 90 min. After hydrolysis, the hydrolysate was separated from aqueous solution by filtration. The filtrate was then analyzed for determination of glucose and xylose.

2.5 Analytical methods

Xylose and glucose in the acid hydrolysate were analyzed by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC, SHIMADZU) using SUPELCOSIL LC-NH2 column and RI detector. Aqueous acetonitrile (75%) was used as mobile phase with flow rate of 1.5 ml/min and oven temperature was maintained at 50 °C.

3. Results and Discussion

3.1 Composition of OPEFB

The composition of this material was analyzed according to the AOAC method. The results of an analysis (based on a 105 °C dry weight) of the composition of OPEFB. The composition of OPEFB was determined to be 52.6% cellulose, 37.3% hemicellulose, 9.5% lignin and 0.6% other. The results agree well with the recent analysis data reported by Umikalsom et al. [8]. Analysis of the OPEFB shows that theoretical fermentable sugars

accounted for more than 62.1% on a dry matter basis, similar to that of other major lignocellulosic biomass types, such as rice straw, wheat straw, and corn stover, indicating that OPEFB has a great potential as a bio-fuel feedstock.

3.2 Optimization of Alkali Pretreatment by Response Surface Methodology

The coded and decoded values of factors in the central composite design (CCD) are shown in Table 1. Experimental design and cellulose yield are shown in Table 2. The statistical significance of the second-order model equation was verified by an F test [analysis of variance (ANOVA)]. The following second-order polynomial prediction was obtained from regression analysis of cellulose production data.

Table 1 Experimental range and levels of independent process variables

Independent variable	Symbol	Range and levels				
		-α	-1	0	1	+α
Temperature (˚C)	X_1	100	106	115	124	130
Reaction time (min)	X_2	15	30	53	75	90
NaOH concentration (%)	X_3	1	4	8	12	15

$$Y = - 236.32 + 4.233\ X_1 + 1.598\ X_2 - 0.01707\ X_1^2 - 0.01921\ X_2^2 \quad (1)$$

Where Y (cellulose yield) is the predicted response as a function of reaction temperature (X_1), reaction time (X_2) and acid concentration (X_3). The ANOVA results showed that this model was appropriate since the R^2 value was 95% (R^2 implies that the sample variation of 95% for cellulose production is attributable to the independent variables, and only 5% of the total variation cannot be explained by the model). Also, the statistics' P value for the overall regression is significant at the 5% level, which further supports that the model is adequate in approximating the response surface of the experimental design.

Table 2 Experimental design and results obtained with OPEFB biomass pretreatment

Runs	Variables			Response
	X_1	X_2	X_3	Y (%)
1	-1.000	1.000	-1.000	33.22
2	-1.000	-1.000	-1.000	51.13
3	1.000	1.000	1.000	35.28
4	0.000	0.000	0.000	55.00
5	0.000	-0.594	0.000	42.55
6	-1.000	1.000	1.000	31.22
7	1.000	-1.000	-1.000	57.00
8	1.000	-1.000	1.000	57.94
9	0.000	0.000	0.000	55.60
10	-1.000	-1.000	1.000	52.13
11	-0.594	0.000	0.000	46.69
12	1.000	1.000	-1.000	32.28
13	0.000	0.000	0.000	55.60
14	0.000	0.000	0.000	55.60
15	0.000	+0.594	0.000	17.98
16	+0.594	0.000	0.000	60.19
17	0.000	0.000	-0.594	57.54
18	0.000	0.000	+0.594	57.74

This model to fit the response function and experimental data, regression analysis was performed and the second order model for both responses was evaluated by ANOVA The regression for both the responses was statistically significant at 95% of confidence level. For the response (Y), the determination coefficient (R^2) obtained was 0.962 which showed 96.2% of the variability in response. The Optimal condition is 130 ˚C, 40 minutes and 15% (w/v) NaOH.

3.3 Comparison of component in OPEFB after pretreated by chemical methods and untreated

From figure 2. Showed OPEFB treated by difference chemical such as NaOH, H_2SO_4 and water compared with untreated OPEFB. The result found that the amount of cellulose of OPEFB treated by NaOH was highest (68.8 % of cellulose) and a minimal amount of lignin as well. When pretreated with H_2SO_4 and water, the amount cellulose decreased because H_2SO_4 and water, it can degrade hemicellulose and also hydrolysis of cellulose. As a result, the amount of cellulose decreased.

So, pretreatment of OPEFB by NaOH was suitable to use increase the amount of cellulose for hydrolysis to achieve high glucose yield.

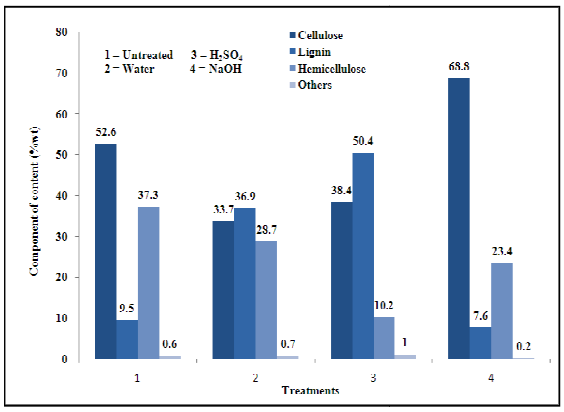


Figure2. Component in OPEFB after pretreated by chemical methods and untreated at130°C, reaction time of 40 minutes and 15 %wt of chemical.

3.4 Acid hydrolysis for sugar formation

It was observed that release of xylose and glucose in the hydrolysate was dependent on operating conditions, 130 ˚C for time period of 90 min with H_2SO_4 concentration maintained at 6%.

Table 3 The amount of glucose and xylose

Sample	Concentration of Analyzed, g/l	
	Xylose	Glucose
This research	19.52	19.96
Data reported byRahman et al.[6]	13.16	7.61

4. Conclusion

Alkali pretreatment of OPEFB biomass was carried out with NaOH solution selected operating conditions to obtain high value of cellulose. A 2^3 rotatable central composite design was adopted in designing of experiments and response surface methodology was adopted in order to optimize the alkali pretreatment. It was found that under optimum conditions, cellulose yield was 68.8% when operating temperature, reaction time and NaOH concentration were 130˚C, 40 min and 15%, respectively. This condition comparison of component in OPEFB after pretreated by chemical methods and untreated , found that pretreatment of OPEFB by NaOH was suitable to use increase the amount of cellulose for hydrolysis to achieve high glucose yield. Glucose, 19.96 g/L was achieved when reaction was carried out at 130 ˚C for time period of 90 min with H_2SO_4 concentration maintained at 6%. Thus it is to be mentioned that under controlled treatment conditions, OPEFB waste can be fruitfully utilized as a potential source of glucose, which can be a starting raw material for production of ethanol by microbial conversion process.

Acknowledgments

The authors would like to thank Faculty of Engineering, Prince of Songkla University for financially support.

References

[1] Miller, G.L. 1959. Use of DinitrosaIicyIic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428.

[2] Delgenes, J. P., Moletta, R. and Navarro, J. M. 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis, and Candida shehatae. Enzyme and Microbial Technology, 19: 220-225.

[3] Taherzadeh, MJ. and Karimi, K. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. International Journal of Molecular Sciences, 9: 1621-1651.

[4] Silverstein, Rebecca A., Chen, Ye., Sharma-Shivappa, Ratna R., Boyette, Michael D. and Jason Osborne. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. Bioresourse Technology, 98: 3000-3011.

[5] Gupta, R. 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of Prosopis juliflora, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis-NCIM 3498. Bioresource Technology, 100: 1214-1220.

[6] Rahman, S.H.A., Choudhury, J.P., Ahmad, A.L., Kamaruddin, A.H. 2007. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. Bioresource Technology, 98: 554-559.

[7] Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Chen, Q., Wu, G., Yu, F., Wang C. and Jin, S. 2006. Microwave-assisted Alkali Pre-treatment of Wheat Straw and its Enzymatic Hydrolysis. Biosystems Engineering, 94: 437-442.

[8] Umikalsom, M. S.A., Ariff, B., Zulkifli, H. S., Tong, C. C., Hassan M. A. and Karim, M. I. A. 1997. The treatment of oil palm empty fruit bunch for subsequent as substratefor cellulose production by Chaetomium globosum. Bioresourse Technology, 62: 1-9.

[9]Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, 83: 1-11.