การผลิตไบโอเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง

Bio-ethanol Production from Pineapple Peels Using Baker's Yeast

อักษรภัค เต็งรัง

Ugsornphak Tengrang

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

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง

ผู้เขียน นางสาวอักษรภัค เต็งรัง

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินินาฏ จงคง)

คณะกรรมการสอบ

....……...……...ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา ศรีสุวรรณ)

..……....……..กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์)

…….....กรรมการ

(ดร.ณัฐวรรณ กลัดแก้ว)

...……...…...กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินินาฏ จงคง)

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

……..……...……...

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ……

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินินาฏ จงคง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ……....

(นางสาวอักษรภัค เต็งรัง)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวอักษรภัค เต็งรัง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง

ผู้เขียน นางสาวอักษรภัค เต็งรัง

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกสับปะรด โดยเปรียบเทียบการปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี วิธีแรก คือ การปรับสภาพและย่อยด้วยการใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด (การเน่าเปื่อย) วิธีที่สอง คือ การใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนขนมปังหมดอายุ และวิธีสุดท้าย คือ การใช้เอนไซม์ จากนั้นนำผลผลิตหลังการย่อยด้วยสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละวิธีมาศึกษาการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ขนมปัง

การปรับสภาพและย่อยวิธีแรกศึกษาโดยการเตรียมวัตถุดิบเปลือกสับปะรด 100-160 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร บรรจุในถุงซิปซึ่งวางไว้ใต้อ่างน้ำ ไม่โดนแสงแดด มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 84-92 ภายใต้อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 26-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1-14 วัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ การใช้เปลือก 141 กรัมต่อลิตร ปรับสภาพพร้อมกับย่อยเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 0.58 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 135.43 กรัมต่อลิตร วิธีที่สองศึกษาโดยการเตรียมวัตถุดิบเปลือกสับปะรด 100-160 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนปริมาณขนมปังต่อเปลือกเป็น 1:3-1:9 โดยใช้ขนมปังเลยวันหมดอายุแล้วช่วง 1-7 วัน บรรจุในถุงซิปภายใต้สภาวะเดียวกันกับวิธีแรก ด้วยระยะเวลา 1-14 วัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้ขนมปังเลยวันหมดอายุแล้ว 5 วัน ด้วยอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกเป็น 1:3 ปริมาณเปลือก 153 กรัมต่อลิตร ใช้เวลา 1 วัน จะได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 2.07 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทั้งหมด 389.33 กรัมต่อลิตร สำหรับวิธีสุดท้ายจะใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในการปรับสภาพ 100-240 U (U คือ 1 หน่วยของเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ภายใต้อุณหภูมิ และพีเอช ค่าหนึ่ง)ต่อเปลือก โดยการเตรียมวัตถุดิบเปลือก 100-160 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5-7.0 ให้ความร้อนซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 70-100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1-4 ชั่วโมง แล้วนำผลผลิตหลังการปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสม (188 U แอลฟา-อะไมเลส ต่อกรัมเปลือก ด้วยปริมาณเปลือก 160 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5 ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง) มาศึกษาการย่อยต่อด้วยกลูโคอะไมเลส ที่ช่วง

ปัจจัยสภาวะเดียวกันกับการปรับสภาพ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ 120 U กลูโคอะไมเลส ต่อกรัมเปลือก พีเอช 3.5 ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 48.16 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 549.35 กรัมต่อลิตร

หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยด้วยสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละวิธี ศึกษาการหมักด้วยยีสต์ขนมปังร้อยละ 2-8 พีเอชเริ่มต้น 4.5-6.5 ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-8 วัน ผลการศึกษาพบว่า การปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีแรกก่อนการหมักด้วยยีสต์ร้อยละ 2 ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน สามารถให้ผลผลิตเอทานอลมากกว่าการปรับสภาพและย่อยด้วย 2 วิธีหลัง คือ ปริมาณเอทานอลร้อยละ 5.38 โดยปริมาตร รองลงมาคือวิธีที่สองซึ่งหมักด้วยยีสต์ร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่พีเอช 6.4 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลร้อยละ 4.07 โดยปริมาตร และวิธีสุดท้าย เมื่อหมักด้วยยีสต์ร้อยละ 6 ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ให้ผลผลิตเอทานอลร้อยละ 1.10 โดยปริมาตร

เมื่อทำการประมาณต้นทุนในการผลิตเอทานอล พบว่า วิธีซึ่งมีค่าใช้จ่ายต่ำสุดคือการผลิตด้วยการปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีแรก 23.31 บาทต่อลิตร (เอทานอล) รองลงมาคือ การปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีที่สอง 25.14 บาทต่อลิตร และวิธีสุดท้ายไม่มีความคุ้มทุน 64.81 บาทต่อลิตร

Thesis Title Bio-ethanol production from pineapple peels using baker's yeast

Author Miss Ugsornphak Tengrang

Major Program Chemical Engineering

Academic Year 2014

ABSTRACT

Ethanol production from the pineapple peels were studied in this work. The comparison of 3 different pretreatment and hydrolysis methods were investigated. The first method was using natural organism living on the peels (Decay). The second was using mold on expired bread and the last was using enzymes. Then each optimal hydrolyzed product was fermented to produce ethanol by baker's yeast.

For the first hydrolysis (Ensiling-wet-storage method) the crushed peels were mixed with water in ratios of 100-160 g/L and were packed into plastic bags. The bags were stored in a damp under 84-92 %relative humidity at an ambient temperature (26-32 °C) for decomposition time of 1-14 days. (The natural microorganism was prior existed on the plants (the peels)). The optimal condition using 141 g. of peel to 1 L of water for 5 days hydrolysis time provided 0.58 g/L of reducing sugar and 135.43 g/L of total sugar. The second method, the peels and the expired bread were mixed in a weight ratio of 1:3-1:9 with the peels mixed bread to water ratio of 100-160 g/L. The material mixture was packed under the same condition as the first methods for 1-14 days, and a factor to be studied further as the time beyond the expiration date of the bread of 1-7 days. The optimal condition was 5 days beyond the expiration date using 1:3 ratio of the bread to the peels with 153 g/L of the mixture for 1 day of decomposition time. This provides 2.07 g/L reducing sugar and 389.33 g/L total sugar. In addition, the last method, the peels were pretreated by 100-240 U of alpha-amylase (U is 1 unit of enzyme for convert substrate to product 1 μmol/min under the same temperature and pH) using 100-160 g/L of peels to water with 5.5-7.0 of pH at 70-100 ºC for 1-4 hr. Then the optimum pretreated products (188 U alpha-amylase, 160 g peels/L 5.5 pH, 70 ºC for 4 hr.) were hydrolyzed under the same studied

pretreatment condition (100-240 U, 100-160 g/L, 70-100 ºC and 1-4 hr.). It was found that the optimal hydrolysis was using 120 U glucoamylase with 3.5 pH at 70 ºC for 4 hr. This gave 48.16 g/L reducing sugar and 549.35 g/L total sugar.

After that each optimal hydrolysate was investigated for the baker's yeast fermentation, 2-8 %wt yeast, 4.5-6.5 pH, 30-40 ºC and 2-8 days. The results were found that the optimal fermentation for the first hydrolysate was 2 %wt yeast with 4.5 pH at 40 ºC for 8 days which could get the ethanol content more than the 2 others. It achieved 5.38 %v ethanol product. Secondary the expired bread product should be fermented by 3 % yeast with a pH of 6.4 at 30 ºC for 8 days that provided 4.07 %v ethanol. And the last hydrolysate was processed using 6 % yeast with 5.5 pH at 35 ºC for 5 days that 1.10 %v ethanol was received.

The production costs of the 3 methods were estimated. They were found that the first method (decay) gave the lowest cost that was 23.31 baht/L of ethanol. The second method was 25.14 baht/L and the third was 64.81 baht/L.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(12)
รายการภาพประกอบ	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	3
2.1 สับปะรด	3
2.2 เอทานอล	5
2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล	7
2.4 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล	9
2.5 กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ	11
2.6 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง	19
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	26
3.1 วัสดุ	26
3.2 อุปกรณ์	27
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	29
3.4 วิธีการทดลอง	30
3.4.1 การศึกษาองค์ประกอบของเปลือกสับปะรด	30
3.4.2 การปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่เกิดขึ้นเองบนเปลือกสับปะรด	30
3.4.3 การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว 1-7 วัน	31
3.4.4 การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์	32

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.4.5 การหมักเอทานอลโดยยีสต์ขนมปัง โดยใช้ผลผลิตจากการปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีต่างๆ	34
3.4.6 การขยายขนาดการหมัก	35
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	36
4.1 องค์ประกอบในเปลือกสับปะรด	36
4.2 ปริมาณน้ำตาลในเปลือกสับปะรด	37
4.3 การศึกษาการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด	38
4.4 การศึกษาการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์บนขนมปังหมดอายุแล้ว 1-7 วัน	40
4.5 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้เอนไซม์	48
4.6 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง	64
4.7 ผลการประเมินต้นทุนเบื้องต้น	82
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	91
เอกสารอ้างอิง	94
ภาคผนวก	99
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์	100
ภาคผนวก ข ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง	106
ภาคผนวก ค บทความที่เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ	124
ประวัติผู้เขียน	130

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกสับปะรดคิดเป็นร้อยละของวัตถุแห้งร้อยละ 96.28	3
2-2	ค่าการส่งออกของสับปะรดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552-2554	5
4-1	องค์ประกอบของเปลือกสับปะรด	36
4-2	ชนิดของน้ำตาลและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีต่างๆ	37
4-3	สภาวะการทดลองและผลการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด	38
4-4	สภาวะการทดลองและผลการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์บนขนมปังหมดอายุแล้ว 1-7 วัน	41
4-5	สภาวะการทดลองและผลการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส	49
4-6	สภาวะการทดลองและผลการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	58
4-7	สภาวะการทดลองและผลการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองบนเปลือกสับปะรด	65
4-8	สภาวะการทดลองและผลการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังหมดอายุแล้ว 1-7 วัน	71
4-9	สภาวะการทดลองและผลการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส	77
4-10	ราคาสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	82
4-11	สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรด	83

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4-12 สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังของแต่ละวิธี 84

4-13 ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกระบวนการทางธรรมชาติ ที่กำลังการผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95) 85

4-14 ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกระบวนการใช้จุลินทรีย์จากขนมปังมี่หมดอายุแล้ว ที่กำลังการผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95) 86

4-15 ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกระบวนการใช้เอนไซม์ ที่กำลังการผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95) 87

4-16 ต้นทุนในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 87

4-17 เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการใช้วัตถุดิบชนิดต่างๆ 88

4-18 การเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ ขนมปังหมดอายุ และเอนไซม์ที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตเอทานอล 89

ก-1 สภาวะที่ใช้ในการทดลองของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) 105

ข-1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลองและจากการทำนายที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด 106

ข-2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลองและจากการทำนายที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังหมดอายุแล้ว 1-7 วัน 108

ข-3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลองและจากการทำนายที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 110

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข-4	ปริมาณน้ำตาลจากการทดลองและจากการทำนายที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	112
ข-5	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด และหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปัง	114
ข-6	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว และหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	116
ข-7	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	118

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่		หน้า
2-1	การย่อยเซลลูโลส หรือเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส	10
2-2	การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ด้วยกระบวนการหมัก	10
2-3	การเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส (xylose) ไปเป็นเอทานอล	11
2-4	แสดง (ก) อะไมโลส เกิดจากกลูโคสแต่ละหน่วยเชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะ α-1,4	13
	(ข) อะไมโลแพกติน เกิดจากกลูโคสที่ต่อเป็นแขนง ด้วยพันธะ α-1,6	13
3-1	เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer รุ่นHP 8453	27
3-2	เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC) รุ่นHP 6890	28
3-3	แผนภาพแสดงขั้นตอนการผลิตเอทานอล	29
3-4	เปลือกสับปะรดหลังบด	30
3-5	การปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ที่เกิดขึ้นเองบนเปลือกสับปะรด	31
3-6	การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์ บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว 1-7 วัน	32
3-7	ลักษณะขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว	32
3-8	การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส	33
3-9	การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	33
3-10	การหมักเปลือกสับปะรดโดยใช้ยีสต์ขนมปัง	34
3-11	เครื่องหมักเอทานอลขนาด 5 ลิตร	35

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-1 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ธรรมชาติ ภายใต้อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 84-92) 39

4-2 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณวัตถุดิบผสม (ขนมปังผสมเปลือกสับปะรด) 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 8 วัน 42

4-3 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังหมดอายุต่อเปลือกสับปะรดเป็น 1:6 และปริมาณวัตถุดิบผสม 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร 43

4-4 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวัตถุดิบผสม (ขนมปังผสมเปลือกสับปะรด) ต่อ น้ำ 1 ลิตร และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปัง ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังหมดอายุต่อเปลือกสับปะรดเป็น 1:6 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 8 วัน 44

4-5 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย และอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด (1: กรัม) ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังหมดอายุไปแล้ว 4 วัน และปริมาณวัตถุดิบผสม 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร 45

4-6 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวัตถุดิบผสมต่อน้ำ 1ลิตร และอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด (1:กรัม) ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อย โดยใช้ขนมปังหมดอายุไปแล้ว 4 วัน และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 8 วัน 46

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-7 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวัตถุดิบผสม และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังหมดอายุไปแล้ว 4 วัน และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังหมดอายุต่อเปลือกสับปะรดเป็น 1:6 47

4-8 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณเปลือกสับปะรด ต่อ น้ำ 1 ลิตร ที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย เป็นเวลา 150 นาที 50

4-9 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส ที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยเป็นเวลา 150 นาที 51

4-10 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพ และย่อยและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.3 51

4-11 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพ และย่อยและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.3 52

4-12 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณเปลือก สับปะรดที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด พีเอช 6.3 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 150 นาที 53

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-13 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส พีเอช 6.3 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 150 นาที 53

4-14 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร พีเอช 6.3 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 150 นาที 54

4-15 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด 55

4-16 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 150 นาที 55

4-17 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและอุณหภูมิที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และพีเอช 6.3 56

4- 18 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและอุณหภูมิที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และพีเอช 4.5 59

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-19 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 6 ชั่วโมง 60

4-20 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 6 ชั่วโมง 61

4-21 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและพีเอชที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด 61

4-22 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5 62

4-23 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 6 ชั่วโมง และพีเอช 4.5 63

4-24 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 66

4-25 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้พีเอช 5.5 และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 67

4-26 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5 67

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-27 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 68

4-28 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและพีเอชในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 69

4-29 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และพีเอช 5.5 69

4-30 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 72

4-31 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้พีเอช 5.5 และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 73

4-32 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5 73

4-33 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอชในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 74

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-34 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและพีเอช ที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 75

4-35 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมัก และอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และพีเอช 5.5 75

4-36 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปัง ที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 78

4-37 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปัง ที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้พีเอช 5.5 และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 79

4-38 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและ ปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5 79

4-39 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณ เอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน 80

4-40 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและ พีเอชมีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 81

4-41 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและ อุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และพีเอช 5.5 81

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

ก-1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 101

ก-2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 103

ก-3 กราฟมาตรฐานเอทานอล 105

ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด 107

ข-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์บนขนมปังหมดอายุแล้ว 1-7 วัน 109

ข-3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 111

ข-4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 113

ข-5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักเปลือกสับปะรดโดยใช้ยีสต์ขนมปัง ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด 115

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

ข-6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักเปลือกสับปะรดด้วยการใช้ยีสต์ขนมปัง ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว 1-7 วัน 117

ข-7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ 119

ข-8 ลักษณะพื้นผิวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ของเปลือกสับปะรด ที่กำลังขยาย (ก) กำลังขยาย 30 เท่า (ข) กำลังขยาย 300 เท่า (ค) กำลังขยาย 10000 เท่า 120

ข-9 ลักษณะพื้นผิวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ของเปลือกสับปะรด ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ บนเปลือกสับปะรด ที่กำลังขยาย (ก) กำลังขยาย 40 เท่า (ข) กำลังขยาย 300 เท่า (ค) กำลังขยาย 10000 เท่า 121

ข-10 ลักษณะพื้นผิวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ของเปลือกสับปะรด ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว 1-7 วัน ที่กำลังขยาย (ก) กำลังขยาย 40 เท่า (ข) กำลังขยาย 500 เท่า (ค) กำลังขยาย 10000 เท่า 122

ข-11 ลักษณะพื้นผิวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ของเปลือกสับปะรด ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ ที่กำลังขยาย (ก) กำลังขยาย 40 เท่า (ข) กำลังขยาย 500 เท่า (ค) กำลังขยาย 10000 เท่า 123

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกประสบกับปัญหาราคาน้ำมันในตลาดโลกผันผวนและมีการปรับตัวสูงขึ้น รวมทั้งประเทศไทยหันมาใช้เอทานอลเป็นส่วนผสมในน้ำมันเชื้อเพลิง เช่น แก๊สโซฮอล์ ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำมันเบนซิน 90% และเอทานอล (บริสุทธิ์ 99.5%) 10% นอกจากนี้ยังให้ความสำคัญกับการทำงานวิจัยและเทคนิคต่างๆ ในการผลิตเอทานอลจากพืชและวัสดุเหลือใช้เพื่อใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทน เอทานอลเป็นพลังงานสะอาดที่สามารถใช้ทดแทน ใช้ผสม หรือใช้เป็นสารเติมเพิ่มค่าออกเทน (Ethyl Tertiary Butyl Ether: ETBE) ให้น้ำมันเบนซิน แม้แต่การผลิตไบโอดีเซลก็ควรใช้เอทานอลเป็นสารตั้งต้นแอลกอฮอล์แทนเมทานอลเพื่อเป็นพลังงานหมุนเวียนได้อย่างแท้จริง

เอทานอล (Ethanol) เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการนำเอาพืชมาย่อยเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยใช้เอนไซม์หรือกรดบางชนิดช่วยย่อย และทำให้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95%โดยการกลั่น เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลัก 3 ประเภท คือ วัตถุดิบที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล บีตรูท ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรจำพวกธัญพืช เช่น ข้าวจ้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น และวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

งานวิจัยนี้เสนอแนวทางในการผลิตเอทานอลแบบต้นทุนการผลิตต่ำ ด้วยการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบอย่างคุ้มค่า โดยพัฒนาการผลิตเอทานอลจากเปลือกสับปะรด ซึ่งเป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ราคาถูกหรือแทบไม่มีราคา (สามารถช่วยลดปริมาณขยะสดที่ต้องบำบัดของชุมชน) เป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมาก ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วจะมีปริมาณการผลิต 2.59 ล้านตันต่อปี แต่ปัจจุบันยังมีการนำเปลือกสับปะรดมาใช้ประโยชน์น้อย ที่เห็นได้ชัดมีเพียงการนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ นอกจากนี้เปลือกสับปะรดยังมีองค์ประกอบสำคัญของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตสสูง เพียงพอสำหรับเป็นอาหารเบื้องต้นในการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่จะช่วยในการผลิตไบโอเอทานอลได้ การศึกษาขั้นตอนการปรับสภาพและการย่อยจะใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ

และราที่ขึ้นขนมปังจากเศษขนมปังหมดอายุ เปรียบเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์ แล้วทำการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง ซึ่งเป็นการศึกษาด้วยการประยุกต์ใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่น ใช้วัตถุดิบที่ผลิตเองในประเทศ ดำเนินการผลิตอย่างง่ายและลดการใช้พลังงาน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรด

2. เพื่อศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง

3. เพื่อวิเคราะห์หากระบวนการผลิตที่มีต้นทุนต่ำ และมีความคุ้มค่าอย่างเหมาะสม

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่ทางด้านการผลิตเอทานอล
2. ทำให้ทราบกระบวนการผลิตเอทานอลที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ
3. ช่วยลดขยะเปียกในชุมชน
4. ช่วยเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิตทางการเกษตร

บทที่ 2

ตรวจสอบเอกสาร

2.1 สับปะรด

สับปะรด (ชื่อทางวิทยาศาสตร์: *Ananas comosus*) เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่งที่มีต้นกำเนิดมาจากบริเวณทวีปอเมริกาใต้ ลำต้นมีขนาดสูงประมาณ 80-100 เซนติเมตร การปลูกสามารถปลูกได้ง่ายโดยการฝังกลบหน่อหรือส่วนยอดของผลที่เรียกว่า จุก เปลือกของผลสับปะรดภายนอกมีลักษณะคล้ายตาล้อมรอบผล สับปะรดมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนชื่อ บรอมีลิน (Bromelin) ช่วยย่อยโปรตีนไม่ให้ตกค้างในลำไส้ และ มีเกลือแร่ วิตามินซีจำนวนมาก

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สับปะรดเป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 90-100 เซนติเมตร ลำต้นอยู่ใต้ดิน ปล้องสั้น ไม่แตกกิ่งก้านมีแต่กาบใบห่อหุ้มลำต้น ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงเวียนถี่ ไม่มีก้านใบ ใบเรียวยาว โคนใบเป็นกาบหุ้มลำต้น ปลายแหลม ขอบใบมีหนาม แผ่นใบสีเขียวเข้มและเป็นทางสีแดงด้านล่างมีนวลแป้งสีขาว ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด ดอกเรียงอัดแน่นรอบแกนช่อดอก ก้านช่อใหญ่แข็งแรง กลีบดอก 3 กลีบ ด้านบนสีชมพูอมม่วง ด้านล่างสีขาว เกสรเพศผู้ 6 อัน เรียงกัน 2 ชั้น เป็นผลรวมรูปรี โคนกว้าง มีใบสั้นเป็นกระจุกที่ปลายผล เรียกว่า ตะเกียง ผลสุกสีเหลืองสดและฉ่ำน้ำ

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของสับปะรด

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสับปะรด (*Ananas comosus (L) Merr.*) พบว่า องค์ประกอบส่วนใหญ่ประกอบด้วย น้ำ เส้นใย วิตามินซี น้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส

ตารางที่ 2-1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกสับปะรดคิดเป็นร้อยละของวัตถุแห้งร้อยละ 96.28

องค์ประกอบ	ร้อยละ	องค์ประกอบ	ร้อยละ
แคลเซียม	0.33	ไขมัน	1.13
เถ้า	6.62	เยื่อไย	20.60
ฟอสฟอรัส	0.18	ADF*	25.67
โปรตีน	6.37	NFE*	65.28

ที่มา: http://www.kuifeedpineapple.com

* NFE (Nitrogen Free Extract) คือ คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่ายเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งได้แก่ แป้ง น้ำตาล (อาจมีเฮมิเซลลูโลสและลิกนินปนอยู่)

ร้อยละของ NFE = ร้อยละของวัตถุแห้ง – ร้อยละของเถ้า – ร้อยละของโปรตีน – ร้อยละของไขมัน – ร้อยละของเยื่อไย

* ADF (Acid Detergent Fiber) คือ เซลลูโลส ลิกนิน คูติน สารที่ไม่ละลายในกรดและเถ้า

2.1.3 ข้อมูลการส่งออก

ผลิตภัณฑ์สับปะรดของประเทศไทยที่มีการส่งออกมีอยู่หลายประเภท ที่สำคัญสองอันดับแรกก็คือ สับปะรดกระป๋อง และน้ำสับปะรดเข้มข้น เนื่องจากมีมูลค่าการส่งออกมากถึงร้อยละ 69 และร้อยละ 24 ของมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์สับปะรดทั้งหมดในปี 2554 ปัจจุบันมีโรงงานผลิตสับปะรดกระป๋องและน้ำสับปะรดเข้มข้นที่ได้รับการรับรองจากสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม(สมอ.) มากกว่า 75 โรงงาน กำลังการผลิตประมาณ 800,000 ตัน/ปี ส่วนใหญ่ผลิตตามคำสั่งซื้อจากต่างประเทศ มีการส่งออกเฉลี่ยปีละประมาณ 600,000 ตัน โดยส่งออกเป็นสับปะรดกระป๋องร้อยละ 80 และน้ำสับปะรดร้อยละ 20 คู่แข่งที่สำคัญของไทยในการส่งออกสับปะรดกระป๋องและน้ำสับปะรดได้แก่ ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และจีน

ไทยมีการส่งออกสับปะรดและผลิตภัณฑ์สับปะรด ได้แก่ สับปะรดสด สับปะรดแช่เย็น สับปะรดแช่แข็ง สับปะรดแห้ง สับปะรดกวน สับปะรดกระป๋อง และน้ำสับปะรดเข้มข้น โดยมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกในช่วง ปี 2552-2554 ดังนี้

ปี 2552 ไทยส่งออกสับปะรดและผลิตภัณฑ์สับปะรดปริมาณ 690,600 ตัน มูลค่า 23,147 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าลดลงร้อยละ 14.1 และ 10.9 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปี 2551

ปี 2553 ไทยส่งออกสับปะรดและผลิตภัณฑ์สับปะรดปริมาณ 689,895 ตัน มูลค่า 23,176 ล้านบาท ปริมาณลดลงร้อยละ 0.1 แต่มูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.1 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปี 2552

ปี 2554 ไทยส่งออกสับปะรดและผลิตภัณฑ์สับปะรดปริมาณ 819,373 ตัน มูลค่า 28,995 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 18.8 และ 25.1 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปี 2553

ตารางที่ 2-2 แสดงค่าการส่งออกของสับปะรดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552-2554

ประเภท	2552		2553		2554	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
สับปะรดสดแช่เย็น	2,740.1	31.2	2,149.6	27.9	1,871.0	28.6
สับปะรดแช่แข็ง	646.0	34.3	1,145.3	47.9	988.0	72.5
สับปะรดแห้ง	273.4	25.2	516.8	62.9	455.0	57.7
สับปะรดกวน	26,556.1	1,518.9	27,232.5	1,738.9	28,121.0	1,932.0
สับปะรดกระป๋อง	508,970.3	15,013.2	518,974.0	14,684.2	641,167.0	20,080.2
น้ำสับปะรด	151,414.3	6,523.7	139,876.5	6,614.0	146,771.0	6,824.8
รวม	690,600	23,147	689,895	23,176	819,373	28,995.8

ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักปลัดกระทรวงพาณิชย์ โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร

2.2 เอทานอล

2.2.1 คุณสมบัติทั่วไป

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการนำเอาพืชมาหมักเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์หรือกรดบางชนิดช่วยย่อย เพื่อทำให้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95% โดยการกลั่น มีสูตรเคมี C_2H_5OH มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง (เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8 มีค่าออกเทนสูงถึง 113) ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นไฮดรอกซิลดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -114.1 องศาเซลเซียส จุดเดือด 78.5 องศาเซลเซียส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย อาทิ ใช้ผลิตอาหาร และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิง ฯลฯ บราซิลเป็นประเทศแรกที่มีการศึกษาวิจัยและเริ่มใช้เอทานอลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงตั้งแต่ปี 2516

เอทานอลผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้เอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมี โดยใช้พืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยมและมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลาย

ชนิดตามความเหมาะสมของแต่ละประเทศ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล สาหร่าย ฯลฯ นอกจากนั้น ยังมีความพยายามพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสสูง เช่น ฟางข้าว ขี้เลื่อย หญ้า เป็นต้น

ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสจากพืชจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

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

ในกระบวนการหมักเอทานอลจะเกิดผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมาย เช่น กรดอะซิติก ไกลคอลและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อีกมากมาย ซึ่งจำเป็นต้องมีกระบวนการกำจัดออกก่อนใช้งาน การหมักเอทานอลจะหมักอยู่ในรูปของเหลว โดยจะมีส่วนประกอบของเอทานอลประมาณ 15% เอทานอลจะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการดูดซับและการกลั่นร่วมกัน เอทานอลที่บริสุทธิ์ ในระหว่างการทำปฏิกิริยาของเอทานอลกับออกซิเจนผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ ความร้อน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ

แป้งและเซลลูโลสมีโครงสร้างโมเลกุลที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสมาประกอบกัน จึงสามารถที่จะผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส แต่อย่างไรก็ตามการปรับสภาพเซลลูโลสเพื่อผลิตน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลชนิดอื่นเพื่อเป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล

เอทานอลก็จากผลิตได้จากเอทิลีน โดยการย่อยสลายพันธะคู่ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาและอุณหภูมิสูง

$$C_2H_4 + H_2O \longrightarrow C_2H_5OH$$

แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการหมักถือเป็นวิธีการผลิตที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบัน

2.2.2 ประโยชน์ของเอทานอล

เอทานอลที่ผลิตอยู่ในปัจจุบันมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย อาทิ เช่น

1) ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อให้พลังงานและความร้อน

2) ใช้เป็นตัวทำละลายทางเคมีในทางอุตสาหกรรม

3) ในทางการแพทย์ใช้เป็นตัวทำละลายยาและเป็นสารเสริมช่วยออกฤทธิ์ในยา นอกจากนี้ยังใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อทำความสะอาดบาดแผล

4) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อการผลิตสารบางชนิดในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอาง เช่น น้ำหอม สบู่ เป็นต้น

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม สามารถทำได้ 2 วิธีการด้วยกัน คือการผลิตเอทานอลทางเคมี และการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

2.3.1 การผลิตเอทานอลทางเคมี

เป็นวิธีการผลิตหรือสังเคราะห์เอทานอลโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งมีข้อดีหลายประการ อาทิเช่น ปฏิกิริยาเกิดได้รวดเร็วและให้ความถูกต้องซึ่งสามารถคำนวณได้อย่างใกล้เคียงหรือแน่นอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เอทานอลมีหลากหลายวิธี และการดูแลเอาใจใส่ไม่ยาวนานเหมือนกระบวนการหมักเอทานอลด้วยวิธีการทางชีวภาพ ส่วนข้อเสียของวิธีการผลิตหรือสังเคราะห์เอทานอลทางเคมี ได้แก่ ต้องใช้สารเคมีที่จำเพาะมากเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์เอทานอล ซึ่งสารเคมีเหล่านี้ส่วนใหญ่มีราคาสูง เมื่อเทียบกับวัตถุดิบหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เอทานอลที่ได้มีสารเคมีตัวอื่นๆ ปนมาในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ ซึ่งสารเหล่านั้นเป็นอันตรายทั้งต่อผู้ผลิตและสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้กฎหมายจึงไม่อนุญาตให้นำเอทานอลจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีไปใช้รับประทานหรือใช้กับสิ่งมีชีวิตภายในร่างกาย และการสังเคราะห์เอทานอลในทางเคมี สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างสูงหรือจำเพาะ และของเสียจากกระบวนการผลิตยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจึงไม่นิยมใช้วิธีการผลิตโดยทางเคมี สำหรับตัวอย่างปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้ในการผลิตหรือสังเคราะห์เอทานอลทางเคมีที่สำคัญได้แก่

1) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาการเติมน้ำให้กับเอทธิลีน (ethylene) เป็นการเปลี่ยนเอทธิลีนให้กลายเป็นเอทานอลโดยการเติมกรดซัลฟูริกให้กับเอทธิลีน ได้ผลผลิตเป็นเอทธิลไฮโดรเจนซัลเฟต (ethyl hydrogen sulfate) ซึ่งเมื่อนำไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูง จะได้เอทานอลเป็นสารผลิตภัณฑ์

2) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอทานอลโดยการเติมไฮโดรเจนให้กับอัลดีไฮด์ การสังเคราะห์เอทานอลโดยวิธีนี้ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ดีภายใต้สภาวะที่มีความร้อนและความดันสูง โดยมีนิเกิล (nikel) และแพลตตินั่ม (platinum) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst)

3) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาระหว่างเมทานาล (methanal) กับกรีญาร์-รีเอเจนต์ ซึ่งกรีญาร์รีเอเจนต์เกิดจากอัลคิลเฮไลด์ทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียมในไดเอทธิลอีเทอร์ (anhydrous diethyl ether) จะได้อัลคิลแมกนีเซียมเฮไลด์ (alkylmagnesium halide) ซึ่งเป็นกรีญาร์-รีเอเจนต์ โดยอัลคิลแมกนีเซียมเฮไลด์จะทำปฏิกิริยากับเมทานาลกลายเป็นเอทานอล

4) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาไฮโดรโบเรชันของเอทธิลีน (ethylene) เป็นปฏิกิริยาระหว่างเอทธิลีนกับไฮไดรด์ของโบรอน ที่เรียกว่า โบเรน BH_3 (ไดเมอร์ของโบเรน คือ

B_2H_6 ซึ่งเรียกว่า ไดโบเรน) จะให้สารประกอบไตรอัลคิลโบรอน ซึ่งเมื่อนำไปออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเพอร์รอกไซด์จะให้แอลกอฮอล์หรือเอทานอล

5) การสังเคราะห์เอทานอลจากการไฮโดรไลซิสของเอทิลเฮไลด์ (ethyl helide; CH_3CH_2X) เป็นการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเอทิลเฮไลด์ไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะเป็นด่าง

2.3.2 การผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

การผลิตเอทานอลทางชีวภาพเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นซึ่งส่วนใหญ่จะหมายถึงสารละลายน้ำตาล หากเป็นวัตถุดิบที่ไม่ใช้น้ำตาล เช่น แป้งหรือเซลลูโลส จำเป็นต้องเปลี่ยนวัตถุดิบเหล่านั้นให้กลายเป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ก่อนซึ่งจะเรียกขั้นตอนนี้ว่า การปรับสภาพ (pretreatment) ให้กลายเป็นเอทานอล โดยอาศัยกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตที่สำคัญคือ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Zymomonas mobilis* ข้อดีของการผลิตเอทานอลทางชีวภาพคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ต้นทุนในการผลิตต่ำ เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตส่วนใหญ่เป็นผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งมีราคาถูกเมื่อเทียบกับวิธีการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางเคมี นอกจากนี้ปริมาณของวัตถุดิบยังมีมาก และหาได้ง่าย โดยเฉพาะของเหลือทิ้งทางการเกษตร ข้อดีทางอ้อมคือ ช่วยเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้แก่พืชผลทางการเกษตร สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร ช่วยลดขยะ และช่วยรักษาสิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้ตัวอื่นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้ทำน้ำแข็งแห้ง น้ำโซดา หรือสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเคมี เอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งผลิตได้จากยีสต์สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ ตัวยีสต์อาจใช้เป็นอาหารเสริมเป็นแหล่งของวิตามินบี ใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารที่ให้รสมันเนย หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ ส่วนข้อเสียของการผลิตเอทานอลทางชีวภาพคือ กระบวนการผลิตเอทานอลเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ทำให้ต้องใช้แรงงาน และการดูแลเอาใจใส่มากกว่าวิธีการทางเคมี นอกจากนี้หากต้องการปริมาณผลผลิตที่มากจำเป็นต้องใช้ระบบการผลิตที่ใหญ่ขึ้น ทำให้ต้นทุนของการผลิตโดยเฉพาะต้นทุนเกี่ยวกับเครื่องมืออุปกรณ์สูงขึ้นด้วย และในบางครั้งหากใช้วัตถุดิบที่จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้ได้โดยตรง จำเป็นที่จะต้องปรับสภาพหรือเปลี่ยนไปเป็นสารตั้งต้นที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ก่อน ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากซับซ้อนและเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น

2.4 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรหลายชนิด แบ่งได้เป็น 3 ประเภทหลักๆ ที่สำคัญ คือ วัตถุดิบประเภทแป้ง วัตถุดิบประเภทน้ำตาล และเศษวัสดุที่เป็นเซลลูโลส โดยที่วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลสจะถูกย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อน แต่วัตถุดิบประเภทที่เป็นน้ำตาลอยู่แล้วสามารถนำไปใช้หมักได้เลย ระยะเวลาในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลประมาณ 48 ชั่วโมง จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 8-12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

2.4.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล และน้ำตาลจากหัวบีท ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้เลย โดยไม่ต้องผ่านการย่อยให้กลายเป็นน้ำตาล (Pretreatment) ใดๆ น้ำตาลที่พบในวัตถุดิบเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ดังนี้

น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส+ฟรุกโตส เอทานอล

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \text{ ----------> } 2C_6H_{12}O_6 + \text{Yeast ----------> } 4C_2H_5OH + 4CO_2$$

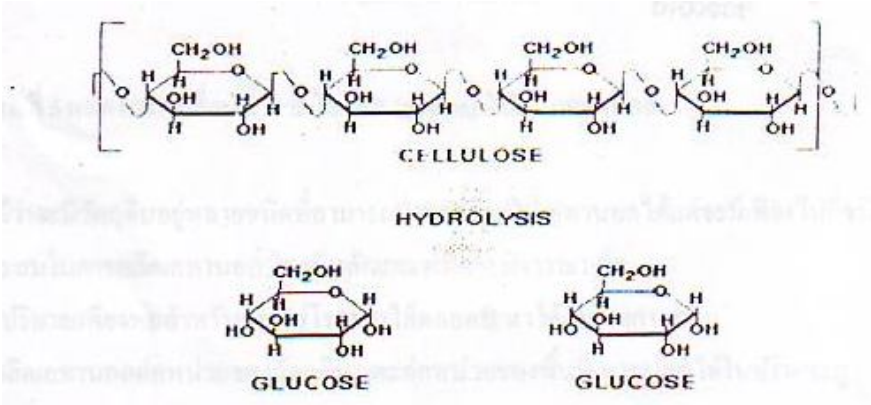
2.4.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ มันสำปะหลัง ธัญพืช และมันฝรั่ง โดยมีโครงสร้างการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของวัตถุดิบเหล่านี้ให้กลายเป็นเอทานอล สามารถสรุปขั้นตอนได้ดังนี้

แป้ง น้ำตาลกลูโคส เอทานอล

$$H(C_6H_{10}O_5)_NOH \text{ -------ย่อย---------> } nC_6H_{12}O_6 + \text{Yeast ----------> } 2C_2H_5OH + 2nCO_2$$

แป้งในวัตถุดิบจะต้องถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน จากนั้นยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้

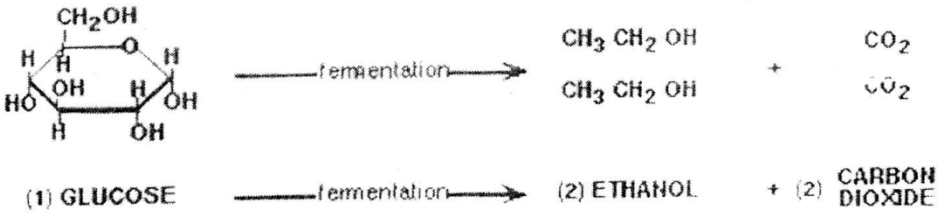
2.4.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด และกากของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ฯลฯ การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสนั้น ขั้นตอนแรกจะใช้กระบวนการไฮโดรไลซิส ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงพันธะในเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ดังภาพประกอบที่ 2-1



ภาพประกอบที่ 2-1 การย่อยเซลลูโลส หรือเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส

ที่มา: www.thai-explore.net/documents/vdo_1299_399.doc

โครงสร้างที่มีมวลโมเลกุลใหญ่จะถูกย่อยสลายให้กลายเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์หรือกรด จากนั้น น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการหมัก ดังภาพประกอบที่ 2-2

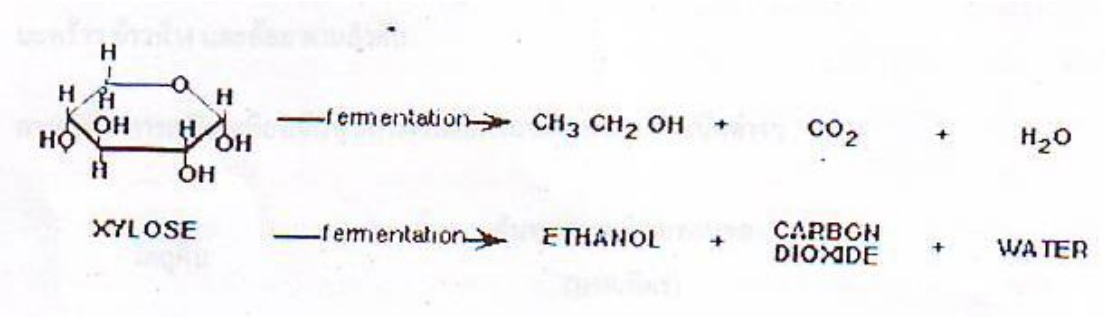


ภาพประกอบที่ 2-2 การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ด้วยกระบวนการหมัก

ที่มา: www.thai-explore.net/documents/vdo_1299_399.doc

โดยทั่วไปกลูโคส 1 โมเลกุล สามารถผลิตเอทานอลได้ 2 โมเลกุล และจะได้คาร์บอนไดออกไซด์อีก 2 โมเลกุล โดยตรวจสอบได้จากน้ำหนักโมเลกุลซึ่งเอทานอลจะมีน้ำหนักโมเลกุลเป็นครึ่งหนึ่งของสารตั้งต้น (กลูโคส)

สำหรับปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส (xylose) ไปเป็นเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 2-3 ซึ่งปกติแล้วน้ำตาลไซโลสสามารถหมักได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ



ภาพประกอบที่ 2-3 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส (xylose) ไปเป็นเอทานอล

ที่มา: www.thai-explore.net/documents/vdo_1299_399.doc

แม้ว่าจะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณา คือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดทั้งปี หาได้ง่าย และมีราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบ และต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารมนุษย์

สำหรับประเทศไทยวัตถุดิบที่ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอลมีเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง

2.5 กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

ในการผลิตเอทานอลมีด้วยกัน 3 ขั้นตอน ได้แก่ การปรับสภาพวัตถุดิบ การย่อย และการหมัก

2.5.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment) มีด้วยกัน 4 วิธี

2.5.1.1 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical Pretreatment) เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด การใช้ความร้อน

2.5.1.2 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment) จะใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายใน

สารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส หรือใช้สารละลายด่างเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน

2.5.1.3 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-chemical Pretreatment) เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี ดังเช่น ในตัวอย่างการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน

2.5.1.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological Pretreatment) เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรง และช่วยลดความเป็นผลึก

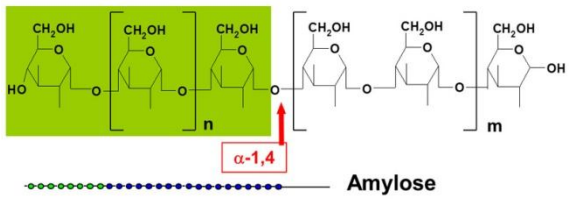
2.5.2 กระบวนการย่อย (Hydrolysis)

สามารถแยกออกออกเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะของวัตถุดิบ

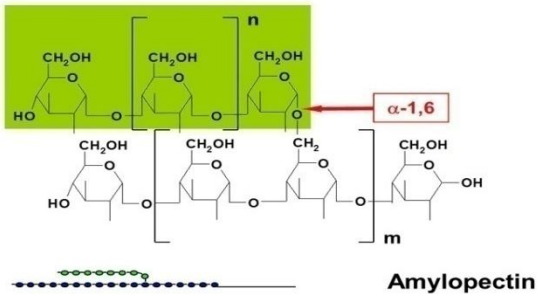
(1) วัตถุดิบประเภทแป้ง การผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทแป้งก่อนนำไปทำการหมักเป็นเอทานอลจะต้องมีการนำไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยการใช้วิธีการทางเคมี วิธีทางฟิสิกส์ หรือวิธีทางชีวภาพ ซึ่งจะเปลี่ยนแป้งที่มีขนาดใหญ่ให้มีโครงสร้างโมเลกุลอยู่ในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลกลูโคส) โดยนิยมใช้ด้วยกัน 2 วิธี ได้แก่

1.1) การใช้กรดในการย่อย (Acid Hydrolysis) การใช้กรดย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส นิยมใช้กรดเกลือ (HCl) กรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) กรดไนตริก (HNO_3) และกรดกำมะถัน (H_2SO_4) แต่ในปัจจุบันการใช้กรดในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลไม่เป็นที่นิยมมากนัก เพราะการย่อยแป้งด้วยกรดนั้นจะต้องทำปฏิกิริยาร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิสูง ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรด ชนิดของกรด เวลาและอุณหภูมิในการย่อย รวมทั้งยังก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เช่น สารเฟอร์ฟูรอล

1.2) การใช้เอนไซม์ในการย่อย (Enzymatic Hydrolysis) วิธีนี้เป็นที่นิยมมากกว่าการใช้กรดในการย่อย เพราะมีความสะดวก ประหยัด และความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้มีค่าสูงกว่า อีกทั้งยังไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม โดยการย่อยสลายแป้งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดพันธะα-1,4 ที่เชื่อมระหว่างกลูโคสแต่ละหน่วยและเอนไซม์ที่ตัดพันธะα-1,6 ที่เป็นสาขาเชื่อมอะไมโลแพกติน ซึ่งโครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลแพกตินแสดงได้ดังภาพประกอบที่ 2-4



(ก) อะไมโลส



(ข) อะไมโลแพกติน

ภาพประกอบที่ 2-4 แสดง (ก) อะไมโลส เกิดจากกลูโคสแต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4
(ข) อะไมโลแพกติน เกิดจากกลูโคสที่ต่อเป็นแขนงด้วยพันธะ α-1,6
ที่มา: http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=422

การย่อยสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ Liquefaction และ Saccharification

1. Liquefaction เป็นการย่อยแป้งในวัตถุดิบให้มีโมเลกุลเล็กลงโดยใช้เอนไซม์ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจะทำการย่อยแป้งที่ตำแหน่ง 1,4 แอลฟาไกลโคซิดิกแบบสุ่ม ทำให้ความหนืดลดลง ได้ผลผลิตเป็นมอลโตสเดกซ์ตรินและโอลิโกแซคคาไรด์

2. Saccharification การย่อยแป้งต่อจากขั้นตอน Liquefaction ให้กลายเป็นน้ำตาลมอลโตสเดกซ์ตรินและโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยสลายพันธะ 1,4 และ 1,6 แอลฟาไกลโคซิดิกของโมเลกุลมอลโตสเดกซ์ตริน และโอลิโกแซคคาไรด์ให้สมบูรณ์จนได้กลูโคสออกมา

(2) วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส

วัตถุดิบชนิดลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ถ้าการย่อยลิกโนเซลลูโลสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าไม่สมบูรณ์จะเกิดทั้งกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนการย่อยเฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลออกมาหลายชนิด ซึ่งจะขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส การย่อยวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสมี 2 วิธีด้วยกันคือ

2.1) การย่อยทางเคมี เป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสโดยตรง สามารถใช้กรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง ได้แก่ กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 70 ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 40 ขึ้นไป กรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 1 เป็นต้น วิธีนี้ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้น เนื่องจากน้ำตาลที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อ ทำให้ได้ผลพลอยได้อื่นๆ เช่น สารเฟอร์ฟูรอล และกรดอาจทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ต้องการ และต้องย่อยที่อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรงและไม่เฉพาะเจาะจง

2.2) การย่อยโดยใช้เอนไซม์ เอนไซม์จะทำปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลส ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) โดยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะบีต้า 1,4 ไกลโคซิดิกภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสหน่วยที่เล็กที่สุดหากการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงและไม่รุนแรง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แต่ใช้เวลานานเมื่อเทียบกับวิธีทางเคมี ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งราและแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้คือเซลลูเลสที่ได้จาก *Trichodermaviride* หรือภายหลังจัดอยู่ใน *T. reessi*

2.5.3 การหมัก (Fermentation)

คือ กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเป็นเอทานอลด้วยเชื้อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก คือ แบคทีเรีย และเชื้อรา โดยทั่วไปจะทำงานในสภาวะแบบไม่ต้องการออกซิเจน แบคทีเรียมีหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ (เช่น ผัก ผลไม้) ให้มีโมเลกุลเล็กลง โดยแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสกุลบาซิลัสผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน กลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก อาศัยในที่ที่มีน้ำตาลทั้งในพืชผัก ผลไม้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำงานในที่ไม่มีอากาศ นอกจากผลิตกรดแลคติกแล้วยังสามารถช่วยผลิตเอทานอลด้วย และแบคทีเรียสามารถเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ในสภาพที่มีออกซิเจน และกลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกจะเปลี่ยนเอทานอลเป็นกรดอะซิติกในสภาพไม่มีออกซิเจน ส่วนเชื้อราจะมี 2 กลุ่ม คือ ยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลในสภาพไร้ออกซิเจน และอีกกลุ่มเรียกว่า ราเส้นใย เป็นจุลินทรีย์พวกที่ต้องการอากาศ

การย่อยและหมักวัสดุทางการเกษตรด้วยจุลินทรีย์ เอทานอลที่ได้เรียกว่า ไบโอ-เอทานอล (Bio-ethanol) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดจากการย่อยและหมักด้วยจุลินทรีย์แสดงดังนี้

$$(C_6H_{12}O_6)_n + nH_2O \xrightarrow{\text{เอนไซม์จากจุลินทรีย์}} nC_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 2nC_2H_5OH + 2nCO_2$$

(เซลลูโลสหรือแป้ง) (น้ำตาล) (เอทานอล)

ปฏิกิริยาแสดงกลไกการผลิตเอทานอล

2.5.3.1) ปัจจัยสำคัญในกระบวนการหมัก คือ

(1) ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลเป็นอาหารเพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์และในขณะเดียวกันทำให้เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเรียกว่า กระบวนการหมัก (Fermentation) ขณะเดียวกันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีควบคู่กันไปด้วย ยีสต์ที่มีประโยชน์ในการผลิตอาหารหลายอย่างที่ทุกคนรู้จักกันดี คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)* หรือยีสต์ขนมปัง ยีสต์ชนิดนี้มนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์มานานแล้ว ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้น้ำตาลแล้วผลิตแอลกอฮอล์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ยีสต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร

(2) อาหาร คือ ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาล เช่น น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม และชอบอาหารที่มีรสเปรี้ยว ในการเจริญของยีสต์ ต้องการน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน โดยยีสต์แต่ละชนิดจะต้องการชนิดของน้ำตาลที่แตกต่างกัน

(3) ความชื้น ยีสต์ต้องการความชื้นในการเจริญเติบโตมากกว่าเชื้อราแต่น้อยกว่าแบคทีเรีย

(4) อุณหภูมิ ยีสต์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอุณหภูมิช่วงกว้างมาก ตั้งแต่ 0-40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์คือ 25-30 องศาเซลเซียส ยีสต์บางชนิดทนต่ออุณหภูมิแช่เยือกแข็งได้ดีมาก

(5) pH ของอาหาร ยีสต์เจริญได้ในช่วง pH กว้าง ค่า pH ต่ำสุดที่ยีสต์ สามารถเจริญได้คือ 1.5 ส่วนค่า pH สูงสุดคือ 8.0-8.5 สำหรับค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน

(6) ปริมาณออกซิเจน ยีสต์เจริญได้ที่มีสภาพที่มีออกซิเจน และสภาพที่ไม่มีออกซิเจน

2.5.3.2) แหล่งของจุลินทรีย์ (ราและยีสต์) ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้

(1) จุลินทรีย์ในผักผลไม้

โดยทั่วไปการปนเปื้อนจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและเชื้อรา จะมีสาเหตุมาจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำ และดิน แหล่งและสาเหตุการปนเปื้อนนั้นอาจแบ่งได้เป็น 2 ช่วงหลัก คือ ก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนทรัพยากรให้ใช้ประโยชน์ได้ใหม่ในวัฏจักรของธาตุอาหาร โดยจุลินทรีย์ทำหน้าที่ย่อยสลายวัสดุสารอินทรีย์ต่างๆ (Organic Decomposition) ให้เป็นธาตุอาหาร เกิดการหมุนเวียนธาตุอาหารกลับมาใช้ใหม่ของสารอินทรีย์วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางการเกษตร ให้กลับอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช โดยกระบวนการย่อยสลายหรือสังเคราะห์สารชนิดอื่นๆขึ้นมาใหม่ในธรรมชาติ เช่น การย่อยสลายเศษซากพืชซากสัตว์ในดินให้อยู่ในรูปฮิวมัส เปลี่ยนจากรูปสารอินทรีย์ไปเป็นสารอนินทรีย์ (Mineralization) เพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช ได้แก่ กระบวนการตรึงไนโตเจน (N_2 Fixation) โดยจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถสร้างอาหารเองได้โดยใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ เช่น แหนแดง และจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถดึงไนโตรเจนจากอากาศและสร้างความอุดมสมบูรณ์ให้กับดินได้ เช่น เชื้อไรโซเบียม

(2) จุลินทรีย์บนขนมปัง (Mold on Bread) หรือจุลินทรีย์ในอากาศ

อาการเสียของขนมปังลักษณะที่เกิดขึ้น เนื่องจากมีเชื้อรา(Mold) ขนมปังนับเป็นตัวกลางที่ดีสำหรับการเจริญเติบโต โดยเฉพาะในส่วนที่มีโอกาสสัมผัสอากาศภายนอก สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา คือ มีความชื้นสูงและมีอุณหภูมิของอากาศที่ร้อนอบอ้าว เวลาใดก็ตามที่เราทิ้งขนมปังไว้ในบรรยากาศ เชื้อราที่มีอยู่ในอากาศ หรือตามที่สิ่งสกปรกต่างๆ จะตกลงบนผิวของขนมปัง ถ้าขนมปังมีความชื้นต่ำ เชื้อรานี้จะไม่เจริญเติบโต แต่ถ้ามีความชื้นสูงถึงระดับหนึ่งที่เหมาะสมแล้ว เชื้อรานี้จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ปรากฏการณ์เช่นนี้ จะพบได้บ่อยเมื่อมีการเก็บขนมปังไว้ในที่ชื้น เชื้อราทั่วไปไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิของเตาอบได้ ดังนั้นถึงแม้ว่าจะบังเอิญมีเชื้อราปะปนอยู่ในแป้งสาลี หรือส่วนผสมทำขนมปังต่างๆ ที่มีการเก็บไม่ดีพอ เชื้อราเหล่านี้ ก็จะถูกทำลายหมดเมื่อขนมปังถูกนำเข้าเตาอบ ดังนั้น การเกิดเชื้อราที่ขนมปังก็มาจากภายนอกที่เกิดภายหลัง การอบจนสุกแล้วเท่านั้น

ตัวอย่างการเสื่อมเสียของขนมปังจากเชื้อรา โดยเชื้อราที่เกี่ยวข้องคือ

- *Rizopus nigricacs* ซึ่งมีไมซีเลียมเป็นปุยฝ้ายสีขาวและมีสปอร์สีดำ
- *Penicillium expansum* หรือ *P. stoloniferm* จะสร้างสปอร์สีเขียว
- *Aspergillus niger (A. niger)* จะสร้างสปอร์สีเขียว สีออกม่วงหรือน้ำตาลจนถึงดำ และเมื่อมีการสร้างสีขึ้นแล้ว สีจะซึมเข้าไปในขนมปัง ทำให้ขนมปังมีสีเหลือง
- *Monilia (Neurospora) sitophila* จะให้โคนิเดียสีชมพู

เนื่องจากเศษขนมปังที่เป็นของเสียมีปริมาณมากในชุมชน ซึ่งเกิดจากการที่ขนมปังตามร้านขายเบเกอรี่ต่างๆหมดอายุลง และเกิดจากเศษขนมปังที่เหลือทิ้งในระหว่างกระบวนการการผลิตของโรงงาน สามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆได้น้อย ในปัจจุบันงานวิจัยนี้จึงสนใจนำวัตถุดิบเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตเอทานอลเพื่อเพิ่มมูลค่าและรายได้ให้แก่ชุมชนและโรงงานขนมปังต่างๆ

(3) ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast)

ยีสต์ขนมปังมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *S. cerevisiae* มักนำไปผสมกับแป้งสาลีและน้ำตาล เพื่อทำหน้าที่ให้ขนมฟู ยีสต์ขนมปังเป็นเชื้อราชนิดหนึ่งซึ่งมีรูปร่างกลม มีขนาด 5-10 ไมครอน (Micron) และขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ ยีสต์ขนมปังสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

ยีสต์สด (Compressed Yeast)

เป็นยีสต์ที่อัดเป็นก้อนหรือแท่ง มีสีครีมอ่อนถึงน้ำตาลอ่อนค่อนข้างขาว มีความชื้นสูงประมาณ 70% การเก็บรักษาจะต้องแช่เย็นให้อยู่ระหว่าง 2-10 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บสั้น ปริมาณการใช้ 2.5-5% ของน้ำหนักแป้ง

ข้อดีของยีสต์ชนิดนี้คือ เป็นยีสต์ที่ใหม่ และมีความแข็งแรงดี เมื่อนำไปใช้ทำขนมปังจะทำให้ได้ขนมปังที่มีกลิ่นดีมีกลิ่นหอมตามธรรมชาติ

ข้อเสียของยีสต์นี้ คือ อายุการเก็บจะสั้น ควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำที่ 0-5.5 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเก็บที่ต่ำกว่า -1 องศาเซลเซียส จะเก็บได้สองเดือน

ยีสต์แห้งชนิดเม็ด (Active Dry Yeast)

เป็นยีสต์สดที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเพื่อลดความชื้นให้เหลือเพียง 5- 10% มีลักษณะเป็นเม็ดๆ ก่อนนำไปใช้ต้องนำไปละลายในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ที่ละลายน้ำตาลไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปผสมกับแป้ง โดยใช้สัดส่วนของน้ำ 1 ลิตรต่อยีสต์ 50 กรัม และน้ำตาล 20 กรัม ปริมาณการใช้ 1.5-4 % ของน้ำหนักแป้ง

ข้อดีของยีสต์ชนิดนี้ คือ สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น แต่ยังไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากต้องนำมาละลายน้ำอุ่นที่ผสมน้ำตาลก่อนใช้ ซึ่งบางครั้งน้ำอาจร้อนหรือเย็นเกินไป ซึ่งมีผลทำให้ยีสต์เสื่อมคุณภาพ มีผลกระทบต่อลักษณะความนุ่มของปัง

ข้อเสีย คือ ให้คาร์บอนไดออกไซด์น้อยกว่ายีสต์สด

ยีสต์แห้งชนิดผง (Instant Dry Yeast)

เป็นยีสต์สดที่นำมาผ่านกระบวนการทำแห้งเพื่อลดความชื้นให้เหลือเพียง 3.5-5.5% มีลักษณะเป็นผงหรือท่อนเล็กๆ สั้นๆ สีน้ำตาลอ่อนออกครีม บรรจุขายในถุงฟอยล์ภายใต้สภาพสุญญากาศจึงทำให้เก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องแช่เย็น แต่เมื่อแกะห่อฟอยล์สุญญากาศออกใช้ ควรเก็บยีสต์ส่วนที่เหลือในภาชนะทึบแสงและปิดสนิทแล้วเก็บแช่เย็นในตู้เย็นช่องแช่เย็นธรรมดา (อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส) ปริมาณการใช้ 1-3 % ของน้ำหนักแป้ง

ข้อดีของยีสต์ชนิดนี้ คือ ใช้สะดวก สามารถเติมลงในแป้งได้ทันที เก็บไว้ได้นาน อย่างไรก็ตาม แม้ว่ายีสต์แห้งสำเร็จรูปจะมีอายุการเก็บนาน แต่ว่ายีสต์ก็เหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีการเกิดและดับสลายตามอายุไขทั้งนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อมในการเก็บรักษาทั้งก่อนและหลังการเปิดห่อใช้

ข้อเสีย คือ เก็บรักษายาก

ยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ในงานวิจัยที่ผ่านมาคือ *S. cerevisiae* เป็นชนิดที่ใช้สำหรับการทดลองทางวิทยาศาสตร์ แต่ในงานวิจัยนี้เราจะใช้ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) ชนิดผงซึ่งเป็นยีสต์ตระกูล (Genus) *S. cerevisiae* เช่นกัน แต่ต่างชนิด (Species) มีคุณภาพ วิธีการสกัด และแหล่งที่มาต่างกัน จึงมีราคาต่ำกว่าถึง 25 เท่า ซึ่งประเทศไทยสามารถผลิตเองได้ เช่น ผลิตได้จากน้ำอ้อย และผลิตจากน้ำส่าเหล้า โดยปัจจุบันได้มีการนำยีสต์ขนมปังแบบผงมาใช้ผลิตสุราชุมชนมากขึ้น เนื่องจากราคาต่ำกว่ายีสต์ชนิดอื่น และแม้ว่ายีสต์ไวน์อาจนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ขนมปัง แต่ยีสต์ไวน์มีราคาแพงกว่า หาซื้อได้ยากกว่า และเก็บรักษายากกว่า จึงไม่เหมาะสมกับการใช้งานในระดับชุมชน แต่อาจจะเหมาะสมในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากยีสต์ไวน์สามารถนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ ซึ่งควรต้องมีการศึกษาและประเมินกระบวนการเชิงเศรษฐศาสตร์ต่อไป

2.6 วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM)

วิธีการพื้นผิวผลตอบสนองเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์ และสถิติมาใช้หาจุดที่เหมาะสมของกระบวนการ ประกอบด้วยกลุ่มของตัวแปรตามหลักคณิตศาสตร์และสถิติ โดยการใช้หลักการเหล่านี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองและตัวแปรอิสระ ในการวิเคราะห์ผลของตัวแปรอิสระจากผลการทดลองมาสร้างเป็นสมการทางคณิตศาสตร์ในรูปพื้นผิวผลตอบสนองการออกแบบการทดลองด้วยเทคนิค RSM มีขั้นตอนดังนี้

กำหนดตัวแปรที่จะศึกษาซึ่งประกอบด้วยตัวแปรอิสระและตัวแปรตามในกระบวนการทางเคมีและชีวเคมีที่มีผลกระทบจากตัวแปรต่างๆ มากมาย โดยจะเลือกบางตัวแปรที่มีผลกระทบโดยตรง การระบุตัวแปรอิสระจะสามารถกำหนดทิศทางในการพัฒนาระดับความสำคัญของตัวแปรได้ เพราะจะเกี่ยวข้องต่อความสำเร็จในการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยตรง ผลของตัวแปรอิสระแสดงในการพล็อตกราฟพื้นผิว (Surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) โดยการพล็อตแบบโครงร่างจะแสดงรูปร่างและตำแหน่งของการพล็อตพื้นผิวได้อย่างแม่นยำขึ้น การ Regression analysis แบบจำลองของสมการกำลังสอง (Quadratic equation) ดังสมการที่ (2.1) โดยค่า Y เป็นตัวแปรตาม b_0, b_i, b_{ii}, b_{ij} เป็นค่าสัมประสิทธิ์แบบจุดตัด (Intercept) สัมประสิทธิ์เชิงเส้น (Linear) สัมประสิทธิ์กำลังสอง (Quadratic) และสัมประสิทธิ์เชิงซ้อน (Interaction) ตามลำดับ ขณะที่ X_i และ X_j เป็นตัวแปรอิสระ($i \neq j$) แบบจำลองทางคณิตศาสตร์จำนวน 3 ตัวแปร

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{13}X_1X_3 \qquad (2.1)$$

แผนการทดลองแบบ CCD นี้พัฒนามาจากแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2^k Factorial design) หรือแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลเชิงส่วน (Fractional Factorial design) เนื่องจากแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับนั้นไม่สามารถใช้หาตัวแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสองได้ โดยที่แผนการทดลองที่สามารถใช้ได้จะต้องมีระดับของปัจจัยอย่างน้อย 3 ระดับ เช่น แผนการทดลองแบบ 3^k แฟคทอเรียล แต่เนื่องจากแผนการทดลองดังกล่าวจะต้องมีการซ้ำที่แต่ละปัจจัย (replicate) เพื่อใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของตัวแบบ (lack of fit test) ซึ่งในกรณีที่มีปัจจัยจำนวนมากจะทำให้จำนวนครั้งของการทดลองมีมาก

ที่มา: วรลักษณ์ (2013)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Choi *et al*. (2013) ได้ทำการศึกษาออกแบบการปรับสภาพโดยใช้เตาเชื้อเพลิงและ horizontal cylinder rotating เพื่อผลิตเอทานอลจากเปลือกส้มแมนดารินที่เสียแล้ว ปรับสภาพที่ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยไม่ต้องใช้สารเคมี โดยลดขนาดอนุภาคให้น้อยกว่า 1 มิลลิเมตร และลดความเข้มข้นของ d-limonene สารยับยั้งการหมักของยีสต์จาก 0.21% เป็น 0.01% เอนไซม์ในการย่อยสลายของการปรับสภาพเปลือกส้มแมนดาริน ถูกดำเนินการใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท (pH 4.8) ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และอัตรา Saccharification ทั้งหมด ประมาณ 95.6% กระบวนการระเหยแบบสุญญากาศจะเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลที่หมักถึง 10% (กลูโคส 7.1% และฟรุคโตส 2.9%) ต่อมาหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ 30 องศาเซลเซียส pH 5.0 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพของห้องปฏิบัติการ ผลผลิตเอทานอลที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น 90.6% เทียบกับ 78% ที่ 36 ชั่วโมง จากเปลือกส้มแมนดารินดิบ

Parmar และ Rupasinghe (2013) ได้ทำการศึกษาการใช้กากแอปเปิ้ลสำหรับการผลิตน้ำตาลหมักเอทานอลและกรดอะซิติก ทำการปรับสภาพกากแอปเปิ้ลโดยใช้ 1.5 กรัมต่อ100 มิลลิลิตรกรดซัลฟูริก อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา 91 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 นาที ตามด้วยโพลีฟีนอลออกซิเดชันโดยโหลดแลคเตส (Lactase) 10 EU ต่อ100 มิลลิลิตร ที่ pH 5.3 ปรับค่า pH เป็นกรดด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ (pH 4.0) จากนั้นทำการย่อยสลายโดยเอนไซม์มาตรฐาน ซึ่งมีดังนี้ โหลดเอนไซม์จาก 43, 183 และ 40.5 EU ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (DM) สำหรับ Celluclast 1.5L, Pectinex 3XL และ Novozyme 188 ตามลำดับ; อุณหภูมิบ่ม 40 องศาเซลเซียส pH 4.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหมักน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisae* ผลผลิตที่ได้เป็น 19.0 กรัมเอทานอลต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และทำการแปลงสภาพทางชีวภาพโดยใช้ Acetobacter aceti ส่งผลให้ได้ผลผลิตแอซิติกที่ความเข้มข้น 61.4 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

Zhang *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตเอทานอลจากรากมันฝรั่งด้วยการหมักโดยใช้ความร้อนและการหมักโดยไม่ใช้ความร้อน ขั้นตอนแรกทำการปรับสภาพโดยนำรากมันฝรั่งมาทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ขัดด้วย 70 % เอทานอล เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ ตัดรากให้มีขนาดเล็กเป็นลูกเต๋าด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำรากมันฝรั่งที่ตัดไว้มา 100 กรัม ผสมด้วย 100 มิลลิลิตร ของเชื้อรา *A. niger* ผสมกันโดยผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไฟฟ้า เพื่อให้ปลอดเชื้อ ที่ pH 4.0 จากนั้นเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Z. mobilis* ปิดฝาให้แน่น ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นถึง 13.2% (โดยปริมาตร) ที่ 60 ชั่วโมง หลังจากปลอดเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลจากการหมักโดยใช้ความร้อนที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปลูกเชื้อ ปรากฏว่าอยู่ในระดับเดียวกัน ดังนั้นการหมัก

เอทานอลจากการให้ความร้อนและไม่ให้ความร้อนมีจลนพลศาสตร์ที่คล้ายกัน จึงช่วยส่งผลให้ประหยัดพลังงานและค่าใช้จ่ายในการทดลอง

Scholz *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดและการหมักแป้งสาหร่ายไปเป็นเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ใช้สาหร่ายสายพันธุ์ *C. reinhardtii* โดยจะทำให้เป็นผงจากนั้นปรับสภาพโดยการนำมาล้างด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที ที่ 70 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงที่ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ ทำเช่นเดียวกันนี้ 10 ครั้ง สารละลายจะถูกนำไประเหยก่อนการชั่งน้ำหนักในบีกเกอร์ กากชีวมวลที่เหลือจะนำไปกวน ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนแผ่นให้ความร้อนก่อนการชั่งน้ำหนักในบีกเกอร์เติมเฮกเซน 50 มิลลิลิตร นำสารละลายไปหมุนเหวี่ยง 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆรินสารละลายและนำไประเหย กากชีวมวลถูกนำไปอบแห้งในตู้อบที่ 80 องศาเซลเซียส เพื่อให้แน่ใจว่ากำจัดตัวทำละลายหมดแล้ว นำ 9.3 กรัม หลังจากสกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน จากนั้นทำการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 2 บรรยากาศ ตรวจสอบตลอดเวลาจนกระทั่งไม่มีการสลายแป้งเพิ่มเติม ประมาณ 30% ของสาหร่ายแห้ง ใช้เอนไซม์ในการหมัก การไฮโดรไลซ์แป้งประสบความสำเร็จโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ความเข้มข้นสูงสุด 0.87±0.01% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ อัตราสูงสุด 14±1 มิลลิลิตรต่อกรัมชั่วโมง ใน 28 ชั่วโมง ค่าสัมประสิทธิ์ของเอทานอลจากกลูโคส 0.44 (กรัมเอทานอลต่อกรัมสาหร่าย)

Yuan *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาการทดสอบสมมติฐานที่ว่าการนำยีน endoinulinase ใส่ลงไปในยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อปรับปรุงการใช้อินนูลินและการหมักเอทานอลผ่านการทำงานร่วมกันระหว่าง heterologous endoinulinase และโดยธรรมชาติของ invertase SUC2 โดยการนำ endoinulinase gane inuA จากเชื้อรา *A. niger* ลงไปใน *S. cerevisiae* โดยจะทำการหมักจากหัวของแก่นตะวัน จากนั้นทำการเติมเซลล์ยีสต์ลงไปใน 50 มิลลิลิตรของการหมัก บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมล็ดที่เพาะเลี้ยงเชื้อถูกย้ายมาใส่ใน ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี 100 มิลลิลิตรของหัวเชื้อที่ใช้หมัก ที่ขนาดหัวเชื้อ 10% (โดยปริมาตร) สำหรับหมักเอทานอล ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องสั่น การหมักที่มี 20 % หัวของแก่นตะวัน โดยไม่มีสารอาหารอื่น มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในแป้ง (71%) ที่คาดไว้หลังจากการย่อยสลายกรด ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล และหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันระหว่าง heterologous endoinulinase และโดยธรรมชาติของ invertase SUC2 ช่วยปรับปรุงการย่อยสลายอินนูลินและการหมักเอทานอลด้วยยิสต์ *S. cerevisiae* ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น

Boonsawang *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทาอลจากเส้นใยปาล์ม (Palm pressed fiber: PPF) โดย Prehydrolysis ก่อน Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยเส้นใยปาล์ม (PPF) ถูกทำให้แห้งด้วยแสงแดดเป็นเวลา 2 วัน ปรับสภาพด้วย 2.5 กิโลโมลต่อลูกบาศก์เมตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าแล้วล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาดและไม่มีสี อบแห้งที่ 60-70 องศาเซลเซียส และบดด้วยเครื่องบด จากนั้นทำการ Prehydrolysis สำหรับ PPF ที่มีความเข้มข้น 100 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 6.0 FPU ต่อกรัม PPF และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) 3.0 U ต่อกรัม PPF ที่ pH 5.0 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดของเอทานอลและผลผลิตที่ได้เป็น 10.4 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร และ 192 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรของเซลลูโลส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการหมักแบบ SSF ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* และที่ 6 ชั่วโมงของ Prehydorlysis ตามลำดับ

Hong และ Yoon (2011) ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอลจากของเสียจากอาหารเพื่อให้เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์และยีสต์ โดยของเสียจากอาหารส่วนใหญ่ประกอบด้วย ข้าวสุก ผลิตภัณฑ์แป้งสาลี ผัก ปลา และเนื้อสัตว์ จะถูกบดให้มีขนาดเล็กโดยใช้ liquidizer จากนั้นเก็บไว้ช่องแช่แข็งโดยให้มีความชื้นประมาณ 800 กรัมต่อกิโลกรัมโดยน้ำหนัก หลังจากนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผสมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส, อะไมโลกลูโคสิเดส (Amyloglucosidase) และโปรติเอส (Protease) การทำงานของเอนไซม์ 240 AGU ต่อมิลลิลิตร ยีสต์ที่ใช้คือ *S. cerevisiae* (KCCM No 50549) และ *Z. mobilis* (ATCC10988) การย่อยพื้นที่ผิวของกากอาหารถูกทำให้เจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นระหว่าง 65 และ 150 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ที่มาตรฐานแห้ง จากนั้นเพิ่มเอนไซม์ลงไปในส่วนผสม (0.5 มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมกากอาหาร) จากนั้นนำไปเขย่าใน oil bath ที่ 45-50 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นประมาณ 4.5-6.0 ตัวอย่างของกากอาหารถูกเตรียมในการทดลอง SSF นำสารละลายนึ่งในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทำการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* (KCCM No. 50549) และยีสต์ *Z. mobilis* (ATCC10988) ลงไป จากนั้นเติมเอนไซม์ที่ได้จากกันผสมกันของแอลฟา-อะไมเลส, อะไมโลกลูโคสิเดส และโปรติเอส การทดลองทั้งหมดดำเนินการใน ขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ซึ่งเขย่าไปด้วย 200 มิลลิลิตรของปริมาณการทำงานที่อุณหภูมิ 33.5 องศาเซลเซียส อัตรากวน 2.5 เฮิร์ต pH เริ่มต้นเป็น 5.0-6.0 หมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งผลการทดลองสรุปได้ว่า กากอาหารสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้

ผ่องศรี และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษาการใช้ครูดเอนไซม์ผงสำหรับการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรด โดยมีจุดประสงค์ คือ เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวที่มีต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยครูดเอนไซม์ผงสองชนิด คือครูดเอนไซม์ผงจากเชื้อ *T. reesei* และเชื้อผสมระหว่าง *T. reesei* และ *S. cerevisiae* การหมักเอทานอลโดยใช้เปลือกสับปะรดคงที่เท่ากับร้อยละ 8 โดยน้ำหนักแห้ง ในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ pH 5 และอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าด้วยอัตรา 120 รอบต่อนาที แปรผันอัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเหลวเท่ากับ 1 : 0.25 และ 1 : 0.50 และเพื่อเปรียบเทียบเอทานอลที่ได้ระหว่างการหมักเปลือกสับปะรดด้วยครูดเอนไซม์ผงกับการหมักแบบรวมปฏิกิริยาด้วย 10% v ของหัวเชื้อผสมที่อัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 1 : 0.50 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 42 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาการหมัก 4 วัน สำหรับการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาที่อัตราส่วนครูดเอนไซม์ผงต่อน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 1 : 0.5 พร้อมกับ 10%v หัวเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่า เอทานอลที่ได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 47 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาหมักนาน 4 วัน

ลักขณา และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน พร้อมศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีการฆ่าเชื้อเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เมื่อเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 และ *S. cerevisiae* TISTR5048 ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอ็กแทร็กซ์มอลท์เอ็กแทร็กซ์ (YM) และในน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) 15 องศาบริกซ์ พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของยีสต์สองสายพันธุ์ในอาหารทั้ง 2 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกัน เมื่อหมักเอทานอลจากน้ำคั้นปลอดเชื้อที่มีปริมาณ TSS 15, 18 และ 24 องศาบริกซ์ (คิดเป็นน้ำตาลทั้งหมด 130, 162 และ 225 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ หมักในฟลาสก์ป้องกันอากาศเข้าขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ใช้ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ SC90 มีอัตราการใช้น้ำตาล และอัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์ TISTR5048 ในทุกสภาวะการทดลอง ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์ SC90 วิธีการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำคั้น 3 วิธี คือ (1) ใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส 40 นาที (2) ไม่ฆ่าเชื้อ และ (3) เติมเพนนิซิลิน 0.05 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าน้ำคั้นที่ฆ่าเชื้อโดยวิธีที่ (1) ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดในแง่ของความเข้มข้น (P, 60.87 ± 4.58 กรัมต่อลิตร) อัตราผลผลิต (*Qp*, 1.27 ± 0.10 กรัมต่อลิตรชั่วโมง) และผลได้เอทานอล (*Yp/s*, 0.49 ± 0.00) ในขณะที่เมื่อใช้น้ำคั้นที่เตรียมอีก 2 วิธี ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลลดลง 14 ถึง 17 % เมื่อเทียบกับวิธีที่ (1) เมื่อขยายขนาดการหมักเอ

ทานอลจากน้ำคั้นปลอดเชื้อในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่า *P*, *Qp* และ *Yp/s* มีค่าใกล้เคียงกับเมื่อหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร

วนิดา และคณะ(2553) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการ SSF จากไม้ยูคาลิปตัส การปรับสภาพมีด้วยกัน 3 ขั้นตอน คือ 1) การระเบิดด้วยไอน้ำ(Steam explosion) 2) การสกัดด้วยน้ำ (Water extraction) 3) การสกัดด้วยด่าง (Alkaline extraction) จากนั้นทำการหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในการหมัก จากการศึกษาปริมาณเยื่อ (5, 7.5 และ 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และอุณหภูมิ (30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส) พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ Celluclast 1.5L และ Novozym 188 ในการหมักแบบ SSF เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด พบว่าปริมาณเยื่อ 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสม มีปริมาณเอทานอล 28.47 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเอทานอลเท่ากับ 79.01% เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเยื่อและอุณหภูมิส่งผลให้มีปริมาณเอทานอลสูงขึ้น

Gaspar *et al.* (2007) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเส้นใยข้าวโพด (Corn fiber) เริ่มจากทำการย่อย 10% โดยน้ำหนักเส้นใยข้าวโพด ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรของเอนไซม์ต่อกรัมของเส้นใยข้าวโพด ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 4.8 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ปริมาณเท่ากับข้างต้นอีกครั้ง และทำการกวน ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองแบบใช้ความดันด้วยไนลอน ขนาด 100 ไมโครเมตร และล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง สำหรับตะกอนของแข็งที่ได้ (Destarched Corn Fiber, DCF) นำไปละลายด้วยสารละลายอัลคาไลน์ภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยนำไปต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้ความดัน 2 บาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จะได้สารที่มีความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนัก และสามารถแยกสารออกเป็นของเหลว (Hemicelluloses) และของแข็งคือ DCF ด้วยการหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) จากนั้นย่อยของแข็ง DCF ด้วยเอนไซม์ และหมักด้วย *S. cerevisiae* โดยทำการเจือจางจนได้ 5% โดยน้ำหนักแห้ง DCF และเติมสารอาหารยีสต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH 4.8 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้โดยใช้สารละลายที่ 1% และ 2% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จะทำให้ได้เอทานอลความเข้มข้น 12.5 และ 11.6 ตามลำดับ ซึ่งเท่ากับ 96.9% และ 89.9% ของผลทางทฤษฎี และพบว่าเมื่อใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จะลดลง เนื่องจากเกิดกรดแลกติกซึ่งไม่เกิดในช่วงแรกๆ

ชลดาและคณะ (2547) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและการหมักน้ำตาลด้วยยีสต์ พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนสก่อนจะทำให้การย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลเพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลส (15 NCU) และเพคติเนส (122.5 PG) ต่อกากมันสำปะหลังแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 4.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (8.36 LU) ต่อกากมันสำปะหลังแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (0.23 GAU) ต่อกากมันสำปะหลังแห้ง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 4.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าสามารถย่อยได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 122.4 กรัมต่อลิตร จากการย่อยกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 144 กรัมต่อลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต เอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้น 89.2 กรัมที่ได้จากการหมักมันสำปะหลังด้วยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 ที่ค่า pH 4.5 และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.03 %โดยน้ำหนัก สามารถผลิตเอทานอลได้ 36.2 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 91 %ของทฤษฎี

Sharmar *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาการนำก้านดอกทานตะวันมาสับและตากแห้ง (70 องศาเซลเซียสน้ำหนักคงที่) และบดขนาด 40 ตาข่าย หลังถูกปรับสภาพโดยไอน้ำระเบิดที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงตามด้วยลดความดันทันทีและกรอง หลังจากนั้นล้างซ้ำด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปอบแห้ง (60 องศาเซลเซียสน้ำหนักคงที่) จากนั้นทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ชนิด *T. reesei* Rut-C30 25 FPU ต่อกรัม โดยความเข้มข้นของสารตั้งต้น เท่ากับ 5% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นระเหยสารละลายให้มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลรีดิวซ์ ใน water bath จากนั้นนำไปหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae var. ellipsoideus.* ขนาดหัวเชื้อ 3% (โดยปริมาตร) ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง pH 5.0 เอทานอลที่ได้เท่ากับ 11.39 กรัมเอทานอลต่อกรัมก้านดอกทานตะวัน

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

เปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแล จากร้านสับปะรดภูแล หลังโลตัส สาขาหน้ามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

3.1.2 เอนไซม์และจุลินทรีย์

3.1.2.1 เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส(α-Amylase from *Aspergillusoryzae*) ผลิตโดย Sigma-Aldrich

3.1.2.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Amyloglucosidase from *Aspergillusniger*) ผลิตโดย Sigma-Aldrich

3.1.2.3 ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) ชนิดยีสต์แห้งสำเร็จรูป ตรา เฟอร์มิพันบราวน์ บริษัท เบอร์ลี่ ยุคเกอร์ สเปเชียลตี้ส์ จำกัด กรุงเทพฯ โดยเก็บรักษายีสต์ขนมปังที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3.1.3 สารเคมีเพื่อการวิเคราะห์

3.1.3.1 ฟีนอล (Phenol) Laboratory Grade ผลิตโดย PanreacSintesis

3.1.3.2 3,5-Dinitrosalicylic acid Laboratory Grade ผลิตโดย Sigma

3.1.3.3 โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassiumtartrate) Laboratory

3.1.3.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) Laboratory Grade ผลิตโดย Merck

3.1.3.5 โซเดียมซัลไฟท์ (Sodium sulfite) Laboratory Grade ผลิตโดย Merck Grade ผลิตโดย Merck

3.1.3.6 กลูโคส (Laboratory Grade) ผลิตโดย Ajax Finechem

3.1.3.7 เอทานอล (Commercial Grade) ความบริสุทธิ์ 99.9 เปอร์เซ็นต์ ผลิตโดย Sigma-Aldrich

3.1.3.8 สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใช้สำหรับชั่งตัวอย่างและสารเคมี

3.2.1.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.2.1.3 เครื่องปั่น (Blender): Moulinex รุ่น MoulinetteS

3.2.1.4 เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge)

3.2.1.5 อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Oil Bath with Shaker): Memmert รุ่น WNB 45

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.2.2.1 UV-Visible Spectrophotometer (UV) เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด แสดงดังภาพประกอบที่ 3-1

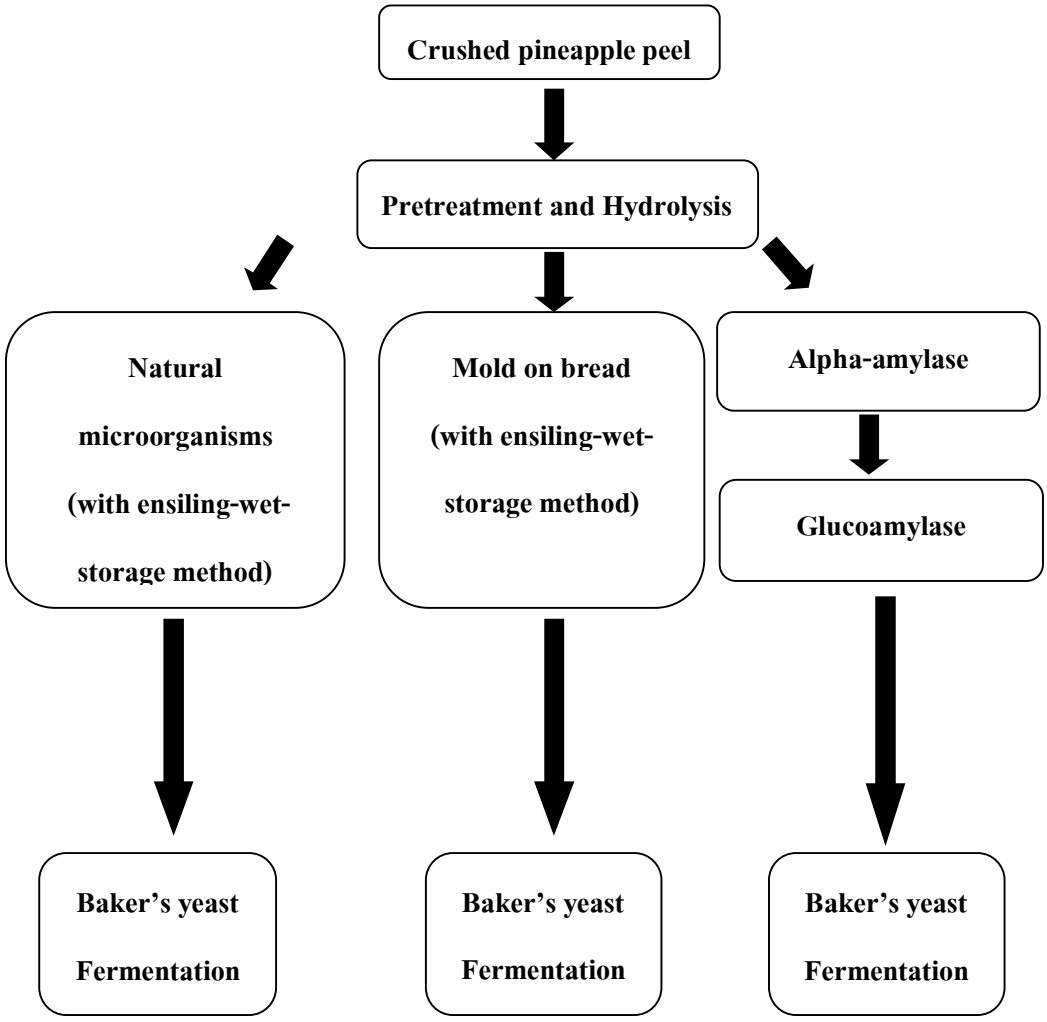
ภาพประกอบที่ 3-1 เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer รุ่นHP 8453

3.2.2.2 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC) รุ่นHP 6890 flame ionization detector เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาค่าความเข้นข้นของเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยใช้เทคนิคการแยกสารที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวออกจากกัน โดยสารตัวอย่างที่มีเอทานอลจะถูกฉีดเข้าสู่ระบบ ต่อจากนั้นจะระเหยกลายเป็นไอ สุดท้ายจะถูกพาด้วยก๊าซเฉื่อยซึ่งเป็น mobile phase ไปยังคอลัมน์ซึ่งเป็น stationary phase เพื่อทำการแยกสารออกจากกัน สารที่แยกได้จะถูกบันทึก เพื่อทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่อไป แสดงดังภาพประกอบที่ 3-2

ภาพประกอบที่ 3-2 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, GC) รุ่นHP 6890

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 แนวทางการผลิต แสดงขั้นตอนการผลิตโดยสังเขปดังภาพประกอบที่ 3-3



ภาพประกอบที่ 3-3 แผนภาพแสดงแนวทางและขั้นตอนการผลิตเอทานอล

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาองค์ประกอบของเปลือกสับปะรด

นำเปลือกสับปะรดบดให้ละเอียดจนมีขนาดไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องบด Moulinex รุ่น MoulinetteS แสดงดังภาพประกอบที่ 3-4 นำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณความชื้น ปริมาณเส้นใย ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดในเปลือกสับปะรด โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์พัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร เพื่อการส่งออก (ADCET) คณะอุตสาหกรรมเกษตร และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ภาพประกอบที่ 3-4 ภาพเปลือกสับปะรดหลังบด

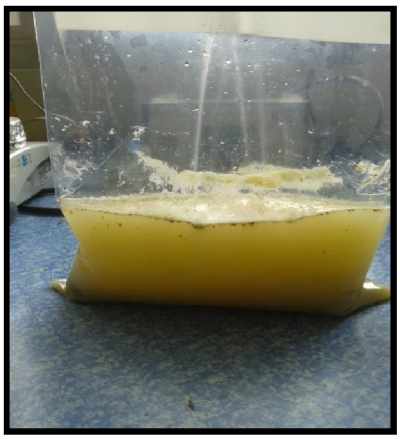
3.4.2 การปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่เกิดขึ้นเองบนเปลือกสับปะรด (with ensiling-wet-storage method) (ภาพประกอบที่ 3-5)

นำเปลือกสับปะรดมาหั่นและบดให้มีขนาด 3 มิลลิเมตร ใส่ในถุงซิป รีดอากาศออกแล้วปิดปากถุง เก็บถุงไว้ในถังปิดฝา และวางถังไว้ใต้อ่างน้ำ ในที่มืดและชื้นเพื่อเร่งการเกิดรา ภายใต้อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ยทุกฤดูกาลของจังหวัดสงขลาอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 26-32 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่ราและยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี) ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 84-92 (เป็นความชื้นที่ได้เคยศึกษาวัดตลอดทั้งปี ณ สถานที่ทำการทดลอง ภาควิชาวิศวกรรมเคมี) ระยะเวลาที่ปล่อยให้เกิดราและเกิดการย่อยทางชีวภาพ 1-14 วัน นำผลผลิตที่ได้ในแต่ละวันไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หรือน้ำตาลกลูโคส (Reducing Sugar) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยเครื่อง UV

ภาพประกอบที่ 3-5 การปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองบนเปลือกสับปะรด

3.4.3 การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์บนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว 1-7 วัน (ภาพประกอบที่ 3-6 และภาพประกอบที่ 3-7)

นำเปลือกสับปะรดและขนมปังหมดอายุ (หมดอายุแล้วไม่เกิน 1 สัปดาห์) มาหั่นและบดรวมกัน ใส่ในซิป รีดอากาศออกแล้วปิดปากถุง เก็บถุงไว้ในถังปิดฝา และวางถังไว้ใต้อ่างน้ำในที่มืดและชื้น เพื่อเร่งการเกิดรา ภายใต้อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ยทุกฤดูกาลของจังหวัดสงขลาอยู่ในช่วง 26-32 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 84-92 ภายใต้สภาวะเดียวกันกับหัวข้อ 3.4.2 ปัจจัยสำคัญที่ทำการศึกษา คือ อายุของขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว 1-7 วัน ปริมาณขนมปังต่อเปลือกสับปะรดที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1 ต่อ 3 ถึง 1 ต่อ 9 และระยะเวลาในการย่อย 1-14 วัน แล้วนำผลผลิตที่ได้ในแต่ละวันไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หรือน้ำตาลกลูโคส (Reducing Sugar) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยเครื่อง UV



ภาพประกอบที่ 3-6 การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองบนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนที่เลยวันหมดอายุขนมปังหมดอายุ 1-7 วัน

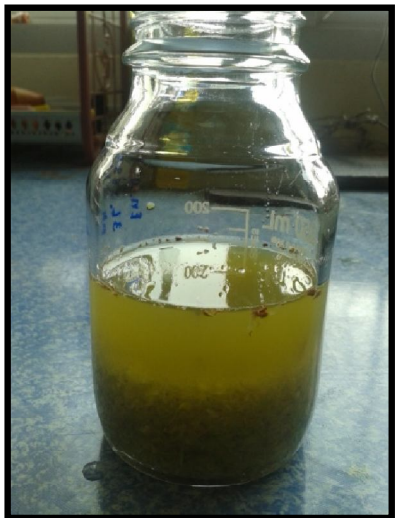
ภาพประกอบที่ 3-7 ลักษณะขนมปังที่เลยวันหมดอายุ

3.4.4 การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์

มี 2 ขั้นตอนด้วยกันคือ

3.4.4.1 การปรับสภาพและย่อยเบื้องต้นขององค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบให้มีโมเลกุลเล็กลง (Liquefaction) โดยใช้แอลฟา-อะไมเลส (ภาพประกอบที่ 3-8)

นำเปลือกสับปะรดมาหั่นและบดให้มีขนาด 3 มิลลิเมตร เติมน้ำ ใส่ในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปัจจัยที่ศึกษาในขั้นตอนนี้คือ การเตรียมวัตถุดิบ 100-160 กรัมต่อลิตร (เปลือกสับปะรดต่อน้ำสะอาด) อุณหภูมิ 70-100 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ 100-240 U ต่อกรัม (U คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดผลผลิต 1 ไมโครโมล/นาที ภายใต้อุณหภูมิ และพีเอช ค่าหนึ่ง) เปลือกสับปะรด ระยะเวลา 1-4 ชั่วโมง ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) เป็น 5.5-7.0



ภาพประกอบที่ 3-8 การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

3.4.4.2 การย่อยให้เป็นน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ภาพประกอบที่ 3-9)

นำผลผลิตหลังการปรับสภาพด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากหัวข้อ 3.4.4.1 ทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ปัจจัยที่ศึกษาในขั้นตอนนี้ คือ อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ 40-120 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และเวลาในการย่อย 4-8 ชั่วโมง ที่พีเอชเป็น 3.5-5.5 แล้วผลผลิตที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณรีดิวซ์หรือน้ำตาลกลูโคส (Reducing sugar) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วยเครื่อง UV

ภาพประกอบที่ 3-9 การปรับสภาพและการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3.4.5 การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง โดยใช้ผลผลิตจากการปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีต่างๆ

นำผลผลิตหลังการย่อยด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.4.2-3.4.4 มาหมักในขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร (Air-locked) ดังภาพประกอบที่ 3-10 โดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เติมยีสต์ และเติมก๊าซไนโตรเจน (Anaerobic process) เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากขวดหมักก่อนปิดฝา Air-locked เพื่อป้องกันอากาศเข้า แต่อนุญาตให้ก๊าซที่เกิดจากการหมักออกได้

ปัจจัยสำคัญที่ศึกษา คือ ระยะเวลาในการหมัก 2-8 วัน ร้อยละโดยน้ำหนักของยีสต์ต่อเปลือกสับปะรดบด 2-8 ค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 4.5-6.5 ภายใต้อุณหภูมิห้อง 30-40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปกรองแยกเอาผลผลิตส่วนของเหลว กรองซ้ำด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อนำผลผลิตของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง UV และปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC

ภาพประกอบที่ 3-10 การหมักเปลือกสับปะรดโดยใช้ยีสต์ขนมปัง

3.4.6 การขยายขนาดการหมัก

นำสภาวะที่เหมาะสมของการหมักในหัวข้อที่ 3.4.5 มาขยายขนาดในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร แสดงดังภาพประกอบที่ 3-11

ภาพประกอบที่ 3-11 แสดงเครื่องหมักเอทานอลขนาด 5 ลิตร

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบในเปลือกสับปะรด

จากการศึกษาองค์ประกอบของวัตถุดิบเปลือกสับปะรด ด้วยวิธี AOAC ผลได้แสดงดังตารางที่ 4-1 พบว่า เปลือกสับปะรดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total Carbohydrate) ปริมาณมากที่สุด หากศึกษาในฐานแห้ง และเมื่อรวมปริมาณเส้นใยจะมีปริมาณร้อยละ 84.51 ซึ่งบ่งบอกถึงความน่าสนใจในการนำเปลือกสับปะรดมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 4-1 แสดงองค์ประกอบของเปลือกสับปะรด

องค์ประกอบ	**วิธีทดสอบ**	**ผลการทดสอบ** (ร้อยละโดยมวล)
โปรตีน	AOAC (Kjeldahl Method)	1.42
ไขมัน	AOAC (Soxhlet extraction Method)	0.08
ปริมาณความชื้น	AOAC (Loss on Drying at 95-100 ^{o}C)	84.89
เถ้า	AOAC	0.84
เส้นใย	Fiber analyzer (ANKOM200)	10.20
แป้ง (Total Carbohydrate)	Calculation	12.77
Energy	Calculation	57.48 kcal
น้ำตาลรีดิวซ์	AOAC (Lane&Eynon)	2.71
น้ำตาลทั้งหมด	AOAC (Lane&Eynon)	0.82

ที่มา: ศูนย์พัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร เพื่อการส่งออก (ADCET) คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4.2 ปริมาณน้ำตาลในเปลือกสับปะรด

ตารางที่ 4-2 แสดงชนิดของน้ำตาลและปริมาณน้ำตาลในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีต่างๆ

ลำดับที่	ตัวอย่างผลผลิต	ชนิดน้ำตาลและปริมาณสาร (% w/v) ±SD			
		ฟรุคโตส	กลูโคส	ซูโคลส	รวม
1	ปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด	0.34 ±0.02	0.41±0.03	0.53±0.01	1.28±0.03
2	ปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์บนขนมปังเลยวันหมดอายุแล้ว 5 วัน	0.22±0.01	0.45±0.03	3.86±0.02	4.53±0.03
3	ปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้เอนไซม์	0.57±0.03	0.84±0.03	0.51±0.01	1.92±0.03

ที่มา: ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จากตารางที่ 4-2 สรุปได้ว่า การปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์จะให้ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (ฟรุคโตสและกลูโคส)มากที่สุด เนื่องจากเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลให้เกิดมากกว่าวิธีอื่น และรองลงมาคือการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด และการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว แต่เมื่อคิดผลรวมของน้ำตาลทั้งหมด โมโนและได-แซคคาไรด์ คือ ทั้งฟรุคโตส กลูโคส และซูโคลส ที่ซึ่งยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae.* สามารถหมักเป็นเอทานอลได้ พบว่า การปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีการใช้จุลินทรีย์บนขนมปังเลยวันหมดอายุ สามารถให้น้ำตาลมากที่สุด ซึ่งแนวคิดการศึกษาวิธีนี้เกิดจากปัญหาการมีขนมปังเหลือทิ้งจากร้านค้าเบเกอรี่และโรงงานผลิตขนมปัง ซึ่งแทนที่จะทิ้งก็

สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ และผลการวิเคราะห์ของน้ำตาลนี้จึงเป็นสิ่งสนับสนุนความคุ้มค่าของวิธีการผลิตซึ่งมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการใช้เอนไซม์

4.3 การปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด

จากการทดลองด้วยการออกแบบโดยใช้ โปรแกรม RSM ที่มีตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร คือ ระยะเวลาในการย่อย (A, วัน) และปริมาณเปลือกสับปะรด (B, กรัมต่อลิตร) ตัวแปรตามคือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (X_1, กรัมต่อลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 สภาวะการทดลองและผลการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด

ลำดับที่	ปริมาณเปลือกสับปะรด (กรัมต่อลิตร)	เวลา (วัน)	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	
			น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลทั้งหมด
1	109	3	0.48	45.31
2	130	8	0.59	86.59
3	130	8	0.59	135.43
4	109	12	0.53	80.05
5	130	8	0.58	96.62
6	160	8	0.54	84.03
7	151	3	0.59	60.90
8	130	14	0.51	104.50
9	151	12	0.44	71.03
10	130	1	0.52	88.55
11	100	8	0.46	94.45

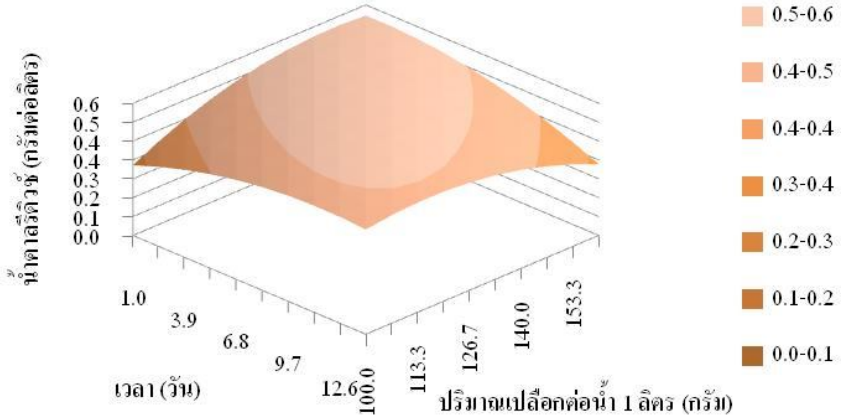
เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ตามหลัก Analysis of variance (ANOVA) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์เชิงสถิติในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แล้วนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยใช้โปรแกรม Essential regression สามารถนำมาอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆดังสมการที่ (4.1)

$$X_1 = -1.669 + 0.087A + 0.0291B - 0.00156A^2 - 0.0000945B^2 - 0.0005AB \quad (4.1)$$

ความสอดคล้องของค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองและค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทำนาย จะได้ R^2=0.920 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองจริง (R^2 adjusted = 0.838) จากข้อมูลแบบจำลองที่ได้สามารถแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆต่อผลผลิตปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปของกราฟพื้นผิว ได้ดังภาพประกอบที่ 4-1

4. 3.1 ผลของปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด

(1) ผลของเวลาและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-1 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ธรรมชาติ ภายใต้อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 84-92

ผลการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ (อัตราส่วนเปลือกสับปะรดต่อน้ำ 1 ลิตร และเวลา) ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในผลผลิตหลังการย่อยแสดง ดังภาพประกอบที่ 4-1 พบว่าผลผลิตหลังการย่อยมีน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณมากขึ้นเมื่อใช้เปลือกสับปะรดในช่วงไม่เกิน 160 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และระยะเวลาในช่วง 1 – 7 วัน และมีผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณที่เหมาะสม เมื่อใช้เปลือกสับปะรดในช่วง 130 – 150 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร และระยะเวลาในช่วง 3 – 6 วัน

จากผลการทำนายสภาวะการย่อยที่เหมาะสมโดย RSM เพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด คือ การย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 141 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ภายใต้อุณหภูมิห้อง ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 84 – 92 เป็นเวลา 5 วัน ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 0.59 กรัมต่อลิตร ซึ่งภายใต้สภาวะนี้ผลการ

ทดลองจริงได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 0.58 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทั้งหมด 135.43 กรัมต่อลิตร โดยผลที่ได้จากการทดลองจริงมีค่าใกล้เคียงกับผลของการทำนาย จึงสรุปได้ว่าสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสม

จากกราฟพื้นผิวแสดงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ พบว่า ปัจจัยที่มีผลมากที่สุด คือ ปริมาณเปลือกสับปะรด รองลงมาคือ ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย โดยจากกราฟพื้นผิว พบว่า การมีปริมาณเปลือกสับปะรดที่มากขึ้น ไม่ได้ช่วยให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้ยังขึ้นกับการทำงานของจุลินทรีย์ที่อยู่บนเปลือกสับปะรดด้วยว่าจะทำงานได้ดีมากน้อยเพียงใด

4.4 การปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์บนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุ (1-7 วัน)

จากการออกแบบโดยใช้ โปรแกรม RSM ที่มีตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร คือ ระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปัง (A, วัน) อัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังต่อเปลือกสับปะรด (B, กรัมต่อกรัม) ปริมาณวัตถุดิบผสม (C, กรัมต่อลิตร) และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (D, วัน) ตัวแปรตาม คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (X_2, กรัมต่อลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 สภาวะการทดลองและผลการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์บนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุ 1-7 วัน

ลำดับที่	ระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปัง (วัน)	อัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังต่อเปลือกสับปะรด (กรัมต่อกรัม)	ปริมาณวัตถุดิบผสม (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (วัน)	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	
					น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลทั้งหมด
1	1	1:6.00	130	8	0.79	300.51
2	6	1:4.50	145	4	1.51	137.59
3	4	1:6.00	160	8	1.10	126.12
4	4	1:6.00	130	8	1.23	155.63
5	4	1:6.00	130	8	1.23	150.27
6	6	1:7.50	115	11	1.10	194.26
7	3	1:7.50	145	11	1.04	185.88
8	4	1:6.00	100	8	0.87	161.75
9	6	1:4.50	145	11	1.11	172.81
10	4	1:9.00	130	8	1.18	164.57
11	3	1:4.50	145	4	1.39	207.78
12	3	1:7.50	145	4	1.16	262.40
13	3	1:4.50	115	11	1.09	176.01
14	6	1:4.50	115	4	1.16	112.49
15	3	1:7.50	115	4	1.05	120.59
16	6	1:7.50	145	4	1.37	136.91
17	4	1:3.00	130	8	1.34	297.21
18	3	1:4.50	115	4	1.18	183.30
19	4	1:6.00	130	8	1.28	165.49
20	6	1:4.50	115	11	1.07	168.31
21	7	1:6.00	130	8	1.12	213.63
22	3	1:4.50	145	11	1.07	211.80
23	3	1:7.50	115	11	1.10	241.80
24	4	1:6.00	130	14	1.51	238.77
25	6	1:7.50	115	4	1.16	128.46
26	6	1:7.50	145	11	1.08	138.65
27	4	1:6.00	130	1	1.83	389.34

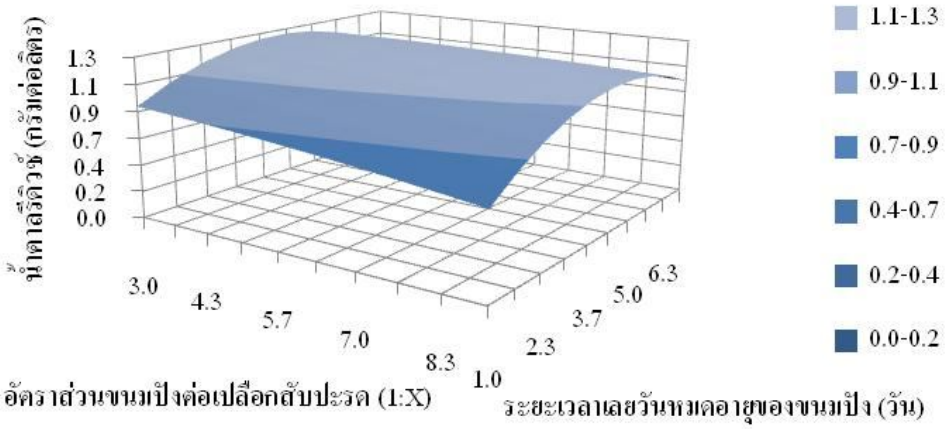
นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ตามหลัก ANOVA ซึ่งสามารถให้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ นำมาอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆดังสมการที่ (4.2)

$$X_2 = -5.979 + 0.193A + 0.06881B + 0.101C - 0.02136D - 0.03626A^2 - 0.0026B^2 - 0.0003C^2 + 0.0092D^2 + 0.0068AB + 0.00095AC - 0.00478AD - 0.00102BC + 0.00594BD - 0.00122CD \quad (4.2)$$

ความสอดคล้องของผลค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองและค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทำนายมี R^2=0.969 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองจริง (R^2 adjusted = 0.934)

4.4.1 ผลของปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์บนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุ 1-7 วัน

(1) ผลของอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรดและระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

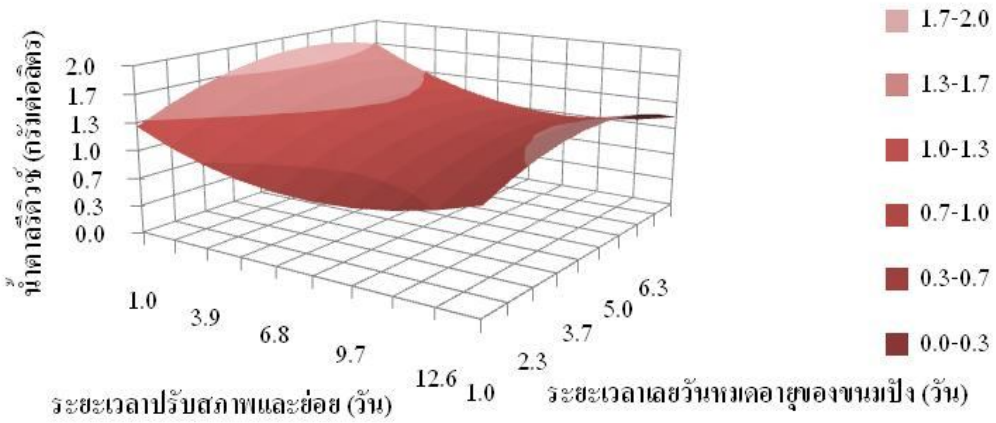


ภาพประกอบที่ 4-2 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรดและระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณวัตถุดิบผสม 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 8 วัน

ผลของอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-2 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ขนมปังที่มีระยะเวลาเลยวันหมดอายุไปแล้วอยู่ในช่วง 3-6 วัน แต่อัตราส่วน

ขนมปังต่อเปลือกสับปะรดส่งผลน้อยมากต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพราะการที่จะผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ต้องขึ้นกับการทำงานของจุลินทรีย์บนเปลือกสับปะรด และจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุด้วย

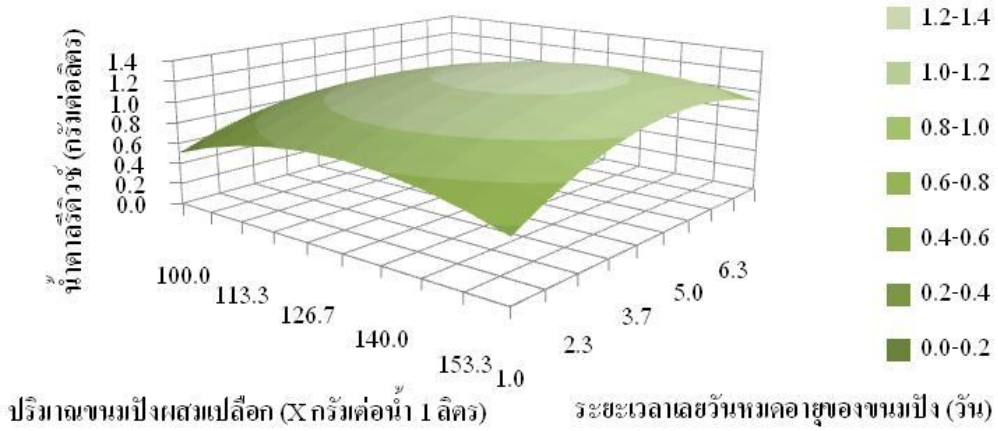
(2) ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-3 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังหมดอายุต่อเปลือกสับปะรดเป็น 1:6 และปริมาณวัตถุดิบผสม 130 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร

ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-3 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยเพียง 1 วัน และควรใช้ระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปัง 3-7 วัน เนื่องจากจุลินทรีย์จากขนมปังที่หมดอายุแล้วมีปริมาณมากพอที่จะสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ภายใน 1 วัน

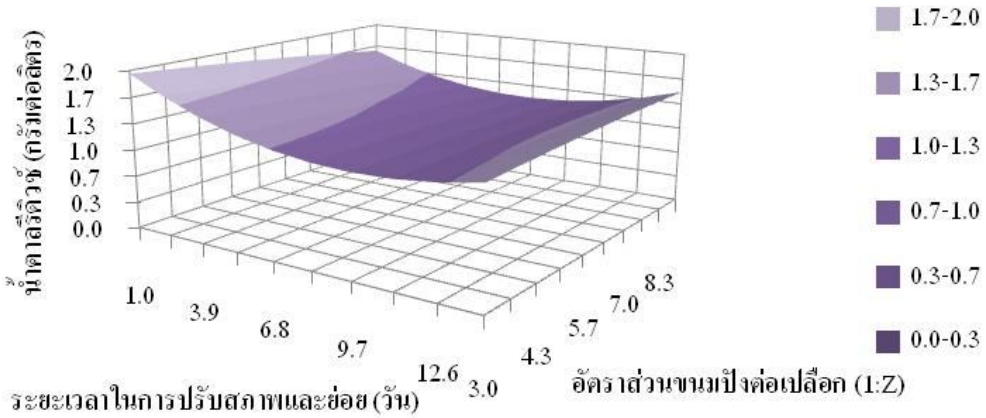
(3) ผลของปริมาณขนมปังผสมเปลือกและระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-4 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวัตถุดิบผสม ต่อ น้ำ 1 ลิตร และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังหมดอายุต่อเปลือกสับปะรดเป็น 1:6 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 8 วัน

ผลของปริมาณขนมปังผสมเปลือก และระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-4 พบว่าปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณขนมปังผสมเปลือกอยู่ในช่วง 120-153 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ซึ่งเมื่อใช้ปริมาณขนมปังผสมเปลือกที่มากกว่า 153 กรัม ต่อ น้ำ 1ลิตร ไม่ได้ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพราะใช้ปริมาณวัตถุดิบผสม 153 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ก็เพียงพอต่อการที่จุลินทรีย์สามารถนำไปย่อยเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ และควรใช้ระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปัง 3-6 วัน

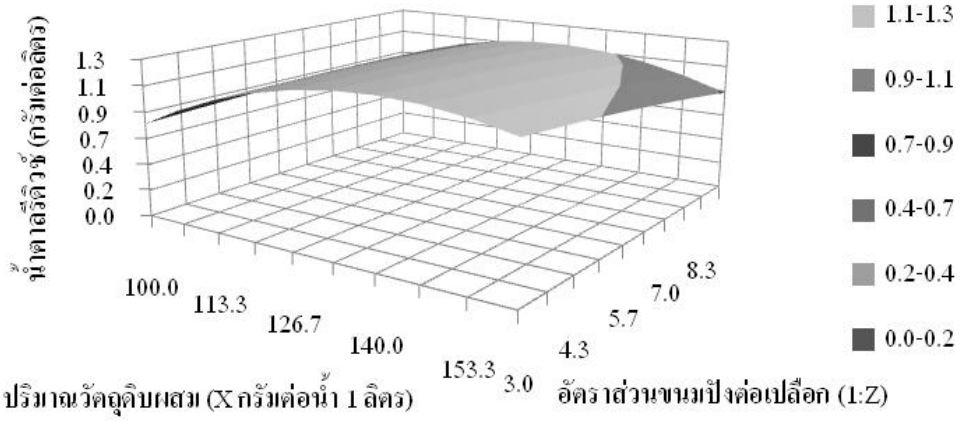
(4) ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-5 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด (1: กรัม) ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังหมดอายุไปแล้ว 4 วัน และปริมาณวัตถุดิบผสม 130 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร

ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปังต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-5 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าที่เหมาะสมเมื่อใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 1-2 วัน และอัตราส่วนขนมปังผสมเปลือกสับปะรดควรใช้ที่อัตราส่วน 1:3 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุ เพราะทั้งในวัตถุดิบเปลือกสับปะรดและขนมปังที่เลยวันหมดอายุเมื่อรวมกันแล้วจะมีปริมาณจุลินทรีย์ในการย่อยคาร์โบไฮเดรต และเซลลูโลส เป็นจำนวนมาก ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปใช้เพื่อผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

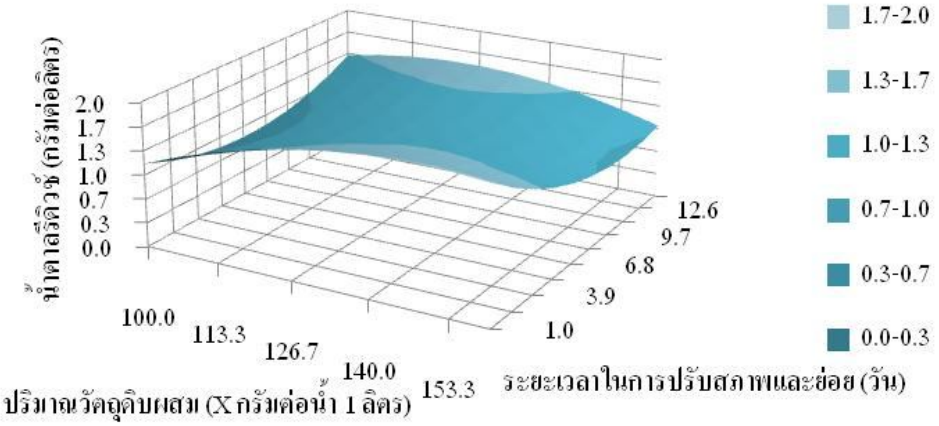
(5) ผลของปริมาณวัตถุดิบผสมและอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-6 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวัตถุดิบผสมต่อน้ำ 1 ลิตร และอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อย โดยใช้ขนมปังหมดอายุไปแล้ว 4 วัน และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 8 วัน

ผลของปริมาณวัตถุดิบผสมและอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรดต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-6 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณวัตถุดิบผสม 114-153.3 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร และอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรดควรอยู่ในช่วง 1:3-1:5

(6) ผลของปริมาณวัตถุดิบผสมและระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-7 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวัตถุดิบผสม และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังหมดอายุไปแล้ว 4 วัน และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังหมดอายุต่อเปลือกสับปะรดเป็น 1:6

ผลของอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรดและระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-7 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณวัตถุดิบผสม 120-160 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยเพียง 1 วัน ซึ่งสอดคล้องกับภาพประกอบที่ 4-5

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว ผลการทำนายสภาวะที่เหมาะสมแบบ CCD คือ ใช้ขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว 5 วัน อัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด 1:3 ปริมาณวัตถุดิบผสม 153 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร และใช้ระยะเวลาในการย่อย 1 วัน ภายใต้อุณหภูมิห้อง ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 84-92 ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการทำนายดังสมการ 4.2 คือ 2.14 กรัมต่อลิตร โดยจากการทดลองจริงจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 2.07 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 389.33 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าผลของการทำนาย แต่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มากกว่า 27 การทดลอง ดังตารางที่ 4-4 จึงถือว่าสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสม

จากแนวโน้มของกราฟพื้นผิวที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ พบว่าปัจจัยที่มีผลมากที่สุด คือ ระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปัง รองลงมา คือ ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย ปริมาณวัตถุดิบผสม และอัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด เพราะบนขนมปังที่

เลยวันหมดอายุ จะมีจุลินทรีย์และราที่ช่วยในขั้นตอนการย่อย ส่งผลทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น

4.5 การปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์

4.5.1 การปรับสภาพและย่อยเบื้องต้นเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

การออกแบบโดยใช้ โปรแกรม RSM ที่มีตัวแปรอิสระ 5 ตัวแปร คือ ปริมาณเปลือกสับปะรด (A, กรัมต่อลิตร) อุณหภูมิ (B, องศาเซลเซียส) ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (C, U ต่อกรัม) ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (D, วัน) และพีเอช (E) ตัวแปรตาม คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (X_3, กรัมต่อลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 สภาวะการทดลองและผลการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ลำดับที่	ปริมาณเปลือกสับปะรด (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (U ต่อกรัม)	ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (นาที)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	
						น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลทั้งหมด
1	115	93	205	105	6.6	9.60	493.05
2	130	85	100	150	6.3	9.61	608.93
3	130	85	170	150	6.3	12.42	653.75
4	115	93	135	195	6.6	8.41	413.76
5	115	78	205	195	6.6	10.63	586.17
6	130	85	170	150	7.0	12.82	559.86
7	145	93	135	195	5.9	20.01	332.48
8	100	85	170	150	6.3	13.22	490.01
9	145	93	135	105	6.6	11.44	308.88
10	130	85	170	60	6.3	17.51	446.82
11	145	78	205	105	6.6	21.02	326.82
12	145	93	205	195	6.6	12.74	449.91
13	115	93	205	195	5.9	13.22	293.45
14	160	85	170	150	6.3	22.03	499.26
15	130	85	170	240	6.3	16.81	416.97
16	130	70	170	150	6.3	19.04	385.00
17	130	100	170	150	6.3	12.13	419.50
18	130	85	240	150	6.3	12.11	418.44
19	145	93	205	105	5.9	15.61	384.99
20	115	78	205	105	5.9	13.44	433.20
21	130	85	170	150	6.3	12.32	388.06
22	115	78	135	195	5.9	14.83	420.41
23	145	78	205	195	5.9	21.91	365.37
24	130	85	170	150	6.3	17.42	289.36
25	145	78	135	105	5.9	19.21	323.52
26	115	78	135	105	6.6	14.13	335.65
27	145	78	135	195	6.6	12.74	395.95
28	130	85	170	150	5.5	15.11	395.59
29	115	93	135	105	5.9	10.52	445.89

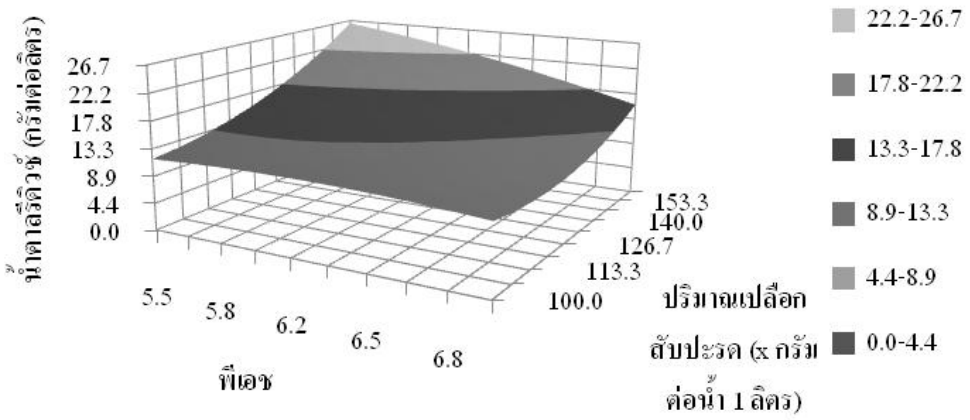
นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ตามหลัก ANOVA สามารถได้แบบจำลองที่นำมาอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆดังสมการที่ (4.3)

$$X_3 = -160.21 + 35.41A + 0.211B + 0.04391C + 0.213D + 48.94E + 3047.1\ A^2 + 0.00308B^2 - 0.000818C^2 + 0.000283D^2 - 1.614E^2 - 2.167AB + 1.060AC + 0.06481AD - 107.78\ AE - 0.00126BC + 0.00276\ BD - 0.140BE - 7.53968E\text{-}05CD + 0.03667CE - 0.08481DE \quad (4.3)$$

ความสอดคล้องของผลการทำนายและการทดลองซึ่งมีค่า $R^2 = 0.929$ ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองจริง (R^2 adjusted = 0.753)

4.5.1.1 ผลของปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

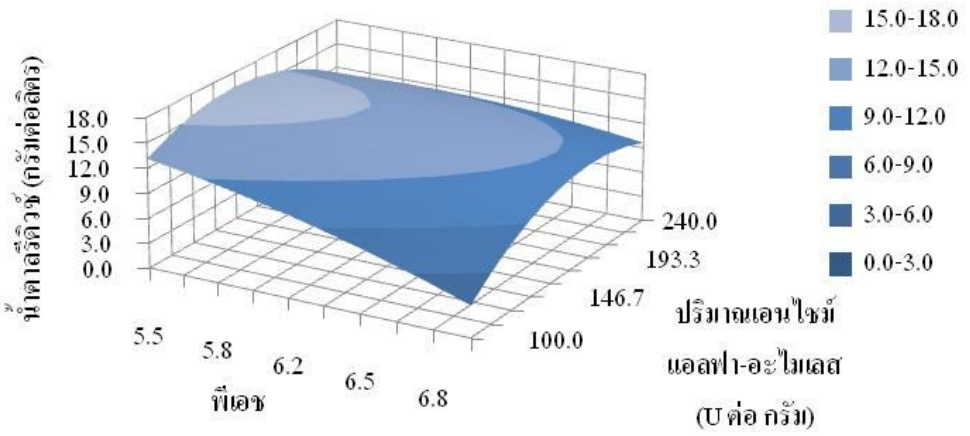
(1) ผลของพีเอชและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-8 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณเปลือกสับปะรด ต่อน้ำ 1 ลิตร ที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยเป็นเวลา 150 นาที

ผลของพีเอชและปริมาณเปลือกสับปะรดต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยเป็นเวลา 150 นาที แสดงดังภาพประกอบที่ 4-8 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วงพีเอช 5.5-6.2 โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรดที่อยู่ในช่วง 153.3-160 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร เพราะหากใช้พีเอชที่น้อยกว่า 5.5 ซึ่งมีความเป็นกรดมากเกินไป อาจทำให้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ทำงานได้ไม่ดี จึงส่งผลให้ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ในปริมาณน้อย

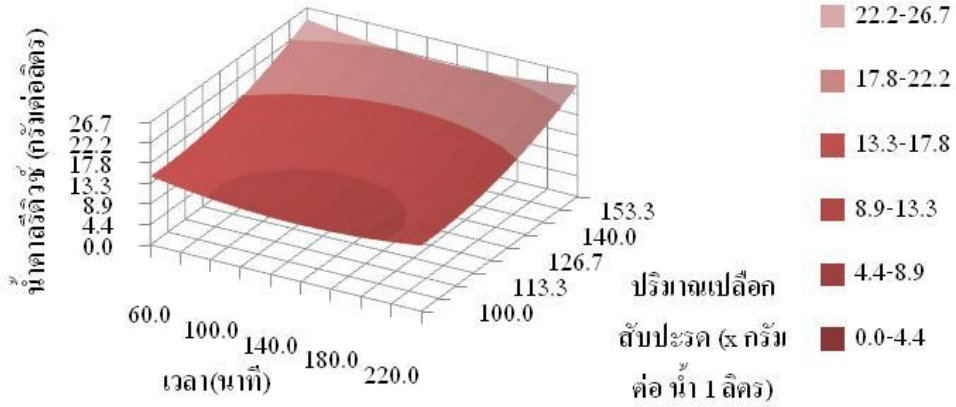
(2) ผลของพีเอชและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-9 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยเป็นเวลา 150 นาที

ผลของพีเอชและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-9 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-6.0 และปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 125- 193.3 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด ซึ่งสอดคล้องกับภาพประกอบที่ 4-8

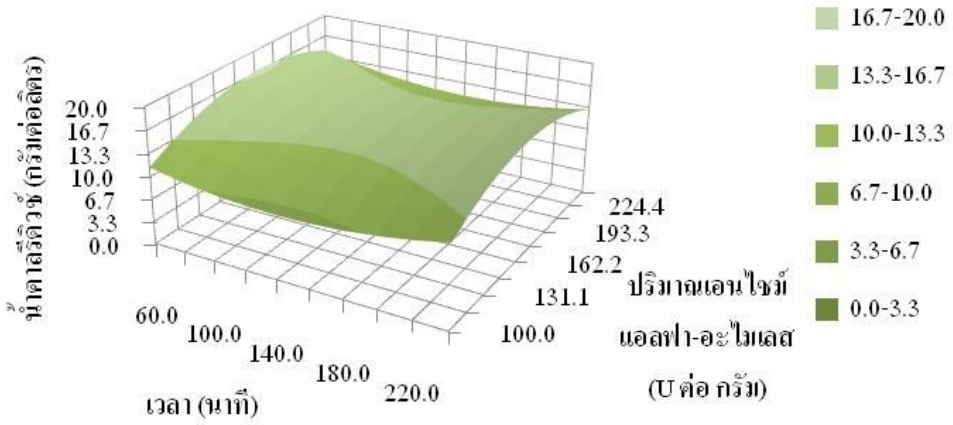
(3) ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-10 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.3

ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-10 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นอยู่ใน 2 ช่วง คือ เมื่อระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 60-100 นาที และ 180-240 นาที โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 153.3-160 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร

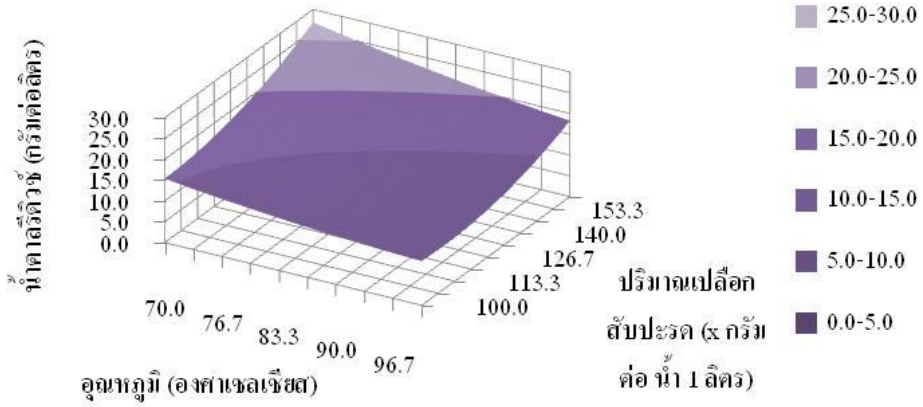
(4) ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-11 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.3

ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-11 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 60-70 นาที และปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 162.2-193.3 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด เพราะหากใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่น้อยจนเกินไป จะทำให้ไม่เพียงพอต่อการย่อยคาร์โบไฮเดรต และเซลลูโลส จึงส่งผลให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณน้อย

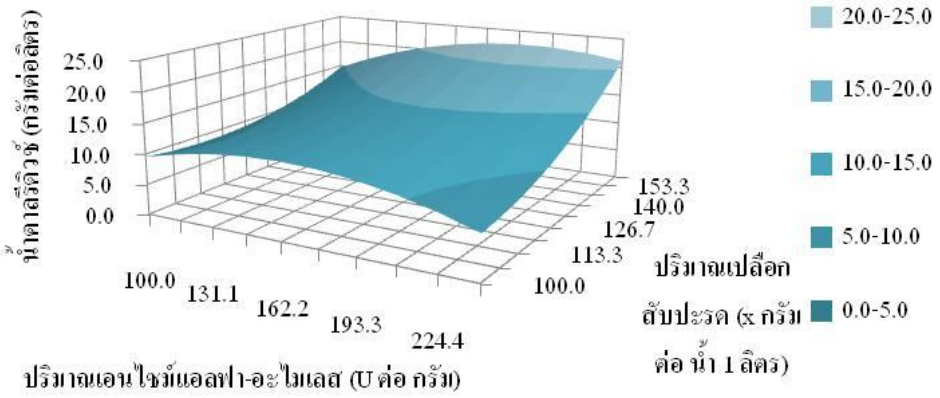
(5) ผลของอุณหภูมิและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-12 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด พีเอช 6.3 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 150 นาที

ผลของอุณหภูมิและปริมาณเปลือกสับปะรดต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-12 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าที่เหมาะสมเมื่อใช้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส และปริมาณเปลือกสับปะรด 153.3-160 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับภาพประกอบที่ 4-10

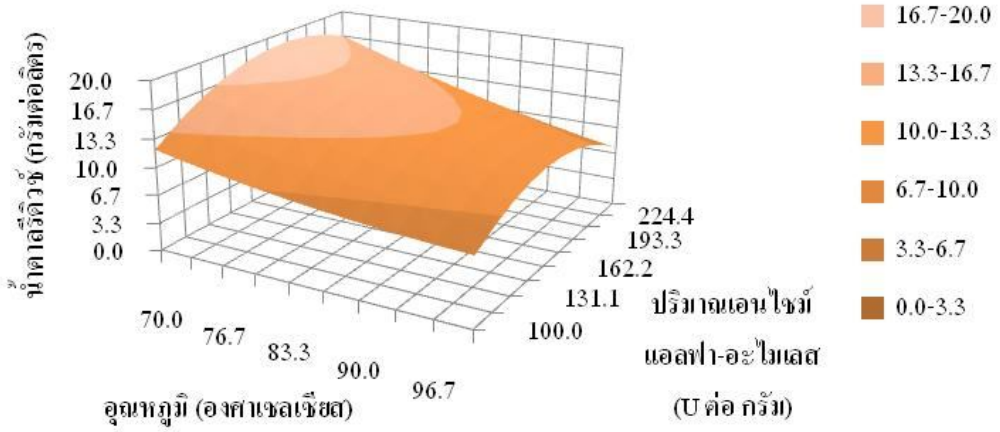
(6) ผลของปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเสและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-13 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและปริมาณเปลือกสับปะรดที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส พีเอช 6.3 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 150 นาที

ผลของปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและปริมาณเปลือกสับปะรดต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-13 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 146.7-240 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และปริมาณเปลือกสับปะรด 153.3-160 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร

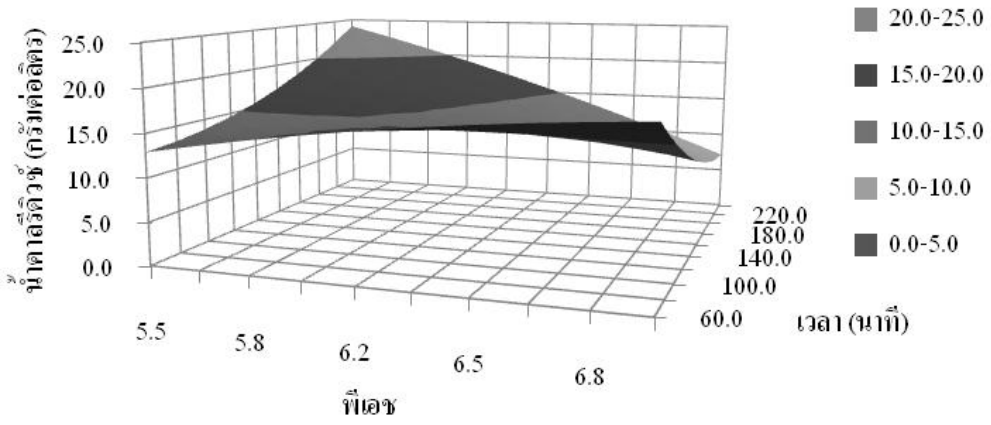
(7) ผลของอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-14 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร พีเอช 6.3 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 150 นาที

ผลของอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-14 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าที่เหมาะสมเมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นก็ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพราะหากใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไป อาจทำให้ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และควรใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 130-240 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด

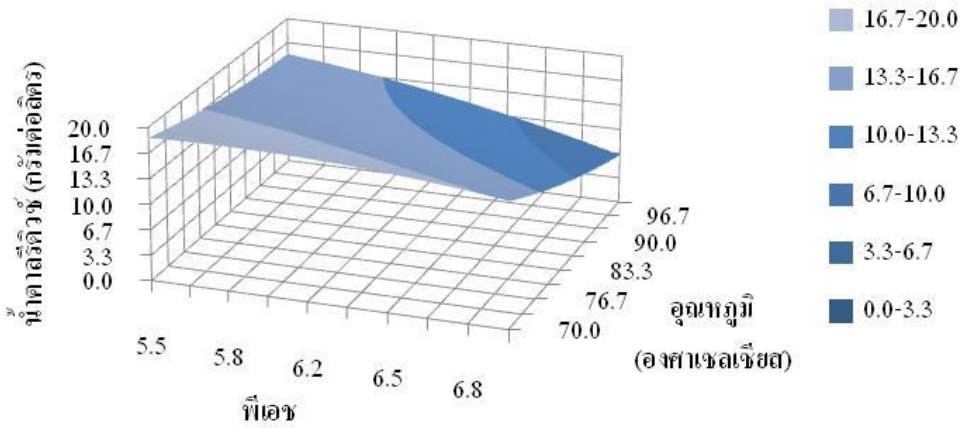
(8) ผลของพีเอชและระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-15 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด

ผลของพีเอชและระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-15 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าที่เหมาะสมเมื่อดำเนินการที่พีเอช 5.5-5.8 และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 200-240 นาที

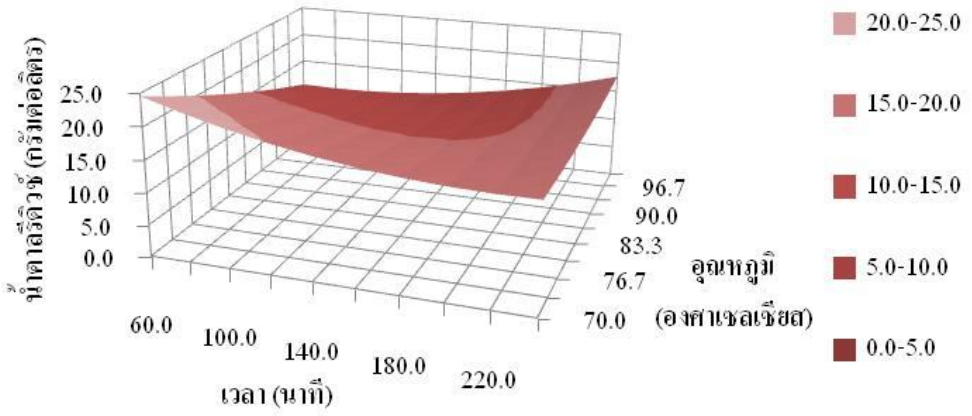
(9) ผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-16 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 150 นาที

ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-16 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าที่เหมาะสมที่พีเอช 5.5-7.0 และใช้อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส

(10) ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-17 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและอุณหภูมิที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 130 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 170 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และพีเอช 6.3

ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อยและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-17 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 60-120 นาที และใช้อุณหภูมิ 70-76.7 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษาปัจจัยต่างๆพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส คือ ใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 160 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 188 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 4 ชั่วโมง จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามทฤษฎี คือ 34.17 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อทำการทดลองจริงจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 27.37 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 630.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทางทฤษฎี แต่มีค่ามากกว่า 29 การทดลอง ดังตารางที่ 4-5 จึงถือได้ว่าสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสม

ปัจจัยที่มีผลมากที่สุด เมื่อสังเกตจากแนวโน้มของกราฟพื้นผิวที่แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ คือ พีเอช รองลงมา คือ อุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ปริมาณเปลือกสับปะรด และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย เนื่องจากเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส สามารถทำงานได้ดีในสภาวะการทดลองที่เป็นกรด ซึ่งพีเอชที่เหมาะสม อยู่ที่ประมาณ 5.5

หากมีค่าพีเอชที่มากกว่าหรือน้อยกว่า 5.5 จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลง ส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

4.5.2 การย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการทดลองด้วยการออกแบบโดยใช้ โปรแกรม RSM ที่มีตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร คือ อุณหภูมิ (A, องศาเซลเซียส) ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (B, U ต่อกรัม) ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (C, วัน) และพีเอช (D) ตัวแปรตาม คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (X_4, กรัมต่อลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 สภาวะการทดลองและผลการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ลำดับที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (U ต่อกรัม)	ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (ชั่วโมง)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	
					น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลทั้งหมด
1	48	100	7	4.0	21.43	553.07
2	48	100	5	5.0	16.75	436.76
3	55	80	6	5.5	16.33	418.47
4	48	60	5	4.0	19.08	420.31
5	48	100	7	5.0	19.67	513.74
6	63	100	7	4.0	17.98	453.03
7	55	80	4	4.5	27.59	490.83
8	63	60	5	4.0	17.81	411.38
9	63	60	7	4.0	14.34	364.27
10	55	80	6	4.5	18.11	487.30
11	40	80	6	4.5	15.51	356.37
12	48	60	7	4.0	21.63	580.97
13	48	100	5	4.0	21.59	429.87
14	48	60	7	5.0	25.73	559.38
15	55	120	6	4.5	20.68	466.16
16	63	100	5	5.0	17.93	454.27
17	70	80	6	4.5	16.92	546.94
18	63	100	5	4.0	23.56	471.44
19	55	40	6	4.5	15.72	411.26
20	48	60	5	5.0	19.36	626.87
21	55	80	6	4.5	16.08	413.94
22	63	60	5	5.0	18.52	532.32
23	63	60	7	5.0	18.23	413.96
24	55	80	8	4.5	26.61	457.18
25	55	80	6	4.5	17.60	352.73
26	63	100	7	5.0	17.91	460.75
27	55	80	6	3.5	19.07	526.16

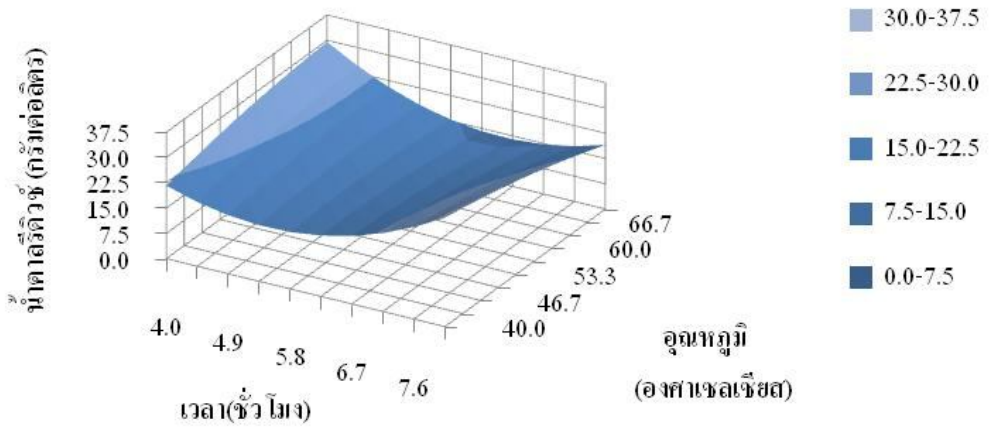
นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ตามหลัก ANOVA สามารถนำมาอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆดังสมการที่ (4.4)

$$X_4 = 66.85 + 1.007A + 0.362B - 25.98\,C - 4.776D - 0.00566\,A^2 + 0.000447B^2 + 2.404C^2 + 0.215D^2 + 0.00619AB - 0.18AC + 0.01853AD - 0.0249BC - 0.133BE + 1.956CE \quad (4.4)$$

ความสอดคล้องของผลการทำนายและค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองจริงมีค่า R^2=0.912 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองจริง (R^2 adjusted = 0.809)

4.5.2.1 ผลของปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

(1) ผลของระยะเวลาในการย่อยและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

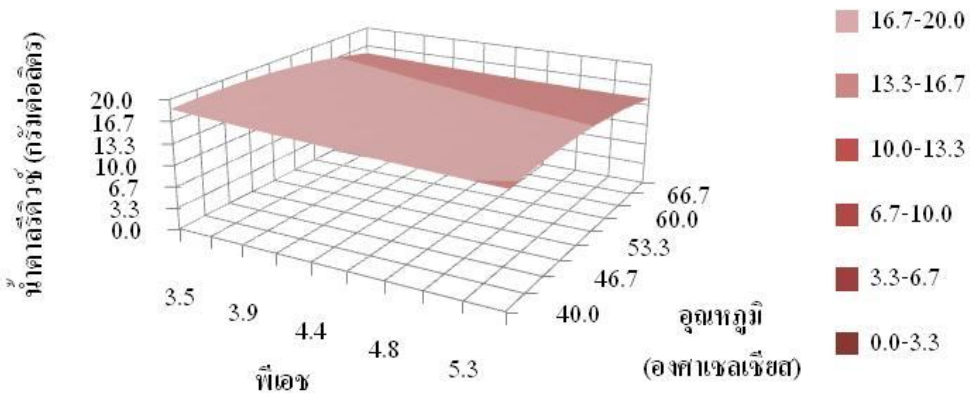


ภาพประกอบที่ 4- 18 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการย่อยและอุณหภูมิที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และพีเอช 4.5

ผลของระยะเวลาในการย่อยและอุณหภูมิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อทำการย่อยโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และพีเอช 4.5 แสดงดังภาพประกอบที่ 4-18 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิในการย่อยมากขึ้น (ในช่วง 40 - 70 องศาเซลเซียส) เพราะหากใช้อุณหภูมิที่มากกว่า 70 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์เร่งปฏิริยาได้น้อยลง และการใช้ระยะเวลาในการย่อยนานขึ้นไม่ได้ช่วยให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น ระยะเวลาเพียง 4 ชั่วโมงก็เพียงพอต่อการย่อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชลดาและคณะ (2547) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยทำการย่อยโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส(0.23 GAU)

ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 ย่อยเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง สามารถย่อยได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ 122.4 กรัมต่อลิตร

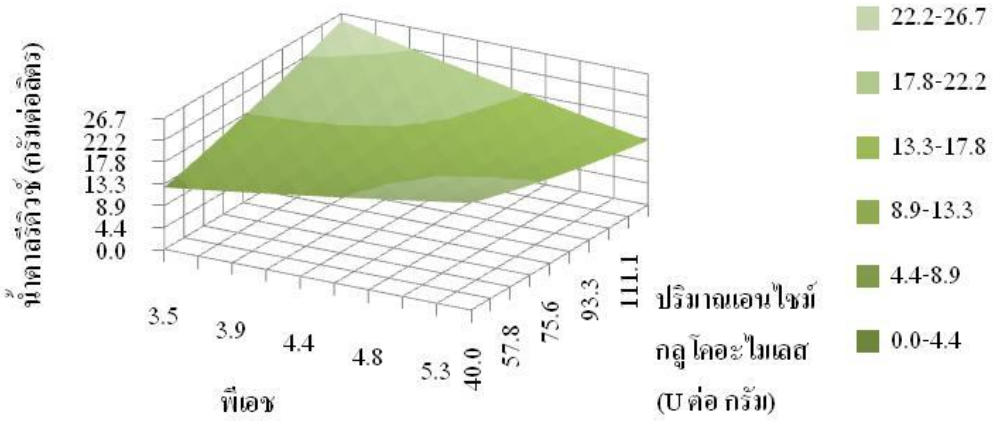
(2) ผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-19 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และระยะเวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง

ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อทำการย่อยโดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด และระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย 6 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-19 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมควรดำเนินการอยู่ในช่วงพีเอช 3.5-4.5 และอุณหภูมิควรอยู่ในช่วง 40-55 องศาเซลเซียส เพราะหากใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไป อาจจะทำให้เอนไซม์เกิดการแปลงสภาพ ส่งผลให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้น้อยลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จึงมีค่าที่ลดลงไปด้วย

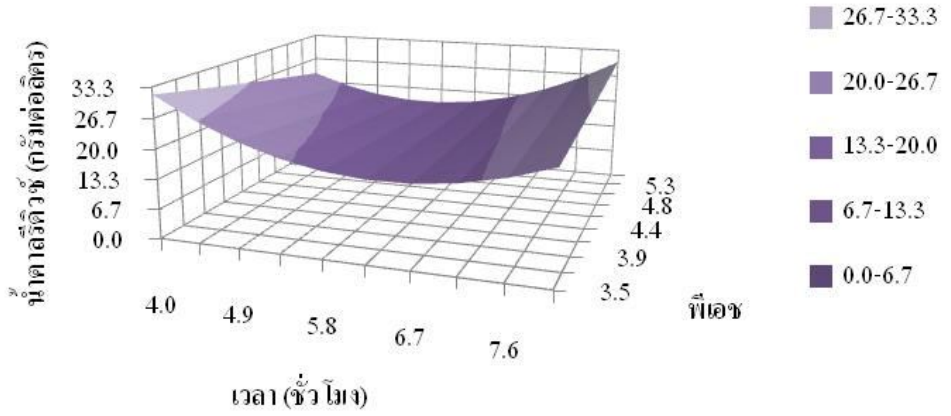
(3) ผลของพีเอชและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-20 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง

ผลของพีเอชและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-20 พบว่าปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสม ควรอยู่ในช่วงพีเอช 3.5-3.9 และปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 120 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด เพราะหากใช้พีเอชที่มากกว่านี้ อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลดน้อยลง ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อยลงไปด้วย

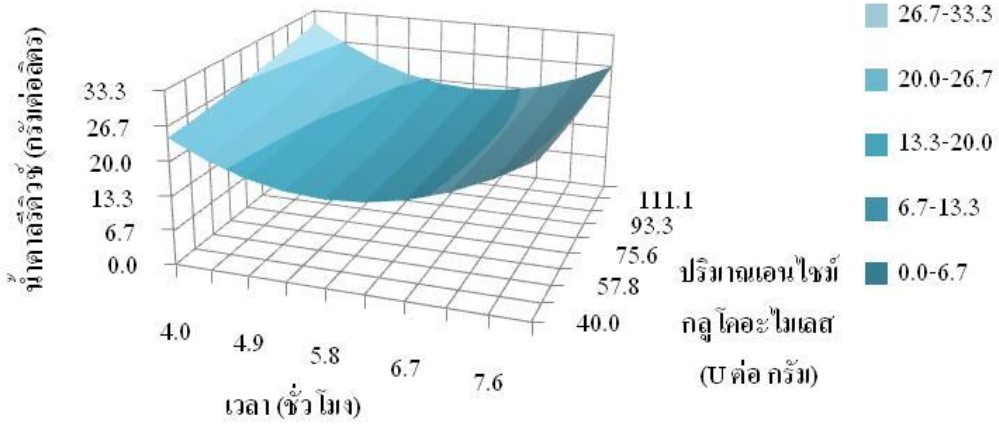
(4) ผลของระยะเวลาในการย่อยและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-21 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการย่อยและพีเอชที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด

ผลของระยะเวลาในการย่อยและพีเอชต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด แสดงดังภาพประกอบที่ 4-21 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่ามากขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อย 4.0-4.4 ชั่วโมง และพีเอชควรดำเนินการที่ 3.5-3.9 ซึ่งสอดคล้องกับภาพประกอบที่ 4-20

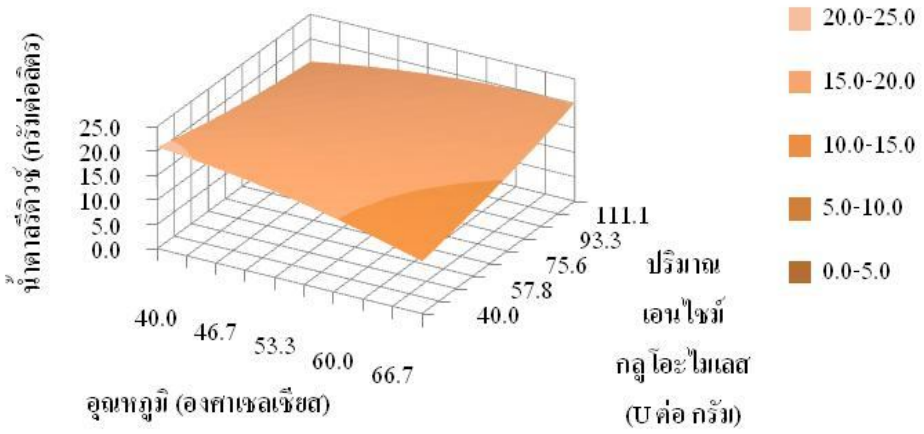
(5) ผลของระยะเวลาในการย่อยและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-22 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการย่อยและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5

ผลของระยะเวลาในการย่อยและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-22 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าที่เหมาะสมเมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อย 4.0-4.4 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับภาพประกอบที่ 4-21 และใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 120 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด เพราะหากใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่น้อยกว่านี้ จะทำให้ไม่เพียงพอต่อการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

(6) ผลของอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพประกอบที่ 4-23 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ระยะเวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง และพีเอช 4.5

ผลของอุณหภูมิและปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพประกอบที่ 4-23 พบว่า ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส และปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 40-50 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ เมื่อใช้โปรแกรม RSM เพื่อทำนายสภาวะที่เหมาะสม ปรากฏว่า ใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 120 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด พีเอช 3.5 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาในการย่อย 4 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามทฤษฎี 46.83 กรัมต่อลิตร จากการทดลองได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 48.16 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 549.35 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากกกว่าผลทางทฤษฎี และมากกว่าผลการทดลอง 27 การทดลอง ดังตารางที่ 4-6 จึงถือว่า สภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสม

จากการกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ พบว่า ปัจจัยที่มีผลมากที่สุด คือ ระยะเวลาในการย่อย รองลงมา คือ ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส อุณหภูมิ และพีเอช ซึ่งจะเห็นได้ว่า ระยะเวลาในการย่อยที่มากขึ้น ไม่ได้ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น เพราะหากใช้เวลามากเกินไป อาจจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลดลงไปด้วย

4.6 การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง

4.6.1 การหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติบนเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง

การออกแบบโดย RSM ด้วยตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร คือ ระยะเวลาในการหมัก (A, วัน) ปริมาณยีสต์ขนมปัง (B, ร้อยละโดยน้ำหนัก) พีเอช (C) และอุณหภูมิ (D, องศาเซลเซียส) ตัวแปรตาม คือ ปริมาณเอทานอล (Y_1, ร้อยละโดยปริมาตร) แสดงดังตารางที่ 4-7

ตารางที่ 4-7 สภาวะการทดลองและผลการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองบนเปลือกสับปะรด

ลำดับที่	เวลา (วัน)	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (%โดยน้ำหนัก)	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอทานอล (%โดยปริมาตร)
1	7	4	5.0	33	2.86
2	8	5	5.5	35	2.86
3	7	7	6.0	38	3.10
4	7	4	6.0	33	2.03
5	4	4	6.0	33	2.81
6	5	5	5.5	35	2.60
7	4	7	5.0	33	2.89
8	5	2	5.5	35	2.44
9	5	8	5.5	35	2.57
10	4	4	5.0	38	2.90
11	7	7	5.0	33	2.30
12	4	7	5.0	38	2.45
13	4	4	5.0	33	2.85
14	5	5	5.5	40	3.29
15	5	5	5.5	35	2.66
16	7	4	5.0	38	3.57
17	4	4	6.0	38	2.66
18	5	5	6.5	35	2.50
19	7	7	6.0	33	1.98
20	5	5	5.5	35	2.61
21	5	5	4.5	35	2.96
22	7	4	6.0	38	3.13
23	2	5	5.5	35	2.75
24	7	7	5.0	38	3.15
25	4	7	6.0	38	3.01
26	5	5	5.5	30	2.58
27	4	7	6.0	33	2.61

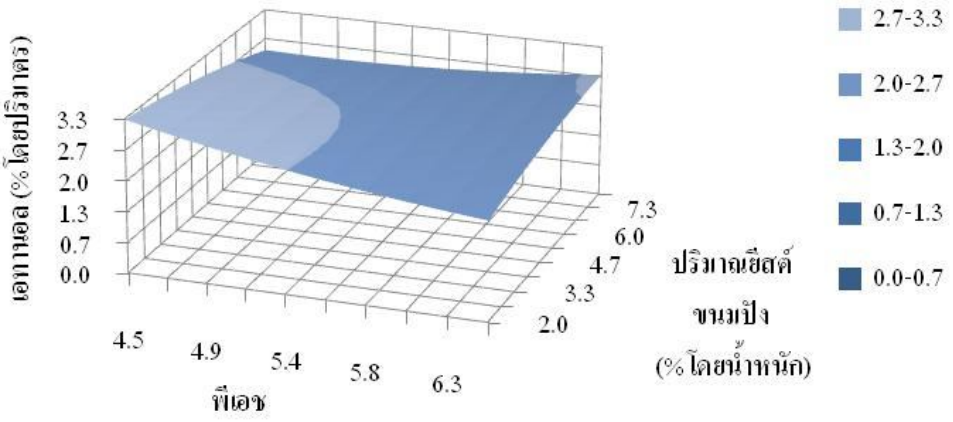
แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ สามารถนำมาอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ดังสมการที่ (4.5)

$$Y_1 = 44.68 - 1.644A - 0.613B - 3.771C - 1.535D + 0.0221A^2 - 0.01132B^2 + 0.123C^2 + 0.0131D^2 - 0.022AB - 0.13AC + 0.0652AD + 0.123BC + 0.0038BD + 0.0646CD \quad (4.5)$$

ความสอดคล้องของผลการทำนายและการทดลองจริงมีค่า R^2=0.926 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองจริง (R^2 adjusted = 0.841)

4. 6.1.1 ผลของปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง

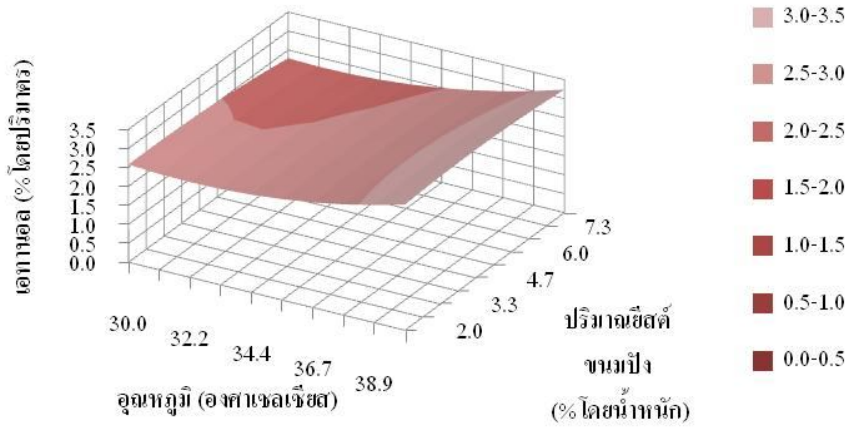
(1) ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-24 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-24 พบว่า ควรทำการหมักที่สภาวะเป็นกรดช่วงพีเอช 4.5-5.0 ที่ซึ่งใช้ยีสต์ปริมาณน้อยประมาณร้อยละ 2-3 โดยน้ำหนัก เพราะที่เปลือกสับปะรดก็ยังคงมีจุลินทรีย์และยีสต์ที่ช่วยในขั้นตอนการหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล

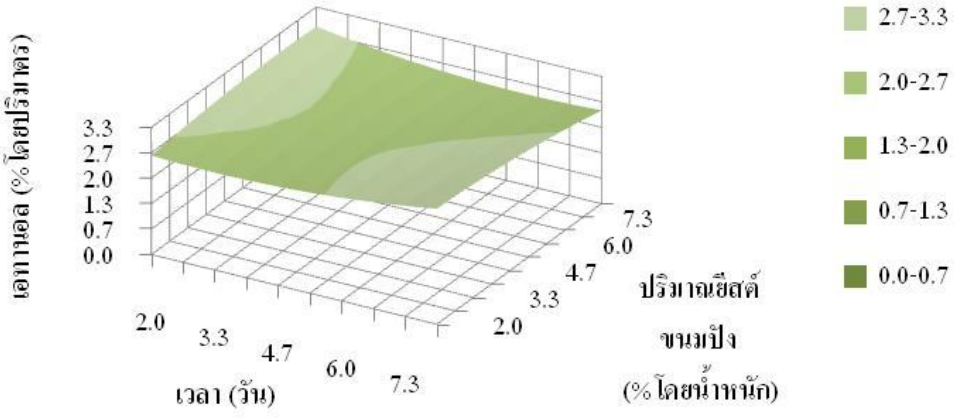
(2) ผลของอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-25 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้พีเอช 5.5 และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-25 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิในการหมักที่สูงขึ้นในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณยีสต์มีผลค่อนข้างน้อยต่อปริมาณผลผลิตเอทานอล ใช้ยีสต์ร้อยละ 2-3 โดยน้ำหนัก ก็เพียงพอต่อการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับภาพประกอบที่ 4-24

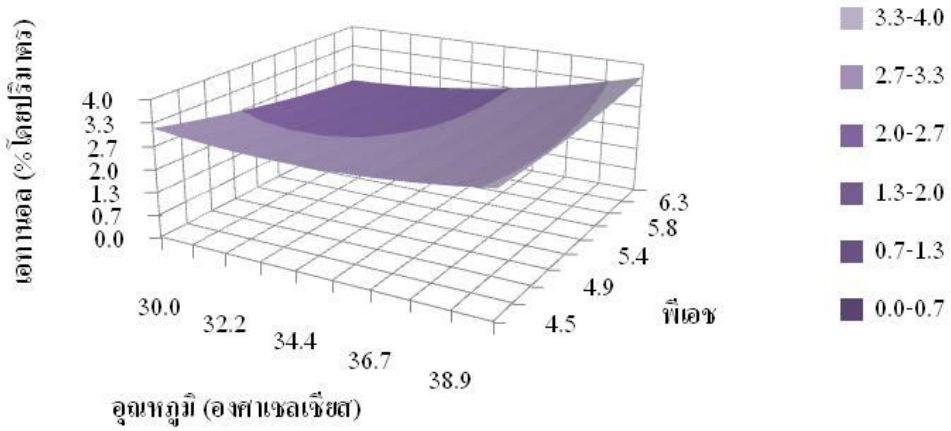
(3) ผลของระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-26 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5

ผลของระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-26 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเหมาะสมใน 2 ช่วงของการหมัก คือ เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 2-3 วัน ด้วยปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 3.0-8.0 โดยน้ำหนัก และที่ระยะเวลาในการหมัก 5-8 วัน โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 2.0-6.5 โดยน้ำหนัก แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มปริมาณยีสต์สามารถช่วยลดระยะเวลาในการหมักได้ และหากใช้ยีสต์ปริมาณน้อยก็สามารถได้ผลผลิตเอทานอลที่เหมาะสมเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมัก

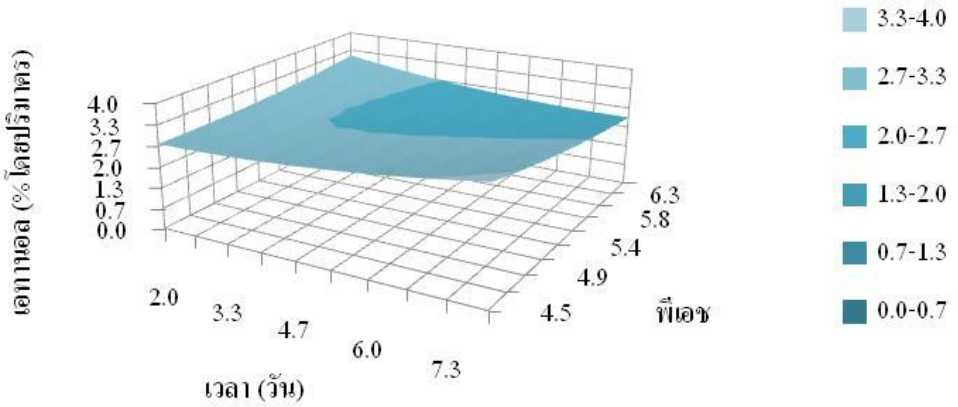
(4) ผลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-27 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-27 พบว่า ปริมาณเอทานอลมีค่าเหมาะสมเมื่อดำเนินการหมักที่อุณหภูมิสูงประมาณ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5-5.0 ทำนองเดียวกันกับภาพประกอบที่ 4-24 ถึง 4-25

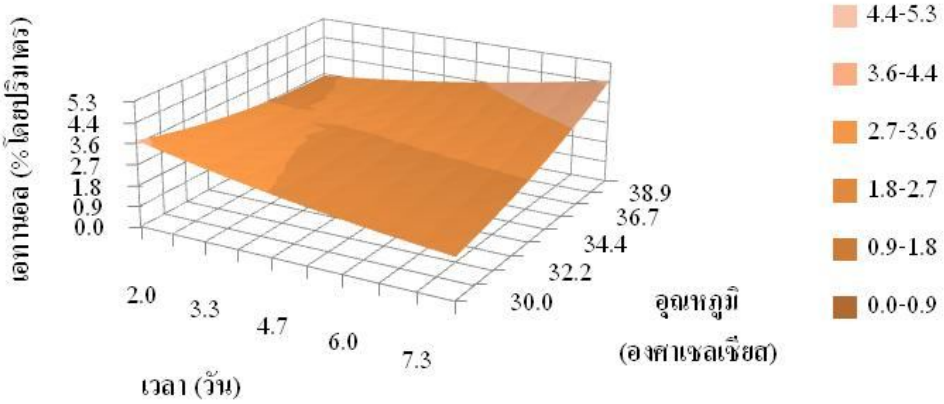
(5) ผลของระยะเวลาในการหมักและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-28 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและพีเอชในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ปัจจัยของระยะเวลาในการหมักและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-28 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ 7-8 วัน ที่พีเอช 4.5-4.7

(6) ผลของระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-29 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และพีเอช 5.5

ผลของระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-29 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเหมาะสมเมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 6-8 วัน ที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล ซึ่งใช้เปลือกที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด ผลการทำนายโดย RSM ด้วยวิธี CCD พบว่าควรใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หมักเป็นระยะเวลา 8 วัน จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 5.48 โดยปริมาตร ซึ่งจากการทดลองจริงได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 5.38 โดยปริมาตร ซึ่งน้อยกว่าค่าการทำนายเล็กน้อย แต่มากกว่าผลทั้ง 27 การทดลองในตารางที่ 4-7 จึงสรุปได้ว่าสภาวะนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสม

จากกราฟแนวโน้มแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ พบว่า ปัจจัยที่มีผลมากที่สุด คือ อุณหภูมิ รองลงมา คือ พีเอช เวลา และปริมาณยีสต์ขนมปัง เพราะอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่สูงสุดของช่วงสภาวะที่ศึกษา และเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด โดยสันนิษฐานได้ว่า อุณหภูมิที่สูงสามารถที่จะไปช่วยแตกพันธะภายในเปลือกสับปะรด ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลุดออกมาในน้ำมากขึ้น ส่งผลให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้สูงขึ้นเช่นกัน

4.6.2 1 การหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว (1-7 วัน) ด้วยยีสต์ขนมปัง

ศึกษาตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร คือ ระยะเวลาในการหมัก (A, วัน) ปริมาณยีสต์ขนมปัง (B, ร้อยละโดยน้ำหนัก) พีเอช (C) และอุณหภูมิ (D, องศาเซลเซียส) ตัวแปรตาม คือ ปริมาณเอทานอล (Y_2, ร้อยละโดยปริมาตร) แสดงดังตารางที่ 4-8

ตารางที่ 4-8 สภาวะการทดลองและผลการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว (1-7 วัน)

ลำดับที่	เวลา (วัน)	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (%โดยน้ำหนัก)	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอทานอล (%โดยปริมาตร)
1	7	4	5.0	33	3.88
2	8	5	5.5	35	3.03
3	7	7	6.0	38	1.31
4	7	4	6.0	33	3.90
5	4	4	6.0	33	3.63
6	5	5	5.5	35	3.44
7	4	7	5.0	33	3.90
8	5	2	5.5	35	3.04
9	5	8	5.5	35	3.39
10	4	4	5.0	38	1.63
11	7	7	5.0	33	3.90
12	4	7	5.0	38	2.71
13	4	4	5.0	33	3.78
14	5	5	5.5	40	1.32
15	5	5	5.5	35	3.47
16	7	4	5.0	38	2.02
17	4	4	6.0	38	1.27
18	5	5	6.5	35	3.40
19	7	7	6.0	33	3.87
20	5	5	5.5	35	3.38
21	5	5	4.5	35	3.43
22	7	4	6.0	38	1.57
23	2	5	5.5	35	3.56
24	7	7	5.0	38	1.13
25	4	7	6.0	38	1.83
26	5	5	5.5	30	3.75
27	4	7	6.0	33	3.86

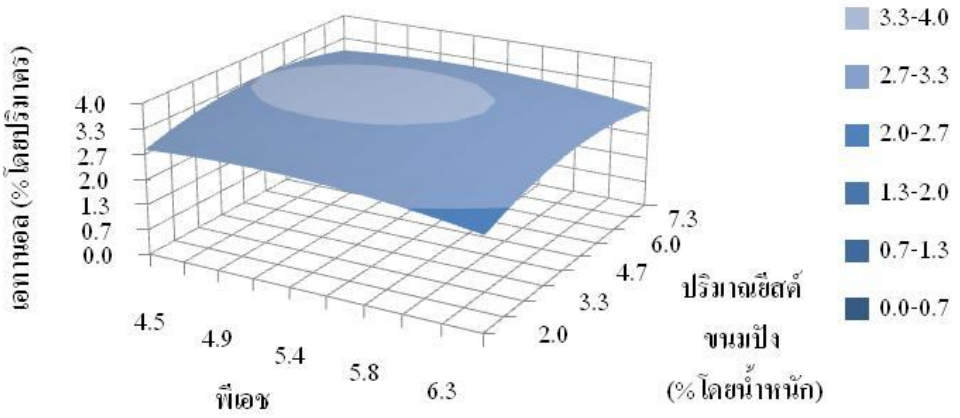
แบบจำลองสำหรับทำนายผลของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนขนมปัง แสดงดังสมการที่ (4.6)

$$Y_2 = -64.42 + 1.294A + 0.822B + 4.315C + 3.291D - 0.04097A^2 - 0.05022B^2 - 0.247C^2 - 0.04520D^2 - 0.0873AB + 0.09656AC - 0.0296AD + 0.01277BC + 0.00255BD - 0.06555CD \quad (4.6)$$

ค่าความสอดคล้องของผลที่ได้จากการทำนาย และที่ได้จากการทดลองจริง คือ R^2=0.903 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองจริง (R^2 adjusted = 0.791)

4. 6.2.1 ผลของปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว (1-7 วัน) ด้วยยีสต์ขนมปัง

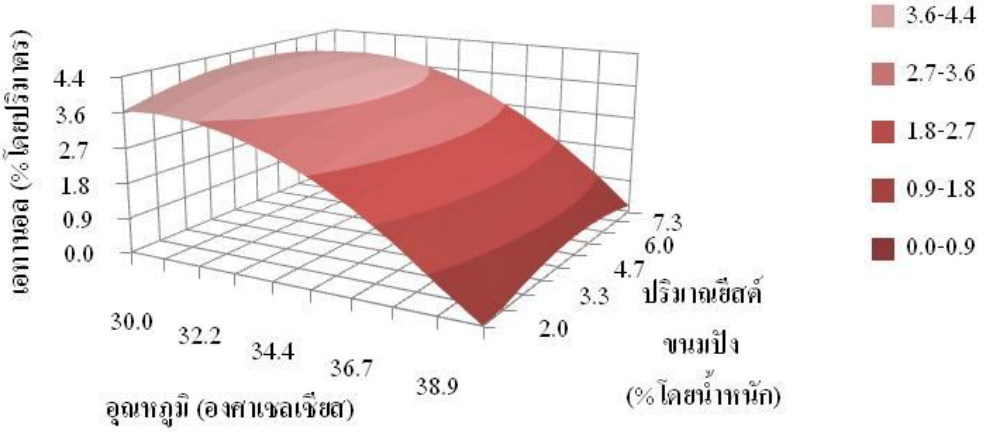
(1) ผลของปริมาณพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-30 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-30 พบว่า ที่พีเอชตั้งแต่ 4.5-5.3 และปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5.6-6.9 โดยน้ำหนัก มีค่าปริมาณเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าพีเอชมากกว่า 5.3 และปริมาณยีสต์ขนมปังมากกว่าร้อยละ 6.9 โดยน้ำหนัก จะทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าที่ลดลง

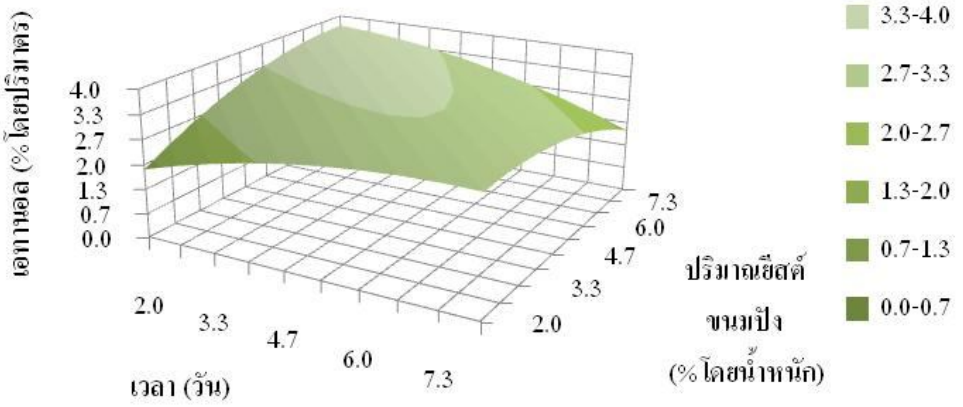
(2) ผลของอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-31 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้พีเอช 5.5 และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-31 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิในการหมัก 30 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณยีสต์มีผลค่อนข้างน้อยต่อปริมาณผลผลิตเอทานอล ซึ่งปริมาณยีสต์ที่เหมาะสมต่อการหมักควรอยู่ในช่วง 3.5-4.5 โดยน้ำหนัก เพราะปริมาณยีสต์จากเปลือกสับปะรดและจากขนมปังที่เลยวันหมดอายุช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก ให้ได้ปริมาณเอทานอลที่มากขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มยีสต์ขนมปังในปริมาณที่มาก ก็เพียงพอต่อการผลิตเอทานอล

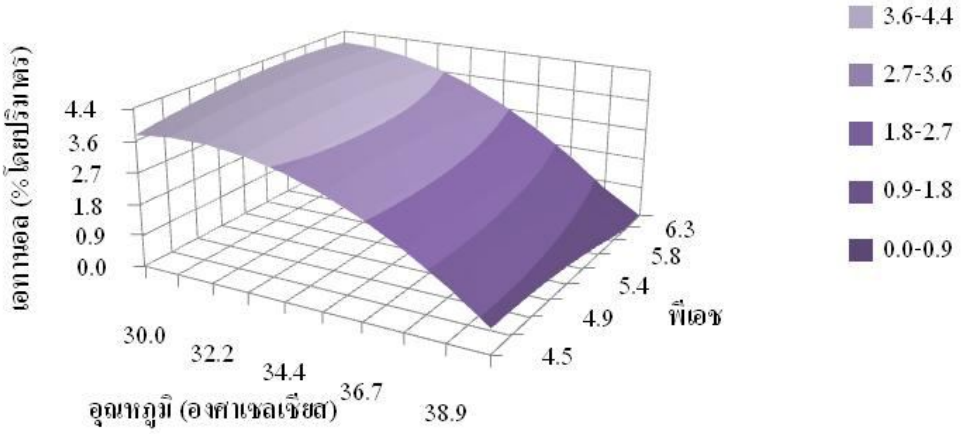
(3) ผลของระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-32 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5

ผลของระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-32 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 4.7-8.0 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการหมัก 2-4 วัน ซึ่งหากใช้ระยะเวลาในการหมักมากกว่านี้ก็ไม่สามารถส่งผลให้ได้ปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้น

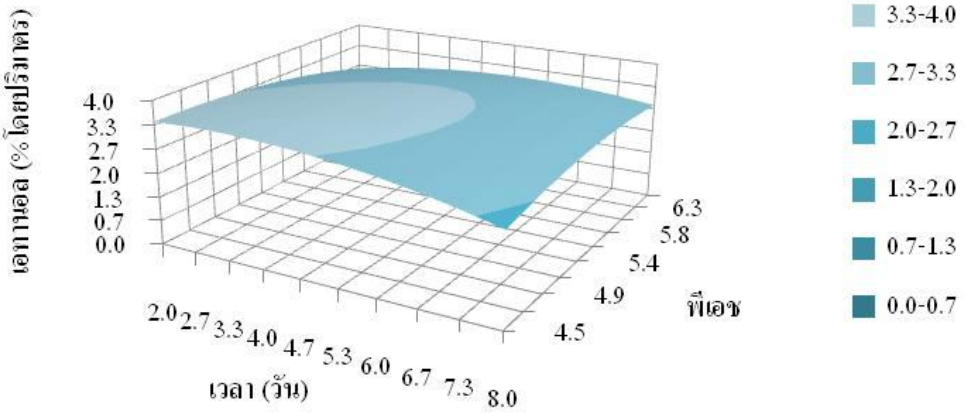
(4) ผลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-33 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอชในการหมักที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-33 พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่เหมาะสมที่สุด และเมื่ออุณหภูมิยิ่งเพิ่มสูงขึ้นก็จะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่ลดลง โดยพีเอชส่งผลน้อยมากต่อปริมาณเอทานอล ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมคือ ควรใช้อุณหภูมิในการหมัก 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5-5.5

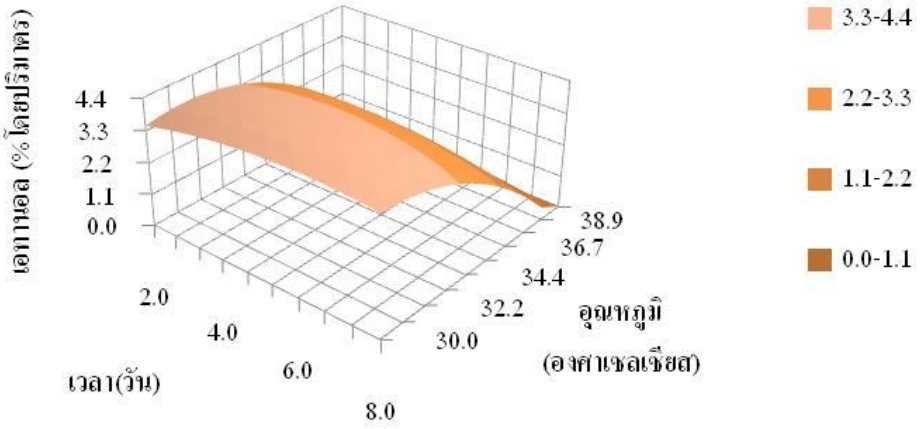
(5) ผลของระยะเวลาในการหมักและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-34 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ผลของระยะเวลาในการหมักและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-34 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 2-5 วัน และพีเอช 4.5-5.8 เพราะจุลินทรีย์และยีสต์ที่ติดมากับเปลือกสับปะรดและขนมปังที่เลยวันหมดอายุต้องใช้เวลาในการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส และหมักน้ำตาลกลูโคสให้เปลี่ยนเป็นเอทานอล

(6) ผลของระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-35 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และพีเอช 5.5

ผลของระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-35 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าสูงเมื่อมีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมักมีผลน้อยมากในการหมัก ซึ่งระยะเวลาในการหมักจึงควรอยู่ในช่วง 2-8 วัน

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ขนมปัง ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังที่หมดอายุแล้ว พบว่า อุณหภูมิ มีผลมากที่สุดต่อการเพิ่มปริมาณเอทานอล โดยควรจะดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณยีสต์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก พีเอช 6.4 และทำการหมักเป็นระยะเวลา 8 วัน ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 4.51 โดยปริมาตร โดยเมื่อทำการทดลองจริงทำให้ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 4.07 โดยปริมาตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าจากการทำนาย แต่มีปริมาณเอทานอลที่มากกว่า 27 การทดลอง จึงสามารถสรุปได้ว่า สภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสม

จากแนวโน้มของกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ สามารถสรุปได้ว่า ปัจจัยที่มีผลมากที่สุด คือ อุณหภูมิ รองลงมา คือ พีเอช ระยะเวลาในการหมัก และปริมาณยีสต์ขนมปัง เพราะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อาจจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์และยีสต์ ทำให้จุลินทรีย์ช่วยในขั้นตอนการย่อยเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้สูงขึ้น

4.6.3 การหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลสด้วยยีสต์ขนมปัง

จากการทดลองโดยการออกแบบโดยใช้ โปรแกรม RSM ที่มีตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร คือ ระยะเวลาในการหมัก (A, วัน) ปริมาณยีสต์ขนมปัง (B, ร้อยละโดยน้ำหนัก) พีเอช (C) และอุณหภูมิ (D, องศาเซลเซียส) ตัวแปรตาม คือ ปริมาณเอทานอล (Y_3, ร้อยละโดยปริมาตร) แสดงดังตารางที่ 4-9

ตารางที่ 4-9 สภาวะการทดลองและผลการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

ลำดับที่	เวลา (วัน)	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (%โดยน้ำหนัก)	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอทานอล (%โดยปริมาตร)
1	7	4	5.0	33	0.59
2	8	5	5.5	35	0.91
3	7	7	6.0	38	0.59
4	7	4	6.0	33	0.56
5	4	4	6.0	33	0.52
6	5	5	5.5	35	1.37
7	4	7	5.0	33	0.54
8	5	2	5.5	35	1.01
9	5	8	5.5	35	1.24
10	4	4	5.0	38	0.57
11	7	7	5.0	33	0.55
12	4	7	5.0	38	0.56
13	4	4	5.0	33	0.49
14	5	5	5.5	40	0.45
15	5	5	5.5	35	1.08
16	7	4	5.0	38	0.68
17	4	4	6.0	38	0.45
18	5	5	6.5	35	0.44
19	7	7	6.0	33	0.51
20	5	5	5.5	35	1.09
21	5	5	4.5	35	0.51
22	7	4	6.0	38	0.55
23	2	5	5.5	35	0.78
24	7	7	5.0	38	0.66
25	4	7	6.0	38	0.65
26	5	5	5.5	30	0.23
27	4	7	6.0	33	0.51

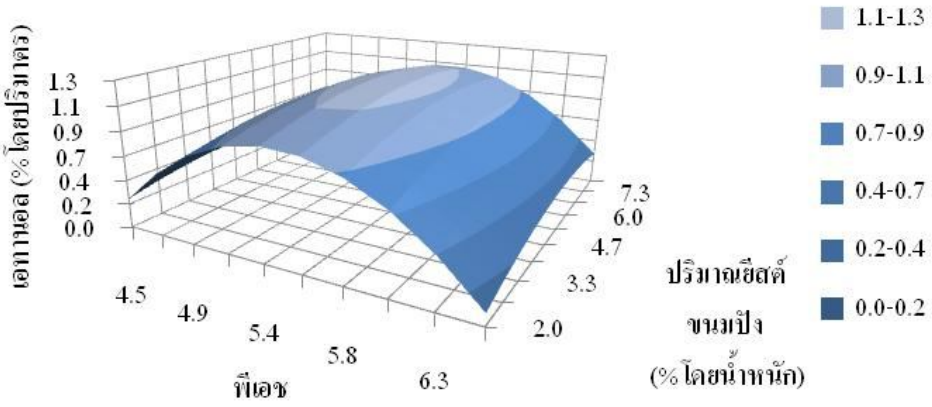
แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ สามารถนำมาอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ดังสมการที่ (4.7)

$$Y_3 = -71.38 + 0.589A - 0.02577B + 9.027C + 2.633D - 0.04736A^2 - 0.01619\ B^2 - 0.796C^2 - 0.03720D^2 - 0.00868AB - 0.01984AC + 0.00157AD + 0.01614BC + 0.00455BD - 0.00817CD \quad (4.7)$$

ค่าความสอดคล้องของผลที่ได้จากการทำนาย และที่ได้จากการทดลองจริง คือ R^2=0.906 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองจริง (R^2 adjusted = 0.798)

4. 6.3.1 ผลของปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยเอนไซม์ด้วยยีสต์ขนมปัง

(1) ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล

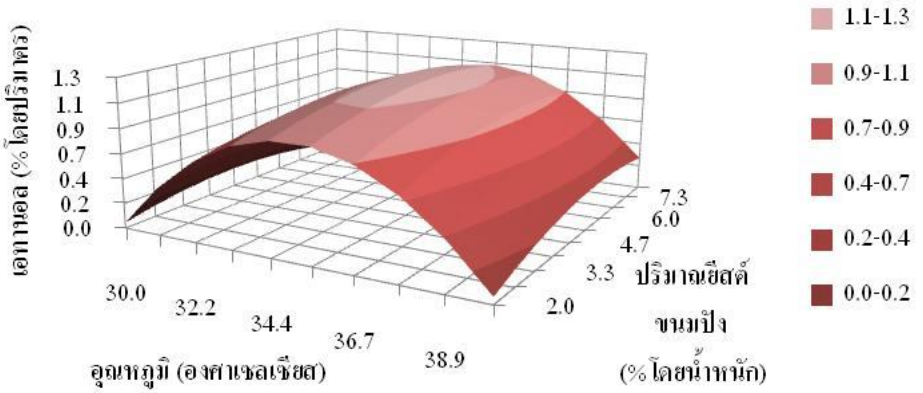


ภาพประกอบที่ 4-36 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปัง ที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-36 พบว่า ควรทำการหมักที่พีเอชเป็นกรด ซึ่งอยู่ในช่วง 5.3-5.8 และปริมาณยีสต์ขนมปังที่ควรใช้จะต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 3.3-7.3 โดยน้ำหนัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรลักษณ์ (2556) ที่ได้ทำการศึกษาการหมักแกนข้าวโพดด้วยยีสต์ขนมปัง โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะที่ศึกษา คือ ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 2-8 โดยน้ำหนัก พีเอช

4.0-6.0 ระยะเวลาในการหมัก 2-6 วัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล คือ ใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.3 ระยะเวลาในการหมัก 6 วัน

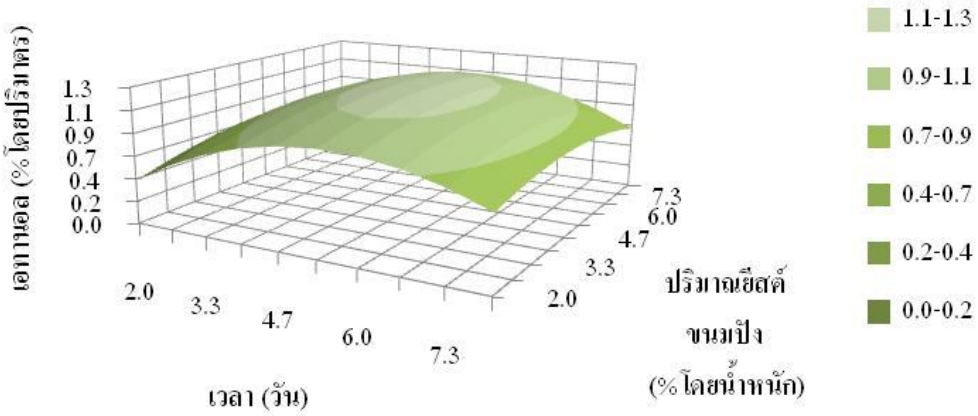
(2) ผลของอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-37 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้พีเอช 5.5 และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของอุณหภูมิและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-37 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิในการหมัก 33-35 องศาเซลเซียส และปริมาณยีสต์ขนมปังควรอยู่ในช่วงร้อยละ 3.3-7.3 โดยน้ำหนัก ซึ่งสอดคล้องกับภาพประกอบที่ 4-36

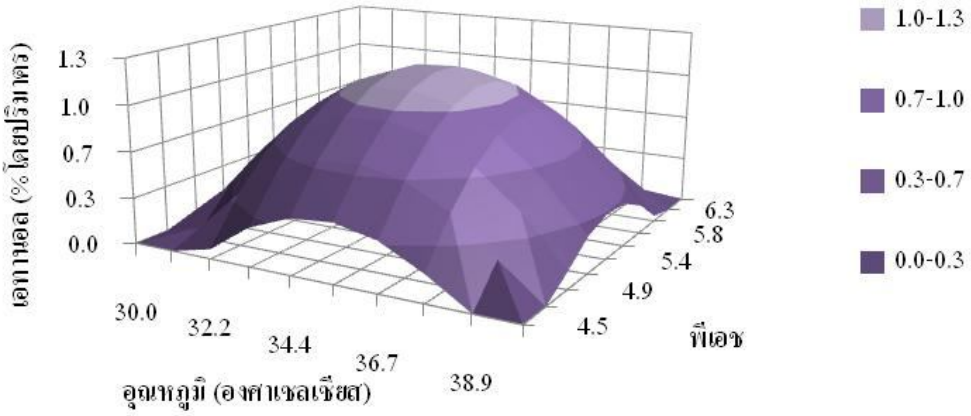
(3) ผลของระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-38 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5

ผลของระยะเวลาในการหมักและปริมาณยีสต์ขนมปังที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-38 พบว่า เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 4-5 วัน และปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 3.3-7.3 โดยน้ำหนัก จะทำให้ได้ปริมาณผลผลิตเอทานอลที่สูงขึ้น โดยสังเกตได้จากกราฟพื้นผิวที่ช่วงเวลา 1-5 วัน ปริมาณเอทานอลที่ได้จะมีค่าที่สูงขึ้น อันเนื่องมาจากอาจจะมีน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ทำให้ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้ในปริมาณที่สูง ซึ่งจะสอดคล้องกับงานวิจัยของสายฤดี (2555) ที่ทำการหมักเอทานอลจากเส้นใยปาล์มด้วยยีสต์ขนมปัง พีเอชเริ่มต้น 5.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาระยะเวลาในการหมัก 1-7 วัน ซึ่งจะพบว่า ใช้ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน จะให้ปริมาณเอทานอลที่มากที่สุด

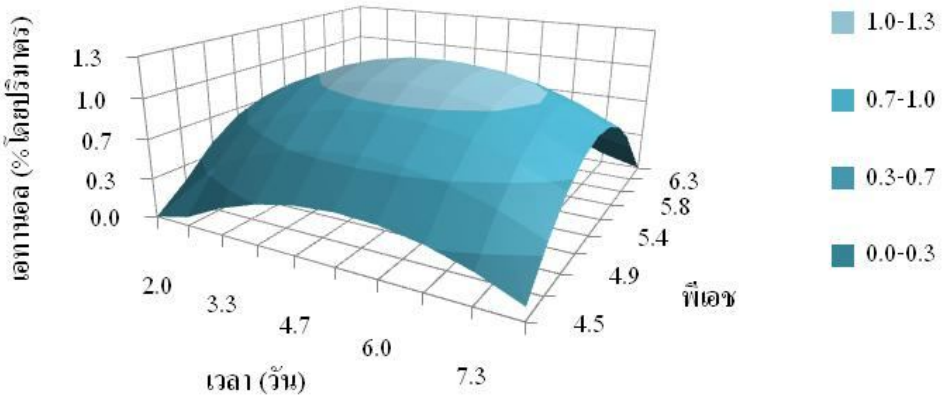
(4) ผลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-39 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน

ผลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-39 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีทำการหมักที่อุณหภูมิระหว่าง 33-35 องศาเซลเซียส และพีเอชระหว่าง 5.0-5.8 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30-35 องศาเซลเซียส ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าที่สูงขึ้นเรื่อยๆ แต่เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 35 องศาเซลเซียส ปริมาณเอทานอลที่ได้จะมีค่าที่ลดลง เนื่องจากเมื่อใช้สภาวะที่อุณหภูมิสูงจนเกินไป ส่งผลให้ยีสต์เสื่อมสภาพ ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดน้อยลง

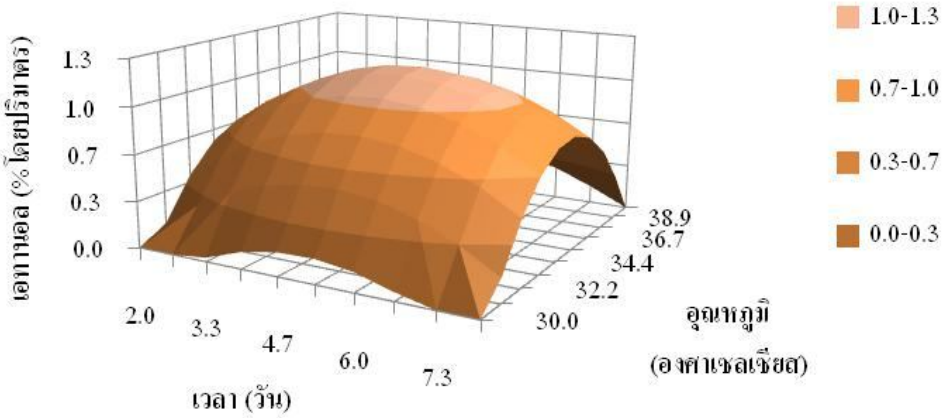
(5) ผลของระยะเวลาในการหมักและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-40 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ผลของระยะเวลาในการหมักและพีเอชที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-40 พบว่า ปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 3-5 วัน และพีเอชอยู่ในช่วง 5.0-5.8

(6) ผลของระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-41 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล โดยใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และพีเอช 5.5

ผลของระยะเวลาในการหมักและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเอทานอล แสดงดังภาพประกอบที่ 4-41 พบว่า ที่ระยะเวลาในการหมัก 3-5 วัน และอุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ได้ปริมาณผลผลิตเอทานอลที่เหมาะสม

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง โดยผ่านการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ ใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 1.19 โดยปริมาตร และเมื่อทำการทดลองจริงจะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 1.10 โดยปริมาตร ซึ่งน้อยกว่าผลของการทำนายแต่มากกว่าทั้ง 27 การทดลอง (ตารางที่ 4-9) จึงสรุปได้ว่า สภาวะที่ได้เป็นสภาวะที่เหมาะสม

และจากแนวโน้มของกราฟพื้นผิวของความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ พบว่าปัจจัยที่มีผลมากที่สุด คือ อุณหภูมิ รองลงมา คือ พีเอช เวลา และปริมาณยีสต์ขนมปัง ซึ่งจากกราฟพื้นผิว จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิ ที่เหมาะสมของการหมัก จะอยู่ในช่วงที่เป็นค่ากลาง คือ 35 องศาเซลเซียส เพราะหากต่ำกว่า หรือมากกว่า 35 องศาเซลเซียส ก็ไม่ได้ส่งผลให้ได้ปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้น เนื่องจากในขั้นตอนการปรับสภาพและย่อย มีการให้ความร้อนตลอดเวลา ดังนั้นในขั้นตอนการหมักจึงไม่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิที่สูง

4.7 ผลการประเมินต้นทุนเบื้องต้น

ตารางที่ 4-10 แสดงราคาวัตถุดิบ สารเคมี และสาธารณูปโภค ที่ใช้ประกอบการคำนวณค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต

สารเคมี	ราคาต่อหน่อย
เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส	0.08 บาทต่อกรัม
เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	0.13 บาทต่อกรัม
สารละลายแอมโมเนีย	7.40 บาทต่อลิตร
กรดซัลฟูริก	0.014 บาทต่อกรัม
ยีสต์ขนมปัง	0.065 บาทต่อกรัม
น้ำ	0.013 บาทต่อลิตร
ไฟฟ้า	1.7 บาทต่อหน่วย

หมายเหตุ ราคาวัตถุดิบและสารเคมี สืบค้นจาก www.Alibaba.com (30 ก.ย. 57)
อัตราแลกเปลี่ยน 1 US = 32.8 บาท

อัตราค่าน้ำ คิดเฉลี่ยราคาระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก (การประปานครหลวง, 30 ก.ย. 57)

อัตราค่าไฟฟ้า คิดเฉลี่ยราคาระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก (กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและเหมืองแร่, 30 ก.ย. 57) 1 หน่วย คือ กิโลวัตต์.ชั่วโมง

ตารางที่ 4-11 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยวิธีต่างๆ

รายการ	การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด		การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว		การปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์	
การปรับสภาพ	ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (วัน)	5	ขนมปังที่เลยวันหมดอายุ (วัน)	5	แอลฟา-อะไมเลส (U)	188
			อัตราส่วนขนมปังต่อเปลือก (กรัมต่อกรัม)	1:3	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	70
			ระยะเวลาในการปรับสภาพ (ชั่วโมง)	1	ระยะเวลาในการปรับสภาพ (ชั่วโมง)	4
การย่อย					กลูโคอะไมเลส (U)	120
					อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	70
					ระยะเวลาในการปรับสภาพ (ชั่วโมง)	4
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	0.58		2.07		48.16	

ตารางที่ 4-12 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังของแต่ละวิธี

รายการ	การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด	การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว	การปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์
ร้อยละยีสต์ (โดยน้ำหนัก)	2	3	6
พีเอชเริ่มต้น	4.5	6.4	5.5
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	40	30	35
ระยะเวลาในการหมัก (วัน)	8	8	5
ปริมาณเอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	5.38	4.07	1.10

จากตารางที่ 4-11 และ 4-12 พบว่า การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรดทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่มากที่สุด เนื่องจากในขั้นตอนการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด และการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุ ไม่ได้ใช้ความร้อนในการปรับสภาพและย่อย จึงทำให้ยังคงมีจุลินทรีย์และยีสต์หลงเหลืออยู่ ซึ่งจุลินทรีย์และยีสต์เหล่านี้สามารถที่นำมาช่วยย่อยคาร์โบไฮเดรตและเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อในขั้นตอนการหมักซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้ในปริมาณที่มากขึ้น โดยใช้ปริมาณยีสต์ในจำนวนน้อย ซึ่งต่างจากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์ ที่มีการให้ความร้อนตั้งแต่การปรับสภาพและให้ความร้อนต่อในขั้นตอนการย่อย ส่งผลให้จุลินทรีย์และยีสต์ที่ติดมากับเปลือกสับปะรด ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ จึงต้องใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังที่มากกว่าวิธีอื่น

และจากผลของการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุ พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้มีปริมาณที่น้อยกว่าการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้ว ไม่ได้ช่วยให้ได้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น

4.7.1 เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีต่างๆ

ตารางที่ 4-13 ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกระบวนการใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติ ที่กำลังการผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95)

รายการ	ปริมาณที่ใช้	ค่าใช้จ่าย (บาท)
1. การปรับสภาพและย่อย		
- เปลือกสับปะรด	1,407.04 กรัม	-
- น้ำ	9.98 ลิตร	0.13
2. การหมัก		
- ยีสต์ขนมปัง	28.14 กรัม	1.83
- สารละลายแอมโมเนีย (ปรับ pH)	0.12 ลิตร	0.89
- ไฟฟ้า	10.43 หน่วย	17.74
3. การกลั่นเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลเป็นร้อยละ 95		
- ไฟฟ้า	1.60 หน่วย	2.72
รวม		23.31

หมายเหตุ ไม่คิดราคาวัตถุดิบเปลือกสับปะรด (วัสดุเหลือใช้และเหลือทิ้งสำหรับอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง)

ตารางที่ 4-14 ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกระบวนการใช้จุลินทรีย์จากขนมปังมี่หมดอายุแล้ว ที่กำลังการผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95)

รายการ	ปริมาณที่ใช้	ค่าใช้จ่าย (บาท)
1. การปรับสภาพและย่อย		
- เปลือกสับปะรด	1,640 กรัม	-
- ขนมปัง	545.72 กรัม	-
- น้ำ	14.29 ลิตร	0.20
2. การหมัก		
- ยีสต์ขนมปัง	49.20 กรัม	3.37
- สารละลายแอมโมเนีย (ปรับ pH)	0.14 ลิตร	1.11
- ไฟฟ้า	10.43 หน่วย	17.74
3. การกลั่นเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลเป็นร้อยละ 95		
- ไฟฟ้า	1.60 หน่วย	2.72
รวม		25.14

หมายเหตุ ไม่คิดราคาวัตถุดิบขนมปัง (วัสดุเหลือใช้และเหลือทิ้งสำหรับอุตสาหกรรมเบเกอรี่)

ตารางที่ 4-15 ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากกระบวนการใช้เอนไซม์ ที่กำลังการผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95)

รายการ	ปริมาณที่ใช้	ค่าใช้จ่าย (บาท)
1. การปรับสภาพ		
- เปลือกสับปะรด	10,133.34 กรัม	-
- น้ำ	63.33 ลิตร	0.82
- สารละลายแอมโมเนีย (ปรับ pH)	0.24 ลิตร	1.78
- เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส	63.33 กรัม	5.07
- ไฟฟ้า	0.72 หน่วย	1.22
2. การย่อย		
- กรดซัลฟูริก (ปรับ pH)	139.33 กรัม	1.95
- เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	15.83 กรัม	2.06
- ไฟฟ้า	0.72 หน่วย	1.22
3. การหมัก		
- ยีสต์ขนมปัง	608.00 กรัม	39.52
- สารละลายแอมโมเนีย (ปรับ pH)	0.22 ลิตร	1.63
- ไฟฟ้า	4.01 หน่วย	6.82
4. การกลั่นเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลเป็นร้อยละ 95		
- ไฟฟ้า	1.60 หน่วย	2.72
รวม		64.81

ตางรางที่ 4-16 แสดงต้นทุนในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

รายการ	การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด	การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว	การปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์
ต้นทุนในการผลิต (บาท/ลิตร)	23.31	25.14	64.81

ตารางที่ 4-17 เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการใช้วัตถุดิบชนิดต่างๆ (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5)

วัตถุดิบ	ผลผลิต (ลิตรต่อตัน)	อ้างอิง
เปลือกสับปะรด (จุลินทรีย์บนเปลือกสับปะรด)	710.71	งานวิจัยนี้
เปลือกสับปะรด (จุลินทรีย์บนเปลือกสับปะรดร่วมกับจุลินทรีย์บนขนมปังเลยวันหมดอายุ)	609.76	
เปลือกสับปะรด (เอนไซม์)	98.68	
แกนข้าวโพด (สารเคมี)	549.31	วรลักษณ์(2556)
แกนข้าวโพด (เอนไซม์)	466.41	วรลักษณ์(2556)
เมล็ดขนุนสด	486.00	บัญชา (2554)
อ้อย	70.00	Suthamma (2007)
มันสำปะหลัง	160.00	
กากน้ำตาล	240.00	

ตารางที่ 4-18 การเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ ขนมปังหมดอายุ และเอนไซม์ ที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตเอทานอล

รายการ	การปรับสภาพและย่อยด้วยวิธีธรรมชาติ		ปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์
	จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด	จุลินทรีย์บนขนมปังหมดอายุ	
ข้อดี	- ต้นทุนในการผลิตต่ำเนื่องจากใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร	- ต้นทุนในการผลิตต่ำเนื่องจากใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม	- ปฏิกิริยามีความจำเพาะเจาะจง ทำให้ได้ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูง - ใช้ระยะเวลาน้อยในการผลิตน้ำตาลริวซ์
ข้อเสีย	- ใช้ระยะเวลานานทำให้สิ้นเปลืองค่าไฟฟ้า -ใช้ปริมาณกรด-เบสเยอะในการปรับพีเอช	- ใช้ระยะเวลานานทำให้สิ้นเปลืองค่าไฟฟ้า - ใช้ปริมาณกรด-เบสเยอะในการปรับพีเอช	- เอนไซม์เก็บรักษายาก ซึ่งต้องแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส - ต้นทุนในการผลิตสูงมาก - ได้ปริมาณเอทานอลน้อย

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักแล้ว จะนำผลผลิตส่วนของเหลวจากการหมักที่ได้ไปทำการเพิ่มความบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 โดยจะทำการกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นแบบ Packed-Column ที่มีความสูง 50 เซนติเมตร กลั่นไอผ่าน Molecular sieve ชนิด 4A บรรจุ Packing ขนาด 0.5 นิ้ว ใช้อุณหภูมิในการกลั่น 85 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันบรรยากาศ เพื่อหาระยะเวลาในการกลั่นเอทานอลให้บริสุทธิ์ปริมาณ 1 ลิตร พบว่า ใช้ระยะเวลาในการกลั่นประมาณ 30 นาที ที่กำลังไฟฟ้า 600 วัตต์ ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการประมาณการค่าไฟฟ้าสำหรับการกลั่นเพิ่มความบริสุทธิ์

การเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้และต้นทุนในการผลิตเอทานอลทั้ง 3 วิธี แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4-13 ถึง 4-17 พบว่าการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด และหมักด้วยยีสต์ขนมปัง ให้ผลผลิตที่มากที่สุด คือ 710.71 ลิตรต่อตัน และใช้ต้นทุนในการผลิต 23.31 บาทต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์ คือ 64.81 บาทต่อลิตร และการใช้เอนไซม์ยังให้ผลผลิตเอทานอลที่

น้อยกว่า คือ 98.68 ลิตรต่อตัน โดยสามารถสรุปได้ว่า ควรเลือกใช้การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด ดีกว่าการใช้เอนไซม์ เพราะได้ผลผลิตเอทานอลที่สูงกว่าและต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า และจากตารางที่ 4-17 จะเห็นได้ว่าวัตถุดิบเปลือกสับปะรดมีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอล เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าวัตถุดิบอื่นๆ

งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด เพราะเป็นวิธีที่คุ้มค่าต่อการผลิตเอทานอลมากที่สุด ถึงแม้ว่าจะใช้การผลิตในระยะเวลาที่นาน แต่เนื่องจากหากทำในอุตสาหกรรม เราสามารถที่จะออกแบบอุปกรณ์ในการหมักได้ง่ายกว่าวิธีอื่นๆ โดยไม่สิ้นเปลืองค่าวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี และสามารถที่จะผลิตได้หลายๆเครื่อง ถ้าหากวางแผนระบบจัดการที่ดี จะทำให้สามารถเก็บผลผลิตได้ทุกวัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด

สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด คือ ใช้ปริมาณเปลือกสับปะรด 141 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร เป็นระยะเวลา 5 วัน จะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.58 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 135.43 กรัมต่อลิตร

5.1.2 การศึกษาการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว

สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังที่หมดอายุแล้ว คือ ใช้ขนมปังที่หมดอายุแล้ว 5 วัน อัตราส่วนขนมปังต่อเปลือกสับปะรด 1:3 ปริมาณขนมปังผสมเปลือกสับปะรด 153 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ใช้ระยะเวลาในการย่อย 1 วัน จะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 2.07 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทั้งหมด 389.33 กรัมต่อลิตร

5.1.3 การศึกษาการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์

สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส คือ ใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 188 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด ปริมาณเปลือกสับปะรด 160 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร พีเอช 5.5 ควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 27.37 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 630.56 กรัมต่อลิตร และย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 120 U ต่อกรัมเปลือกสับปะรด พีเอช 3.5 อุณหภูมิ 70 องศาเซลซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 48.16 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 549.35 กรัมต่อลิตร

5.1.4 การศึกษาการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติบนเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง

สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด และหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปัง คือ ใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 8 วัน จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 5.38 โดยปริมาตร

5.1.5 การศึกษาการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังที่เลยวันหมดอายุแล้วด้วยยีสต์ขนมปัง

สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังที่หมดอายุแล้ว 1-7 วัน และหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปัง คือ ใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก พีเอช 6.4 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 8 วัน จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 4.07 โดยปริมาตร

5.1.6 การศึกษาการหมักผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์ด้วยยีสต์ขนมปัง

สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์ และหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปัง คือ ใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 5 วัน จะได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 1.10 โดยปริมาตร

5.1.7 การเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสีย และการประมาณต้นทุนการผลิตเอทานอล

จากการประเมินต้นทุนเบื้องต้น สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด และหมักด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker's Yeast) สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุด 710.71 ลิตรต่อตัน มีค่าใช้จ่ายในการผลิต 23.31 บาทต่อลิตร

2. การปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์จากขนมปังที่เลยวันหมดอายุ และหมักด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker's Yeast) ได้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุด 609.76 ลิตรต่อตัน มีค่าใช้จ่ายในการผลิต 25.14 บาทต่อลิตร

3.การปรับสภาพด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปัง (Baker's Yeast) ให้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุด 98.68 ลิตรต่อตัน มีค่าใช้จ่ายในการผลิต 64.81 บาทต่อลิตร

จากกการเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของกระบวนการผลิตเอทานอลจากผลผลิตหลังการปรับสภาพและย่อยทั้ง 3 กระบวนการ คือ การใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด การใช้จุลินทรีย์จากขนมปังที่เลยหมดอายุ และการใช้เอนไซม์ พบว่า การใช้

จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติบนเปลือกสับปะรดสามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุด คือ 710.71 ลิตรต่อตัน ซึ่งผลิตได้มากกว่าการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุเพียงเล็กน้อย แต่มากกว่าการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์ถึง 7 เท่า และค่าใช้จ่ายในการผลิตน้อยที่สุด คือ 23.31 บาทต่อลิตร โดยมีค่าใกล้เคียงกับการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่เลยวันหมดอายุ และยังน้อยกว่าการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์ถึง 3 เท่า แต่มีข้อเสีย คือ ใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพ ย่อย และหมัก ที่นานกว่า จึงทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในขั้นตอนการปรับสภาพและย่อย หากใช้ความร้อนน่าจะทำให้ได้ผลผลิตปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น

5.2.2 ในขั้นตอนการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์ น่าจะทำการเจือจางปริมาณเอนไซม์ก่อนที่จะนำไปหมักเป็นเอทานอล

5.2.3 ในขั้นตอนการปรับสภาพและย่อย น่าจะมีการเปรียบเทียบระหว่างการใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรดกับไม่มีจุลินทรีย์บนเปลือกสับปะรด

5.2.4 การเปรียบเทียบการหมักโดยใช้ยีสต์ที่แตกต่างกัน เพื่อนำมาเปรียบเทียบว่ายีสต์ชนิดไหน เหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจากเปลือกสับปะรดให้ได้ปริมาณที่มากที่สุด

5.2.5 การใช้วัตถุดิบชนิดอื่นในการผลิตเอทานอล

เอกสารอ้างอิง

คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. 2521. คณะเกษตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

จตุพร ปานทอง. 2557. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุในกระบวนการปรับสภาพและย่อยเส้นใยปาล์มด้วยเอนไซม์เพื่อการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชลดา ซื่อสัตย์, บงกชรัตน์ ปิติยนต์, ธีรภัทร ศรีนรคุตร และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2547. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: 450-458.

บัญชา โลหรัตน์. 2554. การผลิตเอทานอลจากเมล็ดขนุน. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประไพศรี สมใจ. 2535. การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำอ้อยในระดับห้องปฏิบัติการ. รายงานโครงการวิจัยที่ ภ. 30-09 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์, เยาวลักษณ์ แถลงกัณฑ์, จุฑารัตน์ นุ้ยหนู, นิรันดร์ เจริญศรี และต้อม แม้นรัมย์. 2554. การใช้ครูดเอนไซม์ผงสำหรับการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรด. การประชุมวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทย ณ โรงแรม Phuket Orchid Resort and spa หาดกะรน จังหวัดภูเก็ต ครั้งที่ 7.

ยุทธศักดิ์ สุบการี. 2551. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยใช้วิธี Simultaneous Saccharification and fermentation (SSF). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ระวีวรรณ แกล้วเกล้า. 2537. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ลักขณา เหล่าไพบูลย์, กุลเชษฐ์ เพียรทอง, วรวุฒิ ศรีดี, ประสิทธิ์ ใจศิล, มัลลิกา บุญมี และพัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2554. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และการหาสภาวะที่เหมาะสมใน

การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในระดับขยายขนาด. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น 16(8): 919-930.

วนิดา ปานอุทัย, นิคม แหลมสัก, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา และประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. 2553. การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน. การประชุมเชิงวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรลักษณ์ คงจินดามุณี. 2556. การผลิตเอทานอลจากแกนข้าวโพด. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริพงษ์ เปรมจิต, บุณฑริก ภูมิรา และวงพร เปรมจิต. 2550. การผลิตเอทานอลโดยใช้ปอสา (Paper Mulberry) เป็นวัสดุหมักด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (SSF). การประชุมเชิงวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่ง ประเทศไทย ครั้งที่ 3.

สายฤดี ด้วงหวัง. 2555. การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในทลายปาล์มด้วยวิธี Separation Hydrolysis and Fermentation. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมหวัง วีระวุฒิวงศ์, นวลพรรณ ณ ระนอง และดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2534. การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำกากส่า. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 7(2): 43-51.

อนุกูล จันทร์แก้ว, ตะวัน ฉัตรสูงเนิน และธวัชชัย จีดจาง. 2551. การผลิตเอทานอลจากการย่อยสลายวัตถุดิบเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้จังหวัดแพร่. การประชุมสัมมนาทางวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัย ณ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ครั้งที่ 1.

อัสมา หมาดหล้า. 2555. การผลิตเอทานอลจากส่วนผสมเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้ม. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Balata, M., Balat, H. and Oz, C. 2008. Progress in bioethanol processing, Progress in Energy and Combustion Science 34: 551-573.

Boonsawang, P., Subkaree, Y. and Srinorakutara, T. 2012. Ethanol production from palm pressed fiber by prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation (SSF). Biomass and Bioenergy 40: 127-132.

Choi, I.S., Kim, J.H., Wi, S.G., Kim, K.H. and Bae, H.J. 2013. Bioethanol production from mandarin peel waste using popping pretreatment. Applied Energy 102: 204-210.

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

Gnansounou, E. 2010. Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives. Bioresource Technology. 101: 4842-4850.

Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G.V., Faaij, A.P.C. 2005. Ethanol from lignocellulosic bio-mass: technoeconomic performance in short-, middle-, and long-term. Biomass and Bioenergy 28: 384-410.

Hong, Y.S. and Yoon, H.H. 2011. Ethanol production from food residues. Biomass and Bioenergy 35: 3271-3275.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analylical Chemistry 31: 426-428

Oscar, J.S. and Carlos, A.C. 2008. Trends in biotechno- logical production of fuel ethanol from different feed- stocks. Bioresource Technology 99: 5270-5295.

Parmar, I. and Rupasinghe, H.P.V. 2013. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. Bioresource Technology 130: 613-620.

Scholz, M.J., Riley M.R. and Cuello, J.L. 2013. Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biomass and Bioenergy 48: 59-65.

Sharma, S.K., Kalra, K.L. and Grewal, H.S. 2002. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. Bioresource Technology 85: 31-33.

Wyman, C.E. 2001. Twenty Year of Trials, Tribulation, and Research Progress in Bioethanol Technology. Applied Biochemistry and Biotechnology 91-93: 5-21.

Yuan, B., Wang, S.A., and Li, F.L. 2013. Improved ethanol fermentation by heterologous endoinulinase and inherent invertase from inulin by *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology 139: 402-405.

Zhang, P., Chen, C., Shen, Y., Ding, T., Ma, D., Hua., Z and Sun, D. 2013. Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. Bioresource Technology 128: 835-838.

การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า. กรมกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. http://www.dede.go.th. (สืบค้นเมื่อ 20 กรกฎาคม 2557).

การผลิตเอทานอลจากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร.กรมการพลังงานทหาร. http://www1.mod.go.th (สืบค้นเมื่อ 2 พฤษภาคม 2557).

ข้อมูลเปลือกสับปะรด. บริษัท กุยบุรีผลไม้กระป๋อง จำกัด. http://www.kuifeedpineapple.com (สืบค้นเมื่อ 1 พฤษภาคม 2557).

คู่มือด้านจุลินทรีย์. บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด. http://www.foodsafety-lcfa.com/files/foodsafety_corner/micro_manual.pdf (สืบค้นเมื่อ 20 กรกฎาคม 2557).

โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์ กระทรวงพลังงาน. http://water-pacific.com (สืบค้นเมื่อ 4 สิงหาคม 2557).

งานวิจัยการผลิตเอทานอลจากกากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร. www.mod.go.th (สืบค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2557).

เทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ขนมอบ. เทคโนโลยีราชมงคล. http://www.media.rmutt.ac.th/media/CBT/Professional (สืบค้นเมื่อ 18 มิถุนายน 2557).

ธนาคารความรู้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. http://kb.psu.ac.th (สืบค้นเมื่อ 6 พฤษภาคม 2557).

บทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ. หลักการเทคนิคปฏิบัติในประเทศไทย เกษตรธรรมชาติประยุกต์ โดย รศ.ดร.อานัฐ ต้นโซ. http://www.oknation.net (สืบค้นเมื่อ 4 พฤษภาคม 2557).

ประโยชน์ของเอนไซม์ในน้ำผักผลไม้. http://www.look4thailand.com//healthy (สืบค้นเมื่อ 4 พฤษภาคม 2557).

ผลผลิตสับปะรด. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. http://agri.dit.go.th (สืบค้นเมื่อ 6 มิถุนายน 2557).

ยีสต์ผงกับการผลิตสุราชุมชน. วุฒิ สุวพาณิชย์. http://www.surathai.net (สืบค้นเมื่อ 7 กรกฎาคม 2557).

ราคาวัตถุดิบและสารเคมี. http://www.Alibaba.com (สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2557).

สับปะรดและผลิตภัณฑ์สับปะรด. http://www.dft.go.th/Portals (สืบค้นเมื่อ 21 กรกฎาคม 2557).

อัตราค่าน้ำประปา. การประปานครหลวง. http://www.mwa.co.th (สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2557).

อัตราค่าไฟฟ้า. กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและเหมืองแร่. http://www.dpim.co.th (สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2557).

Stracture of amylase. Plant physiology. http://5e.plantphys.net (สืบค้นเมื่อ 4 สิงหาคม 2557).

Stracture of amylosepectin. Plant physiology. http://5e.plantphys.net (สืบค้นเมื่อ 4 สิงหาคม 2557).

UFM Baking & Cooking school. http://www.ufmeducation.com (สืบค้นเมื่อ 18 มิถุนายน 2557).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี Modified Dinitosalicylic Acid (Miller, 1959)

1.1 การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic Acid

ประกอบด้วยสารเคมีต่างๆดังต่อไปนี้

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

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซม์ปริมาณ 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Dinitrosalicylic Acid ปริมาณ 5 กรัม ฟีนอลปริมาณ 1 กรัม โซเดียมซัลไฟท์ปริมาณ 0.25 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 5 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทตปริมาณ 100 กรัม จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic Stirrer ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น สารละลายจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองส้มใส

1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง

1.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

(1) เตรียม Stock สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคสปริมาณ 0.1 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 700, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปต Stock สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

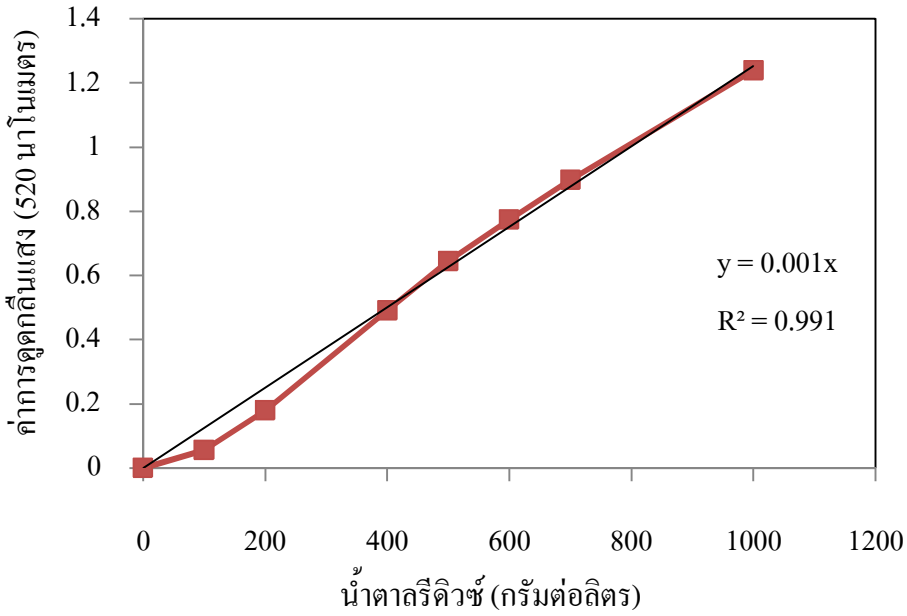
1.2.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารละลายกลูโคสเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

(1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

(2) ปิเปตสารละลาย Dinitrosalicylic Acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที

(3) นำสารตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

(4) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในสารตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงให้เห็นในภาพประกอบที่ ก-1



ภาพประกอบที่ ก-1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง

(1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

(2) ปิเปตสารละลาย Dinitrosalicylic Acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที

(3) นำสารตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

(4) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในสารตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugars) โดยวิธี Modified Phenol Sulfuric Method (Dubois et al., 1956)

2.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้

(1) ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร

(2) 5 เปอร์เซ็นต์ฟีนอล

(3) 98 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริก

2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสารตัวอย่าง

2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

(1) เตรียม Stock สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 700, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปต Stock สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

2.2.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารละลายกลูโคสเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

(1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

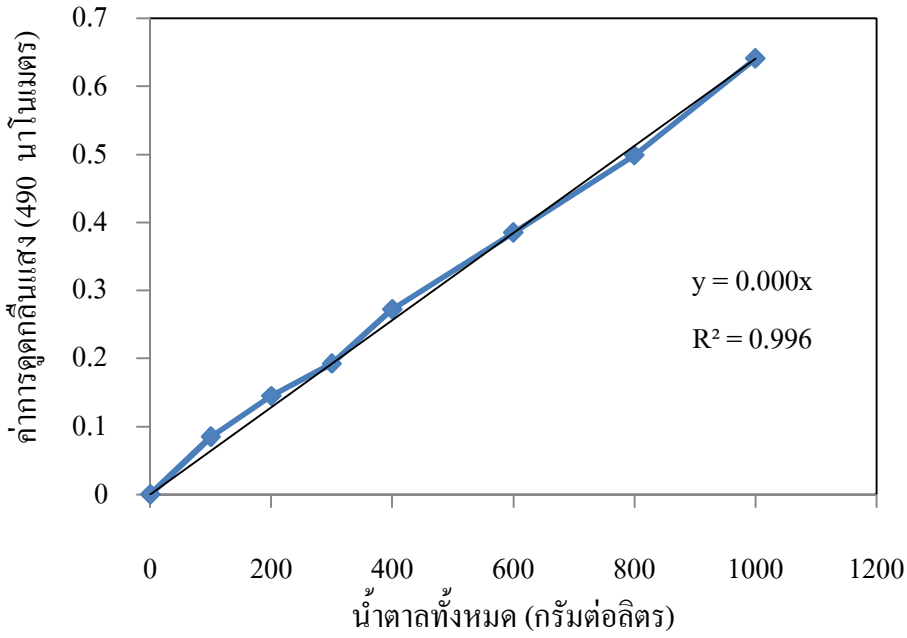
(2) ปิเปตสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ฟีนอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

(3) ปิเปตสารละลาย 98 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

(4) นำสารตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

(5) นำสารตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

(6) นำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงให้เห็นในภาพประกอบที่ ก-2



ภาพประกอบที่ ก-2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสารตัวอย่าง

(1) ปิเปตสารตัวอย่าง ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

(2) ปิเปตสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ฟีนอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

(3) ปิเปตสารละลาย 98 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

(4) นำสารตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

(5) นำสารตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

(6) นำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการหมัก

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้

(1) 99.9 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล

(2) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC)

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล

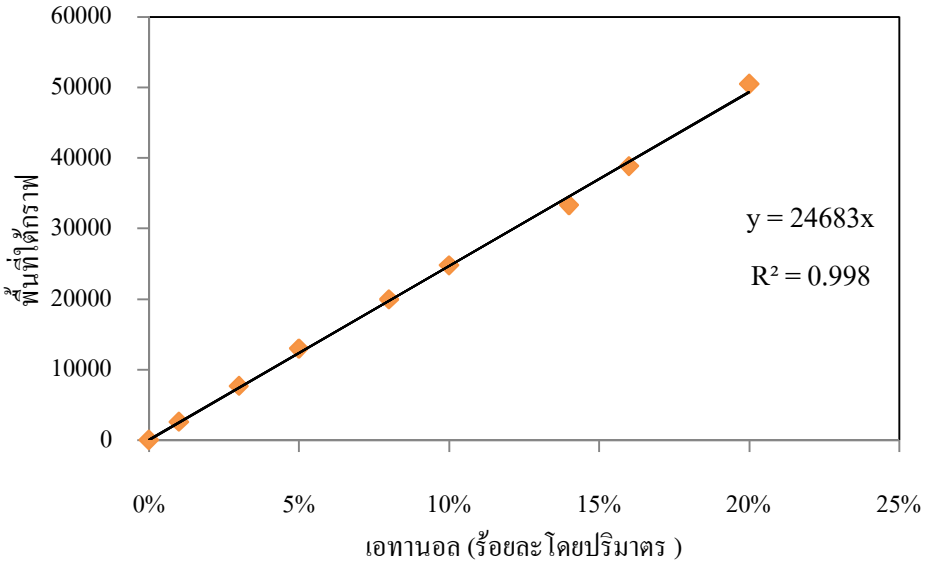
เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 8, 10, 14, 16 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยปิเปต 99.9 เปอร์เซ็ต์ เอทานอล ปริมาณ 1, 3, 5, 8, 10, 14, 16, และ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอลเพื่อใช้วิเคราะห์หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของเอทานอล

นำสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้นต่างๆไปตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ที่สภาวะดังตารางที่ ก-1 จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีค ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงในภาพประกอบที่ ก-3

ตารางที่ ก-1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

	Condition
Inlet temperature	120°C
Carrier gas	He, flow 44.6 ml/min, Split mode 2.0 min
Oven temperature	Initial temperature 120 °C held for 1 min 150 °C held for 3 min 200 °C held for 6.3 min
Column	HP-Innowax, length 30 m, internal diameter 0.32 mm and film thickness 0.25 μm



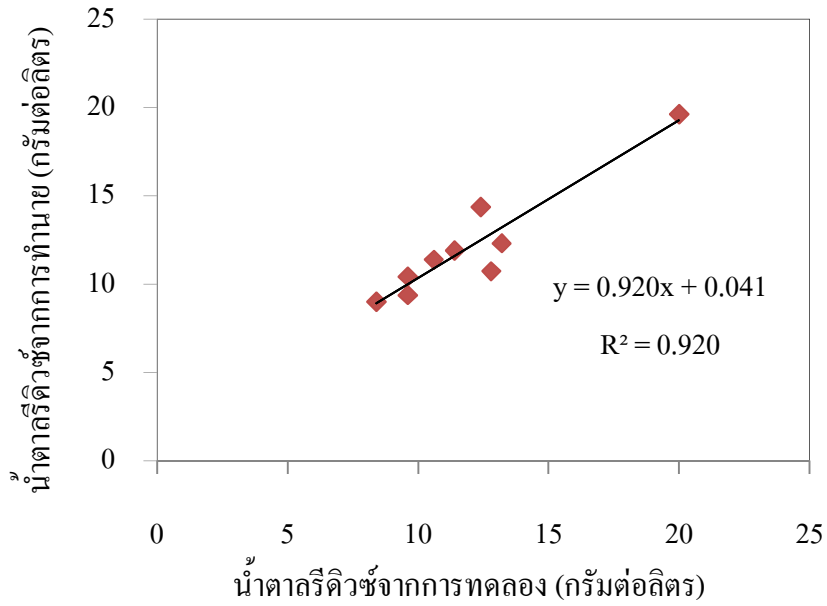
ภาพประกอบที่ ก-3 กราฟมาตรฐานเอทานอล

ภาคผนวก ข

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ตารางที่ ข-1 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด

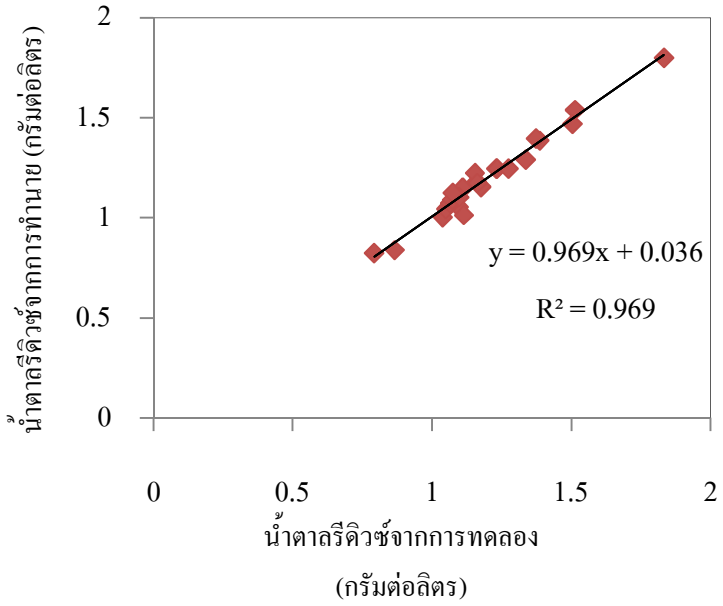
ลำดับที่	ปริมาณเปลือกสับปะรด (กรัมต่อลิตร)	เวลา (วัน)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	
			ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	109	3	0.48	0.46
2	130	8	0.59	0.58
3	130	8	0.59	0.58
4	109	12	0.53	0.53
5	130	8	0.58	0.58
6	160	8	0.54	0.52
7	151	3	0.59	0.59
8	130	14	0.51	0.50
9	151	12	0.44	0.46
10	130	1	0.52	0.54
11	100	8	0.46	0.48



ภาพประกอบที่ ข-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด

ตารางที่ ข-2 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้ขนมปังหมดอายุแล้ว 1-7 วัน

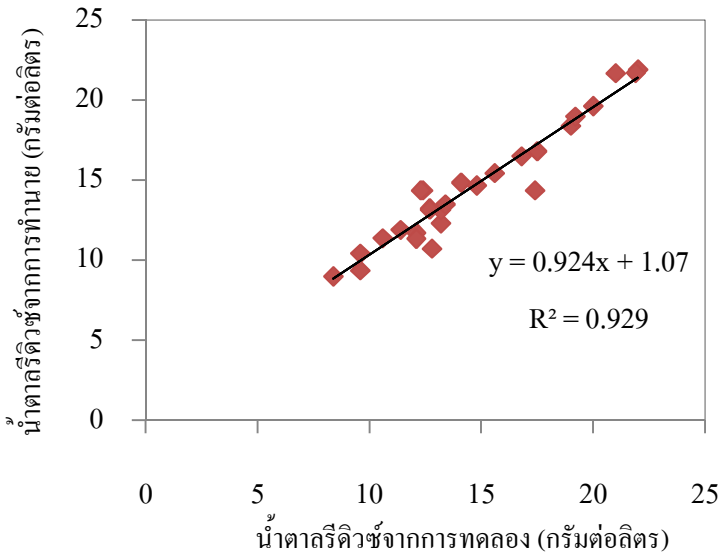
ลำดับที่	ระยะเวลาเลยวันหมดอายุของขนมปัง (วัน)	อัตราส่วนโดยน้ำหนักของขนมปังต่อเปลือกสับปะรด (กรัมต่อกรัม)	ปริมาณวัตถุดิบผสม (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (วัน)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	
					ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	1	1:6.00	130	8	0.79	0.83
2	6	1:4.50	145	4	1.51	1.54
3	4	1:6.00	160	8	1.10	1.06
4	4	1:6.00	130	8	1.23	1.25
5	4	1:6.00	130	8	1.23	1.25
6	6	1:7.50	115	11	1.10	1.14
7	3	1:7.50	145	11	1.04	1.01
8	4	1:6.00	100	8	0.87	0.84
9	6	1:4.50	145	11	1.11	1.15
10	4	1:9.00	130	8	1.18	1.16
11	3	1:4.50	145	4	1.39	1.39
12	3	1:7.50	145	4	1.16	1.18
13	3	1:4.50	115	11	1.09	1.10
14	6	1:4.50	115	4	1.16	1.23
15	3	1:7.50	115	4	1.05	1.05
16	6	1:7.50	145	4	1.37	1.40
17	4	1:3.00	130	8	1.34	1.29
18	3	1:4.50	115	4	1.18	1.16
19	4	1:6.00	130	8	1.28	1.25
20	6	1:4.50	115	11	1.07	1.08
21	7	1:6.00	130	8	1.12	1.02
22	3	1:4.50	145	11	1.07	1.09
23	3	1:7.50	115	11	1.10	1.11
24	4	1:6.00	130	14	1.51	1.47
25	6	1:7.50	115	4	1.16	1.18
26	6	1:7.50	145	11	1.08	1.13
27	4	1:6.00	130	1	1.83	1.80



ภาพประกอบที่ ข-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดด้วยการใช้จุลินทรีย์บนขนมปังหมดอายุแล้ว 1-7 วัน

ตารางที่ ข-3 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

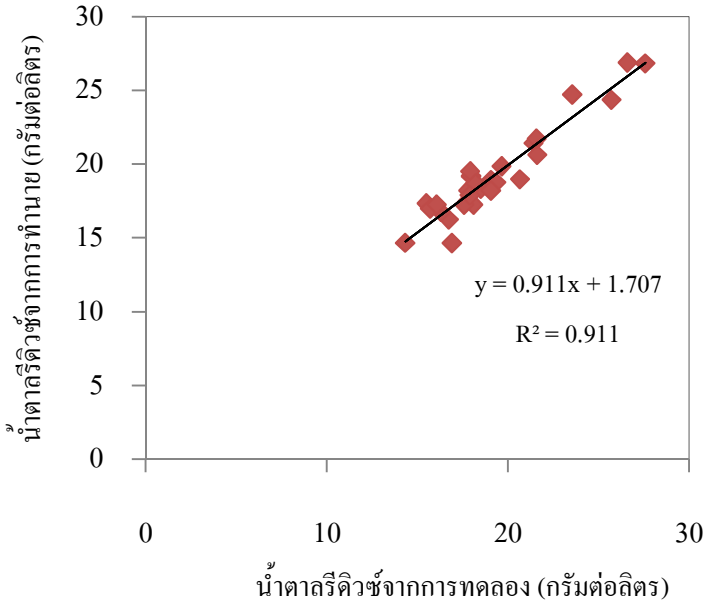
ลำดับที่	ปริมาณเปลือกสับปะรด (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (U ต่อกรัม)	ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (นาที)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	
						ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	115	93	205	105	6.6	9.60	10.42
2	130	85	100	150	6.3	9.61	9.36
3	130	85	170	150	6.3	12.42	14.36
4	115	93	135	195	6.6	8.41	9.00
5	115	78	205	195	6.6	10.63	11.38
6	130	85	170	150	7.0	12.82	10.73
7	145	93	135	195	5.9	20.01	19.62
8	100	85	170	150	6.3	13.22	12.31
9	145	93	135	105	6.6	11.44	11.90
10	130	85	170	60	6.3	17.51	16.81
11	145	78	205	105	6.6	21.02	21.68
12	145	93	205	195	6.6	12.74	13.23
13	115	93	205	195	5.9	13.22	13.14
14	160	85	170	150	6.3	22.03	21.90
15	130	85	170	240	6.3	16.81	16.50
16	130	70	170	150	6.3	19.04	18.40
17	130	100	170	150	6.3	12.13	11.71
18	130	85	240	150	6.3	12.11	11.35
19	145	93	205	105	5.9	15.61	15.44
20	115	78	205	105	5.9	13.44	13.49
21	130	85	170	150	6.3	12.32	14.36
22	115	78	135	195	5.9	14.83	14.67
23	145	78	205	195	5.9	21.91	21.70
24	130	85	170	150	6.3	17.42	14.36
25	145	78	135	105	5.9	19.21	18.97
26	115	78	135	105	6.6	14.13	14.85
27	145	78	135	195	6.6	12.74	13.16
28	130	85	170	150	5.5	15.11	16.18
29	115	93	135	105	5.9	10.52	10.41



ภาพประกอบที่ ข-3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการปรับสภาพและย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ตารางที่ ข-4 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

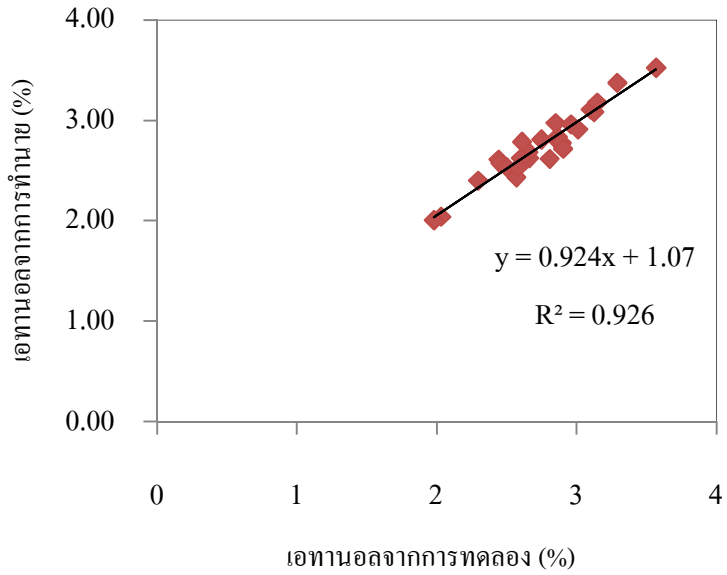
ลำดับที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (U ต่อกรัม)	ระยะเวลาในการปรับสภาพและย่อย (ชั่วโมง)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	
					ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	48	100	7	4.0	21.43	21.45
2	48	100	5	5.0	16.75	16.25
3	55	80	6	5.5	16.33	16.75
4	48	60	5	4.0	19.08	18.93
5	48	100	7	5.0	19.67	19.87
6	63	100	7	4.0	17.98	19.19
7	55	80	4	4.5	27.59	26.85
8	63	60	5	4.0	17.81	18.23
9	63	60	7	4.0	14.34	14.66
10	55	80	6	4.5	18.11	17.26
11	40	80	6	4.5	15.51	17.34
12	48	60	7	4.0	21.63	20.64
13	48	100	5	4.0	21.59	21.74
14	48	60	7	5.0	25.73	24.38
15	55	120	6	4.5	20.68	18.98
16	63	100	5	5.0	17.93	19.53
17	70	80	6	4.5	16.92	14.65
18	63	100	5	4.0	23.56	24.74
19	55	40	6	4.5	15.72	16.98
20	48	60	5	5.0	19.36	18.77
21	55	80	6	4.5	16.08	17.26
22	63	60	5	5.0	18.52	18.34
23	63	60	7	5.0	18.23	18.69
24	55	80	8	4.5	26.61	26.91
25	55	80	6	4.5	17.60	17.26
26	63	100	7	5.0	17.91	17.89
27	55	80	6	3.5	19.07	18.21



ภาพประกอบที่ ข-4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการย่อยเปลือกสับปะรดโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ตารางที่ ข-5 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด และหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปัง

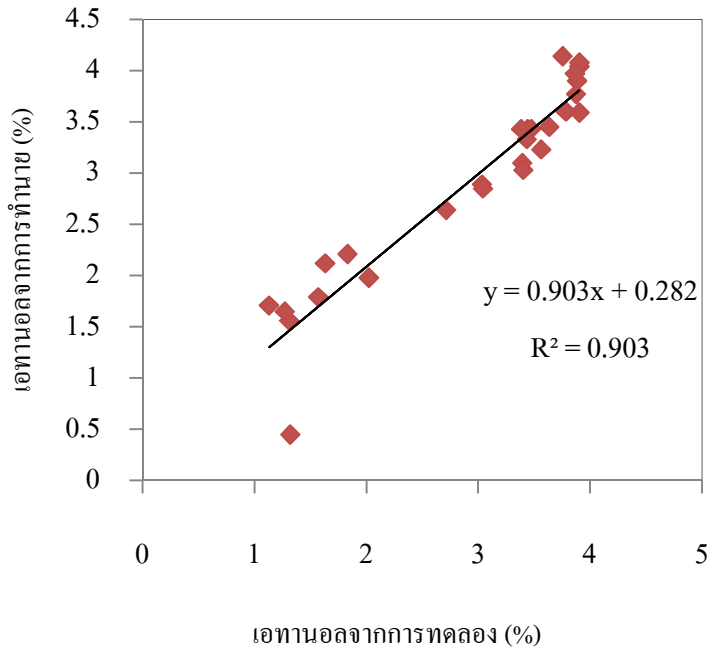
ลำดับที่	เวลา (วัน)	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (%โดยน้ำหนัก)	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอทานอล (%โดยปริมาตร)	
					ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	7	4	5.0	33	2.86	2.80
2	8	5	5.5	35	2.86	2.83
3	7	7	6.0	38	3.10	3.11
4	7	4	6.0	33	2.03	2.04
5	4	4	6.0	33	2.81	2.62
6	5	5	5.5	35	2.60	2.62
7	4	7	5.0	33	2.89	2.77
8	5	2	5.5	35	2.44	2.61
9	5	8	5.5	35	2.57	2.43
10	4	4	5.0	38	2.90	2.72
11	7	7	5.0	33	2.30	2.40
12	4	7	5.0	38	2.45	2.57
13	4	4	5.0	33	2.85	2.97
14	5	5	5.5	40	3.29	3.37
15	5	5	5.5	35	2.66	2.62
16	7	4	5.0	38	3.57	3.52
17	4	4	6.0	38	2.66	2.68
18	5	5	6.5	35	2.50	2.53
19	7	7	6.0	33	1.98	2.01
20	5	5	5.5	35	2.61	2.62
21	5	5	4.5	35	2.96	2.96
22	7	4	6.0	38	3.13	3.08
23	2	5	5.5	35	2.75	2.81
24	7	7	5.0	38	3.15	3.18
25	4	7	6.0	38	3.01	2.91
26	5	5	5.5	30	2.58	2.53
27	4	7	6.0	33	2.61	2.78



ภาพประกอบที่ ข-5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักเปลือกสับปะรดโดยใช้ยีสต์ขนมปัง ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วบนเปลือกสับปะรด

ตารางที่ ข-6 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว และหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปัง

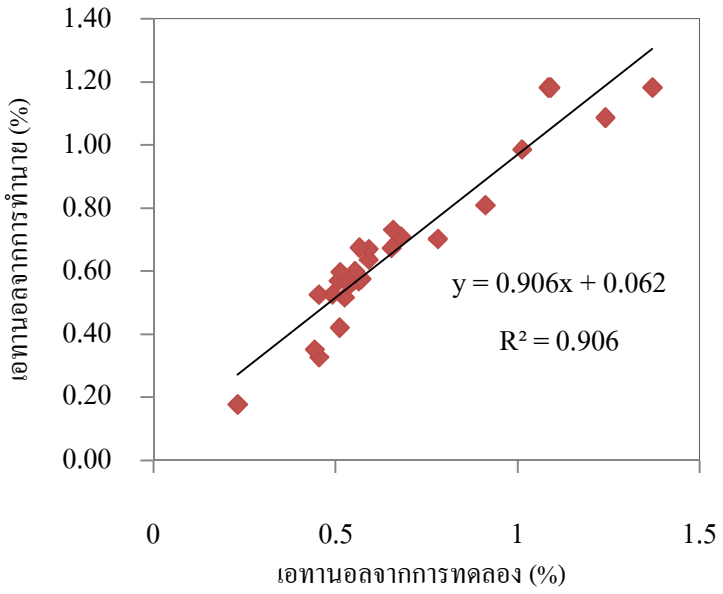
ลำดับที่	เวลา (วัน)	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (% โดยน้ำหนัก)	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอทานอล (%โดยปริมาตร)	
					ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	7	4	5.0	33	3.88	3.90
2	8	5	5.5	35	3.03	2.89
3	7	7	6.0	38	1.31	1.56
4	7	4	6.0	33	3.90	4.04
5	4	4	6.0	33	3.63	3.45
6	5	5	5.5	35	3.44	3.43
7	4	7	5.0	33	3.90	4.08
8	5	2	5.5	35	3.04	2.85
9	5	8	5.5	35	3.39	3.10
10	4	4	5.0	38	1.63	2.12
11	7	7	5.0	33	3.90	3.59
12	4	7	5.0	38	2.71	2.64
13	4	4	5.0	33	3.78	3.60
14	5	5	5.5	40	1.32	0.45
15	5	5	5.5	35	3.47	3.43
16	7	4	5.0	38	2.02	1.98
17	4	4	6.0	38	1.27	1.65
18	5	5	6.5	35	3.40	3.03
19	7	7	6.0	33	3.87	3.77
20	5	5	5.5	35	3.38	3.43
21	5	5	4.5	35	3.43	3.33
22	7	4	6.0	38	1.57	1.79
23	2	5	5.5	35	3.56	3.23
24	7	7	5.0	38	1.13	1.71
25	4	7	6.0	38	1.83	2.21
26	5	5	5.5	30	3.75	4.14
27	4	7	6.0	33	3.86	3.97



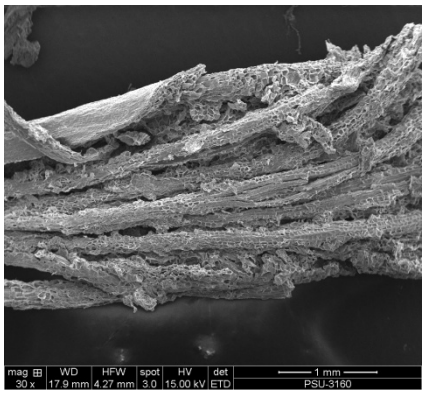
ภาพประกอบที่ ข-6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักเปลือกสับปะรดด้วยการใช้ยีสต์ขนมปัง ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์บนขนมปังที่หมดอายุแล้ว 1-7 วัน

ตารางที่ ข-7 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะ และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปัง

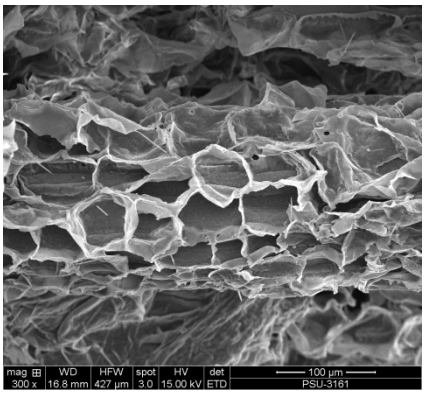
ลำดับที่	เวลา (วัน)	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (%โดยน้ำหนัก)	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอทานอล (%โดยปริมาตร)	
					ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	7	4	5.0	33	0.59	0.64
2	8	5	5.5	35	0.91	0.81
3	7	7	6.0	38	0.59	0.67
4	7	4	6.0	33	0.56	0.57
5	4	4	6.0	33	0.52	0.52
6	5	5	5.5	35	1.37	1.18
7	4	7	5.0	33	0.54	0.56
8	5	2	5.5	35	1.01	0.99
9	5	8	5.5	35	1.24	1.09
10	4	4	5.0	38	0.57	0.57
11	7	7	5.0	33	0.55	0.59
12	4	7	5.0	38	0.56	0.67
13	4	4	5.0	33	0.49	0.53
14	5	5	5.5	40	0.45	0.33
15	5	5	5.5	35	1.08	1.18
16	7	4	5.0	38	0.68	0.71
17	4	4	6.0	38	0.45	0.52
18	5	5	6.5	35	0.44	0.35
19	7	7	6.0	33	0.51	0.57
20	5	5	5.5	35	1.09	1.18
21	5	5	4.5	35	0.51	0.42
22	7	4	6.0	38	0.55	0.60
23	2	5	5.5	35	0.78	0.70
24	7	7	5.0	38	0.66	0.73
25	4	7	6.0	38	0.65	0.67
26	5	5	5.5	30	0.23	0.18
27	4	7	6.0	33	0.51	0.60



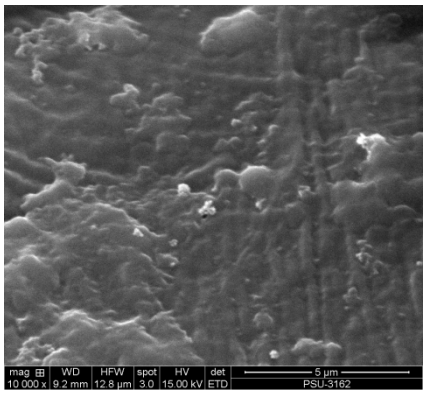
ภาพประกอบที่ ข-7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์



(ก)



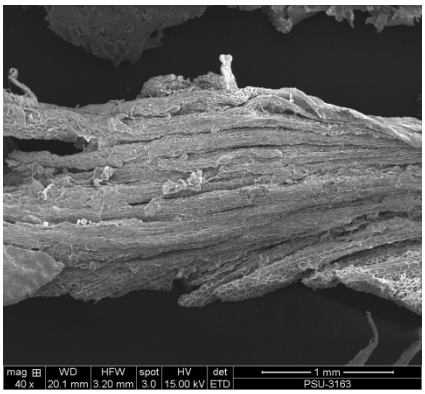
(ข)



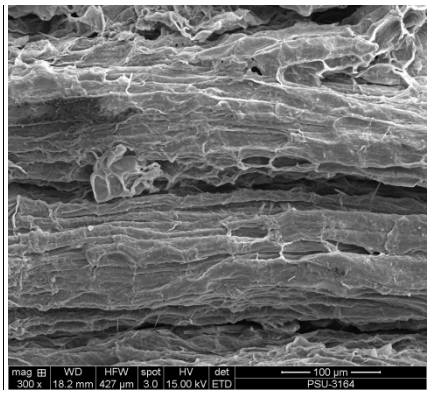
(ค)

ภาพประกอบที่ ข-8 ลักษณะพื้นผิวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ของเปลือกสับปะรด ที่กำลังขยาย (ก) กำลังขยาย 30 เท่า (ข) กำลังขยาย 300 เท่า (ค) กำลังขยาย 10000 เท่า

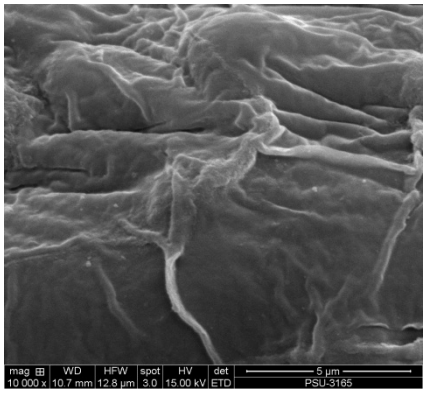
ที่มา: ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



(ก)



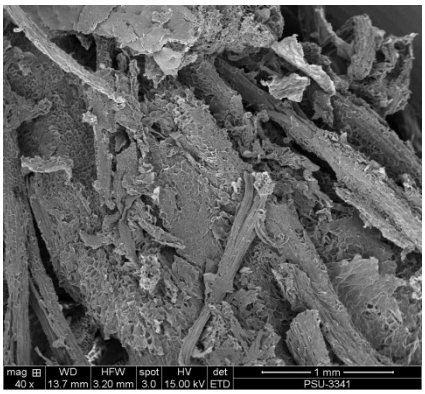
(ข)



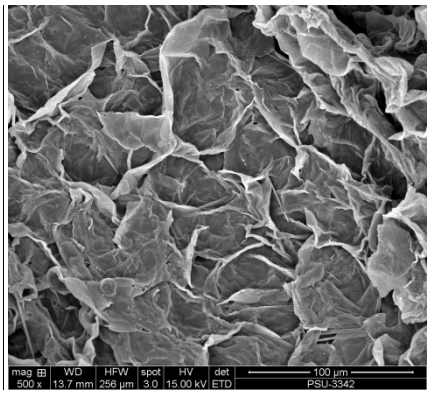
(ค)

ภาพประกอบที่ ข-9 ลักษณะพื้นผิวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ของเปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติบนเปลือกสับปะรด ที่กำลังขยาย (ก) กำลังขยาย 40 เท่า (ข) กำลังขยาย 300 เท่า (ค) กำลังขยาย 10000 เท่า

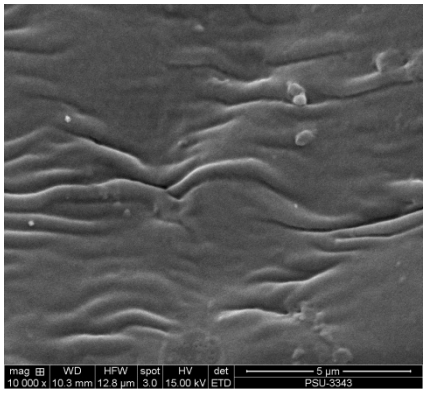
ที่มา: ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



(ก)



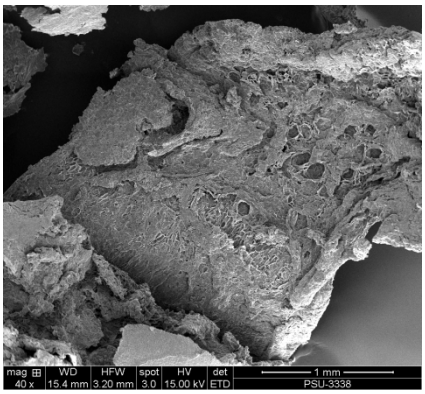
(ข)



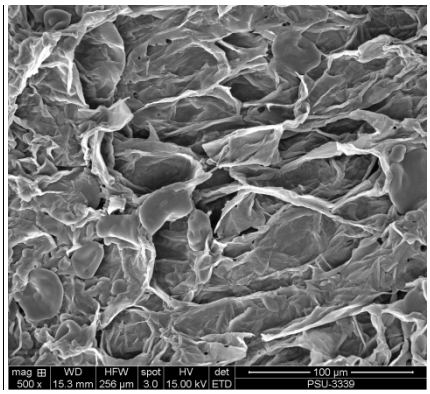
(ค)

ภาพประกอบที่ ข-10 ลักษณะพื้นผิวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ของเปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยจุลินทรีย์บนขนมปังหมดอายุ ที่กำลังขยาย (ก) กำลังขยาย 40 เท่า (ข) กำลังขยาย 500 เท่า (ค) กำลังขยาย 10000 เท่า

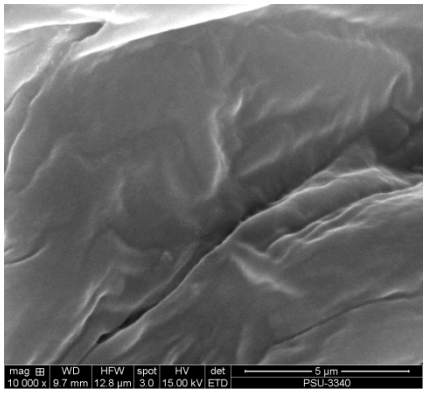
ที่มา: ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพประกอบที่ ข-11 ลักษณะพื้นผิวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ของเปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ ที่กำลังขยาย (ก) กำลังขยาย 40 เท่า (ข) กำลังขยาย 500 เท่า (ค) กำลังขยาย 10000 เท่า

ที่มา: ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ภาคผนวก ค

บทความที่เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Advanced Materials Research Vols. 941-944 (2014) pp 1060-1064
© (2014) Trans Tech Publications, Switzerland
doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.941-944.1060

Optimizing Clarification of Pineapple peel

Ugsornphak Tengrang[1, a] and Sininart Chongkhong[2, b *]

[1,2]Department of Chemical engineering, Faculty of engineering,
Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

[a]ugsornphak_ja@hotmail.com, [b]csininart@yahoo.com

Keywords: Pineapple peels, Alpha-amylase, Clarification, Enzymatic hydrolysis

Abstract. Alpha-amylase is a potentially useful enzyme for the pretreatment and pre-hydrolysis (clarification) of pineapple peel. The clarified products contain sufficient glucose content for ethanol fermentation. The influences of quantity of the peel to water (10-16 %w: weight of peel to weight of water), alpha-amylase amount (100-240 U/g: U of amylase to g of peel), pH value (5.5-7.0), temperature (70-100°C) and time (60-240 min) were investigated by RSM (Response surface methodology). To obtain 31.8 g/L of the highest glucose concentration, the clarification is to be performed by 16 %w peel to water, 188 U amylase/g, 5.5 pH at 70°C for 240 min.

Introduction

An interesting alternative energy source from biomass is ethanol [1,2], because its properties are similar to those of benzene fuels. The production cost of ethanol can be reduced with low-cost feedstocks that are agricultural products or residues (e.g. corncob, banana peel and pineapple peel) [3,4]

Alpha-amylase enzyme is widely employed in many industries which aim to hydrolyze a starchy biomass. The agricultural residues, as raw materials for the ethanol production, are mainly composed of cellulose and starch that can be effectively hydrolyzed into reducing sugars for fermentation by enzymes namely alpha-amylase and gluco-amylase [5]

Clarification process is the pretreatment and pre-hydrolysis before fermentation for the ethanol production that is studied in this research. We are intended to consider the optimal condition (quantity of peel to water, enzyme amount, pH value, temperature and time) for clarification process of the pineapple peel (an agricultural residue) by using RSM.

Materials and Chemicals

Pineapple peels from *Phu Lea* pineapple, Phuket species, that is cultivated in Nang Lea district, Chiang Rai province. The nutritive values per 100 g of the peel are 84.5 g total carbohydrate, 9.4 g protein, 5.6 g ash and 0.5 g crude fat on a dry basis. This peel was obtained from a fresh fruit shop in Hat Yai district, Songkhla province, Thailand.

Alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* (30 U/mg) was purchased from S.M. CHEMICAL SUPPLIES CO.LTD. (Catalog# 10065-10G).

Ammonia solution (25%v) used for adjusting the pH of the studied mixture and DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) used for analyzing the reducing sugar of the clarification products were purchased from C.E.G. Science & Service Limited Partnership.

Pretreatment and Clarification

The pineapple peel was firstly cut to small pieces and then crushed to a size of 2-3 mm. The crushed peel in clean water was clarified using the alpha-amylase enzyme under various conditions in 250 mL screw-capped bottles, which were immersed into an oil bath for controlling a temperature. The investigating variables for the clarification were 10-16 %w of peel to water, 100-240 U/g of alpha-amylase amount (U of amylase to g of peel), and 5.5-7.0 of initial pH by ammonia solution buffer, 70-100°C of temperature and 60-240 min of time. After the investigation in each condition, the

All rights reserved. No part of contents of this paper may be reproduced or transmitted in any form or by any means without the written permission of TTP, www.ttp.net. (ID: 110.77.216.187 22/05/14,10:33:47)

clear liquid in the clarified products was obtained from filtering through fabric, and then the glucose (reducing sugar) concentration in the liquid product was analyzed by UV-Vis spectrophotometer.

Analytical Method

DNS method [6] was used to determine the glucose concentration in the clarified products on spectrophotometer (model HP 8453 with UV-Visible ChemStation software) at λ = 520 nm. A previous calibration was applied for determining the glucose concentration.

Experimental design and Optimization

An optimal variable level was determined using central composite design (CCD) for the clarification process. Independent variables, that were investigated, were %w of peel to water (X_1, g/g), alpha-amylse amount (X_2, U/g), initial pH (X_3), temperature (X_4, °C), and time (X_5, min) . A dependent output variable was glucose concentration in the product (Y, g/L). From Table 1, 29 experiments were carried out to optimize the variables level for an optimal condition of the clarification process.

Result and Discussion

Optimization of the five variables

Table 1 CCD experiment conditions and glucose concentration results from experiment and RSM prediction

Run no.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Experimental	Predicted
						glucose concentration [g/L]	
1	16	170	6.3	85	150	22.0	21.9
2	12	205	6.6	93	105	9.6	10.4
3	13	170	7.0	85	150	12.8	10.7
4	15	135	6.6	93	105	11.4	11.9
5	13	170	6.3	85	150	17.4	14.4
6	13	100	6.3	85	150	9.6	9.4
7	13	170	5.5	85	150	15.1	16.2
8	12	205	6.6	78	195	10.6	11.4
9	15	135	5.9	93	195	20.0	19.6
10	15	205	5.9	93	105	15.6	15.4
11	12	135	5.9	78	195	14.8	14.7
12	13	170	6.3	100	150	12.1	11.7
13	15	205	5.9	78	195	21.9	21.7
14	13	170	6.3	85	60	17.5	16.8
15	13	240	6.3	85	150	12.1	11.3
16	12	135	6.6	78	105	14.1	14.8
17	15	205	6.6	93	195	12.7	13.2
18	12	135	6.6	93	195	8.4	9.0
19	15	205	6.6	78	105	21.0	21.7
20	13	170	6.3	85	150	12.3	14.4
21	15	135	5.9	78	105	19.2	19.0
22	13	170	6.3	85	240	16.8	16.5
23	15	135	6.6	78	195	12.7	13.2
24	12	135	5.9	93	105	10.5	10.4
25	13	170	6.3	70	150	19.0	18.4
26	10	170	6.3	85	150	13.2	12.3
27	12	205	5.9	93	195	13.2	13.1
28	12	205	5.9	78	105	13.4	13.5
29	13	170	6.3	85	150	12.4	14.4

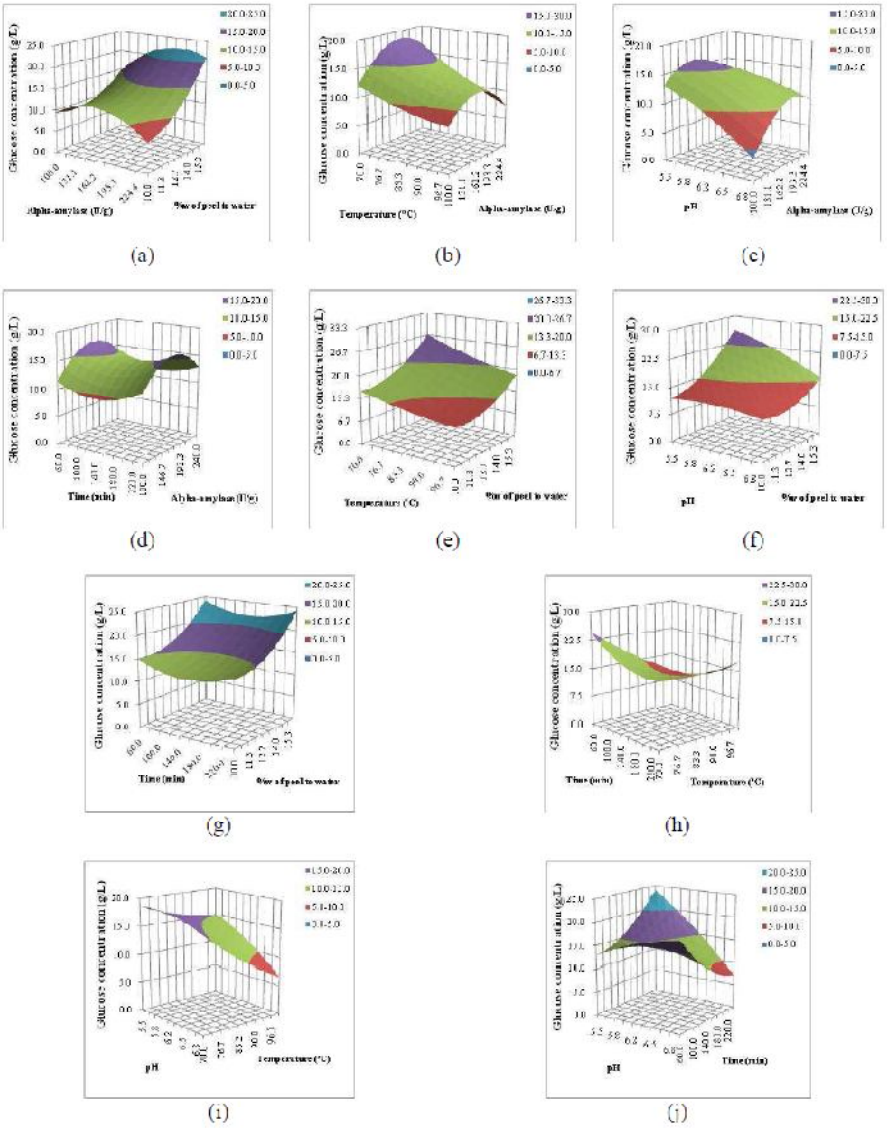


Fig. 1 Response surface plots of (a) %w of peel to water and alpha-amylase amount; (b) temperature and alpha-amylase amount; (c) pH and alpha-amylase amount; (d) time and alpha-amylase amount; (e) temperature and %w of peel to water; (f) pH and %w of peel to water; (g) time and %w of peel to water; (h) time and temperature; (i) pH and temperature; (j) pH and time.

The effects of %w of peel to water, temperature, amylase amount, time and initial pH on glucose concentration in the clarified products can be utilized to generate response surfaces which can be fitted with Eq. 1.

$$Y = -160.21 + 35.41X_1 + 0.04391X_2 + 48.94X_3 + 0.211X_4 + 0.213X_5 + 3047.1X_1^2 - 0.00082X_2^2 - 1.614X_3^2 + 0.0031X_4^2 + 0.00028X_5^2 + 1.06X_1X_2 - 107.78X_1X_3 - 2.167X_1X_4 + 0.0648X_1X_5 - 0.03667X_2X_3 - 0.00126X_2X_4 - 0.000076X_2X_5 - 0.140X_3X_4 - 0.08481X_3X_5 + 0.00276X_4X_5 \quad (1)$$

From Eq. 1, the variable coefficients of X_1, X_2, X_3, X_4, and X_5 point the priority of the variables. These are more than those of the interaction coefficients of X_1X_2, X_1X_3, X_1X_4, X_1X_5, X_2X_3, X_2X_4, X_2X_5, X_3X_4, X_3X_5 and X_4X_5, and those of X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_4^2 and X_5^2 which are a linear relationships rather than curves.

In Table 1, the experimental values of glucose concentration conform with the RSM predicted values that the regression equation shows the determination coefficient (R^2) = 0.929.

The interaction effects of %w of peel to water and alpha-amylase amount

The investigation of the effect of %w of peel to water (or starch concentration) and alpha-amylase amount on clarification process, experiments were carried out at %w of peel to water ranging from 10 to 16 and quantities of amylase ranging from 100 to 240 U/g for 150 min with an initial pH of 6.3 at a temperature of 85°C. For all %w of peel to water the glucose concentration in the clarified product was increased with increasing amount of peel. The optimum conversion was achieved with alpha-amylase amount ranging from 140-240 U/g at %w of peel to water the ranging from 15 to 16 (Fig. 1(a)).

The interaction effects of temperature and alpha-amylase amount

Fig. 1(b) shows the effect of temperature and alpha-amylase amount on glucose concentration. The clarification experiments were performed at various temperatures in the range of 70-100°C and amylase amount of 100-240 U/g for 150 min at a 13 %w of peel to water with a pH 6.3. It was found that there was no improvement of glucose concentration with increasing temperature. Similarly, further increase of enzyme amount more than 210 U/g did not increase the concentration of glucose. The fair optimum temperature and enzyme amount were given as in the range of 70-80°C and 130-240 U/g, respectively.

The interaction effects of pH value and alpha-amylase amount

In order to study the effect of initial pH and amylase amount on the clarification process, the pH used in this process was varied at 5.5, 5.9, 6.3, 6.6 and 7.0 as the amylase amount was varied at 100, 135, 170, 205, and 240 U/g for 150 min with a 13 %w of peel to water at 85°C. The results indicated that the conversion rate were reduced rapidly with increasing pH value. In contrast, the raising of glucose concentration would be obtained with increasing amylase amount (Fig. 1(c)). To get an optimum glucose concentration the clarification should be operated at a pH in the range of 5.5-6.2 and an amount of amylase in the range of 100-208 U/g.

The interaction effects of time and alpha-amylase amount

Fig. 1(d) shows the effects of time (60-240 min) and alpha-amylase amount (100-240 U/g) on the clarification process at 85°C with a 13 %w of peel to water and a pH of 6.3. The results implied that the clarification should be not carried out for a time in the range of 85-140 min. However, it should be carried out with an amount of amylase in the range of 120-225 U/g to achieve a high concentration of glucose.

The interaction effects of temperature and %w of peel to water

The clarification was investigated at various temperatures ranging from 70-100°C and %w of peel to water ranging from 10 to 16 for 150 min using an amylase amount of 170 U/g and a pH of 6.3. It can be seen in Fig. 1(e) that the glucose concentration was raised when the %w of peel to water was increased. But temperature was to be decreased. To reach the maximum content, this process may be operated at 70 °C with a 16 %w of peel to water.

The interaction effects of pH and %w of peel to water

Glucose concentration of the clarification process in ralation with initial pH value and %w of peel to water is shown in Fig. 1(f). The optimum conversion was achieved with the pH value in the range of 5.5-6.5 and %w of peel to water in the range of 15-16 for 150 min at 85°C and an amylase amount of 170 U/g. In addition, the results indicated that further increase of pH value (> 6.5) did not increase the concentration of glucose.

The interaction effects of time and %w of peel to water

Fig.1(g) shows the effects of time and %w of peel to water on glucose concentration at 170 U amylase/g, 6.3 pH value and 85°C. The formation of glucose was increased when quantity of peel to water was increase. However, the increase of time did not increase the concentration of glucose.

The interaction effects of time and temperature

The glucose concentration in relation with time and temperature at 13 %w of peel to water, 170 U amylase/g and 6.3 pH is show in Fig. 1(h). The optimum concentration of glucose may be gotten at a mild operating condition (70°C for 60 min).

The interaction effects of pH and temperature

Fig. 1(i) shows the effects of pH value and temperature on glucose concentration at 13 %w of peel to water, 170 U amylase/g for 150 min. The formation of sugar content would be increased when pH and temperature were reduced. This alpha-amylase enzyme could be active with relatively acidic condition (pH~5.5).

The interaction effects of pH and time

Effects of pH value and time on glucose concentration are shown in Fig. 1(j) at 13 %w of peel to water, 170 U amylase/g and 85°C. The pre-hydrolysis yield was increased with an increase in time. But the yield was decreased when the pH value was increased. The clarification should be operated with a pH in the range of 5.5-5.8 for a time in the range of 200-240 min.

Summary

The clarification process for the ethanol production from pineapple peel before saccharification and fermentation processes was optimized by RSM to determine an optimal condition. From the investigation of the 5 important variables (%w of peel to water, alpha-amylase amount, pH value, temperature and time), the highest glucose concentration in the clarified product, which is obtained from the experiment using 16 %w of peel to water, 188 U/g amylase amount, 5.5 pH value at 70°C for 240 min, is 31.8 g/L. This glucose result demonstrates that the clarification pretreatment and pre-hydrolysis, of starch in the peel with alpha-amylase is sufficient for the ethanol fermentation that may not have to go through the saccharification with gluco-amylase.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support from the NRCT (National Research Council of Thailand) 2014, Contract No. ENG5701035, Prince of Songkla University.

References

[1] M. Balata, H. Balat, C. Oz, Progress in bioethanol processing, Prog. Energy Combust. Sci. 34 (2008) 551-573.

[2] E. Gnansounou, Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives, Bioresour. Technol. 101 (2010) 4842-4850.

[3] J.S. Oscar and A.C. Carlos, Trends in biotechno- logical production of fuel ethanol from different feed- stocks, Bioresour. Technol. 99 (2008) 5270-5295.

[4] C.E. Wyman, Twenty Year of Trials, Tribulation, and Research Progress in Bioethanol Technology, Appl. Biochem. Biotechnol. 91-93 (2001) 5-21.

[5] C.N. Hamelinck, G.V. Hooijdonk, A.P.C. Faaij, Ethanol from lignocellulosic bio-mass: techno economic performance in short-, middle-, and long-term, Biomass Bioenerg. 28 (2005) 384-410.

[6] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Anal. Chem. 31 (1959) 426-428