วว.TISTR

โครงการวิจัยที่ ภ.57-09/ย.2/รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การพัฒนาการออกแบบและจัดสร้างปฏิกรณ์ต้นแบบที่ใช้ในขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบและการไฮโดรไลซีสในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทเส้นใย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ.57-09
การสร้างสรรค์นวัตกรรมสีเขียวจากการพัฒนาเทคโนโลยี
การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากลิกโนเซลลูโลส

โครงการย่อยที่ 2
การพัฒนาการออกแบบและจัดสร้างปฏิกรณ์ต้นแบบที่ใช้ในขั้นตอน
การปรับสภาพวัตถุดิบและการไฮโดรไลซีสใน
กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทเส้นใย

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
การพัฒนาการออกแบบและจัดสร้างปฏิกรณ์ต้นแบบที่ใช้ในขั้นตอน
การปรับสภาพวัตถุดิบและการไฮโดรไลซีสใน
กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทเส้นใย

โดย

วิษณุ ปั้นพันธุ์ **เอกรัตน์ วุฒิเวทย์**
สุทธิ์กมล สุทธิกุล **เทพฤทธิ์ กัณหานนท์**
กิตติ อรสูญ **จิรัสย์ สิรินิวัฒน์กุล**

บรรณาธิการ วว., ปทุมธานี 2559
ศิระ ศิลานนท์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
ศิริสุข ศรีสุข

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางลักษมี ปลั่งแสงมาศ)
ผู้ว่าการ

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง	ข
สารบัญรูป	ค
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	21
3 ผลการวิจัยและวิจารณ์	27
4 สรุปผลการวิจัย	33
5 แนวทางการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	34
6 ข้อเสนอแนะ	35
7. เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	41

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของฟางข้าว 21

ตารางที่ 5.1 กลุ่มเป้าหมายการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ รูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์ ผลลัพธ์และผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้น 34

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1	การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดต่างๆ	6
รูปที่ 1.2	โครงสร้างในพืชประกอบด้วยเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	7
รูปที่ 1.3	ลักษณะการจัดเรียงตัวของกลูโคสโมเลกุลในสายโซ่เซลลูโลส	8
รูปที่ 1.4	โครงสร้างสายโซ่ไซเลนจาก (ก) ไม้เนื้อแข็ง และ (ข) ไม้เนื้ออ่อน	9
รูปที่ 1.5	โครงสร้างสายโซ่ของลิกนิน	10
รูปที่ 1.6	กิจกรรมเอนไซม์สำหรับการไฮโดรไลซิสของไซเลนฟางข้าวสาลี	15
รูปที่ 1.7	เครื่องปฏิกรณ์แนวนอนจากงานวิจัยของ Dasari *et al*. (2009)	17
รูปที่ 1.8	เครื่องปฏิกรณ์แนวนอนจากงานวิจัยของ Jorgensen *et al*. (2006)	17
รูปที่ 1.9	ใบกวนแบบ Helical	18
รูปที่ 1.10	ใบกวนแบบ Rushton	19
รูปที่ 1.11	ใบกวนแบบ plate and frame (a) และ ใบกวนแบบ double-curved-blade (b)	19
รูปที่ 1.12	เครื่องปฏิกรณ์แบบ peg mixer	20
รูปที่ 2.1	การทดลองเพื่อหาวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมก่อนทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์	23
รูปที่ 2.2	ใบกวนแบบ Helix 1	24
รูปที่ 2.3	ใบกวนแบบ Helix 2	25
รูปที่ 2.4	ใบกวนแบบ Plate	25
รูปที่ 2.5	ใบกวนแบบ Rushton	25
รูปที่ 3.1	สมดุลมวลการปรับสภาพด้วยเบสและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์	27
รูปที่ 3.2	สมดุลมวลการปรับสภาพด้วยกรดและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์	27
รูปที่ 3.3	สมดุลมวลการปรับสภาพสองขั้นตอนด้วยเบสและกรด และการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์	28
รูปที่ 3.4	สมดุลมวลการปรับสภาพสองขั้นตอนด้วยกรดและเบส และการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์	28
รูปที่ 3.5	เปรียบเทียบลักษณะใบกวนที่มีผลต่อร้อยละการเปลี่ยนแปลงเทียบเวลา	29
รูปที่ 3.6	เปรียบเทียบลักษณะใบกวนที่มีผลต่อความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเวลา	30
รูปที่ 3.7	ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตที่ส่งผลต่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์	31
รูปที่ 3.8	ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตที่ส่งผลต่อร้อยละการเปลี่ยนแปลง	32

DESIGNING AND CONSTRUCTIONAL DEVELOPMENT ON PROTOTYPE OF RAW MATERIAL PRETREATMENT AND HYDROLYSIS UNITS FOR CELLULOSIC ETHANOL PRODUCTION

Vishnu Panphan, Ekarat Vutivet, Suthkamol Suttikul,
Thapparait Kunhanont, Kitti Orasoon and Jirous Siriniwatkul

ABSTRACT

In this study, the novel 2 impellers (Hellix1 and Hellix2), were designed and applied to enzymatic saccharification of sugarcane trash, compared with the 2 common impellers (Plate and Rushton). The reducing sugar concentration from enzymatic saccharification of sugarcane trash using these 4 impellers was compared. As the mixing between the solid lignocellulose and the enzymes was crucially important, the function of the impeller was, therefore, essential in the process in order to produce maximum sugar concentration, leading to high ethanol yield and low overall production cost.

The optimum condition of pretreatment was conducted using 15%w/v dried solid (DS) of sugarcane trash, pretreated with 2%w/v NaOH autoclave at 121°C, 1.5 bar for 15 min. The pretreated sugarcane trash consisted of 13% NDS, 17.5% hemicellulose, 63.78% cellulose, 2.98% lignin and 2.32% ash which were used as substrate for enzymatic saccharification.

The performance of enzymatic saccharification using 4 impellers i.e. Plate, Rushton, Hellix1 and Hellix2 in a bioreactor were compared by analyzing the sugar concentration, under the condition of enzymatic saccharification using 15%w/v substrate, 5 FPU/g DS of Cellic® CTEC2, agitation speed of 150-250 rpm at 50°C for 48 hrs. The results showed that % conversion was 69, 68, 71, and 83%, respectively, and sugar concentrations were 89, 88, 92, and 101 g/l, respectively. These results could be concluded that the Hellix2 impeller gave highest efficiency to produce sugar.

The increase in substrate concentration from 15 to 45%w/v resulted in an increase of sugar concentration from 101 to 254 g/l.

การพัฒนาการออกแบบและจัดสร้างปฏิกรณ์ต้นแบบที่ใช้ในขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบและการไฮโดรไลซีสในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทเส้นใย

วิษณุ ปั้นพันธุ์[1], เอกรัตน์ วุฒิเวทย์[2], สุทธิ์กมล สุทธิกุล[1], เทพฤทธิ์ กัณหานนท์[1], กิตติ อรสูญ[1] และ จิรัสย์ สิรินิวัฒน์กุล[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการปรับเปลี่ยนใบกวนเพื่อไฮโดรไลซิสเอนไซม์ที่ความหนาแน่นสูง (high gravity hydrolysis) ซึ่งในปัจจุบันลักษณะใบกวนในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเดิมไม่สามารถตอบโจทย์ในการไฮโดรไลซิสในรูปแบบสเลอรีได้ ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของใบกวนจึงมีความจำเป็นในการทำการทดสอบ เพื่อให้สามารถทำการผลิตที่สภาวะความเข้มข้นสูงได้ทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยรวมลดลง.

จากการเปรียบเทียบการปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า สภาวะเหมาะสมที่ใช้ในการปรับสภาพชีวมวลยอดและใบอ้อย คือ การปรับสภาพในหม้อต้มความดัน (Auto-Clave) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) NaOH สัดส่วนของวัตถุดิบยอดและใบอ้อยและสารละลายเบสเท่ากับร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) โดยองค์ประกอบที่ได้จากการปรับสภาพประกอบด้วย NDS ร้อยละ 13, เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 17.15, เซลลูโลสร้อยละ 63.78, ลิกนินร้อยละ 2.98 และเถ้าร้อยละ 2.32 ซึ่งจะใช้เป็นซับสเตรตในขั้นตอนของการไฮไดรไลซิส.

จากผลการเปรียบเทียบใบกวนระหว่าง ใบกวนแบบ Plate, ใบกวนแบบ Rushton, ใบกวนแบบ Helix 1 และใบกวนแบบ Helix 2 โดยทำการการไฮโดรไลซิสซับสเตรตด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/กรัมซับสเตรต ความเร็วรอบการกวน 150-250 rpm อุณหภูมิ 50°ซ. โดยใช้ความเข้มข้นซับสเตรต 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่า ร้อยละการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเท่ากับ 69, 68, 71 และ 83 ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาปกติที่ใช้ขั้นตอนการแยกไฮโดรไลซิสและการหมัก (Separate Hydrolysis and Fermentation; SHF) เท่ากับ 89, 88, 92 และ 101 ตามลำดับ ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าใบกวนแบบ Helix 2 เป็นใบกวนที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการไฮโดรไลซิส และเมื่อลองเพิ่มซับสเตรตด้วยใช้ใบกวนดังกล่าว พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จาก 101 กรัม/ลิตร เป็น 254 กรัม/ลิตร โดยใช้สัดส่วนของซับสเตรตเพิ่มจากร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นร้อยละ 45 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ได้.

---

[1] ฝ่ายเทคโนโลยีพลังงาน, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

[2] ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร, วว.

1. บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้พลังงานอย่างมหาศาล โดยภาพรวมประเทศไทยมีใช้พลังงานในขั้นตอนสุดท้ายในปี พ.ศ. 2557 เท่ากับ 57,749,000 ตันเทียบเท่าตันน้ำมันดิบ ซึ่งสัดส่วนในการใช้พลังงานขั้นสุดท้ายส่วนใหญ่อยู่ในด้านการขนส่ง (ประมาณร้อยละ 35.2) และอุตสาหกรรม (ประมาณร้อยละ 36.4) (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน 2557) จำเป็นต้องพึ่งการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ ดังนั้น กระทรวงพลังงานจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญในการพัฒนาแหล่งพลังงานหมุนเวียนภายในประเทศโดยได้จัดทำแผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน 2551) (พ.ศ. 2551-2565) เป้าประสงค์หลักของแผน คือ “เพิ่มสัดส่วนการใช้พลังงานทดแทนให้เป็นร้อยละ 20 ของการใช้พลังงานขั้นตอนสุดท้ายของประเทศ” โดยพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนที่ใช้ในการขนส่งที่มีความสำคัญ คือ เอทานอล ซึ่งปัจจุบันได้มาจากกระบวนการหมักชีวมวลที่เป็นพืชอาหารของมนุษย์ โดยเฉพาะอ้อยและมันสำปะหลัง ดังนั้น เอทานอลถือได้ว่าเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นแรก โดยเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่หนึ่งทำให้เกิดปัญหาขัดแย้งวัตถุดิบที่นำมาเป็นอาหารของมนุษย์และนำไปใช้เป็นพลังงาน ส่งผลให้ราคาอาหารในประเทศสูงขึ้นตามมา ดังนั้นจึงมีการรณรงค์ส่งเสริมเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สอง ที่พยายามนำวัสดุเหลือทิ้งและเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น เศษไม้จากโรงเลื่อย, ขี้เลื่อย, ฟางข้าว, แกลบ, ซังข้าวโพด, ยอดและใบอ้อย เป็นต้นมาใช้ผลิตเป็นเอทานอล โดยโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตรนี้จะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ที่สามารถทำการย่อยสลายเพื่อให้กลายเป็นน้ำตาล ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เป็นที่สนใจ คือ ยอดและใบอ้อย เป็นของเหลือทิ้งการจากทำไร่อ้อยในประเทศไทย, จากการรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ในปี พ.ศ. 2553 พบว่า ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกอ้อยรวมทั้งสิ้น 57.044 ล้านไร่ สามารถผลิตปริมาณอ้อยรวมทั้งประเทศ 22.936 ล้านตันและมียอดและใบอ้อยเหลือใช้ประมาณเกือบ 50 ล้านตัน (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2553) ดังนั้น ของที่เหลือจากไร่อ้อยนี้จึงเป็นแหล่งพลังงานชั้นดีของประเทศ แต่การใช้ยอดและใบอ้อยเป็นวัตถุดิบมีปัญหาในเรื่องกระบวนการผลิตให้กลาย

หมายเหตุ: โครงการวิจัยฉบับนี้ได้ปรับเปลี่ยนคำศัพท์เนื้อหาตรวจสอบความถูกต้อง โดยอ้างอิงเกณฑ์ตามราชบัณฑิตสภา ดังเช่น คำว่า ไฮโดรไลซีส เปลี่ยนเป็นไฮโดรไลซิส และยังคงชื่อโครงการไว้ดังเดิม คือ การพัฒนาการออกแบบและจัดสร้างปฏิกรณ์ต้นแบบที่ใช้ในขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบและการไฮโดรไลซีสในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทเส้นใย

เป็นน้ำตาลโดยต้องผ่านกระบวนการ 2 ขั้นตอนด้วยกัน คือ การปรับสภาพยอดและใบอ้อยและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis; Saccharification) ซึ่งกระบวนการทั้งสองนี้ยังไม่เป็นที่ยอมรับในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากค่าใช้จ่ายที่สูงในการดำเนินกระบวนการ และขาดระบบเครื่องปฏิกรณ์ที่มีประสิทธิภาพ (Gan, Allen and Taylor 2002), ดังนั้น การพัฒนาการออกแบบและจัดสร้างปฏิกรณ์ต้นแบบที่ใช้ในขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบและการไฮโดรไลซีสในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสนั้นมีความจำเป็นอย่างมากในการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งด้วยเหตุผลทางด้านความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ ในขั้นตอนของการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์นั้น วว. (ศรีนรคุตรและคณะ 2551, 2553, 2556ก, 2556ข, 2557ค) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการใช้ซับเสตรตความเข้มข้นสูง (High Solid Loading) ในขั้นตอนการไฮโดร-ไลซิสด้วยเอนไซม์ ซึ่งหมายถึง การทำการไฮโดรไลซิสในสภาวะที่มีปริมาณน้ำอิสระ (free water) น้อยมาก ซึ่งจะทำให้ลักษณะของแข็งจะอยู่ในสภาวะของสเลอรี (Slurry) หรือปริมาณของแข็งในน้ำอิสระ ~ ร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) (Modenbach and Nokes 2013) ซึ่งในการไฮโดรไลซิสที่ความเข้มข้นสูงมีสาเหตุมาจากการต้องการความเข้มข้นของน้ำตาลหลังจากไฮโดรไลซิสความเข้มข้นสูง ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วความเข้มข้นน้ำตาลสูงจะนำไปสู่ความเข้มข้นของเอทานอลหลังหมักสูงด้วย ช่วยให้ประหยัดพลังงานในการกลั่นได้มาก โดยความเข้มข้นต่ำที่สุดของเอทานอลที่จะกลั่นได้โดยคุ้มค่ากับพลังงานที่เสียไป คือ ร้อยละ 4 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) นั้น หมายถึง ต้องใช้เฉพาะองค์ประกอบเซลลูโลสในการไฮโดรไลซิสถึงร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก). นอกจากนี้ ความเข้มข้นสูงของทั้งน้ำตาลและเอทานอลยังหมายถึง ขนาดที่เล็กลงของเครื่องปฏิกรณ์ พลังงานที่ต้องการในการให้ความร้อนและการผสมน้อยลง ซึ่งทั้งหมดส่งผลต่อเงินลงทุนและต้นทุนในการผลิต ซึ่งจะส่งให้การผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีความเป็นไปได้มากขึ้นในการผลิตในเชิงพาณิชย์.

1.2 การผลิตเอทานอล

การหมักเอทานอลมีมาตั้งแต่สมัยโบราณ เพื่อใช้เป็นเครื่องดื่ม และเริ่มใช้ในทางด้านอุตสาหกรรมภายหลัง โดยก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 เอทานอลที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้จากการหมักทั้งหมดแต่หลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 สิ้นสุดลง ผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียมมีราคาถูกมาก ทำให้ความต้องการเอทานอลจากการหมักลดลง (ยกเว้นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์) อย่างไรก็ตาม หลังการเกิดภาวการณ์ขาดแคลนน้ำมันครั้งแรก (Oil Crisis 1970s) ทำให้กระบวนการผลิตเอทานอลกลับมามีความสำคัญอีกครั้ง (ศิริโภค 2547) โดยกระบวนการผลิตเอทานอล ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1.1 โดยการผลิตแบ่งขั้นตอนออกเป็น 3 ขั้นตอนได้ ดังนี้

1.2.1 การเตรียมวัตถุดิบก่อนเข้ากระบวนการ

ถ้าวัตถุดิบเป็นน้ำตาลที่ได้มาจากอ้อยหรือใช้กากน้ำตาล (molasses) สามารถนำเข้ากระบวนการหมักได้เลย โดยต้องทำการเจือจางก่อนเพราะมีความหนืดสูง เมื่อวัตถุดิบเป็นพืชที่ให้แป้งต้องทำการบดก่อน แล้วจึงนำเข้าขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล เพื่อให้มีสภาพเหมาะกับการหมักยีสต์ โดยวิธีการย่อยแป้งอาจใช้กรดย่อยแป้ง (acid hydrolysis) หรือใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) ซึ่งวิธีการที่ใช้เอนไซม์เพื่อย่อยแป้งนั้นจะได้รับความนิยมมากกว่า เนื่องจากสะดวกและประหยัดต้นทุนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม การย่อยแป้งจะทำการย่อย 2 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 ย่อยแป้งเพื่อทำให้แป้งมีโมเลกุลเล็กหรือทำให้เหลว (liquefaction) เป็นการเตรียมแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้วิธีการต้มเคี่ยวน้ำแป้งสำปะหลังด้วยเอนไซม์ตัวที่ 1 คือ เอนไซม์ อัลฟา-อะไมเลส (alfa-amylase) โดยใช้การเคี่ยวรักษาอุณหภูมิที่ประมาณ 100°ซ. ใช้เวลา 2 ชั่วโมง.

ครั้งที่ 2 ย่อยแป้งทำให้ได้กลูโคสหรือย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (saccharification) โดยทำให้น้ำแป้งสุก ก่อนผสมกับเอนไซม์ คือ กลูโคส-อะไมเลส (gluco-amylase) หรือ บีตา-อะไมเลส (Beta-Amylase) เพื่อย่อยแป้งสุกให้เป็นน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการการหมัก.

ส่วนการเตรียมวัตถุดิบในผลิตเอทานอลของพวกเซลลูโลส มี 2 วิธีหลัก ได้แก่

การย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolysis) คือ การย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส แล้วหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยยีสต์ กลายเป็นแอลกอฮอล์ แล้วนำผ่านการกลั่นและแยกน้ำจนเป็นเอทานอล.

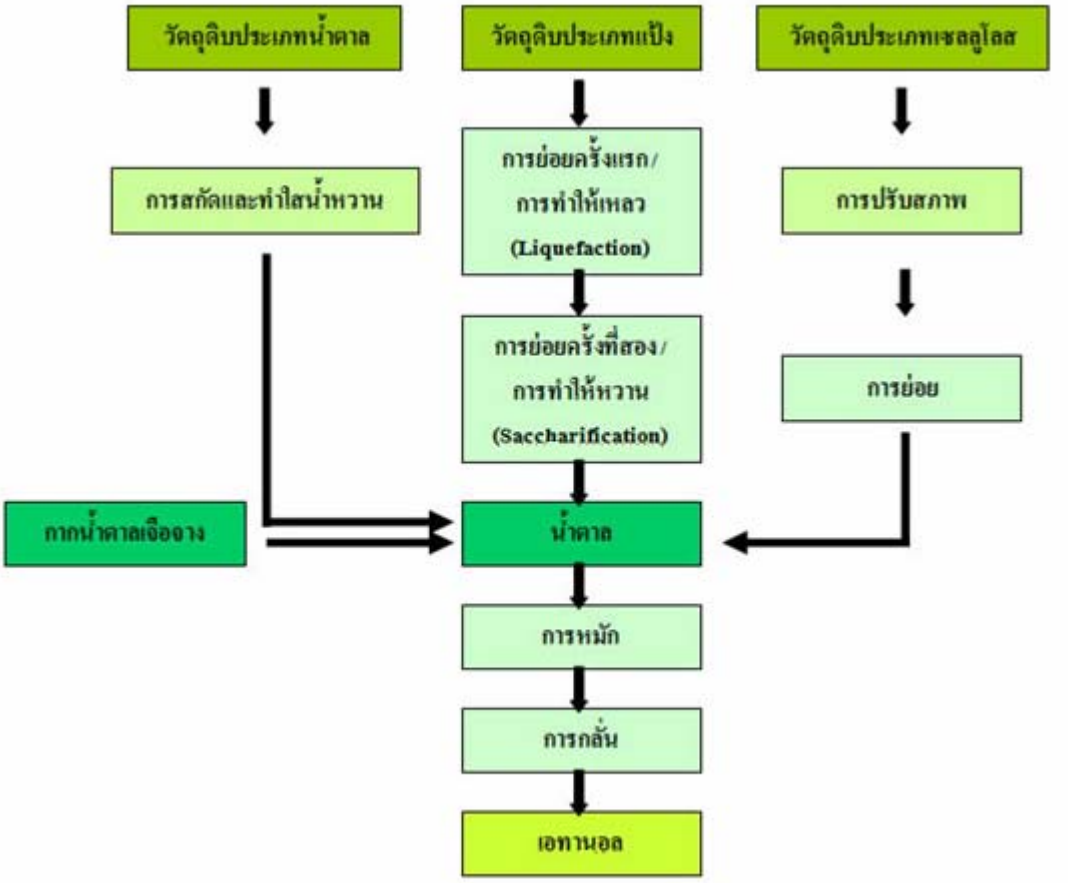
การแปรสภาพเป็นแก๊ส (gasification) คือ การแยกสลายสารประกอบคาร์บอนของวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้กลายเป็นแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide), คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) และไฮโดรเจน (hydrogen) จากนั้น หมักด้วยจุลินทรีย์กลายเป็นแอลกอฮอล์ ผ่านการกลั่นและแยกน้ำจนเป็นเอทานอล.

1.2.2 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการนี้จะทำการเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอล โดยยีสต์ที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป คือ *Saccharomyces cerevisiae* โดยระบบที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง แต่ส่วนใหญ่ยังคงนิยมใช้แบบกะ โดยอุณหภูมิในการหมักทั่วไปใช้อยู่ในช่วง 30 – 35 °ซ. ซึ่งสูงกว่าการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เนื่องจากต้องการเฉพาะเอทานอล จึงไม่ต้องคำนึงถึงสารให้กลิ่นและรส ซึ่งเกิดได้น้อยและระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง การหมักที่อุณหภูมิสูงทำให้การหมักเร็วขึ้นและใช้เวลาในการหมักลดลง จึงช่วยลดต้นทุนในการผลิต (ศิริโภค 2547).

1.2.3 กระบวนการกลั่นและทำให้บริสุทธิ์

การกลั่นเอทานอลนั้นจะทำการกลั่นจนไม่สามารถกลั่นต่อไปได้กลายเป็นสารผสมแอซีโอโทรปิก (ร้อยละ 99.5 ของเอทานอลโดยปริมาตร) โดยการกลั่นขั้นตอนแรก จะใช้หอกลั่นสองหอ หอแรกจะป้อนไอน้ำเข้าไปโดยตรง เนื่องจากในถังหมักยังมีสารอินทรีย์เหลืออยู่เป็นจำนวนมาก, ดังนั้น จึงไม่มีการต้มซ้ำในหอนี้ แต่จะส่งเข้าสู่หอที่สอง สารละลายที่เข้าหอนี้จะมีความเข้มข้นร้อยละ 60 โดยปริมาตร โดยจะทำการต้มกลั่นแบบธรรมดาต่อไป ส่วนในการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้ได้มากกว่าร้อยละ 99.5 สามารถทำได้ 3 กระบวนการ คือ กระบวนการแยกแบบแอซีโอโทรปิก, กระบวนการแยกแบบแวปพอเรชัน และกระบวนการดูดซับ แต่ละกระบวนการมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันไปขึ้นกับผู้ประกอบการณ์จะนำไปใช้ (เตีย และคณะ 2545).

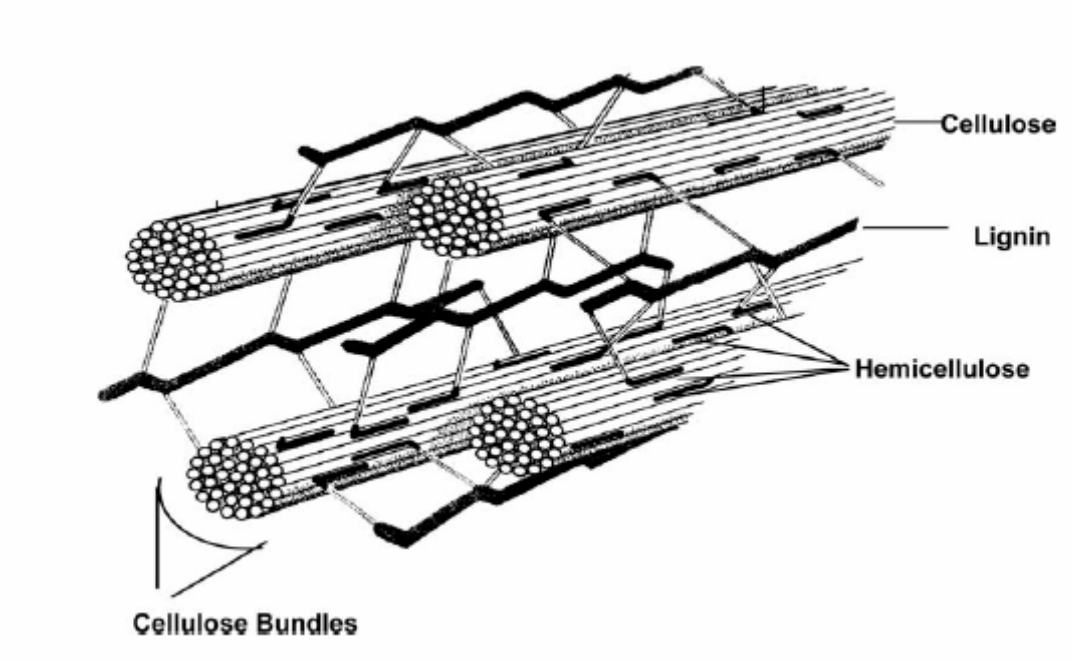


ที่มา: เตีย และคณะ (2545).

รูปที่ 1.1 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดต่างๆ.

1.3 วัสดุลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloses material)

สารประกอบเชิงซ้อนลิกโนเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากที่สุดในโลกและถือว่าเป็นองค์ประกอบหลักที่มีอย่างมากมายของเสียทั้งเหลือจากภายในบ้านและโรงงาน ยิ่งไปกว่านั้นยังมีอยู่ในวัสดุจากธรรมชาติต่างๆ เช่น ไม้, หญ้า และฟาง ด้วยเหตุนี้วัสดุลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นแหล่งวัตถุดิบในกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งมีศักยภาพในระดับอุตสาหกรรมซึ่งแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ และเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการผลิตเชื้อเพลิงธรรมชาติอย่างเอทานอล โดยประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Cardona *et al*. 2010) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างของวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีลักษณะ ดังแสดงในรูปที่ 2.



ที่มา: รอดทัศนะ (2550).

รูปที่ 1.2 โครงสร้างในพืชประกอบด้วยเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน.

1.3.1 เซลลูโลส (cellulose)

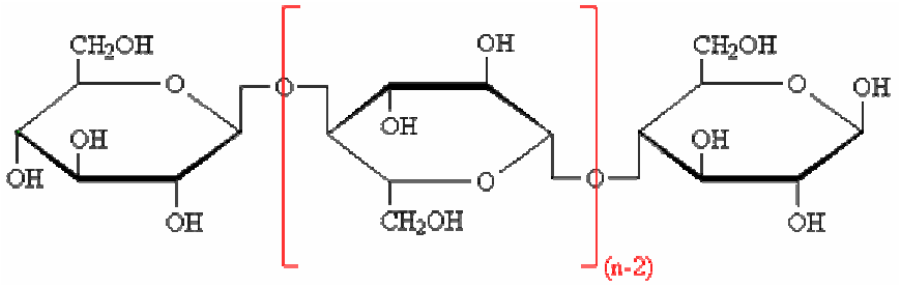
เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช พบตามผนังเซลล์ของพืชทุกชนิดมีหน้าที่ช่วยทำให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง โดยทั่วไปในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักจะพบรวมกับลิกนิน, เฮมิเซลลูโลส, กัม, เพนโทแซน, แทนนิน, ไขมัน และสารให้สี เป็นต้น (รอดทัศนะ 2550) โดยเซลลูโลสเป็นสายโซ่ บีตา-กลูเคน (β-Gucan) และอื่นๆ ซึ่งประกอบไปด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่เชื่อมต่อด้วยพันธะไกลโคสิดิก (glycosidic bond) ระหว่างคาร์บอนตัวที่หนึ่งของกลูโคสกับคาร์บอน

ตัวที่สี่ของกลูโคสตัวถัดไป เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ของคาร์บอนตัวที่หนึ่งอยู่ในตำแหน่ง “บีตา” จึงเรียกพันธะนี้ว่า “บีตา-1, 4-ไกลโคสิดิก” (β-1, 4-glycosidic) การเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสหรือมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อย มีมอนอเมอร์ที่เรียกกันว่า “เซลโลไบโอส” (Cellobiose) ซึ่งประกอบไปด้วยโมเลกุลกลูโคส 2 โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 1.3 ซึ่งระดับขั้นการเกิดพอลิเมอร์ของเซลลูโลส (degree of polymerization) มีประมาณ 7,000 ถึง 15,000 เนื่องจากระหว่างสายโซ่เซลลูโลสจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แล้วเกาะกันเป็นคู่ตามยาวและเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คู่ เรียกว่า “ไมโครไฟบริล” (Microfibrils) จึงทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสมีความแข็งแรงและยากต่อการละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ใดๆ โดยทั่วไปแล้วในองค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลสจะประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 40-60 (Cardona *et al*. 2010) ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามปริมาณการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกได้เป็น 3 ชนิด (รอดทัศนะ 2550) คือ

1. อัลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) คือ เซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอก-ไซด์เข้มข้น ร้อยละ 17.5.

2. บีตา-เซลลูโลส (β-cellulose) คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 17.5 ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด.

3. แกมมา-เซลลูโลส (γ-cellulose) คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอก-ไซด์เข้มข้น ร้อยละ 17.5 และสารละลายกรด ตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์.



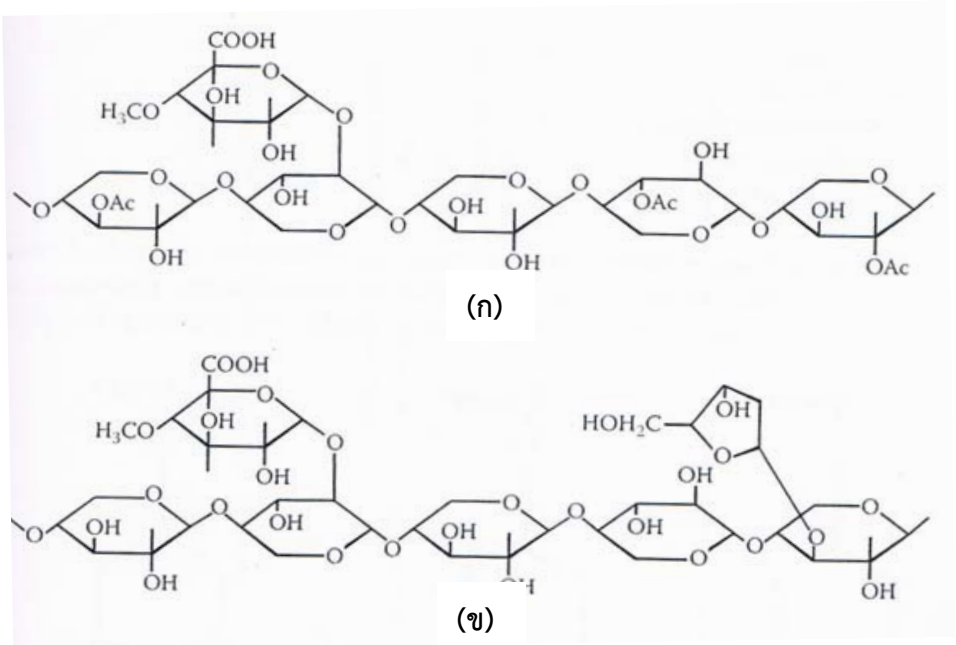
ที่มา: รอดทัศนะ (2550).

รูปที่ 1.3 ลักษณะการจัดเรียงตัวของกลูโคสโมเลกุลในสายโซ่เซลลูโลส.

1.3.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสมีประมาณร้อยละ 20-40 ในวัสดุลิกโนเซลลูโลสและมีลักษณะเป็นสายโซ่สั้นๆ มีโซ่กิ่ง ส่วนใหญ่เฮมิเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุล 5 ได้แก่ ไซโลส (xylose) และอาราบิโนส (arabinose) นอกจากนี้ ยังมีน้ำตาลโมเลกุล 6 อีก เช่น กาแล็กโทส (galactose), กลูโคส

และแมนโนส (mannose) และสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอีก เช่น กลูโรนิก (gluronic), เมทิลกลูโรนิก (metyl gluronic) และกรดกาแล็กทูโรนิก (galacturonic acid) การวิเคราะห์องค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้อแข็ง พบว่า เป็นสายโซ่ไซเลนซึ่งเกิดจากมอนอเมอร์ไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1, 4-ไกลโคสิดิก โซ่กิ่งเชื่อมต่อด้วยพันธะ 1, 3-ไกลโคสิดิกกับกรดเมทิลกลูโรนิก. ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้ออ่อน ปริมาณของหมู่แอซิทิลจะพบได้น้อยกว่า แต่จะมีปริมาณของกิ่งของสายโซ่มากกว่า โดยมีพันธะ 1, 3-ไกลโคสิดิกเชื่อมต่อระหว่างไซโลสจากสายโซ่หลักและแอราบิโนฟูราโนส (arabinofuranose) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 เฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นโซ่กิ่งทำให้ลักษณะของเฮมิเซลลูโลสไม่อยู่เป็นผลึกแต่อยู่ในลักษณะของอสัณฐาน (amorphous) แทนทำให้โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสง่ายต่อการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) (Cardona *et al*. 2010).



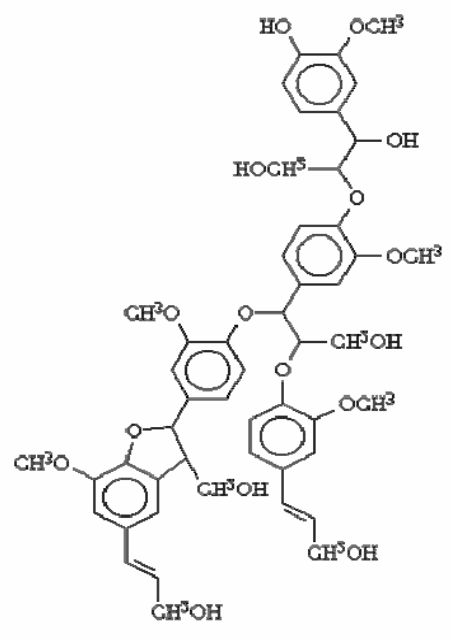
ที่มา: Cardona *et al*. (2010).

รูปที่ 1.4 โครงสร้างสายโซ่ไซเลนจาก (ก) ไม้เนื้อแข็ง และ (ข) ไม้เนื้ออ่อน.

1.3.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนินมีประมาณร้อยละ 10-25 ในวัสดุลิกโนเซลลูโลส เป็นสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนจำพวกฟินอลิก (phenolic) ซึ่งได้มาจากมอนอเมอร์ฟีนิลโพรเพน (phenyl propane) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคาร์บอน-คาร์บอนและพันธะคาร์บอน-ออกซิเจน-คาร์บอน อยู่ในรูปแบบของโครงสร้างอสัณฐานสามมิติ ดังแสดงในรูปที่ 1.5 (Cardona *et al*. 2010) ซึ่งโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงเบนซิน

นี้ ทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอลหรือเมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปกติลิกนินจะอยู่ในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบๆ เซลลูโลสเป็นตัวป้องกันเซลลูโลสจากการย่อย (รอดทัศนะ 2550).



ที่มา: รอดทัศนะ (2550).

รูปที่ 1.5 โครงสร้างสายโซ่ของลิกนิน.

1.4 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose pretreatment)

ในวัสดุลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกบรรจุหนาแน่น โดยชั้น (Layer) ของลิกนิน ซึ่งปกป้องเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากการย่อยสลายของเอนไซม์ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพ เพื่อทำลายลิกนินที่ปกปิดอยู่ เพื่อให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสามารถร่วมกิจกรรมกับเอนไซม์ได้ การปรับสภาพมีวัตถุประสงค์เพื่อลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส เพิ่มพื้นที่ผิวชีวมวล, กำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่ปกปิดอยู่ การปรับสภาพทำให้ความสามารถในการเข้าถึงเซลลูโลสของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นผลให้การเปลี่ยนสายโซ่คาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาลเพิ่มขึ้นและรวดเร็วขึ้น (Binod *et al*. 2010) อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยีในการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสยังไม่เป็นที่ชัดเจนว่าวิธีการไหนดีที่สุดและต้องคำนึงถึงรูปแบบในการเข้าทำลายองค์ประกอบภายในวัสดุลิกโนเซลลูโลสควบคู่ไปกับองค์ประกอบภายในวัสดุลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิด ดังนั้น กระบวนการปรับสภาพจึงมีนัยสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการทั้งระบบและเป็นกุญแจสำคัญที่

จะบรรลุเป้าหมายในการผลิตพลังงาน คือ ใช้พลังงานน้อยที่สุดและราคาถูกที่สุด (Yang and Wyman 2008) โดยวิธีการในการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีอยู่มากมายหลายแบบ ซึ่งทำการค้นคว้าวิจัยในที่นี้จะนำเสนอการปรับสภาพในรูปแบบต่างๆ อย่างคร่าวๆ เพื่อให้เข้าใจถึงกระบวนการในการปรับสภาพแต่ละแบบ ดังนี้

1.4.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment)

การปรับสภาพทางกายภาพจะเพิ่มพื้นที่ผิวที่สามารถเข้าถึงได้และขนาดของรูพรุน ลดปริมาณผลึกและระดับการเกิดพอลิเมอร์ของเซลลูโลส นิยมใช้เพื่อการลดขนาดลิกโนเซลลูโลส รวมถึงการอบไอน้ำ (steaming), การบด (grinding), การโม่ (milling), การฉายรังสี (irration), การใช้อุณหภูมิ (temperature) และความดัน (pressure) (Binod *et al.* 2010).

1.4.1.1 การบดและการโม่ เป็นขั้นตอนเริ่มต้นในการปรับสภาพของชีวมวล ซึ่งจะช่วยลดขนาดของอนุภาคใดๆ ผ่านกระบวนการร่วมของการบดและการปรับสภาพอื่นๆ ซึ่งได้รับการทดลองมาแล้วเพื่อช่วยลดความเป็นผลึกของชีวมวล (Binod *et al.* 2010) เช่น การบดซูเปอร์ไฟล์ (superfine grinding) ของการแยกสลายลิกโนเซลลูโลสด้วยไอน้ำ (Steam Exploded) (Jin and Chen 2006) และการโม่บดฟางข้าวด้วยดิสก์เปียก (Grinding Rice Straw Wet Disk Milling) (Hideno *et al.* 2009) ดีกว่าวิธีการพื้นฐานในการบด แม้ว่าพลังงานที่ใช้จะสูง ยากที่จะนำเอาไปใช้ในเชิงพาณิชย์ (Binod *et al*. 2010).

1.4.1.2 การฉายลำแสงอิเล็กตรอน (electron beam irradiation) สัดส่วนขององค์ประกอบเซลลูโลสในลิกโนเซลลูโลสสามารถที่จะย่อยสลายโดยการฉายรังสีไปยังเส้นใยที่บอบบางโอลิโกแซ็กคาไรด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำและเซลโลไบโอส ซึ่งเกิดขึ้นจากการแยกตัวออกของพันธะกลูโคไซดอลของสายโซ่โมเลกุลเซลลูโลสโดยการฉายรังสีในที่ที่ลิกนิน แต่วิธีการฉายรังสีมีราคาแพงมีความต้องการพลังงานสูง ทำให้มีปัญหาในการใช้ในอุตสาหกรรม (Binod *et al*. 2010).

1.4.1.3 การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave pretreatment) การฉายคลื่นไมโครเวฟมีใช้อย่างแพร่หลายในหลายด้าน เนื่องจากมีประสิทธิภาพความร้อนสูงและใช้งานง่าย การฉายคลื่นไมโครเวฟอาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพิเศษของเซลลูโลส ย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุลิกโนเซลลูโลสและเพิ่มความไวต่อเอนไซม์ของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Binod *et al*. 2010) เช่น ฟางข้าวได้รับการปรับสภาพโดยการฉายรังสีไมโครเวฟเพียงอย่างเดียว (Zhu *et al*. 2005) มีอัตราการไฮโดรไลซิสและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เกือบเท่ากับการไฮโดรไลซิสฟางข้าวดิบ.

1.4.2 การปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment)

เอนไซม์จะไม่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงลิกโนเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาล เพื่อใช้ในการหมักได้เลย ถ้าไม่มีการปรับสภาพด้วยสารเคมี วัตถุประสงค์เพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากเซลลูโลสและทำให้เกิดการบวมของโครงสร้างซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลาย เนื่องจากเอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น (รอดทัศนะ 2550).

1.4.2.1 การปรับสภาพด้วยเบส (alkali pretreatment) เกี่ยวข้องกับการใช้สารละลายที่เป็นเบส เช่น NaOH หรือ KOH เพื่อกำจัดลิกนินและบางส่วนของเฮมิเซลลูโลส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าถึงเซลลูโลสของเอนไซม์ การปรับสภาพด้วยเบสมีผลในการเพิ่มปริมาณผลผลิตจากการย่อยสลายแซ็กคาไรด์มากขึ้น การปรับสภาพสามารถดำเนินการได้ที่อุณหภูมิต่ำ แต่ต้องใช้เวลาค่อนข้างนานและความเข้มข้นของเบสสูง เมื่อเทียบกับกรดหรือสารออกซิเดชัน การปรับสภาพด้วยเบสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการทำลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างลิกนิน เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส รวมไปถึงหลีกเลี่ยงการกระจายตัวของพอลิเมอร์เฮมิเซลลูโลส (Binod *et al*. 2010) เช่น การปรับสภาพด้วยเบสของฟางข้าวสับกับ NaOH ร้อยละ 2 กับของแข็งในสารละลายร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 85 °ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถลดลงลิกนินได้ถึงร้อยละ 36 (Zhang and Cai 2008).

1.4.2.2 การปรับสภาพด้วยแอมโมเนีย (ammonia pretreatment) เป็นการปรับสภาพโดยใช้แอมโมเนียซึ่งมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เช่น เป็นสารช่วยบวมตัวได้อย่างมีประสิทธิภาพสำหรับวัสดุลิกโนเซลลูโลส มีความเลือกสรรสูงโดยสามารถทำปฏิกิริยากับลิกนินโดยที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเซลลูโลส มีความเป็นไอสูงทำให้ง่ายต่อการนำกลับมาใช้ใหม่ ไม่เป็นพิษและไม่กัดกร่อน หนึ่งในปฏิกิริยาที่รู้จักกันดีของแอมโมเนีย คือ การเข้าไปทำลายพันธะคาร์บอน-ออกซิเจน-คาร์บอน ในลิกนินเช่นเดียวกับพันธะเอสเทอร์ (ester) และอีเทอร์ (ether) ในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนิน-คาร์โบไฮเดรต (Kim and Lee 2007).

1.4.2.3 การปรับสภาพด้วยกรด (acid pretreatment) การปรับสภาพของลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดที่อุณหภูมิห้องเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยแบบไม่ใช้ออกซิเจน การปรับสภาพด้วยกรดเจือจางส่วนใหญ่จะส่งผลต่อเฮมิเซลลูโลสกับส่งผลน้อยในการย่อยสลายลิกนิน การปรับสภาพด้วยกรดจะทำการละลายเฮมิเซลลูโลสและด้วยเหตุนี้ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น การปรับสภาพด้วยกรดดำเนินการโดยมักจะใช้กรดเกลือ เช่น กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก และมีการใช้วัตถุดิบอย่างหลากหลาย เช่น ต้นมะกอก (Cara *et al*. 2008), ฟางข้าวไรซ์และหญ้าเบอร์มูด้า (Sun and Cheng 2005), ฟางข้าวสาลี (Saha *et al*. 2005), และเส้นใยข้าวโพด (Saha and Bothast 1999) โดยทุกการทดลองใช้อุณหภูมิสูงเกิน 120°ซ. และใช้กรดอ่อนในการปรับสภาพเพื่อย่อยเฮมิเซลลูโลสออกมาเพื่อให้เอนไซม์เข้าทำการไฮโดรไลซิส.

1.4.2.4 ปรับสภาพด้วยสารออกซิไดส์ (pretreatment with oxidising agent) เกี่ยวข้องกับการเพิ่มของสารประกอบออกซิไดส์ เช่น ไฮโดรเจนเฟอร์ออกไซด์หรือกรดเพราซิตริก ไปยังชีวมวลซึ่งแขวนลอยในน้ำ การปรับสภาพนี้จะกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เพื่อเพิ่มการเข้าถึงของเซลลูโลส การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างการปรับสภาพสามารถเกิดขึ้น เช่น การแทนที่อิเล็กตรอน (electrophilic substitution), การแทนด้านข้างของโซ่กิ่ง (displacement of side chains) การแตกการเชื่อมโยงของ แอลคิล-แอริล-อีเทอร์ (alkyl-aryl-ether) หรือการออกซิเดชันของนิวเคลียสของกลุ่มแอโรแมติก (Binod *et al*. 2010).

1.4.2.5 การปรับสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์ (organosolv pretreatment) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ โดยการลดปริมาณของลิกนินและการกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส ซึ่งสามารถทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ในอัตราที่สูงและสามารถให้ผลผลิตน้ำตาลเกือบเท่าทางทฤษฎี โดยเฮมิเซลลูโลสและลิกนินจะสามารถกู้คืนได้สำหรับผลิตภัณฑ์ร่วมที่มีมูลค่าสูง การเปลี่ยนแปลงของผลึกเซลลูโลสในระหว่างการปรับสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์ยังไม่แน่ชัด แต่พบว่าการบวมตัวของเซลลูโลสในสารละลายอินทรีย์มากน้อยขึ้นกับชนิด, ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์และอุณหภูมิที่ดำเนินการ, กระบวนการ, สารละลายอินทรีย์ และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร้อน เช่น เอทานอลที่ pH ที่เป็นกรดกับการแยกองค์ประกอบชีวมวล แต่ว่ายังมีข้อเสียบางประการสำหรับการปรับสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์ คือ การปรับสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์มีราคาแพงมากในปัจจุบัน แต่การแยกและการรีไซเคิลของที่ใช้กับตัวทำละลายสามารถลดต้นทุนการดำเนินงานของกระบวนการ นอกจากนี้ ยังต้องมีการควบคุมสภาวะอย่างเข้มงวด เนื่องจากไอของสารละลายอินทรีย์เป็นตัวหน่วงการเกิดปฏิกิริยา (Xuebing, Keke and Dehua 2009) โดยกระบวนการปรับสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์นี้ ถ้าทำการปรับสภาพจะดำเนินการที่อุณหภูมิสูง (185-210°ซ.) ไม่มีความจำเป็นในการเพิ่มกรดแต่ที่อุณหภูมิต่ำยังต้องการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Sun and Cheng 2002).

1.4.3 การปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment)

การปรับสภาพทางชีวภาพมีข้อได้เปรียบที่สำคัญแนวคิดบางอย่าง เช่น ใช้พลังงานและสารเคมีในปริมาณน้อย แต่ระบบยังไม่สามารถควบคุมและทำให้รวดเร็วเพียงพอได้ การปรับสภาพทางเคมีมีข้อเสียร้ายแรงในแง่ของความต้องการอุปกรณ์ที่มีความต้านทานการกัดกร่อนเป็นพิเศษ การทำความสะอาดที่ครอบคลุมและการกำจัดของเสียที่เหมาะสม การปรับสภาพทางชีวภาพเป็นวิธีที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สำหรับการกำจัดลิกนินออกจากลิกโนเซลลูโลส จุลินทรีย์ที่มีแนวโน้มมากที่สุด สำหรับการปรับสภาพทางชีวภาพ คือ เชื้อราสีขาว (White-Rot Fungi) อยู่ในคลาสของ *Basidiomycetes*.

1.4.4 การปรับสภาพด้วยวิธีการร่วม (combined pretreatment)

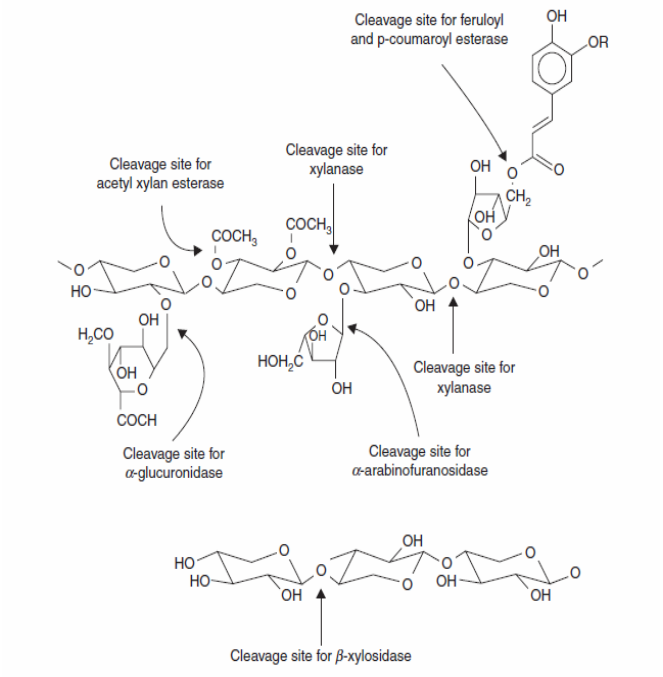
เป็นการปรับสภาพด้วยการใช้วิธีการตั้งแต่สองแบบขึ้นไป เช่น การใช้คลื่นไมโครเวฟเป็นกำลัง เป็นวิธีการปรับสภาพที่มีความสำคัญและมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ จากรายงานของ Jin and Chen (2006) ศึกษาการผสมผสานการปรับสภาพระหว่างการแยกสลายด้วยไอน้ำและการบดแบบซูเปอร์ไฟล์ของฟางข้าวและก่อนทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เพื่อลดเวลาในการบด ประหยัดค่าใช้จ่ายในด้านพลังงาน หลีกเลี่ยงสารหน่วงปฏิกิริยาที่เกิดและมีปริมาณการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่สูงขึ้น และอีกหลายงานวิจัยใช้วิธีการร่วมระหว่างสารเคมี 2 ชนิด ได้แก่ NaOH + แอมโมเนีย (Chaudhary, Singh and Ghosh 2012), KOH + H_2SO_4 (Yadav *et al.* 2011), H_2SO_4 + NaS_2 (Kuhad *et al*. 2010) เป็นต้น.

1.5 การไฮโดรไลซิสของเซลลูโลส (hydrolysis of cellulose)

การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เป็นขั้นตอนที่สองในการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส เกี่ยวข้องกับการเข้าจับ (cleaving) เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของเอนไซม์ เซลลูโลสที่มักจะมีแต่กลูเคนเท่านั้น ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาลโมเลกุลเดียวหลายอย่าง เช่น แมนเนน, ไซเลน, กลูเคน, กลูแล็กแตน และอาราบิเนน, ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสหลักของเซลลูโลส คือ น้ำตาลกลูโคส ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสก่อให้เกิดเพนโทสชนิดต่างๆ และเฮกโซส อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลปริมาณมากจะทำให้เกิดการยับยั้งของผลิตภัณฑ์สุดท้ายและลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลผลิตจากการไฮโดรไลซิส. นอกจากนี้ ลิกนินที่มีปริมาณมากจะบล็อกการเข้าถึงเซลลูโลสของเซลลูเลสซึ่งถือว่าสิ่งยับยั้งที่แข็งแกร่งที่สุด (Binod *et al.* 2010) โดยเซลลูเลสจะถูกขับออกมาโดยสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการย่อยสลายของเซลลูโลส เช่น เชื้อราและแบคทีเรีย จำพวกแอโรบิกบางชนิดที่เจริญเติบโตบนเซลลูโลส เป็นต้น สารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์นี้ประกอบด้วย endo-β-(1,4)-glucanase (Cx-cellulase) และ exo-β-(1,4)-glucanase (cellobiohydrolase) โดย Cx-cellulase จะทำลายพันธะในพื้นที่อสัณฐานของโมเลกุลเซลลูโลสและเซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobiohydrolase) จะย่อยเซลโลไบโอสออกจากปลายข้างที่ไม่รีดิวซ์ การดำเนินการรวมกันของทั้งสองทำให้เกิดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของเซลลูโลส เอนไซม์อื่นที่เรียกว่า “เซลโลไบเอส” (β-(1,4)-glucosidase) มีความจำเป็นในการย่อยสลายเซลโลไบโอสให้ได้กลูโคส โดยเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสจะมีความซับซ้อน การย่อยสลายที่สมบูรณ์ต้องใช้การทำงานของของเอนไซม์หลายชนิด เอนไซม์เหล่านี้เรียกรวมกันว่า “เฮมิเซลลูเลส” และประกอบไปด้วย Endo-Enzymes ซึ่งเกาะติดที่ภายในพันธะกลูโคไซดิก Exo-Enzymes โดยเอาน้ำตาลที่เหลือ

จากปลายข้างที่ไม่รีดิวซ์ ซึ่งไม่ใช่ กลูโคไซดิกเอสเทอร์ เอนไซม์ไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสรวมถึง Endo-β-1,4-xylanase Exo-β-D-xylosidase, α-L-arabinofuranosidase, Endo-1,5-α-L, arabinanase, α-glucuronidase และ acetyl esterases ซึ่งประกอบด้วย acetylxylan, esterase และ acetyl esterase และ acid esterases ซึ่งประกอบด้วย feruloyl esterase และ p-coumaroyl Esterase ดังแสดงในรูปที่ 1.6 แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการไฮโดรไลซิสของไซเลนในฟางข้าวสาลีและการเข้าทำของเอนไซม์ (Drapcho, Nhuan and Walker 2008).

นอกจากนี้ การทำงานของเอนไซม์ยังมีปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตของลิกโนเซลลูโลสที่ย่อยสลายไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียวและผลพลอยได้อื่นๆ เช่น ขนาดของอนุภาค, อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง, ชนิดและความเข้มข้นของกรดที่ใช้, อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับขนาดความยาวของโมเลกุลขนาดใหญ่, ระดับขั้นการเกิดพอลิเมอร์ของเซลลูโลส, ปฏิสัมพันธ์ของเซลลูโลสกับโครงสร้างของพอลิเมอร์ป้องกันอื่นๆ ภายในผนังเซลล์พืช เช่น องค์ประกอบลิกนิน, เฮมิเซลลูโลส, เพกทิน, โปรตีน และเกลือแร่ (Binod *et al.* 2010).



ที่มา: Drapcho, Nhuan and Walker (2008).

รูปที่ 1.6 กิจกรรมเอนไซม์สำหรับการไฮโดรไลซิสของไซเลนฟางข้าวสาลี.

1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

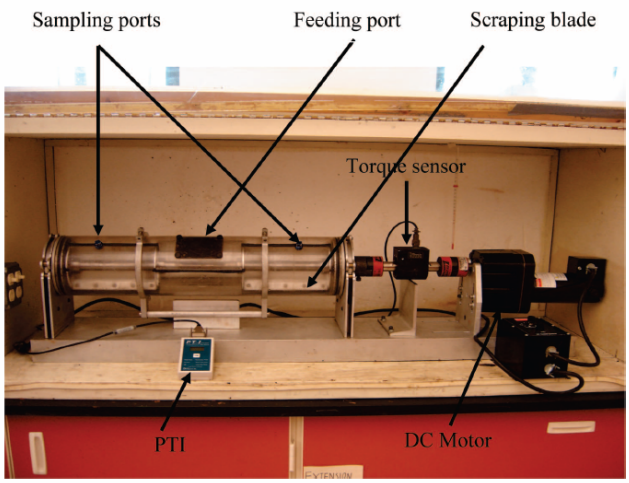
การผลิตเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิด เช่น อ้อย, มันสำปะหลัง และข้าวโพด เป็นต้น แต่เนื่องจากพืชเหล่านี้เป็นอาหารของมนุษย์ทำให้เกิดการแย่งอาหารกันระหว่างมนุษย์และพลังงาน, ดังนั้น จึงได้มีการพัฒนาการผลิตเอทานอลจากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสขึ้น (Cardona, Sanchez and Gutierrez 2010) โดยการผลิตน้ำตาลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสนี้ได้มีการวิจัยกันอย่างกว้างขวาง สิ่งที่งานวิจัยสนใจ คือ การออกแบบปฏิกรณ์ในการไฮโดรไลซิส โดยปัญหาในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้นซับสเตรตสูงก็มีมากมายหลายประการ ซึ่งมีสาเหตุหลักจากปริมาณน้ำอิสระน้อย (lack of free water) ซึ่งส่งผลอย่างมากต่อกระบวนการในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จากเหตุผล 2 ประการ (Modenbach and Nokes 2013) คือ ระบบการถ่ายโอนมวลในระบบ (Mass Transfer) และการหล่อลื่นในระบบ (Lubricity) จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการวิจัยและพัฒนารูปปฏิกรณ์ในการไฮโดรไลซิสชีวมวลที่ความเข้มข้นสูง โดยแบ่งรูปแบบของเครื่องเป็น 2 รูปแบบ คือ

1.6.1 เครื่องปฏิกรณ์ในแนวนอน (horizontal reactor)

เครื่องปฏิกรณ์ในแนวนอน (horizontal reactor) เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่สามารถใช้ประโยชน์จากแรงโน้มถ่วง (gravitational) หรือการตกผสมแบบอิสระ (free-fall mixing) ได้เป็นอย่างดีส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการจะผสมสเลอรี ได้แก่ โรงงานเนยถั่ว ซอสมะเขือเทศและคอนกรีต เป็นต้น (Dasari, Dunaway and Berson 2009; Roche, Dibble and Stickel 2009) ซึ่งเครื่องปฏิกรณ์แนวนอนนี้จะช่วยในการลดการตกตะกอนของอนุภาค (particle settling) และลดการเกาะกลุ่มกันของสารผลิตภัณฑ์ รวมทั้งช่วยในการกระจายตัวเอนไซม์ได้ดีขึ้น และยังต้องการพลังงานที่ต่ำกว่าในการกวนผสม โดยที่ผ่านมามีการศึกษารูปแบบปฏิกรณ์ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ในแนวนอนดังนี้

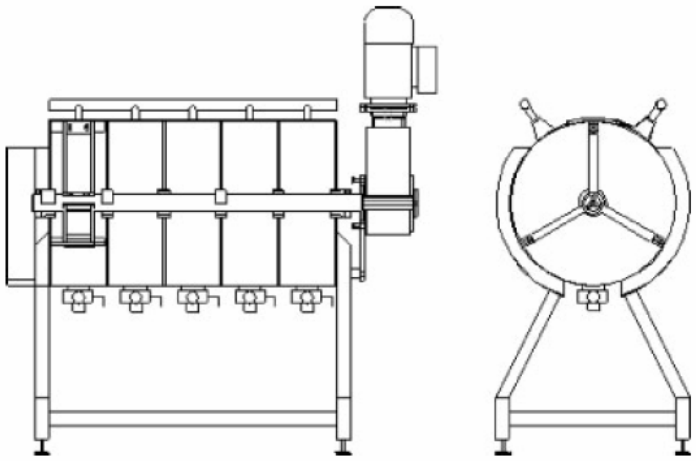
Roche, Dibble and Stickel (2009) ได้เปรียบเทียบการไฮโดรไลซิสขวดตัวอย่างโดยใช้มือในแนวนอนจากการศึกษา พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสที่ร้อยละ 80-85.

Dasari, dunaway and Berson (2009) ได้ทำการศึกษาเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 8 L ที่ทำด้วยแก้ว มีฝาปิดอะลูมิเนียมที่ปลายทั้งสอง โดยภายในมีใบมีดสเตนเลสช่วยบาดตัวอย่างที่อยู่ที่ผิวเครื่องปฏิกรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 1.7 จากการศึกษา พบว่า เครื่องปฏิกรณ์นี้สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้มากกว่าการใช้ขวดเขย่าถึงร้อยละ 10.



รูปที่ 1.7 เครื่องปฏิกรณ์แนวนอนจากงานวิจัยของ Dasari *et al.* (2009).

Jorgensen *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาปฏิกรณ์ไฮโดรไลซิสขนาด 280 L ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยทำการทดสอบปัจจัยของอัตราการเร็วการหมุนของใบกวน (3.3-11.5 rpm) พบว่า ร้อยละของการเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พลังงานที่ใช้ในการกวนผสมลดลงเมื่อเทียบกับปฏิกรณ์แนวตั้ง นอกจากนี้ ปฏิกรณ์นี้ยังมีข้อดี คือ ใบกวนที่อยู่ตรงกลางช่วยในการกวนผสมโดยสามารถหมุนกลับทิศได้ในเวลาที่ตั้งไว้ นอกจากนี้ ใบกวนนี้ยังช่วยขูดเอาชีวมวลที่ติดอยู่ที่ผนังปฏิกรณ์ออกมาช่วยเพิ่มการถ่ายเทความร้อนระหว่างผนังปฏิกรณ์และชีวมวลภายในอีกด้วย.

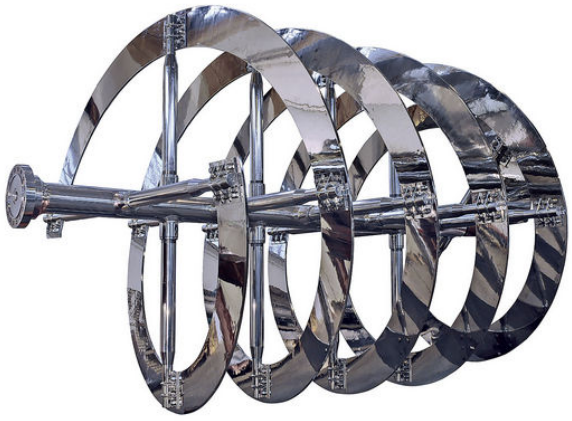


รูปที่ 1.8 เครื่องปฏิกรณ์แนวนอนจากงานวิจัยของ Jorgensen *et al.* (2006).

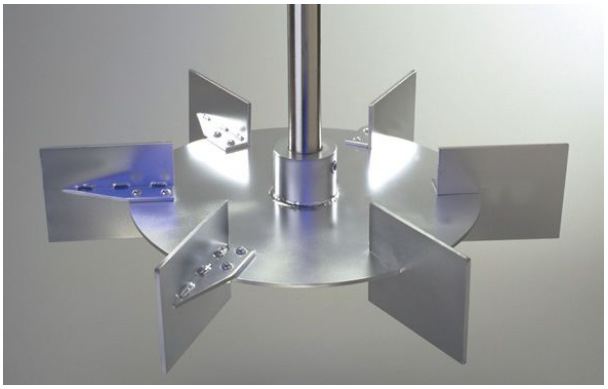
The Integrated Biomass Utilization System (IBUS) Project ร่วมมือกับ DONG Energy ได้ออกแบบและสร้างปฏิกรณ์แบบตกผสมอย่างอิสระ โดยเริ่มต้นจากปฏิกรณ์ขนาด 400 ลิตร เป็น 11,000 ลิตร โดยปฏิกรณ์นี้ทำงานที่ความเข้มข้นซับสเตรตร้อยละ 40 โดยซับสเตรตขนาดใหญ่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากการทำงานเชิงกลของการกวนผสมจะฉีกเส้นใยและอนุภาคต่างๆ ออกจากกัน การฉีกเส้นใยนี้ยังเพิ่มพื้นที่ผิวของลิกโนเซลลูโลสมีผลทำให้เพิ่มการเข้าถึงระหว่างของเอนไซม์และเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสอีกด้วย (Larsen, Ostergaard Haven and Thirup 2012).

1.6.2 เครื่องปฏิกรณ์ในแนวตั้ง (Vertical Reactor)

เครื่องปฏิกรณ์ในแนวตั้ง (Vertical Reactor) เป็นปฏิกรณ์ที่ใช้อยู่เดิมในการหมักเอทานอล โดยมีการปรับเปลี่ยนรูปแบบของใบกวน เพื่อให้สามารถผสมซับสเตรตที่มีความเข้มข้นสูงๆ ได้ โดยที่เป็นที่นิยม คือ ใบพัดแบบ Helical ดังแสดงในรูปที่ 1.9 ซึ่งจากงานวิจัยของ Zhang *et al*. (2009) พบว่า ใบพัดแบบ Helical ใช้พลังงานน้อยกว่าในการไฮโดรไลซิสชีวมวล และทำให้ปฏิกิริยาในการไฮโดรไลซิสเร็วขึ้นอย่างน้อย 2 ชั่วโมง, นอกจากนี้ ยังได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่า (51.0 กรัม/ลิตร vs. 43.9 กรัม/ลิตร) เมื่อใช้ความเข้มข้นซับสเตรตที่ร้อยละ 30 เมื่อเทียบกับใบกวนแบบ Rushton (ใบพาย) ดังแสดงในรูปที่ 1.10.

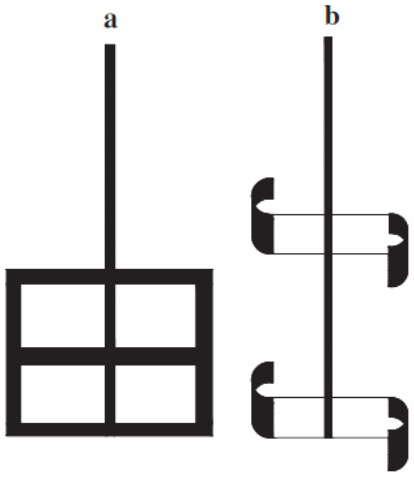


รูปที่ 1.9 ใบกวนแบบ Helical.



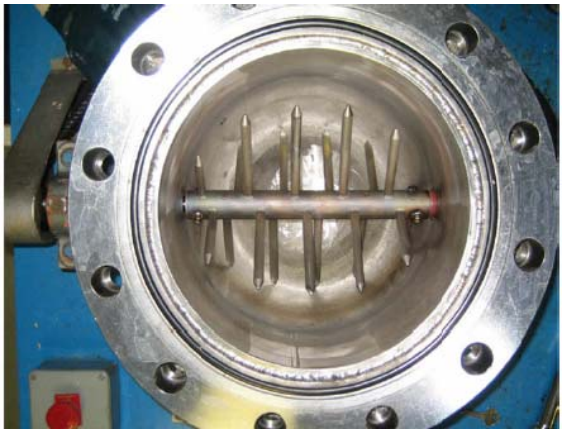
รูปที่ 1.10 ใบกวนแบบ Rushton.

Wang *et al*. (2012) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของใบกวน 2 แบบ คือ ใบกวนแบบ plate and frame และใบกวนแบบ double-curved-blade ดังแสดงในรูปที่ 1.11. พบว่า ใบกวนแบบ plate and frame ให้การเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสมากกว่าถึงร้อยละ 18 ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 100 rpm.



รูปที่ 1.11 แบบ ใบกวนแบบ plate and frame (a) และ ใบกวนแบบ double-curved-blade (b) (Wang *et al*. 2012).

นอกจากนี้ ยังมีการทดลอง peg mixer ซึ่งเป็นปฏิกรณ์ที่ใช้อยู่เดิมในโรงงานกระดาษ โดยจากงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2009) ซึ่งทำการศึกษาปฏิกรณ์ peg mixer ดังแสดงในรูปที่ 1.12. เปรียบเทียบกับการไฮโดรไลซิสในหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า พบว่า ปฏิกรณ์ peg mixer สามารถทำการผสมได้เร็วกว่าเครื่องเขย่า (40 h vs. 1 h).



ที่มา: Zhang *et al*. (2009).

รูปที่ 1.12 เครื่องปฏิกรณ์แบบ peg mixer.

สรุปจากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องในแง่การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ สรุปได้ว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองการผลิตน้ำตาลได้ใช้วัตถุดิบที่มีศักยภาพของแต่ละท้องถิ่น เช่น ในประเทศไทยจะเป็นฟางข้าว, ยอดและใบอ้อย ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ในอุตสาหกรรมการเกษตรของประเทศไทย, นอกจากนี้ เครื่องปฏิกรณ์ในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์สำหรับวัตถุดิบในประเทศไทยยังไม่ได้รับการนำเสนอ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์และหาความเข้มข้นของซับสเตรตที่เพิ่มขึ้นภายใต้ระบบเครื่องมือที่ได้รับการพัฒนาขึ้น ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาตามที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้างต้น ภายใต้จุดประสงค์ในการพัฒนาและขอบเขตงาน ดังนี้

1.7. วัตถุประสงค์

1.7.1 เพื่อศึกษาและพัฒนาขั้นตอนการย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลที่ใช้ในการผลิตเอทานอล.

1.7.2 เพื่อออกแบบและจัดสร้างเครื่องปฏิกรณ์เพื่อใช้ในการการย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาล.

1.7.3 เพื่อเพิ่มศักยภาพและลดต้นทุนในกระบวนการผลิตเอทานอล.

1.8. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาข้อมูลคุณสมบัติของวัตถุดิบประเภทเส้นใยต่างๆ ออกแบบและจัดสร้างเครื่องปฏิกรณ์ที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้น้ำตาล เพื่อทำการทดสอบหาประสิทธิภาพและสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาล สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนการหมักด้วยเชื้อยีสต์ทั้ง *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้ได้เอทานอลที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงที่สุด.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ คือ ยอดและใบอ้อย ซึ่งเก็บเกี่ยวต้น ปี พ.ศ. 2556 ในจังหวัดพิษณุโลก โดยนำเอามาทำการบดผ่านเครื่องบดย่อยไม้ ได้ยอดและใบอ้อยขนาด 2-5 มิลลิเมตร ที่ใช้ในการทดลอง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบตามวิธีการของ Jurgens (1980) ได้องค์ประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 2.1.

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของฟางข้าว

องค์ประกอบ	ร้อยละ
ความชื้น	5.57
NDF	16.21
Hemicellulose	38.43
Lignin (ADL)	5.51
Cellulose	34.06
Ash	5.79

2.2 อุปกรณ์และสารเคมี

2.2.1 อุปกรณ์

1. ถังสเตนเลสขนาด 5 ลิตร.
2. Auto-Pipet ยี่ห้อ Appendorf ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร.
3. ตะแกรงร่อนแป้ง ขนาด 30 เซนติเมตร.
4. ขวดตวงปริมาตรและกระบอกตวง (Volumetric Flask and Cylinder).
5. ตู้อบ (Hot Air Oven) บริษัท Memmert.
6. เครื่องฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SP 300 บริษัท Yamato.
7. ถังหมักขนาด 10 ลิตร รุ่น MDL-Bioneer 10 ลิตร ยี่ห้อ B.E.MA RUBISHI บริษัท Zircon power solution.

8. ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น Labo-controller MDL-8C ยี่ห้อ B.E.MA RUBISHI บริษัท Zircon. power solution.

9. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น UNIVERSAL 32 บริษัท BECTHAI.

2.2.2 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เกรด Analysis Reagent ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Finechem
2. น้ำกลั่น.
3. น้ำประปา.
4. เอนไซม์.

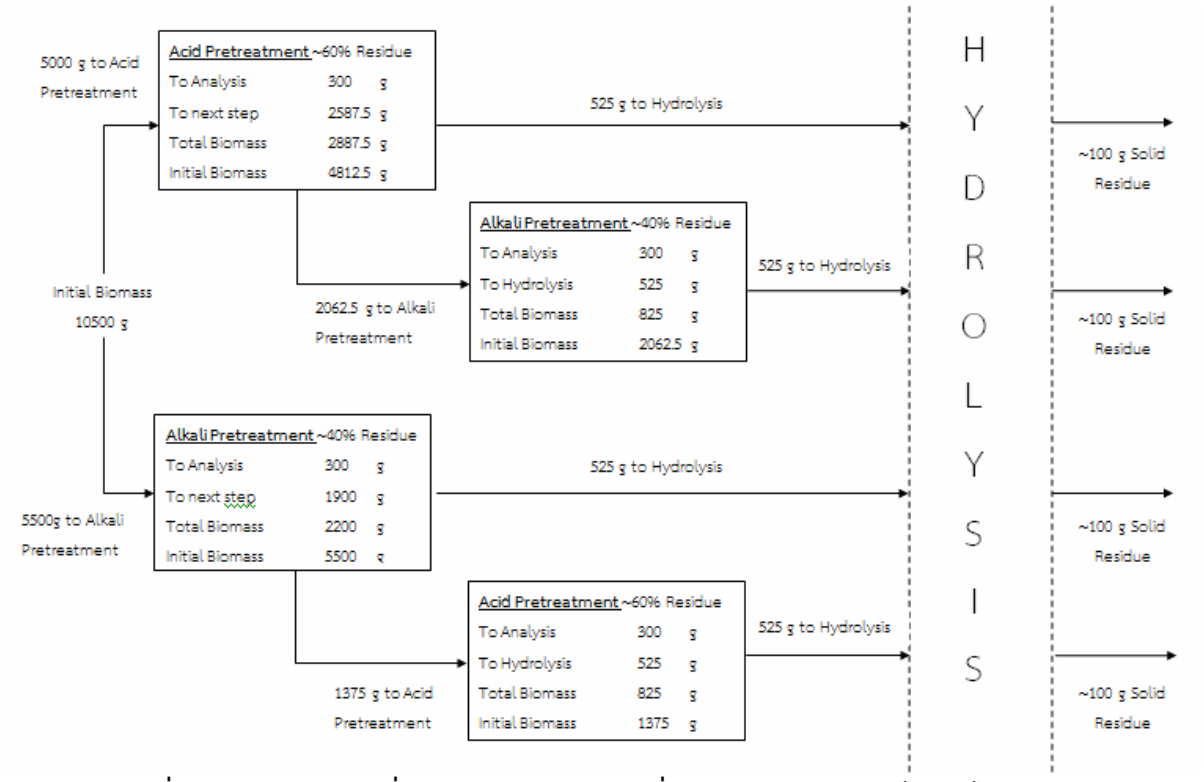
2.2.3 เครื่องมือวัด

1. เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Moisture Analysis) รุ่น MX-50 บริษัท AND.
2. เครื่องชั่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น Basic.
3. กระดาษลิตมัส.
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH Meter) รุ่น pH 510 บริษัท Eutech Instrument.
5. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น Uvikon$_{xs}$ บริษัท Secomam.
6. เครื่อง GC รุ่น 689N บริษัท Agilent Technologies.

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 เปรียบเทียบในการปรับสภาพด้วยสารเคมี

การปรับสภาพชีวมวลด้วยกระบวนการต่างๆ โดยใช้น้ำ, ความดัน, ความร้อนและสารเคมี เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการกำจัดองค์ประกอบซึ่งขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในขั้นตอนการไฮโดรไลซิส โดยกระบวนการในการปรับสภาพวัสดุประเภทเส้นใย ซึ่งได้รับการวิจัยและพัฒนาโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) นั้น มีอยู่ 3 แบบ คือ การใช้กรด, เบส และวิธีการร่วมของทั้งกรดและเบสในการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ศรีนรคุตร และคณะ 2551, 2553, 2556ค) ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาของ วว. นั้น ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ากระบวนการปรับสภาพใด มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นซับเตรตในกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ ดังนั้น คณะทำงานจึงทำการออกแบบการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการปรับสภาพในแต่ละแบบ ดังแสดงในรูปที่ 2.1.



รูปที่ 2.1 การทดลองเพื่อหาวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมก่อนทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์.

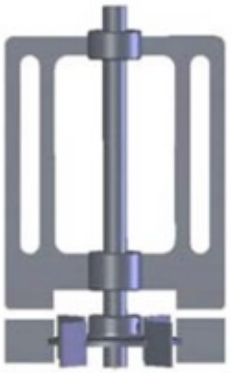
จากรูปที่ 2.1 กระบวนการในการปรับสภาพทั้งหมดจะทำปฏิกิริยาในหม้อต้มความดัน (Auto-Clave) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที และภายหลังการทำปรับสภาพในแต่ละวิธีการจะนำของแข็งที่ได้ไปทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/$g_{Substrate}$ ในเครื่อง Fermenter ขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 50 °ซ., ความเร็วรอบการกวน 300 rpm โดยใช้ความเข้มข้นซับสเตรต ร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งหลังจากผ่านแต่ละขั้นตอนจะทำการเก็บตัวอย่างที่เป็นของแข็งและสารละลายนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบและปริมาณน้ำตาล เพื่อทำสมดุลมวลและหาวิธีการที่ดีที่สุดในการทำการปรับสภาพและใช้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในเครื่อง Hydrolyzer.

2.3.2 เปรียบเทียบการเปลี่ยนใบกวน

จากงานวิจัยที่ผ่านมาสรุปได้ว่าในการที่จะพัฒนาเครื่องไฮโดรไลซิสชีวมวลหลังการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ (hydrolyzer) ต้องทำการพิจารณาร่วมกับเทคโนโลยีการหมักด้วยวิธีการ Simultaneous Saccarification and Fermentation (SSF) ซึ่งจำเป็นต้องใช้เครื่อง Hydrolyzer ในรูปแบบ Vertical โดยคณะทำงานทำการออกแบบใบกวนในรูปแบบ Helix 2 รูปแบบ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 และ 2.3 โดยทำการเปรียบเทียบกับใบกวนที่ใช้อยู่เดิม คือ แบบใบพาย และแบบ Rushton ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และ 2.5 โดยทำการเปรียบเทียบโดยการไฮโดรไลซิสยอดและใบอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมในหัวข้อที่ 2.3.1 แล้วนำของแข็งหลังการปรับสภาพที่ได้ทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/$g_{Substrate}$ ความเร็วรอบการกวน 150-250 rpm, อุณหภูมิ 50 °ซ. โดยใช้ความเข้มข้นซับสเตรต ร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยทำการเก็บตัวอย่าง ณ เวลา 12, 24, 26, 48 ชั่วโมง แล้วทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS แล้วทำการเปรียบเทียบหาใบกวน ซึ่งใช้ระยะเวลาเหมาะสมในการไฮโดรไลซิสยอดและใบอ้อยหลังการปรับสภาพด้วยเอนไซม์.

รูปที่ 2.2 ใบกวนแบบ Helix 1.

รูปที่ 2.3 ใบกวนแบบ Helix 2.



รูปที่ 2.4 ใบกวนแบบ Plate.

รูปที่ 2.5 ใบกวนแบบ Rushton.

2.3.3 ทดลองเพิ่มความเข้มข้นซับเสตรตในการไฮโดรไลซิสด้วยเครื่องปฏิกรณ์ไฮโดรไลซิส

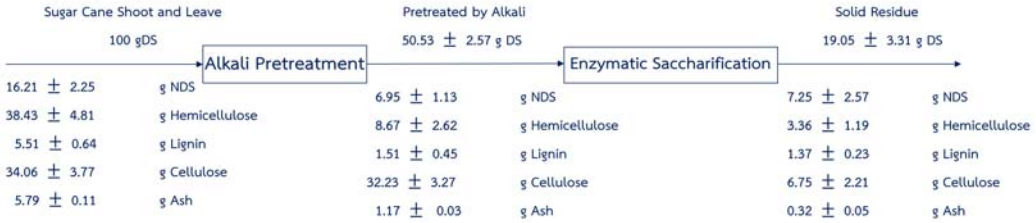
นำใบกวนที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสยอดและใบอ้อยหลังปรับสภาพจากหัวข้อที่ 2.3.2 มาทำการหาความเข้มข้นของซับสเตรตสูงสุดที่สามารถเติมลงไปในระบบเครื่อง Hydrolyzer ได้ เพื่อทำการหาประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำการเปลี่ยนใบกวน โดยทำการทดสอบทำการไฮโดรไลซิด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/$g_{Substrate}$ ความเร็วรอบการกวน 150-250 rpm, อุณหภูมิ 50 °ซ. โดยทำการทดลองในช่วง 0-96 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS เพื่อทำการเปรียบเทียบความเข้นข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นและร้อยละการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงตามสัดส่วนซับสเตรตที่สูงขึ้น.

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

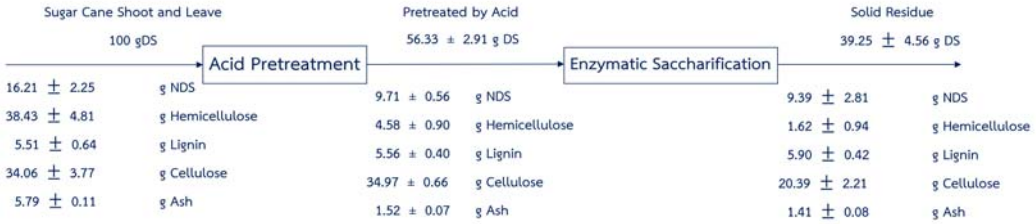
ในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เป็นอุดมคติด้วยเหตุผลดังกล่าว คือ การไฮโดรไลซิสที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งในปัจจุบันลักษณะใบกวนในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเดิมไม่สามารถตอบโจทย์ในการไฮโดรไลซิสในรูปแบบสเลอรีได้ ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของใบกวนจึงมีความจำเป็นในการทำการทดสอบ เพื่อให้สามารถทำการผลิตที่สภาวะความเข้มข้นสูงได้ทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยรวมลดลง.

3.1 เปรียบเทียบในการปรับสภาพด้วยสารเคมี

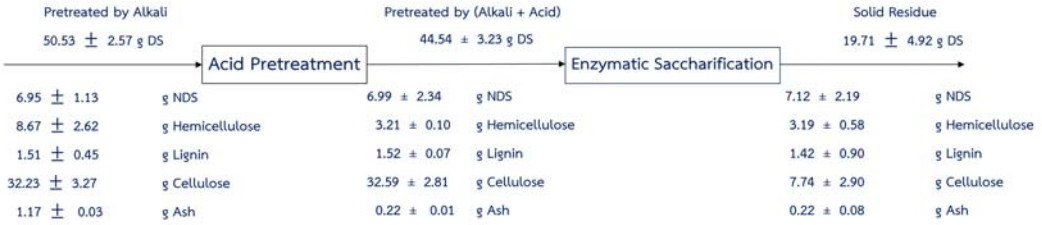
การทดลองการปรับสภาพทั้งหมดจะทำปฏิกิริยาในหม้อต้มความดัน (Auto-Clave) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที และภายหลังการทำปรับสภาพในแต่ละวิธีการจะนำของแข็งที่ได้ไปทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/$g_{Substrate}$ ในเครื่อง Fermenter ขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 50 °ซ. ความเร็วรอบการกวน 300 rpm โดยใช้ความเข้มข้นซับสเตรต ร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.1-3.4 ดังนี้



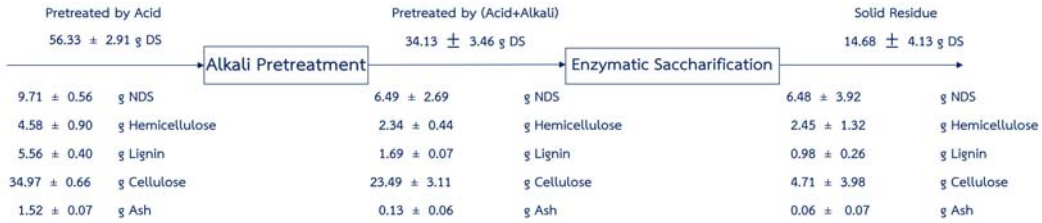
รูปที่ 3.1 สมดุลมวลการปรับสภาพด้วยเบสและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์.



รูปที่ 3.2 สมดุลมวลการปรับสภาพด้วยกรดและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์.



รูปที่ 3.3 สมดุลมวลการปรับสภาพสองขั้นตอนด้วยเบสและกรดและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์.



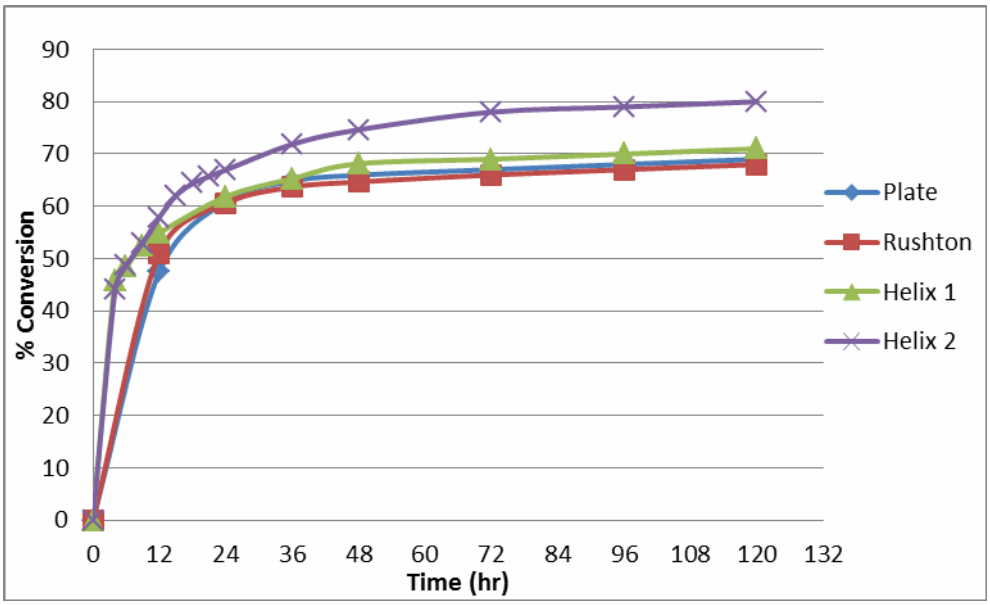
รูปที่ 3.4 สมดุลมวลการปรับสภาพสองขั้นตอนด้วยกรดและเบสและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์.

จากผลการทดลองพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันมากนักระหว่างการปรับสภาพ 2 ขั้นตอน กับการปรับสภาพด้วยเบสเพียงอย่างเดียว ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการปรับสภาพด้วยเบสเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอที่จะทำการปรับสภาพชีวมวล เพื่อเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสได้.

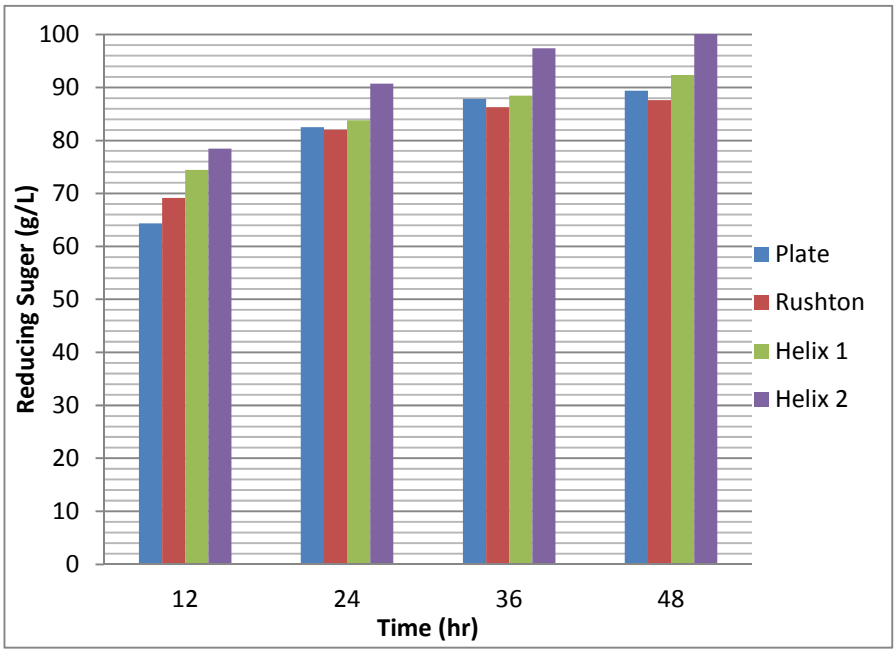
3.2 เปรียบเทียบการเปลี่ยนใบกวน

จากหัวข้อที่ 3.1 พบว่า การปรับสภาพในหม้อต้มความดัน (Auto-Clave) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที ด้วย ร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) NaOH ก็เพียงพอต่อการเป็นซับสเตรตตั้งต้นในขั้นตอนต่อไป โดยซับสเตรตที่ได้จากการปรับสภาพมีองค์ประกอบของร้อยละ 13.76 NDS, ร้อยละ 17.15 เฮมิเซลลูโลส, ร้อยละ 63.78 เซลลูโลส, ร้อยละ 2.98 ADL และ 2.32 Ash โดยใช้ซับสเตรต ดังกล่าวเป็นสารตั้งต้นในการเปรียบเทียบใบกวน โดยทำการไฮโดรไลซิสซับสเตรตด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/$g_{Substrate}$ ความเร็วรอบ

การกวน 150-250 rpm, อุณหภูมิ 50 °ซ. โดยใช้ความเข้มข้นซับสเตรต ร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยทำการเก็บตัวอย่าง ณ เวลา 12, 24, 26, 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง แล้วทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS แล้วทำการเปรียบเทียบหาใบกวน ซึ่งใช้ระยะเวลาน้อยที่สุดในการไฮโดรไลซิสยอดและใบอ้อยหลังการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.5 จากผลการทดลอง พบว่า ใบกวนแบบ Helix 2 ให้ร้อยละการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเท่ากับร้อยละ 83 ที่เวลา 120 ชั่วโมง, รองลงมาเป็น Helix 1, Plate และ Rushton ตามลำดับ โดยเมื่อเทียบเวลาปกติที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ใบกวนแบบ Helix 2 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 100 กรัม/ลิตร รองลงมาเป็น Helix 1, Plate และ Rushton ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.6 ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าใบกวนแบบ Helix 2 เป็นใบกวนที่มีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำเอามาใช้ในขั้นตอนการไฮโดรไลซิส.



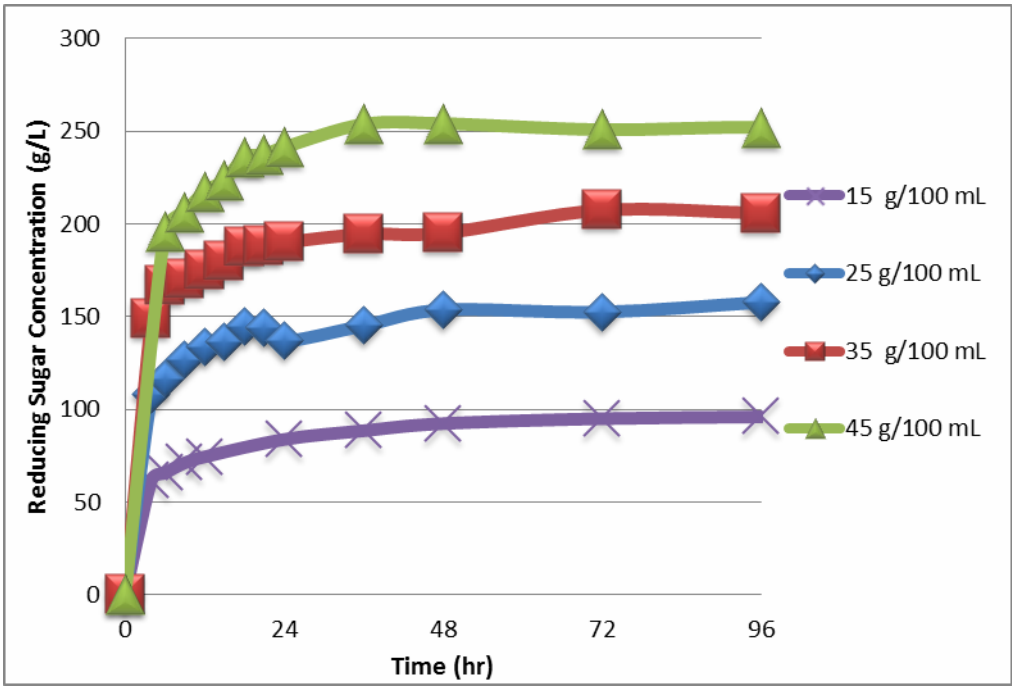
รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบลักษณะใบกวนที่มีผลต่อร้อยละการเปลี่ยนแปลงเทียบเวลา.



รูปที่ 3.6 เปรียบเทียบลักษณะใบกวนที่มีผลต่อความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเวลา.

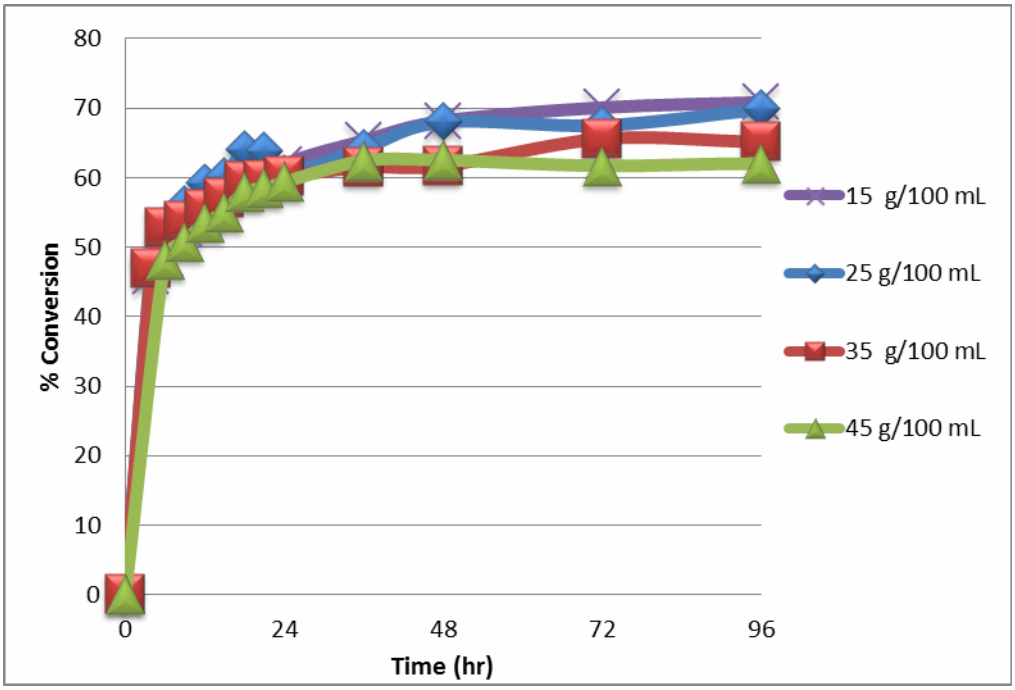
3.3 ทดลองเพิ่มความเข้มข้นซับเสตรตในการไฮโดรไลซิสด้วยปฏิกรณ์ไฮโดรไลซิส

จากการทดลองเปรียบเทียบใบกวนที่ดีที่สุดในการทดลอง พบว่า ใบกวนแบบ Helix 2 มีร้อยละการเปลี่ยนแปลงดีที่สุด ดังนั้น จึงใช้แบบกวนแบบ Helix 2 ทำการทดลองหาผลของการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตในการไฮโดรไลซิส โดยทำการทดสอบทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/$g_{Substrate}$ ความเร็วรอบการกวน 150-250 rpm อุณหภูมิ 50°ซ. โดยทำการทดลองในช่วง 0-96 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS เพื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น ตามสัดส่วนซับสเตรตที่สูงขึ้น ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.7 และ 3.8.



รูปที่ 3.7 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตที่ส่งผลต่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์.

จากรูปที่ 3.7 พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซับสเตรตที่สูงขึ้นเป็นสัดส่วนซึ่งกันและกัน โดยความเข้มข้นของซับสเตรตที่ 15, 25, 35 และร้อยละ 45 (น้ำหนักโดยปริมาตร) สูงสุด เท่ากับ 96, 158, 205 และ 255 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยทุกความเข้มข้นของซับสเตรตจะเริ่มเข้าสู่จุดคงที่ ที่ เวลา 36 ชั่วโมง และไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก หลังจากนั้น จากรูปที่ 3.8 ร้อยละการเปลี่ยนแปลงพบว่า ร้อยละการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงร้อยละ 70, 70, 65 และ 63 ตามลำดับ ซึ่งร้อยละการเปลี่ยนแปลงจะลดลงตามความเข้มข้นซับสเตรตที่เพิ่มขึ้น.



รูปที่ 3.8 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตที่ส่งผลต่อร้อยละการเปลี่ยนแปลง.

เมื่อทำการทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของซับสเตรตสูงสุดที่ถังปฏิกรณ์ไฮโดรไลซิสสามารถทำได้ พบว่า ใบกวนแบบ Helix 2 สามารถเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรตจากเดิม ร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นร้อยละ 45 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า ซึ่งนั้นหมายถึงต้นทุนการผลิตที่ลดลง ดังนั้น ในการผลิตจริงต้องทำการสมดุลต้นทุนในการผลิตและต้นทุนของวัตถุดิบที่ต้องใช้เพื่อให้เศรษฐศาสตร์ในการผลิตสามารถผลิตได้จริงในเชิงพาณิชย์.

4. สรุปผลการวิจัย

จากการเปรียบเทียบการปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันมากนักระหว่างการปรับสภาพด้วยเบสขั้นตอนเดียวหรือการปรับสภาพสองขั้นตอน (กรดและเบส หรือเบสและกรด) ดังนั้น การปรับสภาพด้วยเบสเพียงขั้นตอนเดียวจึงมีความเหมาะสมกว่าทั้งในแง่ของกระบวนการและเศรษฐศาสตร์ โดยสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพชีวมวลยอดและใบอ้อย คือ การปรับสภาพในหม้อต้มความดัน (Auto-Clave) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) NaOH สัดส่วนของวัตถุดิบยอดและใบอ้อยและสารละลายเบสเท่ากับร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) โดยองค์ประกอบที่ได้จากการปรับสภาพประกอบด้วย NDS ร้อยละ 13, เฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 17.15, เซลลูโลสร้อยละ 63.78, ลิกนินร้อยละ 2.98 และเถ้าร้อยละ 2.32 ซึ่งจะใช้เป็นซับสเตรตในขั้นตอนของการไฮไดรไลซิส.

จากผลการเปรียบเทียบใบกวนระหว่างใบกวนแบบ Plate ใบกวนแบบ Rushton ใบกวนแบบ Helix 1 และใบกวนแบบ Helix 2 โดยทำการการไฮโดรไลซิสซับสเตรตด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/$g_{Substrate}$, ความเร็วรอบการกวน 150-250 rpm และอุณหภูมิ 50°ซ. โดยใช้ความเข้มข้นซับสเตรต ร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่า ร้อยละการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเท่ากับ 69, 68, 71 และ 83 ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาปกติที่ใช้ขั้นตอนการแยกไฮโดรไลซิสและการหมัก (Separate Hydrolysis and Fermentation; SHF) เท่ากับ 89, 88, 92 และ 101 ตามลำดับ ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าใบกวนแบบ Helix2 เป็นใบกวนที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการไฮโดรไลซิส.

จากการทดลองการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตโดยใช้ใบกวนแบบ Helix 2 โดยทำการการไฮโดรไลซิสซับสเตรตด้วยเอนไซม์ Cellic® CTEC 2 ความเข้มข้น 5 FPU/$g_{Substrate}$ ความเร็วรอบการกวน 150-250 rpm และอุณหภูมิ 50°ซ. โดยใช้ความเข้มข้นซับสเตรตร้อยละ 15, 25, 35, 45 (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 92, 154 ,195 และ 254 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยมีร้อยละการเปลี่ยนแปลงสูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 71, 70, 65 และ 63 ตามลำดับ โดยร้อยละการเปลี่ยนแปลงจะแปลงผกผันกับความเข้มข้นของซับสเตรต.

5. แนวทางการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการพัฒนาปฏิกรณ์ในการไฮโดรไลซิสไม่ใช่การพัฒนาอุปกรณ์ เพื่อการขยายขนาดไปสู่อุตสาหกรรม แต่เป็นการพัฒนาอุปกรณ์พื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี สำหรับกระบวนการชีวภาพที่ใช้วัสดุลิโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ ซึ่งกระบวนการที่ใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบจำเป็นต้องทำการพัฒนาอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้ความหนาแน่นของสารตั้งต้นสูง เนื่องมาจากค่าใช้จ่ายจำนวนมากทางด้านพลังงานและสารเคมีในการเปลี่ยนสายโซ่เซลลูโลสเป็นน้ำตาล ทำให้ต้นทุนการผลิตทั้งกระบวนการสูงขึ้น ทั้งที่ต้นทุนวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสถูกกว่าการใช้แป้งหรือน้ำตาลเป็นสารตั้งต้น ดังนั้น การพัฒนาปฏิกรณ์ในการไฮโดรไลซิสในสภาวะความหนาแน่นของสารตั้งต้นที่สูงจึงมีความจำเป็นมาก โดยมีกลุ่มเป้าหมายที่จะนำเอาผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 กลุ่มเป้าหมายการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ รูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์ ผลลัพธ์และผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

กลุ่มเป้าหมาย	หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง	การนำไปต่อยอดให้เกิดมูลค่าเพิ่ม	ผลลัพธ์จากการนำไปใช้ประโยชน์	ผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้นทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม
ภาคการวิจัยและพัฒนา	สถาบันวิจัย และสถาบันการศึกษา	เป็นงานวิจัยต้นแบบฯ	เพิ่มความเป็นไปได้ในการพัฒนาเทคโนโลยีเซลลูโลสิกเอทานอลในประเทศไทย	**ด้านเศรษฐกิจ** สามารถลดต้นทุนในการผลิต **ด้านสังคม** ขับเคลื่อนเศรษฐกิจโดยรวมในภาคการเกษตร
ภาคอุตสาหกรรม	กลุ่มอุตสาหกรรมชีวภาพและเอทานอล	เป็นงานวิจัยต้นแบบฯ	เพิ่มผลิตผล (Productivity)	**ด้านสิ่งแวดล้อม** ลดพลังงานที่ใช้ในการผลิต ลดปริมาณของเสียที่เกิดจากกระบวนการ

ซึ่งการเพิ่มปริมาณซับสเตรตที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสได้ถึงร้อยละ 45 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ทำให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ถึง 250 กรัม/ลิตร ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ประมาณ 125 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าที่เคยทำได้ในห้องปฏิบัติการที่ 50 กรัม/ลิตร ถ้าใช้ร่วมกับวิธีการร่วมระหว่างไฮโดรไลซิสและการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation) คาดว่าจะทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นได้มากกว่า 125 กรัม/ลิตร ซึ่งจะส่งผลต่อผลผลิต (yields) ของระบบ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อต้นทุนในการผลิตเซลลูโลสสิกเอทานอลต่ำลง และเมื่อประกอบกับเทคโนโลยีอื่นๆ จะทำให้เทคโนโลยีการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลมีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น นอกจากนี้ การที่สามารถผลิตน้ำตาลความเข้มข้นสูงยังส่งผลต่อกระบวนการชีวภาพอื่นๆ ที่กำลังวิจัยและพัฒนาอยู่ ณ ขนาดนี้ เช่น กระบวนการผลิตบิวทานอล กระบวนการผลิตกรดแล็กติก เป็นต้น ซึ่งเราจะสามารถผลิตน้ำตาลได้เท่าที่ความต้องการของเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆ สามารถใช้ได้ และไม่มีการสูญเสียในระบบอย่างที่ไม่ควรจะเป็น ช่วยต่อยอดกระบวนการชีวภาพของประเทศไทยในอนาคต.

6. ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเป็นงานวิจัยเพื่อใช้ในการวิจัยและพัฒนาในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งปฏิกรณ์ไฮโดรไลซิสจะมีประโยชน์ในการนำเอาไปใช้ต่อไปในอนาคต ดังนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล ซึ่งได้จากการไฮโดรไลซิสชีวมวลหลังการปรับสภาพ เพื่อหาสมการการทำนายการผลิตน้ำตาล เพื่อกระบวนการชีวภาพ ซึ่งจำเป็นต้องใช้น้ำตาลในการผลิต.

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ในกระบวนการแยกระหว่างการไฮโดรไลซิสและการหมัก (Separate Hydrolysis and Fermentation).

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ในกระบวนการรวมการไฮโดรไลซิสและการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation) ผลิตลงได้มาก.

4. ศึกษาการกู้คืน (Recovery) เอทานอลระหว่างกระบวนการหมักแบบความหนาแน่นสูง (High Gravity Fermentation) เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอล.

5. ศึกษาเอนไซม์ชนิดใหม่ๆ ซึ่งสามารถทำงานได้ที่สภาวะต่างๆ และมีกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งสามารถทำงานได้ดีและรวดเร็ว เพื่อให้ใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยที่สุดในการทำการไฮโดรไลซิส.

6. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลด้วยวัสดุลิกโนเซลลูโลสในเชิงพาณิชย์ โดยเริ่มจากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสแบบครบวงจร.

7. เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2551. รายงานสถิติพลังงานของประเทศไทย 2557, [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.dede.go.th/dede/images/stories/stat_dede/Th_En_St_2014_p.pdf, [เข้าถึงเมื่อ 10 กรกฎาคม 2557].

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2553. แผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.dede.go.th/dede/fileadmin/upload/nov50/mar52/REDP_preent.pdf, [เข้าถึงเมื่อ 13 พฤศจิกายน 2554].

เตีย, สุวิทย์; สุภานิช, บุณยพัฒน์ และสาย, สุทธิดา. 2545. การประเมินความเป็นได้ของการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย, กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 14-17.

ปารเมศ, ชุติมา. 2545. การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 1-8.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2553. *สาสน์ปริทรรศน์อุตสาหกรรมเกษตร*. **1**(1), [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.agro.cmu.ac.th/Service50/eview%5CPVol01_May09.pdf, [เข้าถึงได้เมื่อ 13 พฤศจิกายน 2554].

รอดทัศนะ, อิสระ. 2550. การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้น เพื่อผลิตเอทานอลจากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 5-20.

ศูนย์บริการการค้าและการลงทุนจังหวัดเชียงใหม่ สำนักงานพาณิชย์จังหวัดเชียงใหม่. 2557. บทวิเคราะห์การลงทุนการปลูกข้าวในจังหวัดเชียงใหม่. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.rice.moc.go.th/editor/uploads/document/1294286897.pdf, [เข้าถึงเมื่อ 13 พฤศจิกายน 2554].

ศรีนรคุตร, ธีรภัทร; กิจปรีชาวนิช, วิเชียร; อัครจรัลญา, อัญชริดา; ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, ณัฐชนัญ; ฝั่งสินธุ์, บัณฑิต; ปั้นพันธุ์, วิษณุ; กัณหานนท์, เทพฤทธิ์; รัตนสงฆ์, ยุทธศักดิ์; สุทธิกุล, สุทธิ์กมล; เม้าทุ่ง, บัญชา; วังพิลา, มนตรี; สุบการี, ยุทธศักดิ์ และเดชคง, ปิยวรรณ. 2553. การเพิ่มผลผลิตน้ำตาลจากชีวมวลด้วยกรดอ่อน โครงการเอทานอล. ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย (วว.).

ศรีนรคุตร, ธีรภัทร; ปั้นพันธุ์, วิษณุ; กัณหานนท์, เทพฤทธิ์; รัตนสงฆ์, ยุทธศักดิ์; สุทธิกุล, สุทธิ์กมล; สุบการี, ยุทธศักดิ์ และบำรุงเชื้อ, นันทนา. 2556ก. การเพิ่มผลผลิตน้ำตาลจากชีวมวลด้วยกรดอ่อน III, ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.).

ศรีนรคุตร, ธีรภัทร; กิจปรีชาวนิช, วิเชียร; อัครจรัลญา, อัญชริดา; ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, ณัฐชนัญ; ฝั่งสินธุ์, บัณฑิต; รัตนสงฆ์, ยุทธศักดิ์; สุทธิกุล, สุทธิ์กมล; เม้าทุ่ง, บัญชา; วังพิลา, มนตรี; สุบการี, ยุทธศักดิ์ และเดชคง, ปิยวรรณ. 2551. การผลิตน้ำตาลจากยอดและใบอ้อย, ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.).

ศรีนรคุตร, ธีรภัทร; ฝั่งสินธุ์, บัณฑิต; ปั้นพันธุ์, วิษณุ; สุทธิกุล, สุทธิ์กมล; สุบการี, ยุทธศักดิ์ และบำรุงเชื้อ, นันทนา. 2556. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากยอดและใบอ้อย, ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.).

ศรีนรคุตร, ธีรภัทร; ฝั่งสินธุ์, บัณฑิต; อาคม, พิศุทธิ์; ปั้นพันธุ์, วิษณุ; จันทร์ผ่องศรี, สุรพงษ์; วุฒิเวทย์, เทพฤทธิ์; กัณหานนท์, เอกรัตน์; รัตนสงฆ์, ยุทธศักดิ์; สุทธิ์กมล, สุทธิกุล; สุบการี, ยุทธศักดิ์; บำรุงเชื้อ, นันทนา และสิรินิวัฒน์กุล, จิรัสย์. 2556ค. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลจากของเหลือทิ้งใบและยอดอ้อย, ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.).

ศิริโภค, สมใจ. 2547. *จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม*. พิมพ์ครั้งที่ 3, กรุงเทพฯ. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, บริษัท พิมพ์ดีจำกัด, หน้า 137-138.

สุทัศน์ ณ อยุธยา, ประไพศรี และพงศ์ชนัน, เหลืองไพบูลย์. 2008. การออกแบบและวิเคราะห์การทดลอง. บริษัท สำนักพิมพ์ท๊อป จำกัด, หน้า 259-290.

Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, K. and Pandey, A., 2010. Bioethanol Production from Rice Straw: An Overview, *Bioresource Technology*, **13,** pp. 767-4,774.

Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J., Saez, M. F. and Castro, E., 2008. Conversion of Olive Tree Biomass into Fermentable Sugars by Dilute Acid Pretreatment and Enzymatic Saccharification, *Bioresource Technology*, **99(6)** pp. 1,869-1,876.

Cardona, C. A., Sanchez, O.J. and Gutierrez, L. F., 2010. Process Synthesis for Fuel Ethanol Production. Taylor & Francis Group, Manizales, Colombia, pp. 61-62.

Chaudhary, G., Singh, L. K. and Ghosh, S., 2012. Alkaline Pretreatment Methods Followed by Acid Hydrolysis of Saccharum Spontaneum for Bioethanol Production, *Bioresource Technology*.

Dasari, R. K., Dunaway, K. and Berson, R. E., 2009. Production of Biodiesel from Waste Frying Oils. *Energy and Fuel*, **23**, pp. 492–497.

Drapcho, C. M., Nhuan, N. P. and Walker, T. H., 2008. Biofuels Engineering Process Technology, Mc Graw Hill Companies, Inc., New York. pp. 153-224.

Gan, Q., Allen, S.J. and Taylor, G., 2002. Kinetic Dynamics in Heterogeneous Enzymatic Hydrolysis of Cellulose an Overview, an Experimental Study and Mathematical Modelling *Process Biochemistry*, **38**(7), pp. 1003-1018.

Hideno, A, Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T., Inoue, S., Endo, T. and Sawayama, S., 2009. Wet Disk Milling Pretreatment without Sulfuric Acid for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw, *Bioresource Technology*, **100**(10), pp. 2,706-2,711.

Jeya, M., Zhang, Y. W., Kim, I. W. and Lee, J. K., 2009. Enhanced Saccharification of Alkali-Treated Rice Straw by Cellulase from Trametes Hirsuta and Statistical Optimization of Hydrolysis Conditions by RSM, *Bioresource Technology*, **100**, pp. 5,155–5,161.

Jin, S. and Chen, H., 2006. Superfine Grinding of Steam-Exploded Rice Straw and Its Enzymatic Hydrolysis, *Biochemical Engineering Journal*, **30**(3), pp. 225-230.

Jorgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J. and Felby, C., 2006 Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations, *Biotechnology and Bioengineering,* **96**, pp. 862–870.

Jurgens, M. H., 1980. *Animal Feeding and Nutrition*, 5th ed., Kendall/Hunt Publishing Company, United State of America.

Karunanithy, C. and Muthukumarappan, K., 2011. Optimization of Switchgrass and Extruder Parameters for Enzymatic Hydrolysis Using Response Surface Methodology. *Industrial Crops and Products***, 33,** pp. 188-199.

Kim, T. H. and Lee, Y. Y., 2007, Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia at Moderate Temperatures, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **137-140**(1-12), pp. 81-92.

Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P. and Singh, A., 2010. Bioethanol Production from Lantana Camara (Red Sage): Pretreatment, Saccharification and Fermentation, *Bioresource Technology*, **101** (21), pp. 8,348-8,354.

Larsen, J., Ostergaard Haven, M. and Thirup, L., 2012. Inbicon Makes Lignocellulosic Ethanol a Commercial Eeality, *Biomass and Bio Energy*, **46**, pp. 36-45.

Lu, J. and Zhou, P., 2011. Optimization of Microwave-Assisted $FeCl_3$ Pretreatment Conditions of Rice Straw and Utilization of Trichoderma Viride and Bacillus Pumilus for Production of Reducing Sugars, *Bioresource Technology***, 102**, pp. 6,966–6,971.

Modenbach, A. A. and Nokes, S. E., 2013. Enzymatic Hydrolysis of Biomass at High-Solids Loadings-A Review, *Biomass and Bio Energy*, **56**, pp. 526-544.

Rawat, R., Kumbharb, B. K. and Tewaria, L., 2013. Optimization of Alkali Pretreatment for Bioconversion of Poplar (Populus Deltoides) Biomass into Fermentable Sugars Using Response Surface Methodology*, Industrial Crops and Products*, **44**, pp. 220–226.

Roche, M. C., Dibble, C. J. and Stickel, J. J., 2009. Laboratory-Scale Method for Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass at High-Solids Loadings**.** *Biotechnology for Biofuels,* **4**, pp. 77–93.

Saha, B. C. and Bothast, R. J., 1999. Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corn Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* **76**(2), pp. 65-77.

Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A. and Wu, Y. V., 2005. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Wheat Straw to Ethanol. *Process Biochemistry*, **40**(12), pp. 3,693-3,700.

Saida, L., Dhaliwal, S. S., Oberoi, H. S. and Narasu, M. L., 2012. Optimization of Alkali Pretreatment Process Parameters for Sweet Sorghum Bagasse by Enzyme Hydrolysis Using Response Surface Methodology, *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences,* **2**(4), pp. 2,408-2,418.

Scherz, H. and Bonn., 1998. Analytical Chemistry of Carbohydrates, G. Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 354.

Singh, A. and Bishnoi, N. R., 2012. Enzymatic Hydrolysis Optimization of Microwave Alkali Pretreated Wheat Straw and Ethanol Production by Yeast. *Bioresource Technology*, **108**, pp. 94–101.

Singh, A., Tuteja, S., Singh, N. and Bishnoi, N.R., 2011. Enhanced Saccharification of Rice Straw and Hull by Microwave–Alkali Pretreatment and Lignocellulolytic Enzyme Production. *Bioresource Technology*, **102**, pp. 1,773–1,782.

Sun, Y. and Cheng, J., 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review. *Bioresource Technology*, **83**(1), pp. 1-11.

Sun, Y. and Cheng, J.J., 2005, Dilute Acid Pretreatment of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production. *Bioresource Technology*, **96**(14), pp. 1,599-1,606.

Wang, W., Zhuang, X. S., Yuan, Z. H., Yu, Q. Qi. W., Wang, Q. and Tan, X., 2012. High Consistency Enzymatic Saccharification of Sweet Sorghum Bagasse Pretreated with Liquid Hot Water. *Bioresource Technology,* **108**, pp. 252–257.

Xuebing, Z., Keke, C. and Dehua, L., 2009. Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enzymatic Hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**(5), pp. 815-827.

Yang, B. and Wyman, C. E., 2008. Pretreatment: The Key to Unlocking Low-Cost Cellulosic Ethanol, Biofuels, *Bioproduction and Biorefining* **2**, pp. 26–40.

Yadav, K.S., Naseeruddin, S., Prashanthi, G.S., Sateesh, L. and Rao, L.V., 2011. Bioethanol Fermentation of Concentrated Rice Straw Hydrolysis Using Co-Culture of Saccharomyces Cerevisiae and Pichia Stipitis, *Bioresource Technology*, **102**(11) pp. 6473-6478.

Zhang, Q. Z. and Cai, W.M., 2008. Enzymatic Hydrolysis of Alkali-Pretreated Rice Straw by Trichoderma Reesei ZM4-F3. *Biomass Bioenergy*, **32**(12), pp. 1,130-1,135.

Zhang, J., Chu, D., Huang, J., Yu, Z., Dai, D. and Bao, J., 2009. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation at High Corn Stover Solids Loading in a Helical Stirring Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **105,** pp. 718–728.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Ding, Y., Chi, R. a., Liao, J. and Zhang, Y., 2005. Comparison of Three Microwave/Chemical Pretreatment Processes for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. *Biosystems Engineering*, **93**(3), pp. 279-283.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

ก-1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส ลิกนินและเถ้าด้วยวิธีการของ Jurgen (1980)

1. การสกัดโปรตีนและส่วนที่ไม่ต้องการ (Impurites) ด้วยกระบวนการ Neutral Detergent Extraction โดยใช้ Neutral Detergent Solution ที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำมาทำการกรองและอบที่ 100°ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เย็นด้วยโถดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักที่หายไปเทียบกับน้ำหนักแห้งเบื้องต้น โดยน้ำหนักที่หายไป คือ น้ำหนักของโปรตีนและส่วนที่ไม่ต้องการ (NDS).

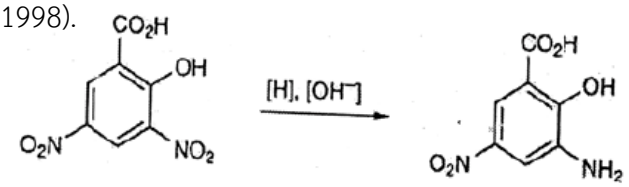
2. การสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยกระบวนการ Acid Detergent Extraction โดยนำตะกอนที่ได้มาทำการรีฟลักซ์ด้วย Acid Detergent Solution (ADS) และ Decalin ที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, จากนั้น นำมากรองและล้างด้วยน้ำร้อน 90-100°ซ. จำนวน 2 ครั้ง และล้างด้วยเอทานอล ร้อยละ 80 จำนวน 1 ครั้ง นำมากรองและอบที่ 100°ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เย็นภายในโถดูดความชื้น ผลต่างระหว่างน้ำหนักที่ชั่งได้เทียบน้ำหนักที่ชั่งได้จากข้อ 1 เท่ากับน้ำหนักของเฮมิเซลลูโลส.

3. การสกัดลิกนินด้วยกระบวนการ Acid Detergent Lignin (ADL) นำตะกอนที่เหลือจากข้อ 2 มาสกัดแยกออกด้วย ADL แล้วทำการสกัดแบบเย็นเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยทำการกวนทุกๆ ชั่วโมง จากนั้นกรองและล้างด้วยน้ำร้อน 3 ครั้ง นำตะกอนที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ผลต่างระหว่างน้ำหนักที่ชั่งได้กับน้ำหนักในข้อ 2 จะเท่ากับน้ำหนักของลิกนิน.

4. การหาปริมาณเซลลูโลส ด้วยกระบวนการ Ash Determination นำตะกอนที่ได้จากข้อ 3 มาเผาที่ 500°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นน้ำหนักที่ชั่งได้เท่ากับน้ำหนักเถ้า ส่วนน้ำหนักที่หายไปเท่ากับน้ำหนักของเซลลูโลส.

ก-2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

หลักการของปฏิกิริยา เมื่อต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายเบสที่มีกรดไนโตรซาลิไซลิกจะเกิดเปลี่ยนรูปไปเป็นสารที่มีสีเข้มขึ้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และสาร 3, 5-dinitrosalicylic acid ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเข้มของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid ดังแสดงในรูปที่ ก-1 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร ปฏิกิริยานี้จะไม่หยุดจนกว่าสารตั้งต้นจะหมด (Scherz and Bonn 1998).



รูปที่ ก-1 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (Scherz and Bonn 1998).

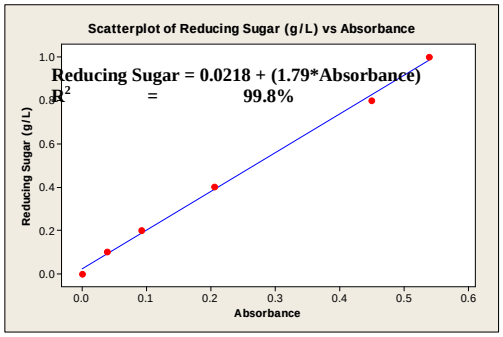
การเตรียมสารละลาย DNS Reagent (3,5-dinitrosalicylic acid)

ชั่งสาร	3, 5-dinitrosalicylic acid	10	กรัม
Sodium	potassium tartrate	300	กรัม
NaOH		16	กรัม

ละลายสารที่ชั่งมาในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยให้ความร้อนค่อยๆ เติมจนละลายหมดจนกระทั่งไม่มีตะกอน ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง.

การเตรียมสารละลายละลายมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ DNS

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส 10 กรัม/ลิตร โดยนำกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร.
2. เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0, 0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนตัวอย่างทำการเจือจางให้อยู่ในช่วงของสารละลายมาตรฐาน.
3. ดูดสารละลายน้ำตาลที่เตรียมไว้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง.
4. เติมสารละลาย DNS ลงไปในแต่ละหลอดๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน.
5. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที.
6. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว ในอ่างน้ำ.
7. เติมน้ำกลั่นอีกให้ครบ 5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน.
8. นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำไปผลการดูดกลืนแสงสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ ก-2.
9. คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่สร้างได้ พร้อมคูณความเข้มข้นที่ทำการเจือจางในขั้นตอนที่ 2.



รูปที่ ก-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย. กลูโคสมาตรฐาน.

ภาคผนวก ข
ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ข-1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวล

Composition of Biomass	NDF	ADF	ADL	Ash
Sugar Cane Shoot and Leaf	83.79	45.36	5.51	5.79
Pretreated by Alkaline Batch 1	85.44	66.44	2.67	2.30
Pretreated by Alkaline Batch 2	87.04	71.74	3.30	2.34
Pretreated by Acid Batch 1	82.37	78.43	13.14	2.74
Pretreated by Acid Batch 2	83.16	77.95	13.70	2.64
Pretreated by Alkaline + Acid Batch 1	82.64	75.51	3.37	0.51
Pretreated by Alkaline + Acid Batch 2	85.95	78.68	3.47	0.50
Pretreated by Acid + Alkaline Batch 1	82.90	76.35	5.00	0.33
Pretreated by Acid + Alkaline Batch 2	79.10	71.93	4.90	0.41

ตารางที่ ข-2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด้วยวิธีการ DNS

Experiment	Time (hr)	Absorbance			Reducing Sugar (g/L)
Plate Impeller	12	0.3658	0.3742	0.3697	64
	24	0.4699	0.4785	0.4781	83
	36	0.4994	0.5104	0.5076	88
	48	0.5057	0.5222	0.5113	89
	72	0.5071	0.5185	0.5197	90
	96	0.5129	0.5170	0.5078	89
Rushton Impeller	12	0.3971	0.3982	0.3974	69
	24	0.4725	0.4708	0.4710	82
	36	0.4917	0.5006	0.4934	86
	48	0.5085	0.4991	0.5051	88
	72	0.4989	0.4978	0.5029	87
	96	0.4977	0.4918	0.5019	86

ตารางที่ ข-2 (ต่อ)

Experiment	Time(hr)	Absorbance			Reducing Sugar (g/L)
Helix 1	4	0.3603	0.3525	0.3561	62
	6	0.3780	0.3769	0.3778	66
	9	0.4097	0.4086	0.4087	71
	12	0.4245	0.4313	0.4309	75
	24	0.4807	0.4829	0.4813	84
	36	0.5024	0.5150	0.5047	88
	48	0.5247	0.5372	0.5353	93
	72	0.5246	0.5221	0.5380	92
	96	0.5323	0.5246	0.5225	92
Helix 2	4	0.3436	0.3423	0.3433	60
	6	0.3783	0.3798	0.3794	66
	9	0.4092	0.4168	0.4151	72
	12	0.4554	0.4593	0.4556	79
	24	0.4838	0.4829	0.4832	84
	36	0.5018	0.5011	0.5011	87
	48	0.5046	0.5187	0.5084	89
	72	0.5752	0.5747	0.5716	100
	96	0.5711	0.5784	0.5693	100

ตารางที่ ข-2 (ต่อ)

Experiment	Time (hr)	Absorbance			Reducing Sugar(g/L)
15% (w/v) Solid Loading	4	0.1718	0.1712	0.1713	60
	6	0.1892	0.1899	0.1894	66
	9	0.2046	0.2084	0.2081	72
	12	0.2277	0.2297	0.2295	80
	15	0.2419	0.2415	0.2416	84
	18	0.2509	0.2506	0.2509	87
	21	0.2523	0.2594	0.2587	89
	24	0.2645	0.2642	0.2643	92
	36	0.2773	0.2819	0.2807	97
	48	0.2894	0.2892	0.2892	101
	72	0.2813	0.2825	0.2875	99
	96	0.2877	0.2896	0.2863	100

ตารางที่ ข-2 (ต่อ)

Experiment	Time (hr)	Absorbance			Reducing Sugar (g/L)
25%(w/v) Solid Loading	4	0.3123	0.30872	0.3122	108
	6	0.3311	0.33025	0.3306	115
	9	0.3591	0.36475	0.3614	126
	12	0.3758	0.39486	0.3848	134
	15	0.3923	0.40433	0.3954	138
	18	0.4170	0.41937	0.4171	145
	21	0.3986	0.41984	0.4106	143
	24	0.3900	0.39874	0.3927	137
	36	0.4168	0.41492	0.4159	145
	48	0.4490	0.44278	0.4458	155
	72	0.4441	0.44059	0.4414	154
	96	0.44496	0.44735	0.4469	155

ตารางที่ ข-2 (ต่อ)

Experiment	Time (hr)	Absorbance			Reducing Sugar(g/L)
35%(w/v) Solid Loading	4	0.4275	0.4414	0.4283	150
	6	0.4854	0.4816	0.4833	168
	9	0.4882	0.4872	0.4876	170
	12	0.5075	0.5038	0.5068	176
	15	0.5497	0.5162	0.5188	184
	18	0.5531	0.5335	0.5384	188
	21	0.5352	0.5688	0.5526	192
	24	0.5522	0.5373	0.5478	190
	36	0.5489	0.5616	0.5489	192
	48	0.5581	0.5548	0.5569	194
	72	0.6099	0.5920	0.6099	210
	96	0.5896	0.5783	0.5873	204

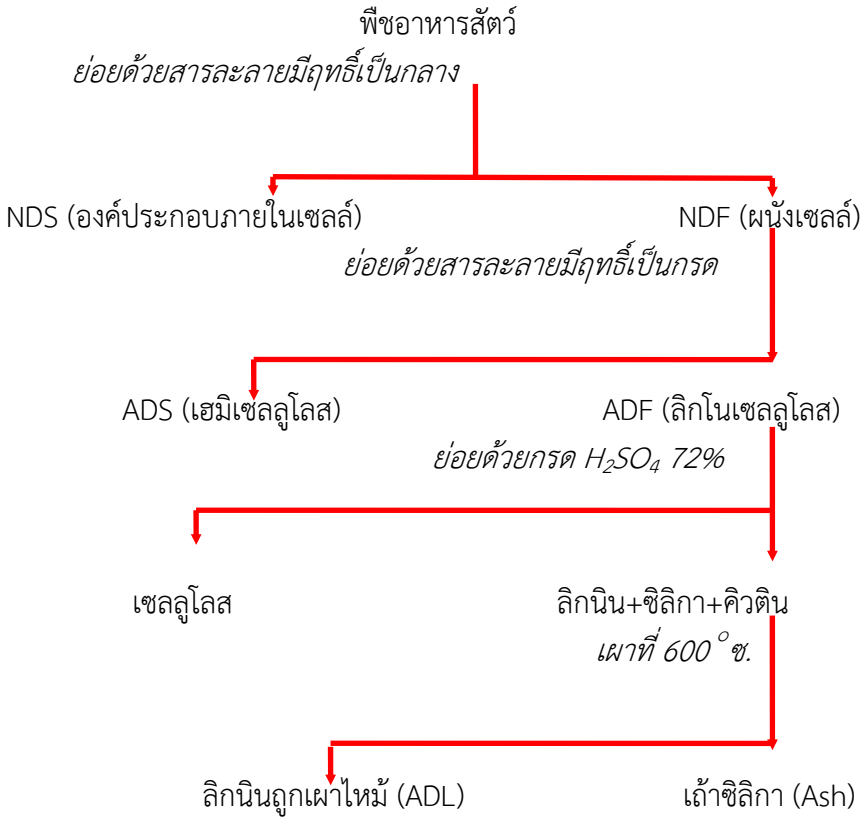
ตารางที่ ข-2 (ต่อ)

Experiment	Time (hr)	Absorbance			Reducing Sugar(g/L)
45%(w/v) Solid Loading	4	0.6600	0.6622	0.6608	230
	6	0.6971	0.6964	0.6969	242
	9	0.7377	0.7357	0.7359	256
	12	0.7611	0.7509	0.7530	263
	15	0.7974	0.7920	0.7962	277
	18	0.7949	0.8206	0.8151	282
	21	0.8228	0.8144	0.8187	285
	24	0.8354	0.8358	0.8249	290
	36	0.8595	0.8476	0.8402	295
	48	0.8588	0.8377	0.8417	294
	72	0.8535	0.8538	0.8536	297
	96	0.8457	0.8374	0.8400	293

ภาคผนวก ค
ตัวอย่างการคำนวณองค์ประกอบของชีวมวล

ตัวอย่างการคำนวณองค์ประกอบของชีวมวล

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยได้ทำการหาองค์ประกอบของเส้นใยของชีวมวลที่ใช้ในกระบวนการ โดยส่งผลตรวจวิเคราะห์ที่คณะเกษตร มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน มีวิธีการคำนวณหาองค์ประกอบตามวิธีการแวงซูทจากผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ ค-1



รูปที่ ค-1 องค์ประกอบคุณค่าทางโภชนะของพืชอาหารสัตว์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีแวงซูต.

จากผลวิเคราะห์องค์ประกอบยอดและใบอ้อยก่อนเข้าสู่กระบวนการได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

Neutral Detergent Fiber (NDF)	83.79%
Acid Detergent Fiber (ADF)	45.36%
Acid Detergent Lignin (ADL)	5.51%
Ash (Siliga)	5.79%

โดยสามารถคำนวณออกมาเป็นองค์ประกอบต่างๆ ได้ดังนี้

%Neutral Detergent Soluble (NDS)	=	100	-	NDF
	=	100	-	83.79
	=	16.21%		

% Acid Detergent Soluble (ADS)	=	NDF	-	ADF		
	=	83.79	-	45.36		
	=	38.43%		=	Hemicellulose	
Acid Detergent Lignin (ADL)	=	5.51%		=	Lignin	
Ash (Silica)	=	5.79%		=	Ash	
Cellulose	=	ADF	-	ADL	-	Ash
	=	45.36	-	5.51	-	5.79
	=	34.06%				

สรุปองค์ประกอบของยอดและใบอ้อยได้ ดังนี้

%NDS	=	16.21%
%Hemicellulose	=	38.43%
%Cellulose	=	34.06%
%Lignin	=	5.51%
%Ash	=	5.79%

ภาคผนวก ง
ตัวอย่างการคำนวณร้อยละการเปลี่ยนแปลง

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละการเปลี่ยนแปลง

ในการทดลองร้อยละ 45 (น้ำหนักโดยปริมาตร) Solid Loading พบว่า ต้องทำการเติมกากยอดและใบอ้อยหลังการปรับสภาพ 6016 กรัม มีความชื้นเท่ากับร้อยละ 62. 6 ตามผลวิเคราะห์ความชื้น ดังนั้น ยอดและใบอ้อยแห้งมีเท่ากับ (6016 กรัม) * (100-62.6%) = 2,250 กรัม

องค์ประกอบยอดและใบอ้อยหลังจากการปรับสภาพเท่ากับ

NDS (%)	=	13.76
Hemicellulose (%)	=	17.15
Cellulose (%)	=	63.78
Lignin (%)	=	2.98
Ash (%)	=	2.32

จากยอดและใบอ้อยหลังการปรับสภาพซึ่งเป็นน้ำหนักแห้ง 1,250 กรัม คิดเป็นน้ำหนักองค์ประกอบต่างๆ ได้ ดังนี้

NDS (g)	=	(13.76%)*(2250 kg)	=	309.600 g
Hemicellulose (g)	=	(17.15%)*(2250 kg)	=	385.875 g
Cellulose (g)	=	(63.678%)*(2250 kg)	=	1435.050 g
Lignin (g)	=	(2.98%)*(2250 kg)	=	67.050 g
Ash (g)	=	(2.32%)*(2250 kg)	=	52.200 g

Cellulose

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหนึ่งของสับปะรดซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ จากสมการ

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

เซลลูโลส 162 กรัม เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลหกได้เท่ากับ 180 กิโลกรัม

จากเซลลูโลสจากยอดและใบอ้อยหลังการปรับสภาพเริ่มต้นเท่ากับ 1435.050 กรัม สมมุติให้เซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลหกทั้งหมด ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลจากเซลลูโลสที่ได้ทางทฤษฎีเท่ากับ (1435.050 กรัม)*(1.11) = 1592.9055 กรัม

Hemicellulose

เฮมิเซลลูโลสเป็นอีกองค์ประกอบหนึ่งของสับปะรดซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเฮมิเซลลูโลสเป็นสายโซ่ไซเลนจึงสมมุติให้ทั้งหมดเป็นไซเลน ส่วนการเปลี่ยนไซโลสเป็นเอทานอลยังไม่มีสมการที่แน่นอนจึงสมมุติให้ C_5 เท่ากับ C_6 ดังนั้น จะสามารถเขียนสมการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลและเอทานอลได้เท่ากับ

$$(C_5H_8O_4)_n \longrightarrow C_5H_{10}O_5$$

เฮมิเซลลูโลส 132 กรัม เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลหก 150 กรัม

จากเฮมิเซลลูโลสจากยอดและใบอ้อยหลังการปรับสภาพเริ่มต้นเท่ากับ 385.875 g สมมุติให้เฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลห้าได้ทั้งหมด ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลจากเฮมิเซลลูโลสที่ได้ทางทฤษฎีเท่ากับ (385.875)*(1.14) = 439.8975 กรัม

ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลทางทฤษฎีที่ควรจะได้จากการไฮโดรไลซิสเท่ากับ 1592.9055 + 439.8975 กรัม เท่ากับ 2032.803 กรัม.

จากผลวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 254.86 กรัม/ลิตร โดยได้ปริมาตร 5 ลิตร ดังนั้น ได้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสเท่ากับ (254.86*5) = 1274.3 กรัม

เมื่อหาร้อยละการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ (1274.3/2032.803)*100 เท่ากับร้อยละ 62.6868