การผลิตเอทานอลจากส่วนผสมเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้ม

Ethanol Production from the Mixture of the Weak Skin Palmyra Palm Seeds and Orange Peels

อัสมา หมาดหล้า

Asma Mardla

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Engineering in Chemical Engineering

Prince of Songkla University

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอทานอลจากส่วนผสมเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้ม

ชื่อผู้เขียน นางสาวอัสมา หมาดหล้า

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

คณะกรรมการสอบ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..……....ประธานกรรมการ

……..… (รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา ศรีสุวรรณ)

(ดร.สินินาฎ จงคง)

…….....กรรมการ

(ดร.สินินาฎ จงคง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

…….....กรรมการ

…….... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์)

…….....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์)

.....กรรมการ

(ดร.สุรัสวดี กังสนันท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี

….....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อน (เยื่อ) ของเต้าตาลโตนด

ชื่อผู้เขียน นางสาวอัสมา หมาหล้า

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

เปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้มซึ่งเป็นผลผลิตเหลือทิ้งทางการเกษตร ถูกนำมาศึกษาเพื่อเพิ่มมูลค่าเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเป็นพลังงานทดแทน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment) การย่อย (Hydrolysis) และการหมัก (Fermentation) สภาวะที่ทำการศึกษาสำหรับการเตรียมวัตถุดิบ คือ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของวัตถุดิบ (เปลือกอ่อนเต้าตาลต่อเปลือกส้ม) เป็น 5:1 ถึง 5:4 ในส่วนของการย่อยจะแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 วิธี คือ การย่อยด้วยวิธีทางกายภาพและการย่อยด้วยวิธีทางชีวภาพ สำหรับการย่อยทางกายภาพจะใช้วิธีการต้ม โดยศึกษาปัจจัยของปริมาณน้ำที่เติม 20 ถึง 40 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 75 ถึง 90 องศาเซลเซียส และเวลาในการต้ม 15 ถึง 60 นาที ในส่วนของการย่อยทางชีวภาพจะทำการศึกษาปัจจัยของระยะเวลาในการย่อย 1-10 วัน ด้วยความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 80 – 90 และการหมักจะทำการศึกษาปัจจัยของจำนวนวันในการหมักในช่วง 1-10 วัน และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ ซึ่งในที่นี้จะทำการศึกษาโดยใช้แหล่งจุลินทรีย์ 2 แหล่ง คือ ลูกแป้งข้าวหมาก (Loog Pang Kao-Mhark) และยีสต์ขนมปัง (Baker's Yeast)

ผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนของวัตถุดิบที่เหมาะสมคือ 5:3 ซึ่งจะถูกนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยสามารถแบ่งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลได้เป็น 3 แบบ ดังนี้ แบบที่ 1 ทำการย่อยด้วยการต้มและหมักด้วยลูกแป้ง โดยต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จะได้น้ำตาลรีดิวส์ 6.01 กรัมต่อลิตร แล้วหมักด้วยลูกแป้งร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นประมาณ 5 ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน ได้ผลผลิตเอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 4.15 โดยปริมาตร สำหรับแบบที่ 2 ทำการย่อยด้วยการต้มและหมักด้วยยีสต์ขนมปัง โดยต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แล้วหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นประมาณ 5 ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จะได้เอทานอลร้อยละ 5.57 โดยปริมาตร และแบบที่ 3 ทำการย่อยทางชีวภาพและหมักด้วยยีสต์ขนมปัง โดยย่อยด้วยจุลินทรีย์ธรรมชาติ เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 6.85 กรัมต่อลิตร แล้วหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นประมาณ 5 ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็น

เวลา 3 วัน จะได้เอทานอลร้อยละ 9.05 โดยปริมาตร และนำสภาวะที่เหมาะสมทั้ง 3 แบบ มาศึกษาการเพิ่มขนาดการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ขนาด 2.5 ลิตร ซึ่งในส่วนนี้จะทำการควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 4.5-6.0 และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักด้วยสภาวะจากแบบที่ 1, 2 และ 3 สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 4.32, 5.78 และ 9.50 โดยปริมาตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการหมักเอทานอลด้วยสภาวะจากการทดลองแบบที่ 3 สามารถให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด ดังนั้นจึงได้นำผลผลิตจากสภาวะแบบที่ 3 มาทำการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ต่อไป โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ อุณหภูมิที่ 65 ถึง 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเพิ่มความบริสุทธิ์ที่ 5 ถึง 15 นาที พบว่าการเพิ่มความบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความดัน 550 มิลลิเมตรปรอท เป็นเวลา 5 นาที สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้ถึงร้อยละ 85 โดยปริมาตร และเมื่อทำการระเหยซ้ำครั้งที่ 3 สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลได้ถึงร้อยละ 97 ซึ่งสามารถนำไปใช้ในเชิงการค้าได้

Thesis Title Ethanol production from the weak skin of edible jelly seeds of Palmyra palm

Author Miss Asma Mardla

Major Program Chemical Engineering

Academic Year 2011

ABSTRACT

Agricultural residues, the weak skin of jelly seeds of the Palmyra Palm mixed with orange peels that were used as raw materials for renewable energy production, were evaluated in this research. Optimum conditions for ethanol production were investigated in 3 steps. Weight ratios of 5:1 to 5:4 of material mixture (seed weak skin to orange peels) were studied in the first pretreatment step. The second hydrolysis step was divided into 2 methods. These were thermal-physic hydrolysis (boiling) that studied important factors were 20 – 40 ml of added water amount, 75 – 90 ∀C of boiling temperatures and 15 – 60 min of boiling time, and biological hydrolysis that significant factors were 1 – 10 days of decay time with 80 – 90 %relative humidity. The third step was fermentation that was compared with between using Loog Pang Kao-Mhark and using Baker's yeast. The studied parameters for fermentation were 1 – 10 %wt of Loog Pang or Baker's yeast for 1 – 10 days with an initial pH of about 5 at an ambient temperature.

It was found that the 5:3 of ratio of raw mixture was enough for the ethanol production and would be employed for next steps. The optimum conditions could be operated by 3 different options. Firstly, the crushed raw mixture was hydrolyzed by boiling at 80 ∀C for 45 min that could get 6.01 g/L reducing sugar (glucose) content in the hydrolyzed products, and then the hydrolyzed products were fermented by using 3 %wt Loog Pang with an initial pH of 5 at an ambient temperature for 9 days that could provide 4.15 %v ethanol product. Secondly, the hydrolysis was the same as the first option and then the fermentation was carried out by using 5 %wt baker's yeast with an initial pH of 5 at an ambient temperature for 9 days that could provide

5.57 %v ethanol product. Finally, the biological hydrolysis was done at 80 – 90 %relative humidity for 4 days that it could be obtained 6.85 g/L glucose content, after that the fermentation was carried out by using 4 %wt baker's yeast with an initial pH of 5 at an ambient temperature for 3 days that could reach 9.05 %v ethanol product. In addition, the 3 options were scaled up for fermentation in 2.5 L bio-reactor. They could increase the ethanol contents to 4.32, 5.78 and 9.50, respectively. The third option could give the highest ethanol content in the products that would be investigated for ethanol purification by using a rotary vacuum evaporator. Operating conditions were studied at 65 – 75 ∀C for 5 – 15 min. The optimum purification was 70 ∀C for 5 min and 550 mmHg that provided 85 %v ethanol content and could reach 97 %v ethanol product for 3 times of evaporation repeatedly.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ดร. สินินาฎ จงคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย แนวทางในการค้นคว้าหาข้อมูลและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ดำเนินไปอย่างสมบูรณ์ รวมถึงการขัดเกลากระบวนการคิด การแก้ไขปัญหาและแนวทางในการดำเนินชีวิต ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาอุทิศเวลาให้คำแนะนำและคำปรึกษาต่างๆ ในการทำวิจัย รวมไปถึง รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา ศรีสุวรรณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์ และดร.สุรัสวดี กังสนันท์ ที่ให้เกียรติสละเวลาเวลามาเป็นกรรมการการสอบ และให้คำแนะนำเพื่อใช้ในการแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ทุนผู้ช่วยวิจัย เพื่อเป็นค่าเล่าเรียนและค่าใช้จ่ายระหว่างการศึกษา ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ที่ให้สถานที่ในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ที่สนับสนุน ให้กำลังใจ และทุนทรัพย์ในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนขอขอบคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้ให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

อัสมา หมาดหล้า

สารบัญ

หน้า

สารบัญ		(8)
รายการตาราง		(10)
รายการภาพประกอบ		(14)
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	4
บทที่ 2	ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
	2.1 วัตถุดิบ	5
	2.2 ลูกแป้ง	15
	2.3 ยีสต์ขนมปัง	21
	2.4 เอทานอล	22
	2.5 การหมัก	30
	2.6 ทากูชิ	38
	2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	38
บทที่ 3	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	47
	3.1 วัสดุ	47
	3.2 อุปกรณ์	50
	3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	51
	3.4 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด	52
	3.5 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดผสมกับเปลือกส้ม	54
	3.6 การทดลองด้วยวิธีของทากูชิ	57
	3.7 ศึกษาการขยายขนาดการผลิตโดยการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ขนาด 2.5 ลิตร	59
	3.8 ศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator)	60

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

	3.9 การวิเคราะห์ผลผลิต	61
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	64
	4.1 องค์ประกอบวัตถุดิบ	64
	4.2 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด	65
	4.3 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดผสมกับเปลือกส้ม	66
	4.4 วิธีทากุชิ	77
	4.5 การหมักเอทานอลด้วยถังปฏิกรณ์ (Bioreactor)	83
	4.6 การเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน	84
บทที่ 5	สรุปผลการทดลอง	87
	5.1 การผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดผสมกับเปลือกส้ม	87
	5.2 การขยายขนาดกำลังการผลิตเอทานอลด้วยการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 2.5 ลิตร	88
	5.3 การเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน	88
	5.4 ข้อเสนอแนะ	88
เอกสารอ้างอิง		90
ภาคผนวก		96
	ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์	97
	ภาคผนวก ข ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง	104
ประวัติผู้เขียน		124

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	แสดงมูลค่าการนำเข้าเชื้อเพลิงของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2536-2542	2
2-1	แสดงสมบัติต่างๆ ของอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin)	11
2-2	แสดงเชื้อราและยีสต์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมาก	19
2-3	การเปรียบเทียบปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดต่างๆ	28
2-4	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณการใช้พลังงานในการแยกน้ำออกจากสารละลายเอทานอล	34
3-1	ระดับของตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง สำหรับการหมักเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก (ด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน)	57
3-2	ระดับของตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง สำหรับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (ด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน)	58
3-3	ระดับของตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง สำหรับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (ด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางชีวภาพ)	58
3-4	แสดงแผนการทดลอง Orthogonal Array L4 (2^3) ตามมาตรฐานของ Taguchi method สำหรับการหมักเอทานอลทั้งสามการทดลอง	58
4-1	องค์ประกอบของเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด และเปลือกส้ม	65
4-2	แสดงผลการหมักเอทานอลด้วยเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ซึ่งผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 75 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที แล้วทำการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วัน	66
4-3	แสดงผลการหมักเอทานอลด้วยเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ซึ่งผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที แล้วทำการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วัน	67
4-4	แสดงผลการหมักเอทานอลด้วยเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 25 นาที โดยทำการศึกษาการเติมน้ำที่ 0 และ 10 มิลลิลิตร ทำการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และเติมน้ำที่ 0, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน	68

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4-5	ผลการทดลองด้วยมาตรฐานของทากูชิ (Orthogonal Array) L4 (2^3) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก	80
4-6	การวิเคราะห์ตารางมาตรฐานของทากูชิ จากการหมักเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก	81
4-7	ตารางแผนการทดลอง (Orthogonal Array) L4 (2^3) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง	83
4-8	การวิเคราะห์ตารางมาตรฐานของทากูชิ จากการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง	83
4-9	ตารางแผนการทดลอง (Orthogonal Array) L4 (2^3) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (ย่อยด้วยวิธีทางชีวภาพ)	85
4-10	การวิเคราะห์ตารางมาตรฐานของทากูชิ จากการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (ย่อยด้วยวิธีทางชีวภาพ)	86
4-11	ผลการทดลองการหมักเอทานอลด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร	88
ก-1	แสดงสภาวะในการตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC)	100
ก-2	แสดงการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ	102
ก-3	แสดงการเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ	103
ข-1	เอทานอลที่ได้จากการทดสอบความเป็นไปได้ในการหมักเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ ที่อุณหภูมิ 75 และ 85 องศาเซลเซียส แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ด้วยลูกแป้งข้าวหมาก 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก	104
ข-2	เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ (ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที) แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ด้วยลูกแป้งข้าวหมาก 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพื่อหาอัตราส่วนของวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำไปผลิตเอทานอล	106
ข-3	น้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากขั้นตอนการย่อยทางฟิสิกส์ที่อุณหภูมิต่างๆ ของวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เพื่อหาอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยทางฟิสิกส์	107

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข-4	น้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากขั้นตอนการย่อยทางฟิสิกส์ (ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) ของวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เพื่อหาปริมาณน้ำ และเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยทางฟิสิกส์	108
ข-5	เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยลูกแป้งข้าวหมากที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณลูกแป้งข้าวหมากและวันในการหมักที่เหมาะสม	109
ข-6	เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยยีสต์ขนมปังที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณยีสต์ขนมปังและวันในการหมักที่เหมาะสม	112
ข-7	เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านการย่อยทางชีวภาพ (ย่อยตามธรรมชาติเป็นเวลา 5 วัน) โดยใช้ยีสต์ขนมปัง 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน เพื่อหาอัตราส่วนของวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำไปผลิตเอทานอล	115
ข-8	เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพ (ย่อยตามธรรมชาติเป็นเวลา 5 วัน) โดยใช้ยีสต์ขนมปัง 5 เปอร์เซ็นต์ และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน เพื่อศึกษาผลของน้ำกลั่นที่มีต่อการหมักเอทานอล	116
ข-9	น้ำตาลรีดิวส์ที่ผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพที่เวลาต่างๆ โดยใช้วัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เพื่อศึกษาจำนวนวันในการย่อยทางชีวภาพที่เหมาะสม	117
ข-10	เอทานอลที่ได้จาการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพที่เวลาต่างๆ เพื่อศึกษาจำนวนวันในการย่อยทางชีวภาพที่เหมาะสม	118
ข-11	เอทานอลที่ได้จาการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เป็นเวลา 10 วัน ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพที่เวลาต่างๆ เพื่อศึกษาจำนวนวันในการย่อยทางชีวภาพที่เหมาะสม	119

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข-12	เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพ (ย่อยตามธรรมชาติเป็นเวลา 3 วัน) แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยยีสต์ขนมปังที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณยีสต์ขนมปังและวันในการหมักที่เหมาะสม	120
ข-13	เอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร จากสภาวะที่เหมาะสมในการหมักขนาด 250 มิลลิลิตร ทั้ง 3 การทดลอง	122
ข-14	เอทานอลที่ได้จากการเพิ่มความบริสุทธิ์ โดยการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร จากการหมักที่สภาวะที่เหมาะโดยการย่อยทางชีวภาพ และทำการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง (แบบที่ 3)	122
ข-15	เอทานอลที่ได้จากการเพิ่มความบริสุทธิ์ในแต่ละครั้ง โดยการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร จากการหมักที่สภาวะที่เหมาะโดยการย่อยทางชีวภาพ และทำการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง (แบบที่ 3)	123

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่		หน้า
2-1	แสดงภาพถ่าย (ก) ต้นตาลโตนด (ข) ใบ (ค) ผล และ (ง) ลอนตาล	6
2-2	แสดงภาพเปลือกอ่อนของเต้าตาลและเนื้อในของเต้าตาล	7
2-3	แสดงภาพต้นส้มสายน้ำผึ้ง	8
2-4	แสดงโครงสร้างอะไมโลส (Amylose)	9
2-5	แสดงโครงสร้างอะไมโลเพคติน (Amylopectin)	10
2-6	แสดงโครงสร้างผนังเซลพืช (plant cell wall structure) ซึ่งมีเซลลูโลส และเพคตินเป็นส่วนประกอบหลัก	14
2-7	แสดงโครงสร้างเซลลูโลส (Cellulose)	14
2-8	แสดงลักษณะของลูกแป้งข้าวหมาก	15
2-9	แสดงแผนภูมิการผลิตลูกแป้ง	18
2-10	แสดงภาพยีสต์ขนมปังชนิด (ก) ยีสต์สด (Fresh or Compressed Yeast) (ข) ยีสต์เม็ด หรือยีสต์น้ำ (Active Dried Yeast) และ (ค) ยีสต์ผง (Instant Yeast)	22
2-11	แสดงโครงสร้างทางเคมีของเอทานอล	23
3-1	แสดงลักษณะภายนอกของเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด	47
3-2	แสดงลักษณะภายนอกของเปลือกส้ม	48
3-3	แสดงลูกแป้งข้าวหมากซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก	48
3-4	แสดงยีสต์ขนมปังซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก	49
3-5	แสดงแผนภาพขั้นตอนการผลิตเอทานอล	51
3-6	แสดงภาพเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดหลังบด	52
3-7	แสดงการต้มวัตถุดิบด้วยอ่างน้ำมันเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Oil Bath Shaker)	53
3-8	แสดงชุดการหมักเอทานอลแอร์ล็อก (Air-locked Flask)	53
3-9	แสดงภาพวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล	54
3-10	แสดงการย่อยวัตถุดิบด้วยวิธีทางชีวภาพ	56
3-11	แสดงการหมักเอทานอลด้วยถังปฏิกรณ์ (Bioreactor) ขนาด 2.5 ลิตร	59
3-12	แสดงเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator)	61
3-13	แสดงขั้นตอนการแยกสารละลาย	61

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

3-14	แสดงเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer	62
3-15	แสดงเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC)	63
4-1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอทานอลและจำนวนวันในการหมักของวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:1 5:2 5:3 และ 5:4 โดยผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน	67
4-2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอทานอลและจำนวนวันในการหมักของวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:1 5:2 5:3 และ 5:4 โดยผ่านการย่อยทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ธรรมชาติ	68
4-3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวส์กับเวลาในการต้มที่อุณหภูมิ 75, 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียส	69
4-4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวส์กับเวลาในการต้มโดยการเติมน้ำปริมาตร 20, 30 และ 40 มิลลิลิตร	70
4-5	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวส์กับจำนวนวันในการย่อยทางชีวภาพในช่วง 1-10 วัน	71
4-6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับจำนวนวันในการย่อย โดยการหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 1, 3, 5, 7, และ 9 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วัน	72
4-7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับจำนวนวันในการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 1, 3, 4, 5, 7, 9 และ 10 โดยน้ำหนัก	73
4-8	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับจำนวนวันในการหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยน้ำหนัก	74
4-9	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับจำนวนวันในการหมักด้วยการเติมน้ำ 5 มิลลิลิตรและไม่เติมน้ำ	75
4-10	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับจำนวนวันในการหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 1, 3, 4, 5, 7, 9 และ 10 โดยน้ำหนัก	76
4-11	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับเวลาในการเพิ่มความบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส	85

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-12	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับจำนวนครั้งในการเพิ่มความบริสุทธิ์จากของเหลวบริสุทธ์ (Evaporate) และกากที่เหลือ (Residue) โดยทำการแยกเอทานอลที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	86
ก-1	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์	99
ก-2	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล	101

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา พลังงานถือเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งต้องนำมาใช้ทั้งในภาคการผลิตและการขนส่ง จึงทำให้มีความต้องการใช้เชื้อเพลิงเพิ่มสูงขึ้นและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นตามสภาพเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมที่เจริญเติบโตขึ้นตามลำดับ ด้วยเหตุนี้ประเทศไทยจึงประสบกับปัญหาความขาดแคลนเชื้อเพลิง และพลังงานมาอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งความอุดมสมบูรณ์ด้านพลังงานของประเทศไทยนั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2543 ประเทศไทยมีกำลังการผลิตน้ำมันดิบเพียงร้อยละ 8.2 ของความต้องการเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องมีการนำเข้าเชื้อเพลิงจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 1-1 และเนื่องจากปริมาณน้ำมันปิโตรเลียมของโลกใกล้จะหมดลง จึงส่งผลให้ราคาน้ำมันปิโตรเลียมในตลาดโลกปรับตัวสูงขึ้น ทำให้ประเทศผู้ใช้น้ำมันต้องนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศและสูญเสียเงินตราต่างประเทศเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมหาศาล ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการพึ่งพาการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากเช่นกัน โดยราคาน้ำมันที่สูงขึ้นได้ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสินค้าภายในประเทศเพิ่มสูงขึ้น ปัญหาดังกล่าวทำให้ปัจจุบันหน่วยงานของภาครัฐ และเอกชนหันมาให้ความสนใจและแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนอื่นที่ประเทศไทยสามารถผลิตได้เอง เพื่อช่วยลดภาระการสั่งซื้อเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ และเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม แหล่งพลังงานที่เหมาะสมที่สุดควรมาจากผลผลิตและของเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่สามารถปลูกใหม่ได้ไม่มีวันหมด การใช้ผลผลิตและของเหลือใช้ทางการเกษตรนอกจากจะช่วยแก้ไขปัญหาข้างต้นได้แล้ว ยังช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มและแก้ไขปัญหาผลผลิตทางการเกษตรล้นตลาด เพิ่มรายได้ให้เกษตรกรซึ่งเป็นประชากรหลักของประเทศ และยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ตารางที่ 1-1 แสดงมูลค่าการนำเข้าเชื้อเพลิงของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2536-2542 (ณรงค์, 2547)

หน่วย: ล้านบาทต่อปี

ปี	มูลค่าการนำเข้า
2536	86,456
2537	91,622
2538	115,248
2539	157,380
2540	168,322
2541	130,656
2542	164,089

การนำวัตถุดิบและของเหลือใช้ทางการเกษตรมาผลิตเป็นพลังงานทดแทน ทำได้หลายวิธี เช่น การผลิตก๊าซชีวภาพ ไบโอดีเซล และเอทานอล ซึ่งในงานวิจัยนี้ให้ความสนใจการผลิตเอทานอล เอทานอลสามารถใช้ทดแทนน้ำมันเบนซินและดีเซล หรือเป็นสารเติมแต่งเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิงได้ เอทานอลสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ วิธีสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) ด้วยกระบวนการแคตาไลติกไฮเดรชัน (Catalytic Hydration) และการหมัก (Fermentation) ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบ 3 ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง และวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส ซึ่งองค์ประกอบทั้ง 3 ประเภทนี้ มีอยู่ในผลผลิตและของเหลือใช้ทางการเกษตรแทบทุกชนิด โดยที่ผ่านมาการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่มักจะผลิตจาก อ้อย มันสำปะหลัง เศษไม้ ฝางข้าว และธัญพืชอื่นๆ เอทานอลมีการใช้งานอย่างแพร่หลายตั้งแต่ปี ค.ศ. 1975 โดยใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงโดยตรงกับรถยนต์ และใช้เอทานอลจำนวนร้อยละ 22 ผสมในน้ำมันเบนซินเพื่อใช้กับเครื่องยนต์ปกติ สำหรับสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศที่มีการผลิตเอทานอลเป็นอันดับสองรองจากบราซิล และประเทศจีนเป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดในเอเชีย รองลงมา ได้แก่ อินเดีย ส่วนญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ เป็นผู้นำเข้ารายใหญ่ ซึ่งการใช้งานเอทานอลในเอเชียส่วนใหญ่จะใช้เพื่อการบริโภค และในอนาคตปริมาณการค้าเอทานอลในตลาดโลกมีแนวโน้มที่จะขยายตัวเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากในหลายประเทศมีนโยบายสนับสนุนให้มีการใช้เอทานอลในรูปของเชื้อเพลิง เพื่อเป็นการลดมลภาวะทางอากาศ

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ของผสมระหว่างเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดและเปลือกส้มเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรจากการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากเต้าตาล และการผลิตน้ำผลไม้ (ส้ม) เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบของทั้งน้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส อีกทั้งยังไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างอื่น นอกจากเป็นอาหารสัตว์ตามบ้านเรือน จากกระบวนการผลิตเอทานอล ต้นทุนครึ่งหนึ่งจะมาจากราคาของวัตถุดิบที่ใช้ (Roble, 2003) ดังนั้นการใช้เปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดและเปลือกส้มเป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นพลังงานทดแทนเอทานอลจึงมีความเหมาะสมเชิงเศรษฐศาสตร์ สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล คือ ยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมาก (Loog-Pang Kao Mhark) และยีสต์ขนมปัง (Baker Yeast) ซึ่งมีราคาถูกและหาได้ง่าย ลูกแป้งข้าวหมากนั้นสามารถนำไปใช้ผลิตแอลกอฮอล์ ขนมปัง แบะแซ (Maltose syrup) เหล้าพื้นเมือง และน้ำส้ม โดยลูกแป้งแต่ละแหล่งผลิตจะมีสูตรการทำและเชื้อต่างๆ กัน ส่วนมากไม่ใช่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียว แต่เป็นเชื้อผสม (Mixed cultures) ของเชื้อรามากกว่า 2 ชนิด หรือเชื้อราและยีสต์ปนกัน ในบางครั้งลูกแป้งที่ทำจากแหล่งผลิตเดียวกันก็ให้ผลิตภัณฑ์ไม่เหมือนกัน ควบคุมไม่ได้ เพราะเป็นการทำแบบพื้นเมืองที่ขาดหลักการทางวิทยาศาสตร์ (จิราภรณ์, 2518) โดยส่วนใหญ่ลูกแป้งข้าวหมากมีรา ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล เช่น ราในตระกูล *Amylomyces* และ *Aspergillus* และยีสต์จะทำหน้าที่ช่วยในการย่อยน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ เช่น ยีสต์ในตระกูล *Saccharomyces cerevisiae* (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2553) และเปรียบเทียบการหมักเอทานอลด้วยการใช้ยีสต์ขนมปัง ซึ่งยีสต์ขนมปังเป็นยีสต์จากตระกูล *Saccharomyces* ที่ช่วยในการย่อยน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์เช่นกัน โดยในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำยีสต์ขนมปังมาทดลองใช้ผลิตสุราชุมชนบ้างแล้ว (สุวพันธ์ 2552) และในต่างประเทศได้มีการนำไปทดลองผลิตเป็นเชื้อเพลิงเอทานอล จากนั้นเลือกวิธีการหมักที่ดีที่สุด เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเชิงพาณิชย์ได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากระบวนการ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากของผสมเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้มด้วยยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมาก (Loog-Pang Kao Mhark) และยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*)
2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบกระบวนการผลิตเอทานอลจากลูกแป้งข้าวหมากและยีสต์ขนมปัง เพื่อใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ได้กระบวนการและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากของผสมเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้ม นักวิจัยสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีเผยแพร่ผลงานในรูปบทความนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ และตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติได้ โดยสามารถนำผลงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น

- เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับกลุ่มแม่บ้าน
- เพื่อเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรและโรงงานแปรรูป

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัตถุดิบ

2.1.1 ตาลโตนด

ตาลโตนด มีชื่อเรียกต่างๆ เช่น Palmyra Palm, Lontar และ Fan Palm มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Botassus flabellifer Lonn.* เป็นพืชที่พบทั่วๆ ไปในเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาตะวันออก ต่อมาได้แพร่พันธุ์เข้าไปในอินเดีย ศรีลังกา และกลุ่มประเทศในแถบเอเชีย ปัจจุบันมีมากในแถบทวีปเอเชีย อินเดีย ศรีลังกา พม่า กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย สำหรับในประเทศไทยพบมากในพื้นที่แถบภาคกลาง เช่น เพชรบุรี นครปฐม และภาคใต้ที่จังหวัดสงขลา เป็นต้น จากข้อมูลเกษตรจังหวัดสงขลา ปี 2542 จังหวัดสงขลามีตาลโตนดอยู่ประมาณ 3 ล้านต้น ครอบคลุมพื้นที่ในจังหวัดสงขลาจำนวน 6 อำเภอ ได้แก่ สิงหนคร สทิงพระ กระแสสินธุ์ ระโนด ควนเนียง รัตภูมิ และจะนะ โดยเฉพาะอำเภอสทิงพระมีอยู่ประมาณ 1,700,000 ต้น (เทศบาลตำบลสทิงพระ, 2554)

2.1.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ตาลโตนด เป็นไม้วงศ์ปาล์มเช่นเดียวกับมะพร้าว แต่ตาลโตนดมีความแข็งแรงทนทาน และอายุยืนยาวกว่ามะพร้าว โดยมีอายุประมาณ 80-100 ปี ตาลโตนดขึ้นได้บนดินทุกชนิด ทั้งความแห้งแล้ง และน้ำท่วมถึง มีรากลึกมาก โดยรากของตาลโตนดไม่แผ่ออกด้านข้าง จึงสามารถปลูกร่วมกับพืชอื่นได้ ตาลโตนดจะให้ผลผลิตหลังจากการปลูกประมาณ 10-15 ปี (ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์, 2537)

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพประกอบ 2-1 แสดงภาพ (ก) ต้นตาลโตนด (ข) ใบ (ค) ผล และ (ง) ลอนตาล

(1) ราก รากเป็นเสี้ยนกลมยาวเป็นกระจุกคล้ายมะพร้าว แต่จะไม่แผ่ไปตามผิวดินเหมือนรากมะพร้าว เนื่องจากรากของต้นตาลจะหยั่งลึกลงไปในดินได้ลึกมาก จึงยึดติดดินได้ดี โอกาสที่จะโค่นล้มหรือถอนรากจึงเป็นไปได้ยาก จึงนิยมปลูกต้นตาลเพื่อเป็นเส้นหลักในการแบ่งเขตของคันนา หรือเพื่อเสริมความแข็งแรงให้กับดินในบริเวณที่ทำการทดน้ำเข้าพื้นที่นา

(2) ลำต้น ตาลโตนเป็นพืชลำต้นเดี่ยว ไม่มีหน่อ ลำต้นมีขนาดใหญ่และสูง เมื่อต้นตาลเติบโตเต็มที่จะสูงประมาณ 25-27 เมตร (บางต้นอาจสูงถึง 30 เมตร) ลำต้นมีลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย โคนต้นอวบใหญ่วัดขนาดโดยรอบได้ประมาณ 50 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์ผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 ฟุต ต้นตาลจะมีลำต้นขนาดใหญ่ไปจนถึงยอด เปลือกลำต้นขรุขระ ลำต้นเป็นเสี้ยนสีดำแข็ง เหนียว ส่วนเนื้อไม้ภายนอกแข็งแรก และค่อยๆ อ่อนเข้าไปสู่ภายในลำต้น แสดงดังภาพประกอบ 2-2 (ก)

(3) ใบ มีลักษณะเป็นรูปพัด (Fan leaf) ขอบใบหยักคล้ายฟันเลื่อย ความกว้างของใบวัดได้ประมาณ 50-70 เซนติเมตร แต่ละใบจะมีใบย่อยเรียกว่า เซกเมนท์ (Segment) ยอดตาลจะมีใบตาลประมาณ 25-40 ใบ (ขึ้นอยู่กับอายุต้นตาล) แต่ละใบจะมีอายุไม่เกิน 3 ปี ตาลโตนดต้นหนึ่งๆ สามารถให้ใบตาลได้ 12-15 ใบต่อปี ส่วนที่เป็นก้านใบหรือทางตาลยาวประมาณ 1-2 เมตร ทางตาลจะหนาโค้งตามความยาวและมีหนามแหลมรอบทั้งสองด้าน ไม่สม่ำเสมอกัน แสดงดังภาพประกอบ 2-1 (ข)

(4) ดอก ตาลโตนดจะออกดอกเป็นช่อ โดยดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจะแยกกันอยู่คนละต้น ช่อดอกตัวผู้ เรียกว่า “งวงตาล” ยาวประมาณ 1.5-2 เมตร ช่อดอกของต้นตัวผู้แตกแขนงออกเป็น 2-4 งวงต่อก้านข้อ ยาวงวงละประมาณ 30-40 เซนติเมตร แต่ละงวงจะมีดอกเล็กๆ จำนวนมาก และมีช่อดอกประมาณ 3-9 ช่อ ส่วนดอกของต้นตัวเมีย เรียกว่า “ปลีตาล” จะมีดอกน้อยกว่าดอกตัวผู้ 10 ดอก ในช่อกลุ่ม มีงวง 3 งวง ต้นตัวเมียจะออกช่อหลังต้นตัวผู้เล็กน้อย แต่จะมีช่อดอกที่มีขนาดใหญ่และชุ่มน้ำหวานมากกว่า และสามารถเก็บรองน้ำตาลได้ตลอดปี

(5) ผล ผลตาลจะออกเฉพาะต้นตัวเมียเท่านั้น ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนถึงเก็บผลอ่อนจะใช้เวลาประมาณ 75-80 วัน โดยผลจะออกเวียนรอบต้นตามก้านใบ ซึ่งหนึ่งก้านใบจะออกหนึ่งปลี ในหนึ่งปลีจะให้ช่อดอกประมาณสามช่อ ซึ่งแต่ละช่อดอกก็จะให้ผลผลิตจำนวนหนึ่งทลาย และทุกๆ หนึ่งทลายจะมีผลตาลประมาณ 10-20 ผล แสดงดังภาพประกอบ 2-1 (ค) โดยทั่วไปตาลหนึ่งลูกมักมีลอนตาลอ่อนอยู่ 2-3 เต้า อยู่ภายในผลตาล ลอนตาลจะมีเนื้อสีขาวใส นิ่ม มีลักษณะแบน ยาวประมาณ 3 นิ้ว กว้าง 2 นิ้ว และหนาประมาณ 0.5 นิ้ว แสดงดังภาพประกอบ 2-1 (ง) และภาพประกอบ 2-2

ภาพประกอบ 2-2 แสดงภาพเปลือกอ่อนของเต้าตาลและเนื้อในของเต้าตาล
(โสนน้อยเรือนมอญ, 2550)

2.1.2 ส้มสายน้ำผึ้ง

ส้มสายน้ำผึ้งเป็นพันธุ์ส้มในกลุ่มส้มเขียวหวานชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lonicera japonica Thunb.* อยู่ในวงศ์ Caprifoliaceae มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในเขตอบอุ่นของทวีปเอเชียตะวันออก เช่น ญี่ปุ่น จึงมีชื่อภาษาอังกฤษว่า Japanese Honey suckle สายน้ำผึ้งเป็นไม้เลื้อยยืนต้น ลำต้นเป็นเถาแข็งยาวประมาณ 5-8 เมตร ลำต้นและกิ่งอ่อนมีขนนุ่มปกคลุม แสดงดังภาพประกอบ 2-3 ซึ่งนิยมปลูกเป็นไม้ประดับให้ขึ้นพันต้นไม้ รั้วหรือเลื้อยไปตามพื้นดิน เหมาะสำหรับพื้นดินที่ระบายน้ำได้ดี ขยายพันธุ์ได้ทั้งการเพาะเมล็ด ตอนกิ่ง และปักชำ (เดชา ศิริภัทร, 2551)

ภาพประกอบ 2-3 แสดงภาพต้นส้มสายน้ำผึ้ง

2.1.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

(1) ใบ ใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ ตามข้อของลำต้น ใบเป็นรูปไข่ ขอบขนานโคนใบมน ปลายแหลม ขอบใบเรียบท้องใบสีอ่อน หน้าใบสีเขียวเข้มเรียบเป็นมัน แผ่นใบค่อนข้างหนาและแข็ง กว้างประมาณ 2.5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 5 เซนติเมตร

(2) ดอก ดอกออกตามปลายกิ่งหรือซอกใบ ออกเป็นช่อๆ ช่อละประมาณ 15 ดอก ก้านช่อดอกสั้น โคนดอกของแต่ละดอกมีใบประดับ 1 คู่ กลีบดอกติดกันเป็นท่อยาวราว 5 เซนติเมตร ปลายดอกเป็นกลีบแยกออกจากกัน ด้านบนติดกันเป็น 4 กลีบ ด้านล่างแยกออกมา 1

กลีบ มีเกสรตัวผู้เป็นเส้นยื่นออกมากลางดอก 5 เส้น มีเกสรตัวเมีย 1 อัน กลีบดอกตูมและเมื่อเริ่มบานมีสีขาว จากนั้น 2-3 วัน เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนและเหลืองเข้ม มีกลิ่นหอมเย็นและกลิ่นแรงขึ้นในเวลากลางคืน สายน้ำผึ้งออกดอกได้ตลอดปี ผลสุกมีสีดำ

(3) ผล ส้มสายน้ำผึ้งมีลักษณะผลคล้ายส้มเขียวหวานมาก ขณะที่ผลยังอ่อนจะมีสีคล้ายส้มเขียวหวาน เมื่อแก่จัดผิวจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแดง ผกเว้นผลส้มที่ได้จากภาคใต้จะมีสีผิวเหมือนกับส้มเขียวหวาน ปอกเปลือกง่าย เปลือกมีกลิ่นหอมคล้ายส้มจีน หรือส้มพองแกน ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว 8-8 เดือนครึ่ง

2.1.3 องค์ประกอบของวัตถุดิบ

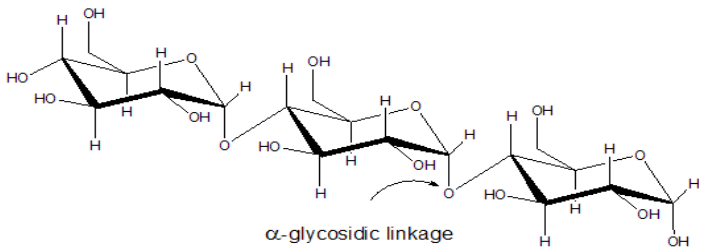
เปลือกเต้าตาลโตนดและเปลือกส้มมีองค์ประกอบที่สำคัญดังนี้

2.1.3.1 แป้ง (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2546)

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืชชั้นสูง ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6:10:5 สูตรเคมีโดยทั่วไป $(C_6H_{10}O_5)_n$ พบในคลอโรพลาสต์ (ในใบ) และในส่วนที่พืชใช้เป็นแหล่งเก็บอาหาร เช่น เมล็ดและหัว เป็นต้น แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (Glucosidic Linkage) แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ อะไมโลส (Amylose) เป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นและ อะไมโลเพคติน (Amylopectin) เป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่ง วางตัวในแนวรัศมีแสดงระดับโครงสร้างของเม็ดแป้ง แป้งจากแหล่งที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินแตกต่างกัน ทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน องค์ประกอบหลักภายในเม็ดแป้งมีดังนี้

(1) อะไมโลส (Amylose)

เป็นพอลิมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (Glucosidic Linkage) ชนิดแอลฟา-1,4 (ζ -1,4) ดังภาพประกอบ 2-4

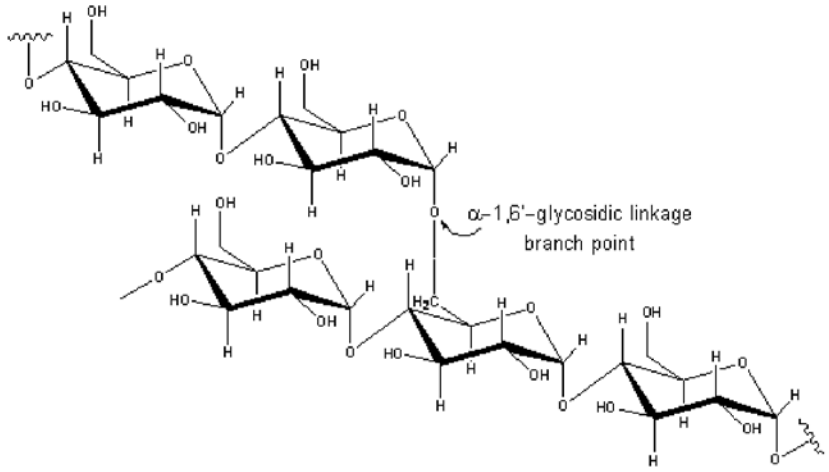


ภาพประกอบ 2-4 แสดงโครงสร้างอะไมโลส (Amylose)

แป้งจากธัญพืชมีปริมาณอะไมโลสสูงประมาณร้อยละ 28 เช่น แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งข้าวฟ่าง ส่วนแป้งจากราก และหัวมีปริมาณอะไมโลสต่ำประมาณร้อยละ 20 เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่งและแป้งสาคู แป้งแต่ละชนิดจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันไป แป้งแต่ละชนิดมีขนาดโมเลกุล หรือระดับขั้นการเกิดพอลิเมอร์ (Degree of Polymerization, DP) ของอะไมโลสแตก ต่างกัน แป้งที่มีโมเลกุลของอะไมโลสยาวขึ้นจะมีแนวโน้มในการเกิดรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) ลดลง ตำแหน่งของอะไมโลสภายในเม็ดแป้งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแป้ง อะไมโลสบางส่วนอยู่ในกลุ่มของอะไมโลเพกทิน บางส่วนกระจายอยู่ทั้งในส่วนอสัณฐาน (Amorphous) และส่วนผลึก (Crystalline)

(2) อะไมโลเพคติน (Amylopectin)

เป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด ζ-1, 4 ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณหน่วยกลูโคสในอะไมโลเพคตินทั้งหมด ขนาดโมเลกุลของอะไมโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิดจะมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วย อะไมโลเพคตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 เท่าของอะไมโลสและมีอัตราการคืนตัวต่ำเนื่องจากอะไมโลเพคตินมีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่ง อะไมโลเพคตินถือว่ามีความสำคัญมากกว่าอะไมโลสทั้งด้านโครงสร้าง หน้าที่และการนำไปใช้ ดังนั้นเมื่อมีอะไมโลเพคตินเพียงอย่างเดียวสามารถรวมตัวเพื่อสร้างเม็ดแป้งได้ปริมาณของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่แตกต่างกันทำให้สมบัติของแป้งแตกต่างกัน โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลเพคตินแสดงดังภาพประกอบ 2-5



ภาพประกอบ 2-5 แสดงโครงสร้างอะไมโลเพคติน (Amylopectin)

จากองค์ประกอบของหลักของแป้งทั้งสองชนิด คือ อะไมโลส และอะไมโลเพค ติน จะมีคุณสมบัติต่างกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตาราง 2-1

ตาราง 2-1 แสดงสมบัติต่างๆ ของอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin)

อะไมโลส	**อะไมโลเพคติน**
1. ประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคสที่ต่อกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะ α-1,4	1. โมเลกุลกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 และมีการแตกกิ่งด้วยพันธะ α-1,6
2. ประกอบด้วยกลูโคส 200-6000 หน่วย	2. แต่ละกิ่งมีกลูโคส 20-25 หน่วย
3. ละลายน้ำได้น้อยกว่า	3. ละลายน้ำได้ดีกว่า
4. เมื่อต้มในน้ำจะมีความข้นหนืดน้อย	4. ข้นหนืดมากและใส
5. ให้สีน้ำเงินกับสารละลายไอโอดีน	5. ให้สีม่วงแดงหรือสีน้ำตาลแดงกับสารละลายไอโอดีน
6. ต้มแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	6. ไม่จับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง

2.1.3.2 คุณสมบัติของแป้ง

แป้งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันไป โดยแสดงดังนี้

(1) การดูดซับน้ำ การพองตัว และการละลาย

เมื่อเติมน้ำลงไปในแป้งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำภายใต้สภาวะบรรยากาศห้อง จนเกิดสมดุลระหว่างความชื้นภายในเม็ดแป้งกับน้ำที่เติม และความชื้นในบรรยากาศ ปริมาณน้ำที่ถูกดูดซึมจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ แป้งดิบจะไม่ละลายในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเจลาติไนซ์ (Gelatinize) เนื่องจากมีพันธะไฮไดรเจน ซึ่งเกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลแป้ง และเมื่ออุณหภูมิของสารผสมน้ำแป้งเพิ่มสูงกว่าช่วงอุณหภูมิเจลาติไนซ์ พันธะไฮโดรเจนจะถูกทำลาย โมเลกุลของน้ำจะเข้ามาจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระ เม็ดแป้งเกิดการพองตัวทำให้การละลาย ความหนืดและความใสเพิ่มขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการพองตัว และความสามารถในการละลายของแป้งมีหลายประเภท ดังนี้

1.1) ชนิดของแป้ง

แป้งแต่ละชนิดมีรูปแบบในการพองตัวและการละลายที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาตามความสามารถในการพองตัวและการละลายของแป้งแล้ว สามารถแบ่งแป้งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ แป้งจากธัญพืช แป้งจากส่วนหัว และแป้งจากส่วนรากหรือส่วนกลางลำต้น (Pith) ซึ่งแป้งจากส่วนรากหรือส่วนกลางลำต้น จะมีกำลังการพองตัวและการละลายมีค่าสูงกว่าแป้งจากธัญพืช เนื่องจากมีจำนวนพันธะน้อยกว่า และแป้งจากส่วนรากจะเกิดเจลาติไนซ์ที่อุณหภูมิต่ำกว่าแป้งจากธัญพืช

1.2) ความแข็งแรงและลักษณะของร่างแหภายในเม็ดแป้ง

ความแข็งแรงและลักษณะของร่างแหภายในเม็ดแป้งจะขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดของพันธะภายในเม็ดแป้ง ซึ่งมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนของพันธะ ได้แก่ ขนาด รูปร่าง ส่วนประกอบและการกระจายตัวของร่างแหภายในเม็ดแป้ง อัตราส่วนของอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) น้ำหนักโมเลกุล การกระจายตัวของโมเลกุล จำนวนกิ่งก้านสาขา การจัดเรียงตัว และความยาวของสาขาในอะไมโลเพคติน (Amylopectin)

(2) ความหนืด

ความหนืดเป็นสมบัติเฉพาะตัวที่สำคัญของแป้ง เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความหนืดของแป้ง ได้แก่ ชนิดของแป้งและการดัดแปรทางกายภาพ เช่น แป้งพรีเจลาติไนซ์หรืออัลฟาสตาร์ช ดัดแปรโดยให้ความร้อนแก่แป้งทำให้แป้งสุก หรือเกิดเจลาติไนซ์ ซึ่งแป้งที่ได้จะกระจายตัวในน้ำเย็นให้ความหนืดทันทีและไม่เกิดเจล

(3) การเกิดเจลาติไนเซชัน

โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl Groups) จำนวนมากยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจน มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) แต่เนื่องจากเม็ดแป้งอยู่ในรูปของร่างแห (Micelles) ดังนั้นการจัดเรียงตัวลักษณะนี้จะทำให้เม็ดแป้งละลายในน้ำเย็นได้ยาก ในขณะที่แป้งอยู่ในน้ำเย็นเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำและพองตัวได้เล็กน้อย แต่เมื่อให้ความร้อนกับสารละลายน้ำแป้ง พันธะไฮโดรเจนจะคลายตัวลง เม็ดแป้งจะดูดน้ำแล้วพองตัว ส่วนผสมของน้ำแป้งจะมีความหนืดมากขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของน้ำอิสระที่เหลืออยู่รอบๆ เม็ดแป้งเหลือน้อยลง ทำให้เม็ดแป้งเคลื่อนไหวได้ยากขึ้น และเกิดความหนืด ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า การเกิดเจลาติไนเซชัน (Gelatinization) อุณหภูมิที่สารละลายเริ่มเกิดความหนืดเรียกว่า อุณหภูมิเริ่มเจลาติไนซ์ เมื่อตรวจด้วยเครื่องมือวัดความหนืดมักเรียกจุดนี้ว่า อุณหภูมิที่เริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืด (Pasting Temperature) หรือเวลาที่เริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืด (Pasting Time) ซึ่งจะแตกต่างกันในแป้งแต่ละ

ชนิด สำหรับแป้งจากพืชหัว เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง จะมีอุณหภูมิเริ่มเจลาติไนซ์ต่ำกว่าอุณหภูมิจากแป้งธัญพืช

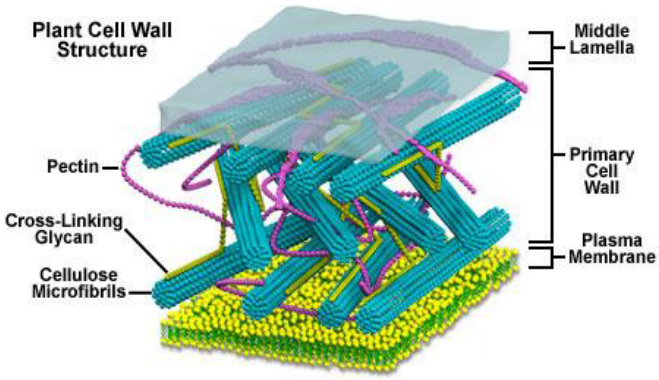
การเกิดเจลาติไนเซชันของเม็ดแป้งแบ่งออกได้ 3 ระยะ คือ ระยะแรกเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำเย็นได้อย่างจำกัดและเกิดการพองตัวแบบผันกลับได้ เนื่องจากร่างแหระหว่างไมเซลล์ (Micelles) ยืดหยุ่นได้จำกัด ความหนืดของสารแขวนลอยจะไม่เพิ่มขึ้นจนเห็นได้ชัด เม็ดแป้งยังคงรักษารูปร่างและโครงสร้างแบบที่เกิดการบิดแสงระนาบโพลาไรซ์ได้ (Birefringence) เมื่อใส่สารเคมีหรือเพิ่มอุณหภูมิให้สารละลายน้ำแป้งจนถึงประมาณ 65 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิจะขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) เมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะที่ 2 เม็ดแป้งจะพองตัวอย่างรวดเร็ว ร่างแหระหว่างไมเซลล์ภายในเม็ดแป้งจะอ่อนแอลง เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย เม็ดแป้งดูดซึมน้ำเข้ามามากและเกิดการพองตัวแบบผันกลับไม่ได้ เรียกว่า การเกิดเจลาติไนเซชัน เม็ดแป้งมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและโครงสร้างแบบที่เกิดการบิดแสงโพลาไรซ์ได้ ความหนืดของสารละลายน้ำแป้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แป้งที่ละลายได้จะเริ่มละลายออกมา เมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนถึงระยะที่ 3 รูปร่างเม็ดแป้งจะไม่แน่นอน การละลายของแป้งจะเพิ่มขึ้น เมื่อนำเม็ดแป้งไปทำให้เย็นจะเกิดเป็นเจล การเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งจะทำให้หมู่ไฮดรอกซิลต่างๆ ของแป้งสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ได้ดีขึ้น ความหนืดสูงสุดของสารละลายน้ำแป้งในระหว่างเจลาติไนซ์จะแปรเปลี่ยนไปตามชนิดของแป้ง

(4) การเกิดรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation)

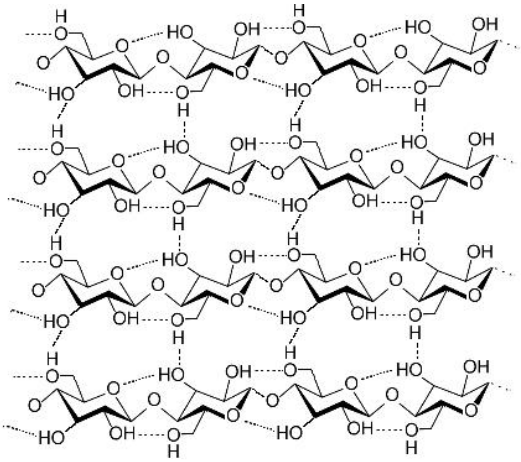
เมื่อแป้งได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่เกิดเจลาติไนเซชันแล้วยังมีการให้ความร้อนต่อไป จะทำให้เม็ดแป้งพองตัวเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่พองตัวเต็มที่และแตกออก โมเลกุลของอะไมโลสขนาดเล็กจะกระจัดกระจายออกมาทำให้ความหนืดลดลง เมื่อปล่อยตัวให้เย็น โมเลกุลอะไมโลสที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล เกิดเป็นร่างแหสามมิติ โครงสร้างใหม่นี้สามารถอุ้มน้ำและไม่มีการดูดน้ำเข้ามาอีก ทำให้มีความหนืดคงตัวมากขึ้น และเกิดลักษณะเจลเหนียวคล้ายฟิล์มหรือผลึก เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเกิดรีโทรเกรเดชันหรือการคืนตัว (Setback) เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงไปอีกลักษณะการเรียงตัวของโครงสร้างจะแน่นมากขึ้น โมเลกุลอิสระของน้ำที่อยู่ภายในจะถูกบีบออกมานอกเจล ปรากฏการณ์ทั้งสองนี้จะทำให้เจลมีลักษณะขาวขุ่น และมีความหนืดเพิ่มขึ้น การคืนตัวของแป้งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของแป้ง ความเข้มข้นของแป้ง กระบวนการให้ความร้อน กระบวนการให้ความเย็น อุณหภูมิ ระยะเวลา ความเป็นกรด-เบส (PH) ของสารละลาย ปริมาณและขนาดของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน และองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ในแป้ง

2.1.3.3 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรท (Carbohydrate) ประเภทโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และมีโครงสร้างเป็นผลึกหรือเป็นพอลิเมอร์สายโซ่ตรง (linear homopolymer) ของกลูโคสที่จับกันด้วยพันธะ β-1, 4-glucosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย นอกจากนี้โดยธรรมชาติของเซลลูโลสจะมีลิกนิน (lignin) จับอยู่ ซึ่งเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลาย แสดงดังภาพประกอบ 2-6 เซลลูโลสมีลักษณะเป็นสายยาวมากกว่า 2000 โมเลกุล แสดงดังภาพประกอบ 2-7 ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลพืช เช่น ผัก ผลไม้ เมล็ดธัญพืช โดยจะอยู่รวมกับเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และเพคติน (Pectin)



ภาพประกอบ 2-6 แสดงโครงสร้างผนังเซลพืช (plant cell wall structure) ซึ่งมีเซลลูโลสและเพคตินเป็นส่วนประกอบหลัก (ที่มา http://micro.magnet.fsu.edu)



ภาพประกอบ 2-7 แสดงโครงสร้างเซลลูโลส (Cellulose)

2.2 ลูกแป้ง

ลูกแป้ง คือ กล้าเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculum) ที่เก็บในรูปเชื้อแห้งเพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดในประเทศแถบเอเชีย แสดงดังภาพประกอบ 2-8 เทคโนโลยีในการผลิตและการใช้ลูกแป้งมีมาแต่โบราณก่อนที่มนุษย์จะเข้าใจถึงศาสตร์ทางจุลชีววิทยา มีความเข้าใจกันว่ามีต้นกำเนิดจากประเทศจีน และถ่ายทอดไปยังประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย กล้าเชื้อในลักษณะนี้มีชื่อเรียกตามภาษาท้องถิ่นของแต่ละประเทศ เช่น ประเทศอินโดนีเซีย เรียกว่า “Ragi” ประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า “Bubod” ประเทศเกาหลี เรียกว่า “Nuruk” ประเทศไต้หวัน เรียกว่า “Chinese yeast” ส่วนใหญ่การใช้ประโยชน์จะคล้ายคลึงกัน คือ ใช้ในการหมักที่มีกิจกรรมการเปลี่ยนแป้งวัตถุดิบประเภทธัญพืชและพืชหัวให้เป็นน้ำตาล (Saccharification) และแอลกอฮอล์ เพื่อผลิตอาหารประเภทข้าวหมาก สุรา เช่น กระแช่ สาโท (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2553)

ภาพประกอบ 2-8 แสดงลักษณะของลูกแป้งข้าวหมาก

สำหรับประเทศไทยลูกแป้งที่ใช้มาแต่โบราณถึงปัจจุบัน ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้าซึ่งใช้หมักสุรา กระแช่ น้ำขาว สาโทและอุ และลูกแป้งน้ำส้มสายชูหรือที่เรียกว่าส่าน้ำส้ม ลูกแป้งทั้งสามชนิดประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดที่สำคัญคือ เชื้อราซึ่งสามารถย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลและยีสต์ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ลักษณะของลูกแป้งจะแตกต่างกันไปแต่ละพื้นที่ ไม่ว่าจะเป็นขนาดของลูกแป้ง สีของลูกแป้ง น้ำหนักของลูกแป้ง กลิ่นรสของลูกแป้งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีการผลิต และองค์ประกอบที่ใช้ในการทำลูกแป้งของแต่ละพื้นที่

2.2.1 องค์ประกอบต่างๆ ที่สำคัญในการทำลูกแป้ง ได้แก่ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2553)

2.2.1.1 แป้ง

ใช้ได้ทั้งแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้า แต่ผลจากการศึกษาพบว่าลูกแป้งที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวเจ้าล้วนๆ จะมีคุณภาพดีกว่าที่ผลิตด้วยแป้งข้าวเหนียว หรือแป้งข้าวเจ้าผสมแป้งข้าวเหนียว ข้าวที่ใช้ผลิตแป้งต้องไม่เก่า หรือไม่อับเชื้อรา ไม่นิยมใช้แป้งสำเร็จ ทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และหลีกเลี่ยงกรดโพรพิโอนิกที่เป็นสารยับยั้งเชื้อราซึ่งมักใส่ลงไปในแป้งสำเร็จ (นภา โล่ทอง, 2537)

2.2.1.2 เครื่องเทศหรือสมุนไพร

เป็นส่วนผสมสำคัญซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการในลูกแป้ง โดยชนิดและปริมาณการในการใช้เครื่องเทศจะขึ้นอยู่กับแต่ละสูตร ซึ่งต้องคำนึงถึงความสะอาด ความสดและความใหม่ รวมถึงไม่ควรบดเครื่องเทศก่อนใช้งานนานๆ เพราะสิ่งเหล่านี้จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของเครื่องเทศและสมุนไพรเหล่านั้น

2.2.1.3 น้ำ

ปริมาณน้ำที่ใช้มีความสำคัญมากในการควบคุมความชื้นของลูกแป้ง โดยต้องไม่ให้แฉะจนเกินไปจะทำให้ลูกแป้งเหม็นเปรี้ยวและเสียได้ หรือแห้งจนเกินไปจนลูกแป้งแตกหรือเชื้อราเจริญในลูกแป้งได้ไม่ดี ความชื้นที่เหมาะสมสำหรับลูกแป้งอยู่ประมาณ 45% เพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์ในลูกแป้งให้อยู่นานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2.1.4 ลูกแป้งเดิม

ซึ่งใช้เป็นแหล่งจุลินทรีย์จะต้องเป็นลูกแป้งที่ไม่เก็บไว้นานจนเกินไป หรือถูกมอดกินหรือใช้ลูกแป้งซึ่งมีเชื้อราอื่นปนเปื้อนอยู่ภายนอกจนเห็นได้ชัด

2.2.1.5 รำหยาบหรือแกลบ

ใส่เพื่อให้ลูกแป้งโปร่ง มีอากาศเข้าได้มาก ทำให้จุลินทรีย์สำคัญสามารถเจริญได้ดี (บางสูตรใช้ บางสูตรไม่ใช้)

2.2.2 กรรมวิธีการทำลูกแป้ง (กอ สะแกกรัง, 2545) แสดงดังภาพประกอบ 2-9 สามารถทำได้ ดังนี้

2.2.2.1 นำข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวมาซาวน้ำให้สะอาด แช่น้ำไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำขึ้นมาทำให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดโดยใช้การโม่ด้วยเครื่องหรือตำด้วย

ครก เสร็จแล้วนำเนื้อแป้งมาห่อด้วยผ้าวางทับด้วยของหนักจนน้ำแห้ง แล้วนำมาร่อนด้วยกระชอน ซึ่งการแช่ข้าวเจ้า หรือข้าวเหนียวในน้ำนานจนเกินไปโดยไม่เปลี่ยนน้ำ จะมีผลให้แบคทีเรียแลคติก และ *Bacillus* sp. เจริญเพิ่มจำนวนในปริมาณมาก ทำให้ลูกแป้งที่ผลิตได้ด้อยคุณภาพ (นภา, 2537)

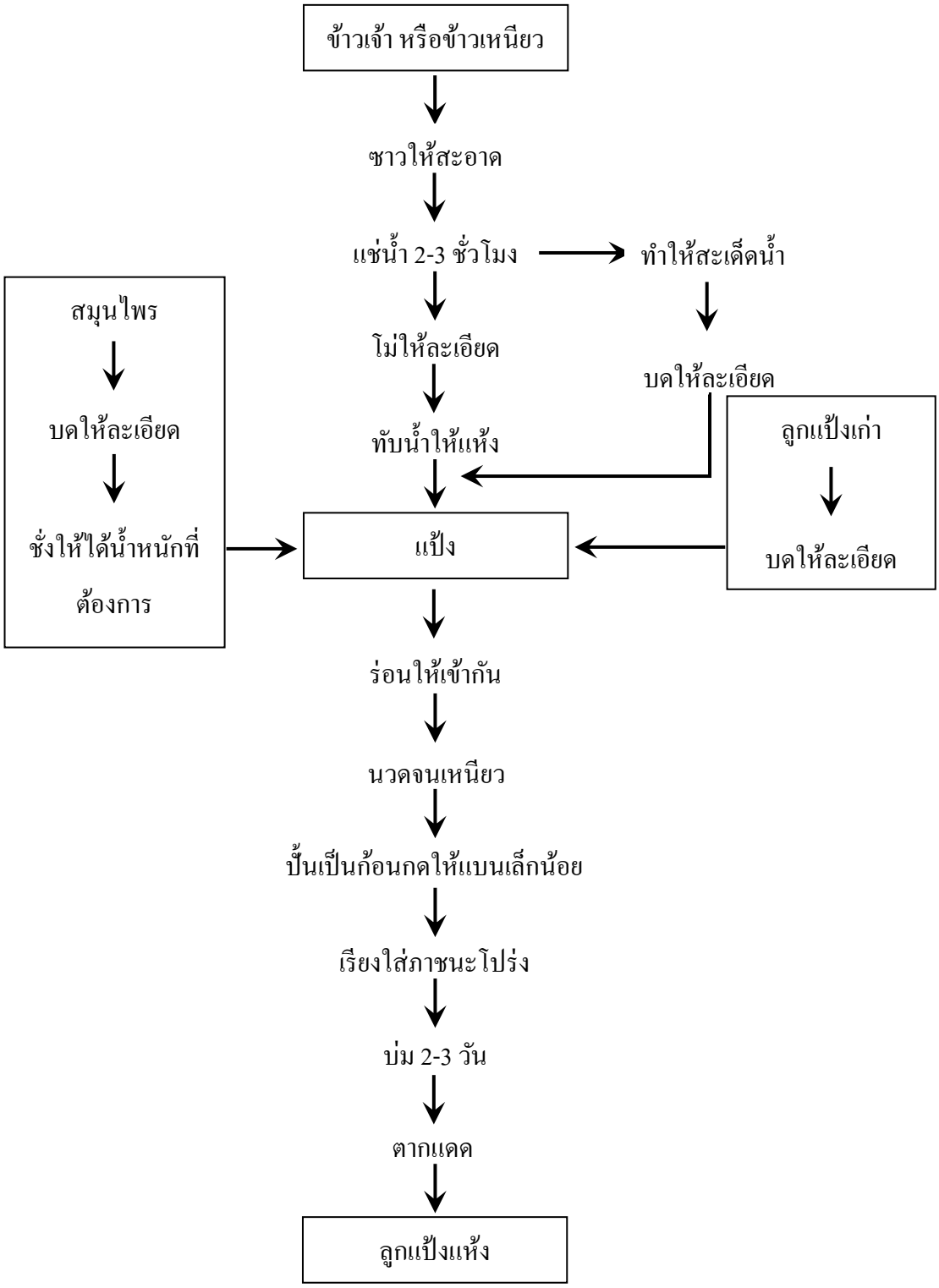
2.2.2.2 บดสมุนไพรชนิดแห้งให้ละเอียดจนสามารถร่อนผ่านกระชอนได้ ซึ่งสมุนไพรอาจนำไปบดพร้อมกับข้าว แล้วชั่งให้ได้น้ำหนักตามต้องการ

2.2.2.3 บดลูกแป้งเก่าให้ละเอียด

2.2.2.4 นำส่วนผสมทั้งสามอย่างมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน คือ แป้งข้าวเหนียวหรือข้าวเจ้า สมุนไพร และลูกแป้งเก่า

2.2.2.5 นวดแป้งเพื่อที่จะปั้นก้อนลูกแป้ง โดยการค่อยๆ พรมน้ำสะอาดลงไปพร้อมกับนวดแป้งไปจนแป้งเหนียวพอที่จะปั้นเป็นก้อนได้ พบว่าการหมักแป้งที่นวดแล้วไว้ประมาณ 6-12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั้นจะได้ลูกแป้งที่มีคุณภาพดีกว่าที่ปั้นโดยไม่หมักแป้ง (นภา โล่ทอง, 2537)

2.2.2.6 ปั้นเป็นลูกกลมๆ แล้วนำไปวางไว้ในกระด้งที่รองด้วยใบตองสะอาด คลุมด้วยผ้าขาวบางสองชั้น เพื่อให้เกิดการอบ และบ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ลูกแป้งจะมีราสีขาวเกิดขึ้น จากนั้นจึงนำไปตากแดดให้แห้ง แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่แห้งสนิท อย่าให้ถูกความชื้นหรือที่มีความร้อน จะเก็บไว้ได้นาน 6 เดือน



ภาพประกอบ 2-9 แสดงแผนภูมิการผลิตลูกแป้ง (นภา โล่ทอง, 2534)

2.2.3 จุลินทรีย์ในลูกแป้ง

ลูกแป้งเป็น “กล้าเชื้อจุลินทรีย์” (inoculum) ที่อยู่ในรูปของเชื้อแห้งที่มีทั้งเชื้อราและยีสต์ เพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดในเอเชีย (นภา โล่ทอง, 2535) โดยใช้ลูกแป้งเป็นสตาร์ทเตอร์ (starter) คุณภาพและลักษณะทั่วไปของลูกแป้งที่ดี คือ จะมีลักษณะโปร่งเบา สีขาวนวล ไม่มีรอยแตกร้าว และมีรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีรูปร่างและขนาดต่างๆ กัน ลูกแป้งมี 2 ประเภทคือ ลูกแป้งข้าวหมากสำหรับทำข้าวหมากและลูกแป้งสุรา ซึ่งลูกแป้งทั้งสองประเภทนี้มีกรรมวิธีที่เหมือนกัน แต่ต่างกันที่ส่วนประกอบของเครื่องเทศและชนิดจุลินทรีย์ในลูกแป้ง สำหรับลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งสุราพบชนิดของเชื้อราและยีสต์ ดังรายละเอียดในตาราง 2-2

ตาราง 2-2 แสดงเชื้อราและยีสต์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมาก (นภา โล่ทอง, 2534)

ชนิดของลูกแป้ง	เชื้อรา	ยีสต์
ลูกแป้งข้าวหมาก	*Amylomyces rouxii* *Rhizopus spp.* *Mucor spp.* *Aspergillus niger* *Aspergillus spp.* *Penicillium spp.* *Hyalodendron spp.*	*Endomycopsis fibuligera* *Endomycopsis spp.* *Hansenula malanga* *Candida tropiccalis* *Tonilopsis glabrata* *Saccharomyces cerevisiae*
ลูกแป้งสุรา	*Rhizopus spp.* *A. rouxii* *Mucor spp.* *Aspergillus spp.* *Penicillium spp.*	*Saccharomyces cerevisiae* *Endomycopsis fibuligera* *Endomycopsis spp.*

จิราภรณ์ สุขุมาวาสี (2518) ทำการศึกษาการแยกเชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมากจาก 10 แหล่ง พบว่ามีจุลินทรีย์ 23 ชนิด ที่ให้เอ็นไซม์ย่อยแป้ง ซึ่งได้แก่ รา 15 ชนิด ยีสต์ 7

ชนิดและบักเตรี 1 ชนิด ซึ่งจุลินทรีย์ที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดคือ รา ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus niger* และยีสต์ในกลุ่ม *Endomycopsis*

วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต และคณะ (2547) ทำการศึกษาการแยกเชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทยจำนวน 19 ตัวอย่าง และลูกแป้งเหล้า 18 ตัวอย่าง สามารถแยกราได้ 51 ไอโซเลท ซึ่งมี 6 ไอโซเลทคือ SML04, SML13, SML17, SML18, SMM06 และ SMM15 ให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสมากกว่า 2 U/ml และมี 1ไอโซเลทคือ SML04 ที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อยแป้งดิบสูงถึง 30.11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเชื้อในกลุ่ม *Amylomyces* และ *Rhizopus* และสามารถแยกยีสต์จำนวน 53 ไอโซเลท มี 3 ไอโซเลทคือ SYL16, SYL18 และSYL20 ซึ่งมีเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สร้างแอลกอฮอล์สูงกว่า 9 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

Limtong และคณะ (2002) ทำการศึกษาการแยกยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมากจำนวน 43 ไอโซเลท จาก 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งลาว 49 ไอโซเลท จาก 19 ตัวอย่าง มี 31 ไอโซเลทจากลูกแป้งข้าวหมากและ 20 ไอโซเลทจากลูกแป้งลาว พบว่ามียีสต์จำพวก *Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *P. burtonii*, *P. fabianii*, *Candida rhagii*, *C. glabrata*, *Torulaspora globosa*, *P. Mexicana*, *P. heimii*, *Rhodotorula philyla*, *Saccharomyces cerevisiae*, *T. delbrueckii* และ *Trichosporon asahii* และยังพบอีกว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* ให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมเลส (amylolytic activity) สูงที่สุด แต่สามารถผลิตเอทานอลได้เพียง 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส (glucose) 18 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์อื่นๆ เช่น *T. globosa* YKM032, *I. orientalis* YMK036, *P. burtonii* YKM034 และ *P. burtonii* YL048 มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่า

Limtong และคณะ (2005) ทำการศึกษาการแยกเชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมากจำนวน 38 ตัวอย่าง สามารถแยกราได้ 91 ไอโซเลต โดยกลุ่มเชื้อราที่พบในลูกแป้งข้าวหมากส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม *Amylomyces* และ *Rhizopus* อีกทั้งยังพบเชื้อราในกลุ่ม *Actinomucor*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Monascus* และ *Penicillium* ซึ่งไอโซเลตที่มีกลุ่มเชื้อรา *Amylomyces* และ *Rhizopus* จะมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมเลส (Amylolytic activity) สูงที่สุด

Dung และคณะ (2006) ทำการศึกษาการแยกยีสต์ในลูกแป้งของเวียดนาม 6 ตัวอย่าง พบว่ามียีสต์ 51 ไอโซเลท โดยยีสต์ที่มีสมบัติในการผลิตเอทานอลสูงสุด คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจากการทดสอบการหมักเอทานอลในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 20 พบว่าได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 8.8 และ *Saccharomyces cerevisiae* ยังมีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอล (Ethanol tolerance) สูงถึงร้อยละ 9-10 โดยปริมาตร

Dung และคณะ (2007) ทำการศึกษาการแยกเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งของเวียดนาม 29 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อได้ 119 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย เชื้อรา 53 ไอโซเลต ยีสต์ 51 ไอโซเลท และแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท โดยเชื้อราที่พบมากคือ *Amylomyces rouxii*, *Amylomyces aff. rouxii*, *Rhizopus oligosporus* และ *Rhizopus oryzae* ส่วนยีสต์ที่พบมากคือ *Saccharomyces cerevisiae* อีกทั้งยังพบเชื้อจำพวก *Candida glabrala* และ *Pichia anomala* ในปริมาณน้อย

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ (สารอโศก, 2544) มีดังต่อไปนี้

2.2.4.1 ความชื้น ต้องไม่น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์

2.2.4.2 อุณหภูมิ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของราอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของยีสต์อยู่ในช่วง 25 - 35 องศาเซลเซียส (จากข้อมูลจังหวัดสงขลา อุณหภูมิเฉลี่ยของทุกฤดูกาลอยู่ในช่วง 26 – 30 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในช่วงที่ราและยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้)

2.2.4.3 ค่าพีเอช สำหรับพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของราอยู่ในช่วง 2 – 8.5 และพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของยีสต์อยู่ในช่วง 4.5 – 6.5 (สำหรับค่าพีเอชในการหมักเอทานอลโดยใช้เปลือกอ่อนของเต้าตาลเป็นวัตถุดิบมีค่าพีเอชเท่ากับ 5 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ราและยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้)

2.2.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารที่ใช้ในการดำรงชีวิตของราและยีสต์ เช่น น้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส

2.3 ยีสต์ขนมปัง (ที่มา http://www.foodietaste.com)

ยีสต์ขนมปังมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมักนำไปผสมกับแป้งสาลีและน้ำตาล เพื่อทำให้ขนมปังฟู ยีสต์ขนมปังเป็นเชื้อราชนิดหนึ่งซึ่งมีรูปร่างกลม มีขนาด 5-10 ไมครอน (Micron) และขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ ยีสต์ขนมปังที่จำหน่ายในท้องตลาดมี 3 ชนิด คือ ยีสต์สด (Fresh or Compressed Yeast) ยีสต์เม็ด หรือยีสต์น้ำ (Active Dried Yeast) และยีสต์ผง (Instant Yeast)

ยีสต์สด ผลิตขึ้นโดยการเลี้ยงและอัดรวมกันเป็นก้อนคล้ายก้อนเนย มีสีน้ำตาลอ่อนค่อนข้างขาว แสดงดังภาพประกอบ 2-10 (ก) โดยมีอาหารของยีสต์ที่เปียกชื้นขึ้นเป็นก้อนแข็ง และมีความชื้นประมาณร้อยละ 70 สำหรับการทำงานของยีสต์จะช้าลงที่อุณหภูมิต่ำดังนั้นจึงควร

เก็บในตู้เย็น โดยต้องเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส ส่วนยีสต์เม็ดและยีสต์ผงเป็นยีสต์แห้งทำมาจากการนำยีสต์สดไปอบแห้ง โดยยีสต์เม็ด หรือยีสต์น้ำมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ ท่อนสั้นๆ แสดงดังภาพประกอบ 2-10 (ข) ยีสต์แห้งอยู่ในสภาพการพักตัว ควรเก็บในสถานที่แห้งและเย็น วิธีใช้คือผสมน้ำอุ่นกับน้ำตาลจนละลาย แล้วจึงโรยยีสต์ลงบนผิวน้ำ ก่อนนำไปผสมในแป้ง ซึ่งยีสต์จะมีความชื้นประมาณร้อยละ 8 – 9 สำหรับยีสต์ผงมีลักษณะเป็นผงละเอียดและแห้ง แสดงดังภาพประกอบ 2-10 (ค) สามารถนำไปใช้งานได้โดยตรง อีกทั้งเป็นยีสต์ที่มีกำลังหมักสูง และมีความชื้นประมาณร้อยละ 5–6

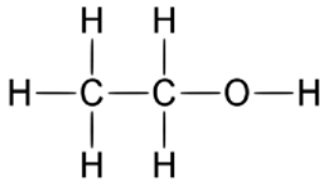
(ก) (ข) (ค)

ภาพประกอบ 2-10 แสดงภาพยีสต์ขนมปังชนิด (ก) ยีสต์สด (Fresh or Compressed Yeast) (ข) ยีสต์เม็ด หรือยีสต์น้ำ (Active Dried Yeast) และ (ค) ยีสต์ผง (Instant Yeast)

2.4 เอทานอล

2.4.1 สมบัติทางเคมีของเอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มีสูตรทางเคมี คือ C_2H_5OH โครงสร้างเอทานอลทางเคมีของเอทานอลแสดงดังภาพประกอบที่ 2-11 เอทานอลมีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 เป็นของเหลวใสไม่มีสี ติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงินไม่มีควัน มีจุดเดือดเท่ากับ 78.27 ที่ความดันบรรยากาศ 1 atm จุดเยือกแข็ง -126 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -110.5 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นที่ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.791 และให้ค่าพลังงานความร้อน (Calorific value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 12,800 บีทียูต่อปอนด์ (Zoeklein และคณะ, 1995)



ภาพประกอบ 2-11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเอทานอล

2.4.2 กระบวนการผลิตเอทานอล สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ (คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

2.4.2.1 การสังเคราะห์ทางเคมี

เป็นการผลิตเอทานอลจากเอทิลีน (Ethylene) ซึ่งเป็นอนุพันธ์สารปิโตรเลียม โดยใช้กระบวนการแคทตาไลติกไฮเดรชัน (Catalytic Hydration) เอทานอลที่ได้จะเรียกว่า เอทานอลสังเคราะห์ (Synthetic Ethanol) แสดงดังสมการ 1

$$CH_2 = CH_2 + H_2O \xrightarrow{H_3PO_4} CH_3CH_2OH \text{ (Ethanol)} \qquad \text{(สมการ 1)}$$

2.4.2.2 การหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์

เป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซึ่งได้จากผลผลิต หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยอาศัยกระบวนการทางชีวเคมี โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลเป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งตามทฤษฎี น้ำตาลเพียงร้อยละ 95 เท่านั้นที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้สำหรับการเจริญเติบโตของตัวมันเองและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 100 จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 48.89 และเอทานอลร้อยละ 51.11 โดยน้ำหนัก เอทานอลที่ผลิตได้จะเรียกว่า ไบโอเอทานอล (Bio-ethanol) แสดงดังสมการ 2

$$\underset{\text{(น้ำตาล)}}{n\ C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{yeast}} \underset{\text{(เอทานอล)}}{2n\ C_2H_5OH} + 2n\ CO_2 \qquad \text{(สมการ 2)}$$

สำหรับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอลโดยวิธีการทางชีวเคมีจะมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ โดยสามารถแบ่งวัตถุดิบออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

(1) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีตรูท และข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น ซึ่งยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการใดๆ เมื่อนำกลูโคส 1 โมเลกุล มาหมักด้วยยีสต์ จะได้เอทานอล 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล (Murphy, 2005) ดังแสดงในสมการ 3

$$\underset{\text{Glucose}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{Yeast}} \underset{\text{Ethanol}}{2C_2H_5OH} + 2CO_2 \qquad \text{(สมการ 3)}$$

(2) วัตถุดิบประเภทแป้ง

ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรจำพวกธัญพืช เช่น ข้าวจ้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น ซึ่งแป้งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำแป้งมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จากนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นเอทานอล ซึ่งตามทฤษฎีการเปลี่ยนแป้งให้เป็นเอทานอล พบว่าแป้ง 90 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคส 100 กรัม จากนั้นเชื้อยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 48.89 กรัม และแอลกอฮอล์ 51.11 กรัม ซึ่งแสดงดังสมการ 4

$$\underset{\text{Starch}}{(\text{-}C_6H_{10}O_5\text{-})_n} + \underset{\text{Water}}{nH_2O} \longrightarrow \underset{\text{Glucose}}{nC_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{Ethanol}}{2nCH_3CH_2OH} + \underset{\text{Carbon dioxide}}{2n\,CO_2} \qquad \text{(สมการ 4)}$$

Starch	Water	Glucose	Ethanol	Carbon dioxide
90	10	100	51.11	48.89

การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งจะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนด้วยวิธีการทางเคมี ฟิสิกส์ หรือวิธีทางชีวภาพ เพื่อทำให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมก่อนนำไปหมัก สำหรับกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลมี 3 วิธี คือ

1) การใช้กรด (Acid Hydrolysis)

กรดที่สามารถใช้ในการย่อยแป้งมีหลายชนิด ซึ่งจะย่อยแป้งให้มีขนาดเล็กลง ได้แก่ กรดเกลือ (HCl), กรดคาร์บอนิก (H_2CO_3), กรดไนตริก (HNO_3), กรดกำมะถัน (H_2SO_4) และพบว่ากรดไนตริกสามารถย่อยสลายแป้งได้ดีกว่ากรดเกลือ หรือกรดชนิดอื่น ปัจจุบันการใช้กรดในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากการย่อยแป้งด้วยกรดต้องทำปฏิกิริยาร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิสูง ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรด เวลาและอุณหภูมิในการย่อย อีกทั้งยังก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เช่น สารเฟอร์ฟูรอล

2) การใช้เอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้กรด เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อชนิดของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งสภาวะที่ใช้ในการย่อยก็ไม่รุนแรง ทำให้ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาง่าย ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง รวมทั้งไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความทนทานต่อการกัดกร่อนสูงเช่นเดียวกับการใช้กรด การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์นั้นเป็นที่นิยม เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก รวมทั้งไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม แต่มีข้อเสียตรงที่ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

3) การใช้เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และราบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อราในกลุ่ม *Rhizopus*, *Aspergillus* และแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus*, *Clostridia* และ *Pseudomonas* เป็นต้น (จิราภรณ์, 2518)

(3) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)

ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ส่วนใหญ่วัตถุดิบในกลุ่มนี้จะทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก ซึ่งขั้นตอนในการผลิตเอทานอลประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการปรับสภาพ (Pretreatment) และขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) (Binod, 2010) ดังนี้

1) การปรับสภาพ (Pretreatment)

ขั้นตอนแรกในกระบวนการผลิตเอทานอล คือ การปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการหมัก เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือเซลลูโลสเป็นสารผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน

(complex) กับเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) ซึ่งส่วนของเซลลูโลสคือส่วนที่จะนำมาใช้จริงเท่านั้น อีกทั้งส่วนประกอบทั้งสองยังทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาน้อยลง โดยลิกนินจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักอีกด้วย (Fermentation) ดังนั้นการปรับสภาพวัตถุดิบมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากเซลลูโลส และเป็นการปรับโครงสร้างเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม คือ ลดการเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มการเป็นรูพรุนของวัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์เข้าถึงและทำปฏิกิริยาได้ดี ซึ่งการปรับสภาพที่นิยมใช้มี 4 วิธี ดังนี้

1.1) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การโม่/บด การใช้รังสี (Electron Beam Irradiation) การใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave Pretreatment)

1.2) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment)

โดยการใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส หรือใช้สารละลายเบสเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เช่น การใช้สารประกอบอัลคาไลน์ (Alkali Pretreatment) การใช้แอมโมเนีย (Ammonia Pretreatment) การใช้กรด (Acid Pretreatment)

1.3) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพ (Physico-Chemical Pretreatment)

เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) ในสภาวะความดันสูง พบว่าประสิทธิภาพในการปรับสภาพฟางข้าวจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนที่เพิ่มขึ้น

1.4) การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological Pretreatment)

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก

∉ ความสำคัญของขั้นตอนการปรับสภาพ มีดังนี้

1. เพิ่มปริมาณการผลิตน้ำตาล
2. ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต

3. หลีกเลี่ยงการเกิดตัวยับยั้งในขั้นตอนการไฮโดรไลซิส และการหมัก

4. ลดต้นทุนในการผลิต

2) การย่อย (Hydrolysis)

เนื่องจากวัสดุชนิดลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นเมื่อทำการย่อยเซลลูโลสจะได้น้ำตาลออกมา ถ้าการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าไม่สมบูรณ์จะเกิดทั้งกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลหลายชนิด ซึ่งจะขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส สำหรับการย่อยมี 2 วิธีด้วยกันที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ

2.1) การย่อยทางเคมี

เป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรง ซึ่งสามารถใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง แต่จะได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เพราะน้ำตาลที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อและกรดอาจทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ได้แก่ กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 70 ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 40 ขึ้นไป กรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 1 เป็นต้น และต้องใช้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรงและไม่เฉพาะเจาะจง โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อน

2.2) การย่อยโดยใช้เอนไซม์

เอนไซม์จะทำปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลสให้ผลผลิตเป็นน้ำตาล การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง และจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก ทำให้ไม่สูญเสียกลูโคสระหว่างการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ แต่จะใช้เวลานานกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการย่อยทางเคมี เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ *Trichoderma viride* หรือภายหลังจัดอยู่ใน *T. reessi*

∉ ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

1. เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ จึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อนทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต

2. ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาถึงภาวะสมดุลได้เร็ว

3. เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง

4. ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น

5. เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามที่ต้องการ

6. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน

เอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2-3 เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลมีหลายชนิด แต่วัตถุดิบที่เหมาะสมมีหลักเกณฑ์การเลือกดังนี้ คือ หาได้ง่าย ราคาถูก มีปริมาณเพียงพอต่อการผลิตตลอดปี

ตาราง 2-3 การเปรียบเทียบปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดต่างๆ (ณัฐกฤต, 2553)

วัตถุดิบที่มีน้ำหนัก 1 ตัน	ปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร)
กากน้ำตาล	260
อ้อย	70
ข้าวฟาง	70
หัวมันสำปะหลังสด	180
ธัญพืช (เช่น ข้าว ข้าวโพด)	375
น้ำมะพร้าว	83

สำหรับการเลือกใช้วัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลของแต่ละประเทศจะใช้วัตถุดิบแตกต่างกันออกไป เช่น ประเทศบราซิลซึ่งเป็นผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ที่สุดของโลกเลือกใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลัก ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกาจะใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบหลักในการ

ผลิตเอทานอล สำหรับประเทศไทยนั้นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลมี 3 ชนิด ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง ปัจจุบันมีการให้ความสนใจในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงเอทานอล นอกจากจะช่วยลดการแย่งแหล่งอาหารของมนุษย์แล้ว ยังช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรซึ่งเป็นประชากรหลักของประเทศอีกด้วย

2.4.3 กลไกการย่อยแป้ง (พักตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546) โดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

2.4.3.1 การเกิดเจลาติไนเซชัน (Gelatinization)

เป็นขั้นตอนที่ทำให้เม็ดแป้งพองตัว โดยเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำขณะที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงประมาณ 80-95 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้เม็ดแป้งพองตัว อุณหภูมิช่วงนี้เรียกว่าอุณหภูมิการเกิดเจล (Gelatinization temperature)

2.4.3.2 การเกิดลิเคอแฟคชัน (Liquefaction)

เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งที่เกิดเจล โดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มของสายโซ่กลูโคส ทำให้แยกเป็นสายสั้นๆ มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและมีความหนืดลดลง

2.4.3.3 การเกิดแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification)

เป็นขั้นตอนการย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ภายหลังการย่อยจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่า ผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส มอลโตส หรือมอลโตไตรโอส

2.4.4 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง (พักตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

เอนไซม์ที่สามารถใช้ในการย่อยแป้งมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะให้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยแป้ง แบ่งออกได้ 4 กลุ่ม ดังนี้

2.4.4.1 Endoamylase

เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลของแป้ง จะตัดพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิกระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของของอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (α-Amylase) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของแอลฟาอะไมเลส (α-Amylase) คือ โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) และ α-limit-dextrins

2.4.4.2 Exoamylase

เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสที่พันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) เบต้าอะไมเลส (β-Amylase) และแอลฟากลูโคซิเดส (α-Glucosidase) ซึ่งการทำงานจะตัดโมเลกุลกลูโคสที่ตำแหน่งปลายของอะไมเลส (Amylase) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นกลูโคสเพียงอย่างเดียว เมื่อใช้กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) และแอลฟากลูโคซิเดส (α-Glucosidase) จะได้มอลโตส (Maltose) เป็นผลิตภัณฑ์และ β-limit-dextrins เมื่อใช้เอนไซม์เบต้าอะไมเลส (β-Amylase)

2.4.4.3 Debranching enzyme

เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ α-1,6 กลูโคซิดิก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไอโซอะไมเลส (Isoamylase) และพูลูแลนเนส (Pululanase) การทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้จะทำการย่อยพันธะในส่วนกิ่งของอะไมโลเพคติน (Amylopectin) หรือการย่อยพันธะ α-1,6 กลูโคซิดิก ในพูลูแลน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide)

2.4.4.4 Transferase

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับ α-1,4 กลูโคซิดิก ของ donor molecule และเปลี่ยนส่วนของ donor เพื่อเป็น Glycosidic acceptor ซึ่งเป็นการสร้างพันธะกลูโคซิดิกใหม่ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Amylomaltase และ Cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) ซึ่งจะใช้ในการผลิตไซโคลเดกทริน (Cyclodextrin) โดยการสร้างเป็น Cyclic oligosaccharide ที่มีกลูโคส 7-8 หน่วย

2.5 การหมัก (Fermentation)

ขั้นตอนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปการหมักจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีความสามารถในการเจริญได้อย่างรวดเร็ว มีความคงทนต่อแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณสูง รวมถึงสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณสูงด้วย

ในทางปฏิบัติน้ำตาลเพียงร้อยละ 95 เท่านั้นที่จะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ ส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้สำหรับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่น ได้แก่

Acetaldehyde	ร้อยละ 0-0.03
Acetic acid	ร้อยละ 0.05-0.25
Glycerine	ร้อยละ 2.5-3.6
Lactic acid	ร้อยละ 0-0.2
Succinic acid	ร้อยละ 0.5-0.77
Fusel oil	ร้อยละ 0.25-0.5
Furfural	เล็กน้อย

สำหรับการหมักแอลกอฮอล์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

(1) การหมักแบบกะ (Batch Fermentation) เป็นกระบวนการหมักภายในระบบปิด โดยอาศัยการเติมวัตถุดิบ สารอาหาร และหัวเชื้อ ลงไปในถังหมักเพียงครั้งเดียวตลอดกระบวนการ เนื่องจากไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่มเข้าไป ทำให้ภาวะในระบบมีการเปลี่ยนแปลง เช่น ความเป็นกรดด่าง (pH)

(2) การหมักแบบเฟดแบทช์ (Fed Batch Fermentation) เป็นกระบวนการที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปในถังหมักอย่างต่อเนื่อง หลังจากที่ใส่เชื้อเริ่มต้นแล้ว โดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วออก ซึ่งปริมาตรของอาหารในการหมักแบบเฟดแบทช์จะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่

(3) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักและแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลา ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดในระยะเวลาเท่ากันเมื่อเทียบกับการหมักทั้งสองวิธีที่กล่าวมา

2.5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมัก

เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการหมักสูงสุด และได้ปริมาณเอทานอลสูง จำเป็นต้องมีการควบคุมสิ่งแวดล้อมในการหมักในทุกขั้นตอน เพื่อให้เหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์ในการหมักเอทานอล ดังนี้

2.5.1.1 ความเข้มข้นของน้ำตาล

ความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ คือ การที่กลูโคสหรือแป้ง (คาร์โบไฮเดรต) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้ความสามารถในการหายใจเสียไป หรือที่เรียกว่า Crabtree หรือ Glucose effect ซึ่งเป็นการกดดันเมตาบอลิซึม (Metabolism) ที่

เกิดขึ้นเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นระดับหนึ่ง คือ มีกลูโคส (Glucose) หรือซูโครส (Sucrose) ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.02-0.1 โดยน้ำหนัก ทำให้การหายใจถูกยับยั้งอย่างรุนแรง (สาวิตรี, 2549)

2.5.1.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ เนื่องจากในระหว่างการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้นในระบบ ซึ่งเกิดจากการทำงานของยีสต์ โดยการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสจะเกิดความร้อนประมาณ 140.2 แคลลอรี่ต่อกรัมกลูโคส ซึ่งจะถ่ายเทความร้อนลงในน้ำหมัก ทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ในสภาพที่อาหารอุดมสมบูรณ์ ยีสต์จะทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี และจะหยุดเจริญเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 และเกินกว่า 40 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ที่ใช้ (Hughes, 1984)

2.5.1.3 ค่าพีเอช

ยีสต์เจริญได้ดีที่ค่าพีเอชในช่วงที่เป็นกรด คือ ในช่วงพีเอช 3.0-6.5 โดยมีค่าที่เหมาะสมประมาณ 4.5 และถ้าพีเอชต่ำกว่า 3.0 จะส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ลดลง ซึ่งในสภาพกรดอ่อนนี้สามารถช่วยควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ดี ซึ่งการหมักเอทานอลจากซูโครสมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชมากกว่าการใช้กลูโคส (Rose, 1987)

2.5.1.4 ความเข้มข้นของเอทานอล

ในสภาพที่มีเอทานอลสูงการเจริญและการหมักเอทานอลด้วยยีสต์จะถูกยับยั้ง เพราะเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์ยีสต์ เมื่อเอทานอลมีความเข้มข้นร้อยละ 4.7-7.8 โดยน้ำหนัก ยีสต์จะหยุดการเจริญเติบโต การที่ยีสต์ไม่เจริญเติบโตจะส่งผลให้อัตราการหมักลดลงด้วย

2.5.1.5 ปริมาณออกซิเจน

เนื่องจากยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่จะมีผลให้การหมักลดลง ยีสต์จะใช้ออกซิเจนในการหายใจเพื่อการเจริญเติบโตและแตกหน่อ (Budding) โดยจะไม่ให้เอทานอลออกมาแต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้นเท่านั้น ดังนั้นการหมักอย่างต่อเนื่องควรมีอากาศบ้างในระหว่างการหมัก เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ทดแทนเซลล์ที่ตายลง และยังพบว่าการให้อากาศเพียงเล็กน้อย จะทำให้มีการใช้กลูโคสได้มากขึ้น และช่วยให้ยีสต์มีความทนทานต่อเอทานอลได้ดีอีกด้วย

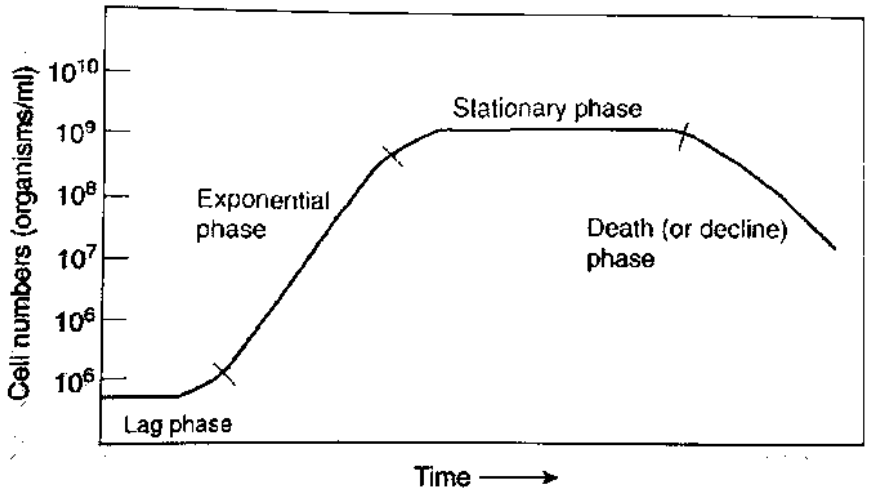
2.5.1.6 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ที่ความดันบรรยากาศปกติ หากมีคาร์บอนไดออกไซด์สูงจะเกิดการยับยั้งการเจริญและการหมักอย่างรุนแรง

2.5.1.7 สารอื่นๆ

พบว่าการเติมแมกนีเซียม 0.5 มิลลิโมล ช่วยให้การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในระยะเติบโตทวีคูณ (Log หรือ Exponential phase) นานขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ได้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Dombek, 1986) และยังมีธาตุอื่นๆ เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม สังกะสี และทองแดง ที่ช่วยให้การเจริญเติบโตของยีสต์ดีขึ้นด้วย (วิลาวัณย์, 2539)

จลนพลศาสตร์การเติบโตของจุลินทรีย์ (Microbial growth kinetics) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแสดงดังภาพประกอบ 2-12 แบ่งออกได้เป็น 6 ระยะด้วยกัน คือ หลังจากการถ่ายเชื้อ (Inoculation) แล้ว จุลินทรีย์จะยังไม่มีการเจริญเติบโต ซึ่งระยะนี้จุลินทรีย์จะปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ จะเรียกระยะนี้ว่า ระยะปรับตัว (Lag phase) จากนั้นเชื้อจุลินทรีย์จะเริ่มมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ ในระยะต้นจะเรียกว่า ระยะเร่งตัว (Acceleration phase) โดยอัตราการเติบโต (Growth rate) จะเพิ่มขึ้นสูงสุดและคงที่เรียกระยะนี้ว่า ระยะเติบโตทวีคูณ (Log หรือ Exponential phase) จากการที่เชื้อจุลินทรีย์เติบโตอย่างรวดเร็วนี้ ส่งผลให้สารอาหารเริ่มไม่เพียงพอและเกิดสภาวะการสะสมของผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการสร้างและสลายของเซลล์ เช่น เอทานอล กรดแอซิติก เป็นต้น ดังนั้นอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์จึงลดลง เรียกระยะนี้ว่า ระยะถดถอย (Deceleration phase) จนกระทั่งอัตราการเติบโตเท่ากับอัตราการตาย (Death rate) ทำให้ปริมาณเซลล์อยู่ในสภาพคงที่ ระยะนี้จะเรียกว่า ระยะคงที่ (Stationary phase) และเมื่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนี้ยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้จุลินทรีย์สลายเซลล์ตัวเอง ปริมาณเซลล์ลดลงเรื่อยๆ ซึ่งเรียกระยะนี้ว่า ระยะตาย (Death หรือ Declining phase) (สาโรจน์, 2538)



ภาพประกอบ 2-12 การแบ่งระยะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (สาโรจน์, 2538)

2.5.2 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์ (สมชาติ โสภณรณฤทธิ์, 2550)

การแยกเอทานอลและทำให้บริสุทธิ์เป็นการแยกเอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร ซึ่งส่วนมากจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในปัจจุบัน การกำจัดน้ำออกจากเอทานอลในอุตสาหกรรมจึงใช้วิธีการกลั่นแบบธรรมดา หรือลำดับส่วน เพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่ปัญหาใหญ่ที่พบคือ การแยกออกจากกันไม่ได้ของน้ำและเอทานอลที่อัตราส่วนเอทานอลกับน้ำที่ร้อยละ 95:5 โดยน้ำหนัก ณ จุดนี้เรียกว่า จุดอะซีโอโทรป (Azeotropic point) เป็นจุดที่ไม่สามารถกำจัดน้ำออกจากเอทานอลได้มากกว่านี้ ถ้าใช้กระบวนการกลั่น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้กระบวนการอื่นมาช่วยในการผลิตเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์สูงถึงร้อยละ 99.5 กระบวนการที่ใช้ในการผลิตเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์เท่ากับหรือมากกว่า 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักนั้นนิยมใช้อยู่ 3 วิธี ได้แก่

2.5.2.1 กระบวนการแยกน้ำด้วยวิธีกลั่นสกัดแยกกับสารตัวที่สาม (Extractive Distillation with the third component)

เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันมานานจนถึงปัจจุบันซึ่งยังใช้กันในเชิงพาณิชย์ วิธีนี้สามารถทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์สูงโดยการเติมสารประกอบที่ 3 เพื่อทำให้น้ำแยกออกจากเอทานอลได้ดียิ่งขึ้น สารประกอบนี้เรียกว่า เอ็นเทรนเนอร์ (entrainer) ได้แก่ ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) หรือเบนซีน (benzene) ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้พลังงานจำนวนมากในการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความ

บริสุทธิ์มากๆ อีกทั้งสารที่ใช้เป็นเอ็นเทรเนอรทเป็นสารมีพิษ บางตัวเป็นสารก่อโรคมะเร็งอีกด้วย ในปัจจุบันได้มีการปรับเปลี่ยนสารตัวที่สามจากสารเบนซิน (Benzene) มาใช้สารไซโคลเฮกเซน (Cyclo-hexane) ซึ่งมีอันตรายน้อยกว่าแทน

2.5.2.2 กระบวนการแยกด้วยวิธีโมเลคูลาซีฟ (Molecular Sieve Separation)

การใช้โมเลกุลาซีฟสามารถดูดน้ำในสภาวะที่เย็นและคายน้ำออกเมื่อได้รับความร้อน แต่เทคโนโลยีนี้มีข้อเสียตรงที่อัตราการสึกกร่อนของโมเลกุลาซีฟค่อนข้างสูง ทำให้ค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตค่อนข้างสูงด้วย

2.5.2.3 กระบวนการแยกด้วยวิธีเมมเบรน (Membrane Pervaporation)

เป็นเทคโนโลยีใหม่ล่าสุด เป็นวิธีที่ง่ายและใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ โดยการแยกสารละลายผสมผ่านเยื่อแผ่นบาง (Membrane) ซึ่งจะอาศัยเทคนิคการซึมผ่าน (permeation) ของน้ำผ่านแผ่นเยื่อบางในรูปของไอน้ำด้วยแรงดึงดูดจากภายนอกที่มีความดันต่ำกว่า โดยแผ่นเยื่อบางต้องมีสมบัติในการยอมให้โมเลกุลน้ำผ่านได้ดีกว่าโมเลกุลเอทานอล ดังนั้นการแยกน้ำออกจากเอทานอลจึงเกิดขึ้นได้

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและพลังงานที่ต้องใช้ ระหว่างกับการกลั่นแบบอะซีโอโทรป (กระบวนการผลิตในปัจจุบัน) และเทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง จะพบว่า กระบวนการแยกด้วยแผ่นเยื่อบางจะใช้พลังงานที่ต่ำกว่า ดังแสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณการใช้พลังงานในการแยกน้ำออกจากสารละลายเอทานอล (*ข้อมูลจาก www.eduzones.com, http://knowledge.eduzones.com/ knowledge-2-5-37230.html*)

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	กระบวนการ	พลังงาน (kg-cal/kg-ethanol)
95-99.5	การกลั่นแบบอะซีโอโทรป	790
90-99.5	เทคโนโลยีเยื่อบาง (Membrane)	101-350

2.5.3 กระบวนการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์รองและของเสียจากโรงงาน (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2549)

ในกระบวนการผลิตเอทานอลนั้น นอกจากจะได้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักแล้ว ยังเกิดผลิตภัณฑ์รองอื่นอีก ได้แก่ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ฟิวส์เซลล์ออยด์ และสารอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิต เช่น น้ำเสียจากกระบวนการกลั่น กากที่ออกจากขั้นตอนการหมักและขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ เป็นต้น ของเสียเหล่านี้หากปล่อยไปสู่สิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดมลภาวะ ดังนั้นเพื่อช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมและช่วยลดต้นทุนการผลิต ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์รองและของเสียขึ้น ดังนี้

2.5.3.1 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดขึ้นในระหว่างการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ ซึ่งจะมีปริมาณประมาณครึ่งหนึ่งโดยน้ำหนักของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการหมัก จากการประมาณกำลังการผลิตเอทานอล 150,000 ลิตร/วัน จะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ100-120 ตัน/วัน สำหรับการใช้ประโยชน์ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถใช้ได้ทั้งสถานะที่เป็นก๊าซ (Gas) ของเหลว (Liquid CO_2) และของแข็ง (Solid CO_2) โดยจะใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นสารทำความเย็น และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทที่มีการอัดก๊าซ นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมอื่นบ้าง ได้แก่ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมการเชื่อมโลหะ พลาสติกและยางและกสิกรรม ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถผลิตได้จากหลายกระบวนการด้วยกัน ได้แก่ กระบวนเผาไหม้ (Combustion) ของเชื้อเพลิงที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ และผลพลอยได้จากกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ กระบวนการสังเคราะห์แอมโมเนีย การอบปูนขาว ($CaCO_3$) ในเตาเผาการผลิตโซเดียมฟอสเฟตจากไบโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และกระบวนการหมักเอทานอล

2.5.3.2 ฟูเซลออยล์ (Fusel oil)

ฟูเซลออยล์ หรือที่บางครั้งเรียกว่าฟูเซลแอลกอฮอล์ (Fusel alcohol) ใช้เรียกส่วนผสมของแอลกอฮอล์อื่นที่มีจุดเดือดสูงกว่าเอทานอล ซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการกลั่นเอทานอล ฟูเซลออยล์ประกอบด้วยแอลกอฮอล์หลายชนิด ส่วนมากเป็นองค์ประกอบที่มีคาร์บอน 3, 4 หรือ 5 อะตอม ได้แก่ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol) และแอคทีฟเอมิลแอลกอฮอล์ (Active amyl alcohol) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่มีมูลค่าสูง นอกจากนี้ยังมีบิวทานอล (Butanol) และโพรพานอล (Propanol) อยู่ด้วย การใช้ฟูเซลออยล์จะต้องมีการแยกแอลกอฮอล์ออกโดยวิธีการกลั่น วิธีทางโครมาโตกราฟฟี หรือวิธีทางเคมี และผ่านกระบวนการทำ

ให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปแอลกอฮอล์ที่ได้ไปใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมจำพวกเรซิ่นและพลาสติก อุตสาหกรรมแล็คเกอร์ และหมึกพิมพ์

2.5.3.3 DDGS (Dry distillers grains with solubles)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการรวมกันของกากที่เป็นวัตถุดิบตั้งต้น ซึ่งเป็นส่วนของกากส่าที่เป็นของแข็งกับส่วนของของแข็งที่ละลายน้ำได้ในน้ำส่าหลังการกลั่นแยกเอทานอลแล้วทำให้แห้งเพื่อให้มีความชื้นเหลือประมาณร้อยละ 10 ถึง 12 ในประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งมีการใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจะมีการผลิต DDGS ที่ได้จากการนำกากแห้งที่เป็นของแข็งผสมกับส่วนของแข็งที่ละลายน้ำได้ เพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ โดย DDGS จะเป็นแหล่งของโปรตีนและพลังงานที่สำคัญสำหรับโคนมและโคเนื้อ อีกทั้งเป็นแหล่งของไฟเบอร์และฟอสฟอรัสของสัตว์จำพวกที่ไม่ใช่สัตว์เคี้ยวเอื้อง รวมทั้งสัตว์ปีกและสัตว์น้ำ ขั้นตอนการผลิต DDGS จะประกอบด้วยการแยกส่วนที่เป็นของเหลวและของแข็งออกจากกัน (Separation) โดยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนที่เป็นของเหลวที่เหลือหลังจากกลั่นแยกเอทานอลไประเหย เพื่อทำให้เข้มข้นขึ้น (Evaporation) แล้วนำไปผสมกับส่วนของแข็งแล้วทำให้แห้ง (Drying) และเย็นตัวลง (Cooling) โดยรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกจำหน่ายออกสู่ท้องตลาดมีทั้งในรูปของผงแห้ง และในรูปของ DDGS อัดเม็ด DDGS ที่ผลิตจากมันสำปะหลังจะมีปริมาณโปรตีนประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งต่ำกว่า DDGS ที่ได้จากข้าวโพด ซึ่งมีโปรตีนประมาณร้อยละ 25 โดยน้ำหนักแห้ง

2.5.3.4 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเป็นแหล่งโภชนาการที่สำคัญ โดยในเซลล์ยีสต์จะประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 40 โดยน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 34 โดยน้ำหนักแห้ง ไขมันร้อยละ 4 โดยน้ำหนักแห้ง และวิตามินบี จึงสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทน และอาหารเสริมสำหรับการเจริญเติบโตของทั้งมนุษย์และสัตว์ หรือสกัดแยกเป็นยีสต์สกัด (Yeast extract) และผนังเซลล์ยีสต์ (Yeast cell wall) ยีสต์สกัดสามารถนำมาใช้ประโยชน์สำหรับอาหารสัตว์ โดยจัดเป็นสารเสริมอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพสูง สามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นในอาหารสัตว์ได้เป็นอย่างดีเนื่องจากมีกลิ่นคาวคล้ายกลิ่นเนื้อสัตว์ ส่วนผนังเซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของเบต้า 1,3 และ 1,6 กลูแคน ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์และสัตว์ สามารถใช้ในการเลี้ยงสัตว์แบบไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เป็นต้น สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำกากส่าจากมันสำปะหลังมีปริมาณกรดอะมิโนส่วนใหญ่ทั้งที่จำเป็นและไม่จำเป็นสูงกว่าสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่มีขายในเชิงพาณิชย์

แต่สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำกากส่าจากกากน้ำตาลจะมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดน้อยกว่ายกเว้นแอสพาร์ติก

2.5.3.5 ก๊าซชีวภาพ (Biogas)

ก๊าซชีวภาพ หมายถึง ก๊าซที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน สามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนซึ่งผลิตได้จากวัสดุเหลือทิ้งและน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตร ก๊าซชีวภาพประกอบด้วยก๊าซหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นก๊าซมีเทน (Methane; CH_4) ประมาณร้อยละ 50-70 และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณร้อยละ 30-50 ส่วนที่เหลือเป็นก๊าซชนิดอื่น ๆ เช่น ไฮโดรเจน (H_2) ออกซิเจน (O_2) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ไนโตรเจน (N_2) และไอน้ำ ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ให้ค่าความร้อนประมาณ 35,800 กิโลจูล /ลูกบาศก์เมตร (kJ/m^3) ส่วนก๊าซชีวภาพที่มีสัดส่วนของก๊าซมีเทนร้อยละ 65 ให้ค่าความร้อน 22,400 กิโลจูล /ลูกบาศก์เมตร เนื่องจากก๊าซชีวภาพมีส่วนประกอบหลักเป็นก๊าซมีเทนจึงทำให้มีคุณสมบัติจุดติดไฟได้ดีและสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนในรูปต่าง ๆ ได้ เช่น การเผาเพื่อใช้ประโยชน์จากความร้อนโดยตรงจะได้ประสิทธิภาพเชิงความร้อนสูงจึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อต้มไอน้ำ (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) และขั้นตอนการเปลี่ยนกรดอินทรีย์ให้เป็นก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างมีเทน (Methane-producing bacteria) ในโรงงานเอทานอลส่วนใหญ่จะเลือกใช้ระบบถังหมักก๊าซชีวภาพ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีการหมักแบบไร้อากาศ (Anaerobic treatment technology) สามารถแบ่งตามรูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ได้เป็น 3 แบบ คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่แขวนลอยในระบบ (Suspended growth) จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะกับวัสดุในระบบ (Supported growth) และแบบลูกผสม (Hybrid) ได้แก่ Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB), Anaerobic Lagoons (AL) และ Upflow Sludge Blanket/Fixed Bed Reactor (USB/FBR)

2.5.3.6 ปุ๋ยอินทรีย์

น้ำกากส่ามีอินทรีย์วัตถุและและประกอบด้วยเกลือที่ละลายได้เป็นจำนวนมาก โดยพบว่าธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืช คือ โพแทสเซียม (K) จะพบในปริมาณที่สูงมากที่สุด รองลงมาคือ ไนโตรเจน (N) และฟอสฟอรัส (P) ตามลำดับ และประกอบด้วยธาตุอาหารรองและธาตุอาหาร

เสริมต่าง ๆ อีกมากมาย ที่สามารถใช้เป็นปุ๋ยได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้งานได้โดยตรง หรือทำเป็นปุ๋ยน้ำเข้มข้น หรือปุ๋ยแห้ง ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดของการขนส่งในกรณีที่ใช้น้ำกากส่าโดยตรง โดยในการทำปุ๋ยน้ำเข้มข้นจะนำน้ำกากส่าที่ได้ผ่านเครื่องต้มระเหย (Evaporator) ทำให้มีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น โดยทั่วไปน้ำกากส่าจะมีความเข้มข้นของของแข็งประมาณร้อยละ 10-15 สามารถทำให้เข้มข้นเป็นร้อยละ 30 ได้ แล้วนำไปใช้ในไร่ต่อไป โดยเวลาใช้งานจะต้องใช้เครื่องฉีดพ่น ซึ่งอาจใช้แรงคน หรือเป็นเครื่องจักรก็ได้ ในกรณีที่ต้องการทำเป็นปุ๋ยแห้งจะต้องมีการนำของแข็ง เช่น กากหม้อกรองของโรงงานน้ำตาลหรือชานอ้อยมาผสมกับน้ำกากส่าที่เข้มข้นเสียก่อน

2.5.4 การใช้เอทานอลไร้น้ำเป็นเชื้อเพลิง

เอทานอลไร้น้ำที่ผลิตได้ สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 รูปแบบ คือ

2.5.4.1 ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง

ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล โดยเครื่องยนต์ของรถยนต์ต้องได้รับการออกแบบเป็นพิเศษให้สามารถต้านทานการกัดกร่อนได้ เนื่องจากเอทานอลสามารถกัดกร่อนโลหะยาง และพลาสติกบางชนิดที่ใช้เป็นชิ้นส่วนของเครื่องยนต์และอุปกรณ์

2.5.4.2 ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทน

เนื่องจากมีค่าออกเทนสูง สามารถใช้ทดแทนสารเพิ่มค่าออกเทนในปัจจุบันอย่างเช่น MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ได้เป็นอย่างดี โดยทำการผสมแอลกอฮอล์เหล่านี้ลงไปในน้ำมันเบนซิน เราจึงเรียกน้ำมันที่ได้จากการผสมระหว่างแอลกอฮอล์กับน้ำมันเบนซินนี้ว่า แก๊สโซฮอล โดยค่าออกเทนจะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของแอลกอฮอล์ที่ใช้ผสมในน้ำมันเบนซิน สำหรับในประเทศไทยใช้อัตราส่วนในการผสมระหว่างแอลกอฮอล์กับน้ำมันเบนซินเท่ากับ 1 : 9 หรือเรียกน้ำมันแก๊สโซฮอลนี้ว่า E10 หรือหากใช้แอลกอฮอล์ผสมกับน้ำมันดีเซล จะเรียกน้ำมันที่ได้จากการผสมนี้ว่า ดีโซฮอล เป็นต้น

2.5.4.3 ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

การสังเคราะห์ไบโอดีเซลจะใช้แอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งในการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า Transesterification โดยการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือเอทานอล และตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ภายใต้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม เพื่อเปลี่ยนไขมันหรือเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันจาก Triglycerides ให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเตอร์ (Mono Alkyl Ester)

2.6 วิธีของทากูชิ (Tagushi Method)

เป็นวิธีที่ประยุกต์ใช้เพื่อการออกแบบจำนวนของการทดลอง ซึ่งแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบด้วยวิธีนี้จะได้มาจากการทดลองเบื้องต้น และจะถูกออกแบบการทดลองในรูปเมทริกซ์ (Matrix) สำหรับการออกแบบการทดลองประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนในการวางแผนการทดลอง (Screening Experiments) โดยใช้ตารางมาตรฐานของวิธีทากูชิ (Orthogonal Array) ซึ่งการจัดลำดับที่นิยมใช้ในตารางมาตรฐานของวิธีทากูชิจะมี 2 ระดับและ 3 ระดับ (The two-level factorial (2^n) or three-level factorial (3^n) experiment) เพื่อลดจำนวนการทดลอง ขั้นตอนที่สองคือการทดลองเพื่อหาสภาวะการทดลองที่ดีที่สุดจากตารางมาตรฐานทากูชิ

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

Cazetta และคณะ (2007) ทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 55.8 กรัมต่อลิตร

D'Amore และคณะ (1989) ทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร โดยทำการเปรียบเทียบการใช้เชื้อ *S. diastaticus* NO.62 เริ่มต้นในปริมาณต่างๆ กัน คือ 0.35, 1.00, 2.00 และ 3.50 แล้วทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าจะผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกัน คือ 70, 78, 82 และ 80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Kannan และคณะ (1998) ทำการศึกษาการหมักเอทานอลด้วยน้ำตาลซูโครส โดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* LS1A ซึ่งเกิดมาจากการกลายพันธุ์จากสายพันเดิม B-806 โดยไม่มีเอนไซม์ intracellular cucrase (Sac A) และ levansucrase (Sac B) พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 73.5 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักเป็นเวลา 18 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมพบว่สจะให้เอทานอลเพียง 65.2 กรัมต่อลิตร

Kiransree และคณะ (2000) ศึกษาการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลความเข้มข้น 14 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าจะผลิตเอทานอลได้ 30 และ

45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักน้ำตาลซูโครสปริมาณ 150 กรัมต่อลิตร จะผลิตเอทานอลได้ 52 และ 64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Limtong และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยที่อุณหภูมิสูง โดยใช้ *Kluyveromyces marxianus* ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิและศึกษาผลของส่วนประกอบของสารอาหารที่มีต่อการหมักเอทานอล คือ ความเข้มข้นของน้ำตาล ไนโตรเจน (ใช้ $(NH_4)_2SO_4$) ฟอสเฟต (ใช้ KH_2PO_4) แมกนิเซียม (ใช้ $MgSO_4.7H_2O$) และค่าพีเอชที่มีผลต่อน้ำอ้อย พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยปริมาตร 200 มิลลิลิตร คือ ใช้ยีสต์ชนิด DMKU3-1042 สำหรับส่วนประกอบของสารอาหารที่ใช้คือ น้ำตาลซูโครส (Sucrose) เท่ากับ 22% ของน้ำตาลทั้งหมด, 0.05 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) $(NH_4)_2SO_4$, 0.05 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) KH_2PO_4, 0.15 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) $MgSO_4.7H_2O$ และสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะได้เอทานอลความเข้มข้นสูงที่สุดคือ 8.7 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) และได้ผลิตภัณฑ์ (เอทานอล) เท่ากับ 77.5 เปอร์เซ็นต์ ของผลตามทฤษฎี และพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ สภาวะเดียวกัน ยกเว้นค่าพีเอชของตัวกลางจะมีค่าเท่ากับ 5.5 และเอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นสูงสุด 6.78 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) และได้ผลิตภัณฑ์ (เอทานอล) เท่ากับ 60.4 เปอร์เซ็นต์ของผลทฤษฎี

Pakvirun Truesombat และคณะ (2007) ทำการหมักเอทานอลจากแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยทำการหมักแบบแบทช์ ซึ่งแก่นตะวันมีองค์ประกอบน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) 256.3 กรัมต่อลิตร อินนูลิน 74 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไนโตรเจน 2,431.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพแทสเซียม 2,491.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในขั้นการย่อยจะใช้กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) ร่วมกับการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที พบว่าจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และเอทานอลสูงสุด ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้สูงสุดเท่ากับ 88.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีกำลังการผลิตเอนอลเท่ากับ 1.84 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ผลิตภัณฑ์เอทานอลเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ของผลตามทฤษฎี

2.7.2 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

ชลดาและคณะ (2547) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและการหมักน้ำตาลด้วยยีสต์ พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูโลสและเพคติเนสก่อนจะทำให้การย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลเพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูโลส (15 NCU)

และเพคติเนส (122.5 PG) ต่อกากมันสำปะหลังแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช เท่ากับ 4.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (8.36 LU) ต่อกากมันสำปะหลังแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (0.23 GAU) ต่อกากมันสำปะหลังแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าสามารถย่อยได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 122.4 กรัมต่อลิตร จากการย่อยกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 144 กรัมต่อลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้น 89.2 กรัมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ที่ค่าพีเอช 4.5 และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถผลิตเอทานอลได้ 36.2 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 91 เปอร์เซ็นต์ของทฤษฎี

Ramasamy Amutha และคณะ (2001) ทำการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยทำการหมักเอทานอลแบบแบทช์ด้วยเชื้อผสมของ *Saccharomyces diastaticus* และ *Zymomonas mobilis* เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อเดี่ยวของ *Saccharomyces diastaticus* พบว่าการใช้เชื้อผสมของ *Saccharomyces diastaticus* และ *Zymomonas mobilis* จะให้เอทานอลความเข้มข้นสูงกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวของ *Saccharomyces diastaticus* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 46.7 กรัมต่อลิตร และ 37.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) ด้วยเชื้อผสมของ *Saccharomyces diastaticus* และ *Zymomonas mobilis* โดยใช้อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจะให้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 8.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Sree และคณะ (1999) ทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบผสมระหว่างข้าวฟ่างและมันเทศ โดยใช้เชื้อ Saccharomyces cerevisiae (VS3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง ร่วมกับเชื้อ Bacillus sp. (VB9) ในกระบวนการหมักแบบ SSF พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 5 กรัม ต่อวัตถุดิบ 100 กรัม และ 3.5 กรัม ต่อวัตถุดิบ 100 กรัม เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส

2.7.3 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

Abedinifara และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวโดยใช้ *Mucor indicus* และ *Rhizopus oryzae* เริ่มจากอบแห้งฟางข้าวเป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปบดและแยกขนาดให้มีขนาดอยู่ในช่วง 295-833 ไมโครเมตร (20-48 เมช) จากนั้นนำฟางข้าวที่ได้ไปปรับสภาพ (Pretreatment) โดยนำฟางข้าว 900 กรัม แช่ลงใน 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริก

ปริมาตร 6 ลิตรหรือในน้ำเป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นเติมของผสมที่ได้ลงในถัง (Reactor) แล้วให้ความร้อนด้วยไอเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ได้ความดันเท่ากับ 1.5 MPa และคงความดันนี้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นจนความดันลดลงเท่ากับ 0.2 MPa นำส่วนที่เป็นของแข็งไปล้างด้วยน้ำก๊อก 3 ครั้ง แล้วกรองและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อไปทำการย่อย (Hydrolysis) ฝางข้าวที่ได้จากข้างต้นและฝางข้าวที่ไม่ผ่านการย่อย โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้คือ 15 FPU cellulase และ 50 IU β-glucosidase ต่อกรัมของเซลลูโลส โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M และสุดท้ายคือการหมัก นำฟางข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยกรดมาหมักด้วย *M. indicus* , *R. oryzae* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในขั้นการย่อย (Hydrolysis) คือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และฟางข้าวความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร จะสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้สูงสุด สำหรับฟางข้าวที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรซึ่งผ่านการย่อย (Hydrolysis) จะสามารถผลิตน้ำตาลได้มากกว่าฝางข้าวที่ไม่ผ่านการย่อย 30 เปอร์เซ็นต์ โดยจะได้น้ำตาล 0.718 กรัมต่อกรัมของเซลลูโลสในฝางข้าว และในขั้นตอนการหมักพบว่าการใช้ *M. indicus* และ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถย่อยน้ำตาลได้ภายใน 1 วัน ซึ่งเร็วกว่าการใช้ *R. oryzae*

Gaspar และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเส้นใยข้าวโพด (Corn fiber) เริ่มจากทำการย่อย 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เส้นใยข้าวโพด (Corn fiber) ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α- 1,4 Amylase) ในปริมาณ 0.5 มิลลิลตร enzyme solution/ กรัม ของเส้นใยข้าวโพด ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 4.8 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α- 1,4 Amylase) ปริมาณเท่ากับข้างต้นอีกครั้ง และทำการกวน (Stir) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองแบบใช้ความดันด้วยไนลอน ขนาด 100 ไมโครเมตร (μm) mesh และล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง สำหรับตะกอนของแข็งที่ได้ (Destarched Corn Fiber, DCF) นำไปละลายด้วยสารละลายอัลคาไลน์ (Alkaline solution) ภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยนำไปต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้ความดัน 2 บาร์ (bar) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จะได้สารที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสามารถแยกสารออกเป็นของเหลว (Hemicelluloses) และของแข็งคือ PCF (Destarched Corn Fiber) ด้วยการหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) จากนั้นย่อยของแข็ง PCF ด้วยเอนไซม์ และหมักด้วย Saccharomyces cerevisiae โดยทำการเจือจางจนได้ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง PCF และเติมสารอาหารยีสต์ (ยีสต์ 2.5 กรัมต่อลิตร, peptone 5 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4$ 0.3 กรัมต่อลิตร, NH_4Cl 2 กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 4.8 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ความ

เข้มข้นของเอทานอลที่ได้โดยใช้สารละลาย 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ KOH จะทำให้ได้เอทานอลความเข้มข้น 12.5 และ 11.6 ตามลำดับ ซึ่งเท่ากับ 96.9 และ 89.9 เปอร์เซ็นต์ ของผลทางทฤษฎี และพบว่าเมื่อใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จะลดลง เนื่องจากเกิดกรดแลกติกซึ่งไม่เกิดในช่วงแรกๆ

Kadar และคณะ (2004) ทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากกระดาษเก่าๆ และผงเซลลูโลส โดยเปรียบเทียบการใช้ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*) กับยีสต์ทนร้อน K. marxianus Y01070 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าจะสามารถผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกัน คือ 17.8 และ 16.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการหมักด้วยผงเซลลูโลส พบว่าจะได้เอทานอล 14.1 และ 14.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Keikhosro และคณะ (2006) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วย *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae* และ Saccharomyces cerevisiae โดยมีการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางและหมักแบบต่อเนื่อง ฟางข้าวประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลส 27(±0.5) เปอร์เซ็นต์, เซลลูโลส 39(±1) เปอร์เซ็นต์, ลิกนิน 12(±0.5) เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 11(±0.5) เปอร์เซ็นต์ เริ่มจากบดฟางข้าวให้มีขนาดต่ำกว่า 833 ไมโครเมตร (20 เมช) จากนั้นนำฟางข้าวจากข้างต้นน้ำหนัก 600 กรัมมาปรับสภาพ โดยแช่ฟางข้าวลงใน 0.5%สารละลายกรดซัลฟูริก ปริมาตร 4 ลิตร เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำของผสมที่ได้ใส่ลงถัง (Reactor) แล้วให้ความร้อนด้วยไอให้ได้ความดันเท่ากับ 15 บาร์ (bar) และคงความดันนี้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นจนความดันเท่ากับ 2 บาร์ แล้วทำการคัดแยกออกจากถัง นำส่วนที่เป็นของแข็งไปล้างด้วยน้ำก๊อก 5 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กรองและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเข้าสู่กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการศึกษาและเปรียบเทียบฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพกับเซลลูโลสบริสุทธิ์ด้วยเชื้อ *M. indicus*, *R. oryzae* และ *S. cerevisiae* จากการทดลองการหมักพบว่าการใช้ *M. indicus* และ *R. oryzae* จะสามารถผลิตเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

Zhu และคณะ (2005) ได้ทำการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยการใช้สารแอลคาไลน์และคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Microwave) ในการเร่งปฏิกิริยา ฟางข้าวมีองค์ประกอบของน้ำ (11.2 ± 0.2) เปอร์เซ็นต์, เซลลูโลส (41.2 ± 0.5) เปอร์เซ็นต์, ลิกนิน (21.3 ± 0.4) เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส (25.8 ± 0.5) เปอร์เซ็นต์ เริ่มจากตัดฟางข้าวให้มีความยาว 1-2 เซนติเมตร แล้วนำไปล้างด้วยน้ำก๊อกจนสะอาด ต่อไปจะแบ่งเป็น 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 คือการปรับสภาพด้วย alkali นำฟางข้าวที่ได้ไปต้มในบีกเกอร์เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำฟางข้าว 20 กรัม ละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 160 มิลลิลิตร นำกากที่ได้ไปล้างด้วยน้ำก๊อกจนกระทั่งเป็น

กลาง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นตัดให้มีขนาด 10-20 เมช และนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่อง (SSF) พบว่ามีเซลลูโลส (73.5 ± 0.7) เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส (11.2 ± 0.5) เปอร์เซ็นต์ วิธีที่ 2 คือการใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในการเร่งปฏิกิริยา นำฟางข้าวที่ได้ไปไปละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 160 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำบีกเกอร์ไปวางไว้ในตู้ไมโครเวฟ (Microwave oven) ด้วยกำลัง 700 วัตต์ (watt) เป็นเวลา 25 นาที นำกากที่ได้ไปล้างด้วยน้ำก๊อกจนกระทั่งเป็นกลาง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นตัดให้มีขนาด 10-20 เมช และนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่อง (SSF) พบว่ามีเซลลูโลส (79.6 ± 0.6) เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส (7.8 ± 0.5) เปอร์เซ็นต์ ต่อไปทำการหมักแบบต่อเนื่องโดยเติมฟางข้าวที่ได้จากวิธีที่ 1 หรือวิธีที่ 2 โดยใช้สารตั้งต้น (ฟางข้าว) ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับฟางข้าวจากวิธีที่ 1 จะใช้เอนไซม์ 15 มิลลิกรัม [cellulase]/g[substrate] ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.3 และใช้เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้เท่ากับ 34.3 กรัมต่อลิตร และได้ผลิตภัณฑ์เอทานอลเท่ากับ 69.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับฟางข้าวจากวิธีที่ 2 จะใช้เอนไซม์ 20 มิลลิลิตร [cellulase]/g[substrate] ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.3 และใช้เวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้เท่ากับ 31.1 มิลลิลิตร และได้ผลิตภัณฑ์เอทานอลเท่ากับ 64.8 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการผลิตเอทานอลโดยใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วยเร่งปฏิกิริยาใช้อัตราการเติมเอนไซม์ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่า แต่จะให้เอทานอลความเข้มข้นที่สูงกว่าและให้ผลิตภัณฑ์เอทานอลที่สูงกว่าอีกด้วย

วนิดาและคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน องค์ประกอบทางเคมีของไม้ยูคาลิปตัสประกอบด้วยเซลลูโลส 43.75 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 18.87 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 24.69 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง เริ่มจากการปรับสภาพ (Pretreatment) ไม้ยูคาลิปตัสด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion) การสกัดด้วยน้ำ (Water extraction) และการสกัดด้วยด่าง (Alkali extraction) จากนั้นทำการหมักแบบต่อเนื่องด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 โดยเริ่มจากนำเยื่อไม้ยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส โดยแปรผันปริมาณเยื่อ (Substrate loading) 5, 7.5 และ10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเติมเพปโทน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 โดยการเติมซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.05 M แล้วทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºC เป็นเวลา 15 นาที เติม cellulose 15 FPU/g substrateและ Novozym 15 FPU/g substrate ปริมาตร 1.5 ลิตร ใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ 10 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะการหมักที่ความเร็ว 150 รอบต่อ

นาที แล้วศึกษาการหมักที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแบบต่อเนื่องคือ การใช้ substrate loadind 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 จะได้ปริมาณเอทานอล 28.47 กรัมต่อลิตรและ ethanol yield เท่ากับ 0.403 กรัมต่อกรัมและ 79.01 เปอร์เซ็นต์

ปิยะพรและคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากการหมักข้าวเปลือกด้วยวิธีการบดหยาบ โดยพันธุ์ข้าวเปลือกที่ใช้คือ สายพันธุ์ กข 6 ทำการเปรียบเทียบขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การเพาะงอกเมล็ดข้าวเปลือก นำข้าวเปลือกด้อยคุณภาพแช่น้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำข้าวเปลือกที่ผ่านการแช่น้ำใส่กระสอบหมักทิ้งไว้นาน 24-36 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดข้าวงอก แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดข้าวให้มีขนาด 2 แบบ คือ แบบบดละเอียด และแบบบดหยาบ วิธีที่ 2 ไม่เพาะงอกเมล็ดข้าวเปลือก นำข้าวเปลือกด้อยคุณภาพไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดข้าวให้มีขนาด 2 แบบคือ แบบบดละเอียดและแบบบดหยาบ เมื่อได้ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบของข้าวเปลือกทั้ง 2 วิธี จึงนำไปทดสอบต่อไปในขั้นการหมัก โดยเริ่มจากนำข้าวเปลือกทั้ง 2 แบบมาทดสอบหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ในถังหมักเอทานอล เริ่มจากนำน้ำต้มสุกผสมกับข้าวในอัตราส่วนข้าว 1 ส่วนต่อน้ำ 3 ส่วน แล้วทำการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส(α- 1,4 Amylase) ในปริมาณ 0.04 กรัมต่อข้าว 1 กิโลกรัม ผสมให้เข้ากันและปล่อยไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของผสมลดลงเป็น 35 องศาเซลเซียส จากนั้นผสมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณ 0.2 กรัมต่อปริมาตรปริมาตรน้ำ 1 ลิตร โดยทำการควบคุมอุณหภูมิถังหมักที่ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการหมักประมาณ 7-10 วัน จากผลการทดสอบหมักเอทานอลจากข้าวเปลือก ทำการตรวจสอบปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก คือ ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3.48-4.89 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส จากผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ พบว่าข้าวที่มีการเพาะงอก แบบบดหยาบได้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุดที่ 7.4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

อนุกูลและคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้จังหวัดแพร่ เริ่มจากนำขี้เลื่อยมาปรับสภาพด้วย 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร กรดซัลฟูริก ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พบว่าอัตราส่วนระหว่างกรดซัลฟูริกต่อปริมาณขี้เลื่อยไม้รวมที่เหมาะสมเท่ากับ 9:1 เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเท่ากับ 25 นาที โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.154 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ *Z. mobilis* พบว่าสารละลายจากขี้เลื่อยไม้สักผลิตเอทานอลได้

สูงสุดเท่ากับ 0.141 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากการผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 34 ชั่วโมง สารละลายจากขี้เลื่อยไม้ยางพาราผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.198 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากการผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 42 ชั่วโมง สารละลายจากขี้เลื่อยไม้จามจุรีผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.186 โดยปริมาตร หลังจากการผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 22 ชั่วโมง และสารละลายจากขี้เลื่อยไม้รวมผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 0.221 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากการผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 32 ชั่วโมง

ศิริพงษ์และคณะ (2550) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากปอสา (Paper Mulberry) ด้วยการหมักแบบต่อเนื่อง เริ่มจากนำเปลือกปอสาที่ผ่านการบดไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอชเท่ากับน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท ความเข้มข้น 0.04 M ที่ค่าพีเอช 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อไปนำของผสมที่ได้ไปหมักแบบต่อเนื่อง โดยเปรียบเทียบกับการหมักด้วย microcrystalline cellulose พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Penicillium sp.* ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติร่วมกับยีสต์ *Candida krusein* NBRC1664 พบว่าจะให้ผลผลิตเอทานอลเพียง 0.0328 เปอร์เซ็นต์ (0.0109 g/g) จากปอสาและ 0.0298 เปอร์เซ็นต์ (0.0099g/g) จาก microcrystalline cellulose แต่เมื่อเปลี่ยนมาใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *T. reesei* QM9414 ร่วมกับยีสต์ *C. krusei* NBRC1664 จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงขึ้นถึง 1.3766 เปอร์เซ็นต์ (0.4588g/g) จากปอสาและ 1.6282 เปอร์เซ็นต์ (0.5427g/g) จาก microcrystalline cellulose จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *T. reesei* QM9414 จะให้ผลผลิตของเอทานอลที่สูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Penicillium sp.* เมื่อใช้ปอสาและ microcrystalline cellulose เป็นวัสดุหมัก นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า เซลลูโลสของปอสาสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุหมักเพื่อการผลิตเอทานอลได้เทียบเท่ากับ microcrystalline cellulose ที่มีราคาสูงกว่า

กาญจนาและคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากกากมะพร้าว พบว่าการปรับสภาพกากมะพร้าวด้วยกรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะทำให้ได้น้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) 2.106 กรัมต่อลิตร และเอทานอลความเข้มข้น 0.18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากผ่านการหมักเป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.1 เปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด

ได้จากศูนย์แปรรูปผลผลิตจากตาลโตนด อบต. คลองรี อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา ลักษณะภายนอกของเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดมีสีน้ำตาลอ่อน แสดงดังภาพประกอบ 3-1 มีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 81% มาตรฐานเปียก แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส

ภาพประกอบ 3-1 แสดงลักษณะภายนอกของเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด

3.1.1.2 เปลือกส้ม

ได้จากร้านขายน้ำผลไม้ปั่น อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ลักษณะภายนอกของเปลือกส้มมีสีเขียวอมส้ม แสดงดังภาพประกอบ 3-2

ภาพประกอบ 3-2 แสดงลักษณะภายนอกของเปลือกส้ม

3.1.2 จุลินทรีย์

3.1.2.1 ลูกแป้งข้าวหมาก (Loog-Pang Kao Mhark)

จากร้านขายของชำ อำเภอยี่งอ จังหวัดนราธิวาส โดยเก็บลูกแป้งข้าวหมากในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบ 3-3 ซึ่งในลูกแป้งข้าวหมากจะมีจุลินทรีย์จำพวกราที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล เช่น *Amylomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., และ *Mucor* sp.เป็นต้น และมียีสต์ซึ่งจะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล เช่น *Saccharomycosis* sp., *Saccharomyces* sp. และ *Pichia* sp. เป็นต้น

ภาพประกอบ 3-3 แสดงลูกแป้งข้าวหมากซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก

3.1.2.2 ยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*)

ชนิดยีสต์แห้งสำเร็จรูป ตรา ชาฟ อิน สแตนท์ บริษัท กิมาส จำกัด กรุงเทพ โดยเก็บรักษายีสต์ขนมปังที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบ 3-4

ภาพประกอบ 3-4 แสดงยีสต์ขนมปังซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก

3.1.3 สารเคมีเพื่อการวิเคราะห์

3.1.3.1 น้ำกลั่น

3.1.3.2 เอทานอล (Commercial Grade) ความบริสุทธิ์ 95% ผลิตโดย Sigma-Aldrich

3.1.3.3 กลูโคส (Laboratory Grade) ผลิตโดย Ajex Finechem

3.1.3.4 ฟีนอล (Laboratory Grade) ผลิตโดย Fisher Scientific

3.1.3.5 โซเดียมซัลไฟท์ (Laboratory Grade) ผลิตโดย Merck

3.1.3.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Laboratory Grade) ผลิตโดย Merck

3.1.3.7 โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (Laboratory Grade) ผลิตโดย Merck

3.1.3.8 Folin Ciocalteu's Phenol Reagent (Laboratory Grade) ผลิตโดย R&M Chemicals

3.1.3.9 โซเดียมคาร์บอเนตปราศจากน้ำ (Laboratory Grade) ผลิตโดย R&M Chemicals

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 เครื่องปั่น (Blender): Moulinex รุ่น Moulinette S ใช้สำหรับบดละเอียดวัตถุดิบ

3.2.1.2 อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Oil Bath with Shaker): Memmert รุ่น WNB 45 ใช้สำหรับทดลองการย่อยเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด และใช้ควบคุมอุณหภูมิในกระบวนการหมัก

3.2.1.3 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator): Buchi Rotavapor รุ่น V-700 ใช้สำหรับเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอทานอลที่ได้จากการหมัก

3.2.1.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ใช้สำหรับชั่งตัวอย่าง

3.2.1.5 เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ใช้สำหรับแยกของเหลวในตัวอย่างหลังจากกระบวนการหมัก

3.2.1.6 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ขนาด 2.5 ลิตร

3.2.1.7 ตู้อบ

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

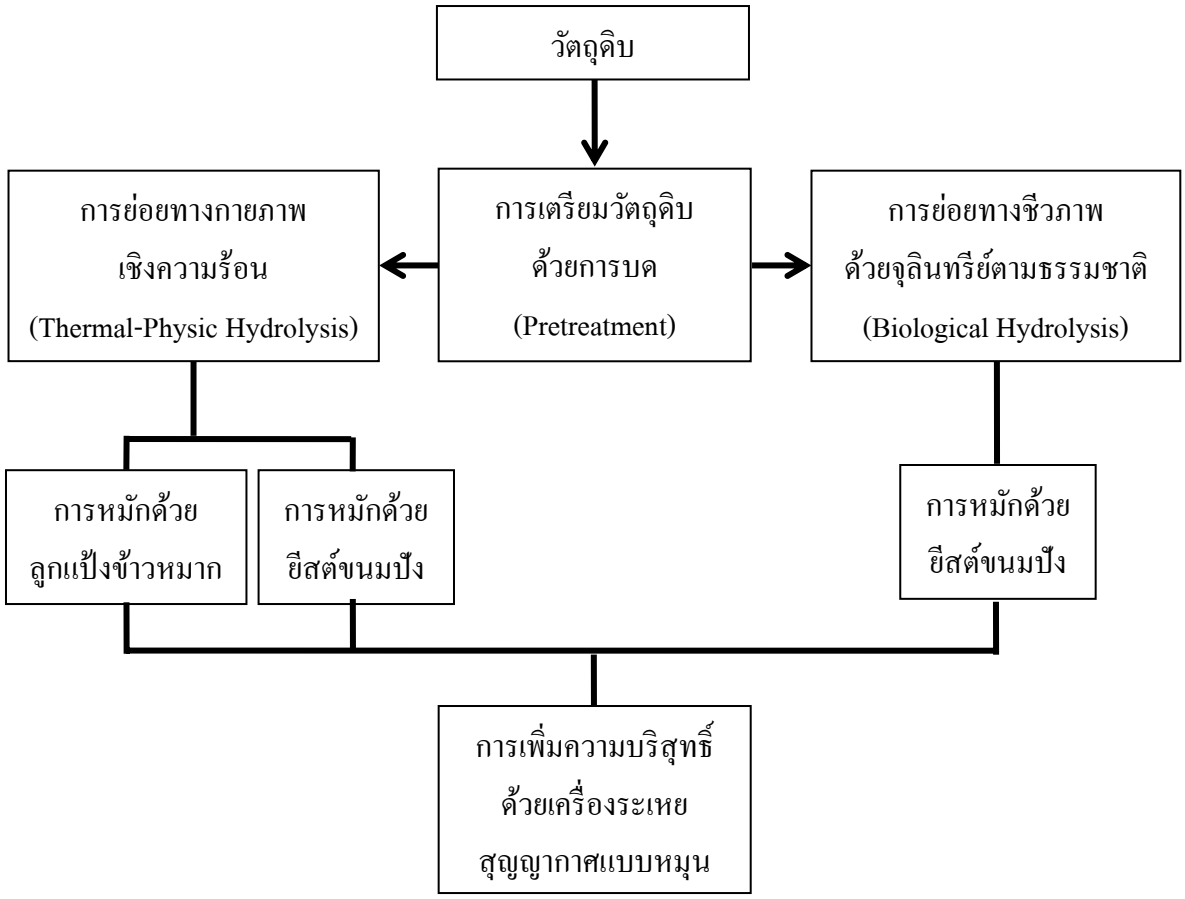
3.2.2.1 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10-100 และ 100-1000 ไมโครลิตร: Labmate ใช้สำหรับปิเปตสารตัวอย่างและสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.2.2.2 UV-Vis Spectrophotometer Microtiter เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร ในช่วง 200-999 นาโนเมตร และสามารถวัดได้ครั้งละ 1 ตัวอย่าง

3.2.2.3 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC) ใช้สำหรับตรวจวัดเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมัก ซึ่งเทคนิค GC เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวออกจากกัน โดยเอทานอลจะถูกฉีดเข้าสู่ระบบ ซึ่งเอทานอลจะระเหยกลายเป็นไอ และจะถูกพาด้วยก๊าซเฉื่อย (mobile phase) ไปยังคอลัมน์ (stationary phase) เพื่อทำการแยกสารออกจากกัน สารที่แยกได้จะถูกบันทึก เพื่อทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่อไป

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลนั้นมีหลายขั้นตอนด้วยกัน ซึ่งสามารถสรุปและแสดงขั้นตอนการศึกษาการผลิตเอทานอล ดังภาพประกอบ 3-5



ภาพประกอบ 3-5 แสดงแผนภาพขั้นตอนการผลิตเอทานอล

3.4 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด สามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

3.4.1 การเตรียม หรือปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

นำเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดมาคัดแยกสิ่งสกปรกออก จากนั้นบดเปลือกตาลให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น Moulinex จนมีขนาดไม่เกิน 1 มิลลิเมตร แสดงดังภาพประกอบ 3-6

ภาพประกอบ 3-6 แสดงภาพเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดหลังบด

3.4.2 การย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน (Thermal-Physic Hydrolysis)

ชั่งเปลือกตาลบด 60 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Oil Bath with Shaker) แสดงดังภาพประกอบ 3-7 จากนั้นวางไว้ให้เย็นเป็นอุณหภูมิห้อง ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ ปริมาณน้ำที่เติมเพิ่มเพื่อใช้ในการย่อย 30 40 และ 50 มิลลิลิตร อุณหภูมิในการต้มที่ 75 และ 85 องศาเซลเซียส และเวลาในการต้มที่ 10 20 และ 30 นาที

ภาพประกอบ 3-7 แสดงการต้มวัตถุดิบด้วยอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Oil Bath with Shaker)

3.4.3 การหมักเอทานอล (Fermentation) ด้วยลูกแป้งข้าวหมาก

นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อย (Hydrolysate) มาทำการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก โดยใช้ลูกแป้งร้อยละ 5 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ กวนผสมให้เข้ากัน (ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5) เติมด้วยก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas) ลงในขวดหมักเพื่อไล่อากาศออกและปิดจุกกันอากาศเข้า (Air-lock) แสดงดังภาพประกอบ 3-8 จากนั้นนำไปวางไว้ในที่มืด แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ในช่วง 27-29 องศาเซลเซียส) เมื่อครบตามจำนวนวันในการหมัก นำน้ำหมักที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวสะอาด นำส่วนของเหลวไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกของแข็งออกจากสารละลาย จากนั้นนำส่วนของเหลวใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC)

ภาพประกอบ 3-8 แสดงชุดขวดหมักเอทานอล (Air-locked Flask)

3.5 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดผสมกับเปลือกส้ม สามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

3.5.1 การเตรียม (Pretreatment) และศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของวัตถุดิบ

3.5.1.1 การศึกษาอัตราส่วนวัตถุดิบโดยการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน (Thermal-Physic Hydrolysis)

ทำการศึกษาอัตราส่วนของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล โดยวัตถุดิบที่ใช้คือ เปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ผสมกับเปลือกส้ม เริ่มจากบดวัตถุดิบทั้งสองเข้าด้วยกันตามอัตราส่วนที่ต้องการศึกษาให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น Moulinex จนมีขนาดไม่เกิน 1 มิลลิเมตร แสดงดังภาพประกอบ 3-9 ชั่งวัตถุดิบ 60 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อน (ย่อย) ด้วยอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Oil Bath with Shaker) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้ววางไว้ให้เย็นจนเป็นอุณหภูมิห้อง ต่อไปนำไปทำการหมักโดยเติมลูกแป้งข้าวหมากลงไปร้อยละ 5 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ คนให้เข้ากัน (ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5) จากนั้นนำไปไล่อากาศออกด้วยก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas) ปิดฝาด้วย Air-locked แล้วนำไปวางในที่มืด ทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ในช่วง 27-29 องศาเซลเซียส) เมื่อครบตามจำนวนวันในการหมัก นำน้ำหมักมากรองและนำส่วนของเหลวไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของวัตถุดิบเปลือกตาลต่อเปลือกส้มเป็น 5:1 5:2 5:3 และ 5:4

ภาพประกอบ 3-9 แสดงภาพวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล

3.5.1.2 การศึกษาอัตราส่วนวัตถุดิบโดยการย่อยทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (Biological Hydrolysis)

ทำการศึกษาอัตราส่วนของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล โดยวัตถุดิบที่ใช้คือเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดผสมเปลือกส้ม เริ่มจากบดวัตถุดิบทั้งสองเข้าด้วยกันตามอัตราส่วนที่ต้องการศึกษา จากนั้นใส่วัตถุดิบลงในถุงดำ มัดปากถุง แล้วเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน (ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-90) เมื่อครบตามระยะเวลาในการย่อย ชั่งวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยมา 60 กรัม ลงในขวดหมักรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำการหมักโดยเติมยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ คนให้เข้ากัน (ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5) นำไปเติมก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas) เพื่อไล่อากาศออก ปิดฝาด้วย Air-locked แล้วนำไปวางไว้ในที่มืด โดยทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ในช่วง 27-29 องศาเซลเซียส) เมื่อครบตามจำนวนวันในการหมัก นำน้ำหมักมากรองและนำส่วนของเหลวไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ อัตราส่วนของวัตถุดิบ 5:1 5:2 5:3 และ 5:4

3.5.2 การย่อยวัตถุดิบ (Hydrolysis) สามารถแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

3.5.2.1 การย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน (Thermal-Physic Hydrolysis)

นำวัตถุดิบที่อัตราส่วนที่เหมาะสมจากหัวข้อ 3.5.1.1 และ 3.5.1.2 มาทำการทดลองโดยนำมาศึกษาการย่อยวัตถุดิบ เริ่มจากชั่งวัตถุดิบบด 60 กรัม ลงในขวดหมักรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 30 และ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Oil Bath with Shaker) แล้ววางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำวัตถุดิบมากรองด้วยผ้าขาว และนำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สำหรับผลผลิตส่วนใสนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม (20 30 และ 40 มิลลิลิตร) เวลาในการย่อย (15 30 45 และ 60 นาที) และอุณหภูมิในการย่อย (75 80 85 และ 90 องศาเซลเซียส)

3.5.2.2 การย่อยทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (Biological Hydrolysis)

นำวัตถุดิบที่อัตราส่วนที่เหมาะสมจากหัวข้อ 3.5.1.1 และ 3.5.1.2 มาทำการทดลองโดยนำมาศึกษาการย่อยวัตถุดิบ เริ่มจากนำวัตถุดิบใส่ลงในถุงดำ แล้วเก็บไว้ในถังดำ (ความชื้น

สัมพัทธ์ร้อยละ 80-90) แสดงดังภาพประกอบ 3-10 เมื่อครบตามระยะเวลาในการย่อย นำวัตถุดิบดังกล่าวไปกรองและนำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลผลิตของเหลวใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ ระยะวันในการย่อย (1-10 วัน)

ภาพประกอบ 3-10 แสดงการย่อยวัตถุดิบด้วยวิธีทางชีวภาพ

3.5.3 การหมัก (Fermnetation) แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 วิธี

3.5.3.1 การหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก

นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน (Hydrolysate) จากสภาวะที่เหมาะสมในหัวข้อ 3.5.2.1 มาทำการหมักเอทานอล โดยนำมาเติมลูกแป้งข้าวหมาก (Loog-Pang Kao Mhark) แล้วคนให้เข้ากัน (ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5) เติมก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas) ลงในขวดหมักเพื่อไล่อากาศออกและปิดจุก Air-lock แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ ปริมาณลูกแป้งข้าวหมาก (ร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ) และจำนวนวันในการหมัก (1-10 วัน) ที่อุณหภูมิห้อง (ในช่วง 27-29 องศาเซลเซียส) เมื่อครบตามจำนวนวันในการหมัก นำน้ำหมักมากรองด้วยผ้าขาวสะอาด และนำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC)

3.5.3.2 การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง

นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน และที่ผ่านการย่อยทางชีวภาพ (Hydrolysate) จากสภาวะที่เหมาะสมจากหัวข้อ 3.5.2.1 และ 3.5.2.2 ตามลำดับ มาทำการหมักเอทานอล โดยนำมาเติมยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) แล้วคนให้เข้ากัน (ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5) เติมก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas) ลงในขวดหมักเพื่อไล่อากาศออกและปิดจุก Air-lock แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ ปริมาณยีสต์ขนมปัง (ร้อยละ 1-10 โดย

น้ำหนักของวัตถุดิบ) และจำนวนวันในการหมัก (1-10 วัน) ที่อุณหภูมิห้อง (ในช่วง 27-29 องศาเซลเซียส) สำหรับการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางชีวภาพจะเพิ่มปัจจัยที่ทำการศึกษาอีกหนึ่งปัจจัย คือ ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม (0 และ 5 มิลลิลิตร) และเมื่อครบตามจำนวนวันในการหมัก นำน้ำหมักที่ได้มากรองและนำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC)

3.6 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีของทากูชิ (Tagushi Method)

สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้การออกแบบการทดลอง (Screening Experiments) และหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยตารางมาตรฐานของวิธีทากูชิ (Orthogonal Array) 2 ระดับ (The two-level factorial (2^n) experiment) สำหรับปัจจัยที่ใช้ในการวางแผนการลองมี 3 ปัจจัย ประกอบด้วย จำนวนวันในการหมัก (t), ปริมาณลูกแป้งข้าวหมากหรือ ยีสต์ขนมปัง (W) และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเอทานอล (T) นอกจากนี้แต่ละปัจจัยจะประกอบด้วย 2 ระดับ ดังแสดงในตาราง 3-1, 3-2 และ 3-3 ตารางมาตรฐานของทากูชิได้ถูกออกแบบ ซึ่งมีทั้งหมด 4 การทดลอง ที่จะใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล

ตาราง 3-1 ระดับของตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง สำหรับการหมักเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก (ด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน)

Factor	Level 1	Level 2
t (days)	9	10
W (%wt)	3	4
T (°C)	room temp.	30

ตาราง 3-2 ระดับของตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง สำหรับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (ด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน)

Factor	Level 1	Level 2
t (days)	4	5
W (%wt)	4	5
T (°C)	room temp.	30

ตาราง 3-3 ระดับของตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง สำหรับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (ด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางชีวภาพ)

Factor	Level 1	Level 2
t (days)	3	4
W (%wt)	4	5
T (°C)	room temp.	30

สำหรับการออกแบบการทดลองในรูปเมทริกซ์ (Matrix) เพื่อใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม และหาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอล แสดงดังตาราง 3-4

ตาราง 3-4 แสดงแผนการทดลอง Orthogonal Array L4 (2^3) ตามมาตรฐานของ Taguchi method สำหรับการหมักเอทานอลทั้งสามการทดลอง

Exp. No.	t	W	T
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

3.7 ศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอทานอลโดยการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ขนาด 2.5 ลิตร

ในการศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอทานอลด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ จะทำการหมักที่สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้น ซึ่งมี 2 การทดลอง คือ

3.7.1 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน (Thermal-Physic Hydrolysis)

3.7.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment) และการย่อยทางกายภาพ (Hydrolysis)

บดวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ให้ละเอียด จากนั้นชั่งวัตถุดิบ 600 กรัม แล้วเติมน้ำ 400 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ด้วยอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Oil Bath with Shaker) จากนั้นวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.7.1.2 การหมักเอทานอล (Fermentation) แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

(1) การหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก (Loog-Pang Kao Mhark)

นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยแล้ว (Hydrolysate) ใส่ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร แสดงดังภาพประกอบ 3-11 เติมลูกแป้งข้าวหมาก (Loog-Pang KaoMhark) ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ กวนให้เข้ากันกับวัตถุดิบ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 10 วัน โดยทำการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 องศาเซลเซียสและควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 4.5-6.0 เมื่อครบตามจำนวนวันในการหมัก นำน้ำหมักมากรองและนำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC)

ภาพประกอบ 3-11 แสดงการหมักเอทานอลด้วยถังปฏิกรณ์ (Bioreactor) ขนาด 2.5 ลิตร

(2) การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker's Yeast)

นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยแล้ว (Hydrolysate) ใส่ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร เติมยีสต์ขนมปังร้อยละ 4 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ กวนผสมให้เข้ากัน ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 แล้วนำไปหมักเป็นเวลา 5 วัน โดยทำการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 องศาเซลเซียสและควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 4.5-6.0 เมื่อครบตามจำนวนวันในการหมัก นำน้ำหมักมากรองและนำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC)

3.7.2 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางชีวภาพ (Biological Hydrolysis)

3.7.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment) และการย่อยทางกายภาพ (Hydrolysis)

บดวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ให้ละเอียด ใส่วัตถุดิบลงในถุงดำและมัดปากถุงให้สนิท แล้วนำไปเก็บไว้ในถังดำ (ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-90) เพื่อทำการย่อยตามธรรมชาติเป็นเวลา 4 วัน

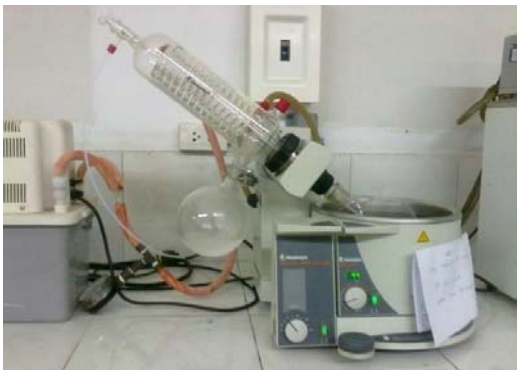
3.7.2.2 การหมักเอทานอล (Fermentation)

ชั่งวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยแล้ว 600 กรัม ใส่ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร เติมยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ กวนผสมให้เข้ากันกับวัตถุดิบ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน โดยทำการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 4.5-6.0 เมื่อครบตามจำนวนวันในการหมัก นำน้ำหมักมากรองและนำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC)

3.8 ศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator)

ทำการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอลโดยการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) โดยใช้น้ำหมักที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด นั่นคือ การผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังจากวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพ (Physical Hydrolysis) และวัตถุดิบที่

ผ่านการย่อยทางชีวภาพ (Biological Hydrolysis) มาทำการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ซึ่งแสดงดังภาพประกอบ 3-12 สภาวะที่ทำการศึกษา คือ การเพิ่มความบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 10 และ 15 นาที (เนื่องจากความดันของเครื่องอยู่ที่ 550 mmHg) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC)



ภาพประกอบ 3-12 แสดงเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator)

3.9 การวิเคราะห์ผลผลิต

3.9.1 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing Sugar) สามารถทำได้โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.9.1.1 นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทั้งวิธีการทางกายภาพ และชีวภาพมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนของของเหลวที่ได้ไปทำการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) เพื่อแยกของแข็งออกจากสารละลายด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แสดงดังภาพประกอบ 3-13

ภาพประกอบ 3-13 แสดงขั้นตอนการแยกสารละลาย

3.9.1.2 นำส่วนของเหลวใสที่ได้ข้างต้นมาผสมกับสารละลาย 3, 5-Dinitro salicylic acid (DNS) ด้วยอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน และนำไปให้ความร้อน (ต้ม) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นด้วยการแช่ในน้ำแข็ง แล้วนำไปวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing Sugar) ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร แสดงดังภาพประกอบ 3-14

ภาพประกอบ 3-14 แสดงเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

3.9.2 ศึกษาการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมัก สามารถทำได้โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.9.2.1 นำน้ำหมักที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง และนำส่วนของเหลวที่ได้มาทำการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) เพื่อแยกของแข็งออกจากสารละลาย ด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.9.2.2 นำส่วนของเหลวใสที่ได้ไปวัดหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) แสดงดังภาพประกอบ 3-15

ภาพประกอบ 3-15 แสดงเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของวัตถุดิบ

จากการศึกษาองค์ประกอบวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ในที่นี้คือ เปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้ม ด้วยวิธีตามมาตรฐานของ AOAC ผลที่ได้แสดงดังตาราง 4-1 จะเห็นได้ว่าเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้มมีองค์ประกอบที่สามารถใช้ในการหมักเอทานอล ดังนี้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้นร้อยละ 2.19 และ 11.46 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดร้อยละ 16.20 และ 36.42 โดยน้ำหนัก และมีปริมาณของเส้นใยร้อยละ 1.40 และ 4.32 โดยน้ำหนัก

ตาราง 4-1 องค์ประกอบของเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด และเปลือกส้ม

องค์ประกอบ	วิธีทดสอบ	เปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	เปลือกส้ม (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
โปรตีน	AOAC	4.69	3.49
ไขมัน	AOAC	0.48	0.34
ความชื้น	AOAC	75.57	53.80
เถ้า	AOAC	1.66	1.63
เส้นใย	AOAC	1.40	4.32
แป้ง (Total Carbohydrate)	Calculation	16.20	36.42
น้ำตาลรีดิวส์	Miller, 1959	2.19	11.46
พลังงาน	Calculation	27.55 kcal	70.91 kcal

จากองค์ประกอบของวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งองค์ประกอบที่สามารถนำมาใช้ในการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้ คือ น้ำตาล (Sugar) แป้ง (Carbohydrate) และเส้นใย (Fiber) ซึ่งมีในทั้งเปลือกเต้าตาลโตนด และเปลือกส้ม เนื่องจากวัตถุดิบ

ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ดังนั้นจึงมีองค์ประกอบของแป้ง (Carbohydrate) น้อยกว่า เมื่อเทียบกับวัตถุดิบทางการเกษตรอื่นๆ เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และอ้อย เป็นต้น (คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

4.2 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด

จากการทดลองนำเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดมาทำการศึกษาการหมัก โดยนำวัตถุดิบมาทำการย่อยด้วยการต้ม ซึ่งศึกษาการเติมน้ำที่ 30 40 และ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที จากนั้นนำมาทำการหมักด้วยเชื้อผสมของราและยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วัน ผลที่ได้แสดงดังตาราง 4-2

ตาราง 4-2 แสดงผลการหมักเอทานอลด้วยเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ซึ่งผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที แล้วทำการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วัน

การทดลองที่	**การย่อยด้วยวิธีทางกายภาพ**		**เอทานอล** (ร้อยละโดยปริมาตร)
	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	**เวลา** (นาที)	
1	30	10	0.10006
2		20	0.14935
3		30	0.26506
4	40	10	0.09412
5		20	0.12707
6		30	0.21267
7	50	10	0.09023
8		20	0.11955
9		30	0.18854

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดสามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้ในปริมาณน้อย ซึ่งเป็นไปได้ว่าการย่อยที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ไม่เพียงพอที่จะย่อยแป้งให้เหมาะสมต่อการหมักต่อไปได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการย่อยที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ผลที่ได้แสดงดังตาราง 4-3

ตาราง 4-3 แสดงผลการหมักเอทานอลด้วยเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ซึ่งผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที แล้วทำการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วัน

การทดลองที่	**การย่อยด้วยวิธีทางกายภาพ**		**เอทานอล** (ร้อยละโดยปริมาตร)
	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	**เวลา** (นาที)	
1	30	10	0.14221
2		20	0.14970
3		30	0.25325
4	40	10	0.09022
5		20	0.15147
6		30	0.25710
7	50	10	0.09550
8		20	0.17774
9		30	0.13969

พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการย่อยเป็น 85 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเอทานอลที่ไม่แตกต่างกันนัก ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มอุณหภูมิในการย่อยเป็น 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 25 นาที รวมทั้งลดปริมาณการเติมน้ำเป็น 10 มิลลิลิตร และไม่เติมน้ำ จากนั้นนำมาทำการหมักด้วยเชื้อผสมของราและยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วัน ผลที่ได้แสดงดังตาราง 4-4

ตาราง 4-4 แสดงผลการหมักเอทานอลด้วยเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 25 นาที โดยทำการศึกษาการเติมน้ำที่ 0 และ 10 มิลลิลิตร ทำการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และเติมน้ำที่ 0, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน

การทดลองที่	**การต้มสุก**		**การหมัก**	**เอทานอล** (ร้อยละโดยปริมาตร)
	ปริมาณน้ำ (มิลลิลิตร)	**เวลาในการต้ม** (นาที)	**ปริมาณน้ำ** (มิลลิลิตร)	
1	0	15	0	0.484
2	0	15	10	0.465
3	0	15	20	0.406
4	0	15	30	0.347
5	10	15	0	0.371
6	10	15	10	0.347
7	10	15	20	0.262
8	10	15	30	0.216
9	10	25	0	0.405
10	10	25	10	0.381
11	10	25	20	0.350
12	10	25	30	0.349

พบว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้น แต่ก็ถือว่ายังไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดน่าจะมีองค์ประกอบที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอล คือ น้ำตาล แป้ง และเส้นใย ปริมาณน้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลได้อย่างเหมาะสม ดังนั้นจึงทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากของผสมเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดร่วมกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทอื่น เพื่อเพิ่มองค์ประกอบของน้ำตาล แป้งและเส้นใย ถึงแม้ว่าเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดจะมีองค์ประกอบที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลในปริมาณไม่มากนัก แต่เปลือกตาลก็มีข้อดีตรงที่มีน้ำ

เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งน้ำมีความสำคัญที่จะต้องใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล ดังนั้นการใช้เปลือกตาลเป็นวัตถุดิบก็จะช่วยลดปริมาณน้ำที่จะต้องเติมในกระบวนการหมัก อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอทานอลอีกด้วย

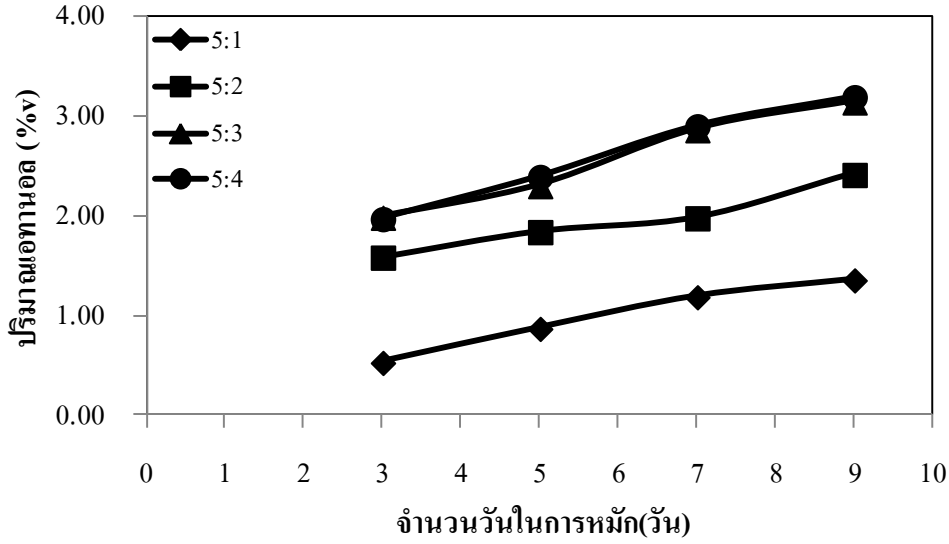
4.3 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดผสมกับเปลือกส้ม

4.3.1 ผลการปรับสภาพ และหาอัตราส่วนวัตถุดิบ

เนื่องจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดมีองค์ประกอบของน้ำตาล (Sugar) แป้ง (Carbohydrate) และเส้นใย (Fiber) ในปริมาณไม่มากพอในการผลิตเอทานอลได้อย่างเหมาะสม ผู้วิจัยจึงหาวัตถุดิบที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทเปลือกผลไม้อื่นมาผสม เพื่อเพิ่มองค์ประกอบของน้ำตาล แป้ง และเส้นใย จึงได้สนใจนำเปลือกส้มมาทำการศึกษา เปลือกส้มเป็นวัสดุเหลือทิ้งและมีองค์ประกอบที่สามารถหมักเป็นเอทานอลได้ทั้ง 3 ชนิด เพียงพอ อีกทั้งความเป็นกรดอ่อนของเปลือกส้มยังมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเชื้อจุลินทรีย์จะเจริญได้ดีในช่วงพีเอช 4.5-6.5 และสำหรับเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดเองก็มีองค์ประกอบของน้ำที่เป็นปัจจัยสำคัญในการหมักด้วยจุลินทรีย์ จึงต้องทำการศึกษาหาอัตราส่วนการผสมของเปลือกทั้ง 2 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

4.3.1.1 ผลของการหาอัตราส่วนวัตถุดิบด้วยการย่อยทางกายภาพและหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก

ผลการศึกษาอัตราส่วนวัตถุดิบด้วยการต้มและหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก แสดงดังภาพประกอบ 4-1 จะเห็นได้ว่าอัตราส่วนของเปลือกส้มมีผลต่อผลผลิตเอทานอล เมื่ออัตราส่วนของเปลือกส้มเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้เอทานอลที่ได้จากการหมักเพิ่มสูงขึ้นด้วย และพบว่าที่อัตราส่วนเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดต่อเปลือกส้มที่ 5:3 เพียงพอสำหรับการนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากการเพิ่มอัตราส่วนเปลือกส้มเป็น 5:4 สามารถได้ผลผลิตอทานอลในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

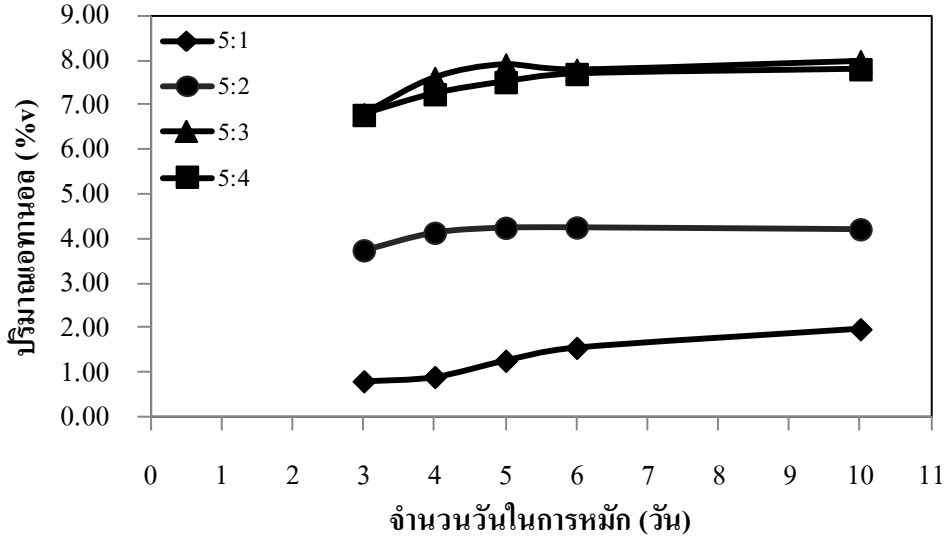


ภาพประกอบ 4-1 ผลการศึกษาหาอัตราส่วนวัตถุดิบที่เหมาะสมในการหมักที่อัตราส่วนเปลือกตาลต่อเปลือกส้มที่ 5:1 5:2 5:3 และ 5:4 โดยผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และนำไปหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 5 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ เป็นเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน

4.3.1.2 ผลการหาอัตราส่วนวัตถุดิบด้วยการย่อยทางชีวภาพและหมักด้วยยีสต์ขนมปัง

จากการศึกษาผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 4-2 จะเห็นได้ว่าเอทานอลที่ได้จากการหมักจะขึ้นอยู่กับจำนวนวันในการหมักที่เพิ่มขึ้น และพบว่าเมื่ออัตราส่วนของเปลือกส้มเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย จะเห็นได้ว่าการหมักเอทานอลด้วยวัตถุดิบที่อัตราส่วนเปลือกตาลต่อเปลือกส้มที่ 5:3 มีความเหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

จากการศึกษาหาอัตราส่วนวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลทั้ง 2 วิธี คือ การย่อยวัตถุดิบด้วยการต้มแล้วหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก และการย่อยวัตถุดิบด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติแล้วหมักด้วยยีสต์ขนมปัง พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนเปลือกส้มเป็น 5:4 สามารถได้ผลผลิตอทานอลในปริมาณใกล้เคียงกันกับที่อัตราส่วน 5:3 ดังนั้นการใช้วัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 จึงเหมาะสมและเพียงพอที่จะนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพประกอบ 4-2 ผลการศึกษาหาอัตราส่วนวัตถุดิบที่เหมาะสมในการหมักที่อัตราส่วนเปลือกตาลต่อเปลือกส้มที่ 5:1 5:2 5:3 และ 5:4 โดยผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ เป็นเวลา 3, 4, 5, 6 และ 10 วัน

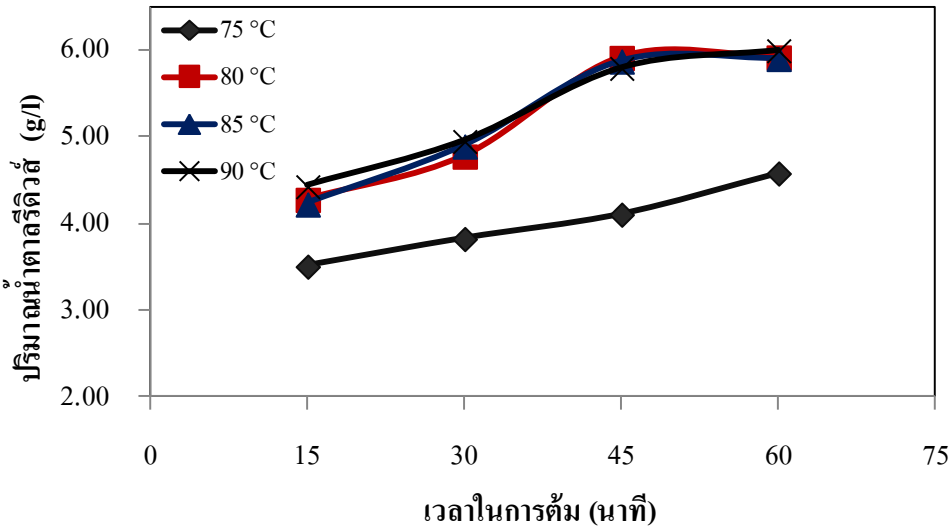
4.3.2 การศึกษาการย่อยวัตถุดิบ (Hydrolysis)

นำวัตถุดิบที่อัตราส่วนเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดต่อเปลือกส้มที่เหมาะสมมาทำการศึกษาการย่อย คือ วัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 โดยจะแบ่งการศึกษาการย่อยเป็น 2 วิธี ดังนี้

4.3.2.1 การศึกษาการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน (Thermal-Physic Hydrolysis) สำหรับปัจจัยที่ทำการศึกษาจะสามารถแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

(1) ศึกษาอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการย่อยทางกายภาพ

จากการทดลองผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 4-3 จะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาในการต้ม (การย่อย) เพิ่มสูงขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) ที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้นด้วยที่ทุกๆ อุณหภูมิ และพบว่าเมื่ออุณหภูมิในการต้มเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ก็จะเพิ่มสูงขึ้นด้วย สำหรับการย่อยที่เวลา 45 และ 60 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ใกล้เคียงกันเมื่อย่อยที่อุณหภูมิ 80 85 และ 90 องศาเซลเซียส คือ ประมาณ 6.01 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการย่อยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เป็นสภาวะที่เพียงพอเหมาะสมแล้ว



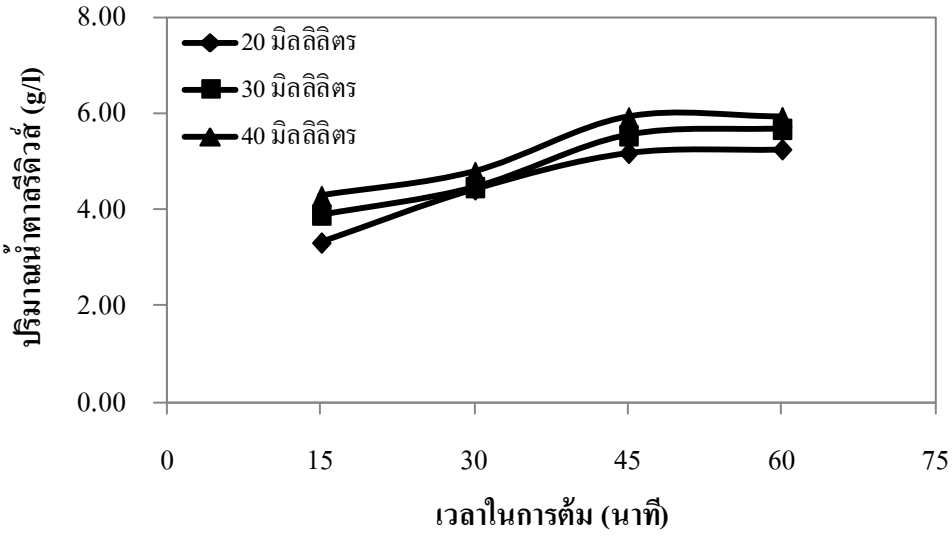
ภาพประกอบ 4-3 ผลการย่อยวัตถุดิบด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 75, 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

(2) ศึกษาปริมาณน้ำที่ต้องเติมเพิ่มเพื่อใช้ในการต้ม

จากการทดลองผลการเติมน้ำที่ปริมาตรต่างๆ (ในช่วง 20-40 มิลลิลิตร) โดยการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 4-4 จะเห็นได้ว่าการเติมน้ำกลั่น 20, 30 และ 40 มิลลิลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ซึ่งการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่เวลาในการย่อย 45 และ 60 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงที่สุดเท่ากับ 6.05 กรัมต่อลิตร จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเติมน้ำมีผลต่อการย่อยวัตถุดิบ ซึ่งปริมาณน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการย่อยได้ดีขึ้น เนื่องจากน้ำจะทำหน้าที่ในการแตกพันธะวัตถุดิบในส่วนของแป้ง และเส้นใย เป็นโมเลกุลที่เล็กลง (น้ำตาลรีดิวส์) ดังนั้นปริมาณน้ำที่เติมลงไปในขั้นตอนการย่อยจึงมีผลต่อประสิทธิภาพในการแตกพันธะ การเติมน้ำ 40 มิลลิลิตร จะสามารถแตกพันธะและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงที่สุด ซึ่งเป็นไปได้ว่าหากมีการเติมน้ำเพิ่มขึ้นอาจส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เพิ่มสูงขึ้นด้วย แต่จากขอบเขตที่ทำการศึกษาจะสรุปได้ว่าการเติมน้ำ 40 มิลลิลิตรมีความเหมาะสมต่อการย่อยมากที่สุด

Arasaratnam (1993) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่มีต่อการย่อย พบว่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีผลต่อการย่อยแป้ง คือ การย่อยวัตถุดิบที่ความเข้มข้น

เริ่มต้นต่ำจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยเพิ่มสูงขึ้นด้วย อันเนื่องมาจากการที่สารตั้งต้นจะไปยับยั้งหรือขัดขวางการย่อยนั่นเอง

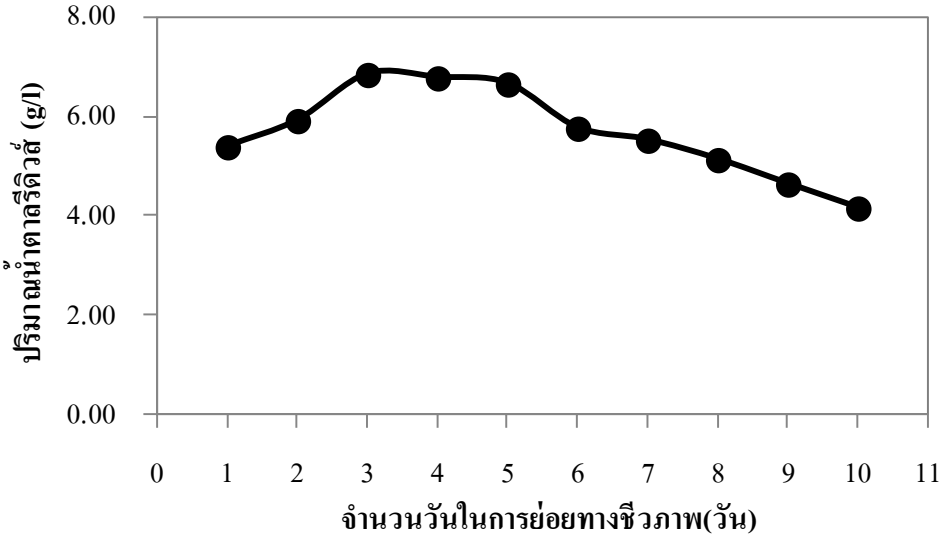


ภาพประกอบ 4-4 ผลการย่อยวัตถุดิบโดยการเติมน้ำที่ 20, 30 และ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

4.3.2.2 การศึกษาการย่อยทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (Biological Hydrolysis)

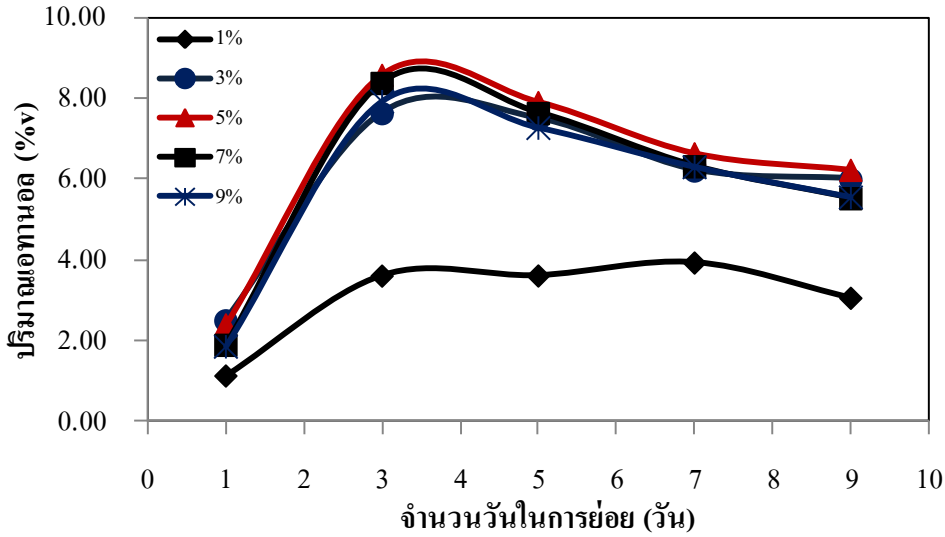
การย่อยวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยนำวัตถุดิบใส่ถุงดำ ปิดปากถุง แล้วเก็บไว้ในที่มืด เพื่อเร่งการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 4-5 จะเห็นได้ว่าเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น 1 ถึง 3 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการย่อยการจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย และจะลดลงเรื่อยๆ หลังจากการย่อย 4 วัน ขึ้นไป ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจมีเชื้อจุลินทรีย์บางตัวใช้น้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้น เพื่อเปลี่ยนเป็นสารอื่น เช่น กรดอะซิติก และกรดแลกติก เป็นต้น จึงสรุปได้ว่าจำนวนวันที่เหมาะสมในการย่อยตามธรรมชาติ คือ การย่อยเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งจะทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวส์ 6.85 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยสภาวะดังกล่าวนี้ ไปศึกษาการหมักต่อไป โดยทั่วไปในธรรมชาติจะมีเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีหน้าที่ย่อยสารอินทรีย์ หรือพืช ผัก ผลไม้ต่างๆ เพื่อเป็นอาหารในการดำรงชีวิต ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ คือ น้ำตาล

ความชื้น อุณหภูมิ เป็นต้น จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองมีสภาวะที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์



ภาพประกอบ 4-5 ผลการย่อยวัตถุดิบด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเป็นเวลา 1-10 วัน

นอกจากการวัดน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นหลังผ่านการย่อยทางชีวภาพแล้ว ยังได้ทำการศึกษานำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยมาทำการหมักเพื่อทดสอบจำนวนวันในการย่อยที่ดีที่สุด ซึ่งได้ทำการย่อย 1-9 วัน จากนั้นนำมาหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 1-9 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ผลที่แสดงดังภาพประกอบที่ 4-6 พบว่าการย่อยวัตถุดิบด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเป็นเวลา 3 วัน จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดไม่ว่าจะทำการหมักด้วยยีสต์ขนมปังปริมาณเท่าใดก็ตาม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการย่อยวัตถุดิบด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเป็นเวลา 3 วัน เพียงพอและเหมาะสมแล้วที่จะนำไปทำการศึกษาการหมักต่อไป



ภาพประกอบ 4-6 ผลการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการย่อย 1, 3, 5, 7, และ 9 วัน ด้วยยีสต์ขนมปัง ร้อยละ 1, 3, 5, 7, และ 9 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ เป็นเวลา 5 วัน

4.3.3 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอล (Fermentation)

4.3.3.1 การผลิตเอทานอลด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน

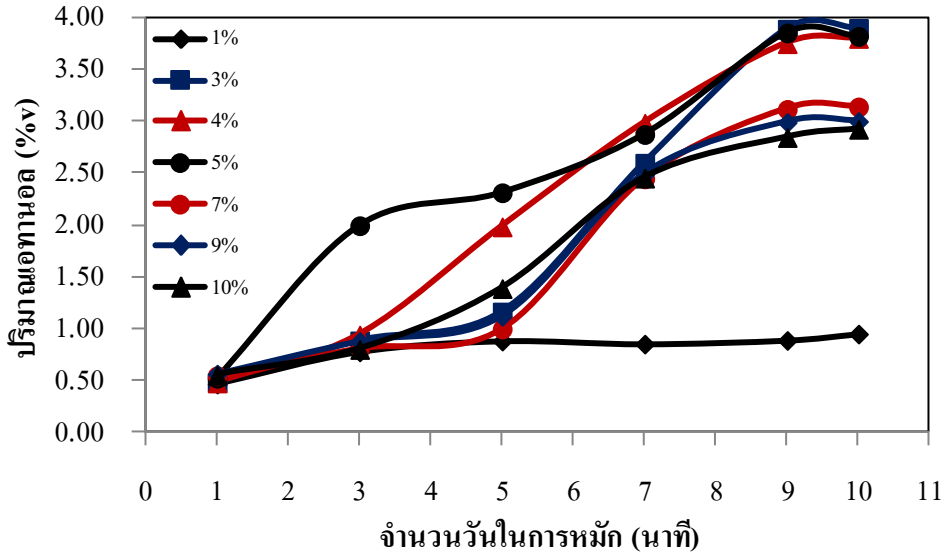
เมื่อนำวัตถุดิบที่อัตราส่วนเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดต่อเปลือกส้มที่ 5:3 มาทำการย่อยทางกายภาพด้วยการเติมน้ำ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แล้ว นำไปศึกษาการหมักต่อไป การหมักจะแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

(1) การหมักเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก (Loog-Pang Kao Mhark)

นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยมาทำการศึกษาการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ ปริมาณลูกแป้งข้าวหมาก (ในช่วงร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ) และจำนวนวันในการหมัก (1-10 วัน) จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) ผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 4-7 จะเห็นได้ว่าการใช้ลูกแป้งข้าวหมากเพียง 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นั้นไม่เพียงพอต่อการนำไปผลิตเอทานอล และเมื่อเพิ่มปริมาณลูกแป้งข้าวหมากตั้งแต่ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักขึ้นไป เอทานอลที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้น และพบว่าในการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากในช่วง 3-7 วัน จะมีการเพิ่มขึ้นของเอทานอลไม่มากนัก แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการหมักเป็น 9-10 วัน พบว่าเอทานอลจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากการที่ลูกแป้งข้าวหมากมีองค์ประกอบของทั้งเชื้อราและยีสต์ ซึ่งราจะทำหน้าที่เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็น

น้ำตาล และยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล ซึ่งเป็นไปได้ว่าราต้องใช้เวลาในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาลค่อนข้างนาน ดังนั้นจึงต้องใช้เวลาในการหมักนานพอสมควร ทำให้ยีสต์สามารถหมักเอทานอลได้มากในช่วงการหมักตั้งแต่ 9-10 วัน จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล คือ การใช้ปริมาณลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 3 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ และทำการหมักเป็นเวลา 9 วัน ซึ่งจะได้เอทานอลร้อยละ 3.96 โดยปริมาตร

Dumrongmanee (2001) ศึกษาการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังบดด้วยลูกแป้งข้าวหมาก พบว่าจะต้องใช้ลูกแป้งร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก และหมักเป็นเวลา 31 วัน จึงจะได้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 9.32 โดยปริมาตร จะเห็นได้ว่าจะต้องใช้เวลาในการหมักค่อนข้างนานจึงจะได้ผลผลิตเอทานอลที่สูง

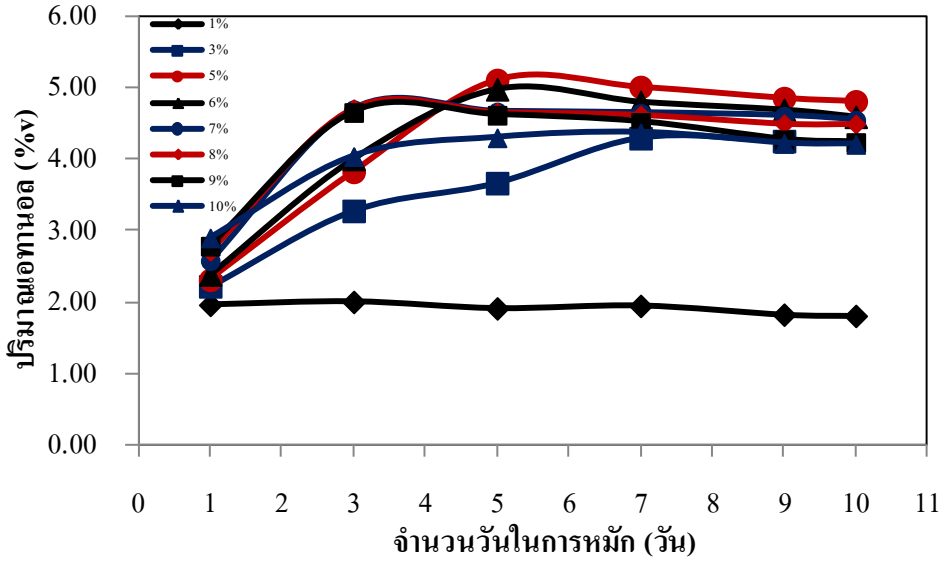


ภาพประกอบ 4-7 ผลการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 1, 3, 4, 5, 7, 9 และ 10 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 1-10 วัน

(2) การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker's Yeast)

นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยมาทำการศึกษาการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ ปริมาณยีสต์ขนมปัง (ในช่วงร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ) และจำนวนวันในการหมัก (1-10 วัน) จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วย

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) ผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 4-8 จะเห็นได้ว่าการใช้ยีสต์ขนมปัง 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นั้นไม่เพียงพอสำหรับการใช้หมักเอทานอลเช่นเดียวกับการหมักเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก สำหรับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 3 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ มีแนวโน้มที่เอทานอลจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนวันในการหมัก และการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังที่ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบขึ้นไป เอทานอลมีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเวลาแรก (จำนวนวันในการหมัก 1-5 วัน) และคงที่เมื่อผ่านการหมักไป 5 วัน จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล คือ การใช้ยีสต์ขนมปังปริมาณร้อยละ 5 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ และทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน สำหรับยีสต์ขนมปังจะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล ซึ่งการดำรงชีวิตของยีสต์ขนมปังมีลักษณะเช่นเดียวกับลูกแป้งข้าวหมาก

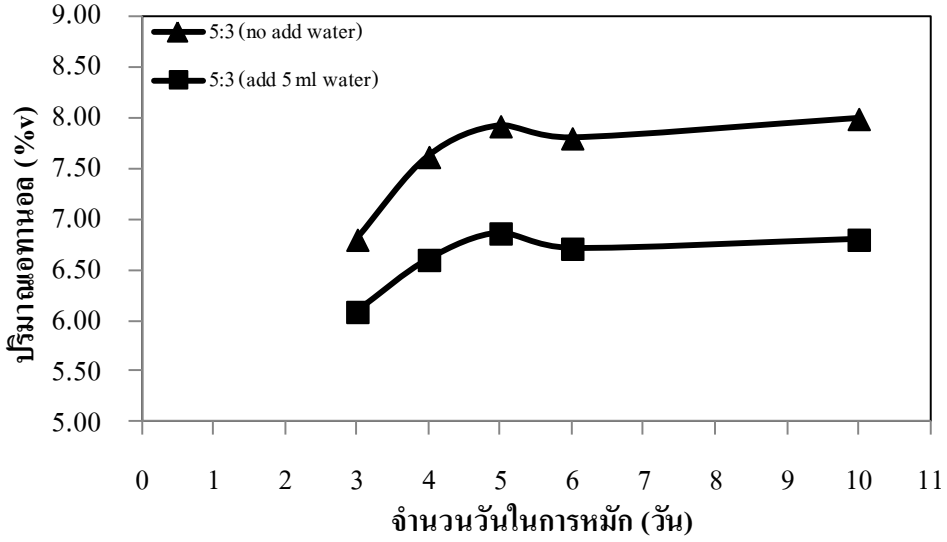


ภาพประกอบ 4-8 ผลการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 1, 3, 4, 5, 7, 9 และ 10 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 1-10 วัน

4.3.3.2 ศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางชีวภาพ

นำวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยมาทำการศึกษาการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง อันดับแรกที่จะทำการศึกษา คือ การเติมน้ำกลั่นในขั้นตอนการหมัก (0 และ 5 มิลลิลิตร) ผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบที่ 4-9 จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบการเติมน้ำกลั่นเพียง 5 มิลลิลิตร และไม่เติมน้ำกลั่น

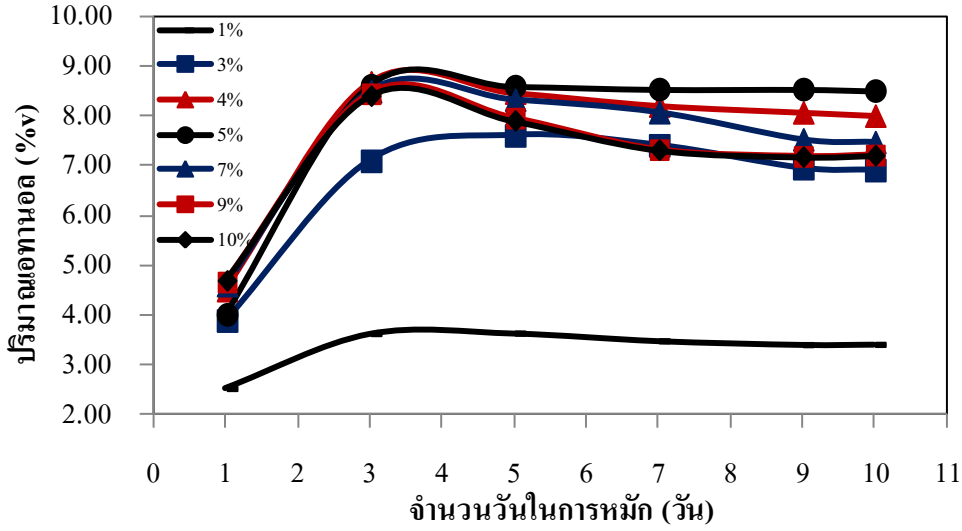
จะสามารถผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งการเติมน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยในขั้นตอนการหมักจะทำให้ความเข้มข้นของผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าเล็กน้อย เนื่องจากการเติมน้ำในขั้นตอนการหมักจะเป็นการเจือจางผลผลิตเอทานอล จึงสรุปได้ว่าไม่มีความจำเป็นที่จะเติมน้ำกลั่นในขั้นตอนการหมัก เนื่องจากปริมาณน้ำในวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักมีเพียงพอสำหรับการทำงานรวมทั้งการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติและยีสต์ขนมปัง โดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติจะทำหน้าที่ในการย่อยคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาล และยีสต์ขนมปังจะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลต่อไป



ภาพประกอบ 4-9 ผลการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเป็นเวลา 3 วัน ด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ โดยมีการเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร และไม่มีการเติมน้ำ แล้วนำไปหมักเป็นเวลา 3, 4, 5, 6 และ 10 วัน

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการศึกษาการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง คือ ปริมาณยีสต์ขนมปัง (ในช่วงร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ) และจำนวนวันในการหมัก (1-10 วัน) จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) ผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 4-10 จะเห็นได้ว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกและคงที่เมื่อใช้เวลาในการหมักตั้งแต่ 3 วัน ขึ้นไป และพบว่าการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังที่ร้อยละ 5, 7, 9 และ 10 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 3 วัน จะให้ปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกัน คือ ประมาณร้อยละ 9.00

โดยปริมาตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล คือ การใช้ยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และไม่มีการเติมน้ำในขั้นตอนการหมัก แล้วทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน



ภาพประกอบ 4-10 ผลการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเป็นเวลา 3 วัน ด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 1, 3, 4, 5, 7, 9 และ 10 โดยน้ำหนักวัตถุดิบ เป็นเวลา 1-10 วัน

4.4 วิธีทากุชิ (Taguchi method)

จากการศึกษาการหมักเอทานอลทั้ง 3 สภาวะ ด้วยวิธีการหมักแบบกะ มาทำการศึกษาด้วยวิธีทากุชิ เพื่อยืนยันผลที่ได้และหาสภาวะที่ดีที่สุด รวมทั้งดูว่าสามารถลดปัจจัยใดได้บ้าง โดยจะใช้วิธีการออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ด้วยหลักการของทากุชิ ซึ่งจะกำหนดระดับตัวแปร 2^3 ระดับ คือ กำหนดตัวแปรที่มีผลต่อการหมักเอทานอล 3 ตัวแปร คือ เวลาในการหมัก (t), ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (W) และอุณหภูมิในการหมัก (T) และกำหนดระดับของตัวแปรที่ 2 ระดับ และทำการทดลอง 4 ครั้ง

4.4.1 การผลิตเอทานอลจากการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อน

4.4.1.1 การผลิตเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก (Loog-Pang Kao Mhark)

เริ่มจากกำหนดปัจจัยตัวแปรที่ต้องการศึกษา จากนั้นทำตารางแผนการทำงานและทำการหมักเอทานอลตามแผนการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-5 โดยกำหนดให้

t = วันในการหมัก (ระดับของตัวแปร: 1 = 9 วัน, 2 = 10 วัน)

W = ร้อยละลูกแป้งข้าวหมาก (ระดับของตัวแปร: 1 = 3%wt, 2 = 4%wt)

T = อุณหภูมิในการหมัก (ระดับของตัวแปร: 1 = อุณหภูมิห้อง, 2 = 30 ºC)

ตาราง 4-5 ผลการทดลองด้วยมาตรฐานของทากูชิ (Orthogonal Array) L4 (2^3) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก

การทดลอง	**t** (9, 10 วัน)	**W** (3, 4%wt)	**T** (room temp., 30 ºC)	**เอทานอล** (ร้อยละโดยปริมาตร)
1	1	1	1	3.6031
2	1	2	2	3.6998
3	2	1	2	4.1481
4	2	2	1	3.8127

พบว่าปัจจัยที่ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลดีที่สุด คือ การหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จะได้ผลผลิตเอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 4.15 โดยปริมาตร สำหรับการวิเคราะห์ผลการทดลองการหมักเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมากตามมาตรฐานของทากูชิ แสดงดังตาราง 4-6 ซึ่งคอลัมน์ที่ 2 จะศึกษาถึงผลของแต่ละปัจจัยที่มีต่อการหมักเอทานอล สำหรับคอลัมน์ที่ 3 จะแสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีต่อกระบวนการหมักเอทานอล สำหรับวิธีการคำนวณผลของแต่ละปัจจัยดังแสดง

ตารางที่ 4-6 การวิเคราะห์ตารางมาตรฐานของทากูชิ จากการหมักเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมาก

No.	t	W	T	t x W	t x T	W x T	Response	$\bar{t}_1 \mid \frac{y_1 2\, y_2}{2} \mid$ 3.6515 $\bar{t}_2 \mid \frac{y_3 2\, y_4}{2} \mid$ 3.9804
1	1	1	1	1	1	1	y_1=3.6031	$\bar{W}_1 \mid \frac{y_1 2\, y_3}{2} \mid$ 3.8756
2	1	2	2	2	2	1	y_2=3.6998	$\bar{W}_2 \mid \frac{y_2 2\, y_4}{2} \mid$ 3.7563
3	2	1	2	2	1	2	y_3=4.1481	$\bar{T}_1 \mid \frac{y_1 2\, y_4}{2} \mid$ 3.7079
4	2	2	1	1	2	2	y_4=3.8127	$\bar{T}_2 \mid \frac{y_2 2\, y_3}{2} \mid$ 3.9240

$\overline{txW_1} \mid \frac{y_1 2\, y_4}{2} \mid$ 3.7079 $\quad$ $\overline{txT_1} \mid \frac{y_1 2\, y_3}{2} \mid$ 3.8756 $\quad$ $\overline{WxT_1} \mid \frac{y_1 2\, y_2}{2} \mid$ 3.6515

$\overline{txW_2} \mid \frac{y_2 2\, y_3}{2} \mid$ 3.9240 $\quad$ $\overline{txT_2} \mid \frac{y_2 2\, y_4}{2} \mid$ 3.7563 $\quad$ $\overline{WxT_2} \mid \frac{y_3 2\, y_4}{2} \mid$ 3.9804

ผลของ $t \mid \left|\bar{t}_1 4 \bar{t}_2\right| \mid \left|3.6515 4 3.9804\right| \mid$ 0.3290

ผลของ $W \mid \left|\bar{W}_1 4 \bar{W}_2\right| \mid \left|3.8756 4 3.7563\right| \mid$ 0.1194

ผลของ $T \mid \left|\bar{T}_1 4 \bar{T}_2\right| \mid \left|3.7079 4 3.9240\right| \mid$ 0.2161

ผลของ $txW \mid \left|\overline{txW_1} 4 \overline{txW_2}\right| \mid \left|3.6515 4 3.9804\right| \mid$ 0.3290

ผลของ $txT \mid \left|\overline{txT_1} 4 \overline{txT_2}\right| \mid \left|3.8756 4 3.7563\right| \mid$ 0.1193

ผลของ $WxT \mid \left|\overline{WxT_1} 4 \overline{WxT_2}\right| \mid \left|3.6515 4 3.9804\right| \mid$ 0.3289

จากการวิเคราะห์ผลด้วยตารางมาตรฐานของทากุชิพบว่า ปัจจัยของเวลาในการหมักเอทานอล (t) มีผลต่อการหมักเอทานอลมากที่สุด คือ การเพิ่มเวลาในการหมักเอทานอลจะมีผลต่อการหมักเอทานอลมากกว่าการเพิ่มปัจจัยของปริมาณลูกแป้งข้าวหมากที่ใช้ในการหมัก (W) และอุณหภูมิในการหมัก (T) สำหรับปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามพบว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของเวลาในการหมักเอทานอล (t) และปริมาณลูกแป้งที่ใช้ในการหมัก (W) มีผลเกื้อหนุนต่อกันมากที่สุด คือ การเพิ่มจำนวนวันในการหมัก (t) สามารถลดปริมาณลูกแป้งที่ใช้ในการหมัก (W) ได้ นอกจากนี้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูกแป้งที่ใช้ในการหมัก (W) และอุณหภูมิในการหมัก (T) ก็ยังมีผลเกื้อหนุนต่อกันมากเช่นกัน คือ การเพิ่มอุณหภูมิในการหมัก (T) สามารถลดปริมาณลูกแป้งที่ใช้ในการหมัก (W) ได้ จะเห็นได้ว่าปริมาณลูกแป้งที่ใช้ในการหมักนั้นมีผลต่อการหมักน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับปัจจัยอื่น ดังนั้นการใช้ลูกแป้งให้พอเหมาะต่อการหมักเอทานอลก็เพียงพอแล้ว

จากสภาวะการทดลองการหมักเอทานอลด้วยลูกแป้งข้าวหมักด้วยวิธีของทากุชิพบว่ามีบางปัจจัยที่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ ร้อยละของลูกแป้งข้าวหมากที่ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก และพบว่าการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มจำนวนวันในการหมักเป็น 10 วัน จะให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงขึ้นกว่าเดิมอีกด้วยเท่ากับร้อยละ 4.15 โดยปริมาตร

4.4.1.2 การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*)

เริ่มจากกำหนดปัจจัยตัวแปรที่ต้องการศึกษา จากนั้นทำตารางแผนการทำงานและทำการหมักเอทานอลตามแผนการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-7 โดยกำหนดให้

t = วันในการหมัก (ระดับของตัวแปร: 1 = 4 วัน, 2 = 5 วัน)

W = เปอร์เซ็นต์ยีสต์ขนมปัง (ระดับของตัวแปร: 1 = 4%wt, 2 = 5%wt)

T = อุณหภูมิในการหมัก (ระดับของตัวแปร: 1 = room temp., 2 = 30 ºC)

ตาราง 4-7 ตารางแผนการทดลอง (Orthogonal Array) L4 (2^3) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง

การทดลอง	**t** (4, 5 วัน)	**W** (4, 5 %wt)	**T** (room temp., 30 ºC)	**เอทานอล** (ร้อยละโดยปริมาตร)
1	1	1	1	5.2748
2	1	2	2	5.3079
3	2	1	2	5.5787
4	2	2	1	5.3115

พบว่าปัจจัยที่ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลดีที่สุด คือ การหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จะได้ผลผลิตเอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 5.58 โดยปริมาตร สำหรับการวิเคราะห์ผลการทดลองการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังตามมาตรฐานของทากูชิ แสดงดังตาราง 4-8 สำหรับวิธีการคำนวณผลของแต่ละปัจจัยดังแสดง

ตารางที่ 4-8 การวิเคราะห์ตารางมาตรฐานของทากูชิ จากการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง

No.	t	W	T	t x W	t x T	W x T	Response	$\bar{t}_1 \mid \frac{y_1 2\, y_2}{2} \mid$ 5.2914 $\bar{t}_2 \mid \frac{y_3 2\, y_4}{2} \mid$ 5.4451
1	1	1	1	1	1	1	y_1=5.2748	$\overline{W_1} \mid \frac{y_1 2\, y_3}{2} \mid$ 5.4268
2	1	2	2	2	2	1	y_2=5.3079	$\overline{W_2} \mid \frac{y_2 2\, y_4}{2} \mid$ 5.3097
3	2	1	2	2	1	2	y_3=5.5787	$\overline{T_1} \mid \frac{y_1 2\, y_4}{2} \mid$ 5.2932
4	2	2	1	1	2	2	y_4=5.3115	$\overline{T_2} \mid \frac{y_2 2\, y_3}{2} \mid$ 5.4433

$\overline{txW_1}$ | $\frac{y_1 2\ y_4}{2}$ | 5.2932 $\overline{txT_1}$ | $\frac{y_1 2\ y_3}{2}$ | 5.4268 $\overline{WxT_1}$ | $\frac{y_1 2\ y_2}{2}$ | 5.2914

$\overline{txW_2}$ | $\frac{y_2 2\ y_3}{2}$ | 5.4433 $\overline{txT_2}$ | $\frac{y_2 2\ y_4}{2}$ | 5.3097 $\overline{WxT_2}$ | $\frac{y_3 2\ y_4}{2}$ | 5.4451

ผลของ t | $\left|\overline{t_1} 4 \overline{t_2}\right|$ | $|5.2914 4 5.4451|$ | 0.1537

ผลของ W | $\left|\overline{W_1} 4 \overline{W_2}\right|$ | $|5.4268 4 5.3097|$ | 0.1171

ผลของ T | $\left|\overline{T_1} 4 \overline{T_2}\right|$ | $|5.2932 4 5.4433|$ | 0.1501

ผลของ txW | $\left|\overline{txW_1} 4 \overline{txW_2}\right|$ | $|5.2932 4 5.4433|$ | 0.1501

ผลของ txT | $\left|\overline{txT_1} 4 \overline{txT_2}\right|$ | $|5.4268 4 5.3097|$ | 0.1171

ผลของ WxT | $\left|\overline{WxT_1} 4 \overline{WxT_2}\right|$ | $|5.2914 4 5.4451|$ | 0.1537

จากการวิเคราะห์ผลด้วยตารางมาตรฐานของทากุชิพบว่า ปัจจัยของเวลาในการหมักเอทานอล (t) มีผลต่อการหมักเอทานอลมากที่สุด คือ การเพิ่มเวลาในการหมักเอทานอลจะมีผลต่อการหมักเอทานอลมากกว่าการเพิ่มปัจจัยอื่น สำหรับปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามพบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของปริมาณยีสต์ขนมปัง (W) และอุณหภูมิในการหมักเอทานอล (T) มีผลเกื้อหนุนต่อกันมากที่สุด คือ การเพิ่มอุณหภูมิในการหมัก (T) สามารถลดปริมาณยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (W) ได้

จากสภาวะการทดลองการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังด้วยวิธีของทากุชิ พบว่ามีบางปัจจัยที่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ จำนวนการหมักที่ 5 วัน และพบว่าสามารถลดปัจจัยของปริมาณของยีสต์ขนมปังได้ที่ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และทำการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงขึ้นกว่าเดิมเท่ากับร้อยละ 5.58 โดยปริมาตร

4.4.2 สภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการย่อยทางชีวภาพ และการหมักเอทานอล

เริ่มจากกำหนดปัจจัยตัวแปรที่ต้องการศึกษา จากนั้นทำตารางแผนการทำงานและทำการหมักเอทานอลตามแผนการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-9 โดยกำหนดให้

t = วันในการหมัก (ระดับของตัวแปร: 1 = 3 วัน, 2 = 4 วัน)

W = เปอร์เซ็นต์ยีสต์ขนมปัง (ระดับของตัวแปร: 1 = 4%wt, 2 = 5%wt)

T = อุณหภูมิในการหมัก (ระดับของตัวแปร: 1 = room temp., 2 = 30 ºC)

ตาราง 4-9 ตารางแผนการทดลอง (Orthogonal Array) L4 (2^3) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (ย่อยด้วยวิธีทางชีวภาพ)

การทดลอง	**t** (3, 4 วัน)	**W** (4, 5 %wt)	**T** (room temp., 30 ºC)	**เอทานอล** (ร้อยละโดยปริมาตร)
1	1	1	1	8.7162
2	1	2	2	8.7052
3	2	1	2	9.0504
4	2	2	1	8.7692

พบว่าปัจจัยที่ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลดีที่สุด คือ การหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จะได้ผลผลิตเอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 9.05 โดยปริมาตร สำหรับการวิเคราะห์ผลการทดลองการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังตามมาตรฐานของทากูชิ แสดงดังตาราง 4-10 สำหรับวิธีการคำนวณผลของแต่ละปัจจัยดังแสดง

ตารางที่ 4-10 การวิเคราะห์ตารางมาตรฐานของทากูชิ จากการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (ย่อยด้วยวิธีทางชีวภาพ)

No.	t	W	T	t x W	t x T	W x T	Response	$\bar{t}_1 \mid \frac{y_1 2\, y_2}{2} \mid$ 8.7107 $\bar{t}_2 \mid \frac{y_3 2\, y_4}{2} \mid$ 8.9098
1	1	1	1	1	1	1	y_1=8.7162	$\overline{W_1} \mid \frac{y_1 2\, y_3}{2} \mid$ 8.8833
2	1	2	2	2	2	1	y_2=8.7052	$\overline{W_2} \mid \frac{y_2 2\, y_4}{2} \mid$ 8.7372
3	2	1	2	2	1	2	y_3=9.0504	$\overline{T_1} \mid \frac{y_1 2\, y_4}{2} \mid$ 8.7427
4	2	2	1	1	2	2	y_4=8.7692	$\overline{T_2} \mid \frac{y_2 2\, y_3}{2} \mid$ 8.8778

$\overline{txW_1} \mid \frac{y_1 2\, y_4}{2} \mid$ 8.7427 $\overline{txT_1} \mid \frac{y_1 2\, y_3}{2} \mid$ 8.8833 $\overline{WxT_1} \mid \frac{y_1 2\, y_2}{2} \mid$ 8.7107

$\overline{txW_2} \mid \frac{y_2 2\, y_3}{2} \mid$ 8.8778 $\overline{txT_2} \mid \frac{y_2 2\, y_4}{2} \mid$ 8.7372 $\overline{WxT_2} \mid \frac{y_3 2\, y_4}{2} \mid$ 8.9098

ผลของ $t \mid \left|\bar{t}_1 4 \bar{t}_2\right| \mid \left|8.7107 4 8.9098\right| \mid$ 0.1991

ผลของ $W \mid \left|\overline{W_1} 4 \overline{W_2}\right| \mid \left|8.8833 4 8.7372\right| \mid$ 0.1461

ผลของ $T \mid \left|\overline{T_1} 4 \overline{T_2}\right| \mid \left|8.7427 4 8.8778\right| \mid$ 0.1351

ผลของ $txW \mid \left|\overline{txW_1} 4 \overline{txW_2}\right| \mid \left|8.7427 4 8.8778\right| \mid$ 0.1351

ผลของ $txT \mid \left|\overline{txT_1} 4 \overline{txT_2}\right| \mid \left|8.8833 4 8.7372\right| \mid$ 0.1461

ผลของ $WxT \mid \left|\overline{WxT_1} 4 \overline{WxT_2}\right| \mid \left|8.7107 4 8.9098\right| \mid$ 0.1991

จากการวิเคราะห์ผลด้วยตารางมาตรฐานของทากุชิพบว่า ปัจจัยของเวลาในการหมักเอทานอล (t) มีผลต่อการหมักเอทานอลมากที่สุด คือ การเพิ่มเวลาในการหมักเอทานอลจะมีผลต่อการหมักเอทานอลมากกว่าการเพิ่มปัจจัยอื่น สำหรับปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามพบว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของปริมาณยีสต์ขนมปัง (W) และอุณหภูมิในการหมักเอทานอล (T) มีผลเกื้อหนุนต่อกันมากที่สุด คือ การเพิ่มอุณหภูมิในการหมัก (T) สามารถลดปริมาณยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (W) ได้ และในทำนองเดียวกัน การเพิ่มปริมาณยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (W) ก็สามารถช่วยลดอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักได้

จากสภาวะการทดลองการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังด้วยวิธีของทากุชิ พบว่า เมื่อทำการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส จะสามารถลดปัจจัยของปริมาณของยีสต์ขนมปังได้ที่ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และเพิ่มจำนวนวันหมักเป็น 4 วัน จะให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงขึ้นกว่าเดิมเท่ากับร้อยละ 9.05 โดยปริมาตร

4.5 การหมักเอทานอลด้วยถังปฏิกรณ์ (Bioreactor)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยวิธีทากุชิ (Tagushi method) ทั้ง 3 สภาวะ มาทดลองหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ขนาด 2.5 ลิตร ผลที่ได้แสดงดังตาราง 4-11 จะเห็นได้ว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์จะสูงกว่าการทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังจะให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงกว่าการหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก ดังนั้นจึงจะนำผลผลิตที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ขนมปังทั้ง 2 สภาวะมาทำการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ต่อไป

ตาราง 4-11 ผลการทดลองการหมักเอทานอลด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร

สภาวะการทดลอง	**เอทานอล** (ร้อยละโดยปริมาตร)
การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางกายภาพเชิงความร้อนฟิสิกส์	4.3181
(1) การหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก	
(2) การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	5.7759
การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ธรรมชาติ	9.5012
(1) การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	

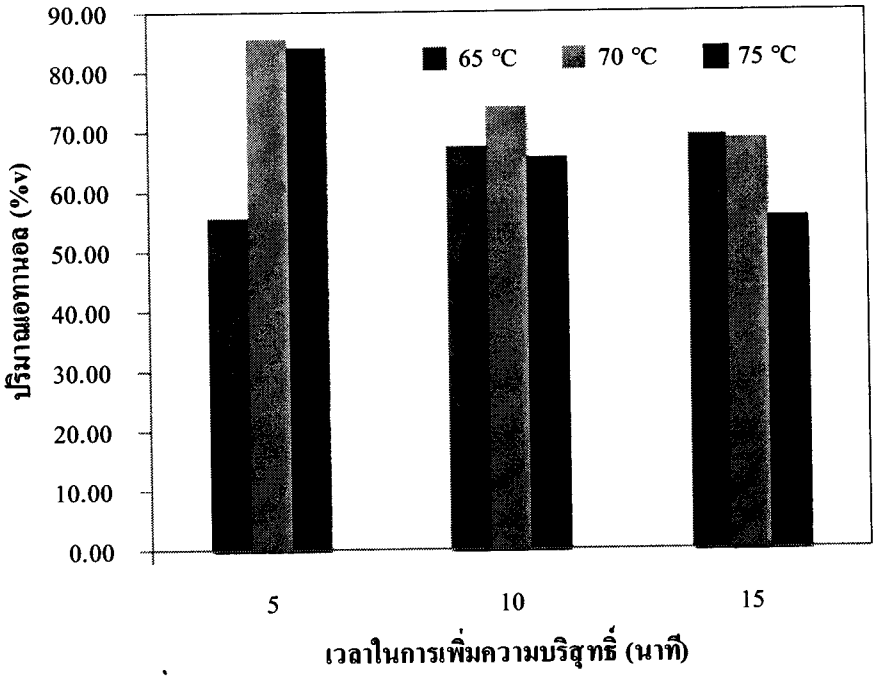
4.6 การเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน

จากการทดลองการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังทั้ง 2 สภาวะ ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ขนาด 2.5 ลิตร นำผลผลิตเอทานอลที่ได้มาทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

4.6.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2.5 ลิตร

จากการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอทานอลจากการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 65-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที ที่ความดัน 550 มิลลิเมตรปรอท ผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 4-11 จะเห็นได้ว่าการระเหยเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศสามารถแยกเอทานอลได้ประสิทธิภาพค่อนข้างดี จากการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาการระเหยจะทำให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มสูงขึ้นด้วย แต่ค่อนข้างใช้เวลาในการระเหยนานจนเกินไป แต่จากการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 70 และ 75 องศาเซลเซียส พบว่าเอทานอลที่ได้จะมีความบริสุทธิ์น้อยลงเมื่อเพิ่มเวลาในการระเหย เนื่องมาจากอุณหภูมิที่ใช้ในการระเหยค่อนข้างสูง ซึ่งน้ำอาจมีการระเหยออกมาบางส่วนและเมื่อ

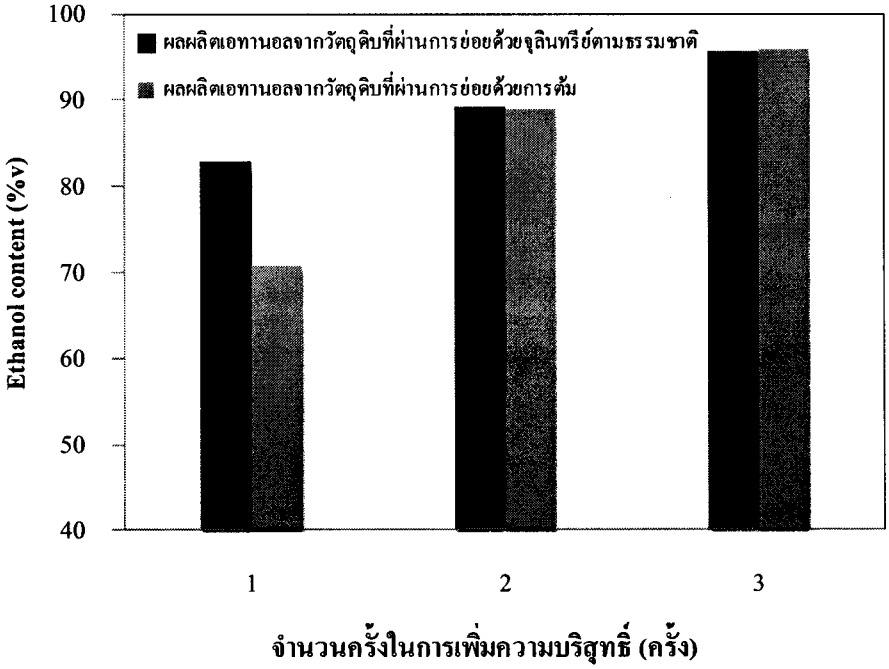
เวลาผ่านไปนานขึ้น น้ำก็จะระเหยออกมาในปริมาณมากขึ้นด้วย จึงทำให้เอทานอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ลดลง และยังพบอีกว่าการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 85.51



ภาพประกอบ 4-11 ผลการเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส (ที่ความดัน 550 มิลลิเมตรปรอท) เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที

4.6.2 จำนวนครั้งในการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้ได้เอทานอลร้อยละ 95 โดยปริมาตร

จากการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การแยกเอทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันเพียงหนึ่งครั้งไม่เพียงพอที่จะเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลได้ถึงร้อยละ 95 โดยปริมาตร ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองนำเอทานอลที่ได้จากข้างต้นมาทำการระเหยแยกซ้ำด้วยสภาวะเดิม ผลที่ได้แสดงดังภาพประกอบที่ 4-12 จะเห็นได้ว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติและการย่อยด้วยการต้ม ทั้ง 2 สภาวะ จะต้องทำการแยกซ้ำถึง 2 ครั้ง จึงจะได้เอทานอลความบริสุทธิ์ที่สูงกว่าร้อยละ 95 โดยปริมาตร คือเท่ากับ 96.7 และ 95.9 โดยปริมาตร ตามลำดับ



ภาพประกอบ 4-12 ผลของจำนวนในการเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.6.3 ผลผลิตเอทาอานอลที่ได้จากการหมักและการเพิ่มความบริสุทธิ์

จากการศึกษาการหมักและการเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนสามารถคำนวณผลผลิตเอทานอล (Yield) ที่ได้จากทั้ง 2 สภาวะการทดลอง คือ การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังจากวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติและการย่อยด้วยการต้ม ดังแสดงดังตาราง 4-12 จะให้ได้ว่าเอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติจะให้ผลผลิตเอทาที่สูงกว่า แสดงว่าการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติมีประสิทธิภาพในการย่อยวัตถุดิบให้ได้เป็นน้ำตาล มากกว่าการใช้ความร้อนในการย่อย และจากการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอล พบว่าเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะแยกเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์ที่สูงกว่าร้อยละ 95 โดยปริมาตร

ตารางที่ 4-12 แสดงผลผลิตเอทานอล จากทั้ง 2 สภาวะ

สภาวะ	**การย่อยด้วยการต้ม และหมักด้วยยีสต์ขนมปัง**	**การย่อยทางชีวภาพ และหมักด้วยยีสต์ขนมปัง**
ผลผลิตหลังการหมัก	Purity: ร้อยละ 5.76 โดยปริมาตร Yield: ร้อยละ 64.15	Purity: ร้อยละ 9.50 โดยปริมาตร Yield: ร้อยละ 82.80
ผลผลิตหลังเพิ่มความบริสุทธิ์	Purity: ร้อยละ 95.89 โดยปริมาตร Yield: ร้อยละ 5.48	Purity: ร้อยละ 96.70 โดยปริมาตร Yield: ร้อยละ 15.60

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การผลิตเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนดผสมกับเปลือกส้ม

ผลผลิตเหลือทิ้งทางการเกษตรสามารถนำมาสร้างมูลค่าเพิ่มเปลี่ยนเป็นพลังงานทดแทนด้วยการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้

(1) การเตรียมวัตถุดิบ

การเตรียมวัตถุดิบสำหรับการหมักพบว่า การใช้วัตถุดิบที่อัตราส่วนของเปลือกตาล: เปลือกส้มเท่ากับ 5:3 มีความเหมาะสมในการนำไปผลิตเอทานอลมากที่สุด เนื่องจากมีความเหมาะสมและเอื้อต่อการหมักเอทานอล ซึ่งวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปสำหรับการผลิตเอทานอล

(2) การย่อย (Hydrolysis)

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยการต้ม คือ การต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จะได้น้ำตาลรีดิวส์สูงที่สุดเท่ากับ 6.01 กรัมต่อลิตร

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ โดยการบรรจุไว้ในถุงดำปิดปากถุงวางในที่มืดและมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 80 – 90 ปล่อยให้เกิดการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเป็นเวลา 4 วัน จะได้น้ำตาลรีดิวส์สูงที่สุดเท่ากับ 6.85 กรัมต่อลิตร

(3) การหมัก (Fermentation)

สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยการต้มและทำการหมักด้วยเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก คือ ใช้ลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นประมาณ 5 ภายใต้อุณหภูมิห้อง หมักเป็นเวลา 9 วัน จะได้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 4.15 โดยปริมาตร

สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยด้วยการต้มและหมักด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker's Yeast) คือ ใช้ยีสต์ขนมปังร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นประมาณ 5 ภายใต้อุณหภูมิห้อง (25 – 35 องศาเซลเซียส) หมักเป็นเวลา 5 วัน จะได้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 5.57 โดยปริมาตร

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติและหมักด้วยยีสต์ขนมปัง คือ ใช้ยีสต์ขนมปังร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นประมาณ 5 ภายใต้อุณหภูมิห้อง หมักเป็นเวลา 3 วัน จะได้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 9.05 โดยปริมาตร

5.2 การขยายขนาดกำลังการผลิตเอทานอลด้วยการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 2.5 ลิตร

จากการศึกษาการหมักเอทานอลด้วยสภาวะที่เหมาะสมทั้ง 3 สภาวะ (ตามหัวข้อ 5.1.3) แต่ทำการควบคุมอุณภูมิให้คงที่ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถได้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 4.32, 5.78 และ 9.50 โดยปริมาตร ตามลำดับ

5.3 การเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตเอทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน

จากการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความดัน 550 มิลลิเมตรปรอท เป็นเวลา 5 นาที จะสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้ถึงร้อยละ 85 โดยปริมาตร และการดำเนินการซ้ำครั้งที่ 3 จึงจะสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้มากกว่าร้อยละ 95 โดยปริมาตร

5.4 ข้อเสนอแนะ

(1) เพื่อให้การหมักเอทานอลด้วยเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ควรใช้เปลือกตาลผสมกับวัตถุดิบอื่น เช่น เปลือกส้มสายพันธุ์อื่น เปลือกส้มโอ และมะนาว เป็นต้น ซึ่งมีองค์ประกอบที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

(2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักจะต้องสะอาด ปราศจากการปนเปื้อน เพื่อให้การหมักที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

(3) ลูกแป้งข้าวหมากที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ควรสังเกตลักษณะว่าเสื่อมคุณภาพหรือไม่โดยสังเกตจากสีต้องขาว มีรูพรุน และไม่มีกลิ่นเหม็น เพราะลูกแป้งที่เสื่อมคุณภาพจะสามารถผลิตเอทานอลได้น้อย

(4) ควรเก็บรักษาลูกแป้งและยีสต์ขนมปังซึ่งเป็นแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ไว้ในที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และควรมีภาชนะแบ่งใช้เพื่อป้องกันการปนเปื้อน เพราะอาจทำให้เชื้อเสื่อมสภาพหรือตายได้

เอกสารอ้างอิง

กอ สะแกกรัง. 2545. ลูกแป้งเหล้าหัวใจของเหล้าพื้นบ้าน. เกษตรกรรมธรรมชาติ. 8: 18-19.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. กรุงเทพฯ: คณะกรรมาธิการ.

ชลดา ซื่อสัตย์, บงกชรัตน์ ปิติยนต์, ธีรภัทร ศรีนรคุตร และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2547. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. หน้าที่ 450-458. สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม.

จิราภรณ์ สุขุมาวาสี. 2518. การศึกษาทางชีววิทยาของลูกแป้งข้าวหมาก. หน้าที่ 381-390. การประชุมวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 14.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2537. ตาลโตนด. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ เพชรกะรัต.

พักตร์ประไพ ประจำเมือง และวิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2546. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง. หน้าที่ 28-31. วารสารศูนย์บริการวิชาการ ปีที่ 11 ฉบับที่ 4.

ณรงค์ เพ็ชรประเสริฐ. 2547. น้ำมัน สถานการณ์พลังงานกับกระบวนทัศน์ใหม่ด้านพลังงานทางเลือก. ศูนย์ศึกษาเศรษฐศาสตร์การเมือง คณะเศรษฐศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภา โล่ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยะพร ปะระมะ, สัมพันธ์ ไชยเทพ, ณัฐวุฒิ เนียมสอน และ Nobutaka Ito. 2551. การผลิตเอทานอลจากการหมักข้าวเปลือกด้วยวิธีการบดหยาบ. หน้าที่ 95-98. สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ประศาสตร์ ฟูตระกูล. 2531. การพัฒนาการเลี้ยงยีสต์ขนมปังแบบอุตสาหกรรม. หน้าที่ 321-326. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วนิดา ปานอุทัย, นิคม แหลมสัก, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา และประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. 2553. การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน. หน้าที่ 392-400. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร

ศิริพงษ์ เปรมจิต, บุณฑริก ภูมิรา และวงพร เปรมจิต. 2550. การผลิตเอทานอลโดยใช้ปอสา (Paper Mulberry) เป็นวัสดุหมักด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (SSF). หน้าที่ 111-117. การประชุมเชิงวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 3.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมชาติ โสภณรณฤทธิ์. 2550. การพัฒนาพลังงานที่ยั่งยืนสำหรับประเทศไทย. มูลนิธิบัณฑิตยสภาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (บวท.).

วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต และทรงศักดิ์ บูรณเศวตธรรม. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากลูกแป้งที่ผลิตเอนไซม์และแอลกอฮอล์เพื่ออุตสาหกรรมสาโท. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนุกูล จันทร์แก้ว, ตะวัน ฉัตรสูงเนิน และธวัชชัย จีดจาง. 2551. การผลิตเอทานอลจากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้จังหวัดแพร่. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ.

Abedinifara, S., Keikhosro, K., Khanahmadic, M. and Taherzadehb, M.J. 2009. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. Biomass Bioenergy. 33: 828-833.

Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran R.K. and Pandey, A. 2010. Bioethanol production from rice straw: An overview. Bioresource Technol. 101: 4767-4774.

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

D'Amore, G.R. and Wilke, C.R. 1989. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40 ºC. Enzyme Microb. Technol. 11:411-416.

Dombek, K. M., Ingram, L. O. 1986. Magnesium ilmition and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 52: 975-981.

Dung, N.T.P., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2006. Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. Food Microbiol. 23: 331-340.

Dung, N.T.P., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2007. Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (*men*). LWT-Food Sci. Technol. 40: 130-135.

Gaspar, M., Kalman, G. and Reczey, K. 2007. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. Process Biotechemistry. 42: 1135-1139.

Hughes, D. B., Tudrosgen, N. J., Moye, C. J. 1984. The effect of temperature on the kinetic of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnology Letters, 6: 1-6.

Icoz, E., Tugrul, K. M., Saral, A.and Icoz, E. 2008. Research on ethanol production and use from sugar beet in Turkey. Biomass& Bioenergy 33: 1-7.

Kadar, Zs., Szengyel, Zs. And Reczey, K. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. Ind. Crop Product. 20: 103-110.

Kannan, T.R., Sangiliyandi, G. and Gunasekaran, P. 1998. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. Enzyme and Microbial Technology 22: 179-184.

Keikhosro, K., Giti, E. and Taherzadeh, M.J. 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 40: 138-144.

Kiransree, N., Sridhar, M. and Venkateswar R.L. 2000. Characterisation of thermotolerant, ethanol tolerant fenmentive *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioprocess Engineering. 72: 43-46.

Limtong, S., Sintara, S., Suwannarit, P., and Lotong, N. 2002. Yeast diversity in Thai traditional alcoholic starter. Kasetsart J. (Nat. Sci.).36: 149-158.

Limtong, S., Sintara, S., Suwannarit, P., and Lotong, N. 2005. Species diversity of molds in Thai traditional fermentation starters (Loog-Pang). Kasetsart J. (Nat. Sci.). 39: 511-518.

Limtong, S., Sringiew, C. and Yongmantchai, W. 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. Bioresource Technology. 98: 3367-3374.

Naguleswaran, S., Vasanthan, T., Hoover, R. and Liu, Q. 2009. Structure and physicochemical properties of palmyrah (*Borassus Flabellifer L.*) seed-shoot starch grown in Sri Lanka. Food Chemistry. 118: 634-640.

Rose, A. H., Harrison, J. S. 1987. The Yeasts: Biology of Yeasts 2nd ed. Vol. I. Pp. 41-72. London: Academic Press.

Sree, K.N., Sridhar, M., Rao, K.C. and Pandey, A. 1999. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. Process Biochemistry. 34: 115 – 119.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C., Yu, F. and Jin, S. 2005. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. Process Biochemistry. 41: 869-873.

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. 1995. Wine analysis and production. New York: The Champman&Hall enolory library.

กรมการพลังงาน. 2548. การผลิตเอทานอลจากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร (ออนไลน์). สืบค้นจาก : www1.mod.go.th [24 มิถุนายน 2553]

สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . 2549. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.dede.go.th [16 กันยายน 2554]

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2553. การวิจัยสุราไทย (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www2.diw.go.th [5 มกราคม 2553]

กรรณิกา มาถาวร. 2552. เอกสารข้อมูลความปลอดภัยสารเคมี (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.liquor.or.th [5 มกราคม 2553].

ชัด ขำเอี่ยม. 2552. อนุรักษ์ไม้ตาล “ไม้สารพัดประโยชน์”ไม้ดีที่ใกล้สูญหาย (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.gotoknow.org [6 เมษายน 2553]

เดชา ศิริภัทร. 2551. สายน้ำผึ้ง จากความหอมของไม้ดอก สู่ความหวานของไม้ผล (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.doctor.or.th [5 เมษายน 2553]

เทศบาลตำบลสทิงพระ. ประวัติตาลโตนด (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.sathingpra.go.th [6 เมษายน 2554]

ณัฐกฤต พิทักษ์. 2552. การผลิตเอทานอลจากอ้อย (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://as.doa.go.th [29 มีนาคม 2553]

สารอโศก. 2544. การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.asoke.info [5 มิถุนายน 2553]

โสนน้อยเรือนมอญ. 2550. อาหารของชาวรามัญ (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.monstudies.com [5 มกราคม 2553]

สุวพันธ์. 2552. ชวนคุยเรื่องยีสต์. (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.surathai.net [6 ตุลาคม 2553]

โครงสร้างเซลลูโลส (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://th.wikipedia.org [4 กรกฎาคม 2554]

โครงสร้างอะไมโลส (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.room601.ob.tc [4 กรกฎาคม 2554]

โครงสร้างอะไมโลเพคติน (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.room601.ob.tc [4 กรกฎาคม 2554]

โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.vcharkarn.com [4 กรกฎาคม 2554]

โครงสร้างผนังเซลพืช (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://micro.magnet.fsu.edu [4 กรกฎาคม 2554]

ยีสต์ (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.foodietaste.com [4 กรกฎาคม 2554]

การแยกน้ำออกจากสารละลายเอทานอล (ออนไลน์).
สืบค้นจาก : http://www.eduzones.com, http://knowledge.eduzones.com

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugars) โดยวิธี Modified Dinitrosalicylic Acid (Miller, 1959)

1.1 การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic Acid

สารละลาย Dinitrosalicylic Acid ประกอบด้วยสารเคมีต่างๆดังนี้

3,5-Dinitrosalicylic Acid	1%	w/v
Phenol	0.2%	w/v
Sodium sulfite	0.05%	w/v
Sodium hydroxide	1%	w/v
Sodium potassium tartrate	20%	w/v

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Dinitrosalicylic Acid 2.5 กรัม, ฟีนอล 0.5 กรัม, โซเดียมซัลไฟท์ 0.125 กรัม, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 50 กรัม ลงไป จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic Stirrer และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ประกอบด้วย

(1) ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2-20 และ 20-200 ไมโครลิตร

(2) สารละลาย Dinitrosalicylic Acid

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ทั้งหมดในสารตัวอย่าง

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

(1) เตรียม Stock สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 1 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

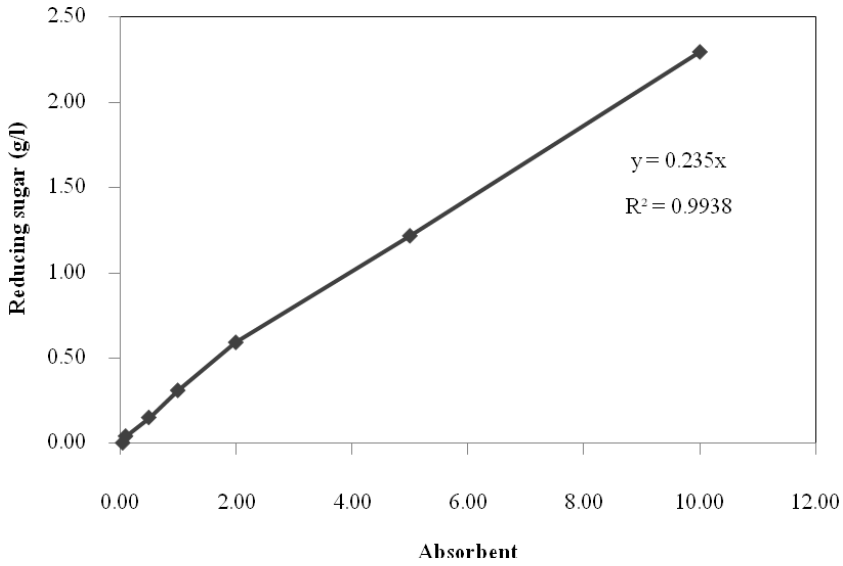
(2) เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยปิเปต Stock สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารละลายกลูโคสเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

(1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

(2) ปิเปตสารละลาย Dinitrosalicylic Acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(3) ทำให้สารตัวอย่างเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว โดยวางลงบนน้ำแข็ง และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงในภาพประกอบ ก-1 เพื่อใช้เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง



ภาพประกอบ ก-1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในสารตัวอย่าง

3.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในสารละลายตัวอย่าง

(1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

(2) ปิเปตสารละลาย Dinitrosalicylic Acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

(3) ปิดฝาหลอดทดลอง จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(4) ทำให้หลอดทดลองเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว โดยวางหลอดทดลองลงบนน้ำแข็ง และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพประกอบ ก-1)

4. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของเอทานอลที่ระเหยได้จากการหมักแบบแบทช์

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเอทานอลที่ระเหยได้ โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC)

4.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ประกอบด้วย

(1) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC)

(2) 99.9 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล

4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล

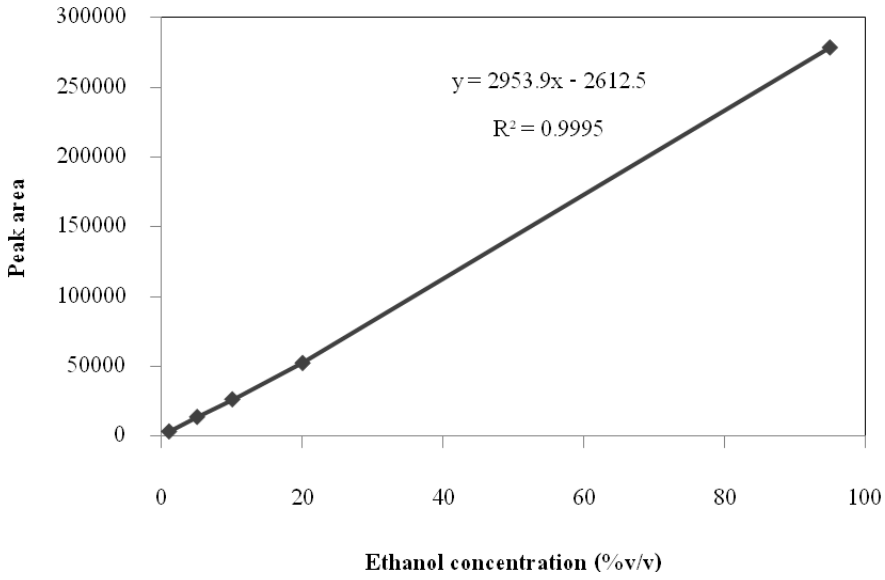
เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยปิเปต 99.9 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาณ 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 9.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

4.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอลเพื่อใช้วิเคราะห์หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของเอทานอลที่หมักได้

นำสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ไปตรวจวัดตามสภาวะดังตาราง ก-1 จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีค (Peak) ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงในภาพประกอบ ก-2 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของเอทานอลที่หมักได้

ตาราง ก-1 แสดงสภาวะในการตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC)

	Condition
Inlet temperature	270 °C
Carrier gas	He ,flow 1.0 ml/min, Splitless mode 1.0 min
Oven temperature	Initial temperature 50 °C held for 6 min
Column	HP-Innowax, length 30 m, internal diameter 0.32 mm and film thickness 0.25 σm



ภาพประกอบ ก-2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

5. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการดังตาราง ก-2 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย A : 0.05 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$ 7.80 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 8.90 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ตาราง ก-2 แสดงการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ

พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

6. การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ (Sodium acetate buffer) (Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A : 0.2 M acetic acid (11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร หรือ $C_2H_3O_2.3H_2O$ 27.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการดังตาราง ก-3 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ตาราง ก-3 แสดงการเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ

พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

ภาคผนวก ข

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ตาราง ข-1 เอทานอลที่ได้จากการทดสอบความเป็นไปได้ในการหมักเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ ที่อุณหภูมิ 75 และ 85 องศาเซลเซียส แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ด้วยลูกแป้งข้าวหมาก 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

การทดลองที่	การย่อยด้วยวิธีทางฟิสิกส์			Ethanol (%v/v)		
	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	1	2	ave.
1	30	75	10	0.10088	0.09957	2.65006
2			20	0.14961	0.14909	0.14935
3			30	0.26461	0.26540	2.65006
4	40	75	10	0.09137	0.09686	0.09412
5			20	0.11103	0.14312	0.12707
6			30	0.21069	0.21465	0.21267
7	50	75	10	0.09957	0.10088	0.10023
8			20	0.12809	0.11101	0.11955
9			30	0.27084	0.26625	0.26854

ตาราง ข-1 (ต่อ) เอทานอลที่ได้จากการทดสอบความเป็นไปได้ในการหมักเอทานอลจากเปลือกอ่อนเต้าตาลโตนด ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ ที่อุณหภูมิ 75 และ 85 องศาเซลเซียส แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ด้วยลูกแป้งข้าวหมาก 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

การทดลองที่	การย่อยด้วยวิธีทางฟิสิกส์			Ethanol (%v/v)		
	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	1	2	ave.
10	30	85	10	0.14564	0.13877	0.14221
11			20	0.14909	0.15031	0.14970
12			30	0.25254	0.25396	0.25325
13	40	85	10	0.09087	0.08957	0.09022
14			20	0.16206	0.14897	0.15147
15			30	0.25892	0.25528	0.25710
16	50	85	10	0.10809	0.09101	0.09550
17			20	0.17411	0.18138	0.17774
18			30	0.13909	0.14030	0.13969

ตาราง ข-2 เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ (ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที) แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน ด้วยลูกแป้งข้าวหมาก 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพื่อหาอัตราส่วนของวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำไปผลิตเอทานอล

การทดลองที่	**วัตถุดิบ อัตราส่วนเปลือกตาล : เปลือกส้ม**	**วันหมัก (วัน)**	**Ethanol (%v/v)**		
			1	**2**	**ave.**
1	**5:1**	3	0.5432	0.5271	0.5352
2		5	0.8724	0.8821	0.8773
3		7	1.1834	1.2071	1.1953
4		9	1.371	1.3582	1.3646
5	**5:2**	3	1.5828	1.6041	1.5935
6		5	1.8641	1.8362	1.8502
7		7	2.003	1.9752	1.9891
8		9	2.4532	2.3964	2.4248
9	**5:3**	3	1.9861	2.0030	1.9946
10		5	2.2736	2.3514	2.3125
11		7	2.8524	2.8962	2.8743
12		9	3.1662	3.1417	3.1540
13	**5:4**	3	1.9869	1.9742	1.9806
14		5	2.4127	2.3971	2.4049
15		7	2.9532	2.8751	2.9142
16		9	3.2171	3.1962	3.2067

ตาราง ข-3 น้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากขั้นตอนการย่อยทางฟิสิกส์ที่อุณหภูมิต่างๆ ของวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เพื่อหาอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยทางฟิสิกส์

การทดลองที่	การย่อยด้วยวิธีทางฟิสิกส์		ค่าการดูดกลืนแสง	Reducing Sugar (g/l)
	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที)		
1	75	15	0.8281	3.5110
2		30	0.9032	3.8293
3		45	0.9693	4.1099
4		60	1.0812	4.5842
5	80	15	1.0095	4.2801
6		30	1.1272	4.7794
7		45	1.3951	5.9152
8		60	1.3963	5.9201
9	85	15	0.9970	4.2272
10		30	1.1546	4.8954
11		45	1.3855	5.8742
12		60	1.3926	5.9043
13	90	15	1.0453	4.4320
14		30	1.1682	4.9532
15		45	1.3668	5.7953
16		60	1.4148	5.9985

ตาราง ข-4 น้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากขั้นตอนการย่อยทางฟิสิกส์ (ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) ของวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เพื่อหาปริมาณน้ำ และเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยทางฟิสิกส์

การทดลองที่	การย่อยด้วยวิธีทางฟิสิกส์		ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร	Reducing Sugar (g/l)
	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)		
1	15	20	0.7814	3.3130
2	30		1.0426	4.4207
3	45		1.2214	5.1788
4	60		1.2390	5.2534
5	15	30	0.9190	3.8965
6	30		1.0534	4.4665
7	45		1.3076	5.5442
8	60		1.3391	5.6778
9	15	40	1.0095	4.2801
10	30		1.1272	4.7794
11	45		1.3951	5.9152
12	60		1.4108	5.9201

ตาราง ข-5 เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยลูกแป้งข้าวหมากที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณลูกแป้งข้าวหมากและวันในการหมักที่เหมาะสม

การทดลองที่	ปริมาณลูกแป้งข้าวหมาก (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
1	1%	1	0.4669	0.4671	0.4670
2		3	0.8052	0.7495	0.7773
3		5	0.8647	0.8990	0.8818
4		7	0.8587	0.8465	0.8526
5		9	0.8934	0.8823	0.8878
6		10	0.9574	0.9413	0.9494
7	3%	1	0.4755	0.4871	0.4813
8		3	0.8856	0.8812	0.8834
9		5	1.2590	1.0652	1.1621
10		7	2.5895	2.6052	2.5973
11		9	3.8898	3.8904	3.8901
12		10	3.9056	3.8902	3.8979
13	4%	1	0.4801	0.4751	0.4776
14		3	0.9427	0.9381	0.9404
15		5	1.9864	1.9795	1.9830
16		7	2.9864	2.9795	2.9830
17		9	3.7743	3.7265	3.7504
18		10	3.8056	3.7962	3.8009

ตาราง ข-5 (ต่อ) เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยลูกแป้งข้าวหมากที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณลูกแป้งข้าวหมากและวันในการหมักที่เหมาะสม

การทดลองที่	ปริมาณลูกแป้งข้าวหมาก (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
19	5%	1	0.52445	0.52210	0.52327
20		3	1.9861	2.0030	1.9946
21		5	2.2736	2.3514	2.3125
22		7	2.8524	2.8962	2.8743
23		9	3.8662	3.8417	3.8540
24		10	3.84572	3.79525	3.82049
25	6%	1	0.64310	0.64930	0.64620
26		3	0.98643	0.96432	0.97538
27		5	2.97557	2.45932	2.71745
28		7	3.05217	3.23579	3.14398
29		9	3.58543	3.54780	3.56662
30		10	3.49643	3.51340	3.50492
31	7%	1	0.54969	0.54481	0.54725
32		3	0.80673	0.81684	0.81178
33		5	1.03604	0.96051	0.99828
34		7	2.42516	2.46767	2.44642
35		9	3.22380	3.00959	3.11670
36		10	3.19287	3.0872	3.14004

ตาราง ข-5 (ต่อ) เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยลูกแป้งข้าวหมากที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณลูกแป้งข้าวหมากและวันในการหมักที่เหมาะสม

การทดลองที่	ปริมาณลูกแป้งข้าวหมาก (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
37	8%	1	0.45220	0.47310	0.46265
38		3	1.26860	1.28410	1.27635
39		5	2.67452	2.74113	2.70783
40		7	3.27413	3.30284	3.28849
41		9	2.76466	2.72839	2.74653
42		10	2.53655	2.48312	2.50984
43	9%	1	0.55694	0.56928	0.56311
44		3	0.89329	0.86175	0.87752
45		5	1.15118	1.08945	1.12032
46		7	2.47047	2.50737	2.48892
47		9	2.98266	2.99827	2.99047
48		10	3.02760	2.97260	3.00010
49	10%	1	0.54380	0.55840	0.55110
50		3	0.79640	0.80510	0.80075
51		5	1.37054	1.40520	1.38787
52		7	2.30800	2.59820	2.45310
53		9	2.86253	2.82762	2.84507
54		10	2.96260	2.88596	2.92428

ตาราง ข-6 เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยยีสต์ขนมปังที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณยีสต์ขนมปังและวันในการหมักที่เหมาะสม

การทดลองที่	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
1	1%	1	1.9453	1.9788	1.9621
2		3	2.0321	1.9742	2.0032
3		5	1.9330	1.8917	1.9123
4		7	1.9518	1.9428	1.9473
5		9	1.7755	1.8736	1.8245
6		10	1.8027	1.8120	1.8074
7	3%	1	2.2192	2.2243	2.2217
8		3	3.2748	3.2821	3.2784
9		5	3.6915	3.6443	3.6679
10		7	4.3026	4.2927	4.2976
11		9	4.2631	4.2513	4.2572
12		10	4.2572	4.2451	4.25115
13	4%	1	2.2876	2.2832	2.2854
14		3	3.6748	3.6821	3.6784
15		5	5.0892	5.1033	5.0962
16		7	4.8923	4.9014	4.8969
17		9	4.7582	4.7540	4.7561
18		10	4.6952	4.6862	4.6907

ตาราง ข-6 (ต่อ) เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยยีสต์ขนมปังที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณยีสต์ขนมปังและวันในการหมักที่เหมาะสม

การทดลองที่	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
19	5%	1	2.3052	2.3217	2.3134
20		3	3.8143	3.8372	3.8258
21		5	5.1174	5.1095	5.1135
22		7	5.0137	5.0158	5.0148
23		9	4.8525	4.8662	4.8594
24		10	4.8042	4.8241	4.8142
25	6%	1	2.3862	2.3874	2.3868
26		3	4.0183	3.9946	4.0065
27		5	4.9977	4.9674	4.9826
28		7	4.7909	4.8217	4.8063
29		9	4.7307	4.6600	4.6953
30		10	4.6025	4.5921	4.5973
31	7%	1	2.5642	2.5953	2.5798
32		3	4.6942	4.7003	4.6973
33		5	4.6564	4.6743	4.6654
34		7	4.6411	4.6523	4.6467
35		9	4.6017	4.6143	4.6080
36		10	4.55920	4.54280	4.55100

ตาราง ข-6 (ต่อ) เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านการย่อยทางฟิสิกส์ แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยยีสต์ขนมปังที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณยีสต์ขนมปังและวันในการหมักที่เหมาะสม

การทดลองที่	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
37	8%	1	2.7096	2.7153	2.7125
38		3	4.7053	4.7187	4.7120
39		5	4.6802	4.6455	4.6629
40		7	4.6754	4.5707	4.6231
41		9	4.4298	4.5714	4.5006
42		10	4.5025	4.4892	4.49585
43	9%	1	2.7642	2.8053	2.7848
44		3	4.6605	4.6543	4.6574
45		5	4.6155	4.6233	4.6194
46		7	4.5002	4.5392	4.5197
47		9	4.2502	4.2976	4.2739
48		10	4.2391	4.2351	4.2371
49	10%	1	2.8964	2.9031	2.8998
50		3	4.5854	3.4943	4.0399
51		5	4.3136	4.2919	4.3027
52		7	4.3531	4.3907	4.3719
53		9	4.2317	4.2143	4.2230
54		10	4.2035	4.2172	4.21035

ตาราง ข-7 เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านการย่อยทางชีวภาพ (ย่อยตามธรรมชาติเป็นเวลา 5 วัน) โดยใช้ยีสต์ขนมปัง 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน เพื่อหาอัตราส่วนของวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำไปผลิตเอทานอล

การทดลองที่	วัตถุดิบ อัตราส่วนเปลือกตาล : เปลือกส้ม	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
1	**5:1**	3	0.7760	0.8315	0.8038
2		4	0.8963	0.9026	0.8995
3		5	1.2639	1.265	1.2644
4		6	1.5448	1.5628	1.5538
5		10	1.9957	1.9506	1.9731
6	**5:2**	3	3.7182	3.7699	3.7441
7		4	4.0586	4.2156	4.1371
8		5	4.2185	4.2803	4.2494
9		6	4.2941	4.2187	4.2564
10		10	4.2406	4.191	4.2158
11	**5:3**	3	6.8044	6.7928	6.7986
12		4	7.5823	7.6471	7.6147
13		5	7.8932	7.9425	7.9179
14		6	7.7961	7.8013	7.7987
15		10	7.9742	8.0053	7.9898
16	**5:4**	3	6.8225	6.7438	6.7832
17		4	7.2977	7.1995	7.2486
18		5	7.5482	7.4943	7.5213
19		6	7.6952	7.7103	7.7028
20		10	7.8056	7.8138	7.8097

ตาราง ข-8 เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพ (ย่อยตามธรรมชาติเป็นเวลา 5 วัน) โดยใช้ยีสต์ขนมปัง 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน เพื่อศึกษาผลของน้ำกลั่นที่มีต่อการหมักเอทานอล

การทดลองที่	วัตถุดิบ อัตราส่วนเปลือกตาล : เปลือกส้ม	วันหมัก (วัน)	Ethanol		
			1	2	ave.
1	**5:1**	3	0.7724	0.7841	0.7783
2		4	0.8531	0.8471	0.8501
3		5	1.0872	1.1113	1.0992
4		6	1.6551	1.5797	1.6174
5		10	1.8657	1.8506	1.8581
6	**5:2**	3	3.4586	3.3556	3.4071
7		4	3.6538	3.5972	3.6255
8		5	3.9601	3.8994	3.9298
9		6	3.976	3.8522	3.9141
10		10	4.0697	4.0549	4.0623
11	**5:3**	3	6.0799	6.0941	6.0870
12		4	6.5962	6.6031	6.5997
13		5	6.8672	6.8552	6.8612
14		6	6.7134	6.7072	6.7103
15		10	6.7929	6.8048	6.7988
16	**5:4**	3	6.1799	6.1941	6.1870
17		4	6.7962	6.8031	6.7997
18		5	7.0672	7.1552	7.1112
19		6	7.1338	7.0972	7.1155
20		10	6.9929	6.9748	6.9838

ตาราง ข-9 น้ำตาลรีดิวส์ที่ผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพที่เวลาต่างๆ โดยใช้วัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เพื่อศึกษาจำนวนวันในการย่อยทางชีวภาพที่เหมาะสม

การทดลองที่	**จำนวนวันในการย่อย** (วัน)	**ค่าการดูดกลืนแสง**	**Reducing Sugar (g/l)**
1	1	1.27376	5.4006
2	2	1.39781	5.9266
3	3	1.61635	6.8532
4	4	1.60031	6.7852
5	5	1.57135	6.6624
6	6	1.36173	5.7736
7	7	1.30483	5.5323
8	8	1.21288	5.1425
9	9	1.09725	4.6522
10	10	0.98347	4.1698

ตาราง ข-10 เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพที่เวลาต่างๆ เพื่อศึกษาจำนวนวันในการย่อยทางชีวภาพที่เหมาะสม

จำนวนวันในการย่อย (วัน)	Yeast (%)	Ethanol		
		1	2	Ave.
1	1%	1.1531	1.14425	1.1487
3		3.5946	3.6493	3.6220
5		3.6392	3.6099	3.6246
7		3.9410	3.9489	3.9449
9		3.0808	3.0632	3.0720
1	3%	2.5863	2.4421	2.5142
3		7.6818	7.6058	7.6438
5		7.5037	7.4899	7.4968
7		6.2432	6.2042	6.2237
9		5.9483	6.0626	6.0055
1	5%	2.4642	2.3641	2.4142
3		8.5929	8.5896	8.5913
5		7.9425	7.8932	7.9178
7		6.6832	6.6163	6.6498
9		6.2743	6.2053	6.2398
1	7%	1.9041	1.9131	1.9086
3		8.3845	8.3966	8.3906
5		7.6373	7.6528	7.6451
7		6.4293	6.2270	6.3282
9		5.8791	5.1956	5.5373
1	9%	1.8753	1.8695	1.8724
3		7.9874	7.8928	7.9401
5		7.3671	7.2075	7.2873
7		6.4076	6.2264	6.3170
9		5.5302	5.6082	5.5692

ตาราง ข-11 เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 เป็นเวลา 10 วัน ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพที่เวลาต่างๆ เพื่อศึกษาจำนวนวันในการย่อยทางชีวภาพที่เหมาะสม

จำนวนวันในการย่อย (วัน)	Yeast (%)	Ethanol		
		1	2	Ave.
1	1%	1.1432	1.1532	1.1482
3		3.4938	3.4933	3.4936
5		3.8923	3.8786	3.8854
7		3.6497	3.6068	3.6283
9		2.9864	2.8643	2.9254
1	3%	2.2432	2.1974	2.2203
3		6.9611	6.9271	6.9441
5		7.5742	7.6053	7.5898
7		5.9542	5.9035	5.9289
9		5.7732	5.8421	5.8077
1	5%	2.2363	2.2413	2.2388
3		8.5016	8.5021	8.5019
5		7.9742	8.0053	7.9898
7		7.1038	6.5140	6.8089
9		6.1937	6.2836	6.2386
1	7%	2.2631	2.2311	2.2471
3		7.4418	7.4137	7.4277
5		7.6636	7.4784	7.5710
7		6.4800	6.2947	6.3873
9		5.7770	5.9458	5.8614
1	9%	2.0312	2.1521	2.0917
3		7.2664	7.2851	7.2758
5		7.9662	7.9908	7.9785
7		6.3095	6.2020	6.2558
9		4.5738	4.4121	4.4930

ตาราง ข-12 เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพ (ย่อยตามธรรมชาติเป็นเวลา 3 วัน) แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยยีสต์ขนมปังที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณยีสต์ขนมปังและวันในการหมักที่เหมาะสม

การทดลองที่	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
1	1%	1	2.5291	2.5098	2.5195
2		3	3.6524	3.5924	3.6224
3		5	3.6361	3.6271	3.6316
4		7	3.4721	3.4813	3.4767
5		9	3.4027	3.3971	3.3999
6		10	3.4081	3.4021	3.4051
7	3%	1	3.8927	3.8726	3.8827
8		3	7.0841	7.0961	7.0901
9		5	7.6595	7.5420	7.6007
10		7	7.3100	7.4942	7.4021
11		9	6.9587	6.9274	6.9430
12		10	6.9841	6.8241	6.9041
13	5%	1	4.0212	3.9961	4.0087
14		3	8.6060	8.6100	8.6080
15		5	8.5929	8.5896	8.5913
16		7	8.5215	8.5421	8.5318
17		9	8.5266	8.5371	8.5319
18		10	8.5016	8.5021	8.5019

ตาราง ข-12 (ต่อ) เอทานอลที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่อัตราส่วน 5:3 ซึ่งผ่านขั้นตอนการย่อยทางชีวภาพ (ย่อยตามธรรมชาติเป็นเวลา 3 วัน) แล้วทำการหมักที่เวลาต่างๆด้วยยีสต์ขนมปังที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาปริมาณยีสต์ขนมปังและวันในการหมักที่เหมาะสม

การทดลองที่	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	วันหมัก (วัน)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	ave.
19	7%	1	4.5826	4.6051	4.5939
20		3	8.4731	8.5016	8.4874
21		5	8.3207	8.3186	8.3197
22		7	8.0877	8.0453	8.0665
23		9	7.5527	7.4907	7.5217
24		10	7.4725	7.4625	7.4675
25	9%	1	4.6521	4.6612	4.6567
26		3	8.4117	8.4632	8.4374
27		5	7.9082	7.9888	7.9485
28		7	7.2998	7.3302	7.3150
29		9	7.2500	7.1085	7.1793
30		10	7.2041	7.2103	7.2072
31	10%	1	4.6942	4.6851	4.6897
32		3	8.3934	8.4053	8.3993
33		5	7.8679	7.9338	7.9008
34		7	7.3414	7.2868	7.3141
35		9	7.2110	7.1421	7.1766
36		10	7.2071	7.1994	7.2033

ตาราง ข-13 เอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร จากสภาวะที่เหมาะสมในการหมักขนาด 250 มิลลิลิตร ทั้ง 3 การทดลอง

การทดลองที่	สภาวะ	Ethanol (%v/v)		
		1	2	ave.
1	**การหมักด้วยการย่อยทางฟิสิกส์** (1) การหมักด้วยลูกแป้งข้าวหมาก	4.1427	4.1419	4.1423
2	(2) การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	5.5826	5.5749	5.5787
3	**การหมักด้วยการย่อยทางชีวภาพ** (1) การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	9.0464	9.0544	9.0504

ตาราง ข-14 เอทานอลที่ได้จากการเพิ่มความบริสุทธิ์ โดยการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร จากการหมักที่สภาวะที่เหมาะโดยการย่อยทางชีวภาพ และทำการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง

การทดลองที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	Ethanol (%v/v)		
			1	2	Ave.
1	65	5	56.1843	55.4818	55.8331
2		10	67.5257	67.3487	67.4372
3		15	69.7532	68.9838	69.3685
4	70	5	85.8731	85.1618	85.5175
5		10	73.6225	74.6772	74.1498
6		15	68.9382	68.5022	68.7202
7	75	5	84.0447	84.1682	84.1065
8		10	65.1385	66.1338	65.6361
9		15	55.9407	55.8593	55.9000

ตาราง ข-15 เอทานอลที่ได้จากการเพิ่มความบริสุทธิ์ในแต่ละครั้ง โดยการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร จากการหมักที่สภาวะที่เหมาะโดยการย่อยทางชีวภาพ และทำการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง (แบบที่ 3)

การทดลองที่	สาร	จำนวนครั้งในการเพิ่มความบริสุทธิ์	Ethanol		
			1	2	Ave.
1	Evaporate	1	82.7668	82.9012	82.8340
2		2	89.2787	88.9522	89.1154
3		3	95.8945	95.3861	95.6403

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวอัสมา หมาดหล้า

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210120051

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการทำวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2552-2553

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Mardla, A., Chongkhong, S. and Chetpattananondh, P. 2011. ETHANOL PRODUCTION FROM THE WEAK SKIN OF JELLY SEEDS OF PALMYRA PALM BY LOOG-PANG. Proceeding of the 5th PSU-UNS International Conference on Engineering and Technology (ICET-2011), May 2-3, 2011, Phuket, Thailand.

Mardla, A., Chongkhong, S. and Chetpattananondh, P. 2011. ETHANOL PRODUCTION FROM AGRICULTURAL RESIDUES USING BAKER YEAST (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*). Proceeding of the 18th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE2011), October 27-28, 2011, Ho Chi Minh City, Vietnam.

Mardla, A., Chongkhong, S. and Chetpattananondh, P. 2011. ETHANOL PRODUCTION FROM AGRICULTURAL RESIDUES USING LOOG-PANG KAO MHARK. Proceeding of the 21st Thai Institute of Chemical Engineering And Applied Chemistry (TICHE-2011), November 10-11, 2011, Hatyai, Songkhla, Thailand.

Chongkhong, S. and Mardla, A. 2012. ENSILING - WET-STORAGE METHOD FOR BIO-ETHANOL PRODUCTION BY BAKER'S YEAST. Proceeding of the 10th International PSU Engineering Conference, May 14-15, 2012, Hatyai, Songkhla, Thailand.