กระบวนการปรับสภาพน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

Pretreatment of Palm Oil Mill Wastewater for Ethanol Production

บุษยมาศ เหมณี

Bussayamas Hemmanee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Environmental Management
Prince of Songkla University
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ กระบวนการปรับสภาพน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

ผู้เขียน นางสาวบุษยมาศ เหมณี

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
……	……ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี สุขสาโรจน์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ)
	…….....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)
……	…….....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)
	…….....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี สุขสาโรจน์)
	…….....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

……

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ กระบวนการปรับสภาพน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

ผู้เขียน นางสาวบุษยมาศ เหมณี

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งการศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการการปรับสภาพน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยการใช้กรดซัลฟูริกหรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ หรือการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที ผลการศึกษาพบว่า น้ำเสียที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เวลา 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 61.56 และ 7.99 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำเสียที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง พบว่าการปรับสภาพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 60 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 32.86 และ 6.58 กรัมต่อลิตร สำหรับผลของการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน(การต้ม) พบว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยการต้มให้ปริมาณน้ำตาลน้อยมาก ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบร่วมระหว่างกรดและการต้ม โดยใช้กรด 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เวลา 90 นาที ร่วมกับการต้มเวลา 30 นาที พบว่าการเตรียมวัตถุดิบร่วมทำให้น้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นกว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดหรือการต้มเพียงอย่างเดียว แต่น้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลและความร้อนที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ ส่วนการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างร่วมกับการต้ม พบว่าให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดร่วมกับการต้ม และเมื่อนำน้ำเสียที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส กลับพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง จากนั้นนำน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบทั้งกรดร่วมกับความร้อนและด่างร่วมกับความร้อนไปหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที นาน 48 ชั่วโมง พบว่าผลิตเอทานอลได้ 0.55 และ 0.71 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ประสิทธิภาพการผลิตเท่ากับ 0.30 และ 0.30 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาล ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการที่จะนำน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นวัตถุดิบ

ในการผลิตเอทานอลในทางทฤษฎี แต่เป็นไปได้น้อยในทางปฏิบัติ เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่ำส่งผลให้ผลผลิตต่ำ จึงอาจต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพการเตรียมวัตถุดิบหรือพิจารณาใช้เป็นวัตถุดิบร่วม

คำสำคัญ: เอทานอล, โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม, เอนไซม์เซลลูเลส, *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis Title	Pretreatment of Plam Oil Mill Wastewater for Ethanol Production
Author	Miss Bussayamas Hemmanee
Major Program	Environmental Management
Academic Year	2010

ABSTRACT

This research aims to study the efficiency of palm oil mill wastewater pretreatment for ethanol production. The pretreatment with sulfuric acid (1% and 2%), sodium hydroxide (NaOH) (1% and 2%) and boiling (95^{o}C) were conducted at incubation time 30, 60 and 90 minutes. It was found that for acid pretreatment, the highest values of total sugar and reducing sugar obtained were 61.56 and 7.99 g/L (at 90 minute and 1% H_2SO_4). For the results of sodium hydroxide pretreatment, the highest values of total sugar and reducing sugar obtained were 32.86 and 6.58 g/L (at 60 minute and 2 % NaOH) whereas the pretreatment by boiling was low efficiency. Thereafter, the pretreatment with the combination of 1% H_2SO_4 at 90 minute and boiling for 30 minute was conducted. The result showed that it was more effective than use only acid or boiling alone. The total sugar was increased but the reducing sugar decreased which may cause by the sugar degradation by heat. For the combination of 2 % NaOH at 60 minute and boiling for 30 minutes, it yielded lower efficiency than that of acid combined with heat pretreatment. After that the pretreated wastewater samples were hydrolyzed by cellulase but it resulted the lower total sugar and reducing sugar than that the initiation. The pretreated samples then were used as the substrate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* incubated at 30ºC for 48 hr under the agitation condition at 100 rpm. The ethanols obtained were 0.55 (Yp/s = 0.30 g ethanol/g sugar) and 0.71 g/L (Yp/s = 0.30 g ethanol/g sugar) for acid combined with heat and alkali combined with heat pretreatment respectively. These results could mention that there is less possible for practice anyway. It need more study to enhance the pretreatment process or may use palm oil mill wastewater as co-substrate.

Key words: Ethanol, Palm oil mill, enzyme cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบัญ	(7)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 บทตรวจเอกสาร	2
1.2.1 เอทานอล (Ethanol)	3
1.2.2 แหล่งที่มาและคุณลักษณะน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม	28
1.3 วัตถุประสงค์	32
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีวิจัย	33
2.1 วัสดุ	33
2.2 อุปกรณ์	34
2.3 สารเคมี	34
2.4 วิธีดำเนินการวิจัย	34
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปราย	38
3.1 ลักษณะสมบัติน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากเครื่องดีแคนเตอร์	38
3.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการเตรียมวัตถุดิบที่เหมาะสม	39
3.3 ผลการศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบ	41
3.3.1 ผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของกรดต่อประสิทธิภาพของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	41
3.3.2 ผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของด่างต่อประสิทธิภาพของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	46

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.3 ผลของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (การต้ม)ต่อปริมาณน้ำตาลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	51
3.3.4 ผลของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อน (การต้ม) ต่อปริมาณน้ำตาลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	54
3.3.5 ผลของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน(การต้ม) ต่อปริมาณน้ำตาลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	57
3.4 ผลการศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลส	60
3.4.1 ผลของการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ	60
3.4.2 ผลของการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียโรงงานโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ	62
3.5 ผลการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอล	63
3.5.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเขย่าและไม่เขย่าของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*	64
3.5.2 ผลการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	67
3.5.3 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*	69
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	76
บรรณานุกรม	79
ภาคผนวก	88
ประวัติผู้เขียน	144

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากขั้นตอนต่างๆ ในการสกัดน้ำมันปาล์มและน้ำทิ้งรวมของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	30
1.2 องค์ประกอบโดยประมาณของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	31
1.3 ปริมาณแร่ธาตุของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	31
1.4 คุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	32
3.1 ลักษณะของน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบริษัท ทักษิณปาล์ม (2521) จำกัด 331 ถนนธราธิบดี ตำบลท่าข้าม อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี	39
3.2 การผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยอัตราการเขย่าและไม่เขย่า	66
3.3 การผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยระยะเวลาบ่มต่างๆ	68
3.4 การผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบที่แตกต่างกันปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	73
3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทต่างๆ	74
3.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทต่างๆ	75
ภาคผนวก	88
ก.1 ช่วงค่า BOD_5 และวิธีการเจือจาง	97
ก.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน	100

รายการภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1.1 โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล 4

1.2 กระบวนการ Embden-Meyerhof pathway 26

3.1 ผลของระยะเวลาในการเตรียมวัตถุดิบต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 40

3.2 ผลของระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 43

3.3 ผลของระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 45

3.4 ผลของระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 48

3.5 ผลของระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 50

3.6 ผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (การต้ม) จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 52

3.7 ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (การต้ม) จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 53

3.8 ผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับความร้อน (การต้ม) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 55

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

3.9 ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับความร้อน (การต้ม) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 56

3.10 ผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)ร่วมกับความร้อน 58

3.11 ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)ร่วมกับความร้อน 59

3.12 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* 65 ในน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับการให้ความร้อนและด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อน 61

3.13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* 65 ในน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับการให้ความร้อนและด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อน 63

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันปัญหาพลังงานมีความเกี่ยวข้องกับการดำเนินชีวิตประจำวันของมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม เนื่องจากราคาน้ำมันที่มีการปรับตัวสูงขึ้น นักวิชาการด้านเศรษฐกิจได้คาดการณ์ว่าในปี พ.ศ.2553 หากเป็นไปตามเงื่อนไขของกลุ่มประเทศผู้ค้าน้ำมันรายใหญ่หรือ Organization of The Petroleum Exporting Countries (OPEC) ซึ่งเป็นผู้กำหนดราคาน้ำมันและมีอัตราการผลิตน้ำมันคงที่ ส่งผลให้ราคาน้ำมันปรับตัวสูงขึ้นจนผู้บริโภคไม่มีกำลังซื้อ (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2552) และในอนาคตมนุษยชาติต้องเผชิญหน้ากับภาวะน้ำมันขาดแคลน เนื่องจากแหล่งพลังงานฟอสซิล ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของน้ำมันและก๊าซธรรมชาติหมดลง ในปัจจุบันจึงได้มีการแก้ปัญหาโดยหาแหล่งพลังงานทดแทน ซึ่งมีการค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีแหล่งพลังงานเพียงพอสำหรับประชากรที่เพิ่มขึ้น ประเทศไทยมีการคิดค้นหาแหล่งพลังงานทดแทนในรูปพลังงานเชื้อเพลิง คือ เอทานอล ซึ่งอัตราการผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการและยังมีต้นทุนการผลิตที่สูง จึงมีการนำผลผลิตทางการเกษตรมาแปรรูปเพื่อผลิตเป็นเอทานอล เนื่องจากประเทศไทยมีพืชผลทางการเกษตรและวัสดุที่เหลือใช้อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น มันสำปะหลัง อ้อย ซังข้าว และเปลือกข้าวโพด ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อหมักเป็นเอทานอล (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549)

สำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ต้องมีการปรับสภาพหรือเตรียมวัตถุดิบ เพื่อให้เซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาล และน้ำตาลเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยอาศัยจุลินทรีย์ ซึ่งกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีหลายวิธี เช่น การปรับสภาพทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ แต่ในปัจจุบันปริมาณวัตถุดิบและราคาของวัตถุดิบที่มีการปรับตัวอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ภาคอุตสาหกรรมซึ่งเป็นผู้ผลิต ไม่สามารถจัดหาวัตถุดิบในราคาที่คุ้มต่อการผลิตเพื่อนำมาจำหน่ายได้ จากปัญหาดังกล่าวทำให้ภาคอุตสาหกรรมมีความสนใจที่จะใช้วัตถุดิบราคาถูกที่สามารถนำมาเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตเอทานอล เช่น การศึกษาโดยนำน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมประเภทโรงงานผลิตผงชูรส โรงงานผลิตเบียร์ และโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋องมาผลิตเป็นเอทานอล ซึ่งจะช่วยให้ภาคอุตสาหกรรมสามารถผลิตเอทานอลด้วยต้นทุนที่ต่ำ (Ruanglek *et.al.,* 2006)

ในปัจจุบันปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่ทุกคนให้ความสนใจและตระหนัก โดยเฉพาะการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ก่อให้เกิดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม แต่สำหรับในภาคใต้ของไทยโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญ คือ โรงงานแปรรูปยางพารา โรงงานแปรรูปอาหารทะเล และโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความเป็นไปได้ในการนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล คือ โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในวัตถุดิบประเภทปาล์มน้ำมันมีส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลส และสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์

สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอล ซึ่งการนำของเสียมาใช้ประโยชน์เป็นวิธีการหนึ่งของการจัดการสิ่งแวดล้อมที่ได้รับการยอมรับและมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องในปัจจุบัน โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์เป็นตัวทำปฏิกิริยา เนื่องจากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ที่มีในแหล่งอาหารเป็นสารอินทรีย์ชนิดอื่นที่มีประโยชน์มากมายหลายชนิด การใช้กระบวนการนี้เป็นการผลิตโดยใช้วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่สามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก ซึ่งได้ทำการศึกษากระบวนการปรับสภาพน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล รวมทั้งปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการดังกล่าว ผลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการจัดการของเสียและได้เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่มีมูลค่า คือ เอทานอล

1.2 บทตรวจเอกสาร

ปัจจุบันประเทศทั่วโลกกำลังเผชิญหน้ากับปัญหาด้านพลังงาน เนื่องมาจากราคาน้ำมันดิบและน้ำมันสำเร็จรูปที่ปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ โดยเฉพาะประเทศไทยที่ต้องสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ เพื่อนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงที่เป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาประเทศ ซึ่งการใช้พลังงานภายในประเทศปี พ.ศ.2549 มีมูลค่าสูงถึง15.6 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าผลิตภัณฑ์มวลรวมในประเทศ (Gross Domestic Product : GDP) แม้ว่าปริมาณการใช้จะลดลงเมื่อเทียบกับปี พ.ศ.2545 ที่มีการใช้สูงถึง 16.4 เปอร์เซ็นต์ของ GDP แต่มูลค่าการนำเข้าพลังงานกลับสูงขึ้น ซึ่งเป็นไปตามราคาน้ำมันของตลาดโลกที่สูงขึ้นในรอบ 5 ปีที่ผ่านมา โดยปี พ.ศ. 2549 มูลค่าการนำเข้าพลังงานของประเทศสูงขึ้นถึง 873,565 ล้านบาท (ธีรภัทร ศรีนรคุตรและคณะ , 2551) และในอนาคตราคาน้ำมันมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้หลายประเทศให้ความสำคัญและเร่งพัฒนาโดยหาแหล่งพลังงานทดแทนที่สามารถผลิตขึ้นเองภายในประเทศ แหล่งพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้กับประเทศไทย เช่น พลังงานจากชีวมวล พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ

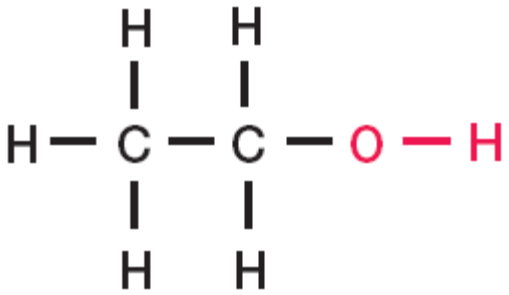
และพลังงานลม เป็นต้น แต่พลังงานบางประเภท เช่น พลังงานแสงอาทิตย์และพลังงานลม มีข้อจำกัดที่จะต้องนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศ ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง การพัฒนาแหล่งพลังงานดังกล่าวจึงทำได้ยาก (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2552) ดังนั้นแหล่งพลังงานที่เหมาะสมกับประเทศไทยในขณะนี้ จึงเป็นพลังงานชีวมวล (Bio-energy) เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีแหล่งชีวมวลทางด้านการเกษตรมากมาย เช่น อ้อย มันสำปะหลัง และกากน้ำตาล จึงมีความได้เปรียบทางด้านวัตถุดิบ แต่อ้อยเป็นวัตถุดิบที่มีราคาแพง อีกทั้งยังปลูกได้ตามฤดูกาล และมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศที่แปรปรวนเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยรองจากข้าวและยางพารา ซึ่งในปัจจุบันทั้งภาครัฐและเอกชนต่างให้ความสนใจกับการพัฒนาหาแหล่งพลังงานทดแทนจากชีวมวล เช่น ก๊าซชีวภาพ (Biogas) ไบโอเอทานอล (Bioethanol) และไบโอดีเซล (Biodiesel) (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549)

1.2.1 เอทานอล (Ethanol)

เอทานอลเป็นพลังงานสะอาด สามารถเผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันปิโตรเลียม ในขณะเดียวกันเป็นสารที่เพิ่มค่าออกเทน (Octane) เมื่อใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน สามารถใช้ทดแทนสาร Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) ที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้ เพราะก่อให้เกิดมลพิษในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ เนื่องด้วยจุดเด่นของเอทานอลมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสาร MTBE ที่สามารถเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน เนื่องจากสาร MTBE ย่อยสลายยากและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เกิดสารตกค้างกับน้ำใต้ดิน อีกทั้งการผสมสาร MTBE ในน้ำมันเบนซินเกิน 10-15 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดผลกระทบต่อเครื่องยนต์ ทำให้ในประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้เลิกใช้ในปี พ.ศ. 2545 (ธีรภัทร ศรีนรคุตร, 2543)

1.2.1.1 ลักษณะสมบัติของเอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือที่เรียกว่าเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งหรือที่รู้จักกันในชื่ออื่น ได้แก่ Grain Spirit หรือ Neutral Spirit เป็นต้น ซึ่งเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยง่าย สามารถละลายน้ำ และสารอินทรีย์ชนิดอื่นได้ดี ให้ค่าพลังงานความร้อน (Calorific Value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 12,800 บีทียูต่อปอนด์ มีจุดเดือด 78 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง -117.3 องศาเซลเซียส และมีความถ่วงจำเพาะ 0.794 ที่อุณหภูมิ 60 องศาฟาเรนไฮต์ มีสูตรทางเคมี คือ C_2H_5OH มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 (ภาพที่ 1.1) เอทานอลบริสุทธิ์มีเนื้อแอลกอฮอล์ประมาณ 99.7 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปมีน้ำเจือปนไม่เกิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้เปลวไฟสีน้ำเงินที่ไม่มีควันโดยปกติเอทานอลสามารถรวมตัวได้กับน้ำ อีเทอร์หรือคลอโรฟอร์มได้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล

ที่มา : Prescott และคณะ (2002)

1.2.1.2 การใช้ประโยชน์จากเอทานอล (วสันต์ จันทร์สัจจา, 2546)

-ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ สุรา บรั่นดี และสาเก

-ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้

-ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น น้ำหอม แชมพูสระผม และน้ำยาบำรุงผิว

-ใช้ในอุตสาหกรรมยา กระบวนการสกัด (Extraction Process) สารอื่นๆในสมุนไพร และการทำให้บริสุทธิ์ (Purification Process) ใช้เป็นส่วนประกอบในการผสมยา ใช้เป็นตัวทำละลายเวชภัณฑ์ที่ใช้ในการฆ่าแมลง ฆ่าเชื้อรา และน้ำยาดับกลิ่น

-ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสี เป็นตัวทำละลายของน้ำยาเคลือบ น้ำมันชักเงา และน้ำยาแลกเกอร์

-ใช้เป็นสารผสมในน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ (Additive) ต่างๆ ได้แก่ การนำเอทานอลมาผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ เพื่อช่วยเพิ่มค่าออกเทน สำหรับในประเทศไทยมีการเลือกใช้สูตร E 10 คือ น้ำมันเบนซิน 91 (90 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับเอทานอล (10 เปอร์เซ็นต์) โดยปริมาตร (ณัฐกิตต์ ธรรมเจริญ, 2543) และใช้โดยทั่วไปสำหรับเป็นเชื้อเพลิงของรถยนต์และมีโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเกิดขึ้นภายในประเทศ

1.2.1.3 การใช้เอทานอลในต่างประเทศ

สำหรับสถานการณ์การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในต่างประเทศ โดยประเทศบราซิลเป็นประเทศที่ผลิตและใช้เอทานอลมากที่สุดในโลก มีการใช้เอทานอลตั้งแต่ปี พ.ศ.2518 ในปัจจุบันมีการผลิตเอทานอลรวม 13,000 ล้านลิตรต่อปี ซึ่งวัตถุดิบส่วนใหญ่มาจากอ้อยและน้ำตาล โดยมีการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงกับรถยนต์ที่ได้รับการปรับแต่งเครื่องยนต์ ส่วนประเทศสหรัฐอเมริกาได้พัฒนาเชื้อเพลิงทดแทนตั้งแต่ปี พ.ศ.2522 ซึ่งมีการออกกฎหมายและมาตรการสนับสนุนด้านการลงทุนให้เงินกู้ดอกเบี้ยต่ำและช่วยเหลือด้านภาษี เพื่อเป็นแรงจูงใจในการใช้เชื้อเพลิงทดแทนโดยเฉพาะเอทานอล ปัจจุบันมีปริมาณการผลิตรวม 7,000 ล้านลิตรต่อปี เป็นอันดับสอง

รองจากประเทศบราซิล วัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ และหัวบีทรูท ส่วนในสหภาพยุโรปที่ยังไม่ได้รับความนิยมมากนัก แต่มีการตั้งเป้าหมายให้ประเทศสมาชิกมีการใช้เอทานอล 12 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานทั้งหมดในปี พ.ศ. 2553 มีประเทศฝรั่งเศสเป็นผู้ผลิตรายใหญ่สุด นอกจากนี้ยังมีประเทศสเปน เนเธอร์แลนด์ และสวีเดน เป็นต้น และประเทศในเอเชียมีการผลิตรวม 5,500 ล้านลิตรต่อปี โดยจีนเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุด มีปริมาณการผลิตประมาณ 3,000 ล้านลิตรต่อปี รองลงมา คือ อินเดีย มีปริมาณการผลิต 1,700 ล้านลิตรต่อปี ส่วนญี่ปุ่นและเกาหลีใต้ เป็นผู้นำเข้ารายใหญ่ ปัจจุบันการซื้อขายเอทานอลในตลาดโลกมีปริมาณเพิ่มขึ้น และในอนาคตการค้าในตลาดโลกจะมีขยายตัวเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากหลายประเทศมีนโยบายสนับสนุนให้มีการใช้เอทานอลในรูปของเชื้อเพลิง เพื่อเป็นการลดภาวะมลพิษทางอากาศ (ธีรภัทร ศรีนรคุตร และคณะ, 2551)

1.2.1.4 เทคโนโลยีการผลิตเอทานอล

พลังงานจากเอทานอลเป็นพลังงานที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิลได้ดี และไม่เกิดปัญหาทางด้านมลพิษสิ่งแวดล้อม ซึ่งการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงมีมาตั้งแต่อดีต โดยใช้วัตถุดิบในการผลิต คือ ชูการ์บีทและข้าวโพด แต่ในขณะนั้นต้นทุนการผลิตยังสูงกว่าต้นทุนราคาน้ำมันปิโตรเลียมจึงไม่เป็นที่นิยม มีเพียงประเทศบราซิลซึ่งค่อนข้างยากจนแต่มีพื้นที่ทางการเกษตรมาก ได้ทำการพัฒนาการผลิตเอทานอลจากอ้อยและชูการ์บีท ในที่สุดบราซิลได้กลายเป็นผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ที่สุดของโลก มีกำลังการผลิต 16,000 ล้านลิตรต่อปี และสามารถนำมาใช้กับยานพาหนะโดยตรง (Neat Ethanol) (ธีรภัทร ศรีนรคุตร และคณะ, 2551) ในปัจจุบันเกิดวิกฤตน้ำมันแพง และปริมาณน้ำมันดิบตามธรรมชาติที่มีอยู่จำกัด ส่งผลให้หลายประเทศสนใจการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิง แม้แต่สหรัฐอเมริกาได้พัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้หญ้าสวิทช์ (Switch Grass) เป็นวัตถุดิบในการผลิต สำหรับประเทศไทยได้มีการนำเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ มาผสมกับน้ำมันเบนซินในสัดส่วน 10:90 เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ น้ำมันแก๊สโซฮอล์ สูตร E 20 (มีส่วนผสมของเอทานอลในน้ำมันเบนซิน 20 เปอร์เซ็นต์) โดยทั่วไปใช้สำหรับเป็นเชื้อเพลิงรถยนต์ และมีโรงงานอุตสาหกรรมเอทานอลเกิดขึ้นในประเทศไทย โดยเอทานอลสามารถผลิตจากได้ 2 วิธี คือ การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical Synthesis) และการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ (Fermentation) ปัจจุบันเอทานอลที่ผลิตส่วนใหญ่จะได้จากกระบวนการทางชีวภาพที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ และเอทานอลจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีมีปริมาณน้อยมากประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทั้งหมดของโลก (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549)

ก. เอทานอลจากกระบวนการสังเคราะห์

เป็นการใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์เอทานอล โดยมีเอทิลีน (Ethylene) เป็นวัตถุดิบผ่านกระบวนการไฮเดรชัน (Hydration) คือ การทำปฏิกิริยากับน้ำร่วมกับ

กรดฟอสฟูริก ซึ่งถูกดูดซับไว้ในซีโอไลท์ หรือซิลิกาแอโรเจล (Substrate) เอทานอลที่ได้เรียกว่า “เอทานอลสังเคราะห์” (Synthesis Ethanol) ดังสมการที่ (1) (ดุษณี ธนะบริพัฒน์, 2539)

$$H_2C = CH_2 + H_2PO_3 + H_2O \text{ --------> } CH_2CH_3OH + H_2PO_3 \quad (1)$$

Substrate Product

ข. เอทานอลจากกระบวนการหมัก

เป็นการใช้กระบวนการทางชีวเคมีในการผลิตเอทานอล วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอลส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร เอทานอลที่ได้เรียกว่า “ไบโอเอทานอล” การหมักเอทานอลที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์กัน มีผลให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่างกันตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (สุมณฑา วัตนสินธุ์, 2545)

การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก มีสองขั้นตอนสำคัญ คือ

ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทแป้งและวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล ขั้นตอนนี้อาศัยกรดหรือเอนไซม์เป็นตัวทำปฏิกิริยา ดังสมการที่ (2)

$$C_6H_{10}O_5 + H_2O \xrightarrow{\text{เอนไซม์/กรด}} C_6H_{12}O_6 \quad (2)$$

แป้ง น้ำ น้ำตาล

ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล โดยยีสต์หรือแบคทีเรีย ดังสมการที่ (3)

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์/แบคทีเรีย}} 2\,CH_3CH_2OH + 2\,CO_2 + 28.7\ \text{kcal} \quad (3)$$

น้ำตาล เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

สัดส่วน 100 51.1 48.9

จากสมการเคมี พบว่าน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อยีสต์หรือแบคทีเรีย จะได้เอทานอล 51.1 กรัม และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลที่สามารถใช้ได้จะมีเพียง 95 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น หรือคิดเป็นประสิทธิภาพการผลิตผลิตภัณฑ์จากสับสเตรต (Yp/s) ไม่เกิน 0.485 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สำหรับน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ที่เหลือยีสต์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโต เพื่อสร้างพลังงานและผลิตภัณฑ์พลอยได้ (By Product) อื่นๆ เช่น

อะเซตัลดีไฮด์ กรดอะซีติก กรดแลกติก และกลีเซอรอล เป็นต้น การหมักเอทานอลจะทำการหมักในถังหมักไร้สนิมที่อุณหภูมิ 18-30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 2-3 วัน (Zoecklein *et al.,* 1995) สำหรับวัสดุทางการเกษตรที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวยังมีของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น กากน้ำตาล ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้เช่นกัน จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาล (150, 200 และ 250 กรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 55.8 กรัมต่อลิตร (Cazetta *et al.,* 2007)

1.2.1.5 กระบวนการหมักเอทานอล

ปัจจุบันการหมักเอทานอลมีทั้งที่ใช้การหมักแบบครั้งคราวและการหมักแบบต่อเนื่องโดยมีการพัฒนาการหมักทั้งสองแบบ และมีการสร้างเทคโนโลยีใหม่ๆ สำหรับการผลิตเอทานอล โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนการผลิต

ก. การหมักแบบครั้งคราวธรรมดา (Simple Batch Fermentation)

สำหรับการผลิตเอทานอลในปัจจุบันส่วนใหญ่ใช้กระบวนการหมักแบบนี้ และได้มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การหมักแบบนี้เป็นการทำให้สารตั้งต้นมีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยมีการปรับให้มีความเข้มข้นของน้ำตาล 14-18 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นอาจทำการใช้ความร้อนสูง (Pasteurization) และปรับพีเอช (pH) เริ่มต้นให้ต่ำกว่า 5 หรือมีการเติมธาตุอาหารของยีสต์บางอย่างลงในสารตั้งต้น เพื่อเพิ่มสารอาหาร หลังจากนั้นจึงเติมยีสต์ปล่อยให้เจริญเติบโตและสร้างเอทานอล เวลาที่ใช้ในการหมักอาจลดลงโดยการใช้เชื้อปริมาณมาก ยีสต์ที่จะนำมาเติมต้องนำมาเลี้ยงในถังกล้าเชื้อเพื่อให้มีความว่องไวในการหมัก โดยสภาพของการเลี้ยงเชื้อจะเป็นสภาพการให้อากาศเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต ปกติอุณหภูมิเริ่มต้นของการหมักจะต่ำ คือประมาณ 21-23 องศาเซลเซียส และในระหว่างการหมักอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเป็น 32-40 องศาเซลเซียส การหมักเอทานอลจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 36-72 ชั่วโมง และปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้โดยทั่วไป คือ 6-9 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ข้อดีของการหมักแบบครั้งคราว

-การควบคุมทำได้ง่ายไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ชำนาญการ ไม่จำเป็นต้องทำให้วัตถุดิบหรืออุปกรณ์ต่างๆ ปลอดเชื้อ เหมาะสำหรับการผลิตที่มีปริมาตรไม่มาก และในการหมักแต่ละครั้งจุลินทรีย์ที่ใช้มีความแข็งแรงและว่องไวดี เพราะต้องเตรียมจุลินทรีย์ใหม่เสมอ ทำให้การกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์เกิดขึ้นยาก

ข้อเสียของการหมักแบบครั้งคราว

-ให้ความสามารถในการหมักเอทานอล (Ethanol Productivity) ต่ำ เนื่องจากใช้เวลาในการหมักนาน ต้องเสียเวลาในการล้างทำความสะอาด ฆ่าเชื้อ เตรียมอุปกรณ์และเติมอาหารสำหรับการหมักใหม่เมื่อสิ้นสุดการหมักแต่ละครั้ง ทำให้ความสามารถในการหมักโดยรวมต่ำ (Bayrock and Inglew, 2001)

ข. การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch Fermentation) และการหมักแบบรีพีตด์แบตช์ (Repeated Batch Fermentation)

การที่อาหารมีน้ำตาลความเข้มข้นสูงเมื่อเริ่มต้นการหมักมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ การหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมน้ำตาลลงในถังหมักเป็นช่วงๆ ช่วยลดปัญหาการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทำให้ความสามารถเพิ่มจำนวนและหมักเอทานอลได้สูงขึ้น ส่วนการหมักแบบรีพีตด์แบตช์ที่ทำร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่เป็นวิธีหนึ่งที่จะเพิ่มความสามารถในการหมักเอทานอลโดยทำให้เวลาของการหมักลดลง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ข้อดีของการหมักแบบกึ่งกะ (กลยุทธ โชติพัฒนา และนิสิต ตัรฑวิเชฐ, 2535)

-สามารถผลิตเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก (High Cell Concentration) การเลี้ยงเซลล์แบบครั้งคราว (Batch) จะได้ปริมาณเซลล์ไม่มากเท่ากับการเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Fed-Batch) ซึ่งสามารถผลิตเซลล์ได้สูงมาก เช่น 100 กรัมต่อลิตร เป็นต้น

-ช่วยลดผลกระทบจากความเข้มข้นของกลูโคส (Glucose Effect) เช่น การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำตาลมอลท์หรือกากน้ำตาล พบว่ามีเอทานอลละลายปะปนอยู่กับยีสต์ในถังหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง ทำให้ปริมาณเซลล์ของยีสต์ลดลง เพื่อที่จะลดผลกระทบจากความเข้มข้นของกลูโคส จึงได้นำเทคนิคการเลี้ยงแบบกึ่งกะมาใช้ในการผลิตยีสต์ในปัจจุบัน

-ป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น กรณีการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์การหมักแบบครั้งคราวอาจพบปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ทำให้ผลผลิตแอลกอฮอล์ลดลง หากใช้เทคนิคการหมักแบบกึ่งกะเข้าช่วยแล้วปัญหาเหล่านี้จะหมดไป การใช้เทคนิคการหมักแบบกึ่งกะสามารถป้องกันการเสียของได้ หากเกิดมีกรณีส่าเสียหรือไม่ดีก็สามารถหยุดการเติมกากน้ำตาลที่จะเติมในช่วงหลังไม่ให้เกิดการสูญเสียมากยิ่งขึ้นได้

ข้อเสียของการหมักแบบกึ่งกะ

-อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงค่อนข้างมีความซับซ้อน และมีราคาสูง

ค. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation)

จุดประสงค์สำคัญในการหมัก คือ การเพิ่มความสามารถในการหมัก ซึ่งการที่มียีสต์ความเข้มข้นสูงจะทำให้ความสามารถในการหมักเพิ่มขึ้น โดยการหมักแบบต่อเนื่องดีกว่าการหมักแบบครั้งคราวหลายอย่างรวมทั้งสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้อัตราการหมักและความสามารถในการผลิตเอทานอลสูงสุด มีความสามารถในการหมักอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน มี Volumetric Productivity สูงกว่า รวมทั้งการเติมอาหารสำหรับการหมักใหม่ในระยะที่มีความคงตัวกระบวนการควบคุมและดำเนินการง่ายกว่าการหมักแบบครั้งคราว

ปัญหาที่เกิดในการหมักแบบต่อเนื่อง คือ การปะปนของเชื้ออื่นจากภายนอก และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองของเชื้อที่ใช้หมัก และปัญหาในการที่จะรักษาอัตราการหมักให้สูงอยู่ตลอดเวลา ทั้งนี้พบว่าอัตราการหมักที่ต่ำลงสัมพันธ์กับเซลล์ที่ตายเนื่องจากขาดอากาศ ซึ่งอาจแก้ไขการขาดออกซิเจนของยีสต์โดยการเติมสารบางอย่าง เช่น Tween 80 เออร์กอสเตอรอล หรือกรดลิโนลินิกลงไปในอาหารสำหรับหมัก หรือโดยเพิ่มจำนวนยีสต์ให้มีมากๆ ด้วยการเลี้ยงแบบให้อากาศก่อนที่จะเริ่มการหมัก (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง

-สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้ สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและการก่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่

ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่อง

-การหมักในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ การเจริญแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์เกิดจากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้เร็วกว่า

นอกจากนี้ มีการใช้วิธีการหมักในสภาพสุญญากาศ (Vacuum Fermentation) การหมักแบบที่เรียกว่า Rotor Fermentation และการหมักโดยใช้ระบบการตรึงเซลล์

สำหรับการหมักในสภาพสุญญากาศนั้น เนื่องจากเอทานอลยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ เพื่อลดปัญหานี้ในระหว่างการหมักจึงได้พยายามที่จะไม่ให้มีเอทานอลความเข้มข้นสูงภายในถังหมักโดยทำการแยกเอทานอลออกไปเมื่อถูกสร้างขึ้น เนื่องจากเอทานอลเป็นสารที่ระเหยง่าย จึงมีการใช้ข้อได้เปรียบนี้ในการแยกเอาเอทานอลออกจากสารตั้งต้น โดยพบว่าถ้าหมักเอทานอลในสภาพสุญญากาศ เอทานอลจะระเหยออกไปจากสารตั้งต้นได้ในอุณหภูมิที่ไม่สูงนักและที่อุณหภูมินั้นยีสต์ยังคงเจริญและหมักเอทานอลได้ทำให้มีเอทานอลไม่มากพอที่จะยับยั้งการเจริญ เมื่อปริมาณยีสต์ยังคงรักษาให้สูงอยู่ได้ตลอดการหมัก เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้ความสามารถในการหมักเอทานอลสูง

ซึ่งจากการศึกษาพบว่า มีการใช้ปอสาเป็นวัสดุในการหมักด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)) เปรียบเทียบกับการใช้ผลึกเซลลูโลสและใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* QM 9414 ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติร่วมกับยีสต์ *Candida krusei* NBRC 1664 พบว่าให้ผลผลิตเอทานอล 1.38 เปอร์เซ็นต์ จากปอสาและ 1.63 เปอร์เซ็นต์ จากผลึกเซลลูโลส (ศิริพงษ์ เปรมจิต และคณะ, 2550)

1.2.1.6 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ สามารถนำมาใช้ในการหมักเอทานอล ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) ได้แก่

-วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวโพด ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง และมันเทศ เป็นต้น

-วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย น้ำตาล และบีทรูท เป็นต้น

-วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลิตผลทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ ขี้เลื่อยและวัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่นโรงงานกระดาษ เป็นต้น โดยที่วัตถุดิบประเภทแป้งและลิกโนเซลลูโลสจะถูกย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อน แต่วัตถุดิบประเภทที่เป็นน้ำตาลอยู่แล้วสามารถนำไปใช้หมักได้เลย ตามทฤษฎีระยะเวลาในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลประมาณ 48 ชั่วโมง และได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 8-12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งจากงานวิจัยที่ศึกษาวัตถุดิบที่ใช้จัดอยู่ในประเภทลิกโนเซลลูโลส

1.2.1.7 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว หญ้าแฝก กากอ้อย ซังข้าวโพดและเศษไม้ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็น สายยาวและอยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และอะราบิโนส (Arabinose) เป็นต้น ตลอดจนสาร acetyl เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีการแตกกิ่งมากและไม่เป็นผลึก ทำให้สามารถ hydrolyze ได้ง่าย ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) ที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตที่ยึดเหนี่ยวผนังเซลล์ของพืชเข้าด้วยกัน ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549) จากการศึกษาของ Sreenath และคณะ (2000) โดยนำไม้ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์มาผลิตเอทานอล ซึ่งใช้การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดอ่อน จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อยีสต์ที่ใช้ผลิตเอทานอลได้ดี คือ เชื้อ *Candida shehatae* FPL-Y-049 ซึ่งจะให้ผลผลิต

เอทานอลสูง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงและความเข้มข้นของ Acetate ซึ่งเป็นตัวยับยั้งต่ำ นอกจากนี้ การเติมสารอาหาร ซึ่งประกอบด้วย Yeast Nitrogen Base (YNB), Urea และ Peptone จะช่วยให้ปริมาณเอทานอลที่ได้สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าการ Recycle Cell ช่วยลดเวลาในการผลิตเอทานอลลงได้ประมาณ 20 ชั่วโมง และพบว่าค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-6 นอกจากการนำไม้มาผลิตเอทานอลแล้ว พบว่ามีการศึกษาการย่อยสลายเศษเหลือของมันสำปะหลัง เช่น เปลือก ลำต้น และใบ โดยการใช้ความร้อนร่วมกับกรดเพื่อผลิตเอทานอล พบว่าการย่อยสลายโดยใช้กรดซัลฟูริก ความเข้มข้นต่ำ 0.2-0.5 โมลาร์ (M) จะให้ปริมาณเอทานอลหลังการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สูงกว่าการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นสูง 1-5 โมลาร์ การใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะให้ปริมาณ เอทานอลหลังการหมักด้วยยีสต์สูงที่สุดคือ 3.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Agu *et al.,* 1997)

เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลอยู่ในรูปที่เป็นสารผลึกของสารประกอบเชิงซ้อนกับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนที่นำมาใช้จริง คือ ส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อนเพราะส่วนประกอบทั้งสองทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง ซึ่งการมีลิกนินปริมาณมาก จะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักด้วย ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการผลิตเอทานอลคือ เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา การย่อยด้วยเอนไซม์ เช่นในการหมักเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยใช้เซลลูเลส และ*Saccharomyces cerevisiae* พบว่าการย่อยสลายฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และต้นมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในด่างด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า ซึ่งให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.720, 0.693 และ 0.525 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.353, 0.345 และ 0.276 กรัมต่อกรัมสับสเตรทในฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย ตามลำดับ (อำนวย ขวัญเมือง, 2538)

ก. การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

การปรับสภาพวัตถุดิบมีจุดประสงค์เพื่อนำเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสลง ทำให้อนุภาคภายในเกิดรูและเกิดการพองตัวเพื่อเพิ่มพื้นที่ และที่สำคัญหลีกเลี่ยงจากการทำลายโครงสร้างของน้ำตาลให้น้อยที่สุด ป้องกันการเกิดผลพลอยได้ซึ่งจะไปยับยั้งกระบวนการไฮโดรไลซิส และกระบวนการหมัก ลดต้นทุนการผลิต สามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธี (Sun and Cheng, 2002) คือ

1) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

-Mechanical Comminution เป็นการลดขนาดของเศษวัสดุโดยการตัดและบด โดยจะทำการตัดวัตถุดิบให้มีขนาดเท่ากับ 10-30 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไปบดจะได้ขนาด 0.2-2.0 มิลลิเมตร โดยการปรับสภาพจะเป็นการทำลายความเป็นผลึกของโมเลกุลเซลลูโลสและช่วยเพิ่มการย่อยสลายได้มากขึ้น

-Pyrolysis เป็นการเตรียมวัตถุดิบโดยผ่านกระบวนการสลายวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง โดยใช้อุณหภูมิมากกว่า 300 องศาเซลเซียส และจะส่งผลให้เกิดการสลายตัวของเซลลูโลสอย่างรวดเร็วกลายเป็นแก๊สและถ่านหิน ซึ่งถ้าใช้อุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้เซลลูโลสเกิดการสลายตัวได้ช้าและได้ผลิตภัณฑ์ที่ระเหยได้น้อย เมื่อวัตถุดิบผ่านกระบวนการไพโรไลซีสแล้วนำไปย่อยสลายด้วย 1 นอร์มัล (N) H_2SO_4 ที่อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ลิกโนเซลลูโลสจะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 80-85 เปอร์เซ็นต์ และมีกลูโคสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

การใช้การฉายรังสีร่วมกับการใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ NaOH ในการเตรียมวัตถุดิบ ต้นข้าวโพด เปลือกมันสำปะหลังและเปลือกถั่ว พบว่าเมื่อใช้กับต้นข้าวโพดจะทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 20 เปอร์เซ็นต์ เป็น 43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปลือกมันสำปะหลังและเปลือกถั่วจะได้น้ำตาลกลูโคสประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment)

-Ozonolysis เป็นการใช้โอโซนในการสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในวัตถุดิบ เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย หญ้า ถั่วลิสง และขี้เลื่อย เป็นต้น การสลายจะจำเพาะกับลิกนินและเฮมิเซลลูโลสเท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อการสลายตัวของเซลลูโลส ข้อดี คือ สามารถสลายลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษออกมา ทำให้ต้นทุนในการเตรียมวัตถุดิบด้วยวิธีนี้มีราคาแพง

-Acid Hydrolysis เป็นวิธีการใช้กรด เช่น HCl และ H_2SO_4 เจือจาง ในการเตรียมวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส แม้ว่ากรดจะย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี แต่ความเข้มข้นของกรดก็เป็นอันตราย เพราะมีความเป็นพิษและมีฤทธิ์ในการกัดกร่อน ทำให้ในปัจจุบันได้มีการใช้กรดเจือจางในการเตรียมวัตถุดิบ แต่ในการใช้กรดจะมีต้นทุนสูงและ pH ของกรดจะมีผลต่อกระบวนการหมัก ซึ่งในสหรัฐอเมริกามีการศึกษาวิจัยการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวสาลี ทำการเตรียมวัตถุดิบโดยอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปบดให้มีขนาด 1.27 มิลลิเมตร และนำไปเติมกรดเจือจางที่ระดับต่างๆ คือ 0 เปอร์เซ็นต์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ 0.75 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไปแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย 10 โมลาร์ NaOH หรือ $Ca(OH)_2$ แล้วนำไปไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส ที่ 45 องศาเซลเซียส จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อใช้กรดเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ สามารถให้ผลผลิตน้ำตาลมากที่สุดและเซลลูโลสถูกเปลี่ยนไปเป็นกลูโคส 47 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเตรียมวัตถุดิบ โดยใช้กรดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140, 160 และ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส พบว่า การใช้กรด 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในการเตรียมวัตถุดิบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณกลูโคสสูงสุด (Saha *et al.,* 2005) และเมื่อนำจุลินทรีย์ *Pichia stipitis* NRRL Y-71 มาหมักฟางข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยแล้ว พบว่า *P. stipitis* สามารถผลิตเอทานอลและมวลเซลล์เพิ่มขึ้น โดยผลผลิตของ เอทานอลสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัม (Nigam *et al.,* 2000) และนอกจากนี้ยังมีการพัฒนาโดยการนำกรดที่มีความเข้มข้นสูงมาเจือจางเพื่อใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ จากการศึกษาของ Guo และคณะ (2008) พบว่ามีการใช้กรดซัลฟูริกมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 1-3 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 40 มิลลิลิตรในการเตรียมวัตถุดิบ ชานอ้อย ฟางข้าว และ silvergrass โดยสามารถย่อยสลายและให้ปริมาณน้ำตาลไซโลส 21.7, 21.9 และ 24.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถนำไปผลิตเอทานอลได้

นอกจากนี้ยังพบว่าอ้อยก็สามารถนำมาปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลเช่นกัน การเตรียมวัตถุดิบ สามารถกระทำได้โดยใช้ H_2O_2 และ H_2SO_4 กำจัดลิกนินออก การปรับสภาพอ้อยโดยแช่ใน 0.8 M H_2SO_4 เป็นเวลา 12 วัน แล้วนำมาหมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2 แช่เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน (Dawson and Boopathy, 2007)

-Alkaline Hydrolysis เป็นการเตรียมวัตถุดิบโดยใช้ด่าง การเตรียมวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยขึ้นอยู่กับปริมาณลิกนินที่มีอยู่ในวัตถุดิบ โดยการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เจือจางช่วยทำให้เกิดการพองตัว ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว สลายการเป็นพอลิเมอร์ ลดความเป็นผลึกและทำลายโครงสร้างของลิกนิน ส่วนโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะช่วยลดปริมาณของลิกนินในไม้เนื้อแข็งจาก 24-25 เปอร์เซ็นต์ ให้เหลือเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าในประเทศไทยมีการศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยเช่นกัน โดยนำฟางข้าวมาผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย 2 โมลาร์ NaOH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 90 นาที จะได้ตะกอนฟางที่มีเซลลูโลส 94.46 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 1.24 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 2.16 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตะกอนฟางที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเซลลูโลสเท่ากับ 500 ไมโครลิตรต่อกรัม เซลลูโลสน้ำหนักแห้ง แล้วนำไปผ่านกระบวนการหมักใช้เวลา 4 วัน จะได้เอทานอลเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ระวีวรรณ แกล้วกล้า, 2538)

สำหรับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอื่นๆ เช่น เปลือกสับปะรดก็สามารถนำมาปรับสภาพก่อนด้วยสารละลาย NaOH เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลได้เช่นกัน จากผลการศึกษาของเกศมณี ตาดทองและคณะ (2546) ที่ทำการทดลองแช่เปลือกสับปะรดในสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าหลังจากแช่ใน 2.5 โมลาร์ NaOH แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที จะได้เปลือกสับปะรดที่มีปริมาณเซลลูโลส 91.32 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 0.46 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 4.09 เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำไปย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์โดยการใช้ลูกแป้งที่อัตราส่วน 3.0 กรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร ต่อเปลือกสับปะรด 1.5 กรัม จะได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 8 องศาบริกซ์ สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้หลังจากเติมสารอาหารที่จำเป็นและปรับค่ากรด-เบส ให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ *S. serevisiae* แล้วนำไปหมักที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นเวลา 7 วัน จะได้เอทานอลเข้มข้น 4.6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

นอกจากนี้ส่วนที่เหลือจากโรงงานผลิตแป้งข้าวโพดซึ่งประกอบไปด้วยเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และแป้ง โดยส่วนมากจะนำไปเป็นอาหารสัตว์ แต่จากการศึกษาของ Gáspár และคณะ (2007) พบว่าสามารถนำซังข้าวโพดไปเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้ โดยผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบ ด้วยสารละลายด่างแล้วใช้เอนไซม์ในการเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลและใช้เชื้อ *S. serevisiae* ในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอล พบว่าเมื่อผ่านการปรับสภาพด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ KOH แล้วสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายด่างชนิดอื่นๆ นอกจากของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแล้วโรงงานอุตสาหกรรมยังมีของเสียที่ต้องบำบัดก่อนปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจนำมาศึกษาศักยภาพในการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอลได้ เช่น การศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) ของ Hipolito และคณะ (2008)

-Oxidative Delignification เป็นการเตรียมชานอ้อย H_2O_2 สามารถเพิ่มการไฮโดรไลซิสลิกนิน ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลสส่วนมากสามารถสลายตัวโดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อนำลิกโนเซลลูโลสที่เตรียมด้วยวิธีนี้ มาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สำหรับวิธีทางเคมีที่ได้รับความสนใจ คือ การเติมสารที่ทำให้เซลลูโลสพองตัวและทำลายโครงสร้างที่เป็นผลึก มี 2 วิธี คือ Intercrystalline Swelling ซึ่งเกิดจากการได้รับน้ำเข้าไปในระหว่างหน่วยของผลึก ทำให้ปริมาตรเพิ่มขึ้นปริมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และ Intracrystalline Swelling ซึ่งทำให้มีการทะลุทะลวงเข้าไปในโครงสร้างที่เป็นผลึกและทำให้เกิดการพองแบบไม่จำกัดหรือทำให้เซลลูโลสละลายสารที่ใช้เพื่อทำให้เกิด Intracrystalline Swelling คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เอมีนและแอมโมเนีย

ส่วนกรดซัลฟูริกความเข้มข้นสูง (70-75 เปอร์เซ็นต์) และ Fuming Hydrochloric Acid ใช้เป็น Intracrystalline Swelling Agent ได้ ปัจจุบันวิธีทางเคมีที่ใช้มาก คือ การใช้ด่างและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ วิธีการใช้ด่างมาเป็นเวลานาน โดยใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพของสิ่งทอที่ทำจากเซลลูโลส วิธีเตรียมวัตถุดิบที่ดีที่สุดที่มีอยู่ในปัจจุบัน (Sun and Cheng, 2002) คือ

-การใช้ความดันและอุณหภูมิไอน้ำสูง

-การใช้ด่างเจือจาง คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

-การใช้ด่างเข้มข้นโดยใช้ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮดรอกไซด์

3) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพ (Physico-Chemical Pretreatment)

-Steam Explosion เป็นการระเบิดด้วยไอน้ำซึ่งนิยมใช้โดยทั่วไปในการเตรียมวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส วิธีนี้เป็นการใช้ความดันสูง แล้วทำการลดความดันลงอย่างรวดเร็ว ทำให้วัตถุดิบเกิดการระเบิดและการสลายตัว โดยอุณหภูมิเริ่มต้นที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำเท่ากับ 160-260 องศาเซลเซียส และใช้ความดันเท่ากับ 0.69-4.83 เมกะปาสกาล (MPa) เป็นเวลาหลายวินาทีถึงสองหรือสามนาที หลังจากนั้นเอาวัตถุดิบมาวางไว้ที่ความดันบรรยากาศ และปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมวัตถุดิบด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ เวลา อุณหภูมิ ขนาดชิ้นของวัตถุดิบ และความชื้น

ข้อดีของการเตรียมวัตถุดิบด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ ใช้พลังงานต่ำเมื่อเทียบกับการตัด การบด วิธีทางกายภาพจะใช้พลังงานมากกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ การระเบิดด้วยไอน้ำจะมีประสิทธิภาพสูงกับไม้เนื้อแข็ง และสิ่งที่เหลือจากการเกษตร แต่จะมีประสิทธิภาพน้อยกับไม้เนื้ออ่อน ข้อจำกัดของการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ การที่ทำให้ Xylan แตกออกด้วย และลิกนินกับคาร์โบไฮเดรตแตกตัวไม่สมบูรณ์ และอาจสร้างสารที่เป็นตัวยับยั้งจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (Sun and Cheng, 2002) นอกจากนี้ ยังพบว่าของเสียจากอุตสาหกรรมบางชนิดสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้โดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ อาจปรับ pH ให้เป็นกรด เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการแต่ เช่น การปรับค่า pH ให้เป็น 4.5 ในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Z. mobilis* ATCC 31821 และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclave พบว่า สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลได้ 3.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับที่ผ่านการฆ่าเชื้อวัสดุหมักด้วย autoclave (Tao *et al.,* 2005)

-Ammonia Fiber Explosion (AFEX) เป็นวิธีนำวัตถุดิบใส่ลงไปในสารละลายแอมโมเนียที่อุณหภูมิและความดันสูง แล้วทำการลดความดันลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งวิธีนี้คล้ายกับการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยปริมาณของแอมโมเนียที่ใช้เท่ากับ 1-2 กิโลกรัมของแอมโมเนีย ต่อน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบ 1 กิโลกรัม ใช้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การเตรียมวัตถุดิบด้วยวิธีนี้เป็นการเพิ่มอัตรา

การเปลี่ยนจากลิกโนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาล และสามารถใช้วัตถุดิบที่มาจากหลายแหล่ง เช่น พืชตระกูลถั่ว ฟางข้าวต่างๆ ซังข้าวโพด กระดาษต่างๆ และกากอ้อย เป็นต้น

-CO_2 Explosion เป็นการทำในลักษณะเดียวกับการระเบิดด้วยไอน้ำและแอมโมเนีย ซึ่ง CO_2 จะเหมือนกับกรดคาร์บอนิก และได้มีการทดลองใช้วิธีนี้ในการเตรียมพืชตระกูลถั่วโดยใช้ 4 กิโลกรัม CO_2 ต่อกิโลกรัม fiber ที่ความดัน 5.62 เมกะปาสกาล หลังจากนั้นนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงได้น้ำตาลกลูโลส เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลผลิตด้วยวิธีนี้น้อยกว่าวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำหรือการระเบิดด้วยแอมโมเนีย

-Microwave-Assisted Alkali เป็นการใช้เครื่อง Microwave ร่วมกับการใช้ด่างวิธีนี้จะสลายโครงสร้างเซลลูโลส และลดปริมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ในการเตรียมวัตถุดิบโดยใช้วิธีนี้ที่อุณหภูมิสูง คือ มากกว่า 160 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการสลายตัวขององค์ประกอบของวัตถุดิบและเป็นวิธีที่นิยมใช้ เพราะเป็นการใช้ความร้อนสูงได้อย่าง มีประสิทธิภาพและมีขั้นตอนในการทำที่ง่ายได้มีการศึกษาการเตรียมฟางข้าวด้วยการใช้ Microwave ร่วมกับการใช้ด่างก่อนทำการเตรียมโดยใช้วิธี Microwave-Assisted Alkali จะต้องทำการตัดฟางข้าวให้มีความยาว 1-2 เซนติเมตร นำไปล้างและตากแดดจนแห้ง ชั่งน้ำหนัก 20 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์1 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 160 มิลลิลิตรแล้วนำไปเข้า Microwave ทำการทดลองโดยใช้กระแสไฟฟ้าเท่ากับ 700, 500 และ 300 วัตต์ ทำการทดลองตั้งแต่เวลา 15 ถึง 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างจน pH เป็นกลาง อบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ มีการใช้ไมโครเวฟร่วมกับการใช้ด่าง (1 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์) ที่กระแสไฟฟ้าเท่ากับ 700 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที และที่กระแสไฟฟ้า 300 วัตต์ เป็นเวลา 70 นาที จะช่วยเพิ่มปริมาณเซลลูโลสและสลายลิกนินกับเฮมิเซลลูโลสได้มากที่สุด ซึ่งจากการเปรียบเทียบการใช้ด่างร่วมกับไมโครเวฟทำให้เวลาในการทำไฮโดร์ไลซิสด้วยเอนไซม์สั้นกว่า กล่าวคือ ใช้เวลา 72 ชั่วโมง ในการไฮโดรไลซิสได้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 34.9 ± 0.4 กรัมต่อลิตร แต่การใช้ด่างเพียงอย่างเดียวใช้เวลา 96 ชั่วโมง จะได้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 34.5 ± 0.8 กรัมต่อลิตร (Zhu *et al.*,2005a) และเมื่อนำมาทำการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง (Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)) พบว่าฟางข้าวที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบโดยใช้ไมโครเวฟร่วมกับการใช้ด่างใช้เอนไซม์ต่ำกว่า คือ 15 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรต และได้ผลผลิตเป็นเอทานอลเท่ากับ 25.8 กรัมต่อลิตร แต่สำหรับการใช้ด่างอย่างเดียวต้องใช้เอนไซม์ในอัตราเฉลี่ย 20 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรตและได้เอทานอลเท่ากับ 23.7 กรัมต่อลิตร (Zhu *et al.,* 2005b) และยังมีการศึกษาวิจัยการผลิตเอทานอลจากใบอ้อย ซึ่งได้ถูกนำมาปรับสภาพด้วย $NaOH+H_2O_2$ และนำมาใช้เป็นวัสดุหมักสำหรับผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่อง พบว่าเมื่อนำใบอ้อยที่ถูกปรับสภาพแล้ว มาหมักแบบต่อเนื่องด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในอัตรา 40 FPU

cellulase/g-substrate และใช้ *S. cerevisiae* เป็นเชื้อหมักจะได้ เอทานอลสูงสุด 2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดลองเติมเอนไซม์ β-glucosidase จากเชื้อ *Aspergillus niger* เพิ่มเป็น 50 U/g-substrate พบว่าผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 2.2 เปอร์เซ็นต์ (Krishna *et al.,* 1998)

4) การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biodrgradation Pretreatment)

การเตรียมลิกโนเซลลูโลสทางชีวภาพ มีการใช้จุลินทรีย์ เช่น Brown, White and Soft-rot fungi ในการย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบ Brown-rot fungi ใช้เฉพาะเซลลูโลส ในขณะที่ White-rot fungi และ Soft-rot fungi สามารถใช้ได้ทั้งลิกนินและเซลลูโลส White-rot fungi เป็นกลุ่มเชื้อราที่มีประสิทธิภาพมากในการเตรียมลิกโนเซลลูโลส (Fan *et al*., 1987 อ้างถึงใน Sun and Cheng, 2002)

ข้อได้เปรียบของการเตรียมวัตถุดิบด้วยวิธีนี้ คือ ใช้พลังงานต่ำและใช้สภาวะแวดล้อมธรรมดา แต่การไฮโดรไลซิสด้วยจุลินทรีย์จะให้ผลผลิตที่ต่ำมาก (Sun and Cheng, 2002)

ข.วิธีการย่อยสลายวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว หญ้าแฝก กากอ้อย ซังข้าวโพดและเศษไม้ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) การย่อยสลายวัสดุประเภทนี้นิยมใช้วิธีการย่อยทางเคมี และวิธีการย่อยทางชีวภาพด้วยการใช้เอนไซม์ (ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2550)

การย่อยสลาย (Hydrolysis) สามารถทำได้ 2 วิธี

1. การย่อยสลายด้วยสารเคมี สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรง แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย

2. การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพ สามารถทำได้โดยการใช้เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสกับเซลลูโลส ให้ผลผลิตน้ำตาล การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและไม่รุนแรง แต่ใช้ระยะเวลานานเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมี การย่อยด้วยเอนไซม์จะมีต้นทุนต่ำกว่าการย่อยด้วยกรดหรือด่างเพราะลดปัญหาเรื่องการกัดกร่อนอุปกรณ์ ซึ่งการใช้เอนไซม์เป็นสภาวะที่ไม่รุนแรง โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาโดยเลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลส และในการทำงานของเอนไซม์มีปัจจัยที่ต้องพิจารณาหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์ pH อุณหภูมิ และเวลาในการย่อย เป็นต้น

-**วิธีการย่อยทางเคมี** โดยการใช้กรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง เป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรง แต่ได้ผลผลิตน้อย เนื่องจากน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไปทำให้ได้ผลพลอยได้อื่น เช่น Furfural ซึ่งกรดที่มักใช้ในวิธีนี้คือ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป นอกจากนี้วิธีนี้ต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-

160 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาที่เกิดจะรุนแรงและก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากน้ำทิ้งที่เกิดจากการย่อยมีกรดเจือจางอยู่

-วิธีการย่อยทางชีวภาพด้วยการใช้เอนไซม์ พบว่ามีเอนไซม์ 3 ชนิดหลักที่เกี่ยวข้องดังนี้

Endoglucanase (1, 4-β-D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) จะย่อย β-1, 4- glucosidic linkage โดยจะตัดแบบสุ่มภายในสายจะได้ กลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์

Exoglucanase หรือ Cellobiohydrolase (1, 4-β-D-glucan cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) จะทำหน้าที่ย่อยร่วมกับ Endoglucanase ในการย่อยเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducing ผลที่ได้คือ เซลโลไบโอส

Beta-glucosidase (β-D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) จะย่อยเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ได้เป็น กลูโคส

การทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้เริ่มจาก Endoglucanase จะย่อยตำแหน่งต่างๆ ภายในส่วนที่เป็น amorphous แบบสุ่ม เพื่อเป็นการเปิดช่องทางให้ Cellobiohydrase เข้าไปทำงานต่อ Cellobiohydrase หรือ Exoglucanase ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลัก (ประมาณ 40-70 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในกลุ่ม) จะค่อยๆตัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือคู่ออกจากปลายสายเซลลูโลส เอนไซม์นี้จะสามารถย่อยโครงสร้างที่เป็นผลึกได้ ในขั้นตอนสุดท้ายกลูโคสโมเลกุลคู่ หรือ Cellooligosaccharides จะถูกตัดออกเป็นกลูโคสด้วเอนไซม์ Beta-glucosidase

การใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลสมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้กรด โดยสภาวะการทำงานที่ไม่รุนแรง ทำให้มีต้นทุนการบำรุงรักษาที่ต่ำ มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้กับกระบวนการปรับสภาพได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นการปรับสภาพทางกายภาพเพียงอย่างเดียว

จากการศึกษายังพบว่า น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีปริมาณสารอินทรีย์สูง และประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิดที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ จึงส่งผลให้มีการนำน้ำเสียดังกล่าวมาเป็นอาหารของจุลินทรีย์เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย โดยเอนไซม์ที่ผู้วิจัยนำมาใช้ในการศึกษา คือ เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีนเท่ากับ 1 ต่อ 1 ละลายน้ำได้ดี เป็นเอนไซม์เชิงซ้อน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยเซลลูโลสโดยซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส แต่อาจต่ำกว่าหรือสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาผลิต จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา โดยแบคทีเรียได้แก่พวกที่ต้องการอากาศ เช่น *Pseudomonas, Cytophaga, Sporocytophaga* และพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เช่น *Cellulomonas* นอกจากนี้ยังมีพวกที่ไม่ต้องการอากาศ เช่น *Clostridium, Thermophilum, Acetivibrio* (จารุวรรณ มณีศรี, 2538)

1.2.1.8 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบประเภทน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และชูการ์บีช ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสมีขั้นตอนดังนี้ คือ ขั้นแรกจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสอย่างละโมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยยีสต์หรือแบคทีเรีย โดยมีการศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 โดยเลี้ยงในอาหาร Basal salt medium (BSM) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 72.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 9.20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์, 2547)

1.2.1.9 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบอื่นๆ

วัตถุดิบประเภทอื่นที่ใช้ในการผลิตเอทานอล เช่น น้ำเสียหรือน้ำทิ้ง ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำน้ำทิ้งมาใช้ในการผลิตเอทานอลจากหลายแหล่ง เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.138×10^{-4} กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของซีโอดี เท่ากับ 0.9-1.4 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของซีโอดีเพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 6 กรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.225×10^{-4} และ 2.31×10^{-4} กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Khan *et al.,* 1994)

1.2.1.10 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด แต่ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้แพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีประสิทธิภาพดี แต่ในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ไม่ด้อยกว่ายีสต์ เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่าเมื่อใช้น้ำตาลเท่ากันและให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกับทฤษฎี นอกจากยีสต์และแบคทีเรียสายพันธุ์ตามธรรมชาติแล้ว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาและเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์โดยใช้กระบวนการทางพันธุวิศวกรรม (Genetic Engineering) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น เช่น เพื่อให้สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดียิ่งขึ้น จุลินทรีย์ที่ถูกใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces* sp. โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* เนื่องจากสามารถใช้น้ำตาลได้กว้างขวาง เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) ซูโคส (Sucrose) ฟรุกโทส (Fructose) กาแลกโทส (Galactose) มอลโทส (Maltose) แลกโทส (Lactose) ไซโลส (Xylose) อะราบิโนส (Arabinose) และซอบิทอล (Sorbital) (Kiransree *et al*., 2000) และมอลโตทริโอส (Moltotriose) (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) รวมทั้งสับสเตรทจำพวก

แป้งต่างๆด้วย ในการผลิตเอทานอลที่ใช้สำหรับการทดลองในการวิจัยในครั้งนี้เลือกยีสต์ *S. cerevisiae* มาใช้

ก.ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมหรือรี นอกจากนี้อาจมีรูปร่างเป็นรูปถั่ว รูปเลมอน ทรงกระบอก หรือยาวเป็นสาย เซลล์มีความกว้างประมาณ 1-5 ไมครอน และยาวประมาณ 5-30 ไมครอน ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ ส่วนมากเกิดโดยการแตกหน่อ (Budding) และส่วนน้อยที่เกิดจากการแบ่งแยกเซลล์ (Fission) ยีสต์เป็น Heterotroph ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน มีทั้งพวกที่เป็น Saprophyte และ Parasite พบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ข. แหล่งอาหารและปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญและผลิตเอทานอลของยีสต์

สำหรับการเจริญและการพัฒนาของยีสต์นั้น ต้องการสารอาหาร ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน รวมทั้งธาตุอาหารหลัก (Major Element) อื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส นอกจากนี้ ยังต้องการธาตุอาหารบางชนิดในปริมาณค่อนข้างมาก ธาตุอาหารเหล่านี้จัดเป็น Macro element ประกอบด้วย แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ในขณะที่ธาตุอาหารบางชนิดยีสต์ต้องการในปริมาณที่ต่ำ (Micro element หรือ Trace element) ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี นิเกิล โคบอลต์ และโมลิบดีนัม ยิ่งไปกว่านั้นยีสต์ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน พิวรีน (purine) ไพริมิดีน (pyrimidine) และนิวคลีโอไทด์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

1) แหล่งคาร์บอน

ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์เป็นคีโมออร์การ์โนโทรฟ (Chemoorganotroph) ซึ่งต้องใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเมแทบอลิซึมได้ ยีสต์บางชนิดสามารถเมแทบอลิซึมกลูโคสด้วยการหมักได้ด้วย โดยปกติถ้ายีสต์ชนิดใดไม่สามารถหมักกลูโคสจะไม่สามารถหมักฟรุกโทสและแมนโนสด้วย แต่กลูโคสอาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เกิดเมแทบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดในยีสต์ทุกชนิด โดยปกติในธรรมชาติกลูโคสจะไม่ได้มีอยู่อย่างอิสระแต่อยู่ในรูปของพอลิเมอร์จำพวกเซลลูโลส แป้ง และพอลิแซ็กคาร์ไรด์อื่น (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

1.1) น้ำตาลเฮกโซส

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ ซึ่งสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์สามารถนำมาใช้ในการเจริญได้ น้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำมาใช้ในการเจริญ เช่น น้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นสารอาหารที่ยีสต์นำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางมากที่สุด โดยน้ำตาลกลูโคสจะถูกใช้อย่างสม่ำเสมอในการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงยีสต์ ตามธรรมชาติของเชื้อยีสต์ไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสมาใช้ประโยชน์ได้ง่าย เช่น ในกรณีที่กลูโคสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเซลลูโลส แป้ง และโพลีเซคคาไรด์อื่นๆ หรือในส่วนประกอบของสารตั้งต้นที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในการหมัก (กฤษนัย ตระกูลโอสถ และคณะ, 2544)

นอกจากนี้ กลูโคสจะยับยั้งการใช้น้ำตาลตัวอื่นของยีสต์ เมื่อมีการหมักน้ำตาลชนิดนี้ร่วมกับน้ำตาลชนิดอื่น เชื้อสามารถหมักน้ำตาลคาร์บอน 6 หรือน้ำตาลเฮกโซสได้ ซึ่งนอกจากน้ำตาลกลูโคสแล้วยีสต์สามารถหมักน้ำตาลฟรุกโตส แมนโนส กาแลกโตส เป็นต้น โดยเชื้อ Baker's yeast และ Brewer's yeast สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ในกระบวนการหมักได้เร็วเท่ากัน เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสอยู่ที่1-10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสอยู่ที่ 2-8 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้งน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส เป็นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ในกระบวนการหมักได้ (Fermentable Sugar) ส่วนน้ำตาลที่อยู่ในไอโซเมอร์แอล (L-isomer) ทั้งหมดเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ไม่สามารถใช้ในกระบวนการหมักได้ (Unfermentable Sugar) (Chandrakant *et al.*, 2000)

1.2) น้ำตาลเพนโทส

ยีสต์สามารถใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งยีสต์หลายสายพันธุ์ใช้น้ำตาลเฮกโซสในการผลิตเอทานอลซึ่ง yield ที่ได้จะมาก แต่ยีสต์ส่วนน้อยสามารถหมักน้ำตาลเพนโทส เช่น น้ำตาลไซโลสและไซลูโลสให้เป็นเอทานอล ซึ่งยีสต์ที่ใช้น้ำตาลดังกล่าวได้แก่ *P. tannophilus, C .shehatae, P. stipitis* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตเอทานอล เชื้อยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ดี คือ *Candida* sp.ในขณะที่ *Saccharomyces* sp.และ *Schizosaccharomyces* เจริญได้เพียงเล็กน้อย (Prashant *et al*., 1993)

เนื่องจากยีสต์บางชนิดไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้โดยตรง แต่สามารถใช้น้ำตาลไซลูเลสซึ่งเป็นไอโซเมอร์กับน้ำตาลไซโลส ในการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้โดยตรงนั้น จึงต้องมีการใช้เอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรสช่วยในการเกิด isomerisation เปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลูเลสจากนั้นจึงสามารถนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ หรืออาจเป็นการทำให้

เซลล์ยีสต์เกิด recombinant ที่มี gene ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส ซึ่งเชื้อยีสต์ที่สามารถหมักน้ำตาลไซลูโลสได้ คือ *S.cerevisiae*, *S. pombe* (Prashant *et al*., 1993)

1.3) น้ำตาลไดแซคคาไรด์

น้ำตาลซูโครส (Sucrose) เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่สามารถหมักโดยเชื้อยีสต์ ซึ่งซูโครสเป็นไดแซคคาไรด์ที่พบได้ในพืชและผัก เป็นองค์ประกอบสำคัญในบีทและน้ำตาลอ้อย ในการหมักน้ำตาลซูโครสจะมีเอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase) เป็นตัวไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส (Suamalainen and Oura, 1969) จากนั้นยีสต์จึงสามารถนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในการหมักเป็นเอทานอล

2) แหล่งไนโตรเจน

เซลล์ยีสต์จะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณเปอร์เซ็นต์ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองลงมาจากคาร์บอน โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของสารอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะมิโน และโปรตีนชนิดต่างๆ (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2544) ความหลากหลายของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน ที่มีอยู่ใน Yeast Extract ซึ่งประกอบไปด้วย Total Nitrogen (TN) 9.8 เปอร์เซ็นต์และ Amino Nitrogen (AN) 5.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ เพปไทด์ พิวรีน ไพริมิดีน และเอมีน เป็นสารที่ใช้เตรียมขึ้นเพื่อความต้องการไนโตรเจนของเซลล์ยีสต์ ยีสต์บางชนิดใช้เพปไทด์ขนาดเล็กๆ ได้ และการนำเพปไทด์เข้าสู่เซลล์ยีสต์ถูกจำกัดด้วยขนาดโมเลกุล โดยเพปไทด์จะถูกย่อยโดยเอนไซม์เพปทิเดส (peptidase) หลังจากผ่านไปในเซลล์ เช่น S. *cerevisiae* ใช้เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนสองโมเลกุล (dipeptide) และ เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนสามโมเลกุล (tripeptide) นอกจากนั้น มีบางสายพันธุ์ที่ใช้เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนห้าโมเลกุล (pentapeptide) (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

3) แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสจัดอยู่ในรูปกรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิปิด และฟอสเฟต ซึ่งปกติฟอสฟอรัสที่ให้แก่เซลล์ยีสต์จะอยู่ในรูปฟอสเฟต เช่น ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ฟอสเฟตเป็นธาตุที่จำเป็นต่อกระบวนการหมักเอทานอล ยีสต์ใช้ฟอสเฟตในกระบวนการสร้างพลังงานในรูป ATP สังเคราะห์นิวคลีโอโปรตีน และสารอื่นๆ ภายในเซลล์ การแตกตัวของฟอสเฟตจะทำให้เกิดสภาพบัฟเฟอร์ (Buffer) ช่วยรักษา pH ให้คงที่ กรณีที่เซลล์ของยีสต์ขาดฟอสเฟตเซลล์จะอ่อนแอ ดังนั้น ฟอสเฟตจึงจำเป็นสำหรับเซลล์ยีสต์.

ในอาหารเลี้ยงยีสต์แหล่งฟอสฟอรัสที่สำคัญจะอยู่ในรูป ออร์โทฟอสเฟต และอนินทรีย์ฟอสเฟตโดยออร์โทฟอสเฟตทำหน้าที่เป็นสับสเตรตและหน่วยปฏิบัติงานของเอนไซม์

หลายชนิด ระดับของฟอสเฟตภายในไซโทพลาสซึมของยีสต์ต่ำมากคือประมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักของเซลล์แห้ง แต่ระดับของฟอสเฟตจะผันแปรตามกลไกแคทแทบอลึซึมของน้ำตาล ยีสต์สามารถสะสมฟอสเฟตในออร์แกเนล เช่น อาจพบฟอสเฟตในแวคิวโอมากกว่าในไซโทพลาสซึมถึง 110 เท่า สำหรับอนินทรีย์ฟอสเฟตนั้นทั้งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต สามารถใช้เป็นแหล่งฟอสเฟต และเนื่องจากโพแทสเซียมไอออนสามารถเหนี่ยวนำการนำเข้าฟอสเฟตโดยขนส่งร่วมกับฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์มีผลให้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสเฟตที่ดีกว่าแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในที่ขาดแหล่งฟอสเฟตชนิดอื่น และลักษณะของเมแทบอลิซึมของฟอสเฟตอีกอย่างหนึ่งของยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัด คือ เซลล์จะขับเอนไซม์ฟอสโฟเอสเทอเรสที่ไม่จำเพาะ และแอซิดฟอสฟาเทส ไปที่เซลล์ทำให้เซลล์ได้ฟอสฟอรัสจากฟอสเฟตเอสเทอร์ (Berry and Brown, 1987; Walker,1998 อ้างถึงใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

4) แหล่งซัลเฟอร์

ความต้องการซัลเฟอร์ของยีสต์ส่วนใหญ่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ทางชีวภาพของกรดอะมิโนที่มีองค์ประกอบของซัลเฟอร์ โดยทั่วไปเซลล์ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2544) กรดอะมิโนเมไธโอนีน (Methionine) เป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่ยีสต์สามารถใช้ได้ดี (Rose and Harison, 1975) นอกจากนี้ แหล่งซัลเฟอร์ที่ได้อาจเกิดจากสารประกอบซัลเฟอร์หลายชนิดรวมทั้งซัลเฟต ซัลไฟด์ ไทโอซัลเฟต อนินทรีย์ซัลเฟอร์ในรูปของซัลเฟตไอออน โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตหรือโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่นิยมใช้ในอาหาร โดยยีสต์ทุกชนิดสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์จากซัลเฟตได้ การนำเข้าซัลเฟตที่ว่องไวสัมพันธ์กับการมีเอนไซม์ โฮโมซีสทีอีนซินเทส (Homocysteine Synthhase) ซึ่งทำให้ซัลเฟตถูกนำเข้าไปเพื่อสร้างซีสเทอีน โดยซัลเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นซัลไฟด์ทันทีแล้วจึงถูกเมแทบอไลซ์ต่อไป ดังนั้น ซัลไฟด์จึงอาจใช้เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้เช่นกันแต่ต้องใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์บางชนิด เช่น S. *cerevisiae* ใช้ธาตุซัลเฟอร์เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้ โดยธาตุซัลเฟอร์ถูกรีดิวซ์นอกเยื่อหุ้มเซลล์กลายเป็นไทออลไอออน (thiol ion) แล้วจึงผ่านเข้าไปในเซลล์ เมไทโอนีนเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เพียงชนิดเดียวที่ใช้เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้โดยเมไทโอนีน มีผลให้ยีสต์มีการเจริญดีกว่าซัลเฟต (Berry and Brown, 1987; Walker,1998 อ้างถึงใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

5) แหล่งแร่ธาตุที่จำเป็น

แร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ เช่น แมกนีเซียม ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญและกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ มีอยู่ในเซลล์ประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก

เซลล์แห้ง ทำหน้าที่เกี่ยวกับโครงสร้างและเมแทบอลิซึม โดยอนุมูลของแมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดในกระบวนการ Glycolysis สำหรับธาตุแคลเซียมนั้นมีผลต่อการเจริญของยีสต์และกระบวนการหมักเอทานอลเช่นกัน นอกจากธาตุที่กล่าวมาข้างต้น ยังมีธาตุชนิดอื่นที่มีความสำคัญแต่เซลล์ยีสต์ต้องการธาตุเหล่านี้ในปริมาณที่ไม่มากนัก เช่น เหล็ก ทองแดง นิเกิล สังกะสี เป็นต้น (Rose and Harison, 1975)

6) ออกซิเจน

ยีสต์หลายชนิดเจริญเฉพาะในที่มีออกซิเจน ยีสต์เหล่านี้เรียกว่า Obligate aerobic yeast เช่น *Candida* ยีสต์ไม่สามารถเจริญในที่ขาดออกซิเจนอย่างสมบูรณ์ โดยไม่มียีสต์ชนิดใดที่เจริญได้เฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Obligate Anaerobic Yeast) ยีสต์บางชนิดเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เรียกว่า Facultative Anaerobic Yeast ซึ่งยีสต์ประเภทนี้มีลักษณะสำคัญ 3 อย่าง คือ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ชอบเจริญในที่มีออกซิเจนมากกว่าเพราะได้รับพลังงานในรูป ATP มากกว่า และในสภาวะที่มีออกซิเจนจะมีอัตราการใช้กลูโคส (Glucose Consumption) ต่ำกว่าที่ไม่มีออกซิเจน ออกซิเจนจัดเป็น growth factor ที่สำคัญของยีสต์ สำหรับ *S. cerevisiae* ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจึงต้องเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัว สเตอรอล และกรดนิโคตินิกลงในอาหารด้วย *S. cerevisiae* จึงจะเจริญได้ และการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนจะส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ชีวมวล

ในห้องปฏิบัติการนั้น การเขย่าสามารถเพิ่มอัตราการดูดซึมออกซิเจนอย่างมากทำให้การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น ในขณะที่การหมักเบียร์ซึ่งเป็นการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic fermentation) การมีออกซิเจนในช่วงต้นซึ่งยีสต์มีการเจริญแบบใช้ออกซิเจนมีผลที่เป็นประโยชน์ซึ่งสำคัญมากในการนำไปสู่การหมักต่อไป

7) อุณหภูมิ

S. cerevisiae เป็นสายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesospheric Strain) มีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิปานกลาง การเติบโตจะหยุดลงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำที่สุดที่สามารถเติบโตได้ดี คือ 5-10 องศาเซลเซียส ความทนต่ออุณหภูมิสูงจะมากขึ้นเมื่อเชื้อเติบโตในอาหารที่มีความสมบูรณ์ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักจะสูงกว่าการเติบโตประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส (Rose and Harison, 1975)

8) พีเอช (pH)

pH ที่ *S. cerevisiae* สามารถเติบโตได้มีค่า 2.4-8.6 โดยมีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาล ประสิทธิภาพจะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง pH 3.5-6.0 และพบว่าการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโคสจะมีความไวต่อการเปลี่ยนค่า pH มากกว่าการใช้กลูโคส เนื่องจากเอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase) จะเปลี่ยนแปลงที่ค่า pH ต่ำมากกว่า เพราะความสามารถในการ

หมักเอทานอลของเชื้อจะลดลงเมื่อค่า pH ต่ำมากๆ นอกจากการหมักเอทานอลที่ค่า pH ที่เป็นกรดหรือประมาณ 4.5 จะส่งเสริมการหมักแล้วยังช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนมากับสารอาหารด้วย เพราะเชื้อแบคทีเรียส่วนมากสามารถเติบโตได้ดีที่ค่า pH เป็นกลาง (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2544) และค่า pH ดังกล่าวยังเหมาะสมที่สุดสำหรับการหมักน้ำตาลไซโลสด้วยเชื้อยีสต์ *C. shehatae* ในวิธีการหมักแบบกะ (Thomas and Yong-Su, 2003)

ค. กระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์

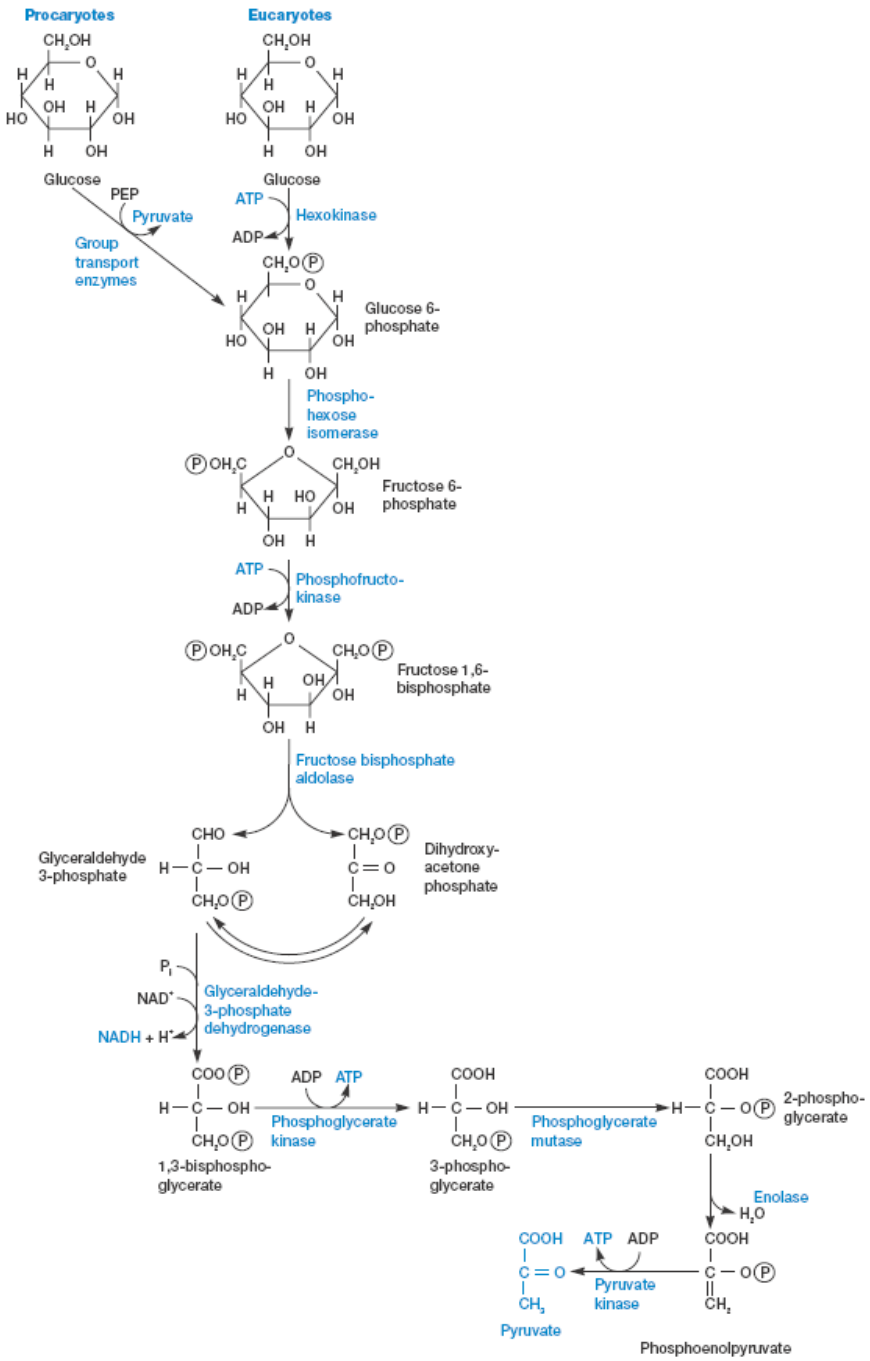
กระบวนการหมักเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ซึ่งการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลเกิดขึ้นหลายวิธี (Pathway) ขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการหมัก โดยทั่วไปมักใช้เชื้อจุลินทรีย์ในสกุล *Saccharomyces* sp. เอทานอลจะถูกสร้างโดยอาศัย Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof-Parnas Pathway ดังแสดงในภาพที่ 1.2 (ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551)

ขั้นตอนของวิถี Glycolysis สามารถออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

<u>ขั้นตอนที่1</u> การสลายกลูโคสให้เป็น 2 ไทรโอสฟอสเฟต (triose phosphate) ประกอบด้วยปฏิกิริยาของ Hexokinase หรือ Glucokinase จะใช้ ATP เพื่อเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น Glucose-6-phosphate (G6P) เปลี่ยนเป็น Fructose-6-phosphate (F6P) ด้วย Phosphohexoisomerase จากนั้น Phosphofructokinase จะเปลี่ยน F6P เป็น Fructose1,6-diphosphate (FDP) ซึ่งแตกตัวเป็นสาร Glyceraldehydes-3-phosphate (G3P) และ Dihydroxyacetonephosphate (DHAP) โดยอาศัยเอนไซม์ Aldolase แล้ว DHAP จะเปลี่ยนเป็น Glycerol phosphate และได้ Glycerol

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> DHAP เปลี่ยนเป็น G3P ด้วยเอนไซม์ Triosephosphate isomerase หลังจากนั้น G3P ทำปฏิกิริยากับฟอสเฟตจะได้ 1,3-Diphosphoglycerate (DPG) และ DPG จะทำปฏิกิริยากับ ADP ได้ 3-Phosphoglycerate (3PG) และ ATP ปฏิกิริยานี้สร้าง ATP ด้วยวิธี Substrate level phosphorylation ซึ่ง 3PG จะเปลี่ยนเป็น Phosphoenol pyruvate (PEP) โดยจะให้ทั้ง ATP และไพรูเวท

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสาร 2 คาร์บอน เช่น เอทานอลหรือ 3 คาร์บอน ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ หากไม่มีออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจน ไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นแลคเตท ในปฏิกิริยาของ Lactate dehydrogenase แต่หากมีออกซิเจนไพรูเวทอาจเปลี่ยนเป็น Aceyl CoA ซึ่งจะเข้าสู่วัฏจักรเครบต่อไป ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดไพรูเวทอาจสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็น Acetaldehyde โดยการเร่งของ Pyruvate decarboxylase ซึ่ง Acetaldehyde จะถูกออกซิไดส์กลายเป็นอะซิเตท หรือรีดิวซ์ด้วย NADH โดยเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ได้เป็นเอทานอล (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2542)



ภาพที่ 1.2 กระบวนการ Embden-Meyerhof pathway

ที่มา : Prescott และคณะ (2002)

ง. ลักษณะของยีสต์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลมีหลายประการ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) เช่น

-ให้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) สูง

-มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง

-มีความทนเอทานอล (ethanol tolerance)

-มีความทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)

-มีความทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)

-มีความสามารถในการจับกลุ่มตะกอน (flocculation) ซึ่งขึ้นอยู่กับกระบวนการว่าต้องการลักษณะการจับกลุ่มตกตะกอนนี้หรือไม่

-ทน pH ต่ำหรือทนกรด (acid tolerance)

-มีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย

-ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่างๆของการหมัก

-ใช้สับสเตรตได้หลายชนิด

-สร้างเมแทบอไลต์อื่นในระดับต่ำ เช่น กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล ไฮฟเออร์แอลกอฮอล์ (higher alcohol) เอสเทอร์ และอัลดีไฮด์

-ไม่มีการกดดัน (repression) การใช้น้ำตาลอื่นเมื่ออยู่ในที่มีกลูโคส

-มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งหรือย่อยเซลลูโลสเมื่อต้องการหมักโดยการใช้แป้งหรือเซลลูโลสเป็นสับสเตรต

-มีอัตราการเจริญสูงแต่ให้ผลผลิตเซลล์ต่ำเพื่อให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนเชื้ออย่างรวดเร็วสำหรับการผลิตเอทานอล

-เซลล์มีความมีชีวิตสูง

-ทนต่อสารพิษและสารยับยั้งการเจริญ

-ทนการปะปนของแบคทีเรีย

-มีลักษณะเป็นคิลเลอร์ (Killer) สามารถผลิต Extracellular protein toxin หรือ ไกโคโปรตีน ซึ่งสารพิษตัวนี้จะมีผลโดยตรงต่อโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะไปรบกวนระบบการลำเลียงสารอาหารของเซลล์ (Zoecklein *et al.,* 1995)

-เพิ่มจำนวนง่าย

-ให้ความร้อนระหว่างการหมักน้อย

เมื่อพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์มาใช้สำหรับการผลิตเอทานอลนั้นการให้ผลผลิตสูงและมีอัตราการหมักเอทานอลสูงเป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญเป็นอันดับแรก นอกจากนั้นลักษณะ

อื่นที่ได้รับความสนใจเวลาคัดเลือกยีสต์ที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงหรือสารเคมี คือ ความทนเอทานอล ความทนอุณหภูมิสูง ความทนแรงดันออสโมซิส และความสามารถในการตกตะกอน สาเหตุที่ทำให้ลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะที่สำคัญได้รับความสนใจ เนื่องจากในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสตามทฤษฎีกลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอล 0.51 กรัม แต่ในทางปฏิบัติทั่วไปจากกลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอลเพียงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบคาร์บอนไปเป็นผลิตภัณฑ์หรือผลผลิตทางทฤษฎี (theoretical yield) ของเอทานอล และมีส่วนหนึ่งที่นำไปสร้างเซลล์ นอกจากนั้นประสิทธิภาพการหมักเอทานอลอาจลดลงและการหมักยาวขึ้นเนื่องจากปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ คือ การยับยั้งด้วยเอทานอล การยับยั้งโดยผลผลิตพลอยได้บางชนิด (เช่น กรดอินทรีย์) การยับยั้งเนื่องจากแรงดันออสโมซิสเพราะมีน้ำตาลความเข้มข้นสูง การยับยั้งการหมักโดยเพิ่มการเจริญของเซลล์เนื่องจากการให้อากาศและการกวน การยับยั้งการหมักเนื่องจากการปะปนด้วยแบคทีเรียและยีสต์อื่น หรือการยับยั้งด้วยไอออนบวกบางชนิดที่ความเข้มข้นสูงโดยเฉพาะการหมักในขนาดอุตสาหกรรม การยับยั้งการหมักจากการที่สายพันธุ์ไม่คงตัวซึ่งอาจเกิดขึ้นเพราะเชื้อมีการกลายพันธุ์หรือเชื้อเปลี่ยนแปลงไป ในการยับยั้งด้วยปัจจัยต่างๆ นั้นการยับยั้งโดยเอทานอลสำคัญที่สุด (Panchal and Tavares, 1990)

จากการศึกษาพบว่ามีการนำน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษทิชชูและพบว่ามีเยื่อกระดาษผสมอยู่ในกากตะกอนน้ำเสีย ซึ่งสามารถนำมาย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้ เนื่องจากเยื่อกระดาษเหล่านั้นมีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส น้ำเสียดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอล 6 มิลลิกรัมต่อลิตร จากกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง 1 กิโลกรัม ในกระบวนการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ, 2547) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้แก่ โรงงานผลิตผงชูรส โรงงานผลิตเครื่องดื่มและโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋อง เพื่อนำของเสียจากโรงงานทั้งสามแห่งมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ *Z. mobilis* NRRL-B-14023 ที่ pH 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำเสียจากโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋องสามารถนำไปแทนเป็นแหล่งอาหารที่ใช้ในการผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด (Ruanglek *et al.,* 2006)

1.2.2 แหล่งที่มาและคุณลักษณะน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis gluineensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งทางภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากมีการนำน้ำมันปาล์มไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างแพร่หลาย โดยสามารถใช้ทดแทนน้ำมันอื่นๆ และแทนไขสัตว์ได้เป็นอย่างดี ทำให้มีการเพิ่มพื้นที่การปลูกและการผลิตปาล์มน้ำมันที่มีแนวโน้มสูงขึ้นในจังหวัดกระบี่ ตรัง สุราษฎร์ธานี ชุมพร และสงขลา (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) ในกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจะมีวัสดุเศษเหลือในรูป

ของแข็ง ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า (Empty Fruit Bunches) เส้นใยปาล์ม (Palm Pericarp Fiber) กากเนื้อผลปาล์ม (Palm Kernel Cake) กะลาปาล์ม (Palm Shell) กากตะกอนสลัดจ์ (Sludge) และส่วนที่เป็นของเหลวคือ น้ำทิ้ง (Palm Oil Mill Effluent, POME) ซึ่งน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตมีประมาณ 0.87 ลูกบาศก์เมตรต่อตันทะลายปาล์มสด (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และคณะ, 2537)

การสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน มีการใช้น้ำในการผลิตมากและก่อให้เกิดน้ำทิ้งในขั้นตอนการแยกน้ำมัน เมื่อน้ำมันถูกลำเลียงเข้าถังพักหรือถังลอย ส่วนของน้ำมันซึ่งเบากว่าน้ำจะลอยตัวอยู่ด้านบนและถูกแยกออกไป ส่วนด้านล่างจะเป็นของผสมลักษณะเหลวข้น เรียกว่าน้ำสลัดจ์ ถูกส่งเข้าถังจมตัว (Settling Tank) และผ่านเข้าเครื่องแยกกรวดทราย (Decanter) ก่อนจะนำเข้าไปในเครื่องแยกน้ำมันโดยใช้ Separator หรือ Decanter ต่อไป สำหรับ Decanter เมื่อใช้งานไประยะหนึ่งต้องมีการล้างทำความสะอาดในขั้นตอนนี้จะมีน้ำทิ้งออกมา 200-250 ลิตรต่อครั้ง จากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานจะมีน้ำทิ้งออกมามาก ส่วนใหญ่มาจากขั้นตอนการอบทะลายปาล์มในรูปน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) (พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์, 2551)

คุณลักษณะของน้ำทิ้งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำทิ้ง ได้แก่ น้ำทิ้งจากบ่อรวมน้ำเสีย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (ตารางที่ 1.1) แสดงให้เห็นว่า น้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำเสียของโรงงานมีค่าบีโอดีและซีโอดี อยู่ในปริมาณสูง รวมทั้งค่ากรดไขมัน ปริมาณของแข็งทั้งในรูปสารที่ระเหยได้ และสารแขวนลอย (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) ต่อมา อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และคณะ (2537) ศึกษาคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 4 โรง พบว่าน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีปริมาณสารแขวนลอยต่ำ (เฉลี่ย 10.30 กรัมต่อลิตร) และมีน้ำมันค่อนข้างสูง (เฉลี่ย 14.57 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้น้ำทิ้งยังมีองค์ประกอบของอินทรีย์สารต่างๆ ที่สำคัญ ดังแสดงใน (ตารางที่ 1.2), (ตารางที่ 1.3) (Hwang *et al.,* 1987) นอกจากนี้ Mustar และคณะ (2001) ได้ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยง *S. cerevisiae* 3010 และ *C. utilis* 1017 พบว่าในน้ำทิ้งมีองค์ประกอบพวกแร่ธาตุต่างๆ เช่น แมกนีเซียม (Mg), แคลเซียม (Ca), โซเดียม (Na) และโพแทสเซียม (K) รวมถึงน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ดังแสดงใน (ตารางที่ 1.4)

ตาราง 1.1 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากขั้นตอนต่างๆ ในการสกัดน้ำมันปาล์ม และน้ำทิ้งรวมของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ปัจจัยคุณภาพ	น้ำทิ้งจากบ่อรวม	น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ	น้ำทิ้งจากเครื่องแยกน้ำและกากสลัดจ์ออกจากน้ำมัน
Color	Dark Brown	Brown	Brown-Blackish Brown
pH	4.05-4.62	4.84-5.35	4.61-4.89
BOD	54,750-60,000	22,800-41,985	21,000-45,375
COD	80,523-115,934	45,360-80,146	38,246-67,567
Volatile acid	3,128-5,870	998-7,125	1,838-2,273
Alkalinity	68-200	37-1,576	86-480
Grease	16-2,449	20-1,165	4
Total solids (TS)	49,063-88,508	26,367-76,733	25,634-47,242
Suspended solids (SS)	18,500-52,000	2,600-6,100	2,900-20,300
Nitrogen			
-ammonia	27-61	7.0-66.3	22-23
-organic	551-1,172	22-1,287	518

หมายเหตุ ทุกหน่วยมีค่าเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นสี และ pH

ที่มา : ดัดแปลงจากพูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533)

ตารางที่ 1.2 องค์ประกอบโดยประมาณของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Composition	Mixed effluent		Sterilizer condensate	
	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)	Dry wt basis (ppm)	Wet wt basis (%)
Total solids	-	4.6	-	6.0
Crude protein (Nx6.25)	10.9	0.5	8.8	0.5
Ether extract	25.6	1.2	34.6	2.1
Ash	11.4	0.5	14.2	0.9
Crude fibre	9.7	0.5	3.3	0.2
Nitrogen-free extract	42.4	1.9	39.1	2.3

ที่มา : Hwang และคณะ (1987)

ตารางที่ 1.3 ปริมาณแร่ธาตุของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

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

ที่มา : Hwang และคณะ (1987)

ตารางที่ 1.4 คุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

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

ที่มา : Mustar และคณะ (2001)

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหากระบวนการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีวิจัย

2.1 วัสดุ

2.1.1 น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

น้ำเสียที่ใช้ในการศึกษาเป็นน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัททักษิณปาล์ม (2521) จำกัด 331 ถนนธราธิบดี ตำบลท่าข้าม อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี บรรจุในแกลลอนปริมาตร 15 ลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* N7 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำมาเลี้ยงในอาหาร Yeast malt extract agar (YM agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Subculture) เดือนละ 1 ครั้ง

2.1.3 เอนไซม์

เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma) ซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้า

2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

-สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ *S. cerevisiae* (YM agar) (Zhu *et al.,* 2005b)
ซึ่งประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	10.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร

-สูตรอาหารสำหรับเตรียมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เริ่มต้น (Zhu *et al.,* 2005b)
ซึ่งประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร

Glucose	36.0	กรัมต่อลิตร

2.2 อุปกรณ์

-ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Memmert รุ่น BM 700

-หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) Tomy รุ่น SS-325

-เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 SWITZERLAND

-เครื่อง Shaking water bath HELO รุ่น SBD 50 Bio-1

-เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Russel รุ่น 150

-Spectrophotometer Shimazu รุ่น UV-1601 JAPAN

-ตู้อบไอร้อน (Hot air oven)

-เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ Ebulliometer

-อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง

2.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical Grade) ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้ในการวิเคราะห์ค่า Chemical Oxygen Demand (COD), Biochemical Oxygen Demand (BOD), Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) และ Oil and Grease

2.4 วิธีดำเนินการวิจัย

2.4.1 การศึกษาลักษณะของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ทำการวิเคราะห์หาลักษณะของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (บริษัท ทักษิณปาล์ม (2521) จำกัด) โดยนำน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์มาทำการวิเคราะห์ค่า pH, Temperature, Oil and Grease, BOD, COD, Suspended Solids (SS) และ TKN โดยใช้วิธีตาม Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater (APHA AWWA and WEF ,1998) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล (น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์)

2.4.2 การศึกษาระยะเวลาในการเตรียมวัตถุดิบที่เหมาะสม

ก่อนการศึกษาขั้นตอนกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ ต้องทำการศึกษาหาระยะเวลาในการเตรียมวัตถุดิบที่เหมาะสม โดยนำน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาบรรจุในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยแต่ละชุด

การทดลองมีระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที เมื่อผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

2.4.3 การศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบ

ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น คือ ชนิดของสารเคมี ความเข้มข้นของสารเคมี และเวลาที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

2.4.3.1 การศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

ทำการศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก โดยนำน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาบรรจุในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยแต่ละชุดการทดลองมีระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30, 60 และ 90 นาที เมื่อผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric (Schherz and Bonn, 1998) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

2.4.3.2 การศึกษาการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ทำการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยนำน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาบรรจุในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยแต่ละชุดการทดลองมีระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30, 60 และ 90 นาที เมื่อผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric (Schherz and Bonn, 1998) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

2.4.3.3 การศึกษาการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (การต้ม)

ทำการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน โดยนำน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร100 มิลลิลิตร มาบรรจุในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส โดยแต่ละชุดการทดลองมีระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30, 60 และ 90 นาทีแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric (Schherz and Bonn, 1998) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล

รีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

2.4.3.4 การศึกษาการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ร่วมกับความร้อน (การต้ม)

ทำการเลือกวิธีการเตรียมวัตถุดิบที่เหมาะสม โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดจากขั้นตอนข้อ 2.4.3.1 มาทำการเตรียมวัตถุดิบร่วมกับความร้อน (การต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส) ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองมีระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30, 60 และ 90 นาทีแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric (Schherz and Bonn, 1998) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

2.4.3.5 การศึกษาการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร่วมกับความร้อน (การต้ม)

ทำการเลือกวิธีการเตรียมวัตถุดิบที่เหมาะสม โดยที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดจากขั้นตอนข้อ 2.4.3.2 มาทำการเตรียมวัตถุดิบร่วมกับความร้อน (การในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส) ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลอง มีระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30, 60 และ 90 นาทีแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric (Schherz and Bonn, 1998) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

2.4.4 การศึกษาการใช้เอนไซม์

ทำการศึกษาการย่อยสลายน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* จากการศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบข้อ 2.4.3.4-2.4.3.5 โดยทำการเลือกชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด นำมาปรับค่า pH เท่ากับ 5 ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymeic hydrolysis) โดยเติมเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) 6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric (Schherz and Bonn, 1998) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

เอนไซม์ 1 ยูนิต (U) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้น (Cellubiose) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 μmol ในเวลา 1 นาที

2.4.5 การศึกษาการผลิตเอทานอล

จากการศึกษาในขั้นตอนที่ 2.4.4 นำทุกชุดการทดลองมาทำการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวน 10^8 cell/mL โดยมีการปรับค่า pH เท่ากับ 5.0 และนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer เปรียบเทียบกับปริมาณเอทานอลจากเครื่อง Gas Chromatograph (GC) รุ่นHP 6850 และใช้ Detector แบบ Flame Ionization Detector โดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

2.4.6 การตรวจวิเคราะห์และรายงานผล

2.4.6.1 การตรวจวิเคราะห์น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

pH, Temperature, Oil and Grease, BOD, COD, SS, TKN โดยใช้วิธีตาม Standard Methods for The Examination of Water And Wastewater (APHA AWWA and WEF , 1998)

2.4.6.2 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric (Schherz and Bonn, 1998) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549) (ภาคผนวก ก)

2.4.6.3 ปริมาณเอทานอล

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในตัวอย่างน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเครื่อง Ebulliometer (ภาคผนวก ก) และสำหรับชุดการทดลองในขั้นตอนข้อ 2.4.5 จะทำการยืนยันเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โดยมีสภาวะการทดสอบ (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ดังนี้

Intel temperature : 150 °C

Oven temperature : 50 °C, hold 9 minutes

Detecter temperature : 200 °C

Column : HP-INNOWax 30 m × 320 m, 250 μm × 0.25 μm

2.4.6.4 การรายงานผลและสถิติ

ในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบพารามิเตอร์ทุกค่าทำ 3 ซ้ำ สำหรับตัวอย่างนั้น ค่าเฉลี่ย 3 ค่าของผลที่ได้จะต้องมีค่า RPD (Relative Percentage Difference) ไม่เกิน10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการรายงานผลการทดลองทางสถิติ รายงานด้วยการหาค่าเฉลี่ย $\overline{x}$ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของผลการทดลอง และใช้ One-way ANOVAในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดการทดลอง

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 ลักษณะสมบัติน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากเครื่องดีแคนเตอร์

การศึกษางานวิจัยนี้ใช้น้ำเสียจากบริษัททักษิณปาล์ม (2521) จำกัด 331 ถนนธราธิบดี ตำบลท่าข้าม อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งเป็นโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ลักษณะสมบัติน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำเสีย จากผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ดังแสดงในตารางที่ 3.1 พบว่าน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์ มีสีน้ำตาล มีความเป็นกรดสูง (pH เท่ากับ 4.5) เนื่องจากน้ำมันบางส่วนแตกตัวเป็นกรดไขมัน มีค่า BOD (25,373.14 มิลลิกรัมต่อลิตร) ประมาณครึ่งหนึ่งของค่า COD (66,987.20 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยมีความสอดคล้องกับรายงานของพูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533) ซึ่งรายงานว่าน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์ มีค่า BOD ประมาณครึ่งหนึ่งของค่า COD และน้ำเสียมีปริมาณ SS เท่ากับ 36,275 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่า TKN เท่ากับ 133 มิลลิกรัมต่อลิตร และตรวจวัดปริมาณน้ำตาล พบว่ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) เท่ากับ 19.34 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) เท่ากับ 3.12 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล จะเห็นได้ว่าน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์ มีปริมาณน้ำตาลมากกว่ารายงานของพงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ (2552) ซึ่งพบว่ามีน้ำตาลฟรุกโตส (2,580 มิลลิกรัมต่อลิตร) น้ำตาลอะราบิโนส (7,910 มิลลิกรัมต่อลิตร) และน้ำตาลกลูโคส (780 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำทิ้งเป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อและผลิตเอทานอลได้ 0.58 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแต่ละแหล่งมีองค์ประกอบในน้ำเสียที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจากลักษณะของน้ำเสียจากเครื่องดีเคนเตอร์โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง จึงมีความเป็นไปได้ในการนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่สามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่เมื่อสังเกตจะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลในน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์ มีปริมาณน้อย ซึ่งน้ำตาลจะเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเอทานอล ดังนั้นจึงสนใจศึกษาหาวิธีการเตรียมวัตถุดิบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณน้ำตาลเพื่อนำไปใช้ในกระบวนผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ตารางที่ 3.1 ลักษณะของน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

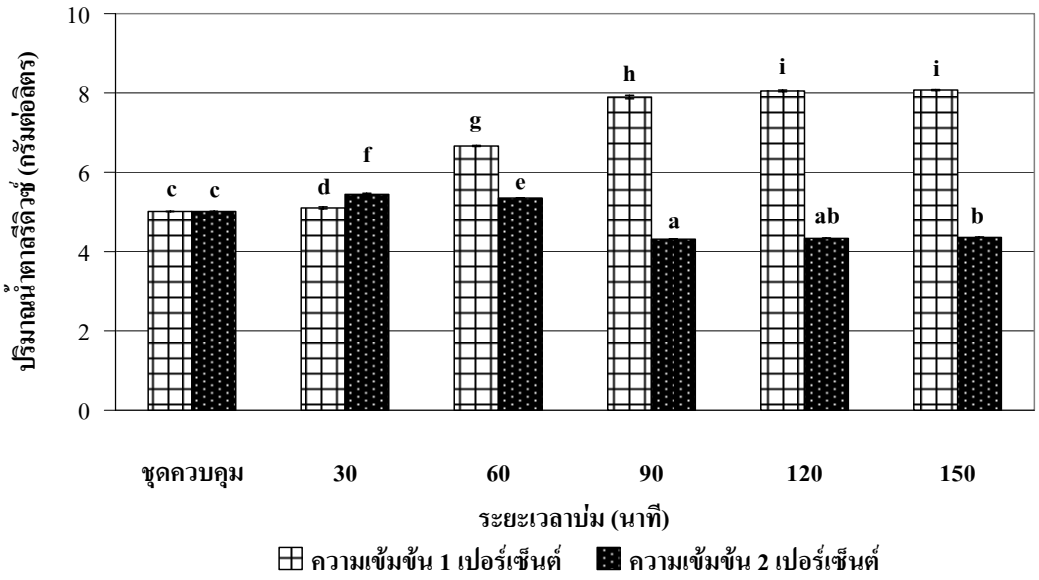
Parameter	Decanter effluent
Color	Brown
pH	4.5
Oil and grease (mg/L)	38,350
BOD (mg/L)	25,373.14
COD (mg/L)	66,987.20
SS (mg/L)	36,275
TKN (mg/L)	133
Total sugar (g/L)	19.34
Reducing sugar (g/L)	3.12

3.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการเตรียมวัตถุดิบที่เหมาะสม

ก่อนการศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบ ได้มีการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ โดยนำน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยแต่ละชุดการทดลองมีระยะเวลาในการบ่ม 30 60, 90, 120 และ 150 นาที โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังการเตรียมวัตถุดิบ เพื่อศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผลการศึกษา (แสดงดังภาพที่ 3.1) พบว่าการเพิ่มระยะเวลาบ่ม ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้น โดยน้ำเสียที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ใช้ระยะเวลาการบ่ม 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.10 ± 0.03, 6.66 ± 0.02, 7.90 ± 0.05, 8.05 ± 0.02 และ 8.08 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบ (ชุดควบคุม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.01 ± 0.00 กรัมต่อลิตร) โดยชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยกรดซัลฟูริกที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 150 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับชุดการทดลองที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 120 นาที และน้ำเสียที่ผ่านการ

เตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาการบ่ม 30, 60, 90 120 และ 150 นาที พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาการบ่มที่ 30 และ 60 นาที ผลที่ได้มีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นกรดซัลฟูริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คือ ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมเท่ากับ 5.45 ± 0.03 และ 5.35 ± 0.01 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.01 ± 0.00 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อใช้ระยะเวลาบ่มเป็น 90 120 และ 150 นาที ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงจากชุดควบคุม โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.31 ± 0.01, 4.33 ± 0.01 และ 4.36 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 90 กับ 120 นาที และชุดการทดลองที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 120 กับ 150 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากชุดการทดลองศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าที่ระยะเวลา 120 และ 150 นาที ไม่ได้ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จึงเลือกที่จะศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบโดยใช้ระยะเวลาในการบ่ม คือ 30, 60 และ 90 นาที



ภาพที่ 3.1 ผลของระยะเวลาในการเตรียมวัตถุดิบต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3 ผลการศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบ

เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัย คือ น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง และเป็นตัวขัดขวางการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นขั้นตอนแรกจึงต้องมีการเตรียมวัตถุดิบเพื่อแยกลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสออกจากโครงสร้าง ลดการเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มการเกิดรูพรุนของวัตถุดิบ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาล และนำน้ำตาลที่ได้มาเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเอทานอล

3.3.1 ผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของกรดต่อประสิทธิภาพของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

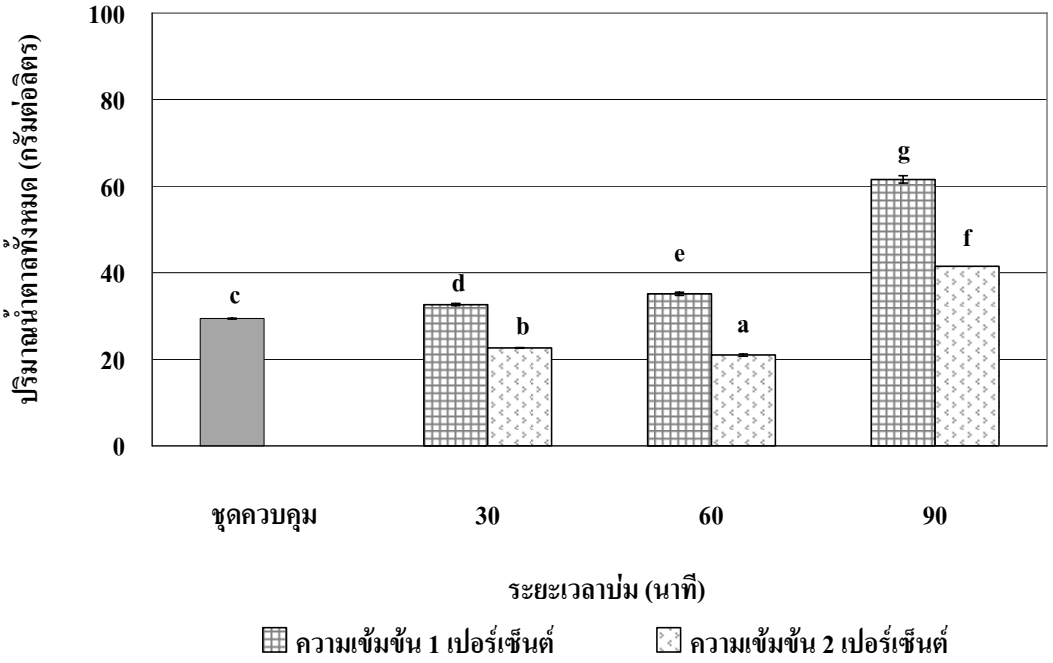
ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางเคมี คือ ปริมาณความเข้มข้นของตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารเคมี ชนิดของสารเคมี อุณหภูมิ และเวลา จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมวัตถุดิบ แม้ว่าการใช้กรดเข้มข้นจะมีประสิทธิภาพต่อการย่อยสลายเซลลูโลส แต่ความเข้มข้นของกรดมีความเป็นพิษ มีฤทธิ์กัดกร่อน และเป็นอันตราย เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย่อยสลายแล้ว ต้องทำการกำจัดหรือนำกรดออกจากระบบ เพื่อให้ระบบนั้นสามารถดำเนินไปได้ (Sivers and Zacchi, 1995)

3.3.1.1 ผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของกรดต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่ละชุดการทดลองใช้ระยะเวลาในการบ่ม 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดก่อนและหลังการเตรียมวัตถุดิบ เพื่อศึกษาหาระยะเวลาและความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ผลการศึกษา (แสดงดังภาพที่ 3.2) ชุดการทดลองที่เตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น โดยน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 32.65±0.23, 35.16 ± 0.37 และ 61.56 ± 0.86 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งทุกชุดการทดลองมีค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 29.42 ± 0.13 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาของกรดจะทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในขององค์ประกอบลิกโนเซลลูโลส ทำให้มีการกำจัดแยกลิกนินออก กรดจึงเข้าไปทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายได้เป็นน้ำตาลที่มีโครงสร้างเล็กลง (Gupta and

Demirbas, 2010) และสำหรับชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที พบว่าผลการศึกษามีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นกรดซัลฟูริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คือ ระยะเวลาการบ่ม 30 และ 60 นาที ไม่ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นจากชุดควบคุม (ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 29.42 ± 0.13 กรัมต่อลิตร) โดยที่ระยะเวลาบ่ม 30 และ 60 นาที ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 22.60 ± 0.73 และ 20.99 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อาจเนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรด ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารเคมี (กรดซัลฟูริก) กับองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในน้ำเสียเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ (มีการกำจัดลิกนินออก เกิดการพองตัวขององค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส ไม่เกิดการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มเป็น 90 นาที พบว่าตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นจากชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 30 และ 60 นาที ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 41.50 ± 0.25 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าทุกชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังภาพที่ 3.2) เนื่องจากระยะเวลาในการบ่ม 90 นาที ทำให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ (กรดซัลฟูริกทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส)

จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่ากรดซัลฟูริกสามารถทำลายพันธะภายในของลิกโนเซลลูโลสที่จับตัวกัน เกิดการย่อยสลายได้เป็นปริมาณน้ำตาลหลายชนิด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดและระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้น พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ได้ในขั้นตอนแรก จะถูกทำปฏิกิริยาต่อไปได้เป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น furfural และ 5-hydroxymethyl furfural (HMF) ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้มีปริมาณลดลง (Saha *et al.,* 2005) โดยพบว่าน้ำเสียที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.2 ผลของระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก(H_2SO_4) ต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

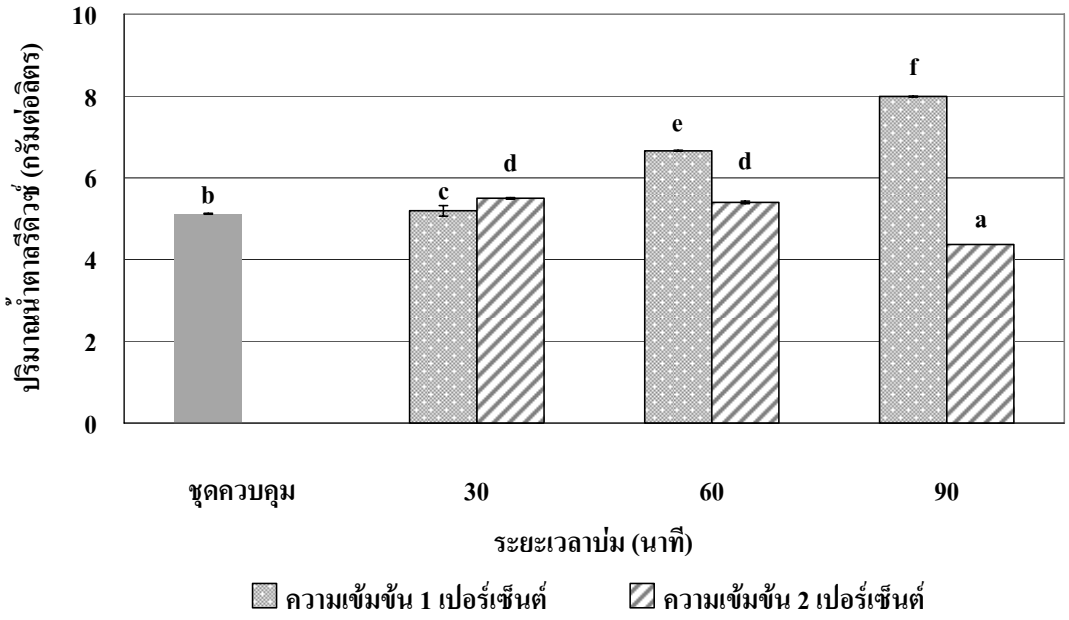
3.3.1.2 ผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของกรดต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ในกระบวนการผลิตเอทานอล มีสารตั้งต้นคือน้ำตาลกลูโคส เป็นวัตถุดิบสำคัญและต้องอาศัยจุลินทรีย์ในการช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยา เพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ คือ เอทานอล (Sun and Cheng, 2002) จากการศึกษาพบว่า มีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณเอทานอลที่จะเกิดขึ้น เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเอทานอลได้ง่ายกว่าน้ำตาลทั้งหมด

ผลการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยการเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ พบว่าการเพิ่มระยะเวลาบ่ม ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้น โดยน้ำเสียที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.19 ±

0.13 6.66 ± 0.01 และ 7.99 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบ (ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.12 ± 0.01 กรัมต่อลิตร) โดยชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยกรดซัลฟูริกที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังภาพที่ 3.3) เมื่อพิจารณาผลการทดลองนี้ มีความสอดคล้องกับการศึกษาการผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันที่ย่อยด้วยกรดโดยใช้การหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยกัลยา อยู่นาน (2546) พบว่าการย่อยกากมันด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-90 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดได้จากการย่อยสลายกากมัน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 0.025 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที

สำหรับชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที พบว่าผลการศึกษามีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อใช้ระยะเวลาบ่ม 30 และ 60 นาที ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม คือ ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.50 ± 0.01 และ 5.46 ± 0.01 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.12 ± 0.01 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มเป็น 90 นาที ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงจากชุดควบคุม โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.37 ± 0.03 กรัมต่อลิตร และพบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังภาพที่ 3.3) จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง อาจเนื่องจากการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียด้วยกรดซัลฟูริก อาจทำให้เกิดการละลายโครงสร้างผลึกเซลลูโลส (Roehr, 2001) และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม อาจทำให้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกถูกย่อยสลายต่อ เกิดปฏิกิริยาที่เปลี่ยนโครงสร้างของน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น องค์ประกอบของ furfural และ 5-hydroxymethyl furfural (HMF) ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ มีปริมาณลดลง (Saha *et al.,* 2005)



ภาพที่ 3.3 ผลของระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ แต่จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกไม่ได้มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากการที่คาร์โบไฮเดรตทำปฏิกิริยากับกรดเข้มข้นทำให้พันธะไกลโคซิดิกถูกทำลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นโมโนแซ็คคาไรด์ และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ทำให้โมโนแซ็คคาร์ไรด์เกิดปฏิกิริยาการดึงน้ำออกจากโมเลกุล โดยการย่อยสลายด้วยกรดได้เป็นผลิตภัณฑ์ คือ สารประกอบ furfural หรืออนุพันธ์ของ furfural ขึ้นอยู่กับชนิดของโมโนแซ็คคาไรด์ที่เป็นสารตั้งต้น (Purwadi *et al.,* 2004) ดังนั้นการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น จากการศึกษาผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกต่อประสิทธิภาพของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ จะเห็นได้ว่า ระยะเวลาในการบ่ม มีผลต่อปริมาณน้ำตาล

ทั้งสองชนิด แต่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกไม่ได้มีผลต่อปริมาณน้ำตาลทั้งสองชนิด ซึ่งน้ำเสียที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งสองชนิดสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

3.3.2 ผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของด่างต่อประสิทธิภาพของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การเตรียมวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยด่าง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนิน และกลไกที่เกิดขึ้น ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของพันธะเอสเทอร์ระหว่างโมเลกุลที่เชื่อมไซแลนกับสารประกอบอื่นๆ เช่น ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส จำนวนรูพรุนภายในโมเลกุลของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการสลายพันธะต่างๆ ที่เชื่อมกันอยู่ภายในโมเลกุล (Sun and Cheng, 2002 ; McMillan 1994) การปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยด่างที่เจือจางทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้าง และทำให้เกิดการกำจัดลิกนินออก (Sun and Cheng, 2002 ; Fan *et al*., 1987)

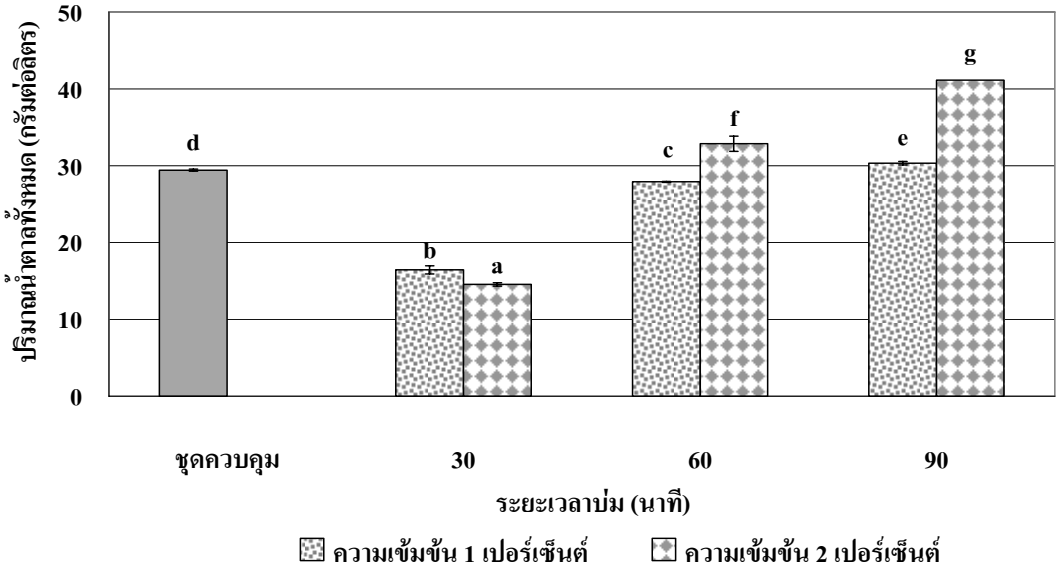
3.3.2.1 ผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของด่างต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยด่าง (โซเดียมไฮดรอกไซด์) ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 30, 60 และ 90 นาที ผลการศึกษาพบว่า น้ำเสียที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 30 และ 60 นาที ไม่ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม โดยตัวอย่างน้ำเสีย มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 16.44 ± 0.53 และ 27.90 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงจากชุดควบคุมที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 29.42 ± 0.13 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มเป็น 90 นาที พบว่าตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 30.32 ± 0.24 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าระยะเวลาบ่มอื่นๆ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังภาพที่ 3.4)

สำหรับชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 พบว่าผลการศึกษาเป็นไปเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร คือ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น แต่ชุดการทดลองที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ไม่สามารถทำให้ตัวอย่างน้ำเสีย

มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม (มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 29.42 ± 0.13 กรัมต่อลิตร) โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 14.56 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 60 และ 90 นาที พบว่าตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 32.86 ± 0.02 และ 41.13 ± 1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (แสดงดังภาพที่ 3.4) ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นจากชุดการทดลองของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ชุดควบคุม) และพบว่าทุกชุดการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จาก 1 เป็น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น(แสดงดังภาพที่ 3.4) พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้ระยะเวลาบ่มนานขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Punnapayak และ Hoffmann (1994) โดยทำการปรับสภาพหญ้าแฝกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอัตราส่วนโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อตัวอย่างพืช เท่ากับ 2 :1 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยก่อนการปรับสภาพวัตถุดิบมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 34.4 34.0 และ 16.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าสัดส่วนเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 55.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลง เป็น 15.2 และ 11.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาที่สารละลายเดือด มีผลต่อความสามารถในการทำปฏิกิริยาของโซเดียมไฮดรอกไซด์กับองค์ประกอบในวัตถุดิบ (เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส) ซึ่งถ้าใช้ปริมาณความเข้มข้นมากขึ้น และระยะเวลาเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างกลายเป็นหน่วยที่มีขนาดเล็กลง



ภาพที่ 3.4 ผลของระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของด่าง (NaoH) ต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

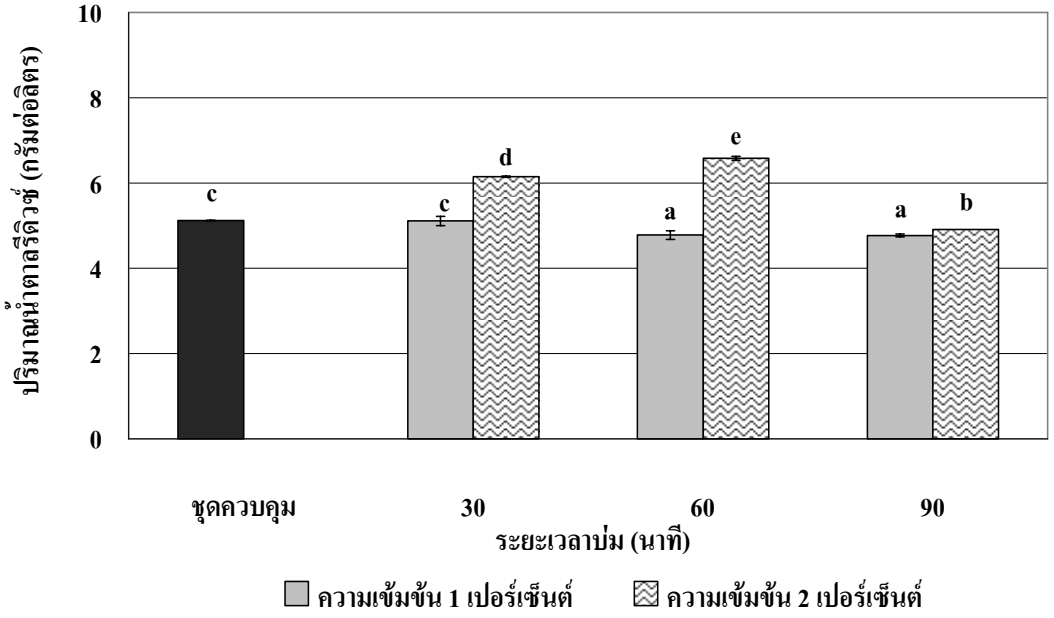
หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.2 ผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของด่างต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 30, 60 และ 90 นาที พบว่าตัวอย่างน้ำเสียที่เตรียมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่ม ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง โดยตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.11± 0.11, 4.78 ± 0.10 และ 4.77 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ชุดการทดลองที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 60 และ 90 นาที พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียที่ใช้ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงจากชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบ (ชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.12 ± 0.01 กรัมต่อลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 3.5

สำหรับชุดการทดลองที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที พบว่าผลการศึกษาไม่เป็นเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร คือ ที่ระยะเวลาบ่ม 30 และ 60 นาที ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมเป็น 6.15 ± 0.03 และ 6.58 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มเป็น 90 นาที พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเท่ากับ 4.91 ± 0.04 กรัมต่อลิตร ซึ่งชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.12 ± 0.01 (แสดงดังภาพที่ 3.5) ดังนั้นตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น และมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จาก 1 เป็น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้น อาจเนื่องจากการกำจัดลิกนินและทำลายพันธะของโมเลกุลน้ำตาล ทำให้เซลลูโลสมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและเพิ่มพื้นผิว ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายของเซลลูโลสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ส่งผลให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น (Gapta and Demirbas, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับการเตรียมวัตถุดิบจากลำต้นของฝ้ายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ทำให้มีการกำจัดลิกนินออก เพื่อลดโครงสร้างผลึกและส่งผลให้เกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวปริมาณเพิ่มขึ้น (Silverstein *et al.,* 2007)



ภาพที่ 3.5 ผลของระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของด่าง (NaoH) ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

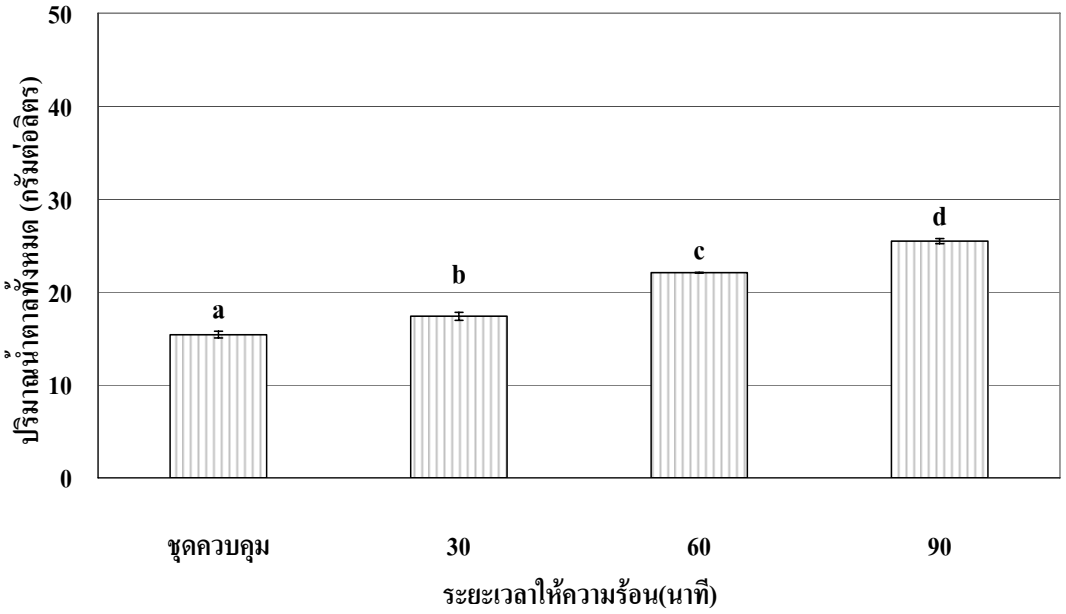
หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาผลของระยะเวลาบ่มและความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อประสิทธิภาพของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการบ่ม มีผลต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แต่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการเตรียมวัตถุดิบจากหญ้า castal bermuda ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5-3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 15-90 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์เซลลูไบเอส 76.4 FPU/mL และ 283.1 CBU/mL โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมวัตถุดิบ คือ บ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 71 เปอร์เซ็นต์ (Wang *et.al.,* 2009)

3.3.3 ผลของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (การต้ม) ต่อปริมาณน้ำตาลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส พบว่าวิธีการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน เช่น การต้ม จะช่วยลดการเป็นผลึกของเซลลูโลสและทำให้เกิดการเพิ่มรูพรุนของวัตถุดิบ นอกจากนี้พบว่าในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีสารประกอบที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound), furfural และ Hydroxymethyl furfural (HMF) (Klinke *et al.,* 2003) เนื่องจากในกระบวนการผลิตมีการใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งการต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือด ช่วยทำลายสารพิษเหล่านี้ได้ และหยุดปฏิกิริยาไลโปไลซิสของการเกิดกรดและไขมันอิสระจากน้ำเสียในกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม จากผลการศึกษานี้จึงนำน้ำเสียมาผ่านกระบวนการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ระยะเวลาต่างๆ คือ 30, 60 และ 90 นาที พบว่าตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น คือ ปริมาณทั้งหมดเท่ากับ 17.39 ± 0.43 22.09 ± 0.02 และ 25.48 ± 0.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำเสียที่ไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (ชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 15.42 ± 0.35 กรัมต่อลิตร) และทุกชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วย ความร้อน (การต้ม) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุด (ดังแสดงในภาพที่ 3.6)



ภาพที่ 3.6 ผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (การต้ม) จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

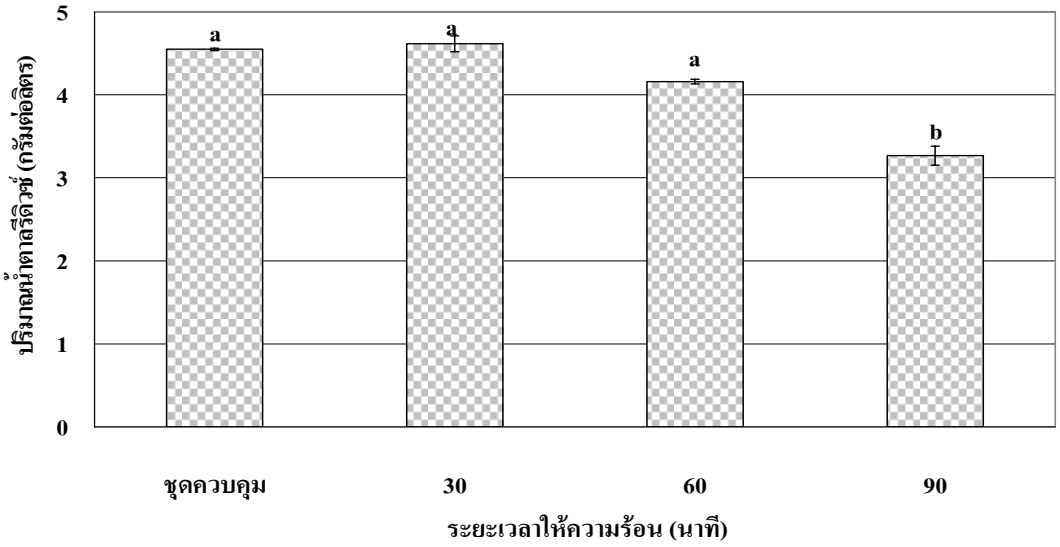
หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างน้ำเสียที่ให้ความร้อน (การต้ม) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ระยะเวลาต่างๆ คือ 30, 60 และ 90 นาที พบว่าที่ระยะเวลาการบ่ม 30 นาที ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด มีค่าเท่ากับ 4.61 ± 0.10 กรัมต่อลิตร (ดังแสดงในภาพที่ 3.7) ซึ่งมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าตัวอย่างน้ำเสียที่ไม่ให้ความร้อน (มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.55 ± 0.02) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลง ซึ่งผลการทดลองจากการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยความร้อน (การต้ม) เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการให้ความร้อน มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง อาจเนื่องมาจากกลไกการสลายตัวด้วยความร้อนของน้ำตาลที่เกิดขึ้นได้หลายกระบวนการ โดยเกิดจากการที่น้ำตาลเฮกโซส และน้ำตาลเพนโทส สูญเสียน้ำและเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ซึ่งชนิดของน้ำตาลที่ให้ความร้อนมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากน้ำตาลแต่ละชนิดมีจุดหลอมเหลว (Melting point)ที่แตกต่างกัน จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างกัน มี 2 ปฏิกิริยาที่สำคัญ คือ

1. ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เป็นปฏิกิริยาที่น้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งมีหมู่ที่เป็นอัลดีไฮด์ และคีโตน ทำปฏิกิริยากับสารประกอบไนโตรเจน เช่น เอมีน โปรตีน ทำให้เกิดสารสีน้ำตาลที่เรียกว่า เมลานอยดิน (melanoidins)

2. ปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน (Caramelization reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการให้ความร้อนแก่น้ำตาลในสภาวะที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจน เกี่ยวข้องกับการสูญเสียน้ำ การย่อยสลาย และการเกิดพอลิเมอร์ (พิศมัย ศรีชาเยช, 2547)

ดังนั้นจากปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยานี้ทำให้ปริมาณน้ำตาลได้ที่จากการย่อยสลายเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ทำให้น้ำตาลที่ได้มีปริมาณลดลง



ภาพที่ 3.7 ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (การต้ม) จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

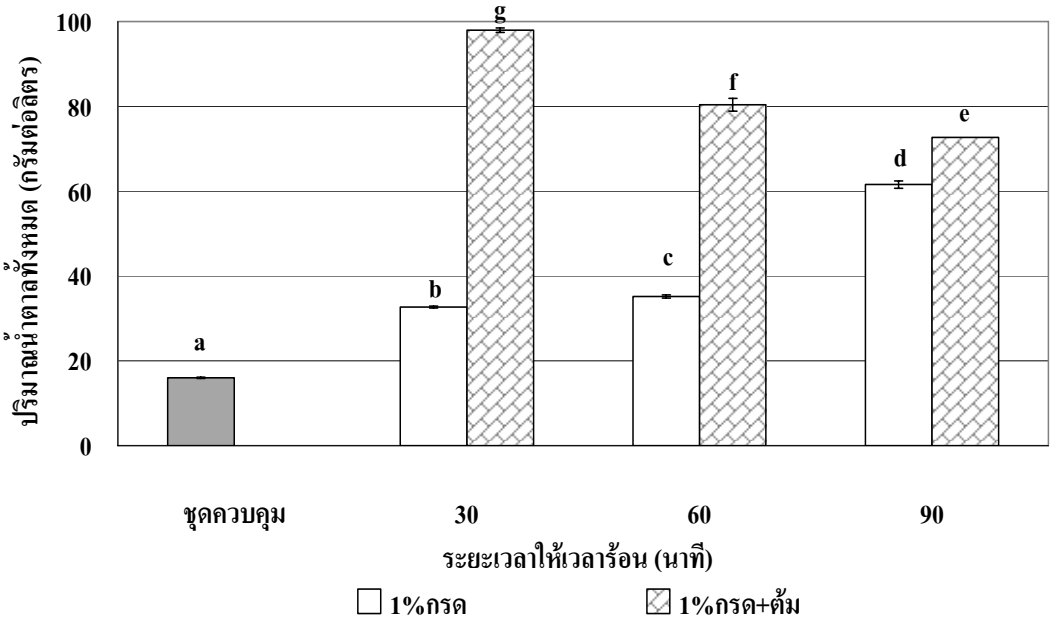
หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

แต่เมื่อพิจารณางานวิจัยของกัลยา อยู่นาน (2546) พบว่าผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างกับผลการทดลองข้างต้น ซึ่งทำการศึกษาการปรับสภาพวัสดุหมักที่เป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว 4 ชนิด ได้แก่ แกลบ ปลายข้าว รำละเอียด และรำหยาบ โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าการปรับสภาพด้วยความร้อน ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น โดยก่อนปรับสภาพด้วยความร้อนมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.44, 5.78, 4.55 และ 6.21 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ และหลังการปรับสภาพด้วยความร้อน พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.70, 20.95, 20.64 และ 8.98 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก และงานวิจัยของทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์ (2545) ที่ศึกษาการย่อยสลายเศษอาหารด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียว บ่มที่อุณหภูมิ 100

องศาเซลเซียส เวลา 0-90 นาที พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงจะขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป โดยความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่อัตราส่วนของเศษอาหารต่อน้ำเท่ากับ 6 ต่อ 10 สูงสุด ที่เวลา 80 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.98 กรัมต่อลิตร

3.3.4 ผลของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อน (การต้ม) ต่อปริมาณน้ำตาลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

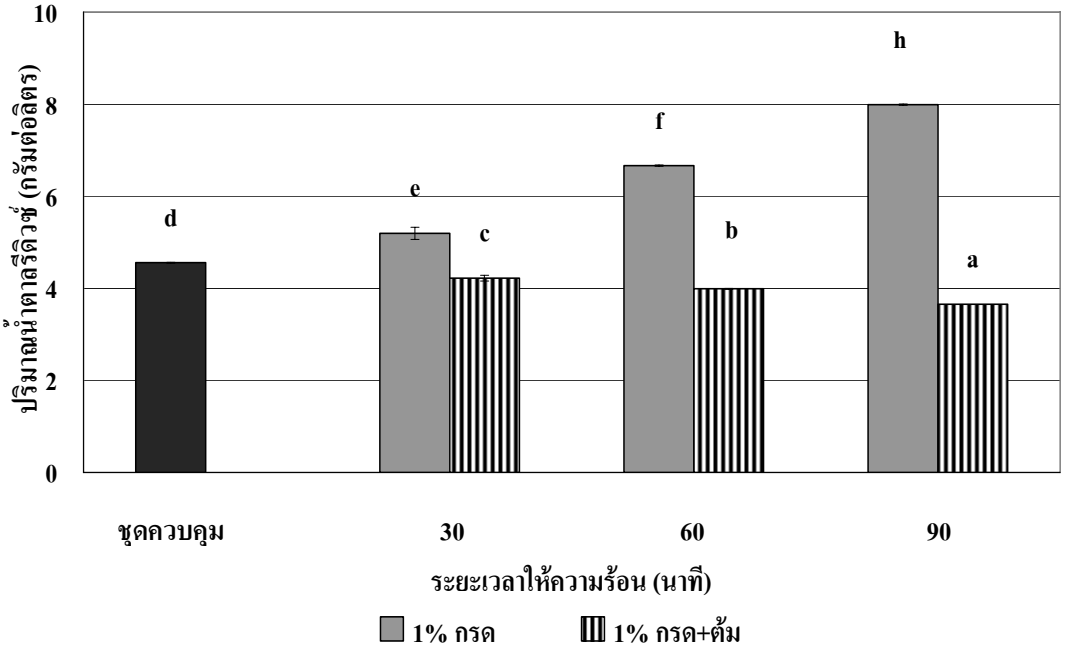
จากผลการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที พบว่าความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 61.56 ± 0.86 และ 7.99 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลดังกล่าวจึงทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไปด้วยการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อน (การต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาต่างๆ คือ 30 60 และ 90 นาที พบว่าน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกเพียงอย่างเดียว โดยชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ร่วมกับความร้อน(การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 97.97 ± 4.70 กรัมต่อลิตร (แสดงดังภาพที่ 3.8) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อน (การต้ม) และความร้อน (การต้ม) เพียงอย่างเดียว (ดังแสดงภาพที่ 3.6) พบว่าการเตรียมวัตถุดิบที่ใช้กรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อนให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าชุดการทอลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 3.8 ผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรด ซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับความร้อน (การต้ม) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ผลที่ได้มีความขัดแย้งกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งพบว่าน้ำเสียที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่ระยะเวลา 90 นาที ร่วมกับการให้ความร้อน (การต้ม) ทำให้ตัวอย่างน้ำเสีย มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงจากการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกเพียงอย่างเดียว โดยชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ที่ระยะเวลาบ่ม 30 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.22 ± 0.05 กรัมต่อลิตร (แสดงดังภาพที่ 3.9)



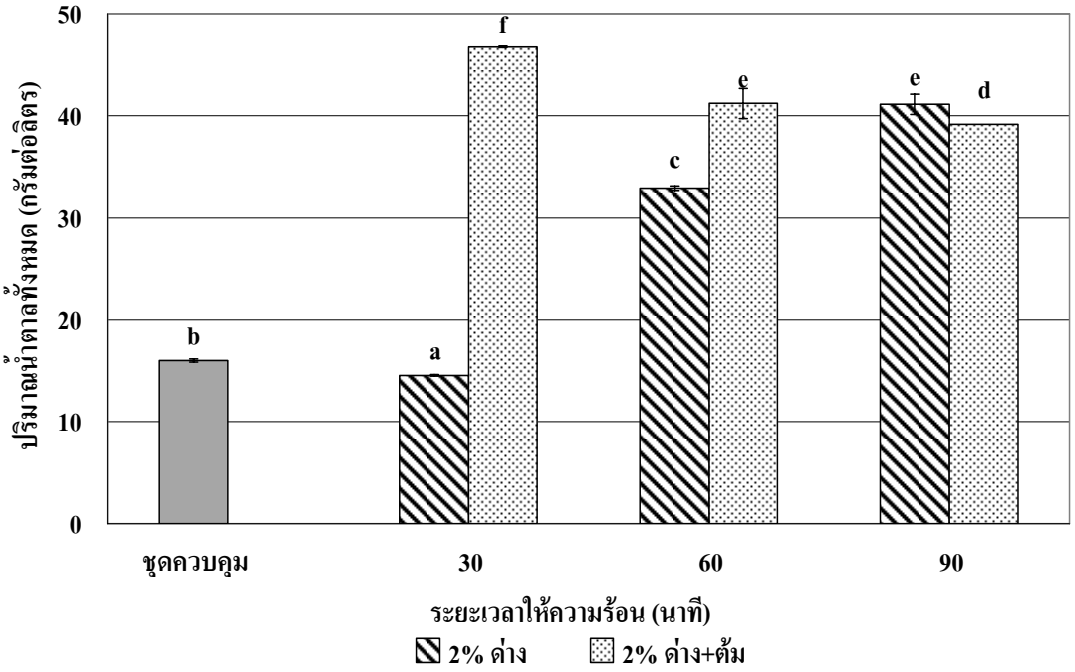
ภาพที่ 3.9 ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรด ซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับความร้อน (การต้ม) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยการใช้ความร้อน(การต้ม) เพียงอย่างเดียว (แสดงดังภาพที่ 3.7) พบว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียว (มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 4.61 ± 0.10 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดร่วมกับความร้อน อาจเนื่องจากการเตรียมวัตถุดิบด้วยการใช้ความร้อนน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นโมโนแซคคาไรด์ชนิดอัลโดสจะแสดงคุณสมบัติในการเป็นสารรีดิวซ์ คือ ให้อิเล็คตรอนได้ อัลโดสที่ละลายอยู่ในน้ำ วงแหวนจะเปิดออก เพื่อเปลี่ยนจากอะโนเมอร์หนึ่งไปเป็นอีกอะโนเมอร์หนึ่งโดยผ่านตัวกลางที่อยู่ในรูปโซ่เปิดที่มีหมู่อัลดีไฮด์อิสระ จึงทำให้สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย จึงทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น (มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, 2542)

3.3.5 ผลของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อนต่อปริมาณน้ำตาลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากผลการทดลองการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที พบว่าชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 60 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.58 ± 0.02 กรัมต่อลิตร จากผลดังกล่าวจึงทำการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบในขั้นตอนต่อไปด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลาต่างๆ คือ 30, 60 และ 90 นาที พบว่าน้ำเสียมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียว โดยชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที พบว่ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองอื่น และมีค่าเท่ากับ 46.80 ± 0.22 กรัมต่อลิตร (แสดงดังภาพที่ 3.10) ซึ่งจากผลการทดลองเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียว พบว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน (การต้ม) มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว อาจเนื่องมาจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำปฏิริยาเซลลูโลสในน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มทำให้เกิดการย่อยสลายเป็นน้ำตาลได้ดีกว่าการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว

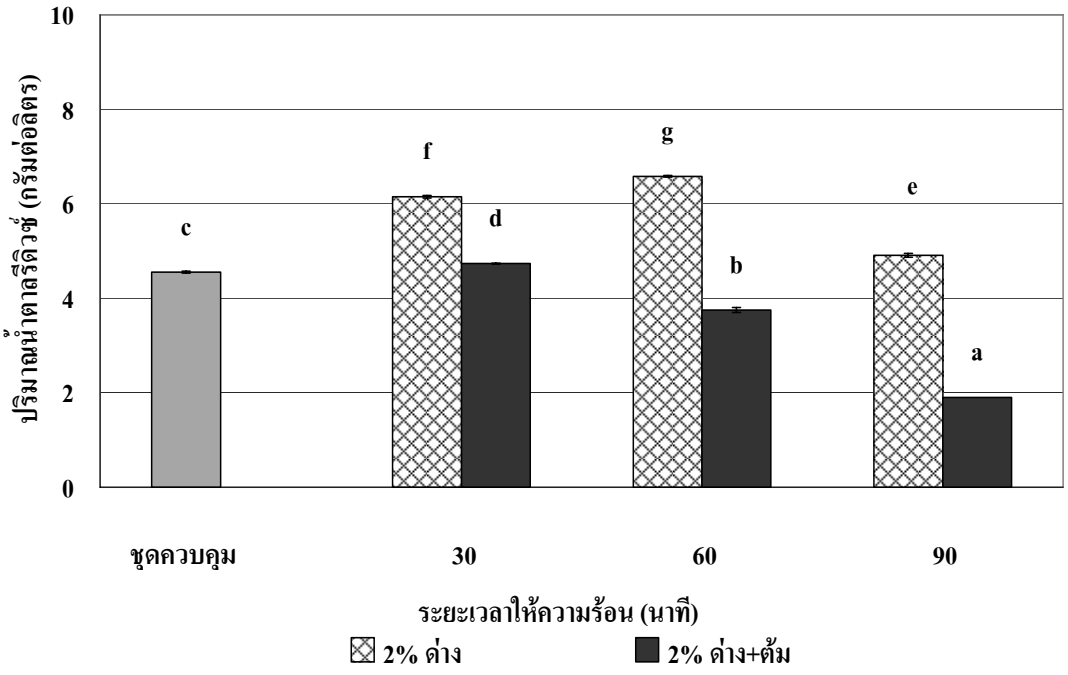


ภาพที่ 3.10 ผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยปริมาตรเปรียบเทียบกับการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร่วมกับความร้อน (การต้ม)

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 3.11 จะเห็นได้ว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน(การต้ม) เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการให้ความร้อน ทำให้ตัวอย่างน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง โดยชุดการทดลองที่มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ ชุดการทดลองที่มีการให้ความร้อนที่ระยะเวลา 30 นาที ซึ่งมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.73 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบ่มทำให้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และความร้อน มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยตรงกับเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสในน้ำเสีย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นน้ำตาล นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว พบว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการเตรียมวัตถุดิบด้วยการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการเตรียมวัตถุดิบของน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมัน

ปาล์ม ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้พันธะเอสเตอร์ระหว่างลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสเกิดการแตกตัว (Gáspár *et al.,* 2007) และเมื่อใช้ความร้อนร่วมทำให้เกิดการสลายพันธะได้ดีขึ้น จากผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhu และคณะ (2005) ซึ่งได้ทำการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบจากซังข้าวด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (เตาอบไมโครเวฟ) ร่วมกับการใช้สารละลายด่าง (โซเดียมไฮดรอกไซด์) เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายด่างเพียงอย่างเดียว พบว่าการเตรียมวัตถุดิบแบบร่วมทำให้เกิดการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงกว่า และให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้ด่างเพียงอย่างเดียว โดยผลการทดลองดังกล่าวของ Zhu และคณะ (2005) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 24.8 ± 0.7 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ความถี่ 700 วัตต์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร



ภาพที่ 3.11 ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยปริมาตรเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร่วมกับความร้อน (การต้ม)

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.4 ผลการศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

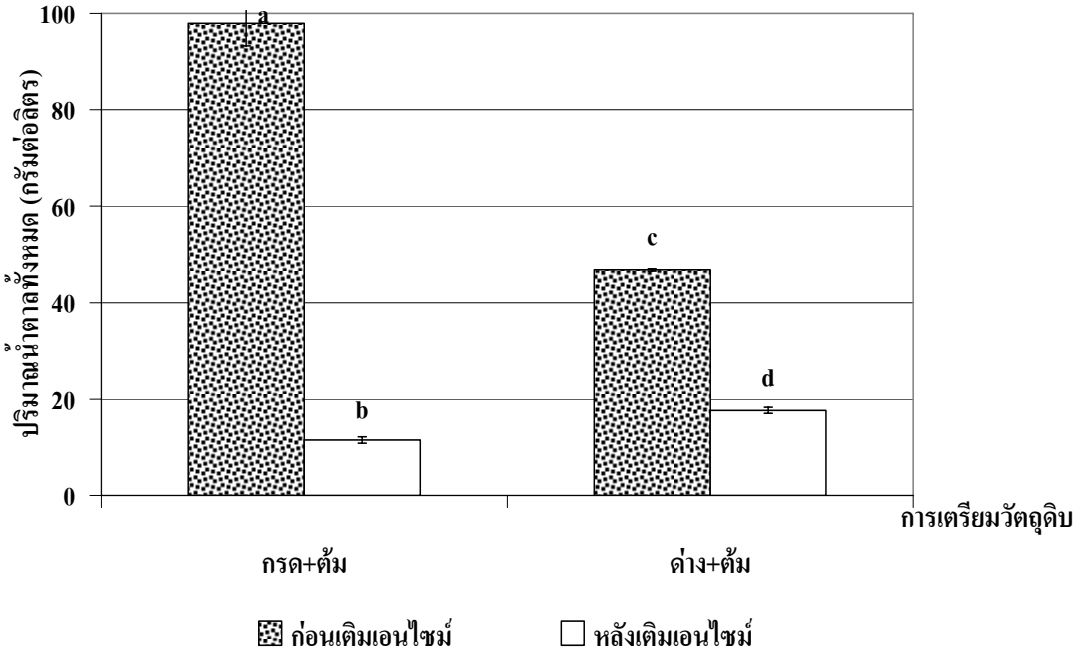
เมื่อทำการเตรียมวัตถุดิบจากชีวมวล ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีความทนต่อการย่อยสลาย จะต้องมีการแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดการเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มการเป็นรูพรุนของวัตถุดิบ เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ดี (Sun and Cheng, 2002) ซึ่งการเตรียมวัตถุดิบและการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำตาล สำหรับกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเมื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ น้ำตาลกลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์จะได้ น้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลส เมื่อทำการย่อยสลายจะได้น้ำตาลหลายชนิดขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในส่วนประกอบเฮมิเซลลูโลส (น้ำตาลไซโลส อะราบิโนส กลูโคส แมนโนส และกาแลคโตส)

สำหรับงานวิจัยนี้ น้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่มีองค์ประกอบ คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งองค์ประกอบนี้มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นเมื่อผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบแล้ว นำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้ปริมาณกลูโคส ในวัตถุดิบที่เป็นส่วนของเซลลูโลสจะมีส่วนของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-Glucosidic linkage (Harmsen *et al.,* 2010) เพราะฉะนั้นในการย่อยสลายเซลลูโลสจึงต้องใช้เอนไซม์เซลลูเลส เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาล ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล

3.4.1 ผลของการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ

จากการศึกษาการไฮโดรไลซีสของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที (ชุดการทดลองที่ 1) และการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 60 นาทีร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที (ชุดการทดลองที่ 2) แล้วทำการศึกษาการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* 6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดการทดลองที่ 1 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดก่อนและหลังเติมเอนไซม์ เท่ากับ 97.97 ± 4.70 และ 11.56 ± 0.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับชุดการทดลองที่ 2 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดก่อนและหลังเติมเอนไซม์เท่ากับ 48.80 ±0.20 และ 17.71 ± 0.61 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าตัวอย่างน้ำเสียทั้งสองชุดการทดลอง มีค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงหลังจากที่เติมเอนไซม์เซลลูเลส (ดังแสดงในภาพที่ 3.12) เนื่องจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำตาลที่มีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ซึ่งโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสที่ภายในประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน อาจจะ

ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสประกอบกันเป็นเปลือกหุ้มรอบๆตัวเซลลูโลสอยู่ ดังนั้นการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์จะแยกเอาส่วนลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก จึงเหลือเซลลูโลสที่เกิดจากน้ำตาลหลายชนิดต่อกัน เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยสลายเซลลูโลส เอนไซม์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ทำงานได้ดี จะทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างน้ำตาล น้ำตาลที่ได้จึงมีปริมาณลดลง ซึ่งผลการทดลองข้างต้นมีความสอดคล้องกับผลการทดลองของวิไลวรรณ ลีนะกุล (2552) ที่ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นไม้ไผ่โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไปย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาล มีค่าลดลงหลังจากใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบภายในของผนังเซลล์พืช

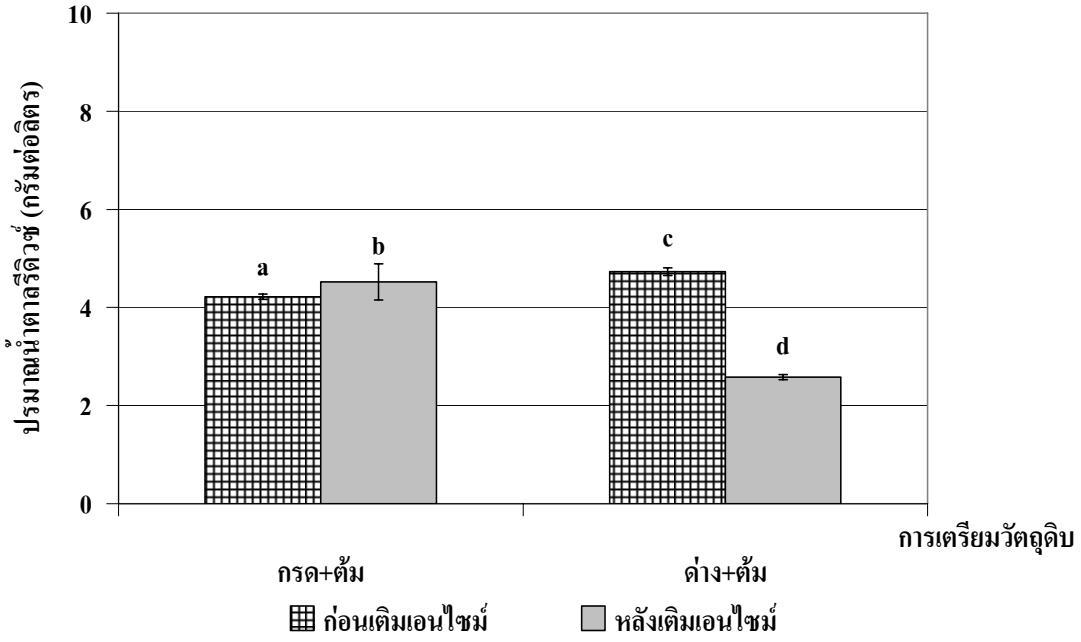


ภาพที่ 3.12 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับการให้ความร้อนและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อน

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.4.2 ผลของการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ

จากการศึกษาการ Hydrolysis (การย่อยสลาย) ของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ที่ระยะเวลา 30 นาที (ชุดการทดลองที่ 1) และการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ที่ระยะเวลา 30 นาที (ชุดการทดลองที่ 2) แล้วทำการศึกษาการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* โดยชุดการทดลองที่ 1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังเติมเอนไซม์ เท่ากับ 4.22 ± 0.13 และ 4.52 ± 0.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับชุดการทดลองที่ 2 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังเติมเอนไซม์เท่ากับ 4.73 ±0.08 และ 2.58 ± 0.05 กรัมต่อลิตร (แสดงดังภาพที่ 3.13) ซึ่งชุดการทดลองทั้งสองชุดการทดลองมีความแตกต่างกัน โดยชุดการทดลองที่ 1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากการเติมเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนชุดการทดลองที่ 2 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงหลังจากเติมเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องมาจากวัตถุดิบประเภทลิกเซลลูโลสที่การเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก กรดซัลฟูริกจะไปแยกส่วนของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก เหลือส่วนที่เป็นเซลลูโลส เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยสลายเซลลูโลสจะได้น้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีหน่วยเล็กที่สุด ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เพิ่มขึ้นหลังจากการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ส่วนการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีการแยกลิกนินออกจากโครงสร้าง เหลือส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสจับกับเซลลูโลส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยสลาย ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเซลลูโลสได้ แต่ไปทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในขั้นตอนแรก ดังนั้นปริมาณน้ำตาลที่ได้จึงลดลงและอาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษ เช่น furfural และ 5-hydroxymethyl furfural (HMF) โดยส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Gupta and Demirbas, 2010) ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และไมโครเวฟ (700W) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงน้อยกว่า 5 กรัมต่อลิตร (น้ำตาลรีดิวซ์ก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 34.9 ± 0.4 กรัมต่อลิตร) แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเตรียมวัตถุดิบจะเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Zhu *et. al.,* 2005a)



ภาพที่ 3.13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับการให้ความร้อนและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อน

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.5 ผลการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอล

ขั้นตอนการหมักเอทานอล เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอล ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน โดยทั่วไปการหมักแบบครั้งคราว (batch fermentation) จะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณ 8-12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งตามทฤษฎียีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้ 51.1 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความร้อนเกิดขึ้นด้วย แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาล 95 เปอร์เซ็นต์ จะเปลี่ยนไปเป็น เอทานอล ส่วนน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ที่เหลือ ยีสต์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อสร้างพลังงานและบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด (by product) เช่น อะซีตัลดีไฮด์ กรดน้ำส้ม กลีเซอรอล กรดแลคติกและฟิวเฟอรัลเล็กน้อย (Zoecklein *et al.,* 1995)

การนำวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินมาผลิตเอทานอล ต้องมีการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และนำมาหมักให้ได้เอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอล คือ สายพันธุ์จุลินทรีย์ ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้น ปริมาณเอทานอล สารอาหาร (ไนโตรเจน) และสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ pHเริ่มต้นของอาหาร ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

3.5.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเขย่าและไม่เขย่าของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

ในกระบวนการผลิตเอทานอล อัตราการเขย่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีลักษณะของน้ำเสียที่มีความหนืด ทำให้การสัมผัสของเชื้อยีสต์และน้ำเสียเป็นไปได้ยาก การเขย่าที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะทำให้เชื้อยีสต์สัมผัสกับน้ำเสียซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารได้มากขึ้น ส่งผลต่อการผลิตเอทานอลให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเขย่าและไม่เขย่าต่อกระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ของน้ำเสียเท่ากับ 5.0 เติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ชุดการทดลองที่ 1) และไม่เขย่า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ชุดการทดลองที่ 2) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างน้ำเสียมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล และ pH หลังการหมัก

ผลการทดลองจากตารางที่ 3.2 พบว่าน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 5.12 กรัมต่อลิตร นำไปเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้เขย่า เนื่องจากการเขย่ามีความสำคัญต่อการสัมผัสระหว่างยีสต์และตัวอย่างน้ำเสีย ทำให้เกิดการผสมที่ดี ซึ่งอาจส่งผลต่อการย่อยสลายและการเจริญของจุลินทรีย์ ส่วนชุดการทดลองที่ไม่ได้เขย่า ทำให้เกิดการผสมที่ไม่ดี โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีปริมาณเท่ากับ 0.31 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรหรือ 2.45 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.96 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.32 และชุดการทดลองที่ 2 เอทานอลที่ผลิตได้มีปริมาณเท่ากับ 0.23 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรหรือ 1.81 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.94 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.50 เมื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลหลังการหมักเอทานอล พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง อาจเนื่องมาจากยีสต์ *S. cerevisiae* นำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ เช่น เอทานอล และเมื่อพิจารณา pH หลังการหมัก พบว่าชุดการทดลองทั้ง 2 มีค่า pH ลดลงหลังจากหมักเอทานอลด้วยยีสต์ ซึ่งจากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง นอกจากยีสต์จะใช้

น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตแล้ว ยังสร้างผลิตภัณฑ์พลอยได้ เช่น กรดซักซิเนตเกิดขึ้นด้วย (ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551)

สำหรับการผลิตเอทานอลจากการทดลอง เมื่อนำมาคำนวณค่าผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) พบว่าการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.49 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ และชุดการทดลองที่ไม่เขย่า มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์

ตารางที่ 3.2 การผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที และไม่เขย่า เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีการ	น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (g/L)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป (g/L)	pH หลังการหมัก	เอทานอล		
				(g/L)	% (v/v)	Yp/s (g_p/g_s)
การเขย่า (100 รอบต่อนาที)	**5.12**	**4.96**	**4.32**	**2.45**	**0.31**	**0.49**
ไม่เขย่า	**5.12**	**3.94**	**4.50**	**1.81**	**0.23**	**0.46**

3.5.2 ผลการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

การผลิตเอทานอลที่ดีจะต้องใช้ระยะเวลาในกระบวนการหมักสั้นและให้ผลผลิตเอทานอลสูง ซึ่งระยะเวลาการหมักขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น ชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะแวดล้อมต่างๆ งานวิจัยนี้จึงทำการการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* โดยทำการหมักน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เป็นระยะเวลา คือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งใช้น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล และ pH หลังการหมัก

ผลจากการทดลองจากตารางที่ 3.3 พบว่าน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรหรือ 2.05 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.23 กรัมต่อลิตร และมีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.67 สำหรับระยะเวลาบ่ม 24 และ 72 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.16 และ 0.18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรหรือ 1.26 และ 1.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.13 และ 3.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.62 และ 4.31 และเมื่อพิจารณาผลของเอทานอลจากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อทำการบ่มที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้มีปริมาณมากกว่าระยะเวลาบ่ม 24 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล เพราะที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่ยีสต์เจริญเติบโตและมีการผลิตเอทานอล เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม ทำให้น้ำตาลซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเอทานอลมีปริมาณลดลง ส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าลดลง และนอกจากนี้ปริมาณเอทานอลอาจจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Tahir *et al.,* 2010)

โดยมีความขัดแย้งกับงานวิจัยของ Kongkiattikajorn และคณะ (2007) พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมักนานขึ้น (วันที่ 4-5) ทำให้มีปริมาณเอทานอลสูงสุด เนื่องจากว่าระบบในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ จะเอื้ออำนวยต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ ทั้งนี้ปริมาณออกซิเจนในระบบมีอิทธิพลอย่างมากต่อการผลิตเอทานอล เมื่อมีการเติมอากาศมากทำให้เกิด Pasteur effect คือ ทำให้เกิดการออกซิเดชันของกลูโคสอย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้ชีวมวลเพิ่มขึ้นในขณะที่การผลิตเอทานอลลดลง

ตารางที่ 3.3 การผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาบ่มต่างๆ คือ 24 48 และ 72 ชั่วโมง

ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (g/L)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป (g/L)	pH หลังการหมัก	เอทานอล		
				(g/L)	%(v/v)	Yp/s (g_p/g_s)
24	5.32	3.13	4.62	1.26	0.16	0.40
48	5.32	4.23	3.67	2.05	0.26	0.48
72	5.32	3.98	4.31	1.42	0.18	0.36

3.5.3 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยยีสต์ *S. cerevisiae*

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร แบ่งชุดการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบ

2. น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลา 90 นาที และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ระยะเวลา 60 นาที

3. น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบแบบร่วม ระหว่างสารเคมี (กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลา 90 นาที และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 60 นาที) และความร้อน (การต้ม) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที

4. น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบแบบร่วม และนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei*

นำชุดการทดลอง 4 กลุ่ม มาผ่านกระบวนการหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิตร นำไปหมักด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล และ pH หลังหมัก

ผลการทดลองจากตารางที่ 3.4 โดยชุดการทดลอง 1 น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบและการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองอื่น คือ 0.21 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรหรือ 1.66 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 5.56 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปเท่ากับ 3.56 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.47 ส่วนชุดการทดลองที่ 2 น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลา 90 นาที และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ระยะเวลา 60 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น) เท่ากับ 7.99 และ 6.58 กรัมต่อลิตร พบว่าผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.13 และ 0.11 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรหรือ 1.02 และ 0.87 กรัมต่อลิตร และมีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.52 และ 4.63 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ 3 น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบแบบร่วม (กรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อนและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น) เท่ากับ 8.12 และ 6.64 กรัมต่อลิตร พบว่าผลิต

เอทานอลได้เท่ากับ 0.17 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรหรือ 1.42 และ 1.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.38 และ 3.62 กรัมต่อลิตร และมีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.23 และ 4.43 ตามลำดับ จากชุดการทดลองที่ 3 จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้การเตรียมวัตถุดิบมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อมีการใช้ความร้อนร่วมด้วย อาจเกิดจากความร้อนที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ ช่วยในการฆ่าเชื้อและลดการปนเปื้อนในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และเมื่อนำมาผลิตเอทานอล พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้น้อยกว่าชุดการทดลองที่ 1 อาจจะเป็นเพราะน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากเตรียมวัตถุดิบเกิดปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก เปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น furfural และ 5-hydroxymethyl furfural (HMF) ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลดลงและสารเคมี (กรดซัลฟูริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์) ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสม มีผลยับยั้งการผลิตเอทานอของยีสต์ *S. cerevisiae* ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลงจากชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 3 น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบแบบร่วม (กรดซัลฟูริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน) และนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.07 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรหรือ 0.55 และ 0.71 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.82 และ 2.34 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.14 และ 4.54 โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง (น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นน้อย) ทำให้การผลิตเอทานอลที่ได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1 และ 2

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดเดียวกัน คือ น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากงานวิจัยของพงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ (2552) ด้วยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 ซึ่งใช้น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์เป็นแหล่งสารอาหาร มีค่าความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 0.58 และ 0.35 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 8.55 และ 6.86 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอล(Yp/s) เท่ากับ 0.17 และ 0.13 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและใช้น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์มีค่าน้อยกว่างานวิจัยชิ้นนี้ อาจเนื่องมาจากน้ำเสียต่างโรงงาน และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแตกต่างกัน จากงานวิจัยเลือกใช้เชื้อ *S. cerevesiae* ที่สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลซูโครส เป็นต้น ซึ่งในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรกซัลฟูริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน (การต้ม) และนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามี

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักน้อย ส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าน้อย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.35 และ 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สำหรับงานวิจัยนี้การผลิตเอทานอล เมื่อนำมาคำนวณหาค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) พบว่าชุดการทดลองที่ 1 มีค่าผลผลิต Yp/s เท่ากับ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนชุดการทดลองที่ 2 มีค่าผลผลิต Yp/s เท่ากับ 0.42 และ 0.32 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และชุดการทดลองที่ 3 มีค่าผลผลิต Yp/s เท่ากับ 0.30 และ 0.30 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นมีปริมาณมาก จะส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาการผลิตเอทานอลของ Sivers และคณะ (1995) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นจาก 50 เป็น 150 กรัมต่อลิตร ค่าผลผลิต Yp/s จะเพิ่มขึ้นจาก 0.45 เป็น 0.50 เอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลอง (แสดงดังตารางที่ 3.4) ต่อค่าทางทฤษฎี (100 เปอร์เซ็นต์ = 0.51) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบ มีประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 90.20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

นอกจากน้ำเสียที่จัดวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เป็นของเหลว ยังมีการศึกษาการผลิตเอทานอลจากขยะเศษอาหาร ซึ่งจัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นของแข็งกึ่งของเหลว ต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยสลายก่อนที่จะทำการหมัก การย่อยสลายเศษอาหารที่เหมาะสม คือ การย่อยสลายโดยใช้กรดเจือจาง ซึ่งใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ที่อัตราส่วนเศษอาหารต่อปริมาณกรด เท่ากับ (6 ต่อ 10) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 80 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 32.59 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายประมาณ 58.39 เปอร์เซ็นต์จากน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 82.84 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการย่อยสลายเศษอาหารน้ำหนัก 254.19 กรัม(แห้ง) เมื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevesiae* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 8 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 37.03 กรัมต่อลิตร(ร้อยละ 4.69 โดยปริมาตร) ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าผลผลิต (Yp/s) เท่ากับ 0.48 และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในการผลิตเอทานอลจากเศษอาหารเท่ากับร้อยละ 14.57 โดยน้ำหนักแห้ง (ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์, 2545) ซึ่งจากการนำเศษอาหารมาผลิตเอทานอลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่ามากกว่างานวิจัยนี้ อาจเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการเตรียมวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักมีปริมาณมาก ซึ่งส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

ผลการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อน (การต้ม) และการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน แล้วนำไปย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* 6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 1x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.55 และ 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำผลการทดลองไปเปรียบเทียบกับงานอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 3.5 และ 3.6 จะเห็นได้ว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากงานวิจัยนี้ต่ำกว่างานวิจัยอื่น อาจเป็นเพราะคุณลักษณะของน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส มีปริมาณสารอินทรีย์มาก การเกิดปฏิกิริยาของน้ำตาลกับความร้อนในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ มีปริมาณการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณต่ำกว่างานวิจัยอื่นๆ เท่ากับ 6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นได้น้อย เมื่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักมีปริมาณน้อย ส่งผลให้เอทานอลที่ได้มีปริมาณน้อยด้วย

ตารางที่ 3.4 การผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* จากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบที่แตกต่างกัน pH เท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

การเตรียมวัตถุดิบ	**น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นก่อนหมักเอทานอล (g/L)**	**น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป (g/L)**	**pH หลังการหมัก**	**เอทานอล**		
				(g/L)	**%(v/v)**	**Yp/s (g_p/g_s)**
น้ำเสียไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบ (ชุดควบคุม)	5.56	3.56	4.47	1.66	0.21	0.46
กรด+ต้ม	8.12	3.38	4.23	1.42	0.17	0.42
ด่าง+ต้ม	6.64	3.62	4.43	1.18	0.15	0.32
กรด+ต้ม +เอนไซม์เซลลูเลส	4.52	1.82	4.14	0.55	0.07	0.30
ด่าง+ต้ม +เอนไซม์เซลลูเลส	2.58	2.34	4.54	0.71	0.09	0.30

ตารางที่ 3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทต่างๆ

วัตถุดิบ	การเตรียมวัตถุดิบ	การย่อยสลาย	กระบวนการหมัก/จุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น	ปริมาณเอทานอล	อ้างอิง
น้ำเสียโรงงานสกัดปาล์มน้ำมัน	ด่าง+ต้ม	เอนไซม์เซลลูเลส	*S. cerevisiae*	2.58 กรัมต่อลิตร	0.71 กรัมต่อลิตร	บุษยมาศ เหมณี (2554)
ใบแห้งของหญ้าแฝกหอม	-	*Aspergillus sp.*	*Kluveromyces thermotolerans*	-	6.07 กรัมต่อลิตร	อรุณวรรณ นุชพ่วง (2547)
ผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าว	-	เอนไซม์เซลลูเลส	*K.*. marxianus	-	1.04 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร	จันทร์จิรา สลับเชื้อ (2550)
กากตะกอนเยื่อกระดาษ	2 % H_2SO_4	เอนไซม์เซลลูเลส	*S. cerevisiae*	76.05 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ	21.50 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ	อิสรี รอดทัศนา (2550)
ไม้ไผ่	0.6 % H_2SO_4	เอนไซม์เซลลูเลสและเบตากลูโคซิเดรต	*S. cerevisiae*		2.30 กรัมต่อ 1000 กรัม	วิไลวรรณ ลีนะกุล (2552)
น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ	-	-	*T.thermosaccharolyticum* PSU-2	8.55 กรัมต่อลิตร	0.58 กรัมต่อลิตร	พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์ (2552)

ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทต่างๆ

วัตถุดิบ	การเตรียมวัตถุดิบ	การย่อยสลาย	กระบวนการหมัก/จุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น	ปริมาณเอทานอล	อ้างอิง
ทะลายปาล์มเปล่า	-	เซลลูเลสทางการค้าร่วมกับเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสชนิดหยาบ	*S. cerevisiae* TISTR 5055	-	9.38 กรัมต่อลิตร	ณัฏฐิยา วัฒนกิจจานุกูล (2552)
ฟางข้าว	1 % NaOH ต้มเดือด	เอนไซม์เซลลูเลสและอนไซม์เซลลูไบเอส	*S. cerevisiae* YC-907	-	23.7 กรัมต่อลิตร	Zhu *et. al.,* 2005a
Eucalyptus	Steam explosion	เอนไซม์เซลลูเลส	*K.*. marxianus CECT	-	17.0 กรัมต่อลิตร	Ballesteros *et. al.,* 2004
Corn cobs	2 % NaOH/ autoclaved	-	*S. cerevisiae*	-	27.0 กรัมต่อลิตร	Latif and Rajoka, 2001

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษากระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยกรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความร้อน(การต้ม อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส) กรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อน (การต้ม) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน (การต้ม) โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น ได้แก่ ชนิดของสารละลาย ความเข้มข้น และเวลา เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาล กระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม แบ่งตามวิธีได้เป็น 5 วิธี คือ

1. การเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 30, 60 และ 90 นาที พบว่าชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เวลา 90 นาที โดยชุดการทดลองที่ดีที่สุด คือ ชุดการทดลองที่เตรียมวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลา 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20.06 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 7.99 กรัมต่อลิตร

2. การเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที โดยชุดการทดลองที่ดีที่สุด คือ ชุดการทดลองที่เตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 60 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 32.86 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 6.58 กรัมต่อลิตร

3. การเตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที โดยชุดการทดลองที่ดีที่สุด คือ ชุดการทดลองที่เตรียมวัตถุดิบด้วยความร้อน ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 17.39 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 4.61 กรัมต่อลิตร

4. การเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อน (การต้ม) โดยชุดการทดลองที่ดีที่สุด คือ ชุดการทดลองที่เตรียมวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลา 90 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 97.97 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 4.22 กรัมต่อลิตร

5. การเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน (การต้ม) โดยชุดการทดลองที่ดีที่สุด คือ ชุดการทดลองที่เตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 60 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 46.80 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.73 กรัมต่อลิตร

เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที และชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 60 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที พบว่าชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น

การผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการย่อยที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระยะเวลา 90 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที (ชุดการทดลองที่ 1) และชุดการทดลองที่มีการเตรียมวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 60 นาที ร่วมกับความร้อน (การต้ม) ระยะเวลา 30 นาที (ชุดการทดลองที่ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยเลือกชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* 60 ยูนิตต่อลิตร pH 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าชุดการทดลองที่ 1 เมื่อเติมเอนไซม์เซลลูเลสทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเป็น 4.52 กรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่ 2 เมื่อเติมเอนไซม์เซลลูเลสทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเป็น 2.58 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำชุดการทดลองทั้งสองไปหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบแบบร่วม คือ การเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดร่วมกับความร้อน และด่างร่วมกับความร้อน แล้วย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.55 กรัมต่อลิตร และ 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากงานวิจัย ผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ไม่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบ (ชุดการทดลองที่ 1) กับน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน (การต้ม) (ชุดการทดลองที่ 2 และ 3) และน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบแบบร่วม และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ชุดการทดลองที่ 4 และ 5) พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 1 มีปริมาณมากกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน มีผลโดยตรงในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาในครั้งแรก (ลดการเป็นผลึกของเซลลูโลส เพิ่มการเกิดรูพรุนของวัตถุดิบ เพื่อให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเกิดการย่อยสลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง เช่น น้ำตาลรีดิวซ์) เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากปฏิกิริยาในขั้นตอนแรก เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลรีดิวซ์เป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น furfural และ

hydroxymethyl furfural (HMF) ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป เพราะปริมาณน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการเตรียมวัตถุดิบมีปริมาณน้อย และสภาวะของน้ำเสียที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง เมื่อปริมาณน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก มีปริมาณน้อย ทำให้ผลิตภัณฑ์ (เอทานอล) จากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ จึงมีปริมาณน้อยด้วยเช่นกัน

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการผลิตเอทานอลด้วยน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* การนำไปประยุกต์ใช้จริงควรใช้น้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์มาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการเตรียมวัตถุดิบ อาจมีการเติมกรดซัลฟูริกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อสลาย เนื่องจากน้ำเสียจากเครื่องดีแคนเตอร์มีอุณภูมิสูง คือ ประมาณ 130-135 องศาเซลเซียส ซึ่งความร้อนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยย่อยสลายโครงสร้างของวัตถุดิบเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการหมัก และความร้อนจะเป็นปัจจัยที่ช่วยควบคุมการปนเปื้อนของสิ่งแปลกปลอมที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก

บรรณานุกรม

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. *การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า*. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กลยุทธ โชติพัฒนา และ นิสิต ตัณฑวิเชฐ. 2535. *การศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของระบบหมักยีสต์ขนมปัง*. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

กัลยา อยู่นาน. 2546. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลจากเปลือกและกากมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี.มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เกศมณี ตาดทอง ขนิษฐา สกุลวา นฤมล แป้นอินทร์ และ วีรยา คำภา. 2546. *การผลิตเอทานอลจากเปลือกสับปะรด*. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครสวรรค์.

จันทร์จิรา สลับเชื้อ. 2550. การผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกข้าวด้วยกระบวนการทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

จารุวรรณ มณีศรี. 2538. การผลิตและการประยุกต์ใช้ไซลาเนสและเซลลูเลสจากกากปาล์มและกากสลัดจ์ โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ และจีมา ชมสุรินทร์. 2547. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง. รวบรวมผลงานโครงการที่ได้รับทุน IRPUS ประจำปี 2547. 248-249.

ณัฐกิตติ์ ธรรมเจริญ. 2543. *เหล้าพื้นบ้าน*. กรุงเทพฯ : บริษัทนาคาอินเตอร์มีเดีย จำกัด.

ณัฏฐิยา วัฒนกิจจานุกุล. 2552. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้การย่อยสลายร่วมกับการหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2539. *จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.* กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์. 2545.การผลิตเอทานอลจากขยะเศษอาหาร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังแบบครั้งคราวโดยการเติมสับสเทรตขึ้นกับพีเอช. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร ศิริลักษณ์ นิวิฐจรรยงค์ นุวงศ์ ชลคุป และ พงษ์ศักดิ์ พรหมกร. 2551. *การศึกษาการเปรียบเทียบเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลของสหรัฐอเมริกาและไทย.* พิมพ์ครั้งที่ 1. สมุทรปราการ: พิมพ์พินิจ การพิมพ์.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2543. จากอดีตถึงปัจจุบัน : โครงการผลิตเอทานอล.*วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. ปีที่ 15. ฉบับที่ 3. หน้า 89-94.

ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด – แบตช์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิศมัย ศรีชาเยช. 2547. ผลของสภาวะการผลิตและกระบวนการให้ความร้อนต่อคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของคาราเมล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์. 2552. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และ วีรศักดิ์ ทองลิมป์. 2533. *กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือทิ้ง และคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม*. วารสารสงขลานครินทร์ 12 (2): 169-176.

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. 2549. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม 326-423. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มนตรี จุฬาวัฒนฑล. 2542. เมตาบอลิสึมของคาร์โบไฮเดรต. ภาควิชาชีวเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 193-213.

ยุทธศักดิ์ สุบการี. 2550. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยใช้วิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. 2538. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเคมีเทคนิค. จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย.

วสันต์ จันทร์สัจจา. 2546. *น่ารู้เกี่ยวกับเอทานอล*. วารสาร For Quality 10 : 41-45.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. *ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. สงขลา :* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิไลวรรณ ลีนะกุล. 2552. ผลของการทำปฏิกิริยาด้วยกรดเจือจางกับไม้ไผ่ต่อการผลิตเอทานอล วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิศวกรรมพลังงาน. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศิริพงษ์ เปรมจิต บุณฑริก ภูมิรา และดวงพร เปรมจิต. 2550. การผลิตเอทานอลโดยใช้ปอสา (Paper Mulberry) เป็นวัสดุหมักด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (SSF). การประชุมวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. *ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี*. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. *ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมณฑา วัตนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2552. *พืชพลังงานเพื่อความมั่นคง พลังงานไทย*. วารสารนโยบายพลังงาน. ฉบับที่ 83. มกราคม-มีนาคม. หน้า 12-17.

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, กัลยา ศรีสุวรรณ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และวีรศักดิ์ ทองลิมป์. 2537. *รายงานโครงการวิจัยการศึกษาวิธีแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โครงการย่อย: การศึกษาในห้องปฏิบัติการ*. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา).

อรุณวรรณ นุชพ่วง. 2547. การย่อยสลายหญ้าแฝกหอม Vetiveria zizanioides Nash โดยใช้เชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูเลสได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพฤกษศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อิสรี รอดทัศนา. 2550. การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อผลิตเอทานอลจากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อำนวย ขวัญเมือง. 2538. การหมักแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เซลลูเลส และ *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Agu, R.C., Amadife, A.E., Ude, C.M., Onyia, A., Ogu, E.O. and Okafor, M. 1997.Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production. *Waste Management.* 17: 91-96.

APHA, AWWA and WEF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewate***r**. 20th ed. Maryland: American Public Health Association

Bayrock, D.P. and Ingledew, W.M. 2001. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. Journal of Industrial. *Microbiology & Biotechnology*. 27: 87-93.

Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B. and Scarmino, I.S. 2007. Fermentation of molasses by Zymomonas mobilis: Effect of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*. 98: 2824-2828.

Chandrakant, P., Bisaria, V.S., 2000. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 53 (3) : 301-309.

Dawson, L. and Boopathy, R. 2007. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production, *Bioresource Technology*. 98: 1695–1699.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analysis Chemistry*. 28 : 350-356

Gapta, R.B. and Demirbas, A. 2010. Gasoline, Diesel, and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants. New York. Cambridge University Press.

Gáspár, M., Kálmán, G. and Réczey, K. 2007. Corn fiber as a raw material for hemicelluloses and ethanol production. *Process Biochemistry*. 42: 1135-1139.

Guo, Gia-Luen., Chen, Wei-Hsi., Chen, Wen-Heng., Men, Lee-Chung.and Hawang, Wen-Song. 2008. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanolproduction. *Bioresource Technology.* 99: 6046-6053.

Harmsen, P.F.H., Huijgen, W.J.J., López, L.M.B. and Bakker, R.R.C. 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Food and biobased research. 8-19.

Hipolito, C.N., Crabbe, E., Badillo, C.M., Zarrabal, O.C., Mora, M.A.M., Flores, G.P., Cortazar, M.A.H. and Ishizaki, A. 2008. Bioconversion of industrial wastewater from palm iol processing to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *J. Cleaner Production*. 16 (5): 632-638.

Hwang, T.K., Ong, S.M., C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluents. Planter, Kuala Lumpur. 54 : 749-756.

Khan, E., Yang, P.Y. and Kinoshita, C.M. 1994. Bioethanol production from dilute feedstock. *Bioresource Technology***.** 47(1): 29-36.

Kiransree, N., Sridhar, M. and Venkateswar, R.L. 2000. Characterisation of thermotolerant, ethanol tolerant fermentative Saccharomyces cerevisiae for ethanol production. *Bioprocess Engineering*. 77: 43-46.

Klinke, H.B., Olsson, L., Thomsen, A.B., Ahring, B.K. 2003. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *saccharomyces cerevisiae* ; wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnology and Bioengineering*. 81 : 738-747.

Koh, J.S., Kodama, T. and Minoda, Y. 1983. Screening of yeasts and cultural conditions for cell production from palm oil. *Agricultural and Biological Chemistry.* 47(6): 1207-1212.

Kongkiattikajorn, J., Rodmui, A. and Dandusitapun, Y. 2007. Effect of agitation rate on batch fermentation of mixture culture of yeasts during ethanol production from mixed glucose and xylose. *Thai. Journal Biotechnology*. 8 : 1-4.

Kootstra, A.M.J., Beeftink, H.H., Scott, E.L. and Sanders, J.P.M. 2009. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. Biochemical *Engineering Journal.* 46:126–131

Krishna, S.H., Prasanthi, K., Chowdary, G.V. and Ayyanna, C. 1998. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochemistry.* 33 (8): 825-830.

Latif, F., Rajoka, M.I. 2001. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. *Bioresource Technology.* 77 : 57-63.

Lee, C., Yamakawa, T. and Kodama, T. 1993. Rapid growth of a thermotolerent yeast on palm oil. *Microbioogyl. Biotechnology.* 9: 187-190.

Mustar, S., Mohd, M.A., Noor., Ahmad, R. and Amin, A.M. 2001. Single cell protein from palm oil mill effluent. Proc. NSF Workshop, Kuala Lumpur.

Nigam, J.N. 2000. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Biotechnology***.** 80:189–193.

Panchal, C.J. and Tavares, F.C.A. 1990. Yeast strain selection for fuel ethanol production. *In* C.J. Panchal (Editor). Yeast strain selection. (225-243). New York: Marcel Dekker. Inc.

Prashant, M. Ajay, S. 1993. Industrial Microbiology. 3rd ed., McGraw-Hill. Tokyo. 954p.

Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein D.A. 2002. Microbiology. Fifth edition. The McGraw-Hill Companies

Punnapayak, H. and Hoffmann, J.J. 1994. Amsonia spp. A potential fuel crops for arid lands. *Microbiology. Bietechnology*. 10 : 290-292.

Purwadi, R., Niklasson, C. and Taherzadeh, M.J. 2004. Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolyzates by $Ca(OH)_2$. *Biotechnology*. 114 : 187-198.

Reed G. 1975. Enzymes in Food Pprocessing. 2nd ed., Academic Press. New York. 104p.

Roehr, M. 2001. The Biotechnology of Ethanol. Classical and Future Applications. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

Rose, A.H. and Harison, J.S. 1975. Yeast Technology: 3nd edition. New York : Academic press.

Ruanglek, V. Maneewatthana, D. and Tripetchkul, S. 2006. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*. 41: 1432-1437.

Saha, C. B., Iten, B. L., Cotta, A. M. and Wu, V. Y. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. 40: 3693-3700.

Silverstein, R.A., Chen,Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D. and Osborne, J. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology***.** 98:3000–3011.

Sivers, MV. and Zacchi, G. 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology*. 51: 43-52.

Sreenath, H.K. and Jeffries, T.W. 2000. Production of ethanol from wood hydrolyzate by Yeasts. *Bioresource Technology.* 72: 261–266.

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

Sun, Y. and Cheng, J. J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production . *Bioresource Technology*. 96: 1599-1606.

Tahir, A., Aftab, M. and Farasat, T. 2010. Effect of cultural conditions on ethanol production by locally isolated *saccharomyces cerevisiae* BIO-07. *Applied Pharmacy*. 3 (2): 72-78.

Tao, F., Miao, J.Y., Shi, G.Y. and Zhang, K.C. 2005. Ethanol fermentatiom by an acid-tolerant Zymomonas mobilis under non-sterilized condition. *Process Biochemistry.* 40:183-187.

Thomas, W.J. and Yong-Su, J. 2003. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeast. Advances in Applied Microbiology. 47: 221-255.

Wang, Z., Keshwani, D.R., Redding, A.P. and Cheng, J.J. 2009. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technology*. 101 : 3583-3585.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Liao, J. and Zhang, Y. 2005a. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry***.** 40: 3082-3086.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C., Yu, F., Jin, S. and Zhao, Y. 2005b. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali Pre-treated rice straw to ethanol. *Biosystems Engineering*. 92 (2): 229–235.

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S., 1995. Wine Analysis and Production. New York : The Chapman & Hall.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1. ซีโอดีทั้งหมด (Total Chemical Oxygen Demand: TCOD)

โดยวิธี dichromate closed reflux method (APHA, AWWA and WEF, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. direstion vessel: ให้ใช้หลอดเพาะเชื้อที่ทำด้วย borosilicate glass ขนาด 16x100 มิลลิลิตร 20x150 มิลลิลิตร หรือ 25x150 มิลลิลิตร พร้อมด้วยฝาเกลียวปิดซึ่งภายในเป็น TFE

2. block heater หรือเครื่องมืออื่นๆ ที่คล้ายกันซึ่งสามารถให้ความร้อนที่ 150±02 องศาเซลเซียส พร้อมกับช่อง block สำหรับใส่หลอด ไม่ควรใช้ oven เพราะตัวอย่างอาจจะรั่วซึ่งจะเกิดการกัดกร่อนและอาจระเบิดได้ ในกรณีที่ต้องใช้ oven ให้ผสมตัวอย่างในหลอดให้เข้ากันดีก่อนจึงจะนำเข้า oven

3. microburet

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS)0.10โมลาร์เตรียมโดยละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2\ 6H_2O$ 39.2 กรัมในน้ำกลั่นเติม conc. H_2SO_4 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร

สารละลายนี้จะต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนในแต่ละวัน ด้วยสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต

<u>การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS)</u>

นำสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด แล้วนำมาไทเทรตกับเฟอร์รัส-แอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.10 M จุดยุติเปลี่ยนจากน้ำเงินแกมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

การคำนวณ

โมลาริตีของ FAS = [ปริมาณ $K_2Cr_2O_7$ (ml) x 0.25] / ปริมาณ FAS ที่ใช้ (ml)

2. สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 0.01667 M เตรียมโดยละลาย $K_2Cr_2O_7$ (อบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) 4.903 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร, conc. H_2SO_4 167 มิลลิลิตร และ $HgSO_4$ 33.3 กรัม ละลายเข้าด้วยกัน จากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายกรด H_2SO_4 เตรียมโดยทำการผสม Ag_2SO_4 และ conc. H_2SO_4 ด้วยสัดส่วน Ag_2SO_4 5.5 กรัม ต่อ conc. H_2SO_4 1 กิโลกรัม ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ให้ Ag_2SO_4 ละลายก่อนนำมาใช้

4. สารละลายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยละลาย 1,10-phenanthroline monohydrate 1.485 กรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ 695 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลท (KHP, $HOOCC_6H_4COOK$) เตรียมโดยบด KHP และทำให้แห้งที่ 110 องศาเซลเซียส ชั่งมา 425 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนได้ 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะอยู่ตัวถ้าเก็บในตู้เย็นแต่ไม่ตลอดไป

วิธีการวิเคราะห์

1. ตวงตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสำหรับหาค่า COD

2. เติมสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 0.01667 M จำนวน 6 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายกรด H_2SO_4 (ผสม Ag_2SO_4) 14 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. ปิดฝาหลอด COD ให้แน่นพอดีและนำหลอดไปเหวี่ยงให้สารผสมกัน

5. วางหลอดลงใน block digester ที่ pre heat ไว้ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ก่อนแล้วรีฟรักซ์ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำหลอดลงใส่ใน test tube rack

6. จากนั้นนำมาไทเทรตด้วยสารละลาย FAS 0.10 โมลาร์ โดยใช้สารละลายเฟอร์โรอิน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติเปลี่ยนจากน้ำเงินแกมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

7. ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากับน้ำตัวอย่าง ทำการรีฟลักซ์เหมือนตัวอย่างทุกประการรวมทั้งสารเคมีที่ใช้ก็ต้องเท่ากันด้วย

การคำนวณ

COD (mg/l) = [(A-B) xM x8,000] / ปริมาณตัวอย่าง (ml)

โดยที่ COD = ค่า Chemical Oxygen Demand

A = ปริมาณ FAS ที่ใช้สำหรับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

B = ปริมาณ FAS ที่ใช้สำหรับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

M = โมลาริตีของ FAS

2. ของแข็งแขวนลอย (Suspended Solid: SS)

โดยวิธี gravimetric method (APHA, AWWA and WEF, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Glass filler disks (whatman GF/C หรือ gelman type A) ซึ่งไม่มีสารอินทรีย์ติดอยู่
2. เครื่องมือสำหรับกรอง
    2.1 fillter older ใช้ gooch crucible adapter หรือ menbrane fillter funnel
    2.2 ถ้วยกรองความจุ 25 มิลลิลิตร สำหรับ Glass Fillter ขนาด 2.2 เซนติเมตร
3. ขวดดูด (suction flask) ความจุ 500 มิลลิลิตร
4. เครื่องดูดสุญญากาศ
5. ตู้อบ

วิธีการวิเคราะห์

1.อบกระดาษกรองที่วางในอะลูมิเนียมฟรอยให้แห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ประมาณ 30 นาที แล้วชั่งหาน้ำหนัก

2.เลือกปริมาณน้ำตัวอย่างที่ได้ปริมาณของแข็งแขวนลอยไม่น้อยกว่า 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.วางกระดาษกรองบนกรวยที่ต่อกับเครื่องดูดสุญญาอากาศ

4.ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียก แล้วเปิดเครื่องดูดสูญญาอากาศ เพื่อให้กระดาษกรองติดกับกรวย

5.กรองตัวอย่างที่ผสมเข้ากันดีแล้วโดยอาศัยแรงดึงจากเครื่องดูดอากาศ

6.ปิดเครื่องดูดสูญญาอากาศ ใช้คีมคีบกระดาษกรอง แล้วนำใส่อะลูมิเนียมฟรอยอันเดิม จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ประมาณ 30 นาที แล้วชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

การคำนวณ

Suspended Solid (mg/l) = [(A-B)x1000] /ml sample

โดยที่ A = น้ำหนักกระดาษกรองก่อนการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)

B = น้ำหนักกระดาษกรองหลังการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)

3. ของแข็งทั้งหมด (Total Solid: TS)

โดยวิธี Gravimetric method (APHA, AWWA and WEF, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1.ถ้วยกระเบื้อง เส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิลิตร

2.High Silica glass

3.เตาเผา ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส

4.ตู้อบ

5.เครื่องดูดสุญญากาศ

วิธีการวิเคราะห์

1.เผาถ้วยระเหยที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและเก็บไว้ในเครื่องดูดสุญญากาศ

2.เทตัวอย่างที่ทราบปริมารแน่นอนลงในถ้วย ระเหยจนแห้งบนอ่างไอน้ำ และนำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส

3.ปล่อยให้เย็นในเครื่องดูดสุญญากาศและชั่ง

การคำนวณ

Total Solid (mg/l) = [(A-B)x1000] /ml sample

โดยที่ A = น้ำหนักของตัวอย่าง+ถ้วยระเหย (มิลลิกรัม)

B = น้ำหนักของถ้วยระเหย (มิลลิกรัม)

4. การวิเคราะห์เจดาห์ลไนโตรเจน (Total Kjeldahl Nitrogen: TKN)

โดยวิธี macro kjeldahl method (APHA, AWWA and EF, 2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือในการย่อยสลาย ประกอบด้วยเครื่องดูดอากาศเพื่อดูดไอน้ำออกทิ้ง
2. เครื่องกลั่น ชุดเดียวกับการหาแอมโมเนียไนโตรเจน

สารเคมี

1. สารละลายสำหรับการย่อย (digestion solution) เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 134 กรัม และ 7.3 กรัม $CuSO_4$ ผสมกันในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 134 มิลลิลิตร ของ conc. H_2SO_4 ด้วยความระมัดระวัง และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 14 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการตกผลึก

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไธโอซัลเฟต เตรียมโดยละลาย NaoH 500 กรัม และโซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) จำนวน 25 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนเป็น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1.เลือกปริมาตรของน้ำตัวอย่างให้เหมาะสม จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนียจนปริมาตรรวมเป็น 300 มิลลิลิตร

2.เติมสารละลายสำหรับการย่อยสลายลงไป 50 มิลลิลิตร

3.ต้มเดี่ยวจนได้สารละลายใส เดี่ยวต่ออีก 20–30 นาทีให้หมดควันมีแต่ส่วนใส จากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 300 มิลลิลิตร

4.ทำให้เป็นด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์–โซเดียมไธโอซัลเฟต 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกลั่น โดยใช้สารละลายอินดิเคติ้งบอริคเอซิค 50 มิลลิลิตร เป็นตัวจับแอมโมเนียจนได้ปริมาตรรวมทั้งหมดเป็น 250 มิลลิลิตร

5.จากนั้นนำส่วนที่กลั่นได้ 250 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งให้เย็น นำมาไทเทรตกับสารละลายกรด H_2SO_4 0.02 N จนกลายเป็นสีม่วงอ่อน

การคำนวณ

$$NH_4^- - N + Org - N\ (mg/L) = [(A - B) \times 280]/ ml.\ sample$$

โดยที่ $NH_4^- - N + Org - N$ = แอมโมเนียไนโตรเจน + อินทรีย์ไนโตรเจน

A = มิลลิลิตรสารละลายมาตรฐานกรด H_2SO_4 0.02 N ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรสารละลายมาตรฐานกรด H_2SO_4 0.02 N ที่ใช้ในการไตเตรท Blank

5. น้ำมัน และไขมัน (Oil and Grease)

โดยวิธี soxhlet extraction method (APHA, AWWA and WEF, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดสกัดซอกฮ์เลต
2. เครื่องดูดสุญญากาศ
3. เครื่องอังน้ำ
4. ขวดสกัด (extraction flask)
5. กระดาษกรองเบอร์ 40
6. เอกซ์แทรคชันทิมเบิล (extraction thimble paper)
7. ผ้ามัสลินตัดเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
8. Glass beads
9. Electric heating mante

สารเคมี

1. conc. HCl
2. ตัวทำละลาย
   2.1 เฮกเซน (n-Hexane) จุดเดือด 49 องศาเซลเซียส
   2.2 methyl-tert-butyl ether (MTBE) จุดเดือด 55-56 องศาเซลเซียส
3. diatomaceous-silica filter acid suspension , 10 กรัมต่อลิตรของน้ำกลั่น
4. solvent mixture, 80 เปอร์เซ็นต์ n-Hexane / 20 เปอร์เซ็นต์ MTBE (v/v)

วิธีวิเคราะห์

1.เก็บตัวอย่างน้ำ 1 ลิตร (หรือปริมาณน้อยกว่า) แล้วปรับ pH ให้น้อยกว่า 2 ด้วย conc.. HCl ในอัตราประมาณ 5 มิลลิลิตรต่อน้ำตัวอย่าง 1 ลิตร

2.เตรียมแผ่นกรองดูดซับน้ำมันโดยวางผ้ามัสลินบนที่กรอง แล้วปูทับด้วย กระดาษกรองเบอร์ 40 ในกรวยบุคเนอร์ แล้วจึงเท diatomaceous-silica filter acid suspension 10 กรัม/ลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตรลงไป ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูดน้ำออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1 ลิตร ดูดน้ำออกจนแห้ง

3.กรองตัวอย่างน้ำที่เตรียมจากข้อ 1 ผ่านบนกระดาษกรองดูดซับน้ำมันอยู่ (ข้อ 2) ดูดน้ำออกจนแห้ง

4.ใช้คีมคีบกระดาษกรอง นำไปใส่ในทิมเบิลใช้สำลีชุบเฮกเซน เช็ดไขมันที่ติดถ้วยบุคเนอร์ให้หมด แล้วนำสำลีใส่ในทิมเบิลด้วย

5.นำทิมเบิลไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใส่เม็ดแก้วให้เต็มทิมเบิล

6.ชั่งน้ำหนักขวดที่ใช้สกัด ซึ่งได้ทำให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ (อบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส)

7.นำทิมเบิลใส่ในชุดซอกเลต ทำการสกัดโดยใช้ เฮกเซนเป็นตัวทำละลายด้วยอัตรา 20 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

8.กลั่นเฮกเซนจากขวดสกัดในเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ออกจนแห้ง (สามารถนำเฮกเซนกลับไปใช้ได้อีก)

9.นำขวดสกัดให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ 30 นาที แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสมมุติเท่ากับ B กรัม

การคำนวณ

$$\text{Oil and Grease (mg/L)} = [(B - A)\times 10^{6}\times 280]/\text{ml. sample}$$

6. การวิเคราะห์ บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand : BOD)
โดยวิธี 5-Day BOD Test (APHA, AWWA and WEF, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Incubation Bottle ขนาด 250-300 มิลลิลิตร พร้อมจุกปิดสนิท
2. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร และขาตั้งบิวเรต
3. กระบอกตวงขนาด 1 ลิตร
4. ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร
5.ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส

สารเคมี

1.น้ำกลั่นที่มีคุณภาพสูง

2.สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เตรียมโดยละลาย KH_2PO_4 8.5 กรัม $Na_2HPO_4.7H_2O$ 33.4 กรัม K_2HPO_4 21.75 กรัม และ NH_4Cl 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต เตรียมโดยละลาย $MgSO_4.7\ H_2O$ 22.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1ลิตร

4.สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เตรียมโดยละลาย anhydrous $CaCl_2$ 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5.สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ เตรียมโดยละลาย $FeCl_3.6\ H_2O$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6.สารละลายกรดและด่าง 1 นอร์มัล เพื่อปรับ pH

7.สารละลายโซเดียมซัลไฟท์ 0.025 นอร์มัล ละลาย Na_2SO_4 1.575 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องเตรียมในวันที่วิเคราะห์เท่านั้น

8.การเตรียมน้ำสำหรับใช้เจือจาง

1.1 ตวงน้ำกลั่นให้มากกว่าปริมาตรที่จะใช้ 1 ลิตร ใส่ในภาชนะที่สะอาด

1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ เฟอร์ริคคลอไรด์ โดยเติมสารแต่ละชนิด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำสำหรับใช้เจือจาง 1 ลิตร

1.3 เติมอากาศเพื่อเพิ่มปริมาณออกซเจนในน้ำอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

9.การเตรียมตัวอย่างที่จะวิเคราะห์

1.4 ต้องปรับ pH ให้เป็น 6.5-7.5 ด้วยกรดหรือด่าง

1.5 ต้องกำจัดคลอรีนหรือโลหะหนักก่อน

10.วิธีการทำเจือจาง

10.1 เลือกเปอร์เซ็นต์น้ำตัวอย่างมาทำการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่า BOD_5 อยู่ในช่วงที่กำหนด แล้วเลือกเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าและต่ำกว่า (ตารางภาคผนวก ข-1)

10.2 ค่อยๆ รินน้ำสำหรับเจือจาง 700-800 มิลลิลิตร ลงในกระบอกตวงขนาด 1 ลิตร พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ

10.3 เติมน้ำตัวอย่างตามจำนวนที่ต้องการ แล้วเติมน้ำสำหรับทำการเจือจางจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

10.4 ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ในขวด BOD_5 ปิดจุกให้แน่นแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ºC 2 ขวด เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาหาปริมาณ DO ส่วนที่เหลืออีก 1 ขวด นำไปหาค่า DO ทันที

11. การพิจารณาผลเพื่อคำนวณค่า

ผลที่น่าเชื่อถือ จะต้องมีค่า DO อย่างน้อย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และต้องมีการลดปริมาณ DO ลงไปอย่างน้อย 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของตัวอย่างน้ำที่ทำการเจือจางจึงจะทำให้ค่า BOD_5 ออกมาถูกต้อง

ตารางภาคผนวก ก.1 ช่วงค่า BOD_5 และวิธีการเจือจาง

ช่วงค่า BOD_5	**ร้อยละของน้ำตัวอย่าง**
20,000-70,000	0.01
10,000-35,000	0.02
4,000-14,000	0.05
2,000-7,000	0.1
1,000-3,500	0.2
400-1,400	0.5
200-700	1.0
100-350	2.0
40-140	5.0
20-70	10.0
10-35	20.0
4-14	50.0
0-7	100

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric (Dubois *et al.*, 1956)

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมกลูโคส และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป mono-, tri-, oligo- และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ได้

หลักการทางปฏิกิริยา

น้ำตาล mono-, tri-, oligo- และ polysaccharide ทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารที่มีสีและสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 480-490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligo- และ polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกิริยาขจัดน้ำออก และมีการแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (Furfural derivatives) ซึ่งเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (Triarylmethane dyes)

สารเคมี

1.สารละลายฟีนอลร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมได้โดยละลายผลึกของฟีนอล 5.0 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

วิธีการวิเคราะห์

1.ใส่สารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank)

2.เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ลงในสารผสมข้อ 1

3. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ระวังกรดผสมน้ำจะเดือด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที

4.นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (Standard curve)

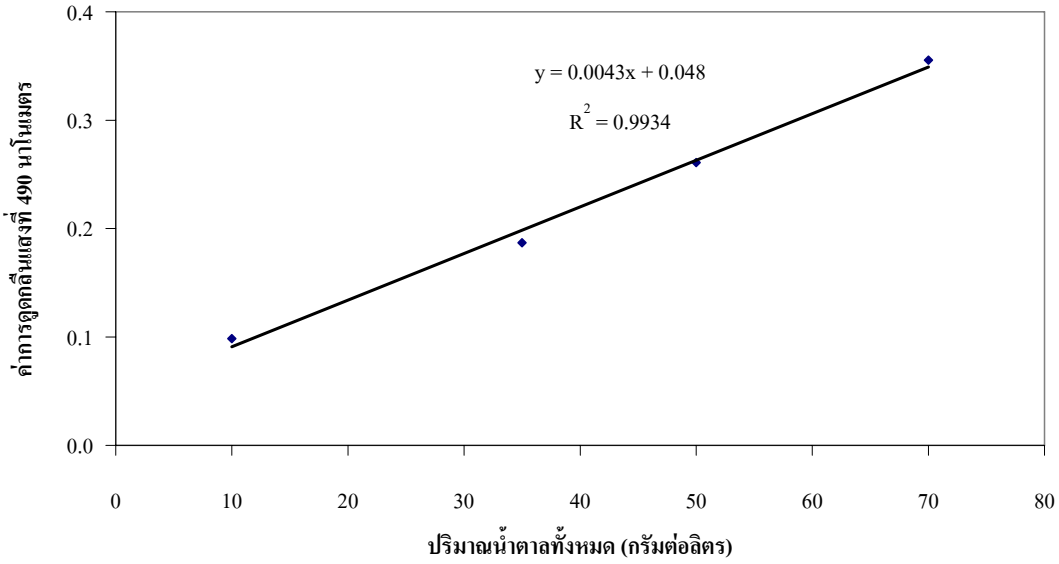
การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(OD_{490})\times(\text{การเจือจาง})}{(\text{ความชัน}\times 1000)}$$

โดยที่ ความชัน = ค่าความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐาน

การเจือจาง = ค่าการเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์



ภาคผนวก ก.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric

8. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson method (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

หลักการทางปฏิกิริยา

1. $2Cu^{2+}$ + reducing sugars ⟶ Cu_2O
2. $Cu_2O + H_2SO_4$ ⟶ $2Cu^{2+}$
3. $2Cu^{2+} + MoO_4^{2-} + SO_4^{2-}$ ⟶ $2Cu^{2+}$ molybdenum blue

สารเคมี

1. Low-alkalinity reagent of Somogyi

สารละลาย A: เตรียมโดยชั่ง Rochelle salt (KNa tartrate) 12 กรัม และ anhydrous Na_2CO_3 24 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นที่ต้มแล้วประมาณ 250 มิลลิลิตร

สารละลาย B: เตรียมโดยชั่ง $Cu_2SO_4.5H_2O$ 4.0 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

สารละลาย C: เตรียมโดยชั่ง anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มเพื่อไล่อากาศออก แล้วทำให้เย็น

เติมสารละลาย B ลงในสารละลาย A พร้อมคนให้เข้ากัน แล้วค่อยๆ เติม $NaHCO_3$ 16 กรัม ลงไปคนให้ละลาย จากนั้นนำไปใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร นำสารละลาย C เติมลงไป

เติมน้ำกลั่นที่ต้มแล้วลงไปเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงรินส่วนลอยมาใช้โดยเก็บไว้ในขวดสีชา

2. Arsenomolybdate reagent of Nelson

สารละลาย D: เตรียมโดยชั่ง ammonium molybdate 25 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริก (96%) ลงไป 21 มิลลิลิตร

สารละลาย E: เตรียมโดยชั่ง $Na_2HAsO_4.7\ H_2O$ 3.0 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

นำสารละลาย E เติมลงในสารละลาย D เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร โดยใช้ Volumetric flask จากนั้นนำสารละลายผสมนี้ไปเก็บที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งน้ำตาล (ซึ่งผ่านการอบที่ 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง และเก็บไว้ในโถดูดความชื้น) มา 0.0200 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ Volumetric flask จะได้สารละลายน้ำตาลเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เป็น stock solution จากนั้นนำ stock solution มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางภาคผนวก ก.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

หลอดที่	**สารละลายกลูโคส (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)**	**น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)**	**สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**
1	0.00	1.00	0
2	0.25	0.75	50
3	0.50	0.50	100
4	0.75	0.25	150
5	1.00	0.0	200

วิธีการวิเคราะห์

1.ดูดสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาณกลูโคสไม่เกิน 200 ไมโครกรัม หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 20x150 มม. 2 ซ้ำ

2.เติม low-alkalinity reagent of Somogyi ลงไป 1.0 มิลลิลิตร

3.นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นโดยใส่ลงในลังน้ำแข็ง

4.เติม arsenmolybdate reagent of Nelson ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้ Cu_2O ละลายหมด

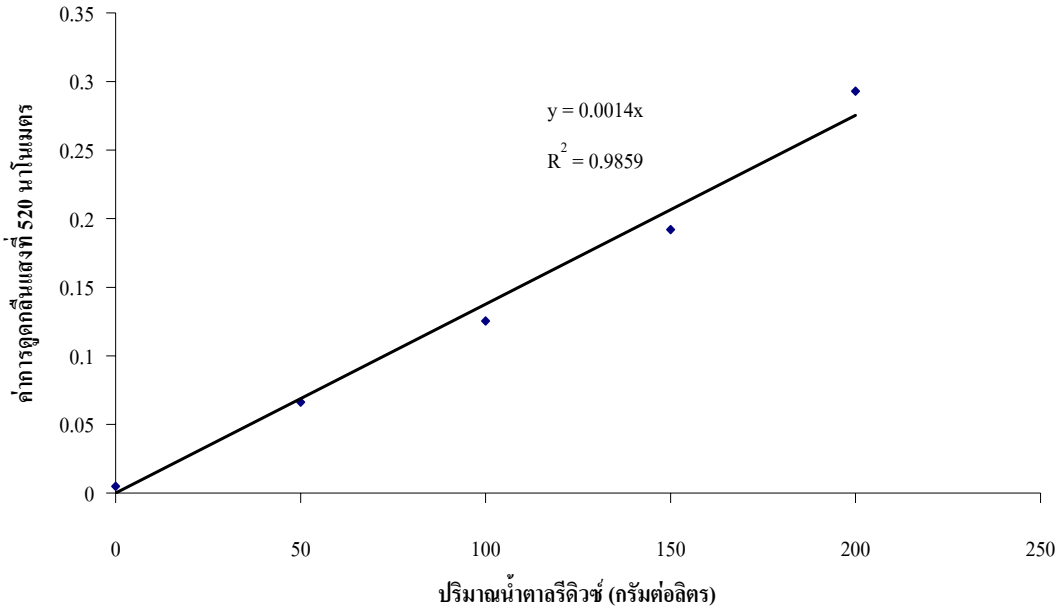
5.เติมน้ำกลั่นลงไปให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที แต่ไม่ควรเกิน 40 นาที

6.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

7.นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ไปเขียนกราฟ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่า OD ใช้เป็นกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่า } OD_{520}\text{nm}) - (0.0282)}{(0.0042)}$$



ภาคผนวก ก.4 กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson method

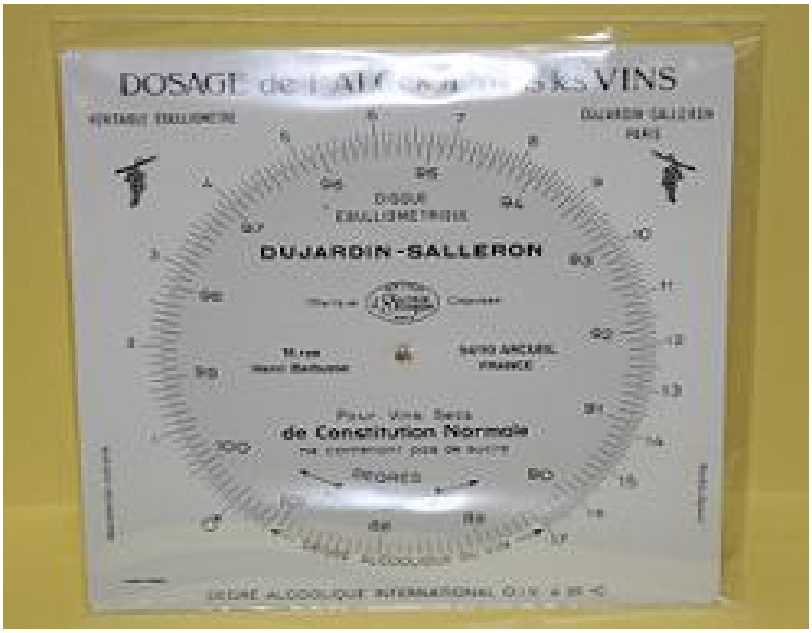
9. การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) ตามวิธีของ Zoecklein และคณะ (1995)

Ebulliometer เป็นเครื่องมือที่ใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยการหาจุดเดือดแล้วเปิดเทียบกับแผ่นสเกลไว้สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (DUJARDINSALLERON scale) เครื่องมือประกอบด้วยโลหะทรงกระบอก 2 ส่วน คือ ส่วน A และ B ต่อกัน ทรงกระบอกส่วน A จะเป็นที่บรรจุสารละลายที่ต้องการหาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยบรรจุสารละลายที่ต้องการวัดลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ ใส่น้ำสำหรับหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E ส่วน F เป็นที่ใช้สำหรับเปิดถ่ายสารละลายออก และท่อ G เป็นตำแหน่งสำหรับรวมเปลวไฟจากตะเกียง แสดงในภาพที่ ก. 3

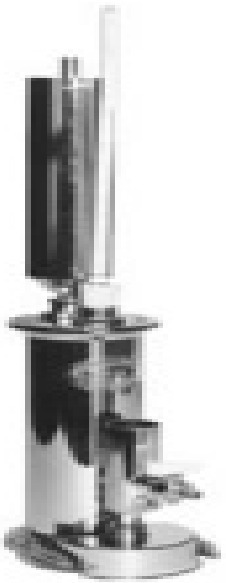
วิธีการวิเคราะห์

1. การหาจุดเดือดของน้ำกลั่น
   - ก. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้
   - ข. เติมน้ำหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E
   - ค. จุดตะเกียงแล้ววางใต้ท่อ G
   - ง. เมื่อน้ำเดือดแล้วอ่านค่าอุณหภูมิที่คงที่ (ประมาณ 15-30 วินาที)
   - จ. นำค่าของอุณหภูมิที่ได้ไปปรับสเกล โดยให้ขีดศูนย์ของสเกลวงนอกตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำกลั่น
2. การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ จากนั้นนำไปเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1 ตั้งแต่ ข้อ ข. ถึง ง. การอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์อ่านค่าจากสเกลวงนอกที่ตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของสารละลายตัวอย่างที่ได้ หน่วยของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ คือ เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร



ภาคผนวก ก.5 แผ่นสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์



ภาคผนวก ก.6 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ Ebulliometer

10. การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography

เป็นการแยกสารอีกชนิดหนึ่งโดยให้สารที่ต้องการแยกกระจายไปมาระหว่าง 2 phase คือ Mobile phase ซึ่งเป็นก๊าซ และ Stationaly phase ที่เป็นของเหลวหรือของแข็ง

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องมือทดสอบ	: HP 6850 Gas chromatography with flame ionized detector
Column	: HP-Innowax
Column description	: Length 30 m, 250 µm I.D, 0.25 µm film thickness
Oven temperature	: 50 °C hold 6 minutes
Inlet temperature	: 200 °C
Detector temperature	: 200 °C
Carier gas, flow rate	: Helium

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย Absolute ethyl alcohol (99.8%) โดยเตรียมความเข้มข้นเป็น 1.0-5.0 กรัม/ลิตร

2.ฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี บันทึกพื้นที่กราฟ

3.นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

11. การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

วัสดุอุปกรณ์

Counting chamber (Haemacytometer)

Microscope

วิธีการวิเคราะห์

1.ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่าง จนถึง 10^{-4} โดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

2.ใช้กระดาษเช็ดเลนส์ทำความสะอาด Haemacytometer และ Coverslip

3.ใช้น้ำแตะบริเวณขอบของ Haemacytometer ปิด Coverslip กดขอบของ Coverslip จนเห็น Newton's ring

4.เขย่าหลอดสารละลายตัวอย่าง ที่ความเจือจาง 10^{-4} ให้เซลล์ยีสต์กระจายอย่างสม่ำเสมอ โดยใช้ Vortex mixer

5.ใช้ Pasteur pipette ที่ปราศจากเชื้อดูดเซลล์ยีสต์ในข้อ 4 แตะปลาย Pasteur pipette ลงบริเวณช่องว่างระหว่าง Haemacytometer กับ Coverslip ปล่อยของเหลวเข้าไปให้เต็มช่องว่างระวังอย่าให้ล้น

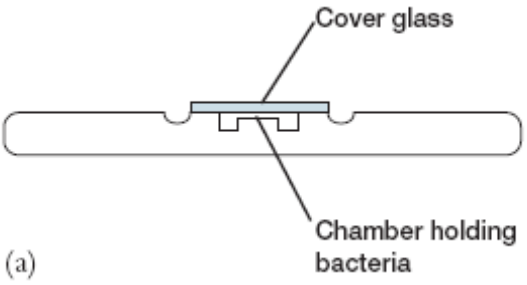
6.นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ Objective กำลังขยาย 40x นับจำนวนเซลล์ยีสต์จากช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ทั้งหมด 5 ช่อง (ถ้าปริมาณเชื้อหนาแน่นมากให้ทำการเจือจางต่อ) ทั้งนี้เพื่อกันการสับสนที่จะเกิดขึ้นในการนับซ้ำหรือลืมนับ จึงให้กำหนดแน่นอนว่าจะนับเซลล์ที่คร่อมอยู่บนเส้นเฉพาะด้านบนและด้านซ้ายของช่อง (ดูภาพประกอบ (a)-(c)) คำนวณหาค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่มีอยู่ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ 1 ช่อง

การคำนวณ

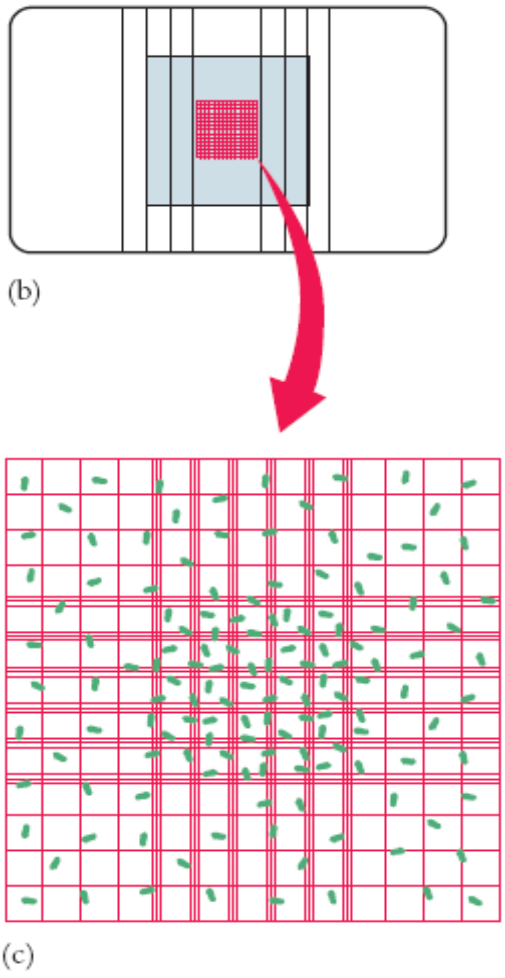
ขนาดความลึกของ Haemacytometer	=	0.1	mm
ขนาดพื้นที่ 1 ช่องใหญ่ของ Haemacytometer	=	0.2 x 0.2	mm
ปริมาตร 1 ช่องใหญ่ของ Haemacytometer	=	0.2 mm x0.2mm x 0.1	mm
	=	0.02 mm x0.02mm x 0.01	mm
	=	0.000004	cm^3
	=	0.000004	mL
	=	4×10^{-6}	mL

เซลล์ต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ใน 1 ช่องใหญ่ (Y) x 10^6 x (1/4) x Dilution

= Y x 10^6 x (1/4) x Dilution



(a)



ภาคผนวก ก.7 เครื่องมือ Haemacytometer นับจำนวนเซลล์

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1.ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s)

$$Yp/s = \frac{\text{ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)}}$$

2.ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

$$\text{ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล} = \frac{\text{ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น* 100}}{\text{ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (0.50)}}$$

3. ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)

$$\text{ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)} = \text{ปริมาณเอทานอล (v/v)} * (10) * (0.79)$$

4. การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่วัดจากเครื่อง Ebulliometer และ เครื่อง Gas Chromatography

สำหรับในงานวิจัยนี้ได้ทำการวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้วัดเอทานอลโดยการหาจุดเดือดของน้ำเทียบกับจุดเดือดของตัวอย่างที่วัดแล้วเปิดตารางของ Dujardin, Successeur De Salleron-Paris เพื่อหาค่าเอทานอลที่ได้ ค่าเอทานอลที่วัดได้อาจมีความคลาดเคลื่อนบ้างดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการยืนยันผลโดยการวัดค่าเอทานอลที่ยีสต์ *S. cerevisiae* ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 200 องศาเซลเซียส โดยการเลือกเอาตัวอย่างเอทานอลของการศึกษาหาวิธีการเตรียมวัตถุดิบแบบร่วมระหว่างสารเคมีและความร้อน และมีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ไปทำการตรวจวัด ซึ่งผลจากการตรวจวัดค่าเอทานอลที่ได้ พบว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC ให้ค่าเอทานอลมากกว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง Ebulliometer ของทุกตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความต่างระหว่างการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC กับการตรวจวัดด้วยเครื่อง Ebulliometer พบว่ามีความแตกต่างกันร้อยละ 0.19 ± 0.03 โดยปริมาตร

ภาคผนวก ค

ข้อมูลทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5229.132	3	1743.044	6015.257	.000
Within Groups	8.114	28	.290		
Total	5237.246	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	-2.50875(*)	.26915	.000	-3.0601	-1.9574
		90 min	-28.90375(*)	.26915	.000	-29.4551	-28.3524
		control	3.23250(*)	.26915	.000	2.6812	3.7838
	60 min	30 min	2.50875(*)	.26915	.000	1.9574	3.0601
		90 min	-26.39500(*)	.26915	.000	-26.9463	-25.8437
		control	5.74125(*)	.26915	.000	5.1899	6.2926
	90 min	30 min	28.90375(*)	.26915	.000	28.3524	29.4551

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	60 min	26.39500(*)	.26915	.000	25.8437	26.9463
	control	32.13625(*)	.26915	.000	31.5849	32.6876
control	30 min	-3.23250(*)	.26915	.000	-3.7838	-2.6812
	60 min	-5.74125(*)	.26915	.000	-6.2926	-5.1899
	90 min	-32.13625(*)	.26915	.000	-32.6876	-31.5849

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.2 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2086.613	3	695.538	3679.633	.000
Within Groups	5.293	28	.189		
Total	2091.906	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	1.61000(*)	.21738	.000	1.1647	2.0553
		90 min	-18.89375(*)	.21738	.000	-19.3390	-18.4485

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
60 min	control	-6.81750(*)	.21738	.000	-7.2628	-6.3722
	30 min	-1.61000(*)	.21738	.000	-2.0553	-1.1647
	90 min	-20.50375(*)	.21738	.000	-20.9490	-20.0585
90 min	control	-8.42750(*)	.21738	.000	-8.8728	-7.9822
	30 min	18.89375(*)	.21738	.000	18.4485	19.3390
	60 min	20.50375(*)	.21738	.000	20.0585	20.9490
control	control	12.07625(*)	.21738	.000	11.6310	12.5215
	30 min	6.81750(*)	.21738	.000	6.3722	7.2628
	60 min	8.42750(*)	.21738	.000	7.9822	8.8728
	90 min	-12.07625(*)	.21738	.000	-12.5215	-11.6310

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.3 การศึกษาผลความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8796.507	5	1759.301	5891.804	.000
Within Groups	12.541	42	.299		
Total	8809.048	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	1% 30 min	1% 60 min	-2.50875(*)	.27322	.000	-3.0601	-1.9574
		1% 90 min	-28.90375(*)	.27322	.000	-29.4551	-28.3524
		2% 30 min	10.05000(*)	.27322	.000	9.4986	10.6014
		2% 60 min	11.66000(*)	.27322	.000	11.1086	12.2114
		2% 90 min	-8.84375(*)	.27322	.000	-9.3951	-8.2924
	1% 60 min	1% 30 min	2.50875(*)	.27322	.000	1.9574	3.0601
		1% 90 min	-26.39500(*)	.27322	.000	-26.9464	-25.8436
		2% 30 min	12.55875(*)	.27322	.000	12.0074	13.1101
		2% 60 min	14.16875(*)	.27322	.000	13.6174	14.7201
		2% 90 min	-6.33500(*)	.27322	.000	-6.8864	-5.7836
	1% 90 min	1% 30 min	28.90375(*)	.27322	.000	28.3524	29.4551
		1% 60 min	26.39500(*)	.27322	.000	25.8436	26.9464
		2% 30 min	38.95375(*)	.27322	.000	38.4024	39.5051
		2% 60 min	40.56375(*)	.27322	.000	40.0124	41.1151
		2% 90 min	20.06000(*)	.27322	.000	19.5086	20.6114
	2% 30 min	1% 30 min	-10.05000(*)	.27322	.000	-10.6014	-9.4986
		1% 60 min	-12.55875(*)	.27322	.000	-13.1101	-12.0074
		1% 90 min	-38.95375(*)	.27322	.000	-39.5051	-38.4024
		2% 60 min	1.61000(*)	.27322	.000	1.0586	2.1614
		2% 90 min	-18.89375(*)	.27322	.000	-19.4451	-18.3424
	2% 60 min	1% 30 min	-11.66000(*)	.27322	.000	-12.2114	-11.1086
		1% 60 min	-14.16875(*)	.27322	.000	-14.7201	-13.6174

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
2% 90 min	1% 90 min	-40.56375(*)	.27322	.000	-41.1151	-40.0124
	2% 30 min	-1.61000(*)	.27322	.000	-2.1614	-1.0586
	2% 90 min	-20.50375(*)	.27322	.000	-21.0551	-19.9524
	1% 30 min	8.84375(*)	.27322	.000	8.2924	9.3951
	1% 60 min	6.33500(*)	.27322	.000	5.7836	6.8864
	1% 90 min	-20.06000(*)	.27322	.000	-20.6114	-19.5086
	2% 30 min	18.89375(*)	.27322	.000	18.3424	19.4451
	2% 60 min	20.50375(*)	.27322	.000	19.9524	21.0551

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.4 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	67.043	3	22.348	2505.492	.000
Within Groups	.392	44	.009		
Total	67.436	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	-1.47083(*)	.03856	.000	-1.5485	-1.3931
		90 min	-2.79833(*)	.03856	.000	-2.8760	-2.7206
		control	.06833	.03856	.083	-.0094	.1460
	60 min	30 min	1.47083(*)	.03856	.000	1.3931	1.5485
		90 min	-1.32750(*)	.03856	.000	-1.4052	-1.2498
		control	1.53917(*)	.03856	.000	1.4615	1.6169
	90 min	30 min	2.79833(*)	.03856	.000	2.7206	2.8760
		60 min	1.32750(*)	.03856	.000	1.2498	1.4052
		control	2.86667(*)	.03856	.000	2.7890	2.9444
	control	30 min	-.06833	.03856	.083	-.1460	.0094
		60 min	-1.53917(*)	.03856	.000	-1.6169	-1.4615
		90 min	-2.86667(*)	.03856	.000	-2.9444	-2.7890

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.5 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.784	3	3.261	6059.248	.000
Within Groups	.024	44	.001		
Total	9.808	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	.03417(*)	.00947	.001	.0151	.0533
		90 min	1.12250(*)	.00947	.000	1.1034	1.1416
		control	.37167(*)	.00947	.000	.3526	.3908
	60 min	30 min	-.03417(*)	.00947	.001	-.0533	-.0151
		90 min	1.08833(*)	.00947	.000	1.0692	1.1074
		control	.33750(*)	.00947	.000	.3184	.3566
	90 min	30 min	-1.12250(*)	.00947	.000	-1.1416	-1.1034
		60 min	-1.08833(*)	.00947	.000	-1.1074	-1.0692
		control	-.75083(*)	.00947	.000	-.7699	-.7317
	control	30 min	-.37167(*)	.00947	.000	-.3908	-.3526
		60 min	-.33750(*)	.00947	.000	-.3566	-.3184
		90 min	.75083(*)	.00947	.000	.7317	.7699

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.6 การศึกษาผลความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	97.593	5	19.519	3120.649	.000
Within Groups	.413	66	.006		
Total	98.006	71			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	1% 30 min	1% 60 min	-1.47083(*)	.03229	.000	-1.5353	-1.4064
		1% 90 min	-2.79833(*)	.03229	.000	-2.8628	-2.7339
		2% 30 min	-.30333(*)	.03229	.000	-.3678	-.2389
		2% 60 min	-.26917(*)	.03229	.000	-.3336	-.2047
		2% 90 min	.81917(*)	.03229	.000	.7547	.8836
	1% 60 min	1% 30 min	1.47083(*)	.03229	.000	1.4064	1.5353
		1% 90 min	-1.32750(*)	.03229	.000	-1.3920	-1.2630
		2% 30 min	1.16750(*)	.03229	.000	1.1030	1.2320
		2% 60 min	1.20167(*)	.03229	.000	1.1372	1.2661
		2% 90 min	2.29000(*)	.03229	.000	2.2255	2.3545
	1% 90 min	1% 30 min	2.79833(*)	.03229	.000	2.7339	2.8628
		1% 60 min	1.32750(*)	.03229	.000	1.2630	1.3920
		2% 30 min	2.49500(*)	.03229	.000	2.4305	2.5595
		2% 60 min	2.52917(*)	.03229	.000	2.4647	2.5936
		2% 90 min	3.61750(*)	.03229	.000	3.5530	3.6820
	2% 30 min	1% 30 min	.30333(*)	.03229	.000	.2389	.3678
		1% 60 min	-1.16750(*)	.03229	.000	-1.2320	-1.1030
		1% 90 min	-2.49500(*)	.03229	.000	-2.5595	-2.4305
		2% 60 min	.03417	.03229	.294	-.0303	.0986
		2% 90 min	1.12250(*)	.03229	.000	1.0580	1.1870
	2% 60 min	1% 30 min	.26917(*)	.03229	.000	.2047	.3336

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	1% 60 min	-1.20167(*)	.03229	.000	-1.2661	-1.1372
	1% 90 min	-2.52917(*)	.03229	.000	-2.5936	-2.4647
	2% 30 min	-.03417	.03229	.294	-.0986	.0303
	2% 90 min	1.08833(*)	.03229	.000	1.0239	1.1528
2% 90 min	1% 30 min	-.81917(*)	.03229	.000	-.8836	-.7547
	1% 60 min	-2.29000(*)	.03229	.000	-2.3545	-2.2255
	1% 90 min	-3.61750(*)	.03229	.000	-3.6820	-3.5530
	2% 30 min	-1.12250(*)	.03229	.000	-1.1870	-1.0580
	2% 60 min	-1.08833(*)	.03229	.000	-1.1528	-1.0239

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.7 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1002.897	3	334.299	3224.199	.000
Within Groups	2.903	28	.104		
Total	1005.800	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	-11.45750(*)	.16100	.000	-11.7873	-11.1277
		90 min	-13.88125(*)	.16100	.000	-14.2110	-13.5515
		control	-12.98000(*)	.16100	.000	-13.3098	-12.6502
	60 min	30 min	11.45750(*)	.16100	.000	11.1277	11.7873
		90 min	-2.42375(*)	.16100	.000	-2.7535	-2.0940
		control	-1.52250(*)	.16100	.000	-1.8523	-1.1927
	90 min	30 min	13.88125(*)	.16100	.000	13.5515	14.2110
		60 min	2.42375(*)	.16100	.000	2.0940	2.7535
		control	.90125(*)	.16100	.000	.5715	1.2310
	control	30 min	12.98000(*)	.16100	.000	12.6502	13.3098
		60 min	1.52250(*)	.16100	.000	1.1927	1.8523
		90 min	-.90125(*)	.16100	.000	-1.2310	-.5715

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.8 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2958.750	3	986.250	3183.556	.000
Within Groups	8.674	28	.310		
Total	2967.425	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	-18.30875(*)	.27830	.000	-18.8788	-17.7387
		90 min	-26.57125(*)	.27830	.000	-27.1413	-26.0012
		control	-14.86375(*)	.27830	.000	-15.4338	-14.2937
	60 min	30 min	18.30875(*)	.27830	.000	17.7387	18.8788
		90 min	-8.26250(*)	.27830	.000	-8.8326	-7.6924
		control	3.44500(*)	.27830	.000	2.8749	4.0151
	90 min	30 min	26.57125(*)	.27830	.000	26.0012	27.1413
		60 min	8.26250(*)	.27830	.000	7.6924	8.8326
		control	11.70750(*)	.27830	.000	11.1374	12.2776
	control	30 min	14.86375(*)	.27830	.000	14.2937	15.4338
		60 min	-3.44500(*)	.27830	.000	-4.0151	-2.8749
		90 min	-11.70750(*)	.27830	.000	-12.2776	-11.1374

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.9 การศึกษาผลความเข้มข้นของด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4095.506	5	819.101	3211.427	.000
Within Groups	10.712	42	.255		
Total	4106.218	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	1% 30 min	1% 60 min	-11.45750(*)	.25252	.000	-11.9671	-10.9479
		1% 90 min	-13.88125(*)	.25252	.000	-14.3908	-13.3717
		2% 30 min	1.88375(*)	.25252	.000	1.3742	2.3933
		2% 60 min	-16.42500(*)	.25252	.000	-16.9346	-15.9154
		2% 90 min	-24.68750(*)	.25252	.000	-25.1971	-24.1779
	1% 60 min	1% 30 min	11.45750(*)	.25252	.000	10.9479	11.9671
		1% 90 min	-2.42375(*)	.25252	.000	-2.9333	-1.9142
		2% 30 min	13.34125(*)	.25252	.000	12.8317	13.8508
		2% 60 min	-4.96750(*)	.25252	.000	-5.4771	-4.4579
		2% 90 min	-13.23000(*)	.25252	.000	-13.7396	-12.7204
	1% 90 min	1% 30 min	13.88125(*)	.25252	.000	13.3717	14.3908
		1% 60 min	2.42375(*)	.25252	.000	1.9142	2.9333
		2% 30 min	15.76500(*)	.25252	.000	15.2554	16.2746
		2% 60 min	-2.54375(*)	.25252	.000	-3.0533	-2.0342
		2% 90 min	-10.80625(*)	.25252	.000	-11.3158	-10.2967
	2% 30 min	1% 30 min	-1.88375(*)	.25252	.000	-2.3933	-1.3742
		1% 60 min	-13.34125(*)	.25252	.000	-13.8508	-12.8317
		1% 90 min	-15.76500(*)	.25252	.000	-16.2746	-15.2554
		2% 60 min	-18.30875(*)	.25252	.000	-18.8183	-17.7992
		2% 90 min	-26.57125(*)	.25252	.000	-27.0808	-26.0617
	2% 60 min	1% 30 min	16.42500(*)	.25252	.000	15.9154	16.9346
		1% 60 min	4.96750(*)	.25252	.000	4.4579	5.4771
		1% 90 min	2.54375(*)	.25252	.000	2.0342	3.0533
		2% 30 min	18.30875(*)	.25252	.000	17.7992	18.8183

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
2% 90 min	2% 90 min	-8.26250(*)	.25252	.000	-8.7721	-7.7529
	1% 30 min	24.68750(*)	.25252	.000	24.1779	25.1971
	1% 60 min	13.23000(*)	.25252	.000	12.7204	13.7396
	1% 90 min	10.80625(*)	.25252	.000	10.2967	11.3158
	2% 30 min	26.57125(*)	.25252	.000	26.0617	27.0808
	2% 60 min	8.26250(*)	.25252	.000	7.7529	8.7721

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.10 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.125	3	.375	12.929	.000
Within Groups	1.277	44	.029		
Total	2.402	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	.24592(*)	.06954	.001	.1058	.3861
		90 min	.25565(*)	.06954	.001	.1155	.3958
		control	-.09564	.06954	.176	-.2358	.0445
	60 min	30 min	-.24592(*)	.06954	.001	-.3861	-.1058
		90 min	.00973	.06954	.889	-.1304	.1499
		control	-.34156(*)	.06954	.000	-.4817	-.2014
	90 min	30 min	-.25565(*)	.06954	.001	-.3958	-.1155
		60 min	-.00973	.06954	.889	-.1499	.1304
		control	-.35129(*)	.06954	.000	-.4914	-.2111
	control	30 min	.09564	.06954	.176	-.0445	.2358
		60 min	.34156(*)	.06954	.000	.2014	.4817
		90 min	.35129(*)	.06954	.000	.2111	.4914

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.11 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.274	3	7.758	4965.342	.000
Within Groups	.069	44	.002		
Total	23.343	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	-.43274(*)	.01614	.000	-.4653	-.4002
		90 min	1.24047(*)	.01614	.000	1.2080	1.2730
		control	1.02727(*)	.01614	.000	.9947	1.0598
	60 min	30 min	.43274(*)	.01614	.000	.4002	.4653
		90 min	1.67322(*)	.01614	.000	1.6407	1.7057
		control	1.46001(*)	.01614	.000	1.4275	1.4925
	90 min	30 min	-1.24047(*)	.01614	.000	-1.2730	-1.2080
		60 min	-1.67322(*)	.01614	.000	-1.7057	-1.6407
		control	-.21321(*)	.01614	.000	-.2457	-.1807
	control	30 min	-1.02727(*)	.01614	.000	-1.0598	-.9947
		60 min	-1.46001(*)	.01614	.000	-1.4925	-1.4275
		90 min	.21321(*)	.01614	.000	.1807	.2457

*The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.12 การศึกษาผลของการเพิ่มความเข้มข้นด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36.686	5	7.337	975.838	.000
Within Groups	.496	66	.008		
Total	37.183	71			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	1% 30 min	1% 60 min	.33878(*)	.03540	.000	.2681	.4095
		1% 90 min	.34851(*)	.03540	.000	.2778	.4192
		2% 30 min	-1.03005(*)	.03540	.000	-1.1007	-.9594
		2% 60 min	-1.46279(*)	.03540	.000	-1.5335	-1.3921
		2% 90 min	.21042(*)	.03540	.000	.1397	.2811
	1% 60 min	1% 30 min	-.33878(*)	.03540	.000	-.4095	-.2681
		1% 90 min	.00973	.03540	.784	-.0609	.0804
		2% 30 min	-1.36882(*)	.03540	.000	-1.4395	-1.2981
		2% 60 min	-1.80157(*)	.03540	.000	-1.8722	-1.7309
		2% 90 min	-.12835(*)	.03540	.001	-.1990	-.0577
	1% 90 min	1% 30 min	-.34851(*)	.03540	.000	-.4192	-.2778
		1% 60 min	-.00973	.03540	.784	-.0804	.0609

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	2% 30 min	-1.37856(*)	.03540	.000	-1.4492	-1.3079
	2% 60 min	-1.81130(*)	.03540	.000	-1.8820	-1.7406
	2% 90 min	-.13808(*)	.03540	.000	-.2088	-.0674
2% 30 min	1% 30 min	1.03005(*)	.03540	.000	.9594	1.1007
	1% 60 min	1.36882(*)	.03540	.000	1.2981	1.4395
	1% 90 min	1.37856(*)	.03540	.000	1.3079	1.4492
	2% 60 min	-.43274(*)	.03540	.000	-.5034	-.3621
	2% 90 min	1.24047(*)	.03540	.000	1.1698	1.3112
2% 60 min	1% 30 min	1.46279(*)	.03540	.000	1.3921	1.5335
	1% 60 min	1.80157(*)	.03540	.000	1.7309	1.8722
	1% 90 min	1.81130(*)	.03540	.000	1.7406	1.8820
	2% 30 min	.43274(*)	.03540	.000	.3621	.5034
	2% 90 min	1.67322(*)	.03540	.000	1.6025	1.7439
2% 90 min	1% 30 min	-.21042(*)	.03540	.000	-.2811	-.1397
	1% 60 min	.12835(*)	.03540	.001	.0577	.1990
	1% 90 min	.13808(*)	.03540	.000	.0674	.2088
	2% 30 min	-1.24047(*)	.03540	.000	-1.3112	-1.1698
	2% 60 min	-1.67322(*)	.03540	.000	-1.7439	-1.6025

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.13 การศึกษาผลของน้ำตาลทั้งหมดจากการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มด้วยการให้ความร้อน (การต้ม)

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	496.765	3	165.588	609.943	.000
Within Groups	7.601	28	.271		
Total	504.366	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	-1.97000(*)	.26052	.000	-2.5036	-1.4364
		90 min	-6.66625(*)	.26052	.000	-7.1999	-6.1326
		control	-10.05625(*)	.26052	.000	-10.5899	-9.5226
	60 min	30 min	1.97000(*)	.26052	.000	1.4364	2.5036
		90 min	-4.69625(*)	.26052	.000	-5.2299	-4.1626
		control	-8.08625(*)	.26052	.000	-8.6199	-7.5526
	90 min	30 min	6.66625(*)	.26052	.000	6.1326	7.1999
		60 min	4.69625(*)	.26052	.000	4.1626	5.2299
		control	-3.39000(*)	.26052	.000	-3.9236	-2.8564
	control	30 min	10.05625(*)	.26052	.000	9.5226	10.5899
		60 min	8.08625(*)	.26052	.000	7.5526	8.6199
		90 min	3.39000(*)	.26052	.000	2.8564	3.9236

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.14 การศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์จากการเตรียมวัตถุดิบจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มด้วยการให้ความร้อน (การต้ม)

ANOVA

Reducing sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.837	3	4.612	834.747	.000
Within Groups	.243	44	.006		
Total	14.080	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	30 min	60 min	.45667(*)	.03035	.000	.3955	.5178
		90 min	1.34750(*)	.03035	.000	1.2863	1.4087
		control	.06750(*)	.03035	.031	.0063	.1287
	60 min	30 min	-.45667(*)	.03035	.000	-.5178	-.3955
		90 min	.89083(*)	.03035	.000	.8297	.9520
		control	-.38917(*)	.03035	.000	-.4503	-.3280
	90 min	30 min	-1.34750(*)	.03035	.000	-1.4087	-1.2863
		60 min	-.89083(*)	.03035	.000	-.9520	-.8297
		control	-1.28000(*)	.03035	.000	-1.3412	-1.2188
	control	30 min	-.06750(*)	.03035	.031	-.1287	-.0063
		60 min	.38917(*)	.03035	.000	.3280	.4503
		90 min	1.28000(*)	.03035	.000	1.2188	1.3412

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.15 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรด ซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับความร้อน (การต้ม)

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	47099.983	7	6728.569	1345.533	.000
Within Groups	280.038	56	5.001		
Total	47380.020	63			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	1%acid	1%acid30	-3.23250(*)	1.11811	.005	-5.4723	-.9927
		1%acid60	-5.74125(*)	1.11811	.000	-7.9811	-3.5014
		1%acid90	-32.13625(*)	1.11811	.000	-34.3761	-29.8964
		1%boil	13.40875(*)	1.11811	.000	11.1689	15.6486
		1%boil30	-68.54500(*)	1.11811	.000	-70.7848	-66.3052
		1%boil60	-50.93125(*)	1.11811	.000	-53.1711	-48.6914
		1%boil90	-43.28625(*)	1.11811	.000	-45.5261	-41.0464
	1%acid30	1%acid	3.23250(*)	1.11811	.005	.9927	5.4723
		1%acid60	-2.50875(*)	1.11811	.029	-4.7486	-.2689
		1%acid90	-28.90375(*)	1.11811	.000	-31.1436	-26.6639
		1%boil	16.64125(*)	1.11811	.000	14.4014	18.8811

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	1%boil30	-65.31250(*)	1.11811	.000	-67.5523	-63.0727
	1%boil60	-47.69875(*)	1.11811	.000	-49.9386	-45.4589
	1%boil90	-40.05375(*)	1.11811	.000	-42.2936	-37.8139
1%acid60	1%acid	5.74125(*)	1.11811	.000	3.5014	7.9811
	1%acid30	2.50875(*)	1.11811	.029	.2689	4.7486
	1%acid90	-26.39500(*)	1.11811	.000	-28.6348	-24.1552
	1%boil	19.15000(*)	1.11811	.000	16.9102	21.3898
	1%boil30	-62.80375(*)	1.11811	.000	-65.0436	-60.5639
	1%boil60	-45.19000(*)	1.11811	.000	-47.4298	-42.9502
	1%boil90	-37.54500(*)	1.11811	.000	-39.7848	-35.3052
1%acid90	1%acid	32.13625(*)	1.11811	.000	29.8964	34.3761
	1%acid30	28.90375(*)	1.11811	.000	26.6639	31.1436
	1%acid60	26.39500(*)	1.11811	.000	24.1552	28.6348
	1%boil	45.54500(*)	1.11811	.000	43.3052	47.7848
	1%boil30	-36.40875(*)	1.11811	.000	-38.6486	-34.1689
	1%boil60	-18.79500(*)	1.11811	.000	-21.0348	-16.5552
	1%boil90	-11.15000(*)	1.11811	.000	-13.3898	-8.9102
1%boil	1%acid	-13.40875(*)	1.11811	.000	-15.6486	-11.1689
	1%acid30	-16.64125(*)	1.11811	.000	-18.8811	-14.4014
	1%acid60	-19.15000(*)	1.11811	.000	-21.3898	-16.9102
	1%acid90	-45.54500(*)	1.11811	.000	-47.7848	-43.3052
	1%boil30	-81.95375(*)	1.11811	.000	-84.1936	-79.7139
	1%boil60	-64.34000(*)	1.11811	.000	-66.5798	-62.1002
	1%boil90	-56.69500(*)	1.11811	.000	-58.9348	-54.4552
1%boil30	1%acid	68.54500(*)	1.11811	.000	66.3052	70.7848
	1%acid30	65.31250(*)	1.11811	.000	63.0727	67.5523
	1%acid60	62.80375(*)	1.11811	.000	60.5639	65.0436

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	1%acid90	36.40875(*)	1.11811	.000	34.1689	38.6486
	1%boil	81.95375(*)	1.11811	.000	79.7139	84.1936
	1%boil60	17.61375(*)	1.11811	.000	15.3739	19.8536
	1%boil90	25.25875(*)	1.11811	.000	23.0189	27.4986
1%boil60	1%acid	50.93125(*)	1.11811	.000	48.6914	53.1711
	1%acid30	47.69875(*)	1.11811	.000	45.4589	49.9386
	1%acid60	45.19000(*)	1.11811	.000	42.9502	47.4298
	1%acid90	18.79500(*)	1.11811	.000	16.5552	21.0348
	1%boil	64.34000(*)	1.11811	.000	62.1002	66.5798
	1%boil30	-17.61375(*)	1.11811	.000	-19.8536	-15.3739
	1%boil90	7.64500(*)	1.11811	.000	5.4052	9.8848
1%boil90	1%acid	43.28625(*)	1.11811	.000	41.0464	45.5261
	1%acid30	40.05375(*)	1.11811	.000	37.8139	42.2936
	1%acid60	37.54500(*)	1.11811	.000	35.3052	39.7848
	1%acid90	11.15000(*)	1.11811	.000	8.9102	13.3898
	1%boil	56.69500(*)	1.11811	.000	54.4552	58.9348
	1%boil30	-25.25875(*)	1.11811	.000	-27.4986	-23.0189
	1%boil60	-7.64500(*)	1.11811	.000	-9.8848	-5.4052

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.16 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรด ซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับความร้อน (การต้ม)

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	182.021	7	26.003	3629.190	.000
Within Groups	.631	88	.007		
Total	182.652	95			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	1%acid	1%acid30	-.06833	.03456	.051	-.1370	.0003
		1%acid60	-1.53917(*)	.03456	.000	-1.6078	-1.4705
		1%acid90	-2.86667(*)	.03456	.000	-2.9353	-2.7980
		1%boil	.57583(*)	.03456	.000	.5072	.6445
		1%boil30	.90500(*)	.03456	.000	.8363	.9737
		1%boil60	1.13333(*)	.03456	.000	1.0647	1.2020
		1%boil90	1.47000(*)	.03456	.000	1.4013	1.5387
	1%acid30	1%acid	.06833	.03456	.051	-.0003	.1370
		1%acid60	-1.47083(*)	.03456	.000	-1.5395	-1.4022
		1%acid90	-2.79833(*)	.03456	.000	-2.8670	-2.7297
		1%boil	.64417(*)	.03456	.000	.5755	.7128
		1%boil30	.97333(*)	.03456	.000	.9047	1.0420
		1%boil60	1.20167(*)	.03456	.000	1.1330	1.2703

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
1%acid60	1%acid	1.53917(*)	.03456	.000	1.4705	1.6078
	1%acid30	1.47083(*)	.03456	.000	1.4022	1.5395
	1%acid90	-1.32750(*)	.03456	.000	-1.3962	-1.2588
	1%boil	2.11500(*)	.03456	.000	2.0463	2.1837
	1%boil30	2.44417(*)	.03456	.000	2.3755	2.5128
	1%boil60	2.67250(*)	.03456	.000	2.6038	2.7412
	1%boil90	3.00917(*)	.03456	.000	2.9405	3.0778
1%acid90	1%acid	2.86667(*)	.03456	.000	2.7980	2.9353
	1%acid30	2.79833(*)	.03456	.000	2.7297	2.8670
	1%acid60	1.32750(*)	.03456	.000	1.2588	1.3962
	1%boil	3.44250(*)	.03456	.000	3.3738	3.5112
	1%boil30	3.77167(*)	.03456	.000	3.7030	3.8403
	1%boil60	4.00000(*)	.03456	.000	3.9313	4.0687
	1%boil90	4.33667(*)	.03456	.000	4.2680	4.4053
1%boil	1%acid	-.57583(*)	.03456	.000	-.6445	-.5072
	1%acid30	-.64417(*)	.03456	.000	-.7128	-.5755
	1%acid60	-2.11500(*)	.03456	.000	-2.1837	-2.0463
	1%acid90	-3.44250(*)	.03456	.000	-3.5112	-3.3738
	1%boil30	.32917(*)	.03456	.000	.2605	.3978
	1%boil60	.55750(*)	.03456	.000	.4888	.6262
	1%boil90	.89417(*)	.03456	.000	.8255	.9628
1%boil30	1%acid	-.90500(*)	.03456	.000	-.9737	-.8363
	1%acid30	-.97333(*)	.03456	.000	-1.0420	-.9047
	1%acid60	-2.44417(*)	.03456	.000	-2.5128	-2.3755
	1%acid90	-3.77167(*)	.03456	.000	-3.8403	-3.7030
	1%boil	-.32917(*)	.03456	.000	-.3978	-.2605

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	1%boil60	.22833(*)	.03456	.000	.1597	.2970
	1%boil90	.56500(*)	.03456	.000	.4963	.6337
1%boil60	1%acid	-1.13333(*)	.03456	.000	-1.2020	-1.0647
	1%acid30	-1.20167(*)	.03456	.000	-1.2703	-1.1330
	1%acid60	-2.67250(*)	.03456	.000	-2.7412	-2.6038
	1%acid90	-4.00000(*)	.03456	.000	-4.0687	-3.9313
	1%boil	-.55750(*)	.03456	.000	-.6262	-.4888
	1%boil30	-.22833(*)	.03456	.000	-.2970	-.1597
	1%boil90	.33667(*)	.03456	.000	.2680	.4053
1%boil90	1%acid	-1.47000(*)	.03456	.000	-1.5387	-1.4013
	1%acid30	-1.53833(*)	.03456	.000	-1.6070	-1.4697
	1%acid60	-3.00917(*)	.03456	.000	-3.0778	-2.9405
	1%acid90	-4.33667(*)	.03456	.000	-4.4053	-4.2680
	1%boil	-.89417(*)	.03456	.000	-.9628	-.8255
	1%boil30	-.56500(*)	.03456	.000	-.6337	-.4963
	1%boil60	-.33667(*)	.03456	.000	-.4053	-.2680

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.17 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยปริมาตรเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร่วมกับความร้อน (การต้ม)

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5752.735	7	821.819	1050.637	.000
Within Groups	43.804	56	.782		
Total	5796.539	63			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	2%alk	2%alk30	14.86375(*)	.44221	.000	13.9779	15.7496
		2%alk60	-3.44500(*)	.44221	.000	-4.3309	-2.5591
		2%alk90	-11.70750(*)	.44221	.000	-12.5934	-10.8216
		2%boil	-11.70750(*)	.44221	.000	-12.5934	-10.8216
		2%boil30	-17.38125(*)	.44221	.000	-18.2671	-16.4954
		2%boil60	-11.79875(*)	.44221	.000	-12.6846	-10.9129
		2%boil90	-9.74500(*)	.44221	.000	-10.6309	-8.8591
	2%alk30	2%alk	-14.86375(*)	.44221	.000	-15.7496	-13.9779
		2%alk60	-18.30875(*)	.44221	.000	-19.1946	-17.4229
		2%alk90	-26.57125(*)	.44221	.000	-27.4571	-25.6854
		2%boil	-26.57125(*)	.44221	.000	-27.4571	-25.6854
		2%boil30	-32.24500(*)	.44221	.000	-33.1309	-31.3591
		2%boil60	-26.66250(*)	.44221	.000	-27.5484	-25.7766

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	2%boil90	-24.60875(*)	.44221	.000	-25.4946	-23.7229
2%alk60	2%alk	3.44500(*)	.44221	.000	2.5591	4.3309
	2%alk30	18.30875(*)	.44221	.000	17.4229	19.1946
	2%alk90	-8.26250(*)	.44221	.000	-9.1484	-7.3766
	2%boil	-8.26250(*)	.44221	.000	-9.1484	-7.3766
	2%boil30	-13.93625(*)	.44221	.000	-14.8221	-13.0504
	2%boil60	-8.35375(*)	.44221	.000	-9.2396	-7.4679
	2%boil90	-6.30000(*)	.44221	.000	-7.1859	-5.4141
2%alk90	2%alk	11.70750(*)	.44221	.000	10.8216	12.5934
	2%alk30	26.57125(*)	.44221	.000	25.6854	27.4571
	2%alk60	8.26250(*)	.44221	.000	7.3766	9.1484
	2%boil	.00000	.44221	1.000	-.8859	.8859
	2%boil30	-5.67375(*)	.44221	.000	-6.5596	-4.7879
	2%boil60	-.09125	.44221	.837	-.9771	.7946
	2%boil90	1.96250(*)	.44221	.000	1.0766	2.8484
2%boil	2%alk	11.70750(*)	.44221	.000	10.8216	12.5934
	2%alk30	26.57125(*)	.44221	.000	25.6854	27.4571
	2%alk60	8.26250(*)	.44221	.000	7.3766	9.1484
	2%alk90	.00000	.44221	1.000	-.8859	.8859
	2%boil30	-5.67375(*)	.44221	.000	-6.5596	-4.7879
	2%boil60	-.09125	.44221	.837	-.9771	.7946
	2%boil90	1.96250(*)	.44221	.000	1.0766	2.8484
2%boil30	2%alk	17.38125(*)	.44221	.000	16.4954	18.2671
	2%alk30	32.24500(*)	.44221	.000	31.3591	33.1309
	2%alk60	13.93625(*)	.44221	.000	13.0504	14.8221
	2%boil	5.67375(*)	.44221	.000	4.7879	6.5596

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	2%boil60	5.58250(*)	.44221	.000	4.6966	6.4684
	2%boil90	7.63625(*)	.44221	.000	6.7504	8.5221
2%boil60	2%alk	11.79875(*)	.44221	.000	10.9129	12.6846
	2%alk30	26.66250(*)	.44221	.000	25.7766	27.5484
	2%alk60	8.35375(*)	.44221	.000	7.4679	9.2396
	2%alk90	.09125	.44221	.837	-.7946	.9771
	2%boil	.09125	.44221	.837	-.7946	.9771
	2%boil30	-5.58250(*)	.44221	.000	-6.4684	-4.6966
	2%boil90	2.05375(*)	.44221	.000	1.1679	2.9396
2%boil90	2%alk	9.74500(*)	.44221	.000	8.8591	10.6309
	2%alk30	24.60875(*)	.44221	.000	23.7229	25.4946
	2%alk60	6.30000(*)	.44221	.000	5.4141	7.1859
	2%alk90	-1.96250(*)	.44221	.000	-2.8484	-1.0766
	2%boil	-1.96250(*)	.44221	.000	-2.8484	-1.0766
	2%boil30	-7.63625(*)	.44221	.000	-8.5221	-6.7504
	2%boil60	-2.05375(*)	.44221	.000	-2.9396	-1.1679

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.18 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยปริมาตรเปรียบเทียบการเตรียมวัตถุดิบด้วยด่างโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร่วมกับความร้อน (การต้ม)

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	210.761	7	30.109	14808.259	.000
Within Groups	.179	88	.002		
Total	210.940	95			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	1%alk	1%alk30	-1.02727(*)	.01841	.000	-1.0638	-.9907
		1%alk60	-1.46001(*)	.01841	.000	-1.4966	-1.4234
		1%alk90	.21321(*)	.01841	.000	.1766	.2498
		1%boil	-1.46001(*)	.01841	.000	-1.4966	-1.4234
		1%boil30	.38821(*)	.01841	.000	.3516	.4248
		1%boil60	1.36904(*)	.01841	.000	1.3325	1.4056
		1%boil90	3.21988(*)	.01841	.000	3.1833	3.2565
	1%alk30	1%alk	1.02727(*)	.01841	.000	.9907	1.0638
		1%alk60	-.43274(*)	.01841	.000	-.4693	-.3962
		1%alk90	1.24047(*)	.01841	.000	1.2039	1.2771
		1%boil	-.43274(*)	.01841	.000	-.4693	-.3962

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	1%boil60	2.39631(*)	.01841	.000	2.3597	2.4329
	1%boil90	4.24714(*)	.01841	.000	4.2106	4.2837
1%alk60	1%alk	1.46001(*)	.01841	.000	1.4234	1.4966
	1%alk30	.43274(*)	.01841	.000	.3962	.4693
	1%alk90	1.67322(*)	.01841	.000	1.6366	1.7098
	1%boil	.00000	.01841	1.000	-.0366	.0366
	1%boil30	1.84822(*)	.01841	.000	1.8116	1.8848
	1%boil60	2.82905(*)	.01841	.000	2.7925	2.8656
	1%boil90	4.67988(*)	.01841	.000	4.6433	4.7165
1%alk90	1%alk	-.21321(*)	.01841	.000	-.2498	-.1766
	1%alk30	-1.24047(*)	.01841	.000	-1.2771	-1.2039
	1%alk60	-1.67322(*)	.01841	.000	-1.7098	-1.6366
	1%boil	-1.67322(*)	.01841	.000	-1.7098	-1.6366
	1%boil30	.17500(*)	.01841	.000	.1384	.2116
	1%boil60	1.15583(*)	.01841	.000	1.1193	1.1924
	1%boil90	3.00667(*)	.01841	.000	2.9701	3.0432
1%boil	1%alk	1.46001(*)	.01841	.000	1.4234	1.4966
	1%alk30	.43274(*)	.01841	.000	.3962	.4693
	1%alk60	.00000	.01841	1.000	-.0366	.0366
	1%alk90	1.67322(*)	.01841	.000	1.6366	1.7098
	1%boil30	1.84822(*)	.01841	.000	1.8116	1.8848
	1%boil60	2.82905(*)	.01841	.000	2.7925	2.8656
	1%boil90	4.67988(*)	.01841	.000	4.6433	4.7165
1%boil30	1%alk	-.38821(*)	.01841	.000	-.4248	-.3516
	1%alk30	-1.41547(*)	.01841	.000	-1.4521	-1.3789

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	1%alk90	-.17500(*)	.01841	.000	-.2116	-.1384
	1%boil	-1.84822(*)	.01841	.000	-1.8848	-1.8116
	1%boil60	.98083(*)	.01841	.000	.9443	1.0174
	1%boil90	2.83167(*)	.01841	.000	2.7951	2.8682
1%boil60	1%alk	-1.36904(*)	.01841	.000	-1.4056	-1.3325
	1%alk30	-2.39631(*)	.01841	.000	-2.4329	-2.3597
	1%alk60	-2.82905(*)	.01841	.000	-2.8656	-2.7925
	1%alk90	-1.15583(*)	.01841	.000	-1.1924	-1.1193
	1%boil	-2.82905(*)	.01841	.000	-2.8656	-2.7925
	1%boil30	-.98083(*)	.01841	.000	-1.0174	-.9443
	1%boil90	1.85083(*)	.01841	.000	1.8143	1.8874
1%boil90	1%alk	-3.21988(*)	.01841	.000	-3.2565	-3.1833
	1%alk30	-4.24714(*)	.01841	.000	-4.2837	-4.2106
	1%alk60	-4.67988(*)	.01841	.000	-4.7165	-4.6433
	1%alk90	-3.00667(*)	.01841	.000	-3.0432	-2.9701
	1%boil	-4.67988(*)	.01841	.000	-4.7165	-4.6433
	1%boil30	-2.83167(*)	.01841	.000	-2.8682	-2.7951
	1%boil60	-1.85083(*)	.01841	.000	-1.8874	-1.8143

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.19 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับการให้ความร้อนและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อน

ANOVA

Total Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37300.108	3	12433.369	1282.468	.000
Within Groups	271.457	28	9.695		
Total	37571.564	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Total Sugar

	(I) method	(J) method	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	pre enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	post enz.cellulase (1% acid 90 min +boiling 30 min)	86.40375(*)	1.55683	.000	83.2147	89.5928
		pre enz.cellulase (2% alkaline 60 min + boiling 30 min)	51.16375(*)	1.55683	.000	47.9747	54.3528
		post enz.cellulase (2% alkaline 60 min + boiling 30 min)	80.25445(*)	1.55683	.000	77.0654	83.4435

(I) method	(J) method	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
post enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	pre enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	-86.40375(*)	1.55683	.000	-89.5928	-83.2147
	pre enz.cellulase (2% alkaline 60 min + boiling 30 min)	-35.24000(*)	1.55683	.000	-38.4290	-32.0510
	post enz.cellulase (2% alkaline 60 min + boiling 30 min)	-6.14930(*)	1.55683	.000	-9.3383	-2.9603
pre enz.cellulase (2% alkaline 60 min + boiling 30 min)	pre enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	-51.16375(*)	1.55683	.000	-54.3528	-47.9747
	post enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	35.24000(*)	1.55683	.000	32.0510	38.4290
	post enz.cellulase (2% alkaline 60 min + boiling 30 min)	29.09070(*)	1.55683	.000	25.9017	32.2797
post enz.cellulase (2% alkaline 60 min + boiling 30 min)	pre enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	-80.25445(*)	1.55683	.000	-83.4435	-77.0654

(I) method	(J) method	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
	post enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	6.14930(*)	1.55683	.000	2.9603	9.3383
	pre enz.cellulase (2% alkaline 60 min + boiling 30 min)	-29.09070(*)	1.55683	.000	-32.2797	-25.9017

* The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางภาคผนวกที่ ค.20 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ในน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับการให้ความร้อนและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อน

ANOVA

Reducing Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.247	3	11.416	282.851	.000
Within Groups	1.776	44	.040		
Total	36.023	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reducing Sugar

	(I) method	(J) method	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	pre enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	post enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	-.29833(*)	.08202	.001	-.4636	-.1330
		pre enz.cellulase (2% alkaline 60 min + 30 min)	-.51500(*)	.08202	.000	-.6803	-.3497
		post enz.cellulase (2% alkaline 60 min + 30 min)	1.63333(*)	.08202	.000	1.4680	1.7986
	post enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	pre enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	.29833(*)	.08202	.001	.1330	.4636
		pre enz.cellulase (2% alkaline 60 min + 30 min)	-.21667(*)	.08202	.011	-.3820	-.0514
		post enz.cellulase (2% alkaline 60 min + 30 min)	1.93167(*)	.08202	.000	1.7664	2.0970
	pre enz.cellulase (2% alkaline 60 min + 30 min)	pre enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	.51500(*)	.08202	.000	.3497	.6803
		post enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	.21667(*)	.08202	.011	.0514	.3820
		post enz.cellulase (2% alkaline 60 min + 30 min)	2.14833(*)	.08202	.000	1.9830	2.3136

(I) method	(J) method	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
post enz.cellulase (2% alkaline 60 min + 30 min)	pre enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	-1.63333(*)	.08202	.000	-1.7986	-1.4680
	post enz.cellulase (1% acid 90 min + boiling 30 min)	-1.93167(*)	.08202	.000	-2.0970	-1.7664
	pre enz.cellulase (2% alkaline 60 min + 30 min)	-2.14833(*)	.08202	.000	-2.3136	-1.9830

*The mean difference is significant at the .05 level.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวบุษยมาศ เหมณี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010920013

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน (ถ้ามี)

บุษยมาศ เหมณี ธันวดี เตชะภัททวรกุล สุขสาโรจน์ และปิยะรัตน์ บุญแสวง. 2552. กระบวนการปรับสภาพน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล. การประชุมวิชาการทางวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ครั้งที่ 7. ระหว่าง วันที่ 21 - 22 พฤษภาคม 2552.