การผลิตเอทานอลจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานเยื่อกระดาษโดยเอนไซม์เซลลูเลสและยีสต์

นางสาวกุลชาดา สง่าสินธุ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ETHANOL PRODUCTION FROM PULP MILL WASTEWATER SLUDGE BY CELLULASE ENZYME AND YEAST

Miss Kunchada Sangasintu

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Environmental Engineering

Department of Environmental Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานเยื่อกระดาษโดยเอนไซม์เซลลูเลสและยีสต์
โดย	นางสาวกุลชาดา สง่าสินธุ
สาขาวิชา	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วงศ์พันธ์ ลิมปเสนีย์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ)

…… กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสุทธิ์ เพียรมนกุล)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.พรรณวดี สุวัฒิกะ)

กุลชาดา สง่าสินธุ : การผลิตเอทานอลจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานเยื่อกระดาษโดยเอนไซม์เซลลูเลสและยีสต์ (ETHANOL PRODUCTION FROM PULP MILL WASTEWATER SLUDGE BY CELLULASE ENZYME AND YEAST) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ, 110 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตเอทานอล โดยทำการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาลซึ่งใช้เป็นสับสเตรท หรือ สารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล จากผลการวิเคราะห์กากตะกอนเยื่อกระดาษพบปริมาณโฮโลเซลลูโลส อัลฟาเซลลูโลส เบต้าเซลลูโลส แกมมาเซลลูโลสและลิกนิน เท่ากับ 73.3, 67.1, 4.7, 1.4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษพบว่าที่อัตราส่วน 1:15 ให้ผลผลิตน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 33.99 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการทดลองจากการทดลองทั้งหมด 7 วัน ทดลองโดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมมาใช้เพื่อการผลิตเอทา-นอลแบบรวมปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยา ผลการทดลองพบว่าการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงกว่าการผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยา การผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลา และพบว่าให้ผลผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 7.26 กรัม/ลิตร ในวันที่ 7 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง เมื่อการผลิตเอทานอลถูกขยายขนาดโดยทำการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมและเพิ่มระยะเวลาในกระบวนการหมัก ผลการทดลองพบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 9.15 กรัม/ลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ว่าเซลลูโลสจากกากตะกอนเยื่อกระดาษสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นทางเลือกของการผลิตพลังงานในอนาคตได้

ภาควิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2553

5170226521 : MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING
KEYWORDS : PULP MILL WASTEWATER SLUDGE / CELLULASE / SACCHARIFICATION / FERMENTATION / CELLULASE ENZYME / YEAST

KUNCHADA SANGASINTU: ETHANOL PRODUCTION FROM PULP MILL WASTEWATER SLUDGE BY CELLULASE ENZYME AND YEAST. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. PETCHPORN CHAWAKITCHAREON; Ph.D., 110 pp.

The objective of this study aimed to evaluate the potential of pulp mill wastewater sludge as substrate for ethanol production. The experiment was carried out in order to determine the appropriate proportion between the cellulase and the pulp mill wastewater sludge for sugar production. The pulp mill wastewater sludge has an average content of 73.3% holocellulose, 67.1% alpha cellulose, 4.7% beta cellulose and 1.4% gamma cellulose and 6% lignin. The experiment was investigated at various proportions of cellulase and pulp mill wastewater sludge. The results indicated that the highest sugar production volume was at the proportions of 1:15 (ml of enzyme/gram of dried sludge) which gave the maximum amount of sugar 33.99 mg/ml on the 6^{th} day of the total 7 days. This proportion was then applied to the ethanol production under simultaneous saccharification and fermentation compared with the separated saccharification and fermentation process. The results indicated that the simultaneous saccharification and fermentation gave ethanol volume more than the separated saccharification and fermentation process. The ethanol volume was likely to increase with time and the maximum volume was at 7.26 g/l on the 7^{th} day, the last day of the experiment. The ethanol production was scaled up to 5 L fermentor under optimum proportion and increased the fermentation period. It was found that the ethanol production gave the maximum volume of 9.15 g/l. These results showed that the cellulose from pulp mill wastewater sludge was as effective raw material for ethanol production and alternative energy for the future.

Department : Environmental Engineering Student's Signature……...
Field of Study : Environmental Engineering Advisor's Signature……...
Academic Year : 2010

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณต่อผู้ที่ให้ความอนุเคราะห์ดังต่อไปนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษาแนะแนวทางหลักการในการดำเนินงานวิจัย และแก้ไขสิ่งบกพร่องมาตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย ซึ่งมีส่วนสำคัญมากในการทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ วงศ์พันธ์ ลิมปเสนีย์ ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ตลอดจน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสุทธิ์ เพียรมนกุล และ อาจารย์ ดร.พรรณวดี สุวัฒิกะ ที่ได้ให้คำปรึกษา ชี้แนะ จนวิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี

คณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและให้ความรู้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและบัณฑิต ห้องปฏิบัติการน้ำดี และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้วัสดุอุปกรณ์ในการทดลอง

ขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา และดูแลกันและกันในระหว่างการทำวิจัยมาโดยตลอด

งานวิจัยวิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 12 (2/2553) รหัสโครงการ 65453210700004 และได้จัดทำการบันทึกข้อมูลสารเคมีเข้าสู่ฐานข้อมูลของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยโปรแกรมการจัดการข้อมูลสารเคมี ChemTrack เรียบร้อยแล้วในช่วงเวลาเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม 2553

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูป ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล 4

2.2 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล 4

2.3 เซลลูโลสิกเอทานอล (Cellulosic Ethanol) 5

2.3.1 วิธีการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส 6

2.3.2 วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส 6

2.3.3 กระบวนการผลิต 7

2.3.3.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ 8

2.3.3.2 การย่อยเซลลูโลส 10

2.3.3.3 การกำจัดสารยับยั้งและสารเจือปน 12

2.4 เยื่อกระดาษ 13

2.4.1 วัตถุดิบ 13

2.4.2 องค์ประกอบหลักที่ใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษ 14

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.3 องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเยื่อกระดาษ 16
2.4.4 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ 19
2.5 กระบวนการหมัก 22
2.5.1 เทคโนโลยีการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล 23
2.5.2 เทคโนโลยีการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอล 25
2.5.2.1 เทคโนโลยีการหมักแบบแบตช์ 25
2.5.2.2 เทคโนโลยีการหมักแบบต่อเนื่อง 25
2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก 26
2.5.3.1 ผลของธาตุอาหาร เกลือแร่ วิตามิน ต่อการหมัก 26
2.5.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการหมัก 27
2.5.3.3 ผลของพีเอชต่อการหมัก 28
2.5.3.4 ความเข้มข้นของน้ำตาล 29
2.5.3.5 ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 29
2.5.3.6 คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน 29
2.5.3.7 ออกซิเจน 29
2.5.3.8 กรดน้ำส้มหรือกรดแอซิติก 30
2.5.3.9 สารส่งเสริมการเจริญเติบโต 30
2.6 จุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ 30
2.6.1 การเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ 31
2.6.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลส 32
2.7 จุลินทรีย์เพื่อการหมักเอทานอล 33
2.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมัก 35
2.9 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย 37
2.9.1 เชื้อรา *Trichoderma reesei* 37
2.9.2 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 38
2.10 การใช้ประโยชน์จากเอทานอลและผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล 39
2.11 การจัดการของเสียจากกระบวนการผลิตเอทานอลของโรงงานในประเทศไทย 42

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.12 งานวิจัยที่ผ่านมา 42

บทที่ 3 แผนการทดลองและการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 50
3.1.1 วัตถุดิบ 50
3.1.2 เชื้อยีสต์ 50
3.1.3 เอนไซม์เซลลูเลส 50
3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ 51
3.1.5 อุปกรณ์และสารเคมี 51
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย 52
3.2.1 ขั้นตอนที่ 1 การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของกากตะกอนเยื่อกระดาษ 52
3.2.2 ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลส กับกากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาล 52
3.2.3 ขั้นตอนที่ 3 การผลิตยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก 53
3.2.4 ขั้นตอนที่ 4 การผลิตเอทานอลด้วยการหมักแบบแบตช์ (ทดลองในขวดทดลองขนาด 250 มล.) 54
3.2.4.1 แบบรวมปฏิกิริยา 54
3.2.4.2 แบบแยกปฏิกิริยา 56
3.2.5 ขั้นตอนที่ 5 การผลิตเอทานอลด้วยการหมักแบบแบตช์ (ทำการทดลองในถังหมัก) 57

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของกากตะกอนเยื่อกระดาษ 58
4.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับ กากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาลกลูโคส 61
4.3 ผลการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล 64
4.3.1 การผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยา 64

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.3.2 การผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยา 65
4.4 ผลการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษด้วยวิธีแบบแบตช์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 72
4.5 ผลการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 76

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย 80
5.2 ข้อเสนอแนะ 82
5.3 การนำไปประยุกต์ใช้ 82

รายการอ้างอิง 84

ภาคผนวก 90
ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ (มาตรฐานของ Tappi) 91
ภาคผนวก ข. การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส 95
ภาคผนวก ค. วิธีคำนวณปริมาณเอทานอลจากพื้นที่ใต้กราฟที่ทำการตรวจวัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี 97
ภาคผนวก ง. ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เอทานอล 100
ภาคผนวก จ. ผลการทดลอง 101
ภาคผนวก ฉ. เอกสารรับรองการจัดเก็บสารเคมี 109

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 110

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า
ตารางที่ 2.1 ชนิดจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 31
ตารางที่ 2.2 ผลผลิตจากยีสต์ 34
ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี 55
ตารางที่ 4.1 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากตะกอนเยื่อกระดาษ 60
ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอล 60
ตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับ
กากตะกอนเยื่อกระดาษต่างๆ 63
ตารางที่ 4.4 ปริมาณการผลิตเอทานอลและน้ำตาลจากกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยา 65
ตารางที่ 4.5 ปริมาณการผลิตเอทานอลและน้ำตาลจากกระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยา 66
ตารางที่ 4.6 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยาและแยกปฏิกิริยา 68
ตารางที่ 4.7 งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส 68
ตารางที่ 4.8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการหมักแบบรวมและแยกปฏิกิริยา 70
ตารางที่ 4.9 ผลการผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร 73
ตารางที่ 4.10 ปริมาณการผลิตเอทานอลภายในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร
และถังหมักขนาด 5 ลิตร 75
ตารางที่ 4.11 ผลการผลิตเอทานอลและน้ำตาลจากกากตะกอนกระดาษที่ผ่านการ
ปรับสภาพด้วย 2%โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 76
ตารางที่ 4.12 ปริมาณการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านและ
ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 78
ตารางที่ 5.1 ปริมาณการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทต่างๆ 83
ตารางที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐาน 96
ตารางที่ ค.1 ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลมาตรฐาน 98
ตารางที่ จ.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับ
กากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาล 103
ตารางที่ จ.2 พื้นที่ใต้กราฟของมาตรฐานเอทานอล(ขวดทดลอง 250 มล.) 104
ตารางที่ จ.3 พื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลแบบรวมปฏิกิริยา
(ขวดทดลอง 250 มล.) 105

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ จ.4 พื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลแบบแยกปฏิกิริยา (ขวดทดลอง 250 มล.) 105
ตารางที่ จ.5 พื้นที่ใต้กราฟของมาตรฐานเอทานอล (ถังหมัก 5 ลิตร) 106
ตารางที่ จ.6 พื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลแบบรวมปฏิกิริยา (ถังหมัก 5 ลิตร) 107
ตารางที่ จ.7 พื้นที่ใต้กราฟของมาตรฐานเอทานอล (ถังหมัก 5 ลิตร และวัตถุดิบปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์) 107
ตารางที่ จ.8 พื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลแบบรวมปฏิกิยา (ถังหมัก 5 ลิตร และวัตถุดิบปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์) 108

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างผนังเซลล์ของพืช 18
รูปที่ 2.2 แผนภาพองค์ประกอบทางเคมีในเซลล์พืช 18
รูปที่ 2.3 ถังหมักทรงกระบอกขนาด 5 ลิตร 35
รูปที่ 2.4 ส่วนประกอบพื้นฐานของถังหมักแบบกวน 36
รูปที่ 2.5 *Trichoderma reesei* (เจริญบนอาหาร PDA) 37
รูปที่ 2.6 *Trichoderma reesei* (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์) 37
รูปที่ 2.7 *Saccharomyces cerevisiae* (เจริญบนอาหาร YMA) 38
รูปที่ 2.8 *Saccharomyces cerevisiae* (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์) 38
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการวิจัย 49
รูปที่ 3.2 กากตะกอนเยื่อหลังอบแห้ง 50
รูปที่ 3.3 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 50
รูปที่ 3.4 กระบวนการบำบัดน้ำเสียและจุดเก็บตัวอย่างตะกอนเยื่อกระดาษ 52
รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลส
กับกากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาล 53
รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการผลิตยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก 54
รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยา 55
รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยา 56
รูปที่ 3.9 ถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร 57
รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์เซลลูเลส
กับกากตะกอนเยื่อกระดาษต่างๆ 63
รูปที่ 4.2 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยาและแยกปฏิกิริยา
(ก) ชุดการทดลองที่ 1และ (ข) ชุดการทดลองที่ 2 69
รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการหมักแบบรวมและแยกปฏิกิริยา
(ก) ชุดการทดลองที่ 1และ (ข) ชุดการทดลองที่ 2 71
รูปที่ 4.4 การผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร 74

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า
รูปที่ 4.5 ผลการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพ
ด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 77
รูปที่ 4.6 การผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านและ
ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 79
รูปที่ ก.1 เครื่องกวนเยื่อกระดาษ (Pulp dispersion apparatus) 92
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 96
รูปที่ ค.1 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เอทานอลที่ได้จากเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี 97
รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานเอทานอล 98
รูปที่ ง.1 ลักษณะพีคของเอทานอลที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี 100
รูปที่ ง.2 ลักษณะพีคที่เกิดขึ้นตามหลังพีคเอทานอลที่วิเคราะห์ด้วย
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี 100
รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานเอทานอล (ขวดทดลอง 250 มล.) 104
รูปที่ จ.2 กราฟมาตรฐานเอทานอล (ถังหมัก 5 ลิตร) 106
รูปที่ จ.3 กราฟมาตรฐานเอทานอล (ถังหมัก 5 ลิตร และวัตถุดิบปรับสภาพ
ด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์) 108

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากอดีตถึงปัจจุบัน ปัญหาพลังงานและเชื้อเพลิงเป็นปัญหาสำคัญที่ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยกำลังเผชิญอยู่ ทั้งนี้เนื่องมาจากการขยายตัวทางเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้ความต้องการใช้พลังงานสูงขึ้น ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งซึ่งมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านอุตสาหกรรมยานยนต์และการคมนาคมขนส่ง ส่งผลให้ความต้องการพลังงานในประเทศมีอัตราเติบโตสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประเทศไทยต้องนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศร้อยละ 90 ของปริมาณการใช้ทั้งหมด

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่ต้องประสบปัญหาราคาพืชผลตกต่ำจากการผลิตที่ล้นตลาดมาโดยตลอด ทำให้เกษตรกรยากจน เศรษฐกิจของประเทศไม่มั่นคง แนวคิดโครงการผลิตพลังงานทดแทนเอทานอล ไบโอดีเซล ในประเทศไทยเริ่มขึ้นในปี พ.ศ.2517 เนื่องจากเกิดวิกฤตการณ์น้ำมัน ปัญหาน้ำมันขาดแคลนจึงคิดที่จะหาพลังงานทดแทนอื่นๆ ใช้แทนน้ำมัน รวมถึงแนวพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ด้านการพัฒนาพลังงานทดแทน พระองค์ทรงริเริ่มให้พัฒนาเชื้อเพลิงน้ำมันจากวัสดุเกษตรมาใช้แทนน้ำมันดิบ ซึ่งเป็นการช่วยเหลือเกษตรกรอีกทางหนึ่ง วัตถุดิบที่นำมาผลิตเอทานอลได้แก่ วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง มันฝรั่ง เป็นต้น วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล บีท-รูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น และวัตถุดิบประเภทเส้นใย เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เป็นต้น

ปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่ของโลกใช้วัตถุดิบหลัก 2 ประเภท คือ น้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล และแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพด อย่างไรก็ตาม เริ่มมีความกังวลว่าวัตถุดิบดังกล่าวอาจไม่เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลในภายภาคหน้า และเป็นการนำพืชอาหารมาใช้ในบางประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกาและจีน ที่นำข้าวโพดมาใช้ผลิตเอทานอล ส่งผลให้ราคาสินค้าอาหารภายในประเทศปรับสูงขึ้น ดังนั้นปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลในหลายประเทศจึงมุ่งเน้นไปที่วัตถุดิบประเภทอื่น เช่น เซลลูโลส ซึ่งเป็นเศษเหลือใช้ที่ได้จากพืช (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2549)

อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษถือเป็นแหล่งวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสอีกแหล่งหนึ่ง ซึ่งมีกระบวนการผลิตที่ก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างและปัญหาที่สำคัญคือ การเกิดกากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge) ในปริมาณสูง ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดกากตะกอนดังกล่าวเป็นจำนวนมาก รวมทั้งอาจก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมตามมา แต่ใน

ขณะเดียวกันกากตะกอนเยื่อกระดาษที่เหลือทิ้งมากับน้ำเสียจากกระบวนการผลิตปริมาณมาก กลับถูกทิ้งไปโดยไร้ประโยชน์ หากมีการนำกากตะกอนเยื่อกระดาษไปใช้ประโยชน์อื่นได้ก็น่าจะช่วยลดปริมาณกากตะกอนเยื่อกระดาษและต้นทุนการกำจัด ซึ่งวิธีการกำจัดโดยทั่วไปจะใช้วิธีฝังกลบซึ่งสิ้นเปลืองมาก จึงมีแนวความคิดที่จะนำกากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลส นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นเอทานอล นอกจากนี้การผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษยังมีข้อดีกว่าการใช้วัตถุดิบชนิดอื่น เช่น มันสำปะหลังและอ้อย เนื่องจากไม่ต้องนำมาทำให้มีขนาดเล็กก่อนนำไปย่อยสลาย

เนื่องจากการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเส้นใยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลจะส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้กรดย่อยที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งด้วยวิธีทางชีวภาพโดยหาอัตราส่วนของกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งต่อเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล และรูปแบบที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือเอทานอล การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ถือเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อใช้พัฒนาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง เพื่อการนำกลับมาใช้ประโยชน์เป็นพลังงานทดแทนได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนเซลลูโลสจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตกระดาษไปเป็นเอทานอลด้วยการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ทำหน้าที่เปลี่ยนเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส และใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอล โดยมีวัตถุประสงค์ของการวิจัยดังนี้

1. เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกากตะกอนเยื่อกระดาษกับเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการผลิตน้ำตาล
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลแบบแบตช์ 2 รูปแบบคือ แบบรวมปฏิกิริยาและแบบแยกปฏิกิริยาในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ทดลองผลิตเอทานอลในถังหมักที่ขยายขนาดใหญ่ขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการทดลองโดยใช้ขวดรูปชมพู่ในระดับห้องปฏิบัติการ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา และห้องปฏิบัติการวิจัยและบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ จังหวัดปราจีนบุรี ใช้เอนไซม์เซลลูเลสซึ่งผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ATCC 26921 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จาก Sigma และใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
3. นำข้อมูลและรูปแบบที่เหมาะสมจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ มาใช้ในการทดลองผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาเพิ่มคุณค่าให้กลายเป็นพลังงานทดแทนในรูปของเอทานอลได้
2. ทราบถึงอัตราส่วนและรูปแบบการผลิตเอทานอลที่เหมาะสม โดยใช้การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเป็นต้นแบบ เพื่อการขยายขนาดการทดลองไปสู่ถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล

สารประกอบเอทานอลเป็นวัสดุใสไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นสารเคมีอินทรีย์ที่หมักได้จากพืชในกลุ่มแป้งหรือน้ำตาล เอทานอลเป็นที่รู้จักกันในชื่อทั่วไปว่า เอทิลแอลกอฮอล์ มีผสมอยู่ในสุราหรือเครื่องดื่มที่ผสมแอลกอฮอล์ทุกชนิดที่ใช้บริโภค เอทานอลในทางเคมีเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นไฮดรอกซิลดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วยหมู่ไฮดรอกซิล เอทานอลบริสุทธิ์มีจุดเดือดที่ 78.5 ºซ คุณสมบัติของเอทานอลใช้เป็นสารเพิ่มออคเทนในน้ำมันแก๊สโซลีนได้ ทำให้มีการใช้ผสมแก๊สโซลีนอย่างแพร่หลายแทนสารผสมที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือ สาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่งมีการค้นพบว่าเป็นสารที่มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อมีการรั่วไหลออกสู่แหล่งน้ำสาธารณะและเคยมีกรณีปนเปื้อนในน้ำดื่มในสหรัฐอเมริกา หากมีการห้ามใช้สาร MTBE ผสมในเชื้อเพลิง จะทำให้มีความต้องการใช้เอทานอลเพิ่มขึ้น

ในปัจจุบันมีการผลิตเอทานอลในทุกภูมิภาคของโลกประมาณ 31,000 ล้านลิตร โดยประมาณ 2 ใน 3 ผลิตในทวีปอเมริกาที่สหรัฐอเมริกาและที่ประเทศบราซิล ส่วนที่เหลือครึ่งหนึ่งผลิตในแถบเอเชีย และอีกครึ่งหนึ่งผลิตในยุโรปและที่อื่นๆ เอทานอลทั้งหมดผลิตจากพืชน้ำตาลประมาณร้อยละ 60 ส่วนที่เหลือร้อยละ 35 ผลิตจากเมล็ดพืชและพืชกลุ่มแป้ง มีเพียงร้อยละ 5 ที่ผลิตโดยการสังเคราะห์ การใช้งานเอทานอลมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลัก 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเครื่องดื่ม กลุ่มอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ ยาและสี และกลุ่มวัสดุเชื้อเพลิงซึ่งมีปริมาณการใช้มากที่สุดถึงร้อยละ 70 ของปริมาณรวม การใช้งานเอทานอลในอุตสาหกรรมมีการขยายตัวสูงมากจากแนวโน้มของโลกที่มีการพึ่งพากระบวนการผลิตที่ใช้สารอินทรีย์มากยิ่งขึ้น

2.2 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

วัตถุดิบประเภทชีวมวลที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล โดยทั่วไปมี 3 ประเภทคือ

1. แป้ง
2. น้ำตาล
3. เซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลได้จากผลิตผลทางการเกษตรซึ่งส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหาร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง หัวบีท ข้าว ข้าวโพด เป็นต้น วัตถุดิบส่วนใหญ่ที่มีการนำมาใช้ผลิตเอทานอล ได้แก่ อ้อยและข้าวโพด ในประเทศบราซิลซึ่งเป็นผู้ผลิตน้ำตาลรายใหญ่ที่สุดของโลก มีการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล (molasses) ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกามีการผลิตเอทานอลจากข้าวโพดเป็นส่วนใหญ่

ในประเทศไทย นอกจากเช่นเดียวกับในประเทศที่กล่าวมาแล้ว ยังมีมันสำปะหลังที่มีการผลิตในปริมาณมาก ซึ่งมีศักยภาพสูงในการนำมาผลิตเอทานอลเช่นกัน เทคโนโลยีในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลได้รับการพัฒนามาเป็นเวลานาน ดังนั้นเทคโนโลยีประเภทนี้จึงค่อนข้างเป็นที่แพร่หลายในปัจจุบัน ส่วนเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสยังได้รับการพัฒนาไปไม่ดีเท่าที่ควร ส่วนใหญ่ยังเป็นการทดลองวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการหรือระดับโรงงานต้นแบบ มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพียงไม่กี่แห่งเท่านั้น (สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2552 : ออนไลน์)

การผลิตเอทานอลส่วนใหญ่ของโลกใช้วัตถุดิบหลัก 2 ประเภท คือ น้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล และแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพด อย่างไรก็ตาม เริ่มมีความวิตกกังวลว่าวัตถุดิบดังกล่าวอาจไม่เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลต่อไปในอนาคต และเป็นการนำพืชอาหารมาใช้ผลิตเอทานอล ซึ่งในบางประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกาและจีน ที่นำข้าวโพดมาใช้ผลิตเอทานอล ส่งผลให้ราคาสินค้าอาหารภายในประเทศปรับสูงขึ้น ดังนั้น ปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลในหลายประเทศจึงมุ่งเน้นไปที่วัตถุดิบประเภทอื่นคือ เซลลูโลส ซึ่งเป็นเศษเหลือใช้ที่ได้จากพืช

2.3 เซลลูโลสิกเอทานอล(Cellulosic Ethanol) (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2549)

เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลส ผลิตจากวัตถุดิบหลักประเภทฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด และเปลือกไม้ วัตถุดิบดังกล่าวประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic material) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์พืช ซึ่งเกิดขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวหรือโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลสจึงมีคุณสมบัติและลักษณะทางเคมีเช่นเดียวกับเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง ปัจจุบันการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในหลายประเทศ เช่น จีน และแคนนาดายังอยู่ในขั้นทดลอง

2.3.1 วิธีการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส (Cellulosic Ethanol) มี 2 วิธีหลัก ได้แก่

2.3.1.1 เซลลูโลไลซิส (Cellulolysis) คือการย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสแล้วหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยยีสต์กลายเป็นแอลกอฮอล์ผ่านการกลั่นและแยกน้ำจนเป็นเอทานอล

2.3.1.2 แก๊สซิฟิเคชั่น (Gasification) คือการแตกสารประกอบประเภทคาร์บอนของเซลลูโลสให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน จากนั้นเข้าสู่กระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์กลายเป็นแอลกอฮอล์ผ่านการกลั่นและแยกน้ำจนกลายเป็นเอทานอลบริสุทธิ์

ข้อดีของการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส

1.วัตถุดิบสามารถหาได้ง่ายเนื่องจากเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของพืชหลายประเภท และสามารถนำส่วนของพืชที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด และกากอ้อยมาใช้ในการผลิตได้

2.การผลิตและใช้เอทานอลจากเซลลูโลสช่วยลดก๊าซเรือนกระจกได้ถึงร้อยละ 85 ขณะที่การผลิตและใช้เอทานอลที่ผลิตจากแป้งช่วยลดก๊าซเรือนกระจกเพียงร้อยละ18-29

3.ช่วยลดปัญหาการนำพืชอาหารที่ใช้บริโภคไปผลิตเอทานอลเพราะเซลลูโลสเป็นส่วนของพืชที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ วัตถุดิบที่นำมาผลิตจึงไม่ใช่อาหารที่มนุษย์บริโภค

4.ทำให้มีปริมาณวัตถุดิบใช้ผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น จากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น น้ำอ้อยนำมาผลิตเอทานอลขณะที่กากอ้อยนำมาผลิตเอทานอล

ทั้งนี้อุปสรรคสำคัญของการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส คือ ต้นทุนการผลิตยังค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง ในปี 2549 ต้นทุนการผลิตเอทา-นอลจากเซลลูโลสของสหรัฐอเมริกาอยู่ที่ประมาณลิตรละ 0.59 ดอลลาร์สหรัฐ (เทียบกับราคาจำหน่ายในสหรัฐอเมริกาลิตรละ 0.40 ดอลลาร์สหรัฐ ในปัจจุบัน) อย่างไรก็ตาม สหรัฐอเมริกาตั้งเป้าลดต้นทุนดังกล่าวให้เหลือเพียงลิตรละ 0.28 ดอลลาร์สหรัฐ ภายในปี 2555

2.3.2 วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส (สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2552 : ออนไลน์)

กากชีวมวลที่มีเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลเป็นที่น่าสนใจเนื่องจากสารจำพวกลิกโนเซลลูโลสนี้มีมาก หาได้ง่าย มีราคาถูก นอกจากนั้นยังเป็นกากหรือวัสดุเหลือใช้ในการเกษตร การใช้กากชีวมวลประเภทนี้ทำให้สามารถเก็บแป้งหรือน้ำตาลไว้เป็นอาหารและนำส่วนที่เหลือทิ้งมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน โครงสร้างของกากชีวมวลที่เป็นลิกโนเซลลูโลส ที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยสารหลักๆ 3 ชนิดคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ในวัสดุชีวมวลแต่ละประเภทจะมีสัดส่วนของสารเหล่านี้ที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและสภาวะที่

พืชเจริญเติบโต เช่น ภูมิอากาศ ความสมบูรณ์ของดิน เป็นต้น เซลลูโลสเป็นสารโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสคล้ายแป้ง แต่พันธะของโมโนเมอร์จะเป็นเบต้าแทนที่จะเป็นอัลฟาเหมือนแป้ง พันธะเบต้านี้ทำให้เซลลูโลสมีลักษณะเชิงเส้น นอกจากนั้นพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นและโครงสร้างที่เป็นผลึกยังทำให้เซลลูโลสมีความเสถียรสูง เซลลูโลสจะมีสัดส่วนระหว่างร้อยละ 40-60 ของสารชีวมวล เฮมิเซลลูโลสซึ่งมีประมาณร้อยละ 20-40 เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเช่นเดียวกับเซลลูโลส แต่ในเฮมิเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาลเพนโตส (ไซโลส อะราบิโนส) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก และเฮกโซส (กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส) เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีการแตกกิ่งมาก และไม่เป็นผลึก ทำให้สามารถย่อยได้ง่าย ลิกนินเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในลิกโนเซลลูโลส ประมาณร้อยละ 10-25 ดังนั้นจึงพบลิกนินเป็นสารตกค้างในทุกกระบวนการที่ผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส ลิกนินเป็นสารโพลีฟีนอลที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตที่คอยยึดเหนี่ยวผนังเซลล์ของพืชเข้าด้วยกัน มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถย่อยสลายสารนี้ไปเป็นกรดอินทรีย์ที่มีมูลค่าสูง เช่น ฟีนอลและวานิลินได้ ถ้าสามารถหากระบวนการทางเคมีที่เปลี่ยนลิกนินให้เป็นสารที่มีมูลค่าเพิ่มสูงๆ ได้ ก็จะเพิ่มความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ให้กับกระบวนการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสได้อย่างมาก เนื่องจากในปัจจุบันลิกนินที่ได้มักใช้เพียงเป็นเชื้อเพลิงเท่านั้น ลิกนินยังสามารถนำไปใช้ทดแทนฟีนอลในการทำเรซินชนิดฟีนอลฟอร์มัลดีไฮด์ เนื่องจากลิกนินและเฮมิ-เซลลูโลสประกอบกันเป็นเปลือกหุ้มรอบๆ ตัวเซลลูโลสอยู่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีเพิ่มกระบวนการปรับสภาพเข้าไปเพื่อแยกลิกนินออกไปก่อนกระบวนการย่อยเซลลูโลส ต้นทุนของการผลิตเอทานอลจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมี (สัดส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) จะส่งผลอย่างมากต่อกระบวนการผลิต พืชโตเร็วตระกูลไม้เนื้ออ่อนหรือหญ้าจะเป็นตัวเลือกที่ดี เนื่องจากโตเร็ว ต้นทุนในการปลูกต่ำ สามารถขึ้นได้ในพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าไม้เนื้อแข็ง ฟางทั้งจากข้าวและข้าวสาลีจะมีลิกนินในปริมาณที่น้อยกว่า และมีน้ำตาลรวมสูงถึงร้อยละ 65-70 ดังนั้นฟางข้าวน่าจะเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับประเทศไทยเพราะเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ทำให้ไม่ต้องแย่งการใช้วัตถุดิบกับอุตสาหกรรมประเภทอื่น

2.3.3 กระบวนการผลิต

กระบวนการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสมีลักษณะคล้ายการผลิตเอทานอลจากแป้งซึ่งโดยทั่วไปประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือขั้นตอนของการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลและขั้นตอนของการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล แต่กระบวนการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสนั้น จะมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบเพิ่มเติมขึ้นมาเพื่อให้สามารถย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลได้ง่ายยิ่งขึ้น

2.3.3.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ

กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนที่จะได้เซลลูโลสแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ การปรับสภาพด้วยวิธีเชิงกล วิธีทางเคมี และทางชีวภาพ

<u>กระบวนการปรับสภาพเชิงกล</u> เป็นการใช้แรงกลหรือกระบวนการทางกายภาพ เพื่อทำความสะอาด ปรับขนาดและทำลายโครงสร้างเซลล์ของวัตถุดิบเพื่อให้ปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีในขั้นต่อไปเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง การตัดหรือบดให้ขนาดชิ้นวัตถุดิบมีขนาดเล็กลงจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ หรือไอน้ำจับกับวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น

ขั้นต่อไปเป็นการย่อย (hydrolysis) เฮมิเซลลูโลสและการแยกลิกนินที่อยู่รอบๆ เซลลูโลสออกไปด้วยวิธีการทางกายภาพ เคมี หรือชีวภาพ โดยการทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายออกไป จากนั้นเมื่อเติมน้ำหรือไอน้ำในขั้นต่อไป เฮมิเซลลูโลสก็จะถูกย่อยไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือคู่ น้ำตาลที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นไซโลส (xylose) โดยมีแมนโนส อะราบิโนสหรือกาแลคโตสผสมอยู่ด้วย เซลลูโลสบางส่วนอาจถูกย่อยในขั้นตอนนี้ก็เป็นได้ หลังจากนั้นก็จะกรองแยกส่วนที่เป็นกากซึ่งเป็นเซลลูโลสกับลิกนินออกมาเพื่อไปทำการย่อยต่อไป ในระหว่างการย่อยน้ำตาลที่ได้จากเฮมิเซลลูโลสอาจถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอ่อน สารประกอบฟูแรนและฟีนอล ซึ่งสารเหล่านี้จะยับยั้งปฏิกิริยาการหมักเอทานอลในขั้นตอนต่อไป อัตราการเกิดสารเหล่านี้แปรตามอุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดที่ใช้ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการนี้จึงสำคัญมาก

<u>กระบวนการปรับสภาพทางเคมี</u> ที่นิยมใช้แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

ก.) การใช้กรดอ่อน กรดแก่ และเบส กระบวนการใช้กรดอ่อนจะใช้กรดเกลือหรือกรดไนตริกเจือจาง กระบวนการที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือการใช้กรดกำมะถันเจือจาง (ร้อยละ 0.5-1.5, 160 ^{o}ซ) เนื่องจากในสภาวะนี้จะได้ผลผลิต (yield) ของเฮมิเซลลูโลสสูงถึงร้อยละ 75-90 ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ การใช้อุณหภูมิที่สูงจะทำให้เกิดสารที่ไม่พึงประสงค์และเป็นพิษต่อกระบวนการหมักในขั้นตอนต่อไป ถึงแม้ว่าการใช้กรดอ่อนจะมีต้นทุนต่ำแต่การกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นมีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการคิดกระบวนการใหม่โดยเพิ่มความเข้มข้นของกรดที่ใช้และทำในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ทำให้สามารถลดการเกิดสารพิษลงได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากกรดแก่ที่ใช้นั้นยากต่อการจัดการและจำเป็นต้องนำกลับมาใช้ใหม่ มิฉะนั้นจะไม่คุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ การนำวิธีการแยกด้วยไฟฟ้าและโครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนไอออนเพื่อการนำกรดมาใช้ใหม่ได้ จึงมีการวิจัยเพื่อพัฒนามาใช้จริงในอุตสาหกรรม

ข.) การย่อยด้วยด่าง การปรับสภาพสามารถทำได้ด้วยด่างเช่นกัน โดยด่างจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสบู่ (saponification) ของพันธะเอสเตอร์ระหว่างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสกับสารอื่น เช่น ลิกนิน การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง ทำให้วัสดุเกิดการพองตัวส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น และความเป็นผลึกลดลง เกิดการแยกตัวของโครงสร้างลิกนินและเฮมิ-

เซลลูโลส การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางนี้สามารถลดปริมาณของลิกนินในไม้เนื้อแข็งลงได้ และส่งผลดีต่อสารจำพวกฟางที่มีปริมาณลิกนินต่ำ แต่ไม่เหมาะกับวัสดุที่มีลิกนินสูง แอมโมเนียก็สามารถใช้กำจัดลิกนินได้ ประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินด้วยแอมโมเนียอยู่ที่ร้อยละ 60-80 สำหรับซังข้าวโพด (corn cobs) และร้อยละ 65-85 สำหรับหญ้าจำพวกสวิตช์แกรซ (switchgrass) แม้ว่าการใช้ด่างจะทำให้การย่อยเซลลูโลสในขั้นต่อไปมีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่วิธีนี้นอกจากจะต้องใช้เกลือที่มีราคาแพงแล้วยังสร้างของเสียที่เป็นเบสซึ่งยากต่อการกำจัด ทำให้เป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมได้

ค.) การย่อยด้วยโอโซน โอโซนจะทำปฏิกิริยากับลิกนินและเฮมิเซลลูโลสโดยไม่ทำให้เซลลูโลสเปลี่ยนแปลง การทดสอบวิธีนี้กับวัสดุหลายชนิดเช่น ฟางข้าวสาลี ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสงและขี้เลื่อย แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินโดยที่ไม่สร้างสารยับยั้งและสามารถทำได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติแต่เนื่องจากจำเป็นต้องใช้โอโซนปริมาณมาก ทำให้เป็นวิธีที่มีต้นทุนสูง

<u>การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ-เคมี</u> คือ การใช้น้ำร้อนความดันสูงกว่าจุดอิ่มตัวในการย่อยเฮมิเซลลูโลส วิธีนี้สามารถให้ผลผลิตของไซโลสที่สูงมากถึงร้อยละ 88-98 การอัดระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ไม่ใช้สารเคมี แต่ใช้ไอน้ำความดันสูง (7-50 บาร์, 160-290 °ซ) ในการให้ความร้อนกับวัตถุดิบเป็นเวลา 2-3 วินาที ถึง 2-3 นาที ก่อนที่จะลดความดันลงอย่างรวดเร็วจนถึงความดันบรรยากาศ กระบวนการนี้จะทำให้เกิดการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสและการเปลี่ยนแปลงในลิกนิน ทำให้การย่อยในขั้นต่อไปทำได้ง่ายขึ้น สภาวะที่มีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการนี้คือ ระยะเวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของวัสดุและปริมาณความชื้น สภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายคือ การใช้อุณหภูมิสูงและระยะเวลาสั้น (270 °ซ 1 นาที) หรือลดอุณหภูมิแล้วใช้เวลาให้นานขึ้น (190 °ซ 10 นาที) การระเบิดด้วยไอน้ำเหมาะสมสำหรับไม้เนื้อแข็งและเศษวัสดุทางเกษตร แต่ไม่เหมาะกับไม้เนื้ออ่อน ข้อดีของการระเบิดด้วยไอน้ำคือ ความต้องการพลังงานที่ต่ำกว่าการลดขนาดด้วยวิธีเชิงกล และไม่มีต้นทุนของการนำไปใช้ใหม่หรือต้นทุนทางสิ่งแวดล้อม ข้อจำกัดของวิธีนี้อยู่ที่การทำลายเฮมิ-เซลลูโลสไปบางส่วน การทำลายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สมบูรณ์และอาจก่อให้เกิดสารยับยั้งที่เป็นพิษต่อการหมัก ดังนั้นจึงต้องใช้น้ำล้างสารยับยั้งออกไป ซึ่งอาจมีเฮมิ-เซลลูโลสบางส่วนละลายหลุดออกไปด้วย ผลผลิตน้ำตาลโดยรวมจึงลดลง โดยทั่วไปแล้วร้อยละ 20-25 ของน้ำตาลจะหายไปกับน้ำล้างนี้ มีการเติมกรด เช่น กรดกำมะถันหรือกรดคาร์บอเนตเข้าไประหว่างการอัดระเบิดด้วยไอน้ำ ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้ดีและลดการเกิดสารพิษได้ ทำให้สามารถแยกเฮมิเซลลูโลสออกมาได้เกือบหมด โดยสามารถนำไซโลสกลับมาใช้ได้ถึงร้อยละ 70 ของค่าทางทฤษฎี

<u>กระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ</u> ราหลายชนิดสามารถย่อยลิกนินและเฮมิ-เซลลูโลสได้ โดยทั่วไปราสีน้ำตาลจะย่อยเซลลูโลส ส่วนราสีขาวจะย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ราขาวจะเป็นตัวเลือกที่ดีที่สุดโดยสามารถให้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ถึงร้อยละ 35 ในเวลา 5 สัปดาห์ เพื่อป้องกันไม่ให้ราใช้เซลลูโลส จึงมีการพัฒนาราสายพันธุ์ที่ไม่มีเซลลูเลสขึ้น แม้ว่าวิธีทางชีวภาพนี้จะสามารถทำได้ในสภาวะปกติและมีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ว่าการย่อยลิกนินทางชีวภาพต้องอาศัยเวลาที่ยาวนานมาก จึงไม่ค่อยเหมาะสมในการนำมาใช้จริง

วิธีที่กล่าวมาข้างต้น การใช้กรดอ่อนเป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนามากที่สุดและได้ไซโลสถึงร้อยละ 75-90 ซึ่งมากกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำมาก และยังก่อให้เกิดสารพิษในปริมาณที่ต่ำกว่า ทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยเซลลูโลสในขั้นต่อไปอีกด้วย ข้อเสียของวิธีนี้คือยิปซัมที่เกิดจากการสะเทินกรดด้วยปูนขาว ซึ่งจะเป็นปัญหาในการกำจัดรวมทั้งต้องใช้วัสดุที่ทนการกัดกร่อนในการสร้างอุปกรณ์ ดังนั้นวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำหรือด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าอาจจะเป็นตัวเลือกที่ดีกว่าก็ได้ ถ้าสามารถเพิ่มผลผลิตขึ้นได้ ส่วนวิธีการใช้น้ำร้อนความดันสูงนั้น แม้ว่าจะให้ผลที่ดีแต่ยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ จึงใหม่เกินกว่าที่จะสรุปได้

2.3.3.2 การย่อยเซลลูโลส

กระบวนการนี้เป็นการย่อยเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสโดยใช้กรด ด่างหรือเซลลูเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ถ้าวัตถุดิบผ่านการปรับสภาพแล้วจะได้น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับการไม่ปรับสภาพจะให้น้ำตาลเพียงร้อยละ 20

ก.) การย่อยด้วยกรด

ในกรณีนี้จะเป็นกระบวนการที่ทำต่อจากการย่อยด้วยกรดในกระบวนการปรับสภาพ ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถใช้ได้ทั้งกรดอ่อนและกรดแก่ กระบวนการที่ใช้กรดอ่อนเป็นกระบวนการที่เก่าแก่ที่สุดกว่าร้อยปี ในขั้นตอนการปรับสภาพจะใช้กรดกำมะถันเจือจาง (ร้อยละ 0.7) ทำที่อุณหภูมิต่ำ (190 °ซ) เพื่อป้องกันการเกิดสารไม่พึงประสงค์ หลังจากแยกน้ำตาลเพนโตสออกไปแล้ว ในขั้นสองจะเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 215 องศาเซลเซียส แต่ลดความเข้มข้นของกรดลงเพื่อผลิตน้ำตาลเฮกโซส ทั้งสองขั้นตอนใช้เวลาในแต่ละขั้นเพียง 3 นาที น้ำตาลที่ได้จากทั้งสองขั้นตอนจะนำไปเข้ากระบวนการหมัก ถ้าใช้กรดแก่จะได้ประสิทธิภาพที่สูงกว่าคือได้น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 90 และสามารถใช้กับวัตถุดิบที่หลากหลายกว่า ปัญหาสำหรับการใช้กรดแก่นอกจากราคาของอุปกรณ์ที่ใช้จะแพงกว่าแล้ว การนำกรดกลับมาใช้ใหม่ เพื่อลดปริมาณกรดที่ต้องใช้เป็นเรื่องที่สำคัญมาก

ข.) การย่อยด้วยเอนไซม์

การใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลสมีข้อได้เปรียบการใช้กรดตรงสภาวะการทำงานที่ไม่รุนแรง ทำให้มีต้นทุนการบำรุงรักษาที่ต่ำ มีประสิทธิภาพสูง สามารถใช้กับกระบวนการปรับสภาพเกือบทุกชนิดยกเว้นการปรับสภาพทางกายภาพเพียงอย่างเดียว การใช้เอนไซม์นี้จะมีศักยภาพสูงสุดในระยะยาวเนื่องจากมีต้นทุนที่ต่ำกว่า ประสิทธิภาพของวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับสัดส่วนวัตถุดิบต่อเอนไซม์ ถ้าสัดส่วนสูงไปจะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในขณะที่สัดส่วนที่ต่ำไปจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและประสิทธิภาพลดลงตามไปด้วย อัตราการเกิดปฏิกิริยาสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยในการดูดซับของเอนไซม์หลังเกิดปฏิกิริยา การใช้เอนไซม์หลายชนิดผสมกัน ไม่ว่าจะเป็นเซลลูเลสจากหลายๆ แหล่งหรือผสมเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น เพคติเนสลงไป ก็สามารถช่วยให้เปลี่ยนเศษไม้ที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำไปเป็นน้ำตาลได้เกือบทั้งหมด มีรายงานว่าจากการเติม *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I ลงในสารสกัดเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Thermonosporafusca* จะทำให้อัตราการย่อยเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการนี้มี 3 กลุ่มคือ ลิกเนส เฮมิเซลลูเลสและเซลลูเลส เอนไซม์กลุ่มลิกเนสเป็นเอนไซม์ของรา ผลิตออกมาย่อยลิกนินในสภาวะที่มีออกซิเจน ในกลุ่มนี้มีเอนไซม์ 2 ประเภท คือ แลคเคสและเปอร์ออกซิเดส เอนไซม์กลุ่มลิกเนสนี้มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะผ่านเนื้อไม้ที่ไม่มีการปรับสภาพเข้าไปย่อยลิกนินภายในได้ เฮมิเซลลูโลสเป็นสารโพลีเมอร์ของน้ำตาลที่ละลายได้ในอัลคาไลประกอบด้วยบางส่วนของผนังเซลล์ที่เป็นเซลลูโลส และเบต้า ดี-กลูแคน สารตระกูลเพคติน (polygalacturonans) และเฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่มีแกแลคโตสแมนโนส และไซโลส เฮมิเซลลูโลสจะมีจำนวนหน่วยของโมโนเมอร์ในช่วงประมาณ 100-200 หน่วย ซึ่งเล็กกว่าเซลลูโลสมาก (10,000-14,000 หน่วย) เอนไซม์กลุ่มของเฮมิเซลลูเลสจะประกอบด้วยหน่วยที่ยึดจับกับคาร์โบไฮเดรตกับหน่วยที่ช่วยคะตะไลส์ปฏิกิริยา โดยที่หน่วยหลังจะเป็นไกลโคไซด์ ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) ที่จะทำลายพันธะไกลโคไซด์ (glycoside) ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาล และคาร์โบไฮเดรต เอสเตอร์เรส (carbohydrate esterase) ที่จะย่อยพันธะเอสเตอร์ที่เป็นกลุ่มข้างเคียง (side group) ของโพลีเมอร์ เอนไซม์ของกลุ่มนี้คือ ไซลาเนสที่ย่อยพันธะเบต้า-1,4 ระหว่างน้ำตาลหลักหรือไซลานเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสให้กลายเป็นไซโลโอลิโกเมอร์ (xylooligomer) แล้วย่อยต่อจนได้ไซลานโมเลกุลเดี่ยว เซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า-1,4 โดยปริมาณเฉลี่ยของจำนวนกลูโคสต่อสายเซลลูโลสอยู่ประมาณ 10,000 หน่วย ในเซลลูโลสมีทั้งส่วนที่เป็นผลึกและส่วนที่มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน (amorphous) ประกอบเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงและทนทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยเฉพาะส่วนที่เป็นผลึก เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสเป็นกลุ่มผสมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในการย่อยพันธะไกลโคไซด์ โดยมีเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เซลโล-

ไบโอไฮเดรส (cellobiohydrase) เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) การทำงานของกลุ่มนี้เริ่มจากเอนโดกลูคาเนสหรือคาร์บอกซิลเมลทิลเซลลูโลส-เซลลูเลส (carboxymethy cellulose(CM)-cellulase) จะย่อยตำแหน่งต่างๆ ภายในส่วนที่มีรูปร่างไม่แน่นอนแบบสุ่มเพื่อเป็นการเปิดช่องทางให้เซลโลไบโอไฮเดรสเข้าไปทำงานต่อ เซลโลไบโอไฮเดรสหรือเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลัก (ประมาณร้อยละ 40-70 ของโปรตีนทั้งหมดในกลุ่ม) จะค่อยๆ ตัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือคู่ออกจากปลายสายเซลลูโลส เอนไซม์นี้จะสามารถย่อยโครงสร้างที่เป็นผลึกได้ ในขั้นตอนสุดท้ายกลูโคสโมเลกุลคู่หรือเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligosaccharides) จะถูกตัดออกเป็นกลูโคสด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ต้นทุนของเอนไซม์ที่ใช้อาจสูงถึงครึ่งหนึ่งของต้นทุนในกระบวนการย่อยทั้งหมด แม้ว่าในช่วงที่ผ่านมาราคาของเอนไซม์จะลดลงอย่างมาก การค้นหาเชื้อที่สามารถผลิตเซลลูเลสในปริมาณมากจึงเป็นหัวข้อหนึ่งที่ได้รับการค้นคว้ากันอย่างแพร่หลาย รวมทั้งการค้นหาเอนไซม์ที่สามารถทนทาน พีเอช อุณหภูมิ และสารยับยั้งชนิดต่างๆ เพื่อการใช้งานในสภาวะต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น การปรับปรุงสายพันธุ์ที่มีอยู่ด้วยวิธีการทางพันธุกรรมโดยก็เป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจ การนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุน เอนไซม์เซลลูเลสสามารถนำกลับออกมาจากส่วนใสด้านบน (supernatant) หรือตะกอนด้านล่างก็ได้ แต่จากส่วนใสด้านบนจะทำได้ง่ายกว่า มีงานวิจัยที่ทำการนำเอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเคส (celluclast) และโนโวไซม์ (Novozym) กลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 5 ครั้ง โดยมีเวลาการใช้งาน 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเอนไซม์ก็ลดลงทุกๆ รอบของการนำกลับมาใช้

2.3.3.3 การกำจัดสารยับยั้งและสารเจือปน

หลังจากกระบวนการปรับสภาพ จะมีสารที่ไม่พึงประสงค์เจือปนอยู่ เช่น เฟอร์ฟูรอล (furfural) และไฮดรอกซิล เมทิล เฟอร์ฟูรอล (HMF) จากการทำปฏิกิริยาของน้ำตาล หรือกรดที่เกิดจากปฏิกิริยาหรือคงค้างจากกระบวนการปรับสภาพ สารพิษเหล่านี้จะไปยับยั้งการหมักในขั้นต่อไป จึงจำต้องกำจัดออก ขั้นตอนการกำจัดจะเริ่มจากการแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกจากกากแล้วนำของเหลวไปผ่านการแลกเปลี่ยนไอออนและเติมปูนขาวเพื่อสะเทินกรด ในส่วนของการแลกเปลี่ยนไอออนแบบต่อเนื่องนั้นจะใช้แอมโมเนียไปแทนที่กรดและนำกรดกลับมาใช้ใหม่ สำหรับกระบวนการที่ใช้กรดเข้มข้นในการปรับสภาพ กรดที่ได้จะถูกเพิ่มความเข้มข้นแล้วหมุนเวียนกลับเข้าไปในกระบวนการ แต่สำหรับกระบวนการที่ใช้กรดเจือจาง การนำกลับไปใช้ใหม่อาจไม่คุ้มกับต้นทุน เมื่อเทียบกับการสะเทินด้วยปูนขาวซึ่งจะได้ยิปซัมออกมาในสัดส่วน 0.02 กิโลกรัมต่อทุกๆ กิโลกรัมของวัตถุดิบขาเข้า ยิปซัมนี้อาจนำไปใช้ในการปรับสภาพดินสำหรับทำการเกษตร แต่ก็อาจกลายเป็นขยะที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้

ปัจจุบันของเสียจากอุตสาหกรรมหลายชนิดมีส่วนประกอบของวัตถุดิบทางการเกษตรปนออกมาในปริมาณที่มาก เช่น กากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำตาลซึ่งมีคุณสมบัติสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้ กากตะกอนเยื่อกระดาษจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษซึ่งเป็นแหล่งของเส้นใยที่ได้จากพืช ซึ่งโครงสร้างที่เล็กที่สุดเมื่อผ่านการย่อยแล้วคือ น้ำตาล และจากปริมาณการผลิตในระดับอุตสาหกรรมที่มีปริมาณมาก กากตะกอนกระดาษที่เหลือทิ้งเหล่านี้จึงเป็นแหล่งวัตถุดิบอีกแหล่งหนึ่งที่ควรนำมาใช้ศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เพื่อเป็นการลดการใช้พืชอาหารเพื่อนำมาผลิตเป็นเอทานอลและลดปริมาณของเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรม

2.4 เยื่อกระดาษ

2.4.1 วัตถุดิบ

1. ไม้ เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญที่สุดในอุตสาหกรรมกระดาษ แบ่งเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะของเส้นใย (Fiber)

1.1 ไม้เนื้ออ่อน (Soft Wood) จะเป็นไม้ที่มีเส้นใยยาว (ประมาณ 3 - 4 มม.) ส่วนใหญ่เป็นไม้ประเภทสน (Cone - Bearing Tree)

1.2 ไม้เนื้อแข็ง (Hard Wood) จะเป็นไม้ที่มีเส้นใยสั้น (ประมาณ 1 - 1.5 มม.) ส่วนใหญ่เป็นไม้ผลัดใบในฤดูใบไม้ร่วง (Deciduous Tree) เช่น กระถินเทพา (Acacia) ยูคาลิปตัส (Eucalyptus)

2. ไม้ล้มลุก ที่สำคัญเช่น ปอ ป่าน ลินิน ฝ้ายและไผ่ เป็นต้น

3. ชานอ้อย เป็นวัตถุดิบสำคัญของอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษในประเทศไทย

4. ฟางข้าว

5. กระดาษใช้แล้ว

ในประเทศไทยไม่มีแหล่งวัตถุดิบประเภทไม้เนื้ออ่อน เนื่องจากภูมิประเทศไม่อำนวย แต่สำหรับไม้เนื้อแข็ง มีการปลูกสวนป่ายูคาลิปตัสกันมากในบริเวณภาคตะวันออกและทางตอนใต้ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษ เส้นใยของยูคาลิปตัสนั้นได้รับการยอมรับว่าเหมาะสมที่สุดในการนำมาผลิตเป็นกระดาษพิมพ์เขียน

2.4.2 องค์ประกอบหลักในเยื่อกระดาษ (บริษัท แอ๊ดวานซ์ อะโกร จำกัด (มหาชน), 2552 : ออนไลน์) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเส้นใย และส่วนที่ไม่ใช้เส้นใย

1. ส่วนที่เป็นเส้นใย

1.1 เยื่อใยสั้นเคมีฟอก (Leaf Bleached Kraft Pulp: LBKP) เส้นใยสั้นผลิตจากไม้เนื้อแข็งเมืองร้อน เช่น ผลิตเยื่อจากไม้ยูคาลิปตัส มีความยาวประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร คุณสมบัติเด่นของเยื่อใยสั้น คือ ช่วยให้เนื้อกระดาษแน่นสม่ำเสมอ เรียบ และมีความทึบแสงดี เนื่องจากเยื่อใยสั้นมีขนาดเล็ก สามารถแทรกตัวตามร่องช่องว่างของเยื่อใยยาวได้ แต่มีข้อเสียคือ ไม่สร้างความแข็งแรงให้กับกระดาษ ทำให้กระดาษขาดง่าย

1.2 เยื่อใยยาวเคมีฟอก (Needle Bleached Kraft Pulp: NBKP) เส้นใยยาวเป็นเยื่อที่ผลิตจากไม้อ่อนจำพวกสน โรงงานผลิตกระดาษในประเทศไทย ไม่มีการผลิตเนื้อเยื่อใยยาว จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เส้นใยยาวมีความยาวประมาณ 3-3.5 มิลลิเมตร ซึ่งจะทำให้มีความสามารถในการยึดเกี่ยวกันสูง ทำให้กระดาษมีความแข็งแรงดีขึ้น ทนต่อแรงดึง แรงฉีกขาด ทำให้การเดินเครื่องดีขึ้น แต่ถ้าใส่เป็นส่วนผสมในเนื้อกระดาษมาก จะเกิดกระจุกของเส้นใยที่จับตัวเป็นกลุ่มก้อน เมื่อมองทะลุแผ่นกระดาษผ่านแสง จะเห็นเหมือนก้อนเมฆเป็นหย่อมๆ ในเนื้อกระดาษเป็นจำนวนมากและทำให้ผิวกระดาษไม่เรียบ

2. ส่วนที่ไม่ใช่เส้นใย ส่วนมากเป็นสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษซึ่งมีหลายชนิด สารเคมีเหล่านี้เติมลงไปเพื่อปรับปรุงสมบัติกระดาษให้ได้ตามวัตถุประสงค์การใช้งาน

2.1 ตัวเติม (filler) สารเติมแต่งชนิดนี้จะเป็นผงแร่สีขาว ใส่ลงไปเพื่อปรับปรุงสมบัติด้านการพิมพ์ของกระดาษ นอกจากนี้ยังใส่ลงไปเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตกระดาษอีกด้วย เพราะตัวเติมส่วนมากจะมีราคาถูกเมื่อเทียบกับเส้นใย ผงแร่ที่ใช้เป็นตัวเติมจะต้องมีขนาดเล็กละเอียด ตัวเติมที่ดีควรมีขนาดประมาณ 1-10 ไมครอน ผงแร่ที่มีขนาดเล็กนี้ เมื่อเติมลงไปจะช่วยเพิ่มเนื้อที่ผิวภายในกระดาษโดยเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างผงแร่กับอากาศและผงแร่กับเส้นใย ทำให้เพิ่มค่าการกระเจิงแสง (light scattering) ของกระดาษ ทำให้กระดาษมีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น และเนื่องจากมีขนาดเล็กกว่าเส้นใยมาก เมื่อใส่ลงไปจะทำให้กระดาษมีผิวเรียบขึ้น ผงแร่ที่ใช้เป็นตัวเติมในกระดาษ ได้แก่ ดินขาว (kaolin clay) ไททาเนียมไดออกไซด์ (titanium dioxide, TiO_2) และแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate, $CaCO_3$) ผงแร่เมื่อใส่ลงไปจะช่วยปรับปรุงสมบัติต่างๆ ของกระดาษให้ดีขึ้นดังนี้ คือ ทำให้ผิวกระดาษเรียบขึ้น เพิ่มความขาวสว่างและความทึบแสงของกระดาษ ทำให้กระดาษมีการดูดซับหมึกได้ดีขึ้น และลดต้นทุนการผลิตกระดาษ

2.2 สารต้านการซึมน้ำ (sizing-agent) สารเติมแต่งชนิดนี้เป็นสารเคมีที่ใส่ลงไปเพื่อเพิ่มสมบัติด้านการต้านทานการซึมน้ำของกระดาษ ทำให้กระดาษต้านทานการเปียกน้ำได้ดีขึ้น เนื่องจากกระดาษทำจากเส้นใยเซลลูโลสซึ่งมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้สูง กระดาษที่ไม่ได้ใส่สารต้านการซึมน้ำจึงเปียกน้ำและดูดซับน้ำได้ง่าย เช่น กระดาษชำระและกระดาษซับ (blotting paper) การเติมสารต้านการซึมน้ำลงไปจะช่วยลดพื้นที่ผิวของการดึงดูดระหว่างเส้นใยและโมเลกุลของน้ำทำให้ลดอัตราการซึมน้ำเข้าสู่เนื้อกระดาษ เมื่อกระดาษโดนน้ำจะไม่เปียกหรือซับน้ำในทันทีทันใด

2.3 สารเพิ่มความเหนียว สารเติมแต่งชนิดนี้เป็นสารเคมีที่เติมลงไปเพื่อเพิ่มสมบัติด้านความเหนียวของกระดาษ โดยเฉพาะความต้านแรงดึง และความต้านแรงดันทะลุ นอกจากนี้ยังช่วยลดการหลุดลอกของเส้นใยที่ผิวกระดาษและเพิ่มพันธะแรงยึดเหนี่ยวระหว่างชั้นกระดาษแข็ง ซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญมาก เพราะถ้าแรงยึดเหนี่ยวระหว่างชั้นต่ำจะทำให้เกิดการแยกชั้นของกระดาษแข็งในระหว่างการพิมพ์ได้ สารเพิ่มความเหนียวที่ใช้ ได้แก่ แป้งธรรมชาติ (native starch) แป้งปรุงแต่ง (modified starch) ปรับให้เป็นประจุบวก และพอลิอะคริลเอไมด์ (polyacrylamide) แป้งเป็นสารเพิ่มความเหนียวที่รู้จักกันดีและมีใช้มานานแล้ว แต่ในปัจจุบันนิยมใช้แป้งประจุบวกและพอลิอะคริลเอไมด์มากกว่า เนื่องจากสารเหล่านี้มีประจุบวกจึงสามารถจับกันได้ดีกับเส้นใยซึ่งมีประจุลบทำให้เพิ่มพันธะระหว่างเส้นใยในกระดาษ ส่งผลให้กระดาษมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น

2.4 สารฟอกนวล (optical brightening agent : OBA) หรือสารเพิ่มความขาวสว่าง สารเติมแต่งชนิดนี้เป็นสารสีย้อมประเภทเรือนแสง (fluorescent dye) เมื่อเติมลงไปจะช่วยให้กระดาษมีความขาวสว่าง (brightness)

2.5 สารสีย้อม (dyes) สารเติมแต่งชนิดนี้เป็นสารเคมีที่ใส่ลงไปในการทำกระดาษ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาโทนสีของกระดาษให้คงที่และชดเชยกับสีของลิกนินซึ่งมีสีเหลือง โดยปกติถ้ากระดาษสัมผัสกับความร้อนหรือแสงอาทิตย์ ลิกนินที่หลงเหลืออยู่ในเนื้อกระดาษจะส่งสีของตัวเองออกมา ทำให้กระดาษมีสีเหลือง สารสีย้อมยังใช้แต่งสีกระดาษขาวให้ได้ระดับคล้ำสีที่ต้องการ หรือเพื่อให้ดูขาวขึ้น ซึ่งเรียกว่าสีแต่ง (tinting dye) โดยใช้สีแต่งในปริมาณน้อยๆ เติมในส่วนผสมของน้ำเยื่อ สีที่ใช้แต่งนี้อาจเป็นสีอะไรก็ได้ แต่ในกระดาษขาวจะใช้สีม่วงหรือสีน้ำเงิน

2.6 สารควบคุมจุลชีวะ (microbiological control agent หรือ biocide) เป็นสารที่ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จำพวกเชื้อราหรือแบคทีเรียในระบบ เพื่อป้องกันการเกิดเมือกจุลินทรีย์ (filler) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้กระดาษสกปรก และทำให้กระดาษขาดในระหว่างการผลิตได้ง่าย

2.4.3 องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเยื่อกระดาษ

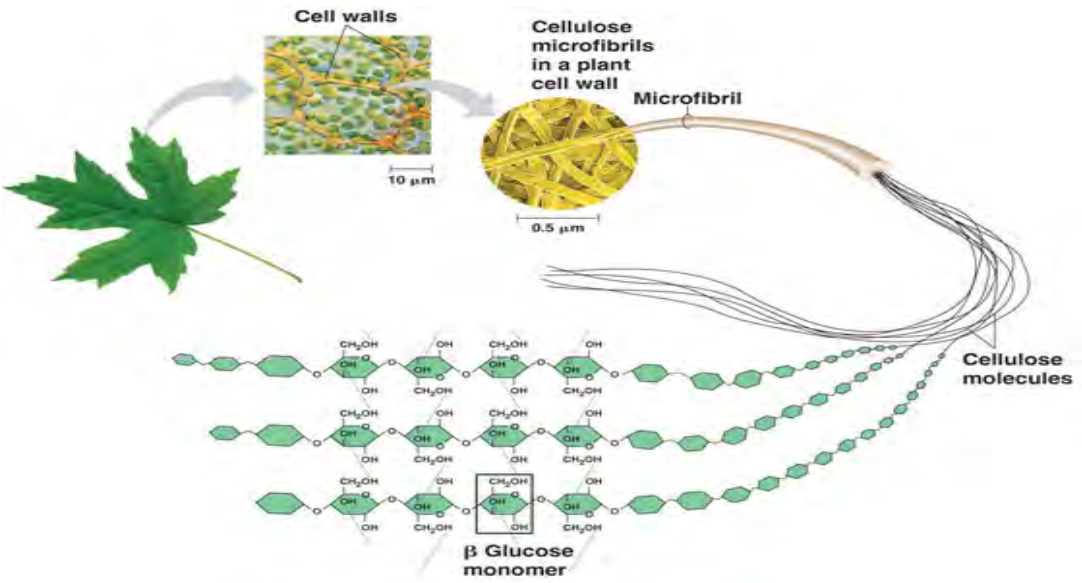
1.เซลลูโลส (Cellulose) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเส้นใยและให้ความแข็งแรง โครงสร้างเป็นลูกโซ่ของดี-กลูโคส ซึ่งเรียงตัวเกาะกันแบบ β-1,4 glycosidic bond ที่มีความยาวต่างกันไป จับกับลูกโซ่ข้างเคียงด้วยแขนแบบไฮโดรเจนทำให้เกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า ไฟบริล (fibrils) ซึ่งแต่ละไฟบริลจะเรียงต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนซึ่งทำให้เกิดการยึดติดกันขึ้นมา โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวกันในผนังเซลล์ของพืชดังแสดงในรูปที่ 2.1 ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่จะพบในรูปที่รวมตัวกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เพนโตเซน กัม แทนนิน ไขมันและสารเกิดสี (Greulch, 1973) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 และเนื่องจากสายของเซลลูโลสจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้เซลลูโลสมีความแข็งแรงไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ใดๆ และไม่ละลายในสารละลายด่างอ่อนหรือกรดอ่อน แต่ละลายได้ดีในสารละลายด่างแก่หรือกรดแก่ ดังนั้นจึงสามารถจำแนกชนิดเซลลูโลสได้เป็น 3 ชนิด ตามความสามารถในการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Paturau, 1989)

1) อัลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น
2) เบต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 17.5 ที่อุณหภูมิห้อง และสามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด
3) แกมมา-เซลลูโลส (γ-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 17.5 ที่อุณหภูมิห้อง และในสารละลายกรดแต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

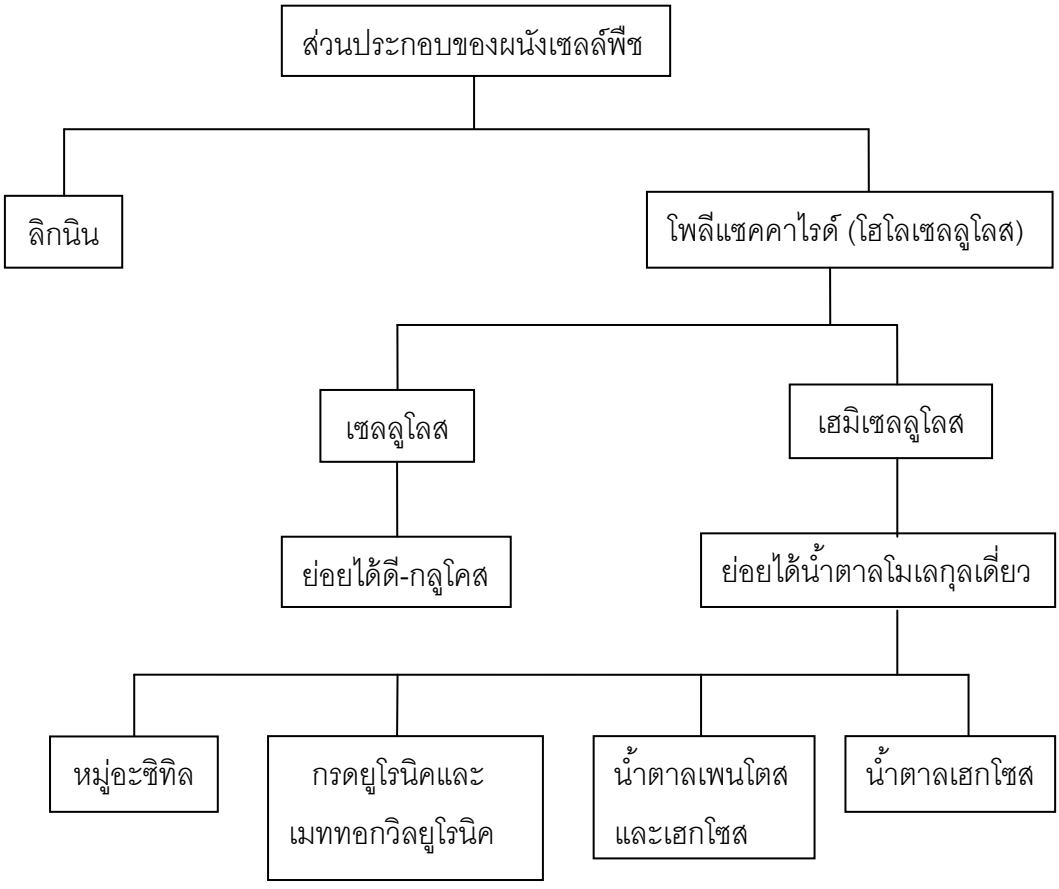
2. เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ทำหน้าที่เป็นสารยึดเซลลูโลสไว้ด้วยกันและให้ความแข็งแรงกับเส้นใย เป็นพอลิแซกคาไรด์ซึ่งคล้ายเซลลูโลสแต่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น กลูโคส กาแลคโตส ไซโลส อะราบิโนส รวมทั้งกรดกลูคูโรนิกและกาแลกทูโรนิก โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วย ไซแลนซ์ (xylans) แมนแนน (mannans) และกาแลกแตน (galactans) เฮมิเซลลูโลสต่างจากเซลลูโลสตรงที่โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสจะมีสายโพลิเมอร์ที่มีลักษณะกิ่งก้านสาขามากกว่าแต่ความยาวสายโพลิเมอร์สั้นกว่าเซลลูโลส สามารถถูกย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจางและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 17.5 โพลีแซคคาไรด์หลายชนิดที่อยู่ในสายโพลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเฮทเทอโรจีนัส (heterogenous) (Paturau, 1989 และ Kirt และคณะ,1983) สามารถจำแนกได้ดังนี้ คือ

1) เพนโตแซน (pentosan) โครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่ประกอบด้วยไซแลน ซึ่งเป็นสารส่วนใหญ่ที่พบในเฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้ยังประกอบด้วยอะราแบน (araban) ซึ่งเมื่อโครงสร้างถูกย่อยจะได้น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส (arabinose) ตามลำดับ
2) เฮกโซแซน (hexosan) โครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่ประกอบด้วยแมนแนน กลูแคนและกาแลคแทน ซึ่งเมื่อโครงสร้างถูกย่อยจะได้น้ำตาลแมนโนส (mannose) กลูโคส (glucose) และกาแลคโตส (galactose) ตามลำดับ
3) โพลียูโรไนด์ (poryuronides) โครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดโพลียูโรนิค นอกจากนี้ยังพบกรดยูโรนิคปนอยู่ แต่ตัวสำคัญคือ เฮกซูโรนิค ซึ่งได้แก่ เบต้า-ดีแมนมูโรนิค (β-D-mammuronic) และเบต้า-ดี กลูคูโรนิค (β-D-glucuronic)

3. ลิกนิน (Lignin) ทำหน้าที่เป็นสารยึดและให้ความแข็งแรงกับเนื้อเยื่อของไม้ ในกระบวนการสกัดเยื่อกระดาษจะต้องกำจัดลิกนินออกไปเนื่องจากเป็นสาเหตุทำให้กระดาษมีสีคล้ำและเยื่อมีความแข็งแรงต่ำ เป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลสูงประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน รวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิด ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายบางชนิด เช่น เอทานอล เมทานอล ที่อุณหภูมิสูงและในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีสมบัติของการยืดหยุ่น ดังนั้นพืชที่มีลิกนินอยู่มากจึงมีความแข็งแรงและสามารถต้านทานต่อสารเคมีและการกระทบกระแทกต่างๆ เนื่องจากลิกนินเป็นตัวป้องกันเซลลูโลสจากการถูกย่อย Zho และ Pan, 2010 ศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทไม้ พบว่ายูคาลิปตัสมีองค์ประกอบทางเคมีของลิกนินเท่ากับร้อยละ 26.9 และลิกนินเป็นตัวการหลักที่จะกีดขวางการผลิตน้ำตาลด้วยการย่อยของเอนไซม์ เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (lignase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่สำคัญ คือ เชื้อรา



รูปที่ 2.1 โครงสร้างผนังเซลล์ของพืช (http://thaigoodview.com., 2553 : ออนไลน์)



รูปที่ 2.2 แผนภาพองค์ประกอบทางเคมีในเซลล์พืช (Greulch, 1973)

2.4.4 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ (นัยนา นิยมวัน, 2552 : ออนไลน์)

การสกัดเยื่อจากไม้หรือวัตถุดิบประเภทอื่นๆ สามารถทำได้ 3 วิธี คือ

1. กระบวนการทางกล (mechanical pulping) โดยการบดเนื้อไม้ด้วยลูกกลิ้ง (Grinder or Grinding Stone) ขนาดใหญ่ จนเนื้อไม้ละเอียดแล้วนำมาแยกเยื่อออกจากเศษไม้หยาบ ต้นทุนดำเนินการของกระบวนการนี้จะต่ำ ผลที่ได้ (yield) สูงเนื่องจากลิกนินถูกสกัดออกไปน้อยมาก เยื่อที่ได้จึงมีความแข็งแรงต่ำ เหมาะกับการนำไปผลิตกระดาษคุณภาพต่ำ เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์

2. กระบวนการทางเคมี (chemical pulping) การสกัดเยื่อจะใช้สารเคมี เพื่อแยกเซลลูโลสออกมาให้มากที่สุด หรืออีกนัยหนึ่งเพื่อสกัดเอาลิกนินออกไปให้มากที่สุด บางกรณีจะสกัดเฮมิเซลลูโลสออกไปด้วย เยื่อที่ได้จะมีความแข็งแรงสูง ผลที่ได้ต่ำเนื่องจากลิกนินส่วนใหญ่ถูกจำกัดออกไปเหมาะกับการนำไปผลิตกระดาษคุณภาพชั้นดีแต่ต้นทุนดำเนินการสูง สารเคมีที่ใช้สกัดเยื่อจะต่างกันไปขึ้นกับกระบวนการ เช่น กระบวนการโซดา (soda process) จะใช้โซเดียมไฮ-ดรอกไซด์(sodium hydroxide) กระบวนการซัลเฟต (sulphate process) จะใช้โซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate) กระบวนการนี้บางครั้งเรียก กระบวนการคราฟท์ (Kraft process) เยื่อที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีความแข็งแรงที่สุดและกระดาษที่ผลิตจากเยื่อคราฟท์จะเรียก กระดาษคราฟท์ ส่วนกระบวนการซัลไฟต์ (sulphite process) จะใช้สารพวกไบซัลไฟต์ (bisulphite) และหรือกรดซัลฟิวรัส (sulphurous acid)

3. กระบวนการกึ่งเคมี (semi-chemical pulping) เป็นกระบวนการ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการใช้สารเคมีเพื่อทำให้สารที่ยึดเส้นใยอ่อนตัวลงทำให้สามารถสกัดเยื่อออกมาง่ายขึ้นและใช้พลังงานน้อยลง ขั้นตอนที่ 2 เป็นการบดเนื้อไม้หรือวัตถุดิบอื่นๆ ที่ผ่านการแช่สารเคมีมาแล้วเพื่อสกัดเยื่อออกมา เยื่อที่ได้จากวิธีนี้จะมีความแข็งแรงมากกว่าเยื่อที่สกัดโดยกระบวนการทางกลแต่แข็งแรงน้อยกว่าเยื่อที่สกัดด้วยกระบวนการทางเคมี ผลที่ได้ต่ำกว่ากระบวนการทางกลเนื่องจากลิกนินบางส่วนถูกกำจัดออกไป

2.4.5 กระบวนการผลิตกระดาษ (บริษัท แอ๊ดวานซ์ อะโกร จำกัด (มหาชน), 2552 : ออนไลน์)

หลังจากผสมน้ำเยื่อเรียบร้อยแล้ว น้ำเยื่อจะถูกส่งเข้าสู่เครื่องจักรผลิตกระดาษ เพื่อทำให้เป็นแผ่นกระดาษที่ยาวต่อเนื่องเรียกว่า กระดาษม้วน โดยทั่วไปเครื่องจักรผลิตกระดาษประกอบด้วยส่วนต่างๆ ได้แก่

1. ถังจ่ายเยื่อ (Headbox) เป็นอุปกรณ์ชิ้นแรกของเครื่องจักรผลิตกระดาษทำหน้าที่จ่ายน้ำเยื่อเข้าสู่ตะแกรงลวดเดินแผ่น ทำลายกลุ่มเส้นใย (flocculated fiber) ในน้ำเยื่อและปล่อยน้ำ-เยื่อลงบนตะแกรงลวดเดินแผ่นอย่างสม่ำเสมอตลอดความกว้างของเครื่องจักร ถังจ่ายเยื่อที่ใช้กันทั่วไปมีอยู่ 2 ชนิด คือ ชนิดเบาะอากาศ (Air cushion headbox) และชนิดไฮดรอลิก (Hydralic headbox)

2. ส่วนตะแกรงลวดเดินแผ่น (Wire section หรือ Forming section) ทำหน้าที่สำคัญ 2 ประการคือ การก่อตัวเป็นแผ่นกระดาษด้วยกระบวนการกรองและการแยกน้ำออก (dewatering) แผ่นเปียกที่ออกจากส่วนนี้จะมีน้ำอยู่ถึงร้อยละ 80 ส่วนตะแกรงลวดเดินแผ่นนี้เป็นอุปกรณ์ที่สำคัญมากต่อความสม่ำเสมอของเส้นใยในเนื้อกระดาษ ลำน้ำเยื่อจากถังจ่ายเยื่อจะตกกระทบตะแกรงลวดเดินแผ่นที่ฟอร์มมิ่งบอร์ด ความเร็วของลำน้ำเยื่อจะสูงหรือต่ำกว่าความเร็วของตะแกรงลวดเดินแผ่นเล็กน้อยเพื่อให้ได้ความแข็งแรงและความสม่ำเสมอของเส้นใยในเนื้อกระดาษ ความแตกต่างของความเร็วลำน้ำเยื่อและตะแกรงลวดเดินแผ่นร่วมกับตำแหน่งที่น้ำเยื่อตกบนฟอร์มมิ่งบอร์ด เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อคุณภาพของกระดาษอย่างมาก (บางครั้งเรียกอัตราส่วนของความเร็วน้ำเยื่อหารด้วยความเร็วของตะแกรงลวดเดินแผ่นว่า Efflux ratio) เมื่อน้ำเยื่อผ่านมาบนตะแกรง น้ำบางส่วนของน้ำเยื่อรวมทั้งเส้นใยและสารเติมแต่งที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดของช่องตะแกรงจะไหลผ่านตะแกรงออกไปโดยอาศัยแรงดึงดูดของโลกและแรงดูดจากอุปกรณ์เสริมอื่นๆ ที่ติดตั้งอยู่ใต้ตะแกรง น้ำที่หายไปมีผลทำให้เส้นใยเซลลูโลสอยู่ใกล้ชิดกันและเกี่ยวประสานกันได้มากขึ้น จนเกิดลักษณะเป็นแผ่นกระดาษ แผ่นกระดาษที่ได้มีผิวหน้าสองด้านที่มีสมบัติหลายประการแตกต่างกัน ทั้งนี้การเรียกด้านของกระดาษใช้การสัมผัสและไม่สัมผัสตะแกรงเป็นเกณฑ์ โดยด้านของแผ่นกระดาษที่สัมผัสตะแกรงเรียกว่า ด้านตะแกรง (wire side) ส่วนด้านของแผ่นกระดาษที่อยู่ตรงข้ามด้านตะแกรงเรียกว่า ด้านสักหลาด (felt side) ซึ่งเป็นด้านที่สัมผัสกับผืนสักหลาดที่ทำหน้าที่ในการส่งผ่านสายของแผ่นกระดาษ (paper wed) บนเครื่องผลิตกระดาษ ปริมาณน้ำที่อยู่ในแผ่นกระดาษหลังการแยกน้ำออกแล้วมีอยู่ประมาณร้อยละ 80-85 โดยน้ำหนัก

3. ส่วนกดรีดน้ำ (Pressing section) สายของแผ่นกระดาษที่เกิดขึ้นหลังจากการแยกน้ำแล้วจะเคลื่อนที่เข้าไประหว่างลูกกลิ้งกดรีดน้ำ (press rolls) ในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อขจัดน้ำออกจากแผ่นกระดาษให้ได้มากที่สุด ก่อนที่จะส่งต่อไปยังหน่วยทำแห้ง ปริมาณน้ำที่ยังมีอยู่ในแผ่นกระดาษเปียกหลังผ่านการกดรีดน้ำแล้วเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 60-70 โดยน้ำหนัก ในส่วนกดรีดน้ำนี้ จะมีการจัดเรียงของชุดกดรีดน้ำหลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับชนิดของกระดาษที่ผลิต สำหรับกระดาษพิมพ์เขียนซึ่งต้องการให้ผิวสองด้านของกระดาษเรียบเท่าๆ กัน ผิวทั้งสองด้านของกระดาษต้องถูกกดด้วยผิวลูกกลิ้งกดรีดน้ำที่เรียบโดยไม่มีผ้าสักหลาด แต่การกดรีดน้ำโดยไม่มีผ้า

สักหลาดรองรับ จะทำให้น้ำระบายออกจากกระดาษได้ยาก การระบายน้ำไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงมักมีผ้าสักหลาดหนึ่งหรือสองผืนเสมอๆ ในจำนวนของลูกกลิ้งกดรีดน้ำทั้งหมดจะมีอยู่หนึ่งลูกที่เป็นแบบสุญญากาศ หรือลูกกลิ้งกดรีดน้ำที่มีผิวเป็นรูหรือช่อง เพื่อให้น้ำระบายออกจากกระดาษได้มากขึ้นนอกจากการกดรีดน้ำออกแล้ว ลูกกลิ้งกดรีดน้ำยังมีหน้าที่ช่วยกดอัดให้เส้นใยเซลลูโลสมาอยู่ใกล้กันและเกิดพันธะเคมีต่อกันได้มากยิ่งขึ้น ทำให้แผ่นกระดาษมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น รวมทั้งช่วยเพิ่มความเรียบให้กับผิวกระดาษด้วย

4. ส่วนอบแห้งกระดาษ (Drying section) การทำแห้งกระดาษทำโดยอาศัยความร้อนจากไอน้ำอิ่มตัวความดันต่ำที่ถูกจ่ายเข้าไปข้างในลูกอบแห้ง ทำให้ผิวลูกอบแห้งร้อนขึ้น แล้วกลั่นตัวเป็นคอนเดนเสท (condensate) คอนเดนเสทจะฟอร์มตัวเป็นฟิล์มอยู่ที่ผิวด้านในของลูกอบแห้ง ฟิล์มนี้ต้องไม่หนาจนเกินไปเพราะจะทำให้การถ่ายเทความร้อนระหว่างไอน้ำและผิวลูกอบไม่ดี การระบายคอนเดนเสทออกจากลูกอบแห้งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการอบแห้งกระดาษ ซึ่งความร้อนนี้จะทำให้ปริมาณน้ำในแผ่นกระดาษมีอยู่ประมาณร้อยละ 2-8 โดยน้ำหนัก ในหน่วยทำแห้งนี้อาจมีการเคลือบสารละลายของสารเพิ่มความแข็งแรงผิวให้แก่กระดาษ การเคลือบสารเพิ่มความแข็งแรงผิวบนกระดาษเกิดขึ้นเมื่อสายของแผ่นกระดาษเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในหน่วยเคลือบสารเพิ่มความแข็งแรงผิว ซึ่งอยู่ก่อนส่วนทำแห้งส่วนสุดท้ายของหน่วยทำแห้ง เมื่อสารเพิ่มความแข็งแรงผิวได้รับการเคลือบบนกระดาษแล้ว สายของกระดาษก็จะเคลื่อนที่เข้าสู่ส่วนทำแห้งส่วนสุดท้ายเพื่อทำให้สารเพิ่มความแข็งแรงผิวบนกระดาษเกิดการแห้งตัวก่อนที่สายของแผ่นกระดาษจะเคลื่อนเข้าสู่ขั้นต่อไป

5. ส่วนฉาบผิวกระดาษ (Size-press section) เป็นการฉาบผิวกระดาษ (surface sizing) กระดาษที่ผ่านส่วนอบแห้งชุดแรกจะถูกฉาบด้วยน้ำแป้งที่ต้มสุก โดยน้ำแป้งจะฉาบอยู่ที่ผิวกระดาษทั้งสองข้างทำให้ผิวกระดาษแข็งแรงขึ้นและทำให้กระดาษมีความต้านทานน้ำเพิ่มขึ้นด้วยเพราะน้ำแป้งจะไปอุดรูที่ผิวกระดาษ ถัดจากเครื่องฉาบผิวจะเป็นส่วนให้ความร้อนแบบลมร้อน (air foil) และส่วนอบแห้งชุดหลังเพื่อให้กระดาษแห้ง อาจมีการเติมสารเติมบางอย่างลงในน้ำแป้งด้วย เช่น สารฟอกนวล เป็นต้น

6. ส่วนรีดผิวกระดาษ (Calendering section) เป็นอุปกรณ์ที่อยู่ถัดจากส่วนอบแห้งชุดหลัง ประกอบด้วยลูกรีดทรงกระบอกซึ่งทำจากโลหะวางซ้อนกัน ผิวของลูกรีดจะแข็งและเรียบมาก กระดาษจะถูกดึงผ่านไประหว่างลูกรีด ทำให้กระดาษบางลง เรียบขึ้น และมีความหน้าสม่ำเสมอขึ้น การรีดผิวกระดาษนี้เป็นขั้นตอนสุดท้ายก่อนที่สายของแผ่นกระดาษจะเข้าม้วน (Peeling) แล้วนำออกจากเครื่องผลิตกระดาษเพื่อนำไปตัดเป็นม้วนขนาดเล็กหรือเป็นแผ่นเพื่อจำหน่ายต่อไป กระดาษที่ผลิตเสร็จแล้วอาจมีการปรับปรุงคุณภาพของผิวกระดาษให้มีความเรียบเพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการพิมพ์และมีความแข็งแรงขึ้น เช่น การเคลือบกระดาษโดยการ

นำกระดาษที่ผลิตมาเคลือบผิวโดยเฉพาะ ผ่านเข้าเครื่องผิวกระดาษ (Coater) และการขัดมันโดยการนำกระดาษที่ผ่านการเคลือบผิวแล้วไปผ่านเครื่องขัดมัน (Supercalender) หลังจากนั้นจึงนำกระดาษมารอแบ่งและเปลี่ยนแกนเป็นแกนกระดาษต่อไป

นอกจากขั้นตอนต่างๆ ที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น ยังมีขั้นตอนอีก 2 ขั้นตอนที่กระดาษอาจต้องผ่านการปรับปรุงคุณภาพของผิวกระดาษก่อนออกจำหน่าย ได้แก่

1) การเคลือบผิวกระดาษ (Coating) การเคลือบผิวกระดาษเป็นขั้นตอนสำหรับเคลือบผิวกระดาษด้วยตัวเติม โดยมีสารยึดตัวเติมให้ติดบนผิวกระดาษได้ การเคลือบผิวเพื่อช่วยให้กระดาษมีผิวหน้าที่เรียบขึ้นทำให้สภาพพิมพ์ได้ของกระดาษดีขึ้น กระดาษที่ผ่านการเคลือบผิวมีชื่อเรียกว่ากระดาษเคลือบผิว (coated paper) ซึ่งการเคลือบผิวอาจเป็นแบบเคลือบด้านเดียวหรือเคลือบสองด้านของกระดาษ และอาจเคลือบด้านหรือเคลือบมันก็ได้ ทั้งนี้การเคลือบด้านหรือเคลือบมันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารเคลือบผิวที่ใช้ ความมันวาวของกระดาษที่นำมาเคลือบผิวและวิธีการที่ใช้ในการเคลือบผิวเป็นสำคัญ ทั้งนี้อุปกรณ์ในการเคลือบผิวกระดาษอาจเป็นส่วนหนึ่งของเครื่องผลิตกระดาษหรือแยกออกมาต่างหากก็ได้

2) การขัดผิวกระดาษ (Supercalendering) กระดาษที่ผ่านการรีดผิวหรือผ่านการเคลือบผิวมาแล้วเป็นกระดาษที่มีความเรียบและความมันวาวในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มความมันวาวของกระดาษให้มีมากยิ่งขึ้น กระดาษจะรับการขัดผิวโดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าซูเปอร์คาร์แลนเดอร์ (supercalender) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ต่อแยกออกจากเครื่องผลิตกระดาษ อุปกรณ์ดังกล่าวประกอบด้วยลูกกลิ้งขัดผิวจำนวนมาก มีลักษณะเป็นกระบอกเรียงซ้อนกันในแนวตั้ง โดยมีลูกกลิ้งที่ทำจากเหล็กกล้าขัดมันเรียงสลับกับลูกกลิ้งที่หุ้มด้วยกระดาษหรือฝ้าย เมื่อสายของแผ่นกระดาษผ่านเข้าไประหว่างลูกกลิ้งแรงกดอัดระหว่างลูกกลิ้งที่กระดาษได้รับมีผลให้เส้นใยเซลลูโลสอัดตัวกันได้มากขึ้น และทำให้กระดาษมีผิวที่เรียบมากขึ้น อันเป็นผลทำให้ความมันวาวของกระดาษเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งที่กระดาษได้รับการขัดผิว

2.5 กระบวนการหมัก

สิ่งมีชีวิตหลายชนิด ตั้งแต่แบคทีเรีย รา หรือยีสต์สามารถเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรตให้กลายไปเป็นเอทานอลได้ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีต่อน้ำตาลหนึ่งกิโลกรัมคือ 0.51 กิโลกรัม โดยในส่วนที่เหลือจะเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$3C_5H_{10}O_5 \longrightarrow 5C_2H_5OH+5CO_2 \text{ (for pentose)}$$

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH+2CO_2 \text{ (for hexose)}$$

แม้ว่าการหมักน้ำตาลเฮกโซสไปเป็นเอทานอลจะเป็นที่รู้จักกันตั้งแต่ประมาณ 6,000 ปีที่แล้ว แต่การหมักน้ำตาลเพนโตสนั้น เริ่มมีการค้นคว้ากันเมื่อมีการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และได้ผลในช่วงทศวรรษที่ 1980 อย่างไรก็ตามสิ่งมีชีวิตทุกชนิดก็ยังมีข้อจำกัด ไม่ว่าจะเป็นเรื่องที่ไม่สามารถหมักได้ทั้งเพนโตสและเฮกโซส หรือการผลิตชีวมวลหรือเซลล์ใหม่ขึ้น ทำให้ปริมาณเอทา-นอลลดลง นอกจากนั้นเซลล์ยังอาจตายได้ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนอีกด้วย ดังนั้นในสมัยก่อนจึงใช้ถังปฏิกรณ์ต่อแบบอนุกรมเพื่อหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ในปัจจุบันจึงมีการลดจำนวนถังปฏิกรณ์ลงโดยการรวมปฏิกิริยาให้เกิดร่วมกันในถังเดียวกัน เช่น การรวมปฏิกิริยาการย่อยเข้ากับการหมัก ทำให้ผลผลิตสูงขึ้นและลดการเกิดสารยับยั้งให้น้อยลงได้ การปรับแต่งพันธุกรรมอาจทำให้ยีสต์หรือแบคทีเรียสามารถหมักได้ทั้งกลูโคสและไซโลสได้พร้อมกัน แต่ก็ยังมีปัญหาในการหมักไซโลสและอะราบิโนส (สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2552 : ออนไลน์)

การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาล โดยทั่วไปมีขั้นตอนดังนี้

1) ขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (สำหรับวัตถุดิบประเภทแป้ง)

2) ขั้นตอนการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล

2.5.1 เทคโนโลยีที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยสารเคมีและการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์

2.5.1.1 การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยสารเคมี

เทคโนโลยีการใช้สารเคมีในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลจะแบ่งออกเป็นการย่อยสลายด้วยกรดและการย่อยสลายด้วยด่าง โดยการย่อยสลายด้วยกรดนั้นจะเป็นที่นิยมในการผลิตเอทานอลในโรงงานอุตสาหกรรมมากกว่า การใช้กรดอ่อนหรือกรดแก่ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันออกไปดังนี้

- การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยกรดอ่อน

ข้อดี คือ ในขั้นตอนของการปรับสภาพความเป็นกรดด่างของกระบวนการย่อยแป้งจะได้ผลผลิตพลอยได้เป็นยิปซั่มซึ่งเกิดจากการปรับสภาพสารละลายด้วยด่าง และเวลาที่ใช้ในการย่อยสั้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบต่อเนื่องจึงทำให้ได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการขั้นต่อไป

ข้อเสีย คือ สภาวะที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลนั้นจะต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูงจึงทำให้วัสดุที่ใช้ทำถังปฏิกรณ์เป็นวัสดุที่มีราคาแพง หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดลงจะต้องมีการปรับสภาพความเป็นกรดด่างของสารละลายด้วยด่างเพื่อให้สารละลายเป็นกลางแล้วจึงนำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป และผลจากการย่อยทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์มีค่าประมาณร้อยละ 50 ของวัตถุดิบ

- การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยกรดแก่

ข้อดี คือ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณมากกว่าร้อยละ 90 ของวัตถุดิบ ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำในการย่อยสลายจึงทำให้วัสดุที่ใช้ทำถังปฏิกรณ์ถูกกว่าวัสดุที่ใช้ทำถังปฏิกรณ์ของการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยกรดอ่อน และการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยกรดแก่นั้นสามารถนำกรดกลับมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายแป้งใหม่ได้

ข้อเสีย คือ ระยะเวลาในการย่อยนาน มีการสูญเสียกรดบางส่วนไปกับส่วนที่ยังไม่ย่อยสลายและการผุกร่อนของเครื่องมือจากการใช้กรดแก่ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยกรดแก่นั้นไม่สามารถควบคุมได้ตามที่ต้องการ และในส่วนของเทคโนโลยีที่จะนำกรดแก่กลับมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายนั้นมีราคาแพงและพัฒนาเทคโนโลยีส่วนนี้ได้ยาก หรือเมื่อนำเทคโนโลยีในการปรับสภาพความเป็นกรดด่างของเทคโนโลยีการย่อยด้วยกรดอ่อนมาใช้ จะต้องใช้ด่างในปริมาณมากในการปรับสภาพ

2.5.1.2 การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์

ข้อดี คือ ได้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณมาก สามารถควบคุมผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการได้ วัสดุที่นำมาใช้ทำถังปฏิกรณ์มีราคาไม่แพงและพลังงานที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับแป้งต่ำ

ข้อเสีย คือ เอนไซม์ไม่สามารถย่อยแป้งที่สภาวะอุณหภูมิห้องได้เนื่องจากองค์ประกอบที่ซับซ้อนของแป้งและพันธะที่ยึดติดกันอย่างมั่นคง จึงต้องทำให้น้ำแป้งร้อนขึ้นซึ่งจะทำให้เส้นใยของแป้งบวมขึ้นเป็นผลให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยพันธะภายในโมเลกุลของแป้งได้ ในปัจจุบันเอนไซม์ยังมีราคาสูงมากจึงทำให้การย่อยด้วยเอนไซม์มีต้นทุนการผลิตสูงตามไปด้วย ดังนั้นควรจะมีการส่งเสริมให้มีการศึกษาวิจัยกระบวนการผลิตเอนไซม์เพื่อทำให้ราคาของเอนไซม์มีราคาต่ำลง

2.5.2 เทคโนโลยีในการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล

สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลหรือสารละลายน้ำตาลที่ได้จากน้ำอ้อย หรือการเจือจางกากน้ำตาลจะถูกนำไปเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ แล้วฆ่าเชื้อด้วยความร้อน จากนั้นปรับสภาพพีเอชให้เหมาะสมต่อการหมักต่อไป

ในปัจจุบันเทคโนโลยีส่วนใหญ่ที่ใช้ในการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลมีอยู่ 2 แบบ คือ การหมักแบบแบตช์และการหมักแบบต่อเนื่อง การหมักแบบแบตช์เป็นการหมักโดยใส่หัวเชื้อและน้ำหมักลงในถังใบเดียวกันและเกิดการหมักขึ้นในถังหมักใบเดียวกันจนเสร็จสิ้นการหมักในเวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง ส่วนการหมักแบบต่อเนื่องเป็นการหมักโดยใส่หัวเชื้อและน้ำหมักลงในถังหมักใบแรก และปล่อยให้มีการไหลล้นไปสู่ถังใบที่ 2 3 4 หรือ 5 โดยอาจมีการเติมเชื้อและสารละลายน้ำตาลลงไปเพิ่มเติมในแต่ละถังจนกระทั่งได้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ต้องการในถังใบสุดท้าย น้ำหมักที่ได้จะผ่านเครื่องแยกเซลล์เพื่อนำเซลล์ยีสต์มาล้างด้วยกรดและบางส่วนนำกลับมาป้อนลงถังหมักใบแรกกับน้ำหมักที่เข้ามาใหม่ต่อไป

2.5.2.1 เทคโนโลยีการหมักแบบแบตช์

ข้อดี คือ ค่าติดตั้งอุปกรณ์ถูกกว่า ไม่ต้องการการฆ่าเชื้อในถังหมักอย่างสมบูรณ์ ไม่ต้องใช้คนที่มีความเชี่ยวชาญมากในการควบคุมเครื่องระหว่างทำงาน ความเสี่ยงในการลงทุนต่ำ ง่ายในการเก็บรักษาวัตถุดิบ สามารถใช้กับการหมักที่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันได้ เวลาที่ใช้ในการหมักไม่ถูกควบคุมและโอกาสที่การหมักจะติดเชื้อต่ำ

ข้อเสีย ของเทคโนโลยีการหมักแบบแบตช์ คือ ความถี่ในการฆ่าเชื้อถังจะมีผลเสียต่อการวัดค่าของเครื่องมือวัดต่างๆ ค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อสูง ความเสี่ยงสูงในการกลาย-พันธุ์ของเชื้อที่ใช้หมัก ถังหมักหนึ่งถังไม่เพียงพอต่อการผลิตผลิตภัณฑ์หลายๆ อย่าง และผลิตภัณฑ์จะถูกแยกออกเนื่องจากปฏิกิริยาที่ไม่ต่อเนื่อง

2.5.2.2 เทคโนโลยีการหมักแบบต่อเนื่อง

ข้อดี คือ ใช้พนักงานน้อย ควบคุมผลิตภัณฑ์ได้ โอกาสติดเชื้อในระหว่างการหมักต่ำ และป้องกันการเสียหายของอุปกรณ์เครื่องมือวัดในระหว่างการฆ่าเชื้อภายในถังน้อย

ข้อเสีย ของเทคโนโลยีการหมักแบบต่อเนื่อง คือ วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักต้องเป็นแบบเดียวกันตลอดการหมัก ปัญหาในการรักษาอัตราการหมักสูงๆ การใช้เครื่องควบคุมแทนคนงานมีค่าใช้จ่ายในการทำงานสูงกว่าอุปกรณ์ ในการแยกของแข็งในระหว่างการหมักมีราคาแพง นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคโนโลยีการย่อยแป้งและหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลพร้อมกันไปในขั้นตอนเดียว (simultaneous saccharification and fermentation; SSF) ซึ่งช่วยให้มีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลที่ย่อยได้ และได้ประสิทธิผลของเอทานอลที่ได้สูงขึ้น มีการลงทุนด้านอุปกรณ์ และการใช้พลังงานต่ำกว่าเทคโนโลยีที่แยกขั้นตอนการย่อยแป้งและการหมักน้ำตาล

ให้เป็นเอทานอล แต่อย่างไรก็ดี เทคโนโลยีแบบนี้ต้องมีการควบคุมการผลิต และการฆ่าเชื้อเป็นอย่างดีเพื่อไม่ให้มีปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหากับระบบโดยรวม

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก

ปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของยีสต์และการหมักแอลกอฮอล์ได้แก่ ธาตุอาหาร เกลือแร่ วิตามิน อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาล และสารบางอย่างที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529)

2.5.3.1 ผลของธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่อการหมัก

เมื่อพิจารณาถึงผลของธาตุอาหารแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์สามารถแยกได้ดังนี้

- ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ในยีสต์บางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่เฉพาะเท่านั้น เพราะกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นตัวควบคุมการทำงานของวิถีไกลโคไลซีส (glycolysis pathway) อย่างไรก็ตามเซลล์ยีสต์เองก็ประกอบด้วยพิวรีน (purine) ไพริมิดีน (pyrimidines) และกรดอะมิโน (amino acid) ดังนั้นจึงอาจใช้ตัวยีสต์เองเป็นแหล่งแอมโมเนียไนโตรเจน เช่น ในการนำน้ำกากส่ากลับมาใช้ละลายกากน้ำตาล (ประมาณร้อยละ 10-30) เรียกกระบวนการนี้ว่า Sloppingback ซึ่งนอกจากจะได้ธาตุอาหารแล้ว ยังช่วยเพิ่มความสามารถของการเป็นบัฟเฟอร์ และลดปริมาณน้ำที่ต้องใช้ รวมทั้งเป็นการกำจัดน้ำกากส่าทิ้งไปในตัวด้วยหรือโดยการนำเอาเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยสลาย (lysed yeast cell) กลับมาใช้ใหม่ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ นิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นส่วนใหญ่

- ฟอสฟอรัส โดยมากใช้ในรูปเกลือฟอสเฟตในสัดส่วนประมาณ 0.6 มิลลิโมล/กรัม/เซลล์ ฟอสเฟตมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โดยทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ไขมันและคาร์โบไฮเดรตและรักษาสภาพของผนังเซลล์ ดังนั้นฟอสเฟตจึงสำคัญต่อการหมัก

- ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของเมไธโอนีน (methionine) แต่เนื่องจากเมไธโอนีนมีราคาแพงมาก ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน

- แร่ธาตุต่างๆ (Trace elements) แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตในการหมักยีสต์แบ่งเป็น 3 พวก ได้แก่ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารองและสารยับยั้ง

- ธาตุอาหารหลัก (macroelements) ได้แก่ K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn และ Cl ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่ยีสต์ต้องการในปริมาณ 0.1-1 มิลลิโมล และแร่ธาตุพวกนี้เข้าไปในเซลล์ยีสต์โดยอาศัยการแพร่

- ธาตุอาหารรอง (microelements) ได้แก่ Co, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni และ Va ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่ยีสต์ต้องการในระดับ 0.1-100 มิลลิโมล

- สารยับยั้ง (inhibitors) ได้แก่ Ag, As, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se และ Te ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10-100 มิลลิโมล จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักโดยยีสต์ ในบางครั้งถ้ามีธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองในปริมาณมากเกินไปจะมีผลไปยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ได้เช่นกัน

- วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ โดยจะควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะวิตามินเป็นโคเอนไซม์หรือสารเริ่มต้น (precursors) ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ยีสต์ต้องการส่วนใหญ่เป็นไบโอตินและแพนธีโอนิคแอซิด นอกจากนี้ความต้องการวิตามินชนิดอื่นๆ เช่น ไธโอนิน ไพริด๊อกซิน ไนอาซิน โฟลิคแอซิด และพี-อะมิโน เบนโซอิค แอซิด ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ บางสายพันธุ์ถ้ามีไธอามินแต่ขาดไพริด๊อกซินจะทำให้การเจริญลดลง ในขณะที่บางสายพันธุ์จะเจริญได้ดีในสภาพซึ่งไม่มีไธอามินและไพริด๊อกซินเท่านั้น

2.5.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการหมัก

อุณหภูมินับว่ามีความสำคัญมากต่อการหมักแอลกอฮอล์ สำหรับยีสต์ที่ใช้กันอยู่ตามโรงงานทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส และจะทนได้ไปถึง 37 องศาเซลเซียส ถ้าสูงขึ้นไปถึง 40 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่แล้วจะชะงักการเจริญแม้ว่าการหมักจะดำเนินไปได้ถ้ามีปริมาณยีสต์มากพอ ดังนั้นหลังการหมักไปแล้ว 1-10 ชั่วโมง ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส หลังจาก 10 ชั่วโมง ไปแล้วควบคุมไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิในช่วง 10 ชั่วโมง สูงกว่า 37 องศาเซลเซียสแล้วอาจเกิดปัญหาแบคทีเรียเจริญขึ้นมามากเกินไป เป็นผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ การควบคุมอุณหภูมิจึงจำเป็นและเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตที่ได้ สำหรับการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูงร้อยละ 15-20 การหมักที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดแอลกอฮอล์หนัก (fusel oil) มากขึ้น การลดอุณหภูมิของถังหมักจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น แต่ก็อาจจะคุ้มทุนได้ถ้าสามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ในระดับร้อยละ 9-10 ภายใน 24-36 ชั่วโมง สาเหตุที่อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากกิจกรรมของยีสต์ คือในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลซูโครสจะเกิดความร้อน 149.5 แคลอรี่ต่อกรัมซูโครส หรือในกรณีน้ำตาล

กลูโคสจะเกิดพลังงานความร้อนจากการหมัก 140.2 แคลอรี่ต่อกรัมกลูโคส ความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นพลังงานคายความร้อน (exothermic energy) จึงทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น ปกติอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์จะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ผลิตออกมาแล้วจะมีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเอทานอลเป็นสำคัญ รวมถึงสายพันธุ์ของยีสต์ด้วย ดังนี้คือ

- กรณีที่มีเอทานอลร้อยละ 4.6 จะทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักของยีสต์ *S. cerevisiae* ลดลงจาก 38 องศาเซลเซียส ไปเป็น 32 องศาเซลเซียส

- กรณีที่มีเอทานอลร้อยละ 3.8 การหมักจะหยุดอยู่ที่ 36 องศาเซลเซียส ถ้ามีเอทานอลสูงขึ้นเป็นร้อยละ 7.5 8.3 และ 9.5 ทำให้ยีสต์หยุดหมักที่อุณหภูมิ 27 18 และ 9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

- ในกระบวนการหมักแบบแบตช์ที่ได้เอทานอลร้อยละ 9.5 จะทำให้ยีสต์มีอัตราในการรอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิสูงกว่า 20-25 องศาเซลเซียส

- ในกรณีที่ใช้ยีสต์ที่ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอล (highly ethanol tolerant) ที่ความเข้มข้นของเอทานอลระหว่างร้อยละ 10 และร้อยละ 19 อัตราการผลิตเอทานอลจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง จะเห็นได้ว่าในระหว่างการหมัก การควบคุมอุณหภูมิและปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักมีความสำคัญมาก

2.5.3.3 ผลของพีเอชต่อการหมัก

ยีสต์และราเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรดพอสมควร คือในระดับ 3.8-5.5 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้าพีเอชต่ำถึง 3 หรือต่ำกว่านั้นก็จะไม่เจริญ ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้มีพีเอชในช่วง 4-4.5 ทั้งนี้นอกจากยีสต์จะเจริญได้ดีที่ระดับพีเอชดังกล่าวแล้วยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ด้วย เพราะแบคทีเรียทั่วไปเจริญได้ดีในสภาพที่พีเอชเป็นกลาง แต่ก็มีแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติคที่เจริญได้ดีในระดับพีเอชที่ยีสต์เจริญและมักจะสร้างปัญหาเมื่อแบคทีเรียพวกนี้สร้างกรดขึ้นมามากเกินไปจนยีสต์ทนไม่ได้ ปกติจะใช้กรดซัลฟูริคแบบราคาถูกมาใช้ในการปรับพีเอช การปรับพีเอชจะช่วยลดเวลาการต้มให้ความร้อนแก่ถังหมักเพื่อการฆ่าเชื้อ เพราะความร้อนที่อุณหภูมิเท่ากันจะฆ่าแบคทีเรียในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดได้มากกว่าในสภาพที่เป็นกลางโดยปกติจะใช้อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที ก็เพียงพอสำหรับต้มฆ่าเชื้อในถังเตรียมกล้าเชื้อเมื่อปรับพีเอชลงมาแล้วให้เป็น 4-4.5 การติดตามวัดค่าพีเอชในช่วงการหมักนับว่าจำเป็น บ่อยครั้งปัญหาที่เกิดขึ้นเราสามารถคาดคะเนได้ว่าการหมักผิดปกติ โดยการสังเกตอุณหภูมิของถังหมักที่ขึ้นอย่างรวดเร็วควบคู่กับการที่พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วอย่างผิดปกติโดยที่แอลกอฮอล์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนั้นขึ้น

บางโรงงานก็แก้ปัญหาโดยการสูบถ่ายไปในถังหมักอื่นที่หมักได้ดีมีแอลกอฮอล์สูงเกินกว่าร้อยละ 5 แล้วและเติมกล้าเชื้อยีสต์เพิ่มควบคู่กันไปก็พอช่วยแก้ปัญหาได้

2.5.3.4 ความเข้มข้นของน้ำตาล

กรณีที่สารละลายมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินขีดจำกัดอันหนึ่งคือประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย จะเกิดการรบกวนการเจริญเติบโตของยีสต์ทำให้เติบโตได้ยาก การหมักจะเกิดขึ้นช้าและไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดกรดแลคติก กรดน้ำส้มและสารอินทรีย์ต่างๆ ขึ้น ซึ่งส่วนมากจะเกิดในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยปกติแล้วการหมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไม่เกินร้อยละ18 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย เพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปโดยปกติและได้เอทานอลในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่น คือประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ถ้าน้ำตาลเป็นแบบโมเลกุลเล็กๆ เช่น กลูโคส ฟรุกโตสแล้ว การหมักจะเกิดได้เร็วกว่าพวกที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ เช่น ซูโครส มอลโตส ทั้งนี้เพราะว่ายีสต์สามารถนำน้ำตาลโมเลกุลเล็กไปใช้ได้ทันที

2.5.3.5 ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์

ในกรณีที่ความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นถึงขีดจำกัดคือ ประมาณร้อยละ 15 โดยปริมาตร (ขีดจำกัดนี้อาจสูงหรือต่ำกว่านี้ขึ้นกับชนิดของยีสต์ แต่เท่าที่พบจะสูงไม่เกินร้อยละ 18 โดยปริมาตร) ปริมาณของเอทานอลที่สูงนี้จะขัดขวางหรือหยุดยั้งการทำงานของยีสต์ (end product inhibition) การหมักจะหยุดชะงัก แม้จะยังคงมีน้ำตาลเหลืออยู่ในน้ำส่าในปริมาณเท่าใดก็ตาม ซึ่งถือว่าเป็นข้อจำกัดสำหรับอุตสาหกรรมการหมัก เช่น ไวน์ เบียร์ เหล้า สาเก เป็นต้น ดังนั้นเครื่องดื่มที่ต้องการปริมาณแอลกอฮอล์สูงจึงต้องนำไปผ่านกระบวนการกลั่นภายหลังจากผ่านกระบวนการหมัก

2.5.3.6 คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน

คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของยีสต์จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบ ความดันในถังหมักจะสูงขึ้น ซึ่งถ้าสูงขึ้นจนถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลง จนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

2.5.3.7 ออกซิเจน

ออกซิเจนจะถูกใช้ในการเจริญเติบโตและการแตกหน่อ (budding) ในกระบวนการหายใจเพื่อทำให้เกิดพลังงานในการดำรงชีพ ซึ่งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของยีสต์ในที่มีออกซิเจนจะไม่ให้เอทานอลออกมาแต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้น

2.5.3.8 กรดน้ำส้มหรือกรดแอซิติก

กรดน้ำส้มมีผลทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์ชะงัก ความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญคือ ร้อยละ 0.1-0.5 ถ้ามีโพรไพโอนิค แอซิด (propionic acid) และบิวทิวริค แอซิด (butyric acid) เกิดขึ้นด้วยก็มีผลเช่นเดียวกันกับกรดน้ำส้ม กรดน้ำส้มเกิดจากแบคทีเรียซึ่งเป็นพวกต้องการออกซิเจน (aerobacter) ซึ่งในบางครั้งกรดน้ำส้มจะทำให้เซลล์ของยีสต์แตกได้

2.5.3.9 สารส่งเสริมการเจริญเติบโต

นอกจากน้ำตาลแล้ว ยีสต์ยังต้องการสารประกอบอื่นเพื่อการเจริญเติบโตและการแตกหน่อเพิ่มจำนวน สารเหล่านี้ ได้แก่ สารประกอบวิตามินบี เช่น ไบโอติน ไทเอมีน ไรโบฟลาวิน และนิโคตินิค แอซิด หน้าที่ของไทเอมีน ฟอสเฟต คือ เป็นองค์ประกอบร่วมในการเปลี่ยนไพรูวิค แอซิด ให้กลายเป็นเอทานอล

2.6 **จุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์**

ในการใช้จุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์จะต้องมีจุลินทรีย์ซึ่งสามารถให้เอนไซม์ตามต้องการได้ก่อน โดยจุลินทรีย์ที่ใช้มักจะมีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ จนจัดเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน (standard strain) โดยทั่วไปมักเป็นพวกที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง (mesophile) เพราะจะได้เอนไซม์ที่สามารถทำงานที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส (เอนไซม์เหล่านี้มักไม่ทนความร้อนสูงเกินกว่า 50 $^{\circ}$ซ) แต่บางครั้งพบว่าเอนไซม์ที่จะนำไปใช้ประโยชน์โดยเฉพาะทางด้านโรงงานจำเป็นต้องทนความร้อน และทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ จุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งเอนไซม์ดังกล่าวจึงควรเป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophile) เช่น แอลฟา-อะไมเลส จากเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* เจริญที่ 55 องศาเซลเซียส ทนความร้อนถึง 80 องศาเซลเซียส การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบกว่าสิ่งมีชีวิตชั้นสูงในด้านสามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาที่ขึ้นกับอุณหภูมิต่างๆ นอกจากนี้ยังเจริญเร็ว วิธีการเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยากและง่ายต่อการควบคุม การผลิตเอนไซม์จึงมีแนวโน้มที่จะอาศัยจุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นความก้าวหน้าอย่างหนึ่งทางเทคโนโลยีด้านชีวภาพที่พยายามใช้สิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์มากที่สุดเพื่อแก้ปัญหาต่างๆ ทั้งด้านการผลิต การกำจัดของเสีย รวมทั้งการนำของเสียเหล่านั้นกลับมาใช้ประโยชน์อีก ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้ มีหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชนิดจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Kazuhisa, 1997)

เชื้อรา	*Aspergillus acculeatus*	*Phanerochaete*
	Acremonium cellulolyticus	*Schizophyllum commune*
	Aspergillus fumigatus	*Sclerotium rolfsii*
	Aspergillus niger	*Sporotrichum cellulophilum*
	Chrysosporium	*Talaromyces emersonii*
	Fusarium solani	*Thielavia terrestris*
	Irpex lacteus	*Trichoderma koningii*
	Penicillium funmiculosum	*Trichoderma reesei*
	Trichoderma viride	
แบคทีเรีย	*Clostridium thermocellum*	*Streptomyces* sp.
	Ruminococcus albus	
แอคติโนมัยซีสท์	*Thermoactinomyces* sp.	*Thermomonospora curvata*

2.6.1 การเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์

เมื่อมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ตามต้องการ แต่ผลผลิตยังไม่เป็นที่พอใจ ปริมาณที่ได้ยังไม่สูงพอ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องปรับปรุงกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ซึ่งทำได้ดังนี้

1) ปรับปรุงสายพันธุ์โดยการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงยีนด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์วิศวกรรม

2) ปรับปรุงสภาพแวดล้อม ในการปรับปรุงสายพันธุ์บางครั้งเสียเวลา และค่าใช้จ่ายมากในการคัดเลือกหาสายพันธุ์ใหม่ที่ต้องการ การปรับปรุงสภาพแวดล้อม (environmental manipulation) จึงเป็นอีกวิธีที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ได้ ซึ่งอาจทำได้โดยเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง (pH) การเติมอากาศ (aeration) อุณหภูมิ (temperature) อาหารเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีที่ใช้มากคือ การเปลี่ยนสูตรอาหาร (medium composition) ในปฏิกิริยาบางอย่างที่ไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์บริสุทธิ์มากๆ มักเตรียมเอนไซม์โดยมีขั้นตอนน้อยที่สุดในการทำให้บริสุทธิ์ทั้งนี้เพื่อลดค่าใช้จ่ายและป้องกันการสูญเสีย

2.6.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่

1. ระดับไนโตรเจน

การเติมสารอนินทรีย์พวกไนโตรเจนสามารถทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยอัตราการย่อยสลายมักจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เติมลงไป Myskow และ Morrison,1963 (อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ, 2547) พบว่า อัตราการย่อยสลายของเซลลูโลสเมื่อ C:N เท่ากับ 7:1 มีอัตราสูงกว่าเมื่อ C:N เท่ากับ 34:1 และพบว่าดินที่มีการเติมไนเตรทจะมีการย่อยสลายเซลลูโลสได้รวดเร็วกว่าดินที่ไม่ได้เติมส่งผลทำให้เกิดฮิวมัสในช่วงระยะเวลาที่สั้น

2. อุณหภูมิ

จุลินทรีย์โดยทั่วไปสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ระหว่างอุณหภูมิ 5-65 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้นๆ ด้วย การศึกษาเกี่ยวกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ของ Yu และคณะ, 1987 (อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ, 2547) พบว่าช่วงอุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้และจะหยุดการเจริญหากมีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

3. การเติมอากาศ

จุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการอากาศจะเจริญได้ดีถ้ามีออกซิเจนเพียงพอ พลังงานที่ได้จากการมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนแตกต่างกันมาก Zeltin, 1970 (อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ, 2547) พบว่าความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus tereus* จะเพิ่มเป็น 2-15 เท่า หากให้อากาศกับเชื้อราโดยการเลี้ยงด้วยขวดรูปชมพู่และเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที Reese และ Ryu,1980 ศึกษาหาการให้อากาศด้วยการใช้เครื่องเขย่าพบว่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที มีความเหมาะสมที่สุดในการศึกษาหาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้

4. ความชื้น

ความชื้นของสับสเตรทเป็นตัวจำกัดชนิดของจุลินทรีย์ ถ้าสับสเตรทมีความชื้นสูง(ร้อยละ 80-95) พวกแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศจะเจริญได้ดี ที่ความชื้นปานกลาง (ร้อยละ 60-75) พวกเชื้อราและแบคทีเรียชนิดที่ต้องการอากาศและย่อยสลายเซลลูโลสได้จะเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่ถ้าหากความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 8 จะส่งผลต่อกิจกรรมและการเจริญของจุลินทรีย์แทบทุกชนิด

5.ค่าพีเอช

จุลินทรีย์ส่วนมากเจริญและเพิ่มกิจกรรมได้ดีในสภาพที่เป็นกลาง ในสภาวะกรด เชื้อราจะเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย Abou-Zeid และ Abulnoja, 1993 อาศัยสมบัติของการเป็นเชื้อทนกรดของเชื้อรา เพื่อการคัดเลือกเชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ และจากการทดลองของ Han และ Srinivasan, 1968 (อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์-วัฒนกิจ, 2547) พบว่าความสามารถในการย่อยเซลลูโลสของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นมากที่สุดที่พีเอช 5.8 แต่ค่าที่ทำให้เซลล์เพิ่มมากที่สุด คือ ที่พีเอช 6.0-7.2

6.โพลีแซคคาไรด์

จุลินทรีย์จะสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้เร็วขึ้น หากในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสับสเตรทนั้นมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เนื่องมาจากในช่วงแรกจุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งย่อยสลายได้เร็วกว่าเซลลูโลสในการเจริญและเพิ่มจำนวน ส่งผลให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้นในภายหลัง

7.ลิกนิน

เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่พบในต้นพืชและมีอิทธิพลอย่างมากต่อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ในเนื้อไม้ที่มีลิกนินอยู่มากจะทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสเป็นไปได้ช้า Fuller และ Norman, 1943 (อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ, 2547) ทดลองใช้เชื้อ *Paeudomonase ephemerocyanea* ในการย่อยสลายเซลลูโลสจากต้นปอต่างชนิดกันซึ่งมีปริมาณลิกนินต่างกัน พบว่า ปริมาณลิกนินที่สูงจะทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสเป็นไปอย่างช้าๆ แต่ถ้าสกัดเอาลิกนินออกก่อนจะทำให้การย่อยสลายเร็วขึ้น

2.7 **จุลินทรีย์เพื่อการหมักเอทานอล**

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด แต่ยีสต์ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบว่าแบคทีเรีย (bacteria) สายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่า เมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน ให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกับทฤษฎี แต่ข้อด้อยกว่ายีสต์ คือแบคทีเรียใช้น้ำตาลได้จำกัดคือใช้ได้ 3 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แต่ยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายกว่าแบคทีเรีย แต่เพื่อให้แบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นจึงมีการแก้ไขทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นคือ สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายและทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น

แม้ว่าจะได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดีขึ้นแต่การนำแบคทีเรียมาใช้ค่อนข้างที่จะยากเพราะโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่คุ้นเคยกับการใช้ประโยชน์จากยีสต์มากกว่า ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ประโยชน์ที่สำคัญที่สุดของยีสต์ที่ทราบกันดีคือ การผลิตเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

ตารางที่ 2.2 ผลผลิตจากยีสต์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

ผลผลิต	จุลินทรีย์	ประโยชน์
ยีสต์ผงฟู เบียร์ ไวน์ ขนมปัง	*Saccharomyces cerevisiae*	อุตสาหกรรมขนมปัง เบียร์
ซีอิ๊ว	*Saccharomyces rouxii*	ไวน์
ขนมปัง	*Candida milleri*	เครื่องปรุงอาหาร
เอทิลแอลกอฮอล์	*Saccharomyces cerevisiae*	ขนมปัง
	Kluyveromyces fragilis	เชื้อเพลิง ตัวทำละลาย
โรโบเฟลวิน	*Eremothecium ashbyi*	
โปรตีนจากจุลินทรีย์	*Candida utilis*	วิตามินเสริม
		อาหารเสริมของสัตว์จากน้ำ
	Saccharomyces lipolytica	เสียของโรงงานกระดาษ
		โปรตีนที่ได้จากผลผลิตของ
		ปิโตรเลียม

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ควรคำนึงถึงในการเลือกนำมาใช้ในการหมักเอทานอลมีดังนี้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2536)

-มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลายชนิด

-ให้ผลผลิตเอทานอลที่สูง

-ทนทานต่อสภาวะต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต เช่น ความเข้มข้นของเอทานอล

-ทนต่อความดันออสโมติก

-สามารถทำการหมักในสภาวะที่อุณหภูมิสูง

-ทนต่อสภาวะที่มีพีเอชต่ำหรือทนกรด

-ลดปัญหาการปนเปื้อนและพันธุกรรมที่เสถียร ไม่กลายพันธุ์ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ง่ายและสามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์

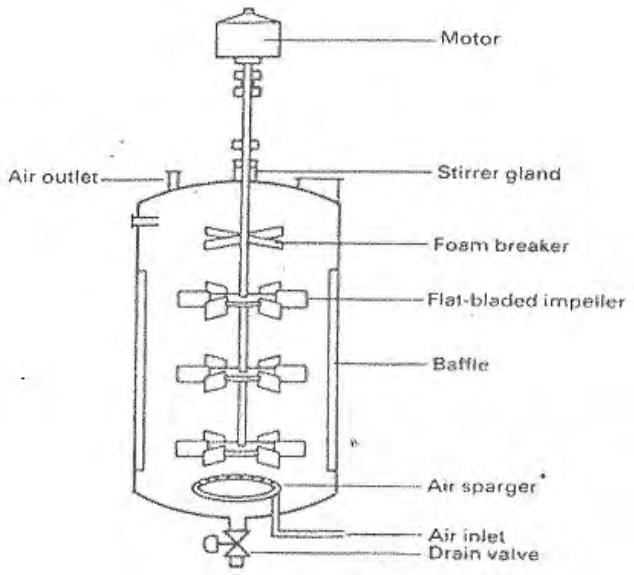
-มีความสามารถในการจับตัวเป็นก้อนตกลงก้นภาชนะ

2.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมัก (กุลวดี ทองภูเบศร์ และอารี ฤทธิบูรณ์, 2547)

กระบวนการทางชีวเคมีเพื่อผลิตเซลล์หรือผลิตภัณฑ์ ไม่ว่าจะเป็นระดับห้องทดลองหรือระดับอุตสาหกรรม จะเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีซึ่งเรียกว่า กระบวนการหมัก ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเซลล์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการควบคุมสภาวะแวดล้อมในถังหมักอีกด้วย ถังหมักที่มีรูปร่าง สัดส่วน และส่วนประกอบที่เหมาะสม จะทำให้กวนผสมสารในน้ำหมักมีความสม่ำเสมอ ไม่ทำให้เกิดปัจจัยจำกัดในระหว่างการหมัก โดยทั่วไปถังหมักสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขนาดตามปริมาณสารที่ใช้หมัก ได้แก่ ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจเป็นหลอดทดลอง ขวดทดลองซึ่งเป็นถังหมักอย่างง่ายและไม่สามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้โดยอัตโนมัติ เติมอากาศโดยวิธีเขย่า ถังหมักทรงกระบอกจะมีการออกแบบพัฒนาให้สามารถควบคุมสภาวะการหมักได้โดยอัตโนมัติดังรูปที่ 2.3 ถังหมักโรงงานต้นแบบ มีขนาดตั้งแต่ 50 ลิตร จนถึง 1,000 ลิตร และถังหมักระดับโรงงานอุตสาหกรรม มีขนาดตั้งแต่ 20,000 ขึ้นไป

รูปที่ 2.3 ถังหมักทรงกระบอกขนาด 5 ลิตร (www.firstenbergequip.com., 2552 : ออนไลน์)

ถังหมักที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ ถังหมักแบบกวน (stirred tank reactor, STR) ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์พื้นฐานที่สำคัญคือ ตัวถัง (vessel) ซึ่งเป็นถังทรงกระบอก อาจทำมาจากแก้วพวกบอโรซิลิเกต (borosillicate) หรือสเตนเลส แล้วแต่กรณีการใช้งาน และมีอุปกรณ์การกวนและให้อากาศ ดังรูปที่ 2.4



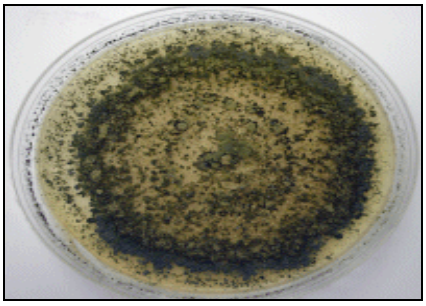
รูปที่ 2.4 ส่วนประกอบพื้นฐานของถังหมักแบบกวน (Scragg, 1991 อ้างถึงใน กุลวดี ทองภูเบศร์ และอารี ฤทธิบูรณ์, 2547)

การกวนและการให้อากาศของถังหมักชนิดนี้ อาศัยใบพัดกวน (impeller) ทำงานร่วมกับมอเตอร์และแกนหมุน และอาจมีการติดตั้งอุปกรณ์การให้อากาศ ซึ่งจะทำหน้าที่พ่นอากาศปลอดเชื้อที่กรองผ่านรูกรองขนาดเล็ก อากาศที่ได้จะผ่านหัวฉีดในถังหมักเข้าสู่น้ำหมัก จากนั้นใบพัดจะกวนฟองอากาศให้กระจายจากก้นถังหมักสู่ส่วนต่างๆ ในถังหมัก นอกจากนั้นยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพการให้อากาศในถังหมักได้โดยควบคุมฟองที่เกิดขึ้น โดยใช้สารเคมีจำพวกป้องกันการเกิดฟอง (antifoam) เช่น น้ำมันพืช และอาจมีการติดตั้งตัวกั้น (baffle) เพื่อเพิ่มการถ่ายโอนออกซิเจนและป้องกันการเกิดกระแสวน (vortex) การที่ถังหมักชนิดนี้มีอุปกรณ์เสริมในการกวนและให้อากาศ ทำให้อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนสูงกว่าถังหมักที่เป็นขวดทดลอง ซึ่งอาศัยการกวนและการให้อากาศโดยการเขย่าบนเครื่องเขย่าเท่านั้น

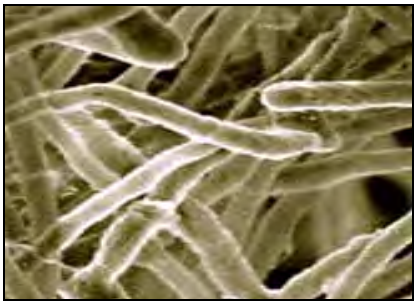
2.9 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

2.9.1 เชื้อรา *Trichoderma reesei* (เชื้อราผลิตเอนไซม์เซลลูเลส)

Trichoderma reesei สามารถย่อยสลายเส้นใยพืชไปเป็นโมเลกุลน้ำตาลได้ นักวิจัยสามารถผลิตเชื้อราที่ออกแบบให้ผลิตเอนไซม์หรือสารเร่งปฏิกิริยาที่คุ้มค่าในการลงทุนในการย่อยสลายเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ซึ่งจะเป็นขั้นตอนแรกในการเปลี่ยนชีวมวลไปสู่เชื้อเพลิงเพื่อการคมนาคมขนส่ง และสารเคมีที่จะใช้เป็นหน่วยแรกในการนำไปสังเคราะห์สารเคมีอื่นๆ ต่อไป *Trichoderma reesei* ถูกพบเป็นครั้งแรกในชุดเครื่องแบบทหารและเต็นท์ผ้าใบในทะเลแปซิฟิคตอนใต้ระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 จากนั้นนักวิทยาศาสตร์ค้นคว้าวิจัยจนพบว่าเชื้อราพันธุ์นี้หรือพันธุ์ข้างเคียงซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 2.5-2.6 เป็นตัวผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปัจจุบันมีการใช้อย่างแพร่หลายในการผลิตเส้นใยและสินค้าอุตสาหกรรมอื่นๆ มากมาย นักวิจัยได้ทำการเปรียบเทียบยีโนมของเชื้อรานี้กับลำดับพันธุกรรมของเชื้อราอื่นๆ ที่ย่อยสลายเซลลูโลสเช่นกันอีก 13 ชนิด สิ่งที่พบ คือ เชื้อรา *T. reesei* นั้นมียีนส์เพียง 2-3 ยีนส์ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์เซลลูโลส เอนไซม์เฮมิเซลลูเลสและเอนไซม์อื่นๆ ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส ยีนส์เหล่านี้จะรวมตัวเข้าด้วยกันเป็นกลุ่มก้อนในยีโนมมากกว่าที่จะกระจายตัวอย่างไม่เป็นระบบ (random) เหมือนในยีโนมของเชื้อราพันธุ์อื่นๆ การค้นหาลำดับการเรียงตัวของยีโนมเชื้อรา *T. reesei* จะเป็นบันไดสำคัญที่มุ่งสู่การใช้วัตถุดิบที่เกิดใหม่ได้ (renewable feedstocks) เพื่อการผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมี ข้อมูลที่ได้จากยีโนมจะช่วยให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจได้ดีขึ้นถึงการทำงานของเชื้อราทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปสู่การลดค่าใช้จ่ายที่สูงในปัจจุบันในการเปลี่ยนชีวมวลจำพวกเซลลูโลสไปสู่น้ำตาลที่จะนำไปหมักเป็นแอลกอฮอล์ในที่สุด (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2552 : ออนไลน์)



รูปที่ 2.5 *Trichoderma* sp. เจริญบนอาหาร PDA (www.moldbacteria.com., 2552 : ออนไลน์)

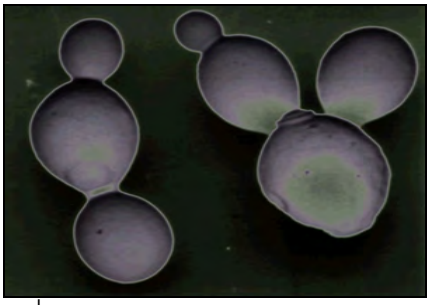


รูปที่ 2.6 *Trichoderma reesei* ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (www.sciencedaily.com., 2552 : ออนไลน์)

2.9.2 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ มีผู้กล่าวว่ายีสต์นั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ รายงานแรกเกี่ยวกับการใช้ยีสต์คือการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อนคริสตศักราช คนไทยรู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์มาเป็นเวลานาน เช่นในการทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก เครื่องดอง ของเมาหลายชนิด เช่น อุ สาโท และกระแช่ เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ตัวอย่างเช่น ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ การผลิตเอธิลแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นสารเคมีและเชื้อเพลิง การผลิตยีสต์เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปังและเป็นโปรตีนเซลล์เดียว ยีสต์ที่ใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักจะอยู่ในสกุล Saccharomyces เซลล์ของยีสต์พวกนี้จะเป็นรูปกลม รูปไข่ หรือค่อนข้างยาว อาจมีการสร้างไมซีเลียมเทียม การสืบพันธุ์จะเป็นแบบแตกหน่อที่ขั้วเซลล์และสร้างแอสโคสปอร์ดังแสดงในรูปที่ 2.7-2.8 สปีชีส์ที่สำคัญคือ *Saccharomyces cerevisiae* หรือที่รู้จักกันในนาม Bakers yeast หรือ Brewers yeast

รูปที่ 2.7 *Saccharomyces cerevisiae* เจริญบนอาหาร YMA (www.emdchemicals.com., 2552 : ออนไลน์)



รูปที่ 2.8 *Saccharomyces cerevisiae* ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (www.micron.ac.uk., 2552 : ออนไลน์)

Saccharomyces cerevisiae มีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ขนมปัง ไวน์ กลีเซอ-รอล และอินเวอเทส (invertase) แบ่งออกเป็น

1. ทอปยีสต์ (Top yeast) เจริญได้อย่างรวดเร็วที่ 20 °ซ เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ลอยขึ้นไปอยู่บนผิวหน้าของอาหาร จึงเรียกว่า ทอปยีสต์ พวกที่หมักแอลกอฮอล์ได้ดี สังเกตได้ง่ายๆ จากการเขย่าขวดหมักจะเห็นฟองเกิดขึ้นจำนวนมาก ส่วนพวกที่หมักไม่ดีมักจะขึ้นเป็นฝ้าอยู่ที่ผิวหน้าของอาหาร

2. บอตทอมยีสต์ (bottom yeast) เป็นพวกที่กิจกรรมการหมักเกิดดีที่อุณหภูมิต่ำ (10-15°ซ) ไม่มีการรวมกลุ่มของเซลล์และการเจริญเป็นไปอย่างช้าๆ ทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์น้อย เซลล์จึงค่อยๆ ตกตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะ จึงเรียกว่า บอตทอมยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถมีชีวิตและเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เพียงสภาวะใดสภาวะหนึ่งเท่านั้น ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) การใช้น้ำตาลภายใต้สภาวะนี้จะเป็นในรูปเรสปิเรชัน (respiration) คือ ยีสต์ใช้ออกซิเจนในกระบวนการสร้างเซลล์ (biosynthesis) ซึ่งถ้ากระบวนการนี้มีประสิทธิภาพจะส่งผลให้การเพิ่มจำนวนของยีสต์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) หรือที่รู้จักกันในชื่อว่า การหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation) ยีสต์จะสร้างพลังงานจากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลตามหลักของวิถีไกลโคไลซีส

จากวิถีไกลโคไลซีส สามารถเขียนเป็นสมการเคมีที่แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นแอลกอฮอล์ ได้ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

กลูโคส เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

น้ำหนักโมเลกุล 180 92 88

นั่นคือ น้ำตาลกลูโคส 1 กิโลกรัม เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ได้

= 92/180 กิโลกรัม

= 0.511 กิโลกรัม

= 0.511/0.7934 ลิตร

= 0.644 ลิตร

หมายเหตุ : ความหนาแน่นของแอลกอฮอล์ คือ 0.7934

2.10 การใช้ประโยชน์จากเอทานอลและผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล

(กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2553 : ออนไลน์)

2.10.1 การใช้ประโยชน์จากเอทานอล

2.10.1.1 กรดอะซิติก (Acetic acid)

กรดอะซิติกมีสูตรทางเคมี คือ CH_3COOH เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เป็นส่วนผสมของน้ำส้มสายชูและยังเป็นสารเคมีที่สำคัญในการทำปฏิกิริยาเคมี เพื่อผลิตสารอนุพันธ์ของกรดอะซิติก เช่น ไวนิลอะซิเตท (Vinyl acetate) กรดเทเรฟทาลิค (Terephthalic acid, TPA) อะซิเตทเอสเทอร์ (Acetate ester) และอะซิติกแอนไฮไดร์ (Acetic anhydride) รวมถึงเซลลูโลสอะซิเตท (Cellulose acetate) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมพลาสติกอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น กรดอะซิติกสามารถ

ผลิตได้จากกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพโดยการหมัก (Fermentation) โดยสามารถใช้เอทานอลเป็นสารตั้งต้นได้ สำหรับปริมาณการผลิตกรดอะซิติกในประเทศไทยพบว่ายังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ ทำให้ประเทศไทยต้องนำเข้ากรดอะซิติกจากต่างประเทศ โดยในปี 2548 มีปริมาณนำเข้า 90,761 ตัน มีมูลค่าประมาณ 2,500 ล้านบาท โดยกรดอะซิติกจะใช้ในอุตสาหกรรมผลิตกรดเทเรฟทาลิค (TPA) สำหรับใช้ในการผลิตพอลีเอทีลีนเทเรฟทาเลท (Polyethylene terephthalate; PET) ที่ใช้ทำขวดพลาสติก ซึ่งมีความต้องการกรดอะซิติกประมาณ 157,200 ตันต่อปี หรือคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาณการใช้ทั้งหมด รองลงมาเป็นการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมสีและยา เป็นต้น

2.10.1.2 เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate)

เอทิลอะซิเตท มีสูตรทางเคมีคือ $CH_3COOCH_2CH_3$ จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มของเอสเทอร์ เอทิลอะซิเตทมีการใช้งานที่หลากหลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร ได้แก่ ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์ขนมหวาน ลูกกวาด ไอศกรีม และเค้ก รวมถึงใช้สกัดสารคาเฟอีนออกจากชาและกาแฟ ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับยางไม้ น้ำมัน ไขมัน และเซลลูลอยด์ ใช้ในทางการแพทย์ ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์และผลิตเครื่องสำอาง ใช้ทำแลคเกอร์ สี สารเคลือบผิว น้ำยาขัดเงา ใช้ในการผลิตหมึกพิมพ์และน้ำหอม เป็นต้น เอทิลอะซิเตทผลิตได้หลายวิธี แต่ส่วนใหญ่ผลิตโดยใช้ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างเอทานอลและกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนชั่น (Dehydrogenation) ของเอทานอล ในด้านการตลาดพบว่าประเทศไทยมีผู้ผลิตภายในประเทศเพียงรายเดียว ทำให้ต้องนำเข้าเอทิลอะซิเตทจากต่างประเทศ โดยในปี 2548 มีการนำเข้าปริมาณกว่า 24,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 950 ล้านบาท โดยมีราคาผลิตภัณฑ์ประมาณ 39 บาทต่อกิโลกรัม

2.10.2 การใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตเอทานอล (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2553 : ออนไลน์)

2.10.2.1 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดขึ้นในระหว่างการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ ซึ่งจะมีปริมาณประมาณครึ่งหนึ่งโดยน้ำหนักของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการหมัก จากการประมาณที่กำลังการผลิตเอทานอล 150,000 ลิตร/วัน จะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 100-120 ตัน/วัน การใช้ประโยชน์ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถใช้ได้ทั้งสถานะที่เป็นก๊าซ (Gas) ของเหลว (Liquid CO_2) และของแข็ง (Solid CO_2) โดยจะใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นสารทำความเย็น และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทที่มีการอัดก๊าซ นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ได้แก่ อุตสาหกรรมเคมี พลาสติกและยาง และกสิกรรม ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักเอทานอล

2.10.2.2 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่แยกได้จากการหมักเป็นแหล่งโภชนาการที่สำคัญโดยในเซลล์ยีสต์จะประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 40 โดยน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 34 โดยน้ำหนักแห้ง ไขมันร้อยละ 4 โดยน้ำหนักแห้ง และวิตามินบี จึงสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทน และอาหารเสริมสำหรับการเจริญเติบโตของทั้งมนุษย์และสัตว์หรือสกัดแยกเป็นยีสต์สกัด (Yeast extract) ยีสต์สกัดสามารถนำมาใช้ประโยชน์สำหรับอาหารสัตว์ โดยจัดเป็นสารอาหารเสริมสำหรับสัตว์ที่มีคุณภาพสูง สามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นในอาหารสัตว์ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีกลิ่นคาวคล้ายกลิ่นเนื้อสัตว์ ส่วนผนังเซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของเบต้า 1,3 และ 1,6 กลูแคน ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์และสัตว์ สามารถใช้ในการเลี้ยงสัตว์แบบไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เป็นต้น

2.10.2.3 ก๊าซชีวภาพ (Biogas)

ก๊าซชีวภาพ หมายถึง ก๊าซที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ใช้เป็นพลังงานทดแทนซึ่งสามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือทิ้งและน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตร ก๊าซชีวภาพประกอบด้วยก๊าซหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นก๊าซมีเทน (Methane; CH_4) ประมาณร้อยละ 50-70 และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณร้อยละ 30-50 ส่วนที่เหลือเป็นก๊าซชนิดอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจน (H_2) ออกซิเจน (O_2) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ไนโตรเจน (N_2) และไอน้ำ ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ให้ค่าความร้อนประมาณ 35,800 กิโลจูล/ลูกบาศก์เมตร ส่วนก๊าซชีวภาพที่มีสัดส่วนของก๊าซมีเทนร้อยละ 65 ให้ค่าความร้อน 22,400 กิโลจูล/ลูกบาศก์เมตร เนื่องจากก๊าซชีวภาพมีส่วนประกอบหลักเป็นก๊าซมีเทน จึงทำให้มีคุณสมบัติจุดติดไฟได้ดีและสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนในรูปต่างๆ ได้ เช่น การเผาเพื่อใช้ประโยชน์จากความร้อนโดยตรง จะได้ประสิทธิภาพเชิงความร้อนสูง จึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อต้มไอน้ำ (Steam boiler) ของโรงงาน ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้น้ำมันเตาเป็นแหล่งพลังงาน ก๊าซชีวภาพปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร สามารถทดแทนน้ำมันเตาได้ 0.55 ลิตร ซึ่งนำมาใช้กับ Boiler เพื่อผลิตไอน้ำสำหรับกลั่นเอทานอลได้ โดยทั่วไปกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ เช่น ไขมัน แป้ง และโปรตีน ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายจนกลายเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile acids) โดยจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรด (Acid-producing bacteria) และขั้นตอนการเปลี่ยนกรดอินทรีย์ให้เป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทน (Methane-producing bacteria) ในโรงงานเอทานอลส่วนใหญ่จะเลือกใช้ระบบถังหมักก๊าซชีวภาพ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีการหมักแบบไร้อากาศ (Anaerobic treatment technology) สามารถแบ่งตามรูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ได้เป็น 3 แบบ คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่แขวนลอยในระบบ (Suspended growth) จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะกับ

วัสดุในระบบ (Supported growth) และแบบลูกผสม (Hybrid) ได้แก่ Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB), Anaerobic Lagoons (AL) และUpflow Sludge Blanket/Fixed Bed Reactor (USB/FBR)

2.11 การจัดการของเสียจากกระบวนการผลิตเอทานอลของโรงงานในประเทศไทย

(กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2553 : ออนไลน์)

ในกระบวนการผลิตเอทานอล นอกจากเอทานอลแล้วยังมีผลพลอยได้อื่นๆ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก และของเสียจากกระบวนการผลิตคือน้ำเสียซึ่งมีเซลล์ยีสต์ปนอยู่เกิดขึ้นด้วย ทั้งนี้คุณภาพของน้ำหมักจะแตกต่างกันตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ จากการสำรวจการจัดการของเสียและผลพลอยได้ของโรงงานผลิตเอทานอลที่มีในปัจจุบัน พบว่าโรงงานยังไม่มีการติดตั้งระบบการเก็บก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในส่วนของน้ำหมักก็ยังไม่มีการแยกเซลล์ยีสต์มาใช้ประโยชน์ แต่จะนำน้ำหมักไปผลิตก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ภายในโรงงาน ในบางโรงงานที่ผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลจะมีการนำน้ำกากส่ามาใช้ในการผลิตปุ๋ย โดยผสมกับกากที่เหลือทิ้งจากการกรองน้ำเชื่อมของโรงงานน้ำตาลหรือชานอ้อย เป็นต้น ซึ่งการใช้ประโยชน์จากของเสียอย่างมีประสิทธิภาพนี้ จะเป็นทั้งการสร้างรายได้ให้กับโรงงาน ในขณะเดียวกันก็จะเป็นการลดภาระค่าใช้จ่ายในการจัดการของเสียของโรงงาน ซึ่งจะช่วยให้โรงงานมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลงได้

2.12 งานวิจัยที่ผ่านมา

Hagerdal และ Haggstrom (1985) ศึกษาการเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสไปเป็นเอ-ทานอล โดยใช้การทำงานร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Trichoderma reesei* ในลักษณะของเชื้อผสม (mixed cultures) พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 0.2 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง โดยมีปัจจัยควบคุมการผลิตคือ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *T. reesei*

ระวีวรรณ แกล้วกล้า (2538) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว พบว่าฟางข้าวซึ่งมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสต่ำมากแต่มีปริมาณลิกนินที่สูง เมื่อปรับสภาพด้วยการแช่ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เพิ่มความเข้มข้นและอุณหภูมิ จะทำให้สัดส่วนของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นแต่ผลผลิตของเอทานอลลดลง

Lark และ คณะ (1997) ศึกษาการนำตะกอนกระดาษ (recycle paper sludge) มาใช้เพื่อการผลิตเอทานอลจากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งการใช้กระดาษเป็นวัตถุดิบจะง่ายกว่าใช้วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสโดยตรง และใช้ *Kluveromyces marxianus* เพื่อกระบวนการหมัก พบว่าหากใช้ตะกอนกระดาษปริมาณมากจะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

Van Wyk (2001) ศึกษาการลำดับขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของกระดาษไปเป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderme reesei* และ *Pennicillium funiculosum* เนื่องจากกระดาษมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ถือเป็นการพัฒนาเปลี่ยนขยะกระดาษซึ่งเดิมมีวิธีการจัดการ เช่น ฝังกลบ เผา ทำปุ๋ย และนำกลับมาใช้ใหม่ ไปสู่การเป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อการผลิตพลังงานแทนแหล่งเดิมซึ่งมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้การหมักน้ำตาลด้วยวิธีทางชีวภาพเพื่อการผลิตเอทานอล ยังถือเป็นการปรับปรุงให้เกิดพลังงานที่ปลอดภัย ลดมลพิษอากาศและลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศ

Galbe และ Zacchi (2002) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากไม้เนื้ออ่อน (soft wood) และเน้นศึกษาในเรื่องการย่อยเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส ซึ่งถือเป็นปัญหาหลักของกระบวนการผลิต ในปี ค.ศ. 1960 การย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้อุณหภูมิต่ำและใช้เอนไซม์เซลลูเลส พบว่าให้ผลผลิตที่สูงและสามารถลดสารประกอบอันตรายได้ดีกว่าการย่อยด้วยกรด แต่มีข้อเสีย คือ การเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลด้วยวิธีทางชีวภาพจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากเซลลูโลสจะถูกล้อมรอบด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ดังนั้นการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อเปิดทางให้เอนไซม์แทรกซึมเข้าสู่เส้นใยและย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้

ง่ายขึ้น จุลินทรีย์ที่ใช้หมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งทนและเหมาะสมต่อสภาวะการหมักเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยมาแล้ว สำหรับ *Zymomonas mobilis* นั้น สามารถหมักกลูโคสให้เป็นเอทานอลได้ปริมาณสูงและเกิดผลผลิตของเซลล์น้อย แต่มีข้อเสีย คือ ไม่ทนทานต่อสภาวะการหมัก

Badger (2002) รายงานว่า ในการผลิตเอทานอลนั้น เนื่องจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง จัดเป็นพืชอาหารของมนุษย์จึงมีราคาแพง วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส เช่น กระดาษ ไม้ เส้นใยพืชจึงกลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งมีปริมาณมากและราคาถูก วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสมีองค์ประกอบของลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสอยู่รวมกัน หรืออาจเรียกอีกอย่างว่า ลิกโนเซลลูโลส โดยลิกนินจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างช่วยยึดต้นพืชและพบในปริมาณที่สูง แต่กลับไม่เป็นผลดี เนื่องจากภายในลิกนินไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบและโครงสร้างของลิกนินยังอยู่ล้อมรอบเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส ทำให้การย่อยน้ำตาลเกิดขึ้นได้ยาก เอทานอลจากเซลลูโลสเป็นที่รู้จักและสนใจมากขึ้น แต่เนื่องจากราคาในส่วนของกระบวนการผลิตนั้นค่อนข้างสูง จึงส่งผลให้การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสยากที่จะสำเร็จในเชิงอุตสาหกรรม

Hagglund และ คณะ (2003) พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่พบว่าในทางปฏิบัติจริง มีเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถสกัดเอาเอนไซม์ออกมาใช้งานได้ โดยส่วนใหญ่นิยมใช้เชื้อรา และเมื่อผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ตามหลักพันธุวิศวกรรมพบว่าสามารถทำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์เซลลูโลสได้ปริมาณสูงขึ้น เชื้อรา *Trichoderma reesei* ถือเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณสูง

ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ (2547) ทดลองเปรียบเทียบปริมาณกลูโคสและเอทานอลที่ผลิตจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่เก็บตัวอย่างมา 2 จุด คือกากตะกอนเยื่อกระดาษหลังผ่านระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง ก่อนและหลังเข้าระบบรีดน้ำตะกอน พบว่าปริมาณกลูโคสที่ได้จากการทดลองในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปได้ว่าสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการรีดน้ำไม่ส่งผลต่อกระบวนการผลิตเอทานอล

Wyman (2007) กล่าวว่า ค่าใช้จ่ายหลักของกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ คือ เอนไซม์ โดยเอนไซม์เซลลูเลสมีขั้นตอนการผลิตที่ส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายที่สูงและมีอัตราการทำปฏิกิริยาที่ช้า ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงการผลิต การใช้จุลินทรีย์ที่ทนต่อความร้อน (thermophilic microbes) ในสภาวะไร้อากาศเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อราปกติ

ศิริพงษ์ เปรมจิต และคณะ (2550) ทดลองผลิตเอทานอลจากปอสาด้วยกระบวนการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ภายในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลตร โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* QM 9414 และใช้ยีสต์ *Candida krusei* NBRC 1664 ในกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณการผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาทำการหมัก โดยให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 6.47, 7.57, 10.73 และ 10.89 (กรัม/ลิตร) ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ตามลำดับ

Saha และ Cotta (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากข้าวเปลือก ที่มีปริมาณเซลลูโลสเท่ากับร้อยละ 35.6 และใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลส เบต้ากลูโคซิเดสและเฮมิเซลลูเลส ในการย่อยข้าวเปลือก ใช้เชื้อ *E. coli* ในกระบวนการหมัก และทำการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอล 2 รูปแบบคือ Simultaneous saccharification and fermentation และ Separate saccharification and fermentation พบว่าการผลิตแบบ Simultaneous saccharification and fermentation ให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าแบบ Separate saccharification and fermentation โดยให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 11 กรัม/ลิตร และ 9.8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Qureshi และ คณะ (2008) ศึกษาการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE) โดยใช้ฟางข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบ และใช้ *Clostridium beijerinckii* ในการย่อยสลายเซลลูโลสและหมักเอ-ทานอล ผู้วิจัยศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการ 5 รูปแบบที่ต่างกัน พบว่าการผลิตด้วย Simultaneous saccharification and fermentation โดยมีการกวนผสมร่วมด้วยจะทำให้ได้ผลผลิต ABE มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบอื่นๆ โดยให้ ABE มากที่สุดเท่ากับ 21.42 กรัม/ลิตร

Patle และ Lal (2008) ศึกษาพบว่า วัตถุดิบประเภทของเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตร ซึ่งมีราคาถูกและมีองค์ประกอบจำพวก แป้ง แพกติน เส้นใย และโปรตีน สามารถนำมาผลิตเอทา-นอลได้ในปริมาณที่สูง โดยใช้การทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ *Candida tropicalis* และ *Zymomonas mobilis*

Marques และ คณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกระดาษเหลือทิ้งด้วยเซลลูเลสและยีสต์ *Pichia stipitis* และทำการเปรียบเทียบกระบวนการผลิตแบบรวมปฏิกิริยา (SSF) และแบบแยกปฏิกิริยา (SHF) พบว่าปริมาณการผลิตแบบแยกปฏิกิริยาให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าแบบรวมปฏิกิริยา โดยแบบแยกปฏิกิริยาให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 19.6 (กรัม/ลิตร) และใช้เวลาในกระบวนการหมักเท่ากับ 179 ชั่วโมง ในขณะที่การผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาให้ผลผลิตเท่ากับ 18.6 (กรัม/ลิตร) และใช้เวลาเท่ากับ 48 ชั่วโมง

Jeihanipour และ Taherzadeh (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทฟ้าย ซึ่งเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ ด้วยการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และทำการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และใช้กระบวนการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 0.48 (กรัม/กรัม)

Matsushika และ คณะ (2009) พบว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 5 สายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่ต่างกันด้วย โดยสายพันธุ์ MA-R4 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสซึ่งผ่านการย่อยมาแล้ว

Dogaris และ คณะ (2009) ศึกษาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากเชื้อรา *Neurospora crassa* พบว่าเชื้อราชนิดนี้ซึ่งเป็นเชื้อราในพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง สามารถขับเอนไซม์ endoglucanase, β-glucosidase และ β-xylosidase ได้ในปริมาณที่สูงเพื่อใช้ในการย่อยชานข้าวฟ่างเพื่อการผลิตเป็นเอทานอล

Tomas-Pejo และ คณะ (2009) ทำการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสและปริมาณเซลล์ยีสต์เพื่อการผลิตเอทานอล โดยทดลองเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่ปริมาณการเติมคงที่ (enzyme loading) เท่ากับ 15 (FPU/g substrate) และแปรผันปริมาณสับสเตรทเท่ากับ 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15 (%w/v) พบว่าปริมาณสับสเตรทที่มากขึ้นจะทำให้สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้มากขึ้นตามไปด้วย โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 2.8,4.7,12.4 และ 15.3 (กรัม/ลิตร) ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังทำการทดลองโดยใช้ปริมาณสับสเตรทคงที่เท่ากับ 10 (%w/v) และแปรผันปริมาณการเติมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 5, 15, 25 และ 35 (FPU/g substrate) และพบว่าปริมาณการเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มากขึ้น จะทำให้สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้มากขึ้นตามไปด้วย โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ เท่ากับ 2.4 6.8 11.5 12.9 (กรัม/ลิตร) ตามลำดับ

Yamashita และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากตะกอนกระดาษที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีทางกลและใช้สารเคมี พบว่าการปรับสภาพทางกลด้วยการบดและปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริคนั้น ส่งผลต่อการผลิตเอทานอล โดยได้เปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลระหว่างตะกอนกระดาษที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพและตะกอนกระดาษที่ทำการปรับสภาพด้วย Ball mill และกรดฟอสฟอริค ได้เท่ากับ 20.4 กรัม/ลิตร และ 30.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Brethauer และ Wyman (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส กล่าวว่า การผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยา (simultaneous saccharification and fermentation) เป็นรูปแบบที่สำคัญในการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสไปเป็นเอทานอล และเป็นกระบวนการที่ลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยน้ำตาล นอกจากนี้แล้วการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous simultaneous saccharification and fermentation) ก็มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่ต่างจากแบบแบตซ์ (Batch simultaneous saccharification and fermentation) กล่าวคือ การหมักแบบต่อเนื่องเป็นวิธีที่ทำให้เกิดการกวนผสมที่สมบูรณ์ ในขณะที่แบบแบตซ์ การกวนผสมที่สมบูรณ์จะเกิดขึ้นได้ยากหากวัตถุดิบมีปริมาณมาก

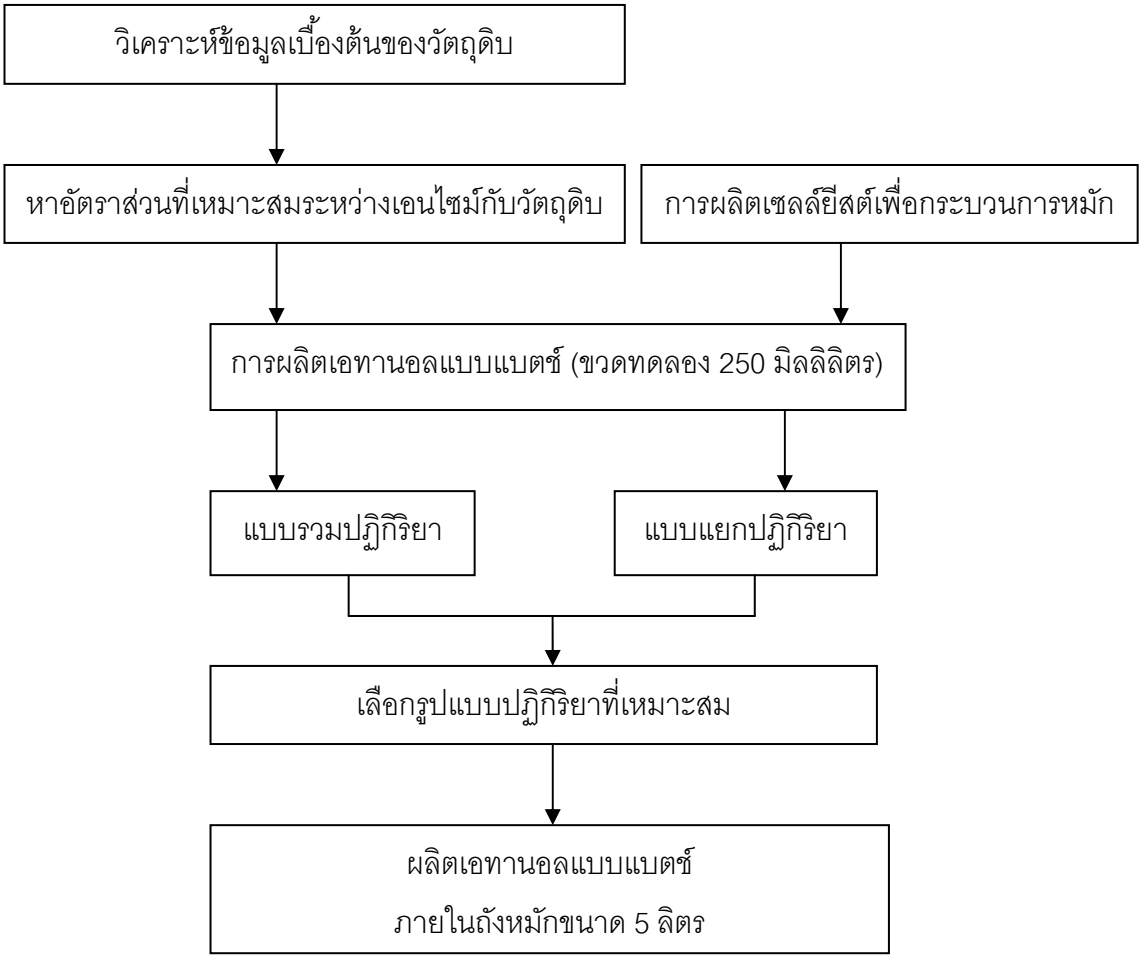
จากงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการนำวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสมาใช้เพื่อการผลิตเอทา-นอลด้วยวิธีการทางชีวภาพ พบว่าวัตถุดิบส่วนใหญ่ที่นำมาใช้จะเป็นวัสดุโดยตรงจากพืช ได้แก่ ฟางข้าว ไม้เนื้ออ่อน ปอสา และข้าวเปลือก เป็นต้น บางงานวิจัยใช้วัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม ได้แก่ เศษผ้าฝ้ายจากโรงงานสิ่งทอ หรือกากตะกอนกระดาษจากโรงงานผลิตกระดาษ วัตถุดิบหลายประเภทสามารถนำมาใช้ในงานวิจัยเพื่อเป็นทางเลือกให้กับการผลิตเอทา-นอลจากเซลลูโลสได้ เนื่องจากวัตถุดิบที่ต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันออกไป นอกจากวัตถุดิบแล้ว เอนไซม์และเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในขั้นตอนของการผลิตน้ำตาลและกระบวนการหมักก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลต่อการผลิตเอทานอล งานวิจัยส่วนใหญ่มีความสนใจที่จะศึกษาการผลิตเอทานอลจากเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราหลากหลายชนิด เช่น *Trichoderma reesei, Pennicillium funiculosum*, *Neurospora crassa* เป็นต้น และในกระบวนการหมักก็เช่นเดียวกัน จุลินทรีย์หลายชนิดถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมหรือคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces marxianus*, *Zymomonas mobilis* และ *Pichia stipitis* เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การนำวัตถุดิบโดยตรงจากพืชเพื่อนำมาผลิตเอทานอลก็มีข้อจำกัดในเรื่องของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนนำเข้าสู่กระบวนการผลิต ซึ่งสำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมผลิตเยื่อและกระดาษ ซึ่งมีแนวโน้มว่าวัตถุดิบประเภทนี้น่าจะมีองค์ประกอบของเซลลูโลสที่สูงและมีปริมาณลิกนินที่ต่ำ ซึ่งถือเป็นผลดีต่อกระบวนการผลิตเอทานอล เนื่องจากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษมีขั้นตอนของการคัดให้เหลือแต่เซลลูโลสและกำจัดลิกนินออกเพื่อคุณภาพที่ดีของผลิตภัณฑ์กระดาษ ดังนั้นวัตถุดิบชนิดนี้จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้ผลิตเป็นเอทา-นอล เพื่อเป็นการลดต้นทุนของสารเคมีที่ต้องใช้ในการปรับสภาพ เวลาในการปรับสภาพ รวมถึงช่วยลดสารเคมีที่เจือปนจากการปรับสภาพเข้าสู่กระบวนการหมัก งานวิจัยนี้เลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ซึ่ง

เป็นเชื้อราที่นักวิทยาศาสตร์วิจัยพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และในปัจจุบันมีใช้อย่างแพร่หลาย และใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ในประเทศไทยคุ้นเคยและใช้เพื่อการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งการเลือกใช้ทั้งเอนไซม์และเชื้อยีสต์นั้นสำหรับการทดลองนี้หวังผลเพื่อให้ข้อมูลของงานวิจัยสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต ดังนั้นทั้งชนิดของเอนไซม์และเชื้อยีสต์ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ชนิดที่อุตสาหกรรมการผลิตสินค้าประเภทแอลกอฮอล์และเอทานอลมีความคุ้นเคย เพื่อเป็นการง่ายต่อการดำเนินการผลิตและไม่ต้องเสียเวลาในการศึกษาสภาวะใหม่ตลอดจนต้องปรับปรุงระบบการผลิตใหม่เพื่อรองรับสภาวะการเปลี่ยนแปลงที่ไม่คุ้นเคย

บทที่ 3

แผนการทดลองและการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (Laboratory scale) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เซลลูโลสจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตเยื่อและกระดาษเพื่อการผลิตเอทานอล ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยและบัณฑิต ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและห้องปฏิบัติการน้ำดี อาคารภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีขั้นตอนการวิจัยดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

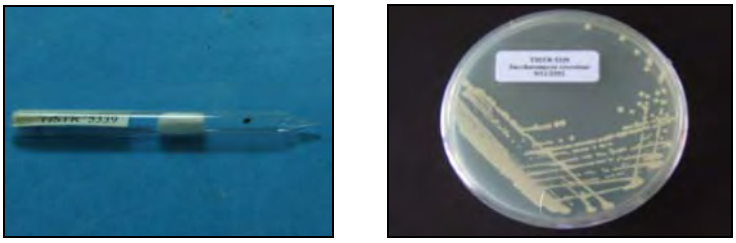
3.1.1 วัตถุดิบ

กากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ จังหวัดปราจีนบุรีลักษณะของกากตะกอนเยื่อกระดาษมีลักษณะเป็นตะกอนสีเทา-ขาว ขนาดประมาณ 0.2-0.5 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.2 กากตะกอนเยื่อหลังอบแห้ง

3.1.2 เชื้อยีสต์

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5339 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2549) ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339

3.1.3 เอนไซม์เซลลูเลส

ใช้เอนไซม์เซลลูเลสซึ่งผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ATCC 26921 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จาก Sigma

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ (Yeast Malt Broth) ยี่ห้อ Himedia

3.1.5 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

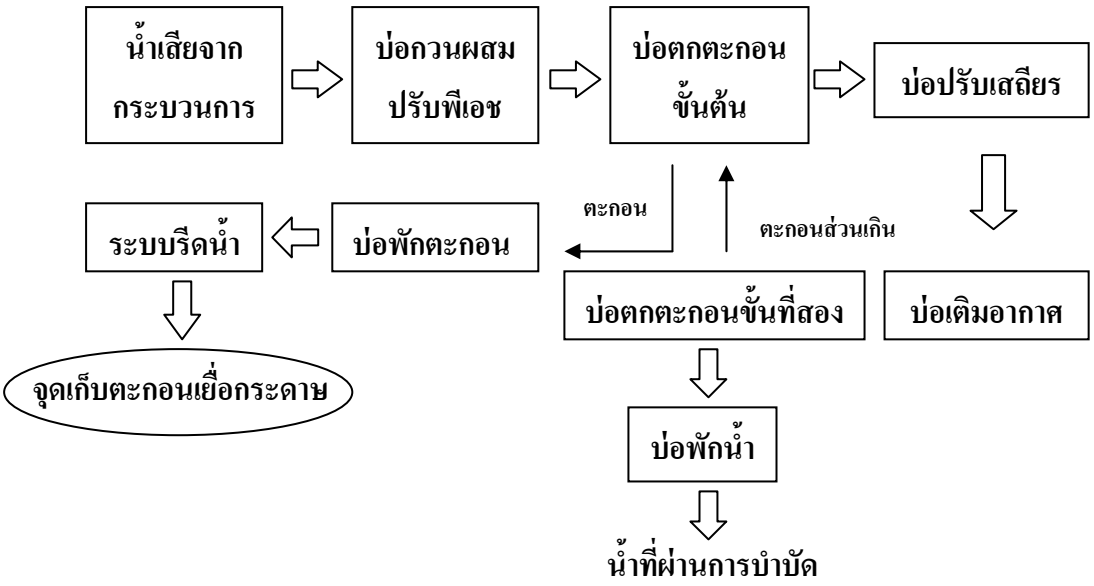
1. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar) ยี่ห้อ Holten Lamiair รุ่น HVR 2460
2. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter)
3. ตู้เย็น
4. หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HA-3D
5. เตาอบความร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ WTB binder รุ่น F115
6. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1601
7. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-7AG
8. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น A200S
9. เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ Kikalabortechnik รุ่น HS 501 digital
10. กระดาษกรอง (CN. Membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
11. ลูปเขี่ยเชื้อ (loop)
12. เตาให้ความร้อน (hot plate) ยี่ห้อ Framo-Geratetechnik รุ่น M21/1
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์
14. เครื่องแก้วสำหรับการทดลอง

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ยี่ห้อ CARLO BRBA
2. 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิค (DNS) ยี่ห้อ Fluka
3. โพแตสเซียมโซเดียมทาเทรต ยี่ห้อ QreC
4. ดี-กลูโคส ยี่ห้อ UNIVAR
5. เอทานอล ยี่ห้อ Merck
6. แฮลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
7. น้ำกลั่น

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

เก็บตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษ จากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ จังหวัดปราจีนบุรี ซึ่งเป็นระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง (Activated Sludge Process) (บริษัท แอ๊ดวานซ์ อะโกร จำกัด (มหาชน), 2553 : ออนไลน์) โดยเก็บตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษบริเวณจุดหลังออกจากกระบวนการรีดน้ำตะกอนของบ่อตกตะกอนขั้นต้น ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 กระบวนการบำบัดน้ำเสียและจุดเก็บตัวอย่างตะกอนเยื่อกระดาษ

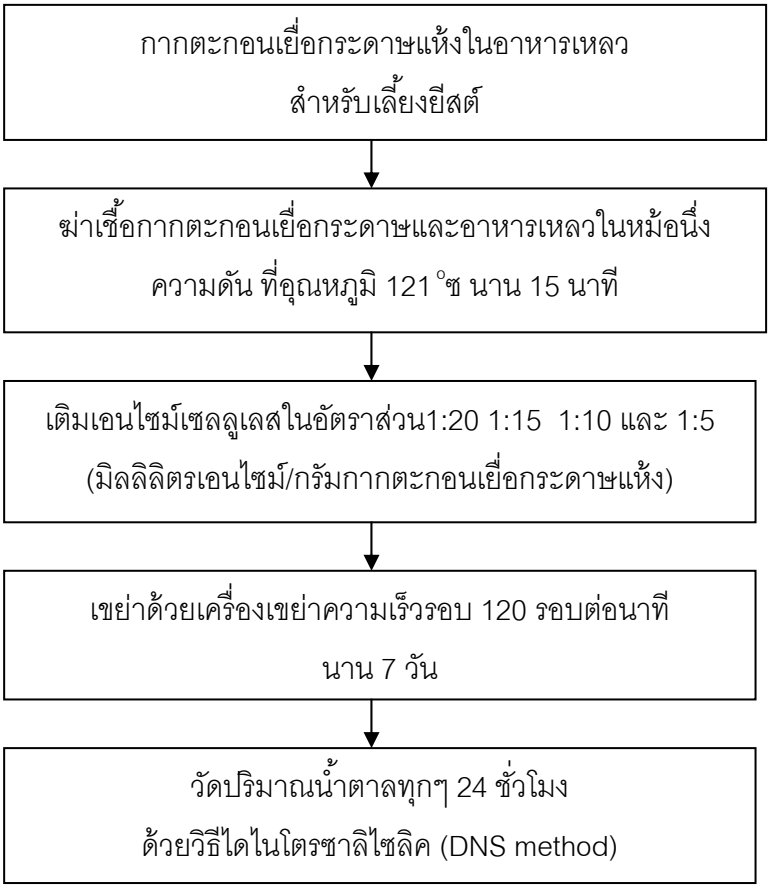
3.2.1 ขั้นตอนที่ 1 การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของกากตะกอนเยื่อกระดาษ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษ ได้แก่ ปริมาณเซลลูโลสและลิกนิน โดยวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ (Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 1983) ซึ่งแสดงวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก.

3.2.2 ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาล

นำตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้งในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงยีสต์ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121องศา-เซลเซียส รอให้เย็นแล้วเติมเซลลูเลสในอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้งเท่ากับ 1:20 1:15 1:10 และ 1:5 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง

เก็บตัวอย่างน้ำหมักด้วยวิธีการกรองและนำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทุกๆ 24 ชั่วโมง นาน 7 วัน ด้วยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิค (Miller, 1959) ดังแสดงในรูปที่ 3.5 และแสดงวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในภาคผนวก ข.



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาล

3.2.3 ขั้นตอนที่ 3 การผลิตยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก (Fermentation)

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ถ่ายยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงยีสต์ (Yeast Malt Extract Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ลงสู่อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงยีสต์ (Yeast Malt Extract Broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเตรียมหัวเชื้อเพื่อกระบวนการผลิตเอทานอล กำหนดค่าความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 0.6 (ค่า OD เท่ากับ 0.6) เพื่อให้เชื้อเริ่มต้นของทุกการทดลองมีความหนาแน่นเท่ากัน โดย

ทำการวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ก่อนนำหัวเชื้อปริมาณร้อยละ 5 ของน้ำหมักมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล ดังแสดงในรูปที่ 3.6

รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการผลิตยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก

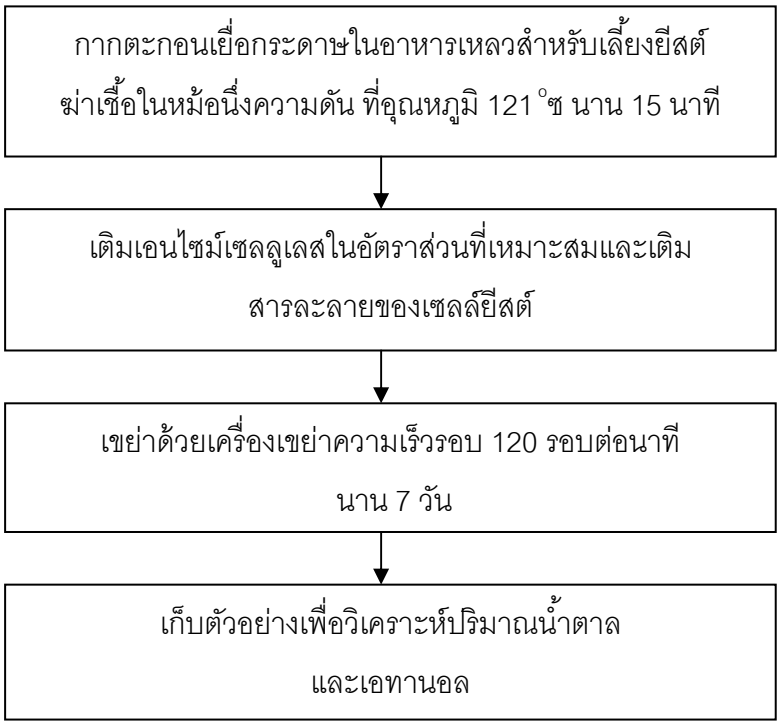
3.2.4 ขั้นตอนที่ 4 การผลิตเอทานอลด้วยการหมักแบบแบตช์ (ขวดทดลอง 250 มล.)

3.2.4.1 <u>แบบรวมปฏิกิริยา</u> (ทำ 2 ชุดการทดลอง) โดยนำตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้งในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงยีสต์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่สามารถผลิตน้ำตาลได้มากที่สุดและเติมสารละลายของเซลล์ยีสต์ที่มีค่าความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 0.6 ปริมาณร้อยละ 5 ของน้ำหมัก นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 1,3, 5 และ 7 ของการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักนำไปแช่แข็งในตู้เย็นนาน 2 ชั่วโมง เขย่าให้เข้ากันแล้วเทน้ำหมักผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ใส่ขวดฝาเกลียว ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิค (DNS method) และวิเคราะห์ปริมาณ

เอทานอลโดยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี (GC) ดังแสดงในรูปที่ 3.7 โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.1

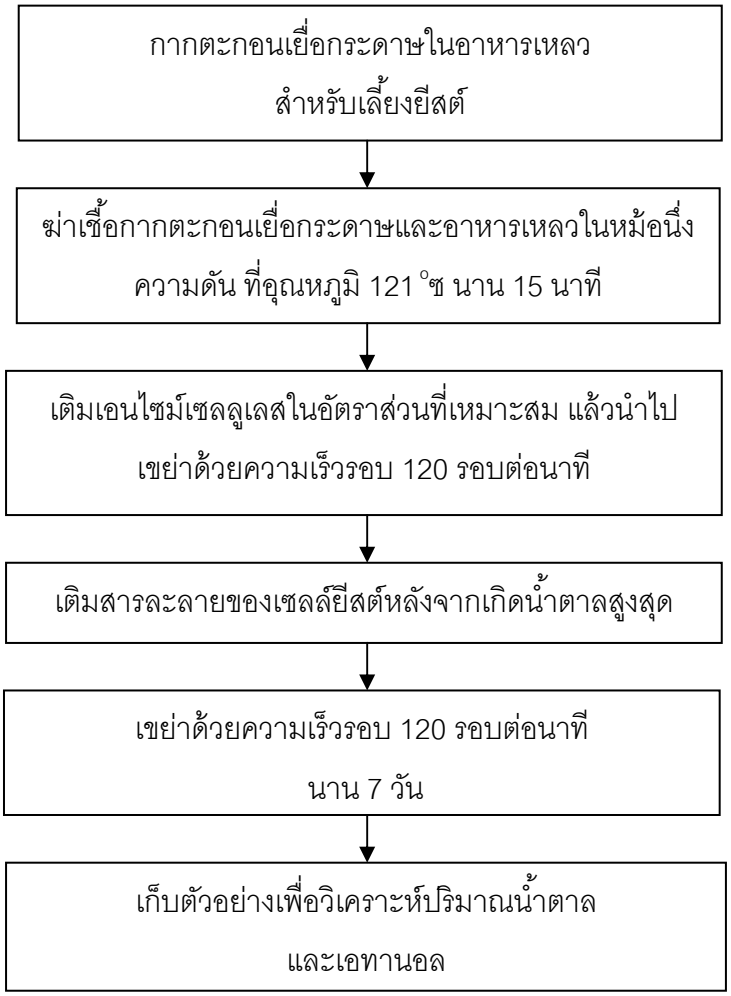
ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี	**สภาวะ**
คอลัมน์	Parapak Q
อุณหภูมิคอลัมน์	160 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิหัวฉีด	220 องศาเซลเซียส
ก๊าซตัวพา	ไนโตรเจน (50 มิลลิลิตรต่อนาที)
ปริมาตรฉีด	1 ไมโครลิตร



รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยา

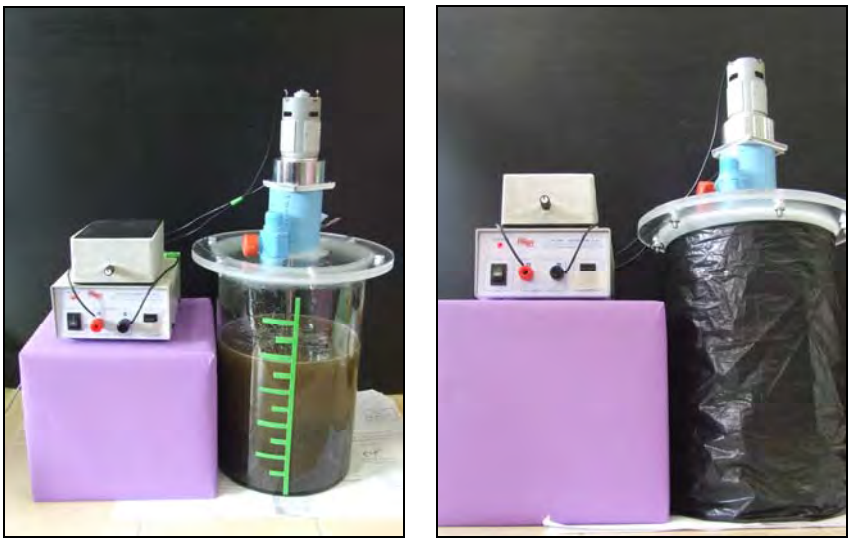
3.2.4.2 <u>แบบแยกปฏิกิริยา</u> (ทำ 2 ชุดการทดลอง) โดยนำตัวอย่างกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสในอัตราส่วนที่เหมาะสมลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงยีสต์ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที จนเกิดปริมาณน้ำตาลสูงสุด จึงเติมสารละลายของเซลล์ยีสต์ที่มีค่าความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 0.6 ปริมาณร้อยละ 5 ของน้ำหมักเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ของการทดลอง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิค (DNS method) และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี (GC) ดังแสดงในรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยา

3.2.5 ขั้นตอนที่ 5 การผลิตเอทานอลด้วยการหมักแบบแบตช์ (ทดลองในถังหมัก)

นำสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่ทดลองในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ทั้งอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้งและรูปแบบการผลิตเอทานอล (แบบรวมปฏิกิริยาหรือแบบแยกปฏิกิริยา) มาใช้ในการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งเป็นถังหมักแบบกวน (stirred tank reactor, STR) ประกอบด้วยอุปกรณ์พื้นฐานที่สำคัญคือ ตัวถัง (vessel) ซึ่งเป็นถังทรงกระบอกทำด้วยแก้ว มีอุปกรณ์การกวนและไม่มีการเติมอากาศ ใช้ปริมาตรทำงาน (Working Volume) เท่ากับ 3.5 ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 3.9 ทำการทดลองเป็นเวลา 13 วัน ตรวจวัดค่าอุณหภูมิและค่าพีเอชของระบบ เก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 ของการทดลอง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและเอทานอล โดยในการทดลองผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร นี้ จะทำการทดลองกับสับสเตรท 2 ลักษณะ คือ กากตะกอนเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพโดยแช่ในสารละลาย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชเป็นกลาง อบแห้งก่อนชั่งน้ำหนักตามอัตราส่วนที่ต้องการ แล้วจึงนำมาใช้เป็นวัสดุหมักเพื่อผลิตเอทานอล



รูปที่ 3.9 ถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการนำกากตะกอนเยื่อกระดาษ ซึ่งเป็นของเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ เพื่อการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยใช้วิธีทางชีวภาพคือใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราในการย่อยวัตถุดิบให้ได้เป็นน้ำตาล และใช้ยีสต์ในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้เอทานอล โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนหลัก คือ

1.) วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของกากตะกอนเยื่อกระดาษ
2.) หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์กับกากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาล
3.) หารูปแบบที่เหมาะสมระหว่างการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาและแบบแยกปฏิกิริยา
4.) ขยายขนาดการผลิตเอทานอลด้วยรูปแบบที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของกากตะกอนเยื่อกระดาษ

เนื่องจากวัตุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล จำเป็นต้องมีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเอทานอล และวัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้ผลิตเอทานอล ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล และวัตถุดิบประเภทแป้งซึ่งมีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาล แต่ปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลในหลายประเทศมุ่งเน้นไปที่วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งก็มีหน่วยย่อยเป็นโมเลกุลของน้ำตาลเช่นกัน อีกทั้งยังส่งผลดีเนื่องจากสามารถใช้แทนวัตถุดิบที่เป็นสินค้าอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบพวกน้ำตาลและแป้ง จึงช่วยลดปัญหาราคาสินค้าอาหารเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากความต้องการแย่งวัตถุดิบกันระหว่างอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล แต่ด้วยข้อจำกัดของการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลที่ค่อนข้างยาก ต้องใช้เวลานานและต้นทุนที่สูง จึงทำให้การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสส่วนใหญ่ยังอยู่ในขั้นตอนของการทดลองวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการหรือระดับโรงงานต้นแบบ สำหรับงานวิจัยนี้ ใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษ ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้เพื่อผลิตเอทานอล เมื่อนำวัตถุดิบมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส (อัลฟาเซลลูโลส เบต้าเซลลูโลส แกมมาเซลลูโลส) และลิกนินตามมาตรฐานการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ (Technical Association of the Pulp and Paper Industry, TAPPI) ซึ่งแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก. และแสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.1 ผลจากการวิเคราะห์พบว่ากากตะกอนเยื่อกระดาษมีปริมาณเซลลูโลสซึ่งแบ่งออกเป็น อัลฟาเซลลูโลส เบต้าเซลลูโลส และแกมมาเซลลูโลสเท่ากับร้อยละ 67.1, 4.7 และ 1.4 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยเรียกรวมเซลลูโลสทั้ง 3 ชนิดนี้ว่าเซลลูโลส ซึ่งมีค่ารวมเท่ากับร้อยละ 73.2 โดยน้ำหนักแห้ง โครงสร้างหลัก

ของเซลลูโลสทั้ง 3 ชนิดนี้ เกิดจากการเรียงตัวต่อกันของลูกโซ่น้ำตาลดี-กลูโคส ซึ่งน่าจะพอยืนยันได้ว่า กากตะกอนเยื่อกระดาษนี้จะสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ เนื่องจากมีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยที่ผ่านมา Saha และ Cotta (2008) วิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสในข้าวเปลือก พบเซลลูโลสร้อยละ 35.6 Yamashita และ คณะ (2010) วิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสในตะกอนกระดาษ พบเซลลูโลสร้อยละ 33.4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสที่ต่างชนิดกัน ก็จะมีปริมาณของเซลลูโลสที่ต่างกันไปด้วย นั่นหมายความว่าปริมาณน้ำตาลซึ่งเป็นหน่วยย่อยก็จะต่างกันด้วย ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสกำลังเป็นที่สนใจ และมีการนำวัตถุดิบหลากหลายประเภทมาศึกษาเพื่อการผลิตเอทา-นอล ซึ่งวัตถุดิบต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 4.2

นอกจากปริมาณของเซลลูโลสที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลแล้ว ลิกนินเป็นอีกสารประกอบหนึ่งซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่จะขัดขวางการผลิตเอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ เนื่องจากลิกนินจะปิดกั้นการเข้าย่อยเซลลูโลสของเอนไซม์ ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากวัตุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสส่วนใหญ่จะมีการกำจัดลิกนินออกก่อน และมักนิยมใช้การปรับสภาพทางเคมี สำหรับลิกนินที่พบในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 6 ในขณะที่ Zhu และ Pan (2010) รายงานว่าพบปริมาณลิกนินในไม้ยูคาลิปตัส (Euclyptus saligna) เท่ากับร้อยละ 26.9 Chen และ คณะ (2009) วิเคราะห์ปริมาณลิกนินในต้นข้าวโพด พบว่ามีลิกนินเท่ากับร้อยละ 19.3 แต่เมื่อนำต้นข้าวโพดไปทำการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่ามีปริมาณลิกนินคงเหลือเท่ากับร้อยละ 8.6 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณลิกนินที่พบในกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ใช้ในการทดลอง พบว่าปริมาณลิกนินในกากตะกอนเยื่อกระดาษ มีปริมาณที่ค่อนข้างน้อยทั้งๆ ที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ อาจเป็นเพราะวัตถุดิบได้ผ่านกระบวนการผลิตกระดาษมาก่อน ซึ่งในกระบวนการผลิตกระดาษนั้น มีขั้นตอนของการกำจัดลิกนิน เนื่องจากลิกนินจะส่งผลให้กระดาษมีสีคล้ำ ทำให้กระดาษมีคุณภาพต่ำ ดังนั้นจึงถือเป็นข้อดีของการนำวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจากกระบวนการผลิตกระดาษมาใช้ผลิตเอทานอล เนื่องจากสามารถช่วยลดเวลาและต้นทุนในขั้นตอนของการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อกำจัดลิกนิน

ตารางที่ 4.1 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากตะกอนเยื่อกระดาษ

ผลการทดสอบ	ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างอบแห้ง
โฮโลเซลลูโลส	73.3
อัลฟาเซลลูโลส	67.1
เบต้าเซลลูโลส	4.7
แกมมาเซลลูโลส	1.4
ลิกนิน	6.0

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอล

ผู้วิจัย	วัตถุดิบ	โฮโลเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)		ลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)	
		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ก่อนการปรับสภาพ	หลังการปรับสภาพ
Lark และคณะ (1997)	เศษกระดาษเหลือทิ้ง	50	10	-	-
Galbe และ Zacchi (2002)	ไม้เนื้ออ่อน	43-45	20-23	28	-
Sharma และ คณะ (2004)	เปลือกเมล็ดทานตะวัน	53	17.5	-	11.4
Saha และ Cotta (2008)	ข้าวเปลือก	35.6	12	-	-
Dogaris และคณะ (2009)	ชานต้นข้าวฟ่าง	40.4	35.5	-	-
Chen และ คณะ (2009)	ต้นข้าวโพด	38.7	21.7	19.3	8.6
Yamashita และคณะ (2010)	ตะกอนกระดาษ	33.4	-	-	-
Zhu และ Pan (2010)	ยูคาลิปตัส	-	-	26.9	-
งานวิจัยนี้ (2553)	กากตะกอนเยื่อกระดาษ	73.2	0.1	6	-

- หมายถึง ไม่มีข้อมูล

4.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาลกลูโคส

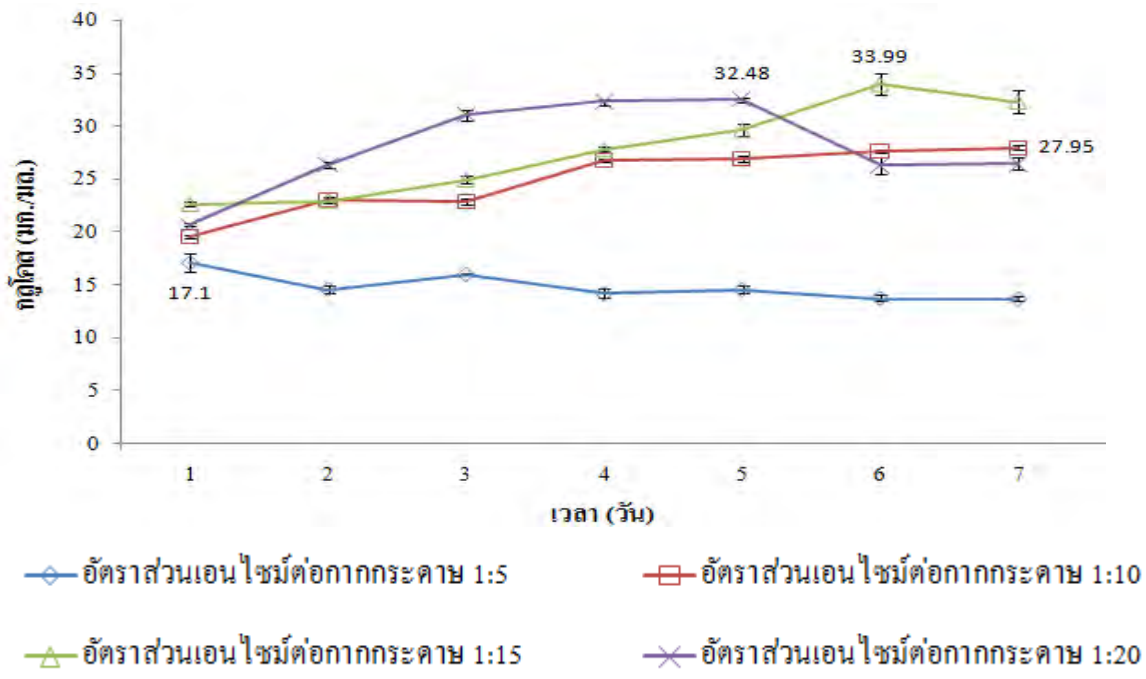
การผลิตน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสนั้นมีข้อดีกว่าการใช้กรดซึ่งเป็นกระบวนการที่เก่าแก่และเป็นที่นิยม คือสภาวะของการย่อยจะไม่รุนแรง ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของวัตถุดิบต่อเอนไซม์ ถ้าสัดส่วนของวัตถุดิบสูงเกินไป จะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่อัตราส่วนที่ต่ำไปก็จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและประสิทธิภาพลดลงตามไปด้วย ประกอบกับต้นทุนในส่วนของเอนไซม์ที่ใช้นั้นมีค่าสูง ดังนั้นการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างวัตถุดิบต่อเอนไซม์จึงถูกนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้

จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลกลูโคสโดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อวัตถุดิบเท่ากับ 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) และทำการทดลองจำนวน 3 ชุดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสพบว่าให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสดังแสดงในตารางที่ 4.3 ผลการทดลองให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสสูงสุดในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 17.1, 27.95, 33.99 และ 32.48 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ซึ่งวิธีการคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสแสดงในภาคผนวก ข. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้ในแต่ละอัตราส่วนสามารถอธิบายได้ว่า ที่อัตราส่วน 1:5 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) ให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเพียง 17.1 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในวันแรกของการทดลองและเริ่มมีค่าลดลงจนค่อนข้างคงที่เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 ในขณะที่อัตราส่วน 1:10 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง)ให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 27.95 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในวันที่ 7 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองและสังเกตได้ว่า แนวโน้มการผลิตกลูโคสเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ปริมาณกลูโคสที่ผลิตได้ของทั้งสองอัตราส่วนข้างต้น ทำให้สันนิษฐานได้ว่า เกิดสภาวะปริมาณของกากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งใช้เป็นสับสเตรท มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ส่งผลให้ปริมาณกลูโคสที่เกิดยังมีปริมาณที่น้อย และเมื่อพิจารณาที่อัตราส่วน 1:15 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) พบว่าให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสสูงสุดถึง 33.99 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่า หากเพิ่มปริมาณสับสเตรทจากสองอัตราส่วนแรก จะทำให้สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงขึ้น ในขณะที่อัตราส่วน1:20 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) ให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 32.48 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลผลิตที่มากที่สุด แต่เนื่องจากเป็นอัตราส่วนของสับสเตรทที่ค่อนข้างมากสำหรับการใช้งานจริง จึงทำให้น้ำหมักมีลักษณะหนืดและยากต่อการกวนผสม ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตเอทานอลในขั้นตอนต่อไป เพราะการกวนผสมที่ไม่สมบูรณ์จะส่งผลทำให้เชื้อยีสต์ ที่ใช้ในกระบวนการหมักไม่สามารถใช้อาหารหรือเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้อย่างสมบูรณ์ และเนื่องจากกากตะกอนเยื่อกระดาษถือเป็นต้นทุนของการผลิต ดังนั้นการเลือกอัตราส่วนที่ใช้ปริมาณ

ของกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ต่ำแต่ให้ปริมาณการผลิตที่สูงจึงถือเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่ง จากผลการทดลองจึงสามารถกล่าวได้ว่าที่อัตราส่วน 1:15 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) ซึ่งให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสมากที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ผลิตน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลในขั้นตอนต่อไป จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Tomas-Pejo และ คณะ (2009) ซึ่งทำการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสและปริมาณเซลล์ยีสต์เพื่อการผลิตเอทา-นอล ทดลองเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่ปริมาณการเติมคงที่ (enzyme loading) เท่ากับ 15 (FPU/g substrate) และแปรผันปริมาณสับสเตรทเท่ากับ 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15 (%w/v) พบว่าปริมาณสับสเตรทที่มากขึ้นจะทำให้สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้มากขึ้นตามไปด้วย โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 2.8,4.7, 8.0,12.4 และ 15.3 (กรัม/ลิตร) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลงานวิจัยในสามอัตราส่วนแรก ซึ่งการเพิ่มปริมาณสับสเตรททำให้ปริมาณการผลิตน้ำตาลกลูโคสนั้นเพิ่มสูงขึ้น จนกระทั่งถึงอัตราส่วนที่สามซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณที่มากเกินไปของสับสเตรททำให้เกิดการกวนผสมที่ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ Tomas-Pejo และ คณะ (2009) ยังทำการทดลองโดยใช้ปริมาณสับสเตรทคงที่เท่ากับ 10 (%w/v) และแปรผันปริมาณการเติมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 5, 15, 25 และ 35 (FPU/g substrate) และพบว่าปริมาณการเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มากขึ้น จะทำให้สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้มากขึ้นตามไปด้วย โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ เท่ากับ 2.4 6.8 11.5 12.9 (กรัม/ลิตร) ตามลำดับ การศึกษาถึงปริมาณที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท ทำให้สามารถใช้เอนไซม์ได้ในปริมาณที่เหมาะสม คือ ไม่ใช้เอนไซม์เกินความต้องการของปฏิกิริยา ซึ่งถือเป็นการสิ้นเปลือง หรือใช้เอนไซม์ในปริมาณที่น้อยเกินไป ซึ่งจะส่งผลทำให้การย่อยวัตถุดิบให้ได้น้ำตาลเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์และทำให้ได้น้ำตาลซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการผลิตเอทานอลในปริมาณน้อย การลดการใช้เอนไซม์ในปริมาณที่เกินความต้องการของปฏิกิริยา จะสามารถช่วยแก้ปัญหาราคาของเอนไซม์ที่แพงและกำลังเป็นปัญหาของการผลิตเอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพในปัจจุบัน

ตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษต่างๆ

วันที่	ปริมาณกลูโคสที่อัตราส่วนต่างๆ (มก./มล.)			
	1:5 (มล./ก.)	1:10 (มล./ก.)	1:15 (มล./ก.)	1:20 (มล./ก.)
1	17.10	19.57	22.66	20.66
2	14.61	23.02	23.01	26.35
3	16.02	22.91	24.92	31.09
4	14.20	26.78	27.82	32.27
5	14.58	26.92	29.65	32.48
6	13.76	27.65	33.99	26.26
7	13.70	27.95	32.33	26.45



รูปที่ 4.1 กราฟเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษต่างๆ

4.3 ผลการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล (ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร)

ทำการเปรียบเทียบกระบวนการผลิตเอทานอลจาก 2 รูปแบบ คือ การผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาและการผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยา โดยการทดลองผลิตเอทานอลทั้ง 2 รูปแบบจะใช้อัตราส่วน 1:15 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) และใช้กระบวนการแบบแบตช์ ซึ่งมีข้อดีสำหรับการนำไปพัฒนาต่อในระดับอุตสาหกรรม คือมีค่าติดตั้งอุปกรณ์ที่ราคาถูกกว่ากระบวนการแบบต่อเนื่อง อีกทั้งยังมีโอกาสที่การหมักจะเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการต่ำกว่าแบบต่อเนื่อง

4.3.1 การผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาในงานวิจัยนี้ เป็นการผลิตเอทานอลโดยย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลและหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลพร้อมกันในขั้นตอนเดียว (Simultaneous saccharification and fermentation; SSF) จากผลการทดลองผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาโดยทำการทดลองเป็นจำนวน 2 ชุดการทดลอง พบว่าผลการทดลองของทั้ง 2 ชุด มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ การผลิตเอทานอลส่วนใหญ่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยให้ผลผลิตเอทานอลในชุดการทดลองที่ 1 เท่ากับ 5.13, 3.55, 6.63 และ 7.02 (กรัม/ลิตร) และในชุดการทดลองที่ 2 เท่ากับ 4.73, 5.52, 6.94 และ 7.26 (กรัม/ลิตร) ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ของการหมักตามลำดับ การทดลองให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 7.26 (กรัม/ลิตร) ในวันสุดท้ายของการทดลองในชุดที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองทั้งหมด 7 วัน พบว่าให้ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิสูงสุดในชุดการทดลองที่ 2 เท่ากับ 0.69 ($กรัม_{เอทานอล}$/$กรัม_{น้ำตาล}$) ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของศิริพงษ์ เปรมจิต และคณะ (2550) ซึ่งทดลองผลิตเอทานอลจากปอสาด้วยกระบวนการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* QM 9414 และใช้ยีสต์ *Candida krusei* NBRC 1664 ในกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณการผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาทำการหมักเช่นกัน โดยให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 6.47, 7.57, 10.73 และ 10.89 (กรัม/ลิตร) ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ปริมาณการผลิตเอทานอลและน้ำตาลจากกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยา

วัน	ปริมาณเอทานอล				น้ำตาล (มก./มล.)	
	(%v/v)		(กรัม/ลิตร)		เริ่มต้น 15 (มก./มล.)	
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
1	0.65	0.60	5.13	4.73	3.77	4.15
3	0.45	0.70	3.55	5.52	4.40	4.90
5	0.84	0.88	6.63	6.94	3.90	4.15
7	0.89	0.92	7.02	7.26	1.13	4.52

ผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิ (Ethanol Yield) ของชุดการทดลองที่ 1

$$\text{ผลได้ผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{เอทานอลวันที่ X - เอทานอลวันที่ 0}}{|\text{น้ำตาลวันที่ X - น้ำตาลวันที่ 0}|}$$

$$= (7.02-0) / |1.13-15|$$

$$= 0.51 \ (\text{กรัม}_{\text{เอทานอล}}/\text{กรัม}_{\text{น้ำตาล}})$$

ผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิ (Ethanol Yield) ของชุดการทดลองที่ 2

$$\text{ผลได้ผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{เอทานอลวันที่ X - เอทานอลวันที่ 0}}{|\text{น้ำตาลวันที่ X - น้ำตาลวันที่ 0}|}$$

$$= (7.26-0) / |4.52-15|$$

$$= 0.69 \ (\text{กรัม}_{\text{เอทานอล}}/\text{กรัม}_{\text{น้ำตาล}})$$

4.3.2 การผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยาในงานวิจัยนี้ เป็นการผลิตเอทานอลที่แยกขั้นตอนของการย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลออกจากการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (Separate hydrolysis and fermentation; SHF) จากผลการทดลองผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยาโดยทำการทดลองเป็นจำนวน 2 ชุดการทดลอง พบว่าผลการทดลองของทั้ง 2 ชุด มีแนวโน้มเดียวกัน คือ ให้ผลผลิตเอทานอลมีปริมาณน้อยและค่อนข้างคงที่ โดยให้ผลผลิตเอทานอลในชุดการทดลองที่ 1 เท่ากับ ND, 0.47, 0.16 และ 0.00 (กรัม/ลิตร) และในชุดการทดลองที่ 2 เท่ากับ 0.16 0.08 0.24 และ 0.16 (กรัม/ลิตร) ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ของการหมักตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทั้งหมด 7 วัน พบว่าให้ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิสูงสุดในชุดการทดลองที่ 2 เท่ากับ 0.02 (กรัม$_{เอทานอล}$/กรัม$_{น้ำตาล}$)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณการผลิตเอทานอลและน้ำตาลจากกระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยา

วัน	ปริมาณเอทานอล				น้ำตาล (มก./มล.)	
	(%v/v)		(กรัม/ลิตร)		เริ่มต้น 15 (มก./มล.)	
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
1	ND	0.02	ND	0.16	6.97	11.69
3	0.06	0.01	0.47	0.08	2.90	8.41
5	0.02	0.03	0.16	0.24	5.32	6.97
7	0.00	0.02	0.00	0.16	5.84	7.50

ND, not detected.

ผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิ (Ethanol Yield) ของชุดการทดลองที่ 1

$$\text{ผลได้ผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{เอทานอลวันที่ X - เอทานอลวันที่ 0}}{|\text{น้ำตาลวันที่ X - น้ำตาลวันที่ 0}|}$$

$$= 0.00 \text{ (กรัม}_{\text{เอทานอล}}\text{/กรัม}_{\text{น้ำตาล}}\text{)}$$

ผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิ (Ethanol Yield) ของชุดการทดลองที่ 2

$$\text{ผลได้ผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{เอทานอลวันที่ X - เอทานอลวันที่ 0}}{|\text{น้ำตาลวันที่ X - น้ำตาลวันที่ 0}|}$$

$$= (0.16\text{-}0) / |7.50\text{-}15|$$

$$= 0.02 \text{ (กรัม}_{\text{เอทานอล}}\text{/กรัม}_{\text{น้ำตาล}}\text{)}$$

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลจากกระบวนการทั้ง 2 รูปแบบ สามารถกล่าวได้ว่า การผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยามีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษมากกว่าการผลิตแบบแยกปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.2 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brethauer และ Wyman

(2010) ซึ่งกล่าวสรุปไว้ว่า การผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาเป็นกระบวนการที่สามารถเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสไปเป็นเอทานอลและสามารถลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยน้ำตาลได้ เนื่องจากการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยานั้น ยีสต์จะค่อยๆ ใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นทันทีเพื่อกระบวนการหมักเอทานอล ดังนั้นการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาจึงน่าจะช่วยลดปัญหาของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยความเข้มข้นน้ำตาลได้ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าให้ค่าน้ำตาลสูงสุดถึง 33.99 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่วราวุฒิ ครูส่ง (2529) กล่าวว่าความเข้มข้นของน้ำตาลเป็นปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก และความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินขีดจำกัดคือประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย จะทำให้เกิดการรบกวนการเจริญเติบโตของยีสต์ ทำให้เติบโตได้ยาก การหมักจะเกิดขึ้นช้าและไม่สมบูรณ์ ผลจากการเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตเอทานอลแบบรวมและแบบแยกปฏิกิริยาให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Saha และ Cotta (2008) ซึ่งศึกษาการผลิตเอทานอลจากข้าวเปลือก โดยใช้เอนไซม์ในการย่อยเซลลูโลสและใช้เชื้อ *E. coli* ในการหมักเอทานอล พบว่าการหมักแบบรวมปฏิกิริยาให้ผลผลิตมากกว่าการหมักแบบแยกปฏิกิริยาเช่นกัน โดยให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 11(กรัม/ลิตร) โดยใช้ระยะเวลาการหมักทั้งสิ้น 53 ชั่วโมง ต่างจากงานวิจัยของ Marques และ คณะ (2008) ซึ่งศึกษาการผลิตเอทานอลจากกระดาษเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและยีสต์ *Pichia stipitis* และทำการเปรียบเทียบกระบวนการผลิตแบบรวมปฏิกิริยา (SSF) และแยกปฏิกิริยา (SHF) พบว่าปริมาณการผลิตแบบแยกปฏิกิริยาให้ผลผลิตเอทานอลมากกว่าแบบรวมปฏิกิริยา โดยแบบแยกปฏิกิริยาให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 19.6 (กรัม/ลิตร) โดยใช้เวลา 179 ชั่วโมง ในขณะที่การผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 18.6 (กรัม/ลิตร) โดยใช้เวลา 48 ชั่วโมง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยานั้น ถึงแม้จะทำให้ได้ปริมาณการผลิตเอทานอลที่สูงกว่าแบบรวมปฏิกิริยา แต่ก็เป็นปริมาณที่มากกว่าแค่เพียงเล็กน้อย แต่กลับต้องใช้เวลาในกระบวนการผลิตนานกว่ามาก การผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส มีผู้ทำการวิจัยโดยเลือกใช้วัตถุดิบและรูปแบบกระบวนการหมักที่แตกต่างกันออกไป สรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยาและแยกปฏิกิริยา

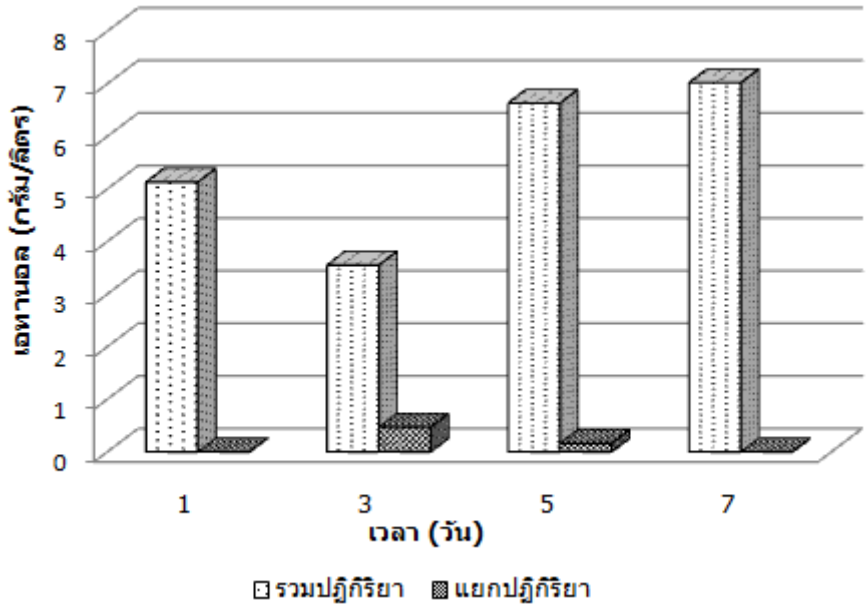
วัน	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)			
	ชุดการทดลองที่ 1		ชุดการทดลองที่ 2	
	รวมปฏิกิริยา	แยกปฏิกิริยา	รวมปฏิกิริยา	แยกปฏิกิริยา
1	5.13	ND	4.73	0.16
3	3.55	0.47	5.52	0.08
5	6.63	0.16	6.94	0.24
7	7.02	0.00	7.26	0.16

ND, not detected.

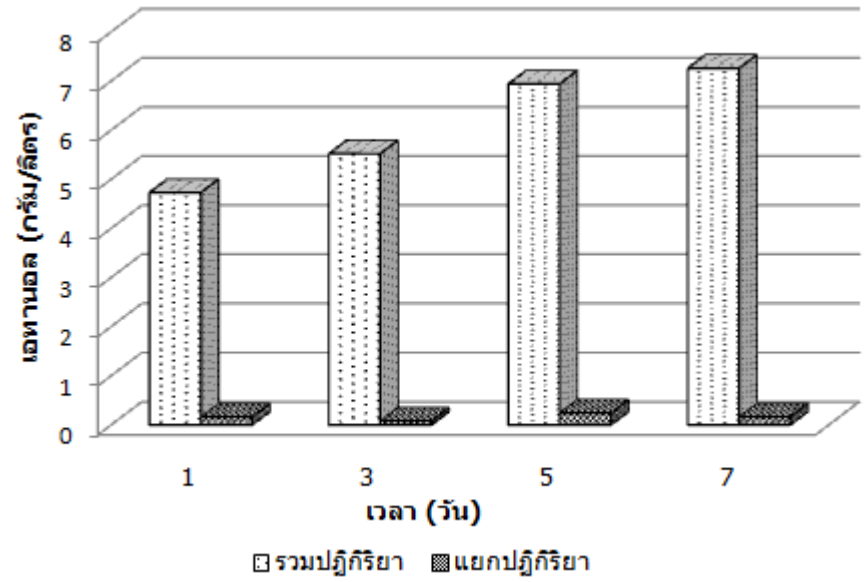
ตารางที่ 4.7 งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส

ผู้วิจัย	วัตถุดิบ	การผลิตเอทานอล	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้	
			(กรัม/ลิตร)	(กรัม/กรัม)
Sharma และ คณะ (2004)	เปลือกเมล็ดทานตะวัน	Cellulase และ *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (SHF)	-	0.423
Saha และ Cotta (2008)	ข้าวเปลือก	Cellulase และ *E. coli* (SSF, SHF)	11, 9.8	-
Dogaris และ คณะ (2009)	ชานต้นข้าวฟ่าง	*Neurospora crassa* (SSF)	-	4.7
Jeihanipour และ Taherzadeh (2009)	ผ้าฝ้ายจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ	Cellulase และ *S. cerevisiae* (SSF)	-	0.48
ศิริพงษ์ เปรมจิต และ คณะ (2550)	ปอสา	Cellulase และ *Candida krusei* (SSF)	10.89	-
งานวิจัยนี้ (2553)	กากตะกอนเยื่อกระดาษ	Cellulase และ *S. cerevisiae* (SSF)	7.26	0.69

- หมายถึง ไม่มี



(ก) ชุดการทดลองที่ 1



(ข) ชุดการทดลองที่ 2

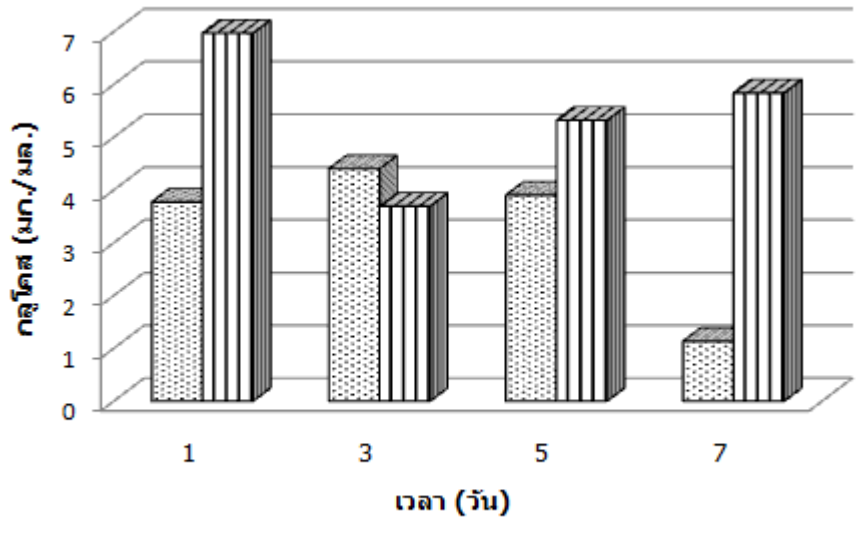
รูปที่ 4.2 ปริมาณการผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบรวมและแยกปฏิกิริยา

(ก) ชุดการทดลองที่ 1 (ข) ชุดการทดลองที่ 2

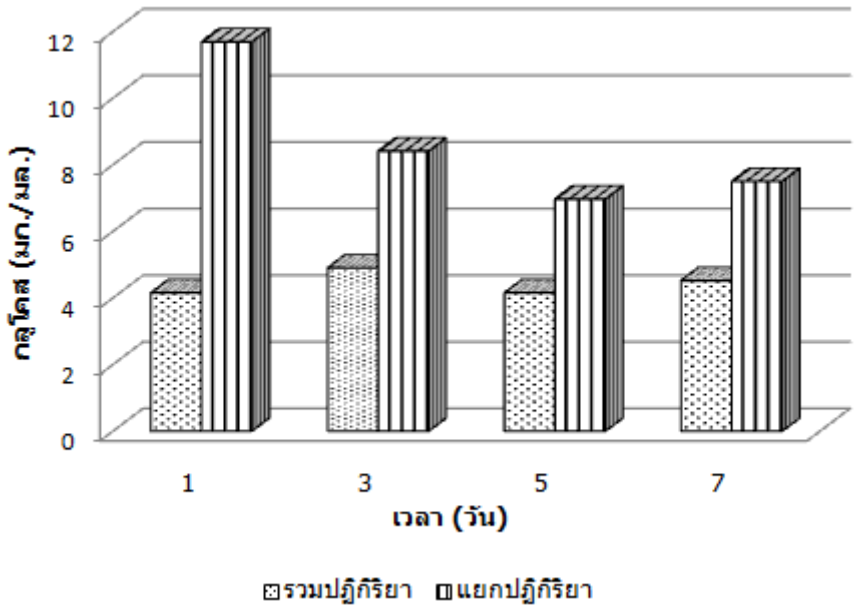
เมื่อพิจารณาที่ค่าน้ำตาลกลูโคสของการผลิตเอทานอลแบบรวมและแยกปฏิกิริยาเปรียบเทียบกัน พบว่าทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเดียวกันคือ น้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่ของกระบวนการผลิตแบบแยกปฏิกิริยามีคงเหลือในระบบมากกว่ากระบวนการผลิตแบบรวมปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้น้อยกว่าหรืออีกทางหนึ่งคือ น้ำตาลที่ถูกใช้ไปไม่ได้ถูกนำไปผลิตเอทา-นอล แต่ถูกเปลี่ยนไปเป็นสารชนิดอื่น จึงทำให้ผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการผลิตแบบแยกปฏิกิริยานั้นมีปริมาณที่น้อย เนื่องจากกระบวนการผลิตแบบแยกปฏิกิริยา ควบคุมการปนเปื้อนได้ยากและอาจเกิดการปนเปื้อนในขั้นตอนของการเติมเซลล์ยีสต์ภายหลัง ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวระบบการหมักจะอยู่ในสภาวะเปิดชั่วคราว ซึ่งเอื้อให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อที่ไม่พึงประสงค์ โดยเฉพาะแบคทีเรียสร้างกรดแลคติคซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในน้ำหมักที่มีค่าพีเอชค่อนข้างต่ำ ต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งจะเจริญได้ดีในสภาวะที่มีค่าพีเอชเป็นกลาง เมื่อเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียสร้างกรดแลคติคแล้วจะทำให้น้ำหมักมีลักษณะเป็นกรดและรบกวนการเจริญของยีสต์และบางครั้งอาจทำให้เซลล์ยีสต์แตก ส่งผลต่อกระบวนการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 4.8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการหมักแบบรวมและแยกปฏิกิริยา

วัน	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	ชุดการทดลองที่ 1		ชุดการทดลองที่ 2	
	รวมปฏิกิริยา	แยกปฏิกิริยา	รวมปฏิกิริยา	แยกปฏิกิริยา
1	3.77	6.97	4.15	11.69
3	4.40	3.69	4.90	8.41
5	3.90	5.32	4.15	6.97
7	1.13	5.84	4.52	7.50



(ก) ชุดการทดลองที่ 1



(ข) ชุดการทดลองที่ 2

รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกระบวนการหมักแบบรวมและแยกปฏิกิริยา

(ก) ชุดการทดลองที่ 1 (ข) ชุดการทดลองที่ 2

ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากกระบวนการผลิตแบบแยกปฏิกิริยาด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี ให้ผลสอดคล้องกับการคาดการณ์ที่ว่า ระบบน่าจะเกิดการปนเปื้อนเนื่องจากเกิดพีคอื่นหลังพีคของเอทานอลดังแสดงในภาคผนวก ง. ซึ่งสำหรับคอลัมน์ที่ใช้ในงานวิเคราะห์นี้พีคที่มักเกิดตามหลังพีคของเอทานอลจะเป็นกลุ่มของแอลกอฮอล์ที่มีเลขโมเลกุลมากกว่าเอทานอล ซึ่งได้แก่ โพรพานอลและบิวทานอล ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นพวกโพรไพโอนิค แอซิด (propionic acid) หรือบิวทิวริค แอซิด (butyric acid) ซึ่งกรดทั้งสองชนิดนี้เมื่อเกิดขึ้นจะทำให้น้ำหมักมีค่าพีเอชที่ต่ำลง และจะรบกวนการเจริญของยีสต์รวมถึงส่งผลต่อกระบวนการผลิตเอทานอลด้วย

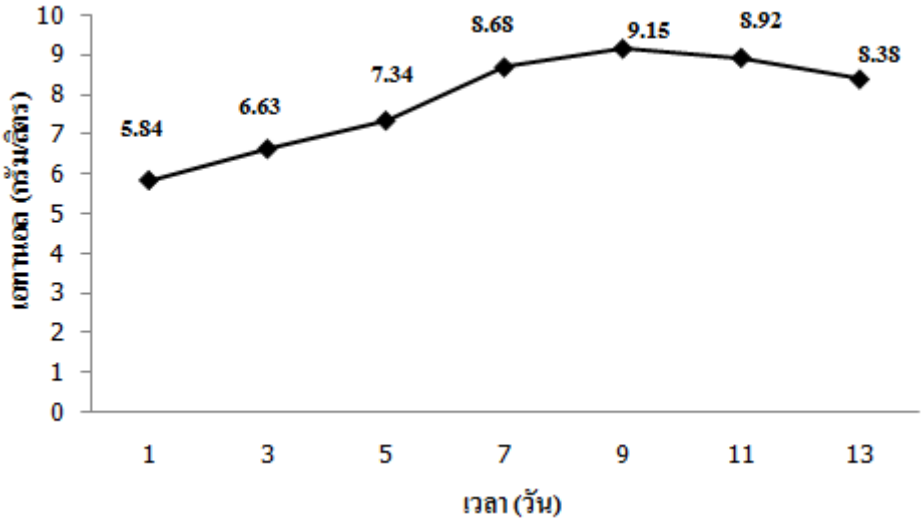
4.4 ผลการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษด้วยวิธีแบบแบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลการทดลองจากข้างต้นทำให้ทราบทั้งอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลและรูปแบบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการทดลองผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร และใช้ปริมาตรการทำงาน (working volume) เท่ากับ 3.5 ลิตร การศึกษาการผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้อัตราส่วนเอนไซม์ต่อกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้งเท่ากับ 1:15 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) และกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยาโดยใช้ถังหมักแบบกวน (stirred tank reactor)และกำหนดความเร็วรอบการกวนของใบพัดเท่ากับ 50 รอบ/นาที โดยไม่มีอุปกรณ์การให้อากาศ และทำการทดลองเป็นระยะเวลา 13 วัน ซึ่งสืบเนื่องมาจากการทดลองผลิตเอทานอลภายในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ผลการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก เมื่อทำการขยายขนาดการทดลอง จึงมีการเพิ่มระยะเวลาการหมัก เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับปริมาณการผลิตเอทานอลสูงสุดที่กระบวนการจะสามารถผลิตได้ จากระยะเวลาการทดลองทั้งหมด 13 วัน พบว่าในวันที่ 9 ของการทดลอง เป็นวันที่ให้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุดเท่ากับ 9.15 (กรัม/ลิตร) และหลังจากวันที่ 9 ของการทดลองพบว่าการผลิตเอทานอลลดลงเล็กน้อยในวันที่ 11 และ 13 ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากน้ำตาลซึ่งเป็นอาหารของยีสต์มีปริมาณที่ลดลงจนเกือบหมด ทำให้ยีสต์เริ่มตายและมีปริมาณลดลงเพราะขาดอาหาร ส่งผลให้การผลิตเอทานอลลดน้อยลงตามไปด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.4 เมื่อสิ้นสุดการทดลองทั้งหมด 13 วัน พบว่าให้ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิเท่ากับ 0.71 ($กรัม_{เอทานอล}$/$กรัม_{น้ำตาล}$) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าพีเอชของระบบมีแนวโน้มลดลงอยู่ในช่วง 5.9-3.5 ซึ่งค่าพีเอชถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อกระบวนการหมัก ทั้งนี้ยีสต์จะเจริญได้ดีในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด คืออยู่ในช่วง 3.8-5.6 ถ้าค่าพีเอชต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง และถ้าค่าพีเอชมีค่าต่ำกว่า 3 จะทำให้ยีสต์หยุดการเจริญ ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้มีพีเอชอยู่ในช่วง 4-4.5 (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) จากผลการทดลองถือว่าค่าพีเอชที่วัดได้จากถังหมักขณะเกิด

กระบวนการหมัก ยังอยู่ในช่วงที่ยีสต์ยังสามารถเจริญได้ แต่อาจมีค่าลดลงจนไม่อยู่ในช่วงที่เหมาะต่อกระบวนการหมัก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า อาจมีการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติคปนเปื้อน เนื่องจากแบคทีเรียชนิดดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีในช่วงที่มีค่าพีเอชเป็นกรดเช่นเดียวกับยีสต์ ขณะที่อุณหภูมิของระบบหมักที่อยู่ในช่วง 31-32 องศาเซลเซียส ซึ่งยังถือว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่ใช้กันตามโรงงานอุตสาหกรรมทั่วไป คือ 30-35 องศาเซลเซียส สำหรับผลการผลิตเอทานอลนั้น เมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา ศิริพงษ์ เปรมจิต และ คณะ (2550) ทำการผลิตเอทานอลจากปอสาโดยทำการหมักแบบรวมปฏิกิริยาพบว่าให้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุดในวันสุดท้ายหรือวันที่ 7 ของการทดลอง เท่ากับ 10.89 (กรัม/ลิตร) ในขณะที่วันที่ 7 ของการทดลองใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษในการผลิตนั้นให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 8.68 (กรัม/ลิตร) แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการผลิตเอทานอลของแต่ละงานวิจัย ต่างก็ใช้วัตถุดิบ เอนไซม์เซลลูเลสและยีสต์ที่ต่างกันในการศึกษา นอกจากนี้แล้วการกวนผสมภายในถังหมักที่ต่างกับการกวนผสมโดยใช้เครื่องเขย่า ก็น่าจะส่งผลต่อการผลิตเอทานอล ด้วย Qureshia และ คณะ (2008) ศึกษาการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE) จากฟางข้าวสาลีด้วยวิธีการหมักแบบรวมปฏิกิริยา (Simultaneous saccharification and fermentation) ได้เปรียบเทียบการผลิตทั้งรูปแบบที่มีและไม่มีการกวนผสม พบว่าการผลิตที่มีการกวนผสมร่วมด้วยจะทำให้ได้ปริมาณการผลิตเอทานอลที่มากกว่า

ตารางที่ 4.9 การผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วัน	ปริมาณเอทานอล		น้ำตาล	พีเอช	อุณหภูมิ
	(% v/v)	(กรัม/ลิตร)	เริ่มต้น 17.32 (มก./มล.)		(°ซ)
1	0.74	5.84	6.14	5.9	31
3	0.84	6.63	8.87	4.3	31
5	0.93	7.34	8.14	4.1	31
7	1.10	8.68	6.96	3.7	31
9	1.16	9.15	9.31	3.9	32
11	1.13	8.92	5.35	4.1	32
13	1.06	8.36	5.59	3.5	32



รูปที่ 4.4 การผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิ (Ethanol Yield)

$$\text{ผลได้ผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{เอทานอลวันที่ X - เอทานอลวันที่ 0}}{|\text{น้ำตาลวันที่ X - น้ำตาลวันที่ 0}|}$$

$$= (8.36-0) / |5.59-17.32|$$

$$= 0.71 \text{ (กรัม}_{\text{เอทานอล}}/\text{กรัม}_{\text{น้ำตาล}})$$

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงการขยายขนาดการทดลองจากขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร มาเป็นถังหมักขนาด 5 ลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าการผลิตภายในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกันระหว่างปริมาณการผลิตเอทานอลภายในขวดทดลอง (ชุดที่ให้ค่าการผลิตมากที่สุด) เทียบกับการผลิตภายในถังหมัก ในช่วง 7 วันของการทดลอง พบว่าการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเดียวกันคือ เกิดเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.10 แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังไม่อาจสามารถกล่าวได้ว่า การผลิตภายในถังหมักซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าจะให้ปริมาณการผลิตเอทานอลที่มากกว่า เนื่องจากภายในระยะเวลา 7 วันของการทดลองภายในขวดทดลองนั้น ปริมาณการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าหากเพิ่มระยะเวลาการหมักภายในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร อาจให้ผลการผลิตที่มากกว่าในถังหมักก็เป็นได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sharma และ คณะ (2004) ซึ่งทดลองผลิต

เอทานอลจากเปลือกเมล็ดทานตะวัน และพบว่าการผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 1 และ 15 ลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้มีค่าใกล้เคียงกัน และในถังหมักที่มีขนาดเล็กสามารถผลิตเอทา-นอลได้มากกว่าถังหมักขนาดใหญ่ โดยให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.449 และ 0.446 (กรัม/กรัม) ตามลำดับ การผลิตเอทานอลภายในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร และถังหมักขนาด 5 ลิตร ของงานวิจัยนี้ มีการกวนผสมที่ต่างรูปแบบกันคือการทดลองในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้การกวนผสมด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ120 รอบ/นาที ในขณะที่การกวนผสมภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้การกวนผสมด้วยใบพัดกวนและใช้ความเร็วรอบเท่ากับ 50 รอบ/นาที ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลการผลิตเอทานอลของทั้งสองขนาดการทดลองมีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.10 ปริมาณการผลิตเอทานอลภายในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร และถังหมักขนาด 5 ลิตร

วัน	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	
	ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร	ถังหมักขนาด 5 ลิตร
1	4.73	5.84
3	5.52	6.63
5	6.94	7.34
7	7.26	8.68
9	-	9.15
11	-	8.92
13	-	8.36

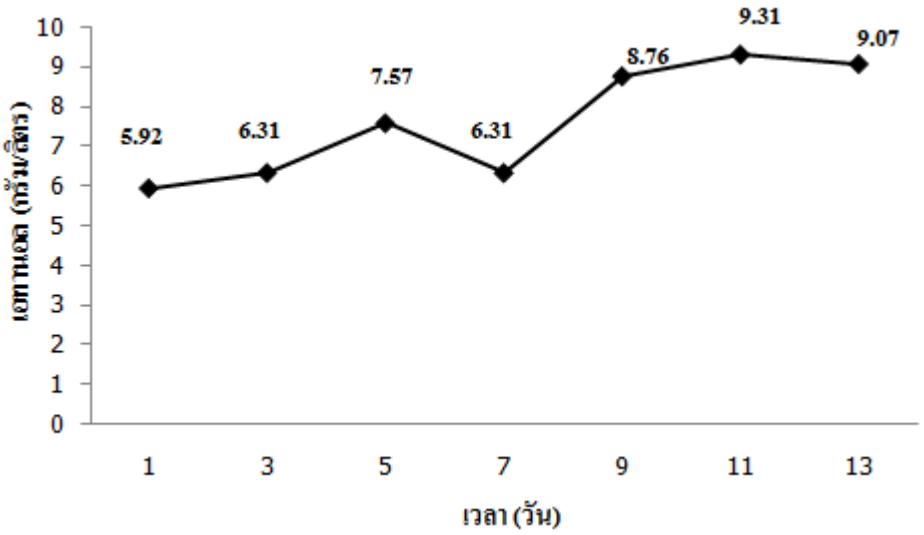
- หมายถึง ไม่มีข้อมูล

4.5 ผลการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2%โซเดียมไฮดร-อกไซด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลการทดลองจากข้างต้นทำให้ทราบทั้งอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลกลูโคสและรูปแบบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการทดลองผลิตเอทานอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร และใช้ปริมาตรการทำงาน (working volume) เท่ากับ 3.5 ลิตร การศึกษาการผลิตเอทา-นอลภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในขั้นตอนนี้จะใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นวัตถุดิบ ใช้อัตราส่วนเอนไซม์ต่อกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้งเท่ากับ 1:15 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) และกระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยาโดยใช้ถังหมักแบบกวน (stirred tank reactor) ความเร็วรอบการกวนของใบพัดเท่ากับ 50 รอบ/นาที โดยไม่มีอุปกรณ์การให้อากาศ และทำการทดลองเป็นระยะเวลา 13 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก จากระยะเวลาทดลองทั้งหมด 13 วัน ในวันที่ 11 ของการทดลอง เป็นวันที่ให้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุดคือ 9.31 (กรัม/ลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.5 เมื่อสิ้นสุดการทดลองทั้งหมด 13 วัน พบว่ากระบวนการผลิตให้ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิเท่ากับ 0.64 ($กรัม_{เอทานอล}/กรัม_{น้ำตาล}$)

ตารางที่ 4.11 ผลการผลิตเอทานอลและน้ำตาลจากกากตะกอนกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วัน	ปริมาณเอทานอล		น้ำตาล	พีเอช	อุณหภูมิ
	(% v/v)	(กรัม/ลิตร)	เริ่มต้น 17.32 (มก./มล.)		(°ซ)
1	0.75	5.92	2.40	5.7	30
3	0.80	6.31	3.91	4.2	33
5	0.96	7.57	2.35	4.2	32
7	0.80	6.31	1.90	4.0	32
9	1.11	8.76	2.36	3.9	32
11	1.18	9.31	2.90	3.9	32
13	1.15	9.07	3.24	3.7	32



รูปที่ 4.5 ผลการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลได้ผลิตภัณฑ์สุทธิ (Ethanol Yield)

$$\text{ผลได้ผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{เอทานอลวันที่ X - เอทานอลวันที่ 0}}{|\text{น้ำตาลวันที่ X - น้ำตาลวันที่ 0}|}$$

$$= (9.07\text{-}0) / |3.24\text{-}17.32|$$

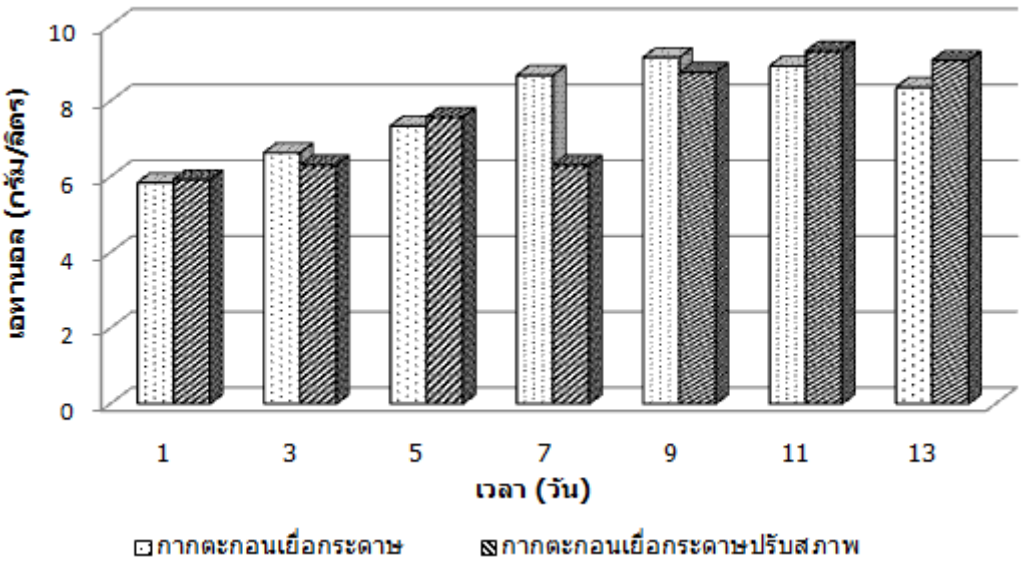
$$= 0.64\ (\text{กรัม}_{\text{เอทานอล}}/\text{กรัม}_{\text{น้ำตาล}})$$

นอกจากนี้ภายในระยะเวลาการทดลองทั้งหมด 13 วัน พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มลดลงอยู่ในช่วง 5.7-3.7 ขณะที่อุณหภูมิของระบบหมักที่อยู่ในช่วง 30-32 องศาเซลเซียส ซึ่งยังถือว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่ใช้กันตามโรงงานอุตสาหกรรมทั่วไป ผลการทดลองในส่วนของการผลิตเอทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพแสดงผลการเปรียบเทียบได้ดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.6 ซึ่งจากกระบวนการดั้งเดิมหรือจากงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่พบว่าการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการนำมาผลิตเอทานอลนั้นจะช่วยให้ได้ผลผลิตเอทานอลในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นโดย Yamashita และ คณะ (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากตะกอนกระดาษที่ทำการปรับสภาพด้วยวิธีทางกลและใช้สารเคมี พบว่าการปรับสภาพทางกลด้วยการบดและปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริคนั้นส่งผลต่อการผลิตเอทานอล โดยได้เปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลระหว่างตะกอนกระดาษที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพและตะกอนกระดาษที่ทำการปรับสภาพ พบว่าได้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 20.4 (กรัม/ลิตร) และ 30.5 (กรัม/ลิตร) ตามลำดับ ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ซึ่ง

หลังจากทำการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์แล้ว พบว่าการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตเอทานอลได้ โดยให้ปริมาณการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ปรับสภาพสูงกว่ากากตะกอนเยื่อกระดาษที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพเท่ากับ 9.15 (กรัม/ลิตร) และ 9.31 (กรัม/ลิตร) ตามลำดับ สำหรับผลการวิจัยนี้พบว่าการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถทำให้ผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ทำการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษ โดยหวังผลให้เข้าไปกำจัดลิกนินออกเพื่อให้เอนไซม์เข้าย่อยเซลลูโลสได้ดีขึ้น อาจส่งผลทำให้ปริมาณเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งมีน้ำตาลเป็นหน่วยย่อยมีปริมาณลดน้อยลง เป็นผลให้ปริมาณการผลิตเอทานอลลดน้อยลงด้วย ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Chen และ คณะ (2009) ที่ศึกษาการปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยวิธีทางเคมี และพบว่า 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ สามารถกำจัดลิกนินในต้นข้าวโพดได้มากถึงร้อยละ 73.9 แต่ในขณะเดียวกันก็จะกำจัดเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสออกจากต้นข้าวโพดด้วยเท่ากับร้อยละ 2.8 และ 33.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.12 ปริมาณการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์

วัน	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	
	กากตะกอนเยื่อกระดาษ	กากตะกอนเยื่อกระดาษปรับสภาพ
1	5.84	5.92
3	6.63	6.31
5	7.34	7.57
7	8.68	6.31
9	9.15	8.76
11	8.92	9.31
13	8.36	9.07



รูปที่ 4.6 การผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งเป็นของเสียเหลือทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเชื้อยีสต์ในกระบวนการผลิตเอทานอล ผลจากการทดลองสามารถสรุปถึง ความเป็นไปได้ในการนำกากตะกอนเยื่อกระดาษ เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษ รูปแบบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล ผลของการขยายขนาดการทดลอง และการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิต ได้ดังนี้

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. กากตะกอนเยื่อกระดาษมีองค์ประกอบทางเคมีของเซลลูโลสประกอบด้วยอัลฟาเซลลูโลส เบต้าเซลลูโลส และแกมมาเซลลูโลสเท่ากับร้อยละ 67.1, 4.7 และ 1.4 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ ทำให้กากตะกอนเยื่อกระดาษมีลักษณะสมบัติของการเป็นวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสที่จะนำมาผลิตเอทานอลได้ และพบปริมาณลิกนินแค่เพียงร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก จึงถือเป็นข้อดีของการนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสที่ค่อนข้างสูงและมีปริมาณของลิกนินที่ต่ำ นำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอล

2. อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษที่เหมาะสมเพื่อการผลิตน้ำตาลในงานวิจัยนี้เท่ากับ 1:15 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) โดยให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 33.99 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่อัตราส่วน 1:5, 1:10 และ 1:20 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดเพียง 17.1, 27.95 และ 32.48 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ โดยปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่ได้จากอัตราส่วน 1:15 (มิลลิลิตรเอนไซม์/กรัมกากตะกอนเยื่อกระดาษแห้ง) นี้ หากยีสต์สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้อย่างสมบูรณ์แล้ว ปริมาณสารตั้งต้นหรือปริมาณน้ำตาลที่มีปริมาณมาก ก็ควรจะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

3. การผลิตเอทานอลแบบรวมและแยกปฏิกิริยา ภายในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยา ให้ผลผลิตมากกว่าการผลิตแบบแยกปฏิกิริยาอย่างเห็นได้ชัด โดยให้ปริมาณการผลิตเอทานอลสูงสุดคือ 7.26 (กรัม/ลิตร) ในวันที่ 7 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง และมีแนวโน้มการผลิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ในขณะที่การผลิตเอทานอล

แบบแยกปฏิกิริยามีแนวโน้มการผลิตที่คงที่ และให้ปริมาณการผลิตเอทานอลสูงสุดแค่เพียง 0.47 (กรัม/ลิตร)

4. เมื่อนำอัตราส่วนและรูปแบบการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยามาใช้เพื่อการผลิตเอ-ทานอลในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร พบว่าให้ค่าการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 9.15 (กรัม/ลิตร) ในวันที่ 9 ของการทดลองทั้งหมด 13 วัน และพบว่ามีค่าพีเอชของระบบระหว่างเกิดกระบวนการหมักอยู่ในช่วง 3.5-5.9 และมีค่าอุณหภูมิของระบบอยู่ในช่วง 31-32 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก

5. เมื่อนำกากตะกอนเยื่อกระดาษมาทำการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าให้ค่าการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 9.31 (กรัม/ลิตร) ในวันที่ 11 ของการทดลองทั้งหมด 13 วัน และพบว่ามีค่าพีเอชของระบบระหว่างเกิดกระบวนการหมักอยู่ในช่วง 3.7-5.7 มีค่าอุณหภูมิของระบบอยู่ในช่วง 30-33 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก ในขณะที่การใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพ ในสภาวะการหมักเดียวกัน พบว่าให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 9.15 (กรัม/ลิตร) สำหรับงานวิจัยนี้ สามารถกล่าวได้ว่า ขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบกากตะกอนเยื่อกระดาษก่อนนำมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลนั้น สามารถช่วยให้ปริมาณการผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นกว่าการผลิตเอทานอลจากวตถุดิบที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพก่อนได้

จากงานวิจัยสรุปได้ว่า กากตะกอนเยื่อกระดาษมีองค์ประกอบของเซลลูโลสที่ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบชนิดอื่น อีกทั้งยังมีปริมาณลิกนินที่ต่ำ ซึ่งถือเป็นข้อดีของการนำวัตถุดิบชนิดนี้มาใช้เพื่อการผลิตเอทานอล ในขั้นตอนการผลิตน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ย่อยเซลลูโลสนั้น ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อปริมาณน้ำตาลที่ผลิตได้ คืออัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท ประกอบกับปัจจุบันการใช้เอนไซม์ถือเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เนื่องจากเอนไซม์มีราคาที่สูง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ต่อปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสม คือไม่ใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงเกินไปซึ่งถือเป็นการสิ้นเปลือง จะส่งผลดีทั้งต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายและต้นทุนของเอนไซม์ นอกจากนี้รูปแบบของการผลิตที่เหมาะสมซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกระบวนการสองรูปแบบ คือแบบรวมปฏิกิริยาและแยกปฏิกิริยา พบว่าแบบรวมปฏิกิริยาให้ผลการผลิตที่สูงกว่าแบบแยกปฏิกิริยา ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการขยายขนาดการทดลองการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการวิจัยโดยประยุกต์ใช้กับวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสชนิดอื่น เช่น กากมันสำปะหลัง ฟางข้าว กากอ้อย เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบจากการเกษตรซึ่งในประเทศไทยสามารถหาได้ง่าย และถือเป็นของเสียเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม สามารถนำมาใช้เพื่อศึกษาการผลิตเอ-ทานอลได้

2. ทำการวิจัยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการย่อยวัตถุดิบได้ เช่น *Aspergillus acculeatus*, *Trichoderma viride*, *Clostridium thermocellum* และ *Streptomyces* sp. เป็นต้น

3. ทำการทดลองโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นในกระบวนการหมัก เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถนำมาใช้เพื่อกระบวนการหมักเอทานอลได้ เช่น *Zymomonas mobilis, Kluyveromyces fragilis* และ *Candida krusei* เป็นต้น

5.3 การนำไปประยุกต์ใช้

ผลการวิจัยผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษพบว่าหากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษจะนำกากตะกอนเยื่อกระดาษจากระบบบำบัดน้ำเสียมาใช้เพื่อการผลิตเอทานอล นอกจากจะได้พลังงานเชื้อเพลิงไว้ใช้ภายในโรงงานแล้ว ยังได้รับผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลซึ่งถือเป็นผลประโยชน์ของผู้ประกอบการ เช่น ก๊าซชีวภาพ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเซลล์ยีสต์ เป็นต้น ก๊าซชีวภาพใช้เป็นพลังงานในรูปของการเผาไหม้เพื่อใช้ประโยชน์จากความร้อนโดยตรง สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อต้มไอน้ำ (Boiler) ของโรงงานได้ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนมากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เครื่องดื่มอัดก๊าซ และเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเอทานอลสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนและอาหารเสริมสำหรับสัตว์ได้

สำหรับในโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตเยื่อและกระดาษ ยกตัวอย่างเช่น โรงงานผลิตเยื่อและกระดาษจังหวัดปราจีนบุรีซึ่งมีกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งในส่วนนี้ประมาณ 30 ตัน/วัน ซึ่งนั่นหมายความว่า หากใช้กระบวนการผลิตดังเช่นงานวิจัยนี้ จะสามารถผลิตเอทานอลได้ดังนี้

เมื่อใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อตะกอนเยื่อกระดาษเท่ากับ 1:15 (มล./ก.)
ในน้ำหมักปริมาตร 100 มล.

แสดงว่า หากมีตะกอนเยื่อกระดาษเท่ากับ 30 ตัน $= 3\times10^{7}$ กรัม
ต้องใช้ปริมาตรน้ำหมักเท่ากับ $(100/15)\times(3\times10^{7}) = 2\times10^{5}$ ลิตร

จากงานวิจัยสามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 9.15 กรัม/ลิตร

นั่นคือจะสามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ $9.15 \times 2 \times 10^5$ = 1,830 กิโลกรัม

= 2,319.39 ลิตร

หรือคิดเป็น = 77.31 ลิตร/ตันตะกอนเยื่อกระดาษ

หมายเหตุ : ค่าความหนาแน่นของเอทานอลเท่ากับ 0.789

ประเทศไทยมีการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบหลายประเภท และมีรายงานปริมาณการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ปริมาณการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

ปริมาณการผลิตเอทานอล (ลิตร/ตันวัตถุดิบ)				
กากน้ำตาล	อ้อย	มันสำปะหลังสด	ข้าวโพด	ข้าวฟ่าง
260	70	180	375	70

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน,

จากข้อมูลงานวิจัยการผลิตเอทานอลจากตะกอนเยื่อกระดาษพบว่า ถ้ามีตะกอนเยื่อกระดาษที่แยกออกมาได้จากระบบบำบัดน้ำเสียทั้งหมดเท่ากับ 30 ตัน/วัน จะสามารถนำไปผลิตเป็นเอทานอลได้ทั้งหมดเท่ากับ 2,319 ลิตร หรือคิดเป็นปริมาณการผลิตเท่ากับ 77.31 ลิตร/ตันตะกอนเยื่อกระดาษ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทอื่น พบว่าตะกอนเยื่อกระดาษสามารถให้ปริมาณเอทานอลต่อตันวัตถุดิบได้สูงกว่า อ้อยและข้าวฟ่าง ดังนั้นการนำตะกอนเยื่อกระดาษมาใช้เพื่อผลิตเอทานอลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของโรงงานที่มีวัตถุดิบเหลือทิ้งประเภทนี้ นอกจากนี้กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน ปี 2549 มีรายงานว่ากำลังการผลิตเอทานอลเท่ากับ 150,000 ลิตร/วัน จะทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ประมาณ 100-120 ตัน/วัน หากโรงงานแห่งนี้ใช้ตะกอนเยื่อกระดาษทั้งหมด 30 ตัน เพื่อนำมาใช้ผลิตเอทานอล จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ประมาณ 1.55-1.85 ตัน ซึ่งผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นอาจสร้างผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ และสร้างรายได้ให้กับโรงงานได้อีกทางหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตาม สิ่งที่ผู้ประกอบการต้องคำนึงถึงร่วมด้วยคือ การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์นั้น แม้จะส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการผลิตด้วยวิธีทางเคมี แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของราคาเอนไซม์ที่ค่อนข้างแพง ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์มีราคาที่สูงกว่าการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสด้วยวิธีทางเคมี

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กุลวดี ทองภูเบศร์ และอารี ฤทธิบูรณ์. 2547. ปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ. 2547. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง. โครงงานวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย. 2549. Cellulosic Ethanal ทางเลือกใหม่ของการผลิตเอทานอลในอนาคต.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3.

นัยนา นิยมวัน. กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.tistr.or.th/t/publication /page_area_show_bc.asp?i1=77&i2=7 [2552, มิถุนายน 27]

บริษัท แอ๊ดวานซ์ อะโกร จำกัด (มหาชน). องค์ประกอบหลักในเยื่อกระดาษ. [ออนไลน์]. แหล่งที่ม:http://www.doubleapaper.com/knowing/paper_element.pdf. [2552, กันยายน 12]

บริษัท แอ๊ดวานซ์ อะโกร จำกัด (มหาชน). กระบวนการผลิตกระดาษ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.doubleapaper.com/knowing/paper_process1.pdf. [2552,กันยายน 12]

บริษัท แอ๊ดวานซ์ อะโกร จำกัด (มหาชน). ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.doubleapaper.com /about /environment.asp. [2553, สิงหาคม 6]

พัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, กรม. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dede.go.th/dede/index. Php ?id=172. [2553, กันยายน 18]

พัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, กรม. เอทานอล. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=124. [2553, กันยายน 26]

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. 2538. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รูป โครงสร้างผนังเซลล์พืช. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://thaigoodview.com [2553, มิถุนายน 22]

รูป ถังหมักทรงกระบอกขนาด 5 ลิตร. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.firstenbergequip.com /general /inventor /search_detail.Lasso?id=598. [2552, ธันวาคม 13]

รูป*Saccharomyces cerevisiae* (เจริญบนอาหาร YMA).[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.emdchemicals.com/.../prods/1_ 05397_0500.html. [2552, สิงหาคม 20]

รูป *Saccharomyces cerevisiae* (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.micron.ac.uk/organisms/sacch.html. [2552, สิงหาคม 20]

รูป *Trichoderma* sp. (เจริญบนอาหาร PDA). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.moldbacteria .com /learnmore/trichoderma.html. [2552, สิงหาคม 20]

รูป *Trichoderma* sp. (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www. sciencedaily.com/.../05/080519153925.html. [2552, สิงหาคม 20]

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กระทรวง. ยุทธศาสตร์ด้านยีนส์ช่วยไขความลับสำหรับชีว-มวลจากเซลลูโลส. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.ostc.thaiembdc.org/news_us/ Dec51_4.html [2552, พฤษภาคม 9]

ศิริพงษ์ เปรมจิต บุณฑริก ภูมิรา และดวงพร เปรมจิต. 2550. การผลิตเอทานอลโดยใช้ปอสาเป็นวัสดุหมักด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง. การประชุมเชิงวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 3.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2549. รายชื่อจุลินทรีย์ผลิตเอทานอลที่มีเพาะเลี้ยงและเก็บไว้ในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. บทที่ 3 เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบเซลลูโลส. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www. eng.su.ac.th/me/eLearning/renewableenergy/Ethanol-Tech-Final-Revised-1.pdf10 [2552, กรกฎาคม 12]

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536. ยีสต์และชีวเคมีของการหมักเอทิลแอลกอฮอล์. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Abou-Zeid, A. and Abulnaja, O. 1993. Utilization of palm-tree compound leaves in formation of cellulases. Bioresource Technology 44: 255-257.

Badger, P. C. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA.17-21.

Brethauer, S. and Wyman, C.E. 2010. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. Bioresource Technology 101: 4862-4874.

Chen, M., Zhao, J. and Xia L. 2009. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. Biomass and Bioenergy.

Dogaris, I., Vakontios, G., Kalogeris, E., Mamma, D. and Kekos, D. 2009. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. Industrial crops and products. 29: 404-411.

Fuller, W.H. and Norman, A.G. 1943. Cellulose Decomposition by Aerobic Mesophilic Bacteria From Soil. Journal of bacteriology. 46: 281-289. อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒน-กิจ. 2547. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง. โครงงานวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Galbe, M. and Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Appl Microbiol Biotechnol. 59: 618-628.

Greulch, V.A. 1973. Plant function and structure. New York.

Han, Y.W. and Srinivasan, V.S. 1968. Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. Applied Microbiology.16:1140-1145. อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒน-กิจ. 2547. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง. โครงงานวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Hagerdal, B.H. and Haggstrom, M. 1985. Production of ethanol from cellulose, Solka Floc BW 200, in a fedbatch mixed culture of *Trichoderma reesei,* C30, and *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. 22:187-189.

Hagglund, P., Eriksson, T., Collen, A., Nerinckx, W., Claeyssens, M. and Stalbrand, H. 2003. A cellulose-binding module of the *Trichoderma reesei* β-mannanase Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex substrates. Journal of Biotechnology. 101:37-48.

Jeihanipour, A. and Taherzadeh, A.J. 2008. Ethanol production from cotton-based waste textiles. Bioresource Technology 100: 1007-1010.

Kazuhisa, M. 1997. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. Osaka. Agriculture department. Osaka University.

Kirt, K.T. 1983. Degradation and conversion of lignocellulosic. The Filamentous Fungi. New York: Edward Arnold.

Lark, N., Xia, Y., Qin, C.G., Gong, C.S. and Tsao, G.T. 1997. Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluveromyces marxianus*. Biomass and Bioenergy 2: 135-143.

Marques, S., Alves, L., Roseiro, J.C. and Girio, F.M. 2008. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. Biomass and bioenergy 32: 400-406.

Matsushika, A., Inoue, H., Murakami, K., Takimura, O. and Sawayama, S. 2009. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology 100: 2392-2398.

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

Myskow, W. and Morrison, R.I. 1963. Decomposition of leguminous plant roots in sand L-transformation of nitrogen compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture 14: 813-821. อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ. 2547. การศึกษาการผลิตเอทา-นอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง. โครงงานวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Patle, S. and Lal, B. 2008. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. Biomass and bioenergy 32: 596-602.

Paturau, J.M. 1989. Byproduction of the Cane Sugar Industry. 3rd ed. Great Britain: Elsevier Science Publisher Ltd.

Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Hughes, S.R. and Cotta, M.A. 2008. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-Batch fermentation. Biomass and bioenergy 32: 168 -175.

Reese, E.T. and Ryu, D.Y. 1980. Shear inactivation of cellulose of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microb. Technol 2: 239-240.

Saha, B.C. and Cotta, M.A. 2008. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. Biomass and bioenergy 32: 971-977.

Scragg A.H. 1991. Bioreactor in Biotechnology: a parctical approach. Ellis Horwood, Chem. 9: 1233-1240 อ้างถึงใน กุลวดี ทองภูเบศร์ และอารี ฤทธิบูรณ์. 2547. ปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

Sharma, S.K., Kalra, K.L., and Kocher, G.S. 2004. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunfower hulls for ethanol production and its scale-up. Biomass and bioenergy 27: 399-402.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry. 1983. Alpha, betta and gamma cellulose in pulp, The Chemical Methods Committee of the Process and Product Quality Division. TAPPI journals.

Tomos-Pejo, E., Garcia-Aparicio, M., Negro, M.J., Oliva, J.M. and Ballesteros, M. 2009. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. Bioresource Technology 100: 890-895.

Van Wyk, J.P.H. 2001. Sequential bioconversion of used paper to sugars by cellulases from *Trichoderma reesei* and *Penicillium funiculosum*. The Environmentalist 21: 211-220.

Wyman, C.E. 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. Trends Biotechnol. 25 (4): 153-157.

Yamashita, Y., Sasaki, C. and Nakamura, Y. 2010. Development of efficient system for ethanol production from paper sludge pretreated by ball milling and phosphoric acid. Carbohydrate Polymers 79: 250-254.

Yu, K.C., Tan, U.L., Mayers, P. and Saddler, N. 1987. Column cellulose hydrolysis reactor: the effect of retention time, temperature, cellulase concentration and exogenously added cellobiase on the overall process. Applied Microbiology and Biotechnology 26: 21-27. อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ. 2547. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง. โครงงานวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Zeltin, R.P. 1970. Effect of the nutrient medium on the biosynthesis of cellulolytic enzymes by the heat resistant fungus *Aspergillus terreus*. Microbiologiia 39: 574-582. อ้างถึงใน ชวิศร์ วงศ์วัฒนกิจ. 2547. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้ง. โครงงานวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Zhu, J.Y. and Pan, X.J. 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production:Technology and energy consumption evaluation. Bioresource Technology 101: 4992-5002.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ (มาตรฐานของ Tappi)

(Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 1983)

1. การเตรียมตัวอย่าง

1. ใช้เยื่อกระดาษปริมาณ 1.5±0.1 กรัม

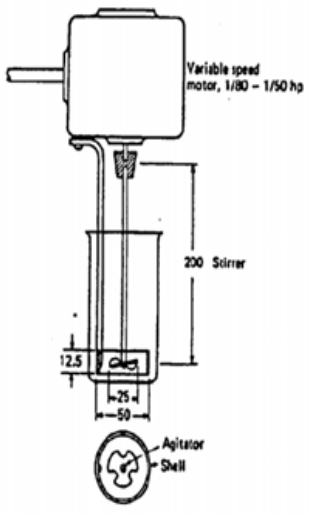
2. ใส่เยื่อกระดาษลงในบีกเกอร์ขนาด 300 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอก-ไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงไปปรับอุณหภูมิของสารละลายให้อยู่ที่ปริมาณ 25°±0.2 °ซ

3. คนสารละลายด้วยเครื่องกวน (Pulp dispersion apparatus) จนกระทั่งเยื่อกระจายอย่างสมบูรณ์

4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ปริมาตรรวมของสารละลายเท่ากับ 100 มล.) คนสารละลายด้วยแท่งแก้วนำไปแช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25°±0.2 °ซ

5. หลังจากการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ในครั้งแรก 30 นาที จึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วและทิ้งไว้อีก 30 นาที ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25°±0.2 °ซ

6. กรองสารละลายโดยใช้ sinter glass crucible เบอร์ 3 โดยกรองสารละลาย 10-20 มิลลิลิตร ในส่วนแรกทิ้งและเก็บสารละลายหลังจากนั้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป



รูปที่ ก.1 Pulp dispersion apparatus. (Dimension are in mm)

2. การหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

1. ปิเปต 25 มิลลิลิตร ของสารละลายตัวอย่าง และ 10 มิลลิลิตร ของ 0.5 N โปแตสเซียมไดโครเมต ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากันแล้วเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยทำในตู้ดูดควัน

2. นำขวดรูปชมพูไปตั้งเตาให้ความร้อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และตั้งทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จึงเติมสารละลายเฟอร์โรอิน อินดิเคเตอร์ 2-4 หยด และนำไปไทเทรตด้วยสารละลาย 0.1 N เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนสารละลายเป็นสีม่วง

3. ทำสารละลายแบลงค์โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 12.5 มิลลิลิตร

3. การหาปริมาณเบต้าและแกมมาเซลลูโลส

1. ปิเปต 50 มิลลิลิตร ของสารละลายตัวอย่าง และเติม 3 N กรดซัลฟูริค ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วคนสารละลายให้เข้ากัน

2. ให้ความร้อนในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 70-90 °ซ (overnight) จนเกิดตะกอนของเบต้าเซลลูโลส แล้วทำการกรอง

3. ปิเปต 50 มิลลิลิตร ของส่วนใสที่ได้จากการกรอง เติม 0.5 N โปแตสเซียมไดโครเมต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยทำในตู้ดูดควัน

4. ให้ความร้อนสารละลายนาน 15 นาที เติมสารละลายเฟอร์โรอิน อินดิเคเตอร์ หลังจากนั้นจึงนำไปไทเทรตด้วยสารละลาย 0.1 N เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนสารละลายเป็นสีม่วง

5. ทำสารละลายแบลงค์โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 12.5 มิลลิลิตร และ 3 N กรดซัลฟูริค ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

การคำนวณ

ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

$$\text{Alpha-cellulose, \%} = 100 - \frac{6.85(V_2-V_1)\times N\times 20}{A \times W}$$

Where:

V_1 = titration of the pulp filtrate, ml

V_2 = blank titration, ml

N = exact normality of the ferrous ammonium sulfate solution

A = volume of the pulp filtrate used in the oxidation, ml

W = over-dry weight of pulp, g

ปริมาณแกมมาเซลลูโลส

$$\text{Gamma-cellulose, \%} = [6.85\ (V_4-V_3) \times N \times 20] / [25 \times W]$$

Where:

V_3 = titration of the solution after precipitation of beta-cellulose, ml

V_4 = blank titration, ml

ปริมาณเบต้าเซลลูโลส

$$\text{Beta-cellulose, \%} = 100\ B\ (\text{alpha-cellulose \%} + \text{gamma-cellulose \%})$$

4. การหาปริมาณลิกนิน

1. ชั่งน้ำหนักแห้งของตัวอย่างหนัก 1±0.1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. วางบีกเกอร์ลงในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อยๆ เติม 72 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริคที่แช่เย็นไว้ในตู้เย็นลงไป 15 มิลลิลิตร พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอ ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ผสมกันดีขึ้น

3. ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา แล้วนำออกจากอ่างน้ำแข็งมาตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 20±1 °ซ เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง พร้อมคนสารละลายอย่างสม่ำเสมอ ทุกๆ 15 นาที

4. เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายในบีกเกอร์ลงไปในขวดก้นกลม พร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นลงไปอีกจนถึงระดับ 575 มิลลิลิตร ที่ขีดไว้ข้างขวดก้นกลม

5. ทำการ Reflux สารละลายนาน 4 ชั่วโมง เมื่อเสร็จเทสารละลายทั้งหมดใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วตั้งบีกเกอร์ทิ้งไว้ 1 คืน

6. กรองผ่าน Sinter glass crucible เบอร์ 3 ที่ทราบน้ำหนักแล้ว ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน แล้วนำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 105 °ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำออกมาทำให้เย็นลงในเดซิเคเตอร์ หลังจากนั้นจึงชั่งน้ำหนักรวมของ glass crucible และลิกนิน

ภาคผนวก ข
การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส (Miller, 1959)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

1. สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

   ละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid 1 กรัม และโพแทสซียมโซเดียมตาเทรต ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$) 250 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 16 กรัมในน้ำ 200 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายในขวดสีชาหรือขวดทึบแสง

วิธีการ

1. ใส่สารละลายที่ต้องการทดสอบ(ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำ ให้เย็นทันที
2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน
3. ทำหลอดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส

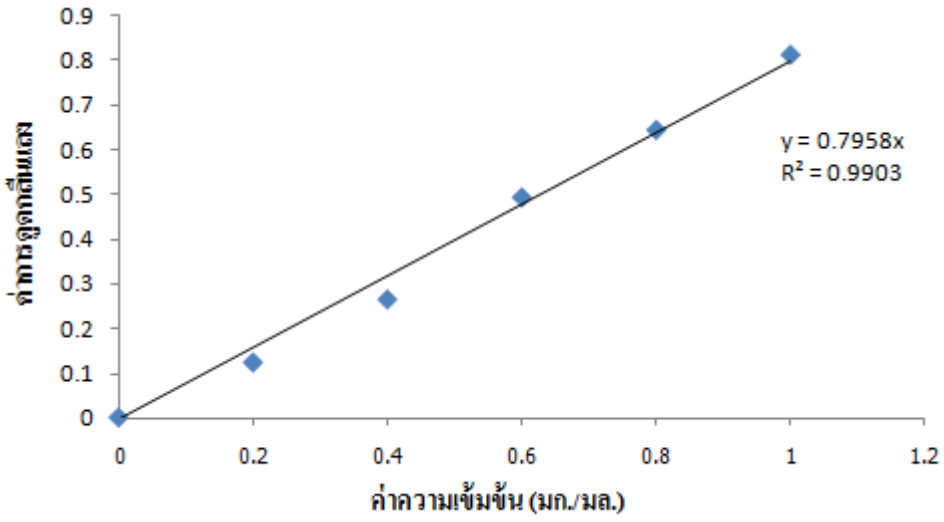
$$\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (มก./มล.)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{ค่าความเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส}}$$

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ทำกราฟมาตรฐานกลูโคสจำนวน 5 จุด โดยเตรียมจากกลูโคส (Analytical grade) จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 (มก./มล.) และนำไปหาปริมาณกลูโคสตามวิธี DNS

ตารางที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 (มก./มล.)

ความเข้มข้นกลูโคส (มก./มล.)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.2	0.123
0.4	0.264
0.6	0.492
0.8	0.643
1.0	0.811



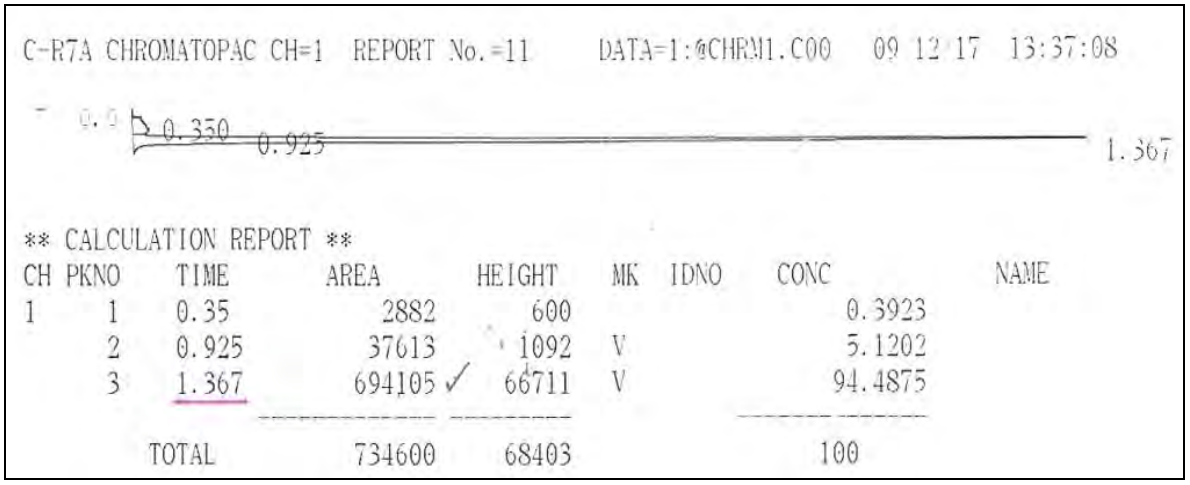
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ภาคผนวก ค

1) ปริมาณเอทานอลจากพื้นที่ใต้กราฟที่ทำการตรวจวัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี

วิธีทำ

1. ทำกราฟมาตรฐานเอทานอลจำนวน 5 จุด โดยเตรียมจากสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ร้อยละ 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 (%v/v) และนำไปหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี ผลที่ได้คือ พื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลแต่ละความเข้มข้น
2. นำพื้นที่ใต้กราฟและค่าความเข้มข้นของเอทานอลทั้ง 5 มาพลอตเป็นกราฟมาตรฐานเอทานอล
3. นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากตัวอย่างไปหาปริมาณเอทานอลจากกราฟมาตรฐานเอทานอล



C-R7A CHROMATOPAC CH=1 REPORT No.=11 DATA=1:@CHRM1.C00 09 12 17 13:37:08

0.0 0.350 0.925 1.367

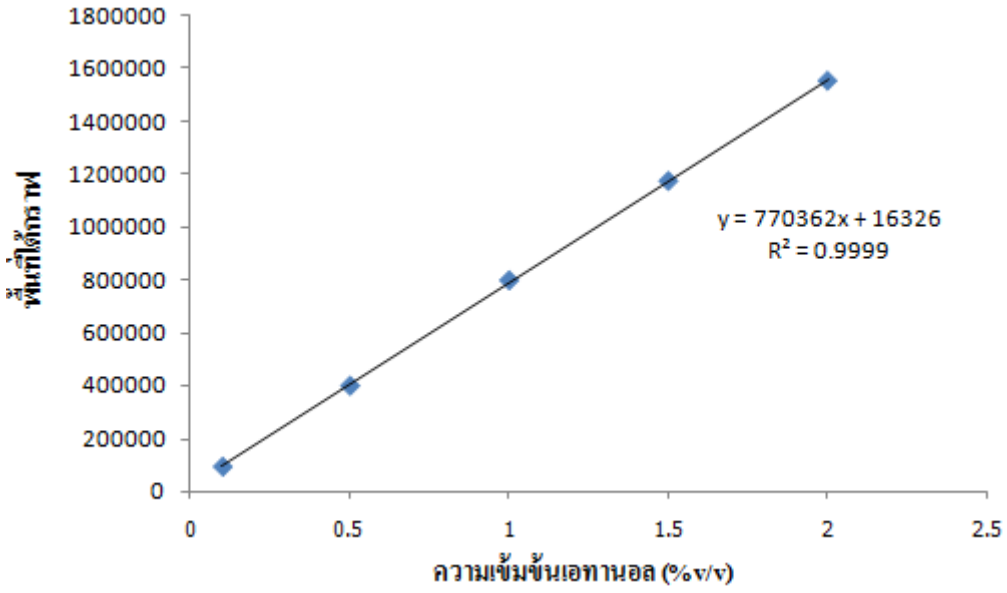
** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	0.35	2882	600			0.3923	
	2	0.925	37613	1092	V		5.1202	
	3	1.367	694105	66711	V		94.4875	
		TOTAL	734600	68403			100	

รูปที่ ค.1 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เอทานอลที่ได้จากเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี

ตารางที่ ค.1 ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 (มก./มล.)

ความเข้มข้นเอทานอล (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.1	90,943
0.5	397,526
1.0	796,746
1.5	1,172,892
2.0	1,552,370



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานเอทานอล

2) การคำนวณปริมาณเอทานอลที่ได้ต่อปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป หรือผลได้ผลิตภัณฑ์ (yield)

$$\text{ผลได้ผลิตภัณฑ์ (Ethanol yield)} = \frac{\text{เอทานอลวันที่ X - เอทานอลวันที่ 0}}{|\text{น้ำตาลวันที่ X - น้ำตาลวันที่ 0}|}$$

วิธีทำ

ปริมาณเอทานอลที่คำนวณได้จากการวัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี จะได้ผลออกมาในหน่วยของร้อยละโดยปริมาตร (%v/v)

สมมติ ให้มีปริมาณเอทานอล เท่ากับ 0.5 (%v/v) คือ

ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร มีเอทานอลอยู่ 0.5 มิลลิลิตร

ในสารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีเอทานอลอยู่ $\frac{0.5}{100} \times 1000$

$= 5$ มิลลิลิตร

จากสูตร $d = m/v$; ความหนาแน่นของเอทานอลเท่ากับ 0.789 กรัม/มิลลิลิตร

แทนในสูตร $0.789 \frac{g}{ml} = \frac{m}{5ml}$

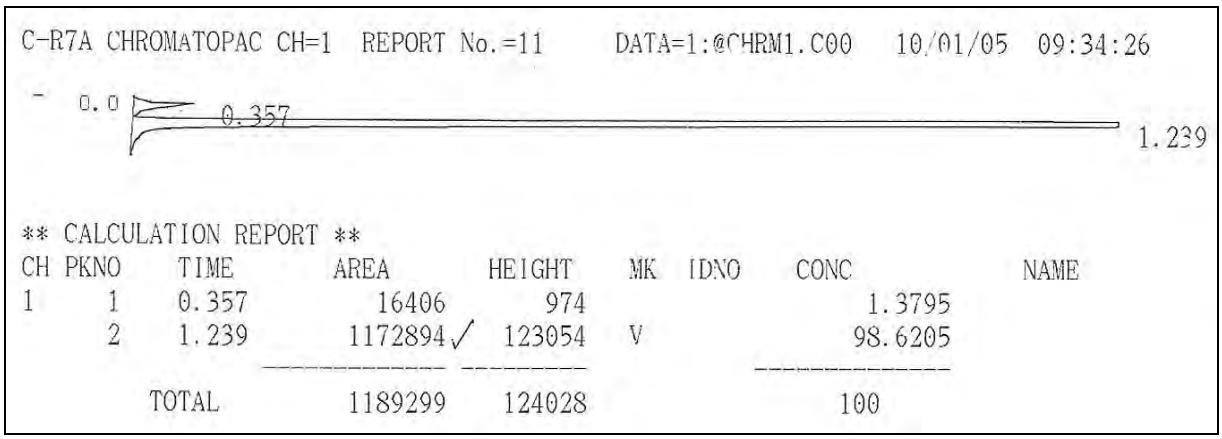
$m = 0.789 \frac{g}{ml} \times 5\ ml$

$= 3.95$ กรัม

นั่นคือ เอทานอล 0.5 (%v/v) เท่ากับเอทานอล 3.95 กรัม/ลิตร

ใช้ค่าเอทานอลในหน่วยของ กรัม/ลิตร แทนในสูตรเพื่อการคำนวณหาผลได้ผลิตภัณฑ์ (Ethanol yield)

ภาคผนวก ง
ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เอทานอล



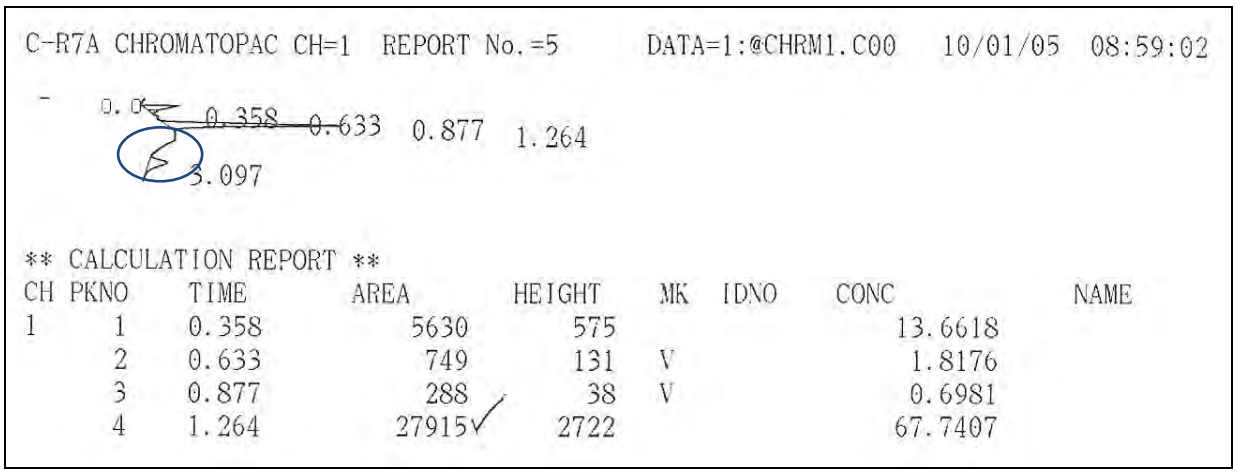
C-R7A CHROMATOPAC CH=1 REPORT No.=11 DATA=1:@CHRM1.C00 10/01/05 09:34:26

0.0 0.357 1.239

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	0.357	16406	974			1.3795	
	2	1.239	1172894	123054	V		98.6205	
		TOTAL	1189299	124028			100	

รูปที่ ง.1 ลักษณะพีคของเอทานอลที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี



C-R7A CHROMATOPAC CH=1 REPORT No.=5 DATA=1:@CHRM1.C00 10/01/05 08:59:02

0.0 0.358 0.633 0.877 1.264

3.097

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	0.358	5630	575			13.6618	
	2	0.633	749	131	V		1.8176	
	3	0.877	288	38	V		0.6981	
	4	1.264	27915	2722			67.7407	

รูปที่ ง.2 ลักษณะพีคที่เกิดขึ้นตามหลังพีคของเอทานอลที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี

ภาคผนวก จ

ผลการทดลอง

1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสของกากตะกอนเยื่อกระดาษ

(แบบ วศ.)

2 ตัวอย่าง
45 รายการ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ
DEPARTMENT OF SCIENCE SERVICE

รายงานการทดสอบ

ชื่อวัตถุตัวอย่าง	เครื่องหมาย / ตรา	หมายเลขปฏิบัติการ
กากตะกอนเยื่อกระดาษ	-	ZC. 468

ผลการทดสอบ

	ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างอบแห้ง
โฮโลเซลลูโลส	73.3
อัลฟ่าเซลลูโลส	67.1
เบต้าเซลลูโลส	4.7
แกรมมาเซลลูโลส	1.4

ชื่อผู้ใช้บริการ	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ผู้ใช้บริการ	ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
ลักษณะตัวอย่าง	ZC. 468 เป็นกากตะกอนเยื่อกระดาษ มีสีเทา-ขาว ชิ้นเล็กๆ มีขนาดประมาณ 0.2 – 05 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 200 กรัม บรรจุในถุงพลาสติก
วันที่ทดสอบ	29 มกราคม 2550 ถึง 23 กุมภาพันธ์ 2550
วิธีทดสอบ	1. โฮโลเซลลูโลส ทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI Section 2. อัลฟ่าเซลลูโลส ทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI T 203 3. แกมมาเซลลูโลส ทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI T 203 4. เบต้าเซลลูโลส ทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI T 203

ผู้รับรอง

(นายจรวย ธงไชย)
นักวิทยาศาสตร์ 8 ว

ผู้รายงาน

(นายยุทธนาพงศ์ แดงเพ็ง)
นักวิทยาศาสตร์ 8ว

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณลิกนินของกากตะกอนเยื่อกระดาษ

แบบ วศ.1

รายงานการทดสอบ

ชื่อวัตถุตัวอย่าง	เครื่องหมาย / ตรา	หมายเลขปฏิบัติการ
ตะกอนเยื่อกระดาษ	-	L52/11067.1

ผลการทดสอบ

	ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างอบแห้ง
ลิกนิน	6.0

ชื่อผู้ใช้บริการ	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ผู้ใช้บริการ	ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
ลักษณะตัวอย่าง	ตะกอนเยื่อกระดาษสีน้ำตาล บรรจุในถุงพลาสติก
วันที่ทดสอบ	16 ธันวาคม2552 – 8 กุมภาพันธ์ 2553
วิธีทดสอบ	ลิกนิน ทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI T 222 om-02

ผู้รับรอง

(นายจรวย ธงไชย)
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ

ผู้รายงาน

(นายยุทธนาพงศ์ แดงเพ็ง)
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ

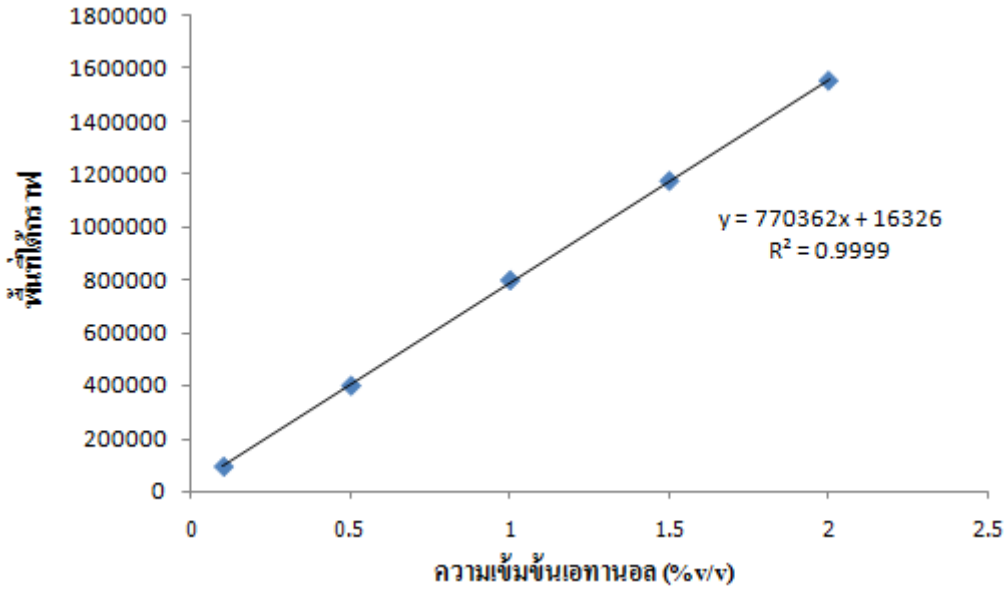
ตารางที่ จ.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับกากตะกอนเยื่อกระดาษเพื่อการผลิตน้ำตาล

วัน / เฉลี่ย	ครั้งที่	ปริมาณกลูโคสที่อัตราส่วนต่างๆ (มก./มล.)			
		1:5	1:10	1:15	1:20
1	1	16.21	19.72	22.62	20.81
	2	17.23	19.45	22.48	20.55
	3	17.84	19.53	22.87	20.62
$\bar{X}$ ± SD		17.10 ± 0.82	19.57± 0.14	22.66 ± 0.20	20.66 ± 0.13
2	1	14.23	23.27	22.99	26.49
	2	14.58	22.92	22.71	26.09
	3	15.02	22.86	23.33	26.47
$\bar{X}$ ± SD		14.61± 0.40	23.02 ± 0.22	23.01± 0.31	26.35 ± 0.23
3	1	16.07	22.66	24.47	31.49
	2	16.02	22.83	25.23	30.50
	3	15.97	23.23	25.17	31.27
$\bar{X}$ ± SD		16.02 ± 0.05	22.91± 0.29	24.92 ± 0.42	31.09 ± 0.52
4	1	14.36	26.61	27.78	31.95
	2	14.54	26.77	27.64	32.34
	3	13.7	26.95	28.04	32.52
$\bar{X}$ ± SD		14.2± (0.44)	26.78± (0.17)	27.82 ± 0.20	32.27± 0.29
5	1	14.24	26.54	30.12	32.21
	2	14.6	27.07	29.03	32.53
	3	14.9	27.15	29.8	32.70
$\bar{X}$ ± SD		14.58 ± 0.33	26.92 ± 0.33	29.65 ± 0.56	32.48 ± 0.25
6	1	13.94	27.45	34.82	26.99
	2	13.4	27.70	32.95	25.37
	3	13.94	27.80	34.19	26.42
$\bar{X}$ ± SD		13.76 ± 0.31	27.65 ± 0.18	33.99 ± 0.95	26.26 ± 0.82
7	1	13.55	27.86	33.35	26.85
	2	13.64	27.78	32.47	25.75
	3	13.91	28.21	31.16	26.75
$\bar{X}$ ± SD		13.7 ± 0.19	27.95 ± 0.23	32.33 ± 1.10	26.45± 0.61

3.ผลการทดลองในขั้นตอนการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยา (ทดลองในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร)

ตารางที่ จ.2 พื้นที่ใต้กราฟของมาตรฐานเอทานอล

ความเข้มข้นเอทานอล (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.1	90,943
0.5	397,526
1.0	796,746
1.5	1,172,892
2.0	1,552,370



รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานเอทานอล (ทดลองในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร)

ตารางที่ จ.3 พื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลแบบรวมปฏิกิริยา

วันที่	ชุดการทดลองที่ 1				ชุดการทดลองที่ 2			
	พื้นที่ใต้กราฟ	เอทานอล (% v/v)	เอทานอล (ก./ล.)	น้ำตาล (มก./มล.)	พื้นที่ใต้กราฟ	เอทานอล (% v/v)	เอทานอล (ก./ล.)	น้ำตาล (มก./มล.)
1	514,818	0.65	5.13	3.77	480,240	0.60	4.73	4.15
3	359,693	0.94	3.55	4.40	556,652	0.70	5.52	4.90
5	664,782	0.84	6.63	3.90	694,105	0.88	6.94	4.15
7	701,790	0.89	7.02	1.13	721,970	0.92	7.26	4.52

4.ผลการทดลองในขั้นตอนการผลิตเอทานอลแบบแยกปฏิกิริยา (ทดลองในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร)

ตารางที่ จ.4 พื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลแบบแยกปฏิกิริยา

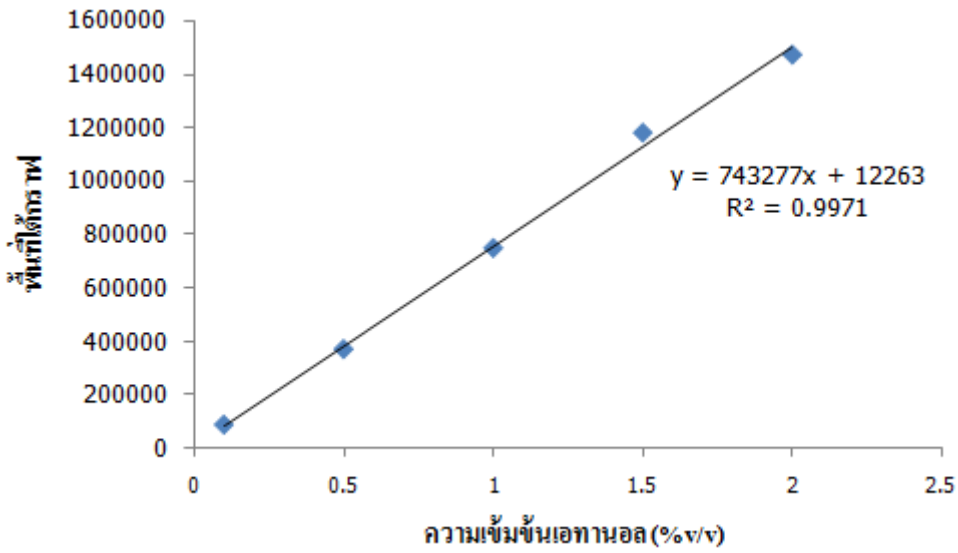
วันที่	ชุดการทดลองที่ 1				ชุดการทดลองที่ 2			
	พื้นที่ใต้กราฟ	เอทานอล (% v/v)	เอทานอล (ก./ล.)	น้ำตาล (มก./มล.)	พื้นที่ใต้กราฟ	เอทานอล (% v/v)	เอทานอล (ก./ล.)	น้ำตาล (มก./มล.)
1	ND	ND	ND	6.97	35,015	0.02	0.16	11.69
3	59,604	0.06	0.47	2.90	26,238	0.01	0.08	8.41
5	27,915	0.02	0.16	5.32	35,939	0.03	0.24	6.97
7	16,812	0.00	0.00	5.84	34,840	0.02	0.16	7.50

ND, not detected.

5.ผลการทดลองในขั้นตอนการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ จ.5 พื้นที่ใต้กราฟของมาตรฐานเอทานอล

ความเข้มข้นเอทานอล (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.1	88,375
0.5	370,265
1.0	747,362
1.5	1,177,665
2.0	1,468,361



รูปที่ จ.2 กราฟมาตรฐานเอทานอล (ภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร)

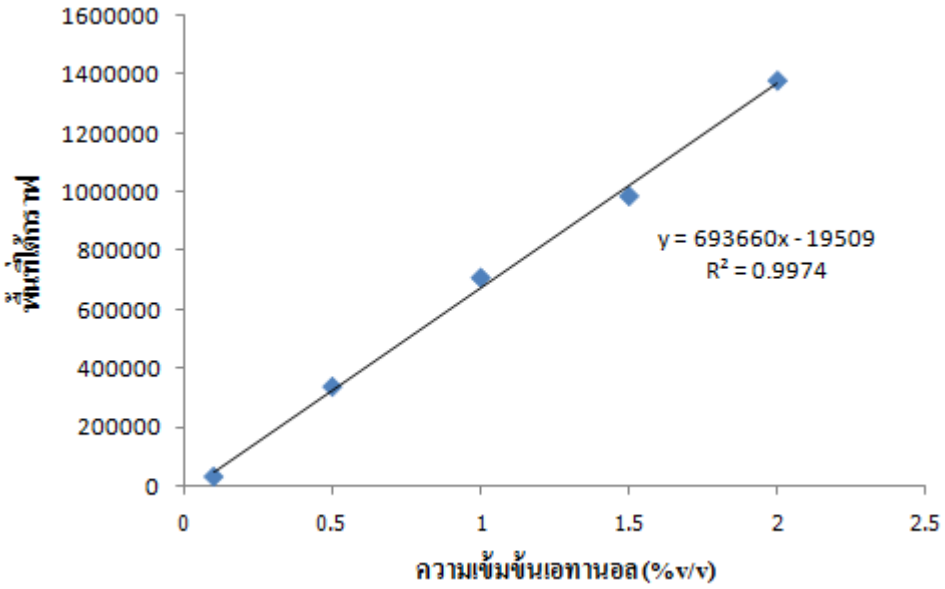
ตารางที่ จ.6 พื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลแบบรวมปฏิกิริยาภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วันที่	ปริมาณเอทานอล			น้ำตาล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
	พื้นที่ใต้กราฟ	(% v/v)	(กรัม/ลิตร)	
1	562,034	0.74	5.84	6.14
3	634,880	0.84	6.63	8.87
5	707,561	0.94	7.34	8.14
7	823,002	1.09	8.68	6.96
9	876,060	1.16	9.15	9.31
11	853,397	1.13	8.92	5.35
13	800,374	1.06	8.36	5.59

6.ผลการทดลองในขั้นตอนการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์

ตารางที่ จ.7 พื้นที่ใต้กราฟของมาตรฐานเอทานอล

ความเข้มข้นเอทานอล (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.1	33,049
0.5	338,200
1.0	707,902
1.5	984,711
2.0	1,376,259



รูปที่ จ.3 กราฟมาตรฐานเอทานอล (กากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์)

ตารางที่ จ.8 พื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลจากการผลิตเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์

วันที่	ปริมาณเอทานอล			น้ำตาล
	พื้นที่ใต้กราฟ	(% v/v)	(กรัม/ลิตร)	(มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
1	504,025	0.75	5.92	2.40
3	536,357	0.80	6.31	3.91
5	645,244	0.96	7.57	2.35
7	538,128	0.80	6.31	1.90
9	751,815	1.11	8.76	2.36
11	795,847	1.18	9.31	2.90
13	778,764	1.15	9.07	3.24

ภาคผนวก ฉ
ใบรับรองการจัดการสารเคมี

งานวิจัยนี้ ได้จัดทำการบันทึกข้อมูลสารเคมีเข้าสู่ฐานข้อมูลของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยโปรแกรมการจัดการข้อมูลสารเคมี ChemTrack ในช่วงเวลาเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม 2553

Chemtrack_02/2552

คณะกรรมการดำเนินงานด้านการจัดการสารเคมีและของเสียอันตราย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ออกใบรับรองฉบับนี้ให้ไว้
เพื่อแสดงว่า

คลังสารเคมี รศ.ดร.เพ็ชรพร เหวากิจเจริญ
ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
รหัสโครงการ 6545321070000 4

ได้บันทึกข้อมูลสารเคมีเข้าสู่ฐานข้อมูลของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โปรแกรมการจัดการข้อมูลสารเคมี ChemTrack เรียบร้อยแล้ว
และได้มีการบันทึกรายการสารเคมีอย่างถูกต้องในช่วงเวลา เดือนมิถุนายน 53 ถึง เดือนกรกฎาคม 53

ให้ไว้ ณ วันที่ 7 กรกฎาคม 2553

(รองศาสตราจารย์ ดร. เลอสรวง เมฆสุต)
ผู้อำนวยการศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้าน
การจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกุลชาดา สง่าสินธุ เกิดเมื่อวันที่ 22 เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2527 ที่จังหวัดระยอง สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2551

การเผยแพร่วิทยานิพนธ์

[1] กุลชาดา สง่าสินธุ และเพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ. การผลิตเอทานอลจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานเยื่อกระดาษโดยเอนไซม์เซลลูเลสและยีสต์ (Ethanol Production from Pulp Mill Wastewater Sludge by Cellulase Enzyme and Yeast). เอกสารประกอบการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ วิศวกรรมและการจัดการสิ่งแวดล้อม ครั้งที่ 2. 18-19 มีนาคม 2553 ณ อาคารสถาบัน 2 ชั้น 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[2] Kunchada Sangasintu and Petchporn Chawakitchareon. “Ethanol Production from Pulp Mill Wastewater Sludge by Simultaneous Saccharification and Fermentation”. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference on Earth Resource Technology “Georesources for green society: Development, Recovery and Recycling”. 11-13 May 2010, Royal Paradise Hotal & Spa, Patong, Phuket, Thailand.

[3] Kunchada Sangasintu and Petchporn Chawakitchareon. “Scale up Pulp Mill Wastewater Sludge for Ethanol Production by Cellulase and *Saccharomyces cerevisiae*”. Accept for Oral presentation at International conference on materials science and technology 2010 (ICMST 2010) at Serpong. Indonesia October 20-21, 2010.