การผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยกระบวนการแบบกะ
Batch Production of Bio-ethanol from Nipa Sap

ศิรินันท์ พ่วงพี

Sirinun Puangpee

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
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยกระบวนการแบบกะ
Batch Production of Bio-ethanol from Nipa Sap

ศิรินันท์ พ่วงพี
Sirinun Puangpee

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
2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยกระบวนการแบบกะ
ผู้เขียน นางสาวศิรินันท์ พ่วงพี
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินินาฏ จงคง)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา ศรีสุวรรณ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินินาฏ จงคง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินินาฏ จงคง)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวศิรินันท์ พ่วงพี)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวศิรินันท์ พ่วงพี)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยกระบวนการแบบกะ
ผู้เขียน นางสาวศิรินันท์ พ่วงพี
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

น้ำหวานจากเป็นวัตถุดิบที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล เนื่องจากมีสารอาหารน้ำตาลเบื้องต้น แร่ธาตุ วิตามินและยีสต์ในน้ำหวาน งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากสดโดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการอุ่นน้ำหวานจากก่อนนำไปหมักเป็นเอทานอล และเปรียบเทียบการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์สองชนิด คือ ยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

การอุ่นน้ำหวานจากนั้นศึกษาโดยพิจารณาทั้งน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณยีสต์ที่มีอยู่แล้วในน้ำหวานจากหลังอุ่น การพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดนั้นทำการศึกษาโดยปรับพีเอชเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 4.5-6.5 แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-30 นาที สำหรับการศึกษาปริมาณยีสต์ที่มีอยู่แล้วในน้ำหวานจากหลังอุ่นนั้น ทำการศึกษาโดยนำน้ำหวานหลังการอุ่นของทุกสภาวะมาทำการหมักเบื้องต้นโดยการผสมกับน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วใส่ยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม (0.1 กรัมต่อสารละลาย 100 กรัม) หลังจากนั้นหมักที่อุณหภูมิห้อง (28-33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่พีเอชเริ่มต้นเป็น 4.9 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาทีเป็นสภาวะที่เหมาะสมเพราะได้ค่าน้ำตาลทั้งหมด 410.58 กรัมต่อลิตร และเอทานอลร้อยละ 10.34 โดยปริมาตร ซึ่งทั้งสองค่านั้นเป็นค่าที่สูงที่สุดจากทุกสภาวะการทดลอง

หลังจากนั้นนำสภาวะการอุ่นน้ำหวานจากที่เหมาะสม มาศึกษาการหมักด้วยยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก ด้วยความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 10-30 โดยน้ำหนัก พีเอชเริ่มต้น 4.5-6.5 ปริมาณยีสต์ 10^8-10^{10} CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม หมักที่อุณหภูมิ 28-40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-144 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังคือ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก พีเอชเริ่มต้น 6 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^8 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม หมักที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 111 ชั่วโมงจะทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลร้อยละ 16.87 โดยปริมาตร สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากคือ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก พีเอชเริ่มต้น 6 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 111 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลร้อยละ 26.91 โดยปริมาตร

เมื่อทำการประเมินค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจาก พบว่าการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังมีค่าใช้จ่ายในการผลิต 18.37 บาทต่อลิตร และผลผลิตเอทานอล 229 ลิตรต่อตันน้ำหวานจาก สำหรับการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก มีค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอล 33.39 บาทต่อลิตรและผลผลิตเอทานอล 384 ลิตรต่อตันน้ำหวานจาก

Thesis Title Batch Production of Bio-ethanol from Nipa Sap
Author Miss Sirinun Puangpee
Major Program Chemical Engineering
Academic Year 2015

Abstract

Nipa sap is efficient feedstock for ethanol production due to nutrient, sugar, vitamin, mineral and yeast in the sap. The aim of this work is ethanol production from nipa sap. The nipa sap preparation was studied. Then the fermentation by using Baker's yeast and isolated yeast were compared.

Total sugar and quantities of yeast after preparation were considered to select optimum condition of nipa sap preparation. The pH of the sap was adjusted to be 4.5-6.5. Then the sap was warming under controlled temperature of 30-60°C for studied time of 5-30 min. After that the mixed solution, prepared sap and distilled water with a ratio of 1:1, was fermented at room temperature (28-33°C) for 48 h using 10^9 CFU/100 g solution (0.1 g/100 g solution) of Baker's yeast. The results indicated that initial pH of 4.9 at 54°C of warming temperature for 25 min was optimum condition because this condition provided maximum total sugar (410.58 g/L) and maximum ethanol (10.34 %v).

After that the optimum prepared products were fermented by using Baker's yeast and isolated yeast. Significant factors were 10-30 %w of sugar concentration, pH of 4.5-6.5, 10^8-10^{10} CFU/100 g solution of yeast load at temperature of 28-40°C for 10-144 h. The optimum condition of fermentation using Baker's yeast was 25 %w of sugar concentration, pH of 6 with 10^8 CFU/100 g solution of Baker's yeast load at 31°C for 111 h which providing 16.87 %v ethanol. The optimum ethanol (26.91 %v) of fermentation using isolated yeast was obtained at 25 %w of sugar concentration, pH of 6, 10^9 CFU/100 g solution of isolated yeast under 37°C for 111 h.

The production cost of two methods was estimated. They were found that the ethanol production using Baker's yeast expended 18.37 Baht/L and yielded 229 L/ton (L ethanol to ton peel). While the ethanol production using isolated yeast priced 33.39 Baht/L and yield 384 L/ton.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สินินาฏ จงคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำทั้งความรู้ ด้านการเรียน การวิจัยและการใช้ชีวิต รวมทั้งแนะแนวทางในการแก้ปัญหา กระบวนการคิด ตลอดจนตรวจทานแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ให้ดำเนินไปอย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา ศรีสุวรรณ รองศาสตราจารย์ ดร. ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์ และรองศาสตราจารย์ ดร. กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณโกวิทย์ จันทรังษี เจ้าของไร่จากที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบน้ำหวานจากและอำนวยความสะดวกในการไปรับวัตถุดิบน้ำหวานจากที่จังหวัด นครศรีธรรมราช

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการแยกเชื้อและเพาะเชื้อยีสต์เพื่อมาใช้ในการทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ทุนโครงการตรี-โท 5 ปี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาและค่าครองชีพรายเดือน

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้จัดสรรทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์เพื่อใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และบุคลากรทุกท่าน ที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ และเอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนให้คำปรึกษา แนะนำ ให้กำลังใจทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ศิรินันท์ พ่วงพี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	5
2.1 ต้นจาก	5
2.2 เอทานอล	7
2.2.1 เทคโนโลยีการผลิตเอทานอล	7
2.2.1.1 การสังเคราะห์เอทานอลจากกระบวนการทางเคมี โดยสังเคราะห์เอทานอลจากเอทิลีน	7
2.2.1.2 การหมักเอทานอล	8
2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล	8
2.2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก	8
2.2.2.2 ปริมาณอาหารและสับสเตรท	9
2.2.2.3 พีเอชเริ่มต้น	9
2.2.2.4 อุณหภูมิ	9
2.2.2.5 อากาศ	9
2.2.2.6 เอทานอล	9
2.2.2.7 ความเข้มข้นของน้ำตาล	9
2.2.2.8 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	9
2.2.3 กระบวนการการหมักเอทานอล	10
2.2.3.1 การหมักแบบกะ	10
2.2.3.2 การหมักแบบกึ่งกะ	10
2.2.3.3 การหมักแบบต่อเนื่อง	10
2.3 ไม้เคี่ยม	10
2.4 บทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก	11
2.4.1 การหมักให้เกิดแอลกอฮอล์	11
2.4.2 การหมักให้เกิดกรดแลคติก	11

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

2.4.3 การหมักให้เกิดกรดอะซิติก 11
2.5 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง 11
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย 17
3.1 วัสดุ 17
3.2 อุปกรณ์ 18
3.3 วิธีการทดลอง 20
3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำหวานจาก 20
3.3.2 ศึกษาการเตรียมวัตถุดิบน้ำหวานจาก 20
3.3.3 ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง 21
3.3.4 ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 22
3.3.5 ศึกษาการเพิ่มขนาดการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ 23
3.3.6 ศึกษาสภาวะในการกลั่นเอทานอล 23
3.3.7 ประมาณต้นทุนการผลิตเอทานอล 24
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 25
4.1 องค์ประกอบของน้ำหวานจาก 25
4.2 การเตรียมวัตถุดิบน้ำหวานจาก 26
4.3 การหมักเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker’s yeast) 33
4.4 การหมักเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก (Isolated yeast) 43
4.5 การเพิ่มขนาดการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ 52
4.6 การกลั่นเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอล 53
4.7 ผลการประเมินต้นทุนการผลิตเบื้องต้น 54

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	60
5.1 สรุปผลการทดลอง	60
5.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยเพิ่มเติม	61
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก	67
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์	68
ภาคผนวก ข ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง	76
ประวัติผู้เขียน	89

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
4-1	แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจาก	25
4-2	แสดงน้ำตาลทั้งหมดของวัตถุดิบน้ำตาล	26
4-3	สภาวะการทดลองจากโปรแกรม RSM ผลน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมดหลังการอุ่นน้ำหวานจากและเอทานอลหลังการหมัก	27
4-4	สภาวะการทดลองจากโปรแกรม RSM และผลเอทานอล หลังการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	34
4-5	สภาวะการทดลองจากโปรแกรม RSM และผลเอทานอล หลังการหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	44
4-6	เปรียบเทียบเอทานอลหลังการหมักด้วยขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร กับถังหมักขนาด 5 ลิตร	52
4-7	ค่าอุณหภูมิเครื่องให้ความร้อนและเอทานอลที่ อุณหภูมิไอ 76, 78 และ 80 องศาเซลเซียส	53
4-8	สภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตเอทานอลแต่ละกระบวนการผลิต	54
4-9	ราคาวัตถุดิบ สารเคมีและ สาธารณูปโภคที่ใช้ประมาณ คำนวณค่าใช้จ่ายในการผลิต	55
4-10	ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่าย ในการผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง ที่ผลผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 โดยปริมาตร)	55
4-11	ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่าย ในการผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวาน จาก ที่ผลผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 โดยปริมาตร)	56
4-12	สรุปต้นทุนในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีที่แตกต่างกันด้วยสภาวะ การหมักที่เหมาะสมของแต่ละวิธี	56
4-13	การเปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบต่างๆ	57
4-14	การเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการผลิตเอทานอลโดยการหมักด้วย ยีสต์ขนมปังและการหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	58
4-15	เปรียบเทียบปริมาณยีสต์ขนมปังที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 โดยปริมาตรที่ผลผลิตเอทานอล 1 ลิตร	59
ก-1	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทดลอง	72
ข-1	แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจากรอบวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2558	76
ข-2	แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจากรอบวันที่ 18 มิถุนายน พ.ศ. 2558	76
ข-3	แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจากรอบวันที่ 4 กันยายน พ.ศ. 2558	77

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ข-4	แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจากรอบวันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558	77
ข-5	แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังการอุ่นน้ำหวานจาก	78
ข-6	แสดงปริมาณเอทานอลหลังหมักเบื้องต้นน้ำหวานจากที่ผ่านการอุ่นแล้ว	80
ข-7	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดหลังหมักน้ำหวานจาก ที่ผ่านการอุ่นแล้ว	82
ข-8	แสดงปริมาณเอทานอลหลังหมักที่ได้จากการหมักน้ำหวานจาก ด้วยยีสต์ขนมปัง	83
ข-9	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และพีเอชหลังหมักที่ได้จาก การหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง	85
ข-10	แสดงปริมาณเอทานอลหลังหมักที่ได้จากการหมักน้ำหวานจาก ด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	86
ข-11	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมดและพีเอชหลังหมัก ที่ได้จากการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	88

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่ **หน้า**

1-1	การผลิตสุราพื้นบ้านจากน้ำหวานจาก	2
1-2	แผนผังสรุปขอบเขตของงานวิจัย	4
2-1	ส่วนประกอบของต้นจาก	5
2-2	การเก็บน้ำหวานจาก	6
2-3	การโซมน้ำหวานจากเพื่อทำน้ำตาลปี๊บ	6
3-1	น้ำหวานจากสด	17
3-2	ตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking incubator)	19
3-3	UV Visible Spectrophotometer (UV) รุ่น HP 8453	19
3-4	Gas chromatography (GC) รุ่น 6890 flame ionization ยี่ห้อ Agilent	20
3-5	ขั้นตอนการศึกษาการเตรียมน้ำหวานจาก	21
3-6	ชุดขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร	21
3-7	ขั้นตอนการศึกษาการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง และยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	22
3-8	ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	22
3-9	ถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร (สร้างจากงานวิจัย ผศ. ดร. สินินาฏ จงคง ทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2554)	23
3-10	ชุดเครื่องกลั่น (สร้างจากงานวิจัย ผศ. ดร. สินินาฏ จงคง ทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2554)	23
4-1	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิต่อน้ำตาลทั้งหมดที่ระยะเวลาในการอุ่น 18 นาที	28
4-2	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการอุ่นต่อน้ำตาลทั้งหมดที่อุณหภูมิในการอุ่น 45 องศาเซลเซียส	28
4-3	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการอุ่นต่อน้ำตาลทั้งหมดที่พีเอชเท่ากับ 5.5	29
4-4	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอลที่ระยะเวลาในการอุ่น 18 นาที	30
4-5	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการอุ่นต่อเอทานอลที่อุณหภูมิในการอุ่น 45 องศาเซลเซียส	31
4-6	กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการอุ่นต่อเอทานอลที่พีเอชเท่ากับ 5.5	31

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-7 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชต่อเอทานอล ที่ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 35

4-8 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณยีสต์ขนมปังต่อเอทานอลที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 36

4-9 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและอุณหภูมิต่อเอทานอลที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 36

4-10 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส 37

4-11 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 38

4-12 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 38

4-13 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส 39

4-14 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยีสต์ขนมปังและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 40

4-15 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยีสต์ขนมปังและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส 40

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-16 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอลที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม 41

4-17 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชต่อเอทานอล ที่ปริมาณ ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 45

4-18 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณ ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 46

4-19 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและอุณหภูมิต่อเอทานอลที่ พีเอช 5.5 ปริมาณ ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 46

4-20 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส 47

4-21 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 47

4-22 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 48

4-23 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอลที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส 49

4-24 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 เป็นเวลา 77 ชั่วโมง 49

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

4-25 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก และระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส 50

4-26 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก ต่อเอทานอลที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม 51

ก-1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 69

ก-2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 70

ก-3 กราฟมาตรฐานเอทานอล 72

ก-4 การเจือจางแบบ serial number 74

ก-5 วิธีการ spread plate 75

ข-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการอุ่นน้ำหวานจาก 79

ข-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการอุ่นน้ำหวานจาก 81

ข-3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง 84

ข-4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 87

บทที่ 1

บทนำ

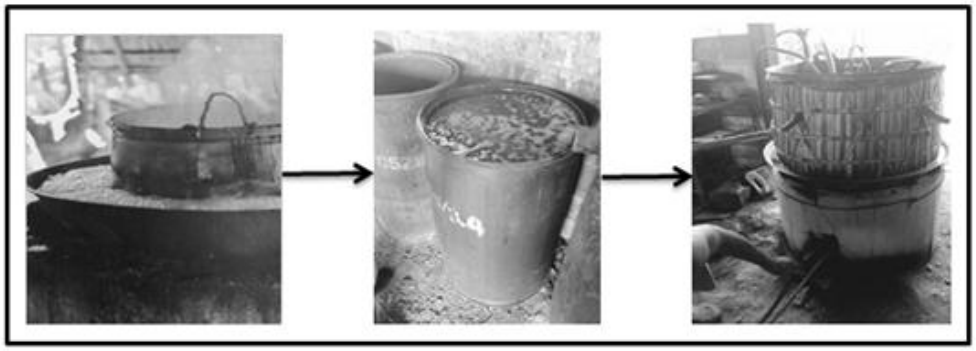
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

พลังงานเป็นปัจจัยที่สำคัญในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจ ปัจจุบันวิกฤตการณ์ด้านน้ำมันปิโตรเลียมได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เอทานอลซึ่งเป็นพลังงานทดแทนที่สะอาดได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น โดยประเทศที่เป็นทั้งผู้ผลิตและบริโภครายใหญ่ของโลกคือ สหรัฐอเมริกาและบราซิล ในขณะที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตเอทานอลอันดับ 9 และการบริโภคอยู่ที่อันดับ 11 ของโลก (คมสันติ์, 2555) ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีวัตถุดิบที่เอื้อต่อการผลิตเอทานอลมากมาย เช่น อ้อย กากน้ำตาล มันสำปะหลัง เป็นต้น แต่พบว่าต้นทุนการผลิตเอทานอลของประเทศไทยยังคงสูงอยู่เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตระดับพาณิชย์มีราคาสูง ส่งผลให้ผู้ประกอบการบางรายของประเทศไทยต้องชะลอการผลิตลง ซึ่งสวนทางกับความต้องการเอทานอลที่สูงขึ้นที่ใช้เพื่อการผลิตแก๊สโซฮอล์ (เบนซินผสมกับเอทานอล) เช่น E10, E20 และ E85 และใช้เพื่อการตอบสนองนโยบายของรัฐบาลที่กระทรวงพลังงานจัดทำแผนให้มีการใช้พลังงานทางเลือกร้อยละ 25 ใน 10 ปี (พ.ศ. 2555-2564) (Alternative Energy Development Plan : AEDP 2012-2021) โดยกำหนดเป้าหมาย 3,285 ล้านลิตรในปี 2564 ขณะที่ปัจจุบันไทยผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลและมันสำปะหลังได้รวมกัน 817.5 ล้านลิตรต่อปี ดังนั้นไทยจะต้องเพิ่มผลผลิตเอทานอลร้อยละ 13.6 ต่อปีภายใน 10 ปี จึงจะได้ตามแผนที่ตั้งไว้ (คมสันติ์, 2555)

แนวทางการแก้ไขปัญหาราคาวัตถุดิบที่สูง (เนื่องจากอ้อยและมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเพื่อการบริโภคและสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นได้อีกมากมาย) และตอบสนองนโยบายของรัฐบาล เราจึงต้องสร้างทางเลือกด้านวัตถุดิบที่มีศักยภาพเพียงพอในการผลิตเอทานอลนั่นคือน้ำหวานจากสด จากการศึกษาหาข้อมูลเบื้องต้นพบว่าต้นจากเป็นพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน สามารถสร้างงาน สร้างรายได้จากภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตั้งแต่รุ่นบรรพบุรุษ นอกจากนี้การปลูกจากนั้นเป็นการพัฒนาตามแนวพระราชดำริของในหลวงฯ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาดินเค็มในพื้นที่นากุ้งร้างได้ และต้นจากยังเป็นวัตถุดิบที่มีข้อได้เปรียบกว่าอ้อย คือ สามารถเติบโตได้เองตามธรรมชาติ ไม่ต้องใช้ยากำจัดวัชพืชหรือยาฆ่าแมลง ไม่ต้องใช้เครื่องจักรในการรีดเอาน้ำหวานและสามารถให้ปริมาณน้ำตาลมากอีกด้วย แม้ว่าจะมีการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากเป็นสุราพื้นบ้านมานานแล้ว แต่ยังไม่มีการนำน้ำหวานจากมาพัฒนาเป็นพลังงานทดแทนในเชิงพาณิชย์ได้ อาจเป็นเพราะในน้ำหวานจากมีจุลินทรีย์หลายชนิดส่งผลให้เกิดการบูดได้ง่าย การผลิตสุราพื้นบ้านแสดงดังภาพประกอบที่ 1-1 โดยนำน้ำหวานจากไปให้ความร้อนจนกลายเป็นน้ำหวานเข้มข้นเพื่อป้องกันการบูดก่อนนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล แล้วหมักด้วยยีสต์ที่ต่อกันมาเป็นทอดๆ ไม่มีความเข้มข้นที่แน่นอนเป็นเวลาประมาณ 21 วันแล้วทำการกลั่นเอทานอลแบบภูมิปัญญาชาวบ้านทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน เวลาและทรัพยากร ส่งผลให้ค่าดำเนินการผลิต

สูง และการผลิตสุราพื้นบ้านยังมีวัตถุดิบอื่นอีกมากมาย ในขณะที่พลังงานทดแทนนั้นหาวัตถุดิบที่คุ้มค่าและมีศักยภาพได้ยาก

งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากสดโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำหวานจากให้เกิดประโยชน์ ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหวานจาก และทำการศึกษาหาสภาวะในการหมักเอทานอลโดยเปรียบเทียบระหว่างยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) และยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก (Isolated yeast) มุ่งเน้นการดำเนินการผลิตและเทคโนโลยีการพึ่งพาตนเองอย่างง่าย เพื่อสามารถถ่ายทอดให้แก่ชุมชนได้



ภาพประกอบที่ 1-1 การผลิตสุราพื้นบ้านจากน้ำหวานจาก

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหวานจากสดสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล
2. เพื่อศึกษาหากระบวนการและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำหวานจากสดโดยใช้ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) เปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากสด ด้วยกระบวนการแบบกะ (Batch)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สร้างมูลค่าเพิ่มให้ผลผลิตจากต้นจาก
2. ได้องค์ความรู้ใหม่สำหรับการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากสด

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1. ใช้น้ำหวานสดจากต้นจาก (ในเขตชุมชนป่าจาก ต.ขนาบนาก อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช) เป็นวัตถุดิบ
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมวัตถุดิบน้ำหวานจากโดยชะลอการทำงานของจุลินทรีย์โดยการให้ความร้อนและปรับพีเอช
3. ศึกษาเปรียบเทียบการหมักไบโอเอทานอลจากน้ำหวานจากสดโดยใช้ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) และ ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก (โดยภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

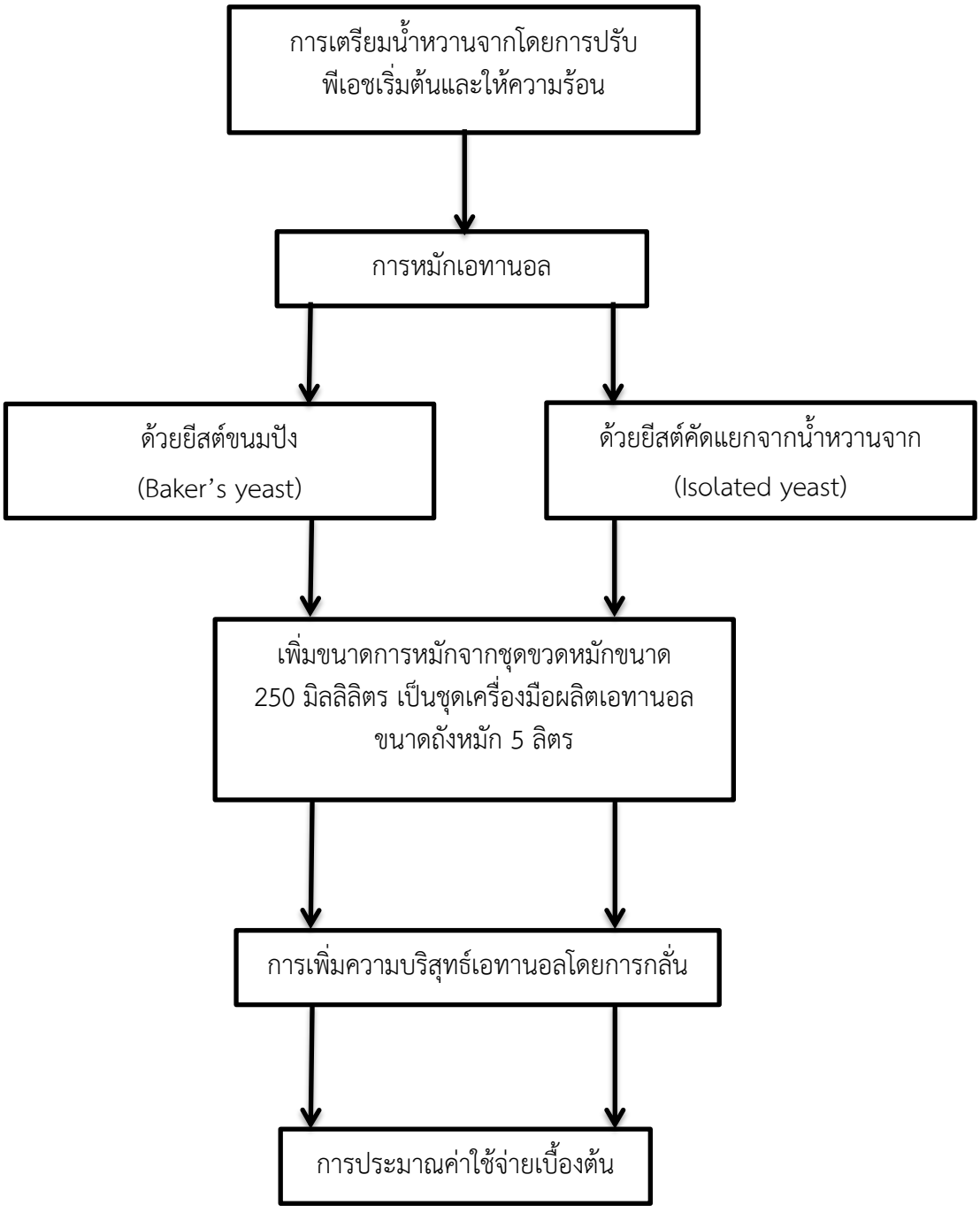
4. การเพิ่มขนาดการหมักจากชุดขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นชุดเครื่องมือผลิตเอทานอลถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร

5. ศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลโดยการกลั่น

6. ประมาณค่าใช้จ่ายเบื้องต้นในการผลิตเอทานอล

แผนผังสรุปขอบเขตของงานวิจัยแสดงดังภาพประกอบที่ 1-2

แผนผังสรุปขอบเขตของงานวิจัย



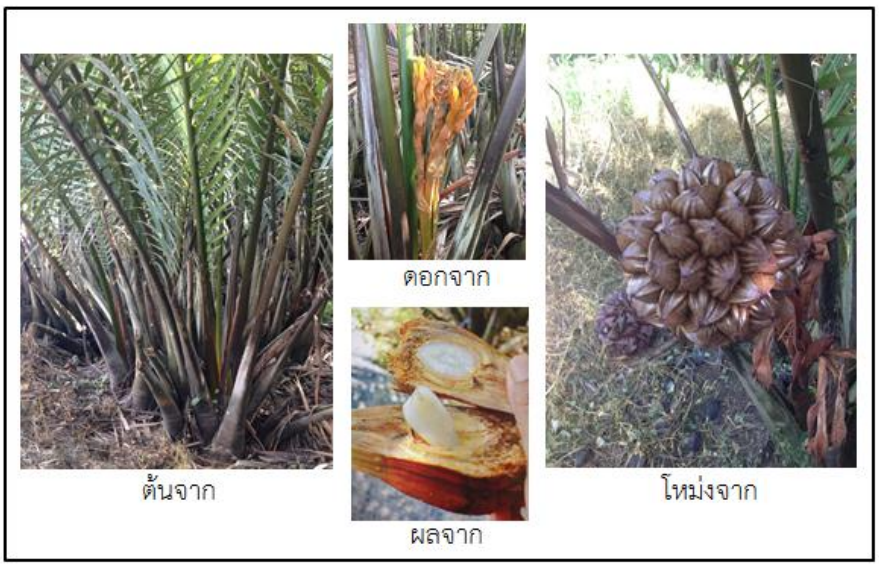
ภาพประกอบที่ 1-2 แผนผังสรุปขอบเขตของงานวิจัย

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ต้นจาก

จากมีชื่อสามัญ คือ Nipa Palm หรือ Atap Palm มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nipa fructicans Wurmb.* เป็นพืชในตระกูล *Arecaceae* ที่เจริญเติบโตในบริเวณป่าชายเลน ชายฝั่งคูคลองที่ออกทะเล แช่น้ำอยู่ตลอดเวลา (หัสชัย, 2552) จากเป็นต้นไม้ที่ลำต้นเป็นกออยู่ใต้ดิน เรียกว่า หินจาก มีใบแทงขึ้นจากกอ เป็นใบประกอบขนาดใหญ่แบบขนนก มีช่อดอกแทงเป็นงวงออกมาจากกาบใบ (พอนจาก) ที่อยู่ใต้ดินเรียกว่า นกจาก ดอกสีเหลืองแสด เมื่อดอกกลายเป็นผลจะกระจุกกันเป็นทะลาย ผลสีน้ำตาลเข้มเบียดกัน เรียกว่า โหม่งจาก เมื่อจากโตอายุได้ 4-5 ปี จึงจะออกผล (ผลไม้ไทย, 2556) แสดงดังภาพประกอบที่ 2-1



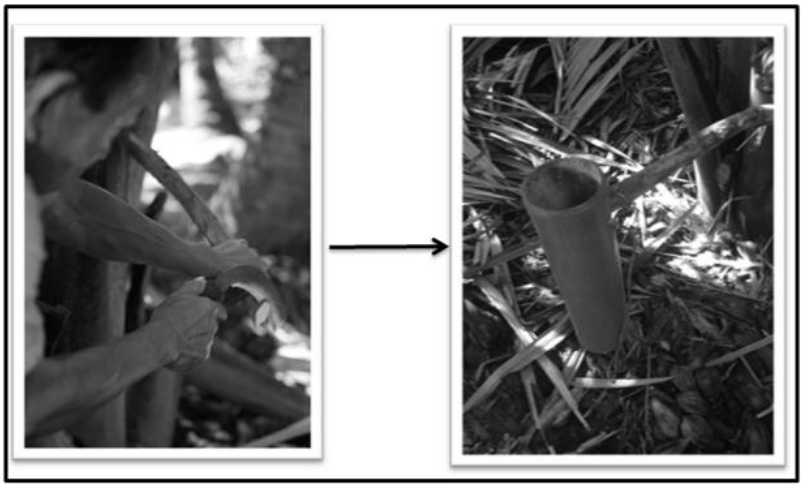
ภาพประกอบที่ 2-1 ส่วนประกอบของต้นจาก

ต้นจากเป็นพืชที่มีคุณค่าทางนิเวศวิทยาเนื่องจากเป็นที่วางไข่และเป็นที่อยู่ของสัตว์น้ำ อีกทั้งยังช่วยป้องกันการกัดเซาะชายฝั่งด้วย และคุณสมบัติที่น่าสนใจของน้ำหวานจากคือ สามารถปรับดินเค็มจากพื้นที่นากุ้งร้างมาเป็นดินที่ใช้ประโยชน์ได้อีกครั้ง

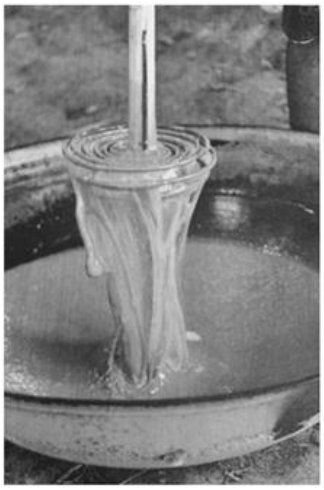
การเก็บน้ำหวานของต้นจากนั้นสามารถเริ่มเก็บได้เมื่อต้นจากมีอายุประมาณ 6-7 ปี (นิดดาและทวีทอง, 2550) จนกระทั่งอายุประมาณ 100 ปี โดยไม่ต้องมีการปลูกต้นจากใหม่ ซึ่งสามารถเก็บน้ำหวานได้จากงวงจากโดยใช้ไม้ตีหรือเคาะเพื่อกระตุ้นให้น้ำหวานออกมาแล้วนวดเพื่อขยายเส้นน้ำหวานหลังจากนั้นใช้ทับปาดปลายช่อดอกแล้วนำกระบอกไม้ไผ่ไปรองรับน้ำหวานและไปเก็บน้ำหวานมาทุกวันตอนเช้าดังภาพประกอบที่ 2-2 แต่การเก็บน้ำหวานจากต้นอ้อยต้องรอให้ต้นอ้อยเจริญเติบโตเต็มที่จึงทำการเก็บอ้อยมาเข้าเครื่องบีบอัดน้ำหวาน โดยระยะเวลาการเจริญเติบโตก่อนเก็บเกี่ยวอ้อยประมาณ 17 เดือน การปลูกอ้อยส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศเนื่องจากการใช้ยาฆ่าแมลง

และยากำจัดวัชพืช อีกทั้งอาจส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมหากมีการลักลอบเผาไร่อ้อยเพื่อกำจัดใบอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยว เห็นได้ชัดว่าต้นจากนั้นมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับอ้อยคือ สามารถเจริญเติบโตได้เองตามธรรมชาติ ไม่ต้องรดน้ำ ไม่ต้องใช้ยากำจัดวัชพืชและยาฆ่าแมลง สามารถเก็บน้ำหวานได้ในขณะที่ต้นจากกำลังเจริญเติบโตอยู่โดยไม่ต้องใช้เครื่องจักรในการรีดน้ำหวานและไม่มีของเหลือทิ้งหลังการเก็บน้ำหวาน

ต้นจากเป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน โดยการนำน้ำหวานจากสดไปเคี่ยวในกระทะก็จะได้น้ำหวานเข้มข้น หรือเคี่ยวจนเกือบแห้งแล้วโซมทำเป็นน้ำตาลปี๊บดังภาพประกอบที่ 2-3 หรือนำไปหมักเพื่อเป็นน้ำส้มจากก็ได้เช่นกัน โดยน้ำส้มจากเมื่อนำไปหมักผสมกับอาหารกุ้งก็จะช่วยทำให้น้ำในบ่อกุ้งไม่เน่าเสีย และยังใช้น้ำหวานจากผลิตเป็นสุราพื้นบ้านได้อีกด้วย (ฟรินน์ดอทคอม, 2558)



ภาพประกอบที่ 2-2 การเก็บน้ำหวานจาก



ภาพประกอบที่ 2-3 การโซมน้ำหวานจากเพื่อทำน้ำตาลปี๊บ

ต้นจากเป็นพืชที่ให้แอลกอฮอล์ต่อไร่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่น เช่น มะพร้าว มันสำปะหลังและอ้อย หากได้รับการพัฒนาที่เหมาะสมอาจใช้เป็นเชื้อเพลิงยามขาดแคลนได้ มีการประเมินว่าต้นจากสามารถให้น้ำตาลได้ถึง 20 ตันต่อเฮกตาร์ หรือ 3,200 กิโลกรัมต่อไร่ และคิดเป็นแอลกอฮอล์ 90 บาร์เรล หรือ 14,300 ลิตรต่อเฮกตาร์ หรือ 2,288 ลิตรต่อไร่ ซึ่งมากกว่าอ้อยถึงสองเท่า (นพรัตน์, 2551)

2.2 เอทานอล

เอทานอล คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ที่มีสูตรเคมี C_2H_5OH มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้เป็นสารตั้งต้นหรือตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้สำหรับฆ่าเชื้อหรือล้างแผล และที่สำคัญที่สุด คือสามารถใช้เพื่อเพิ่มค่าออกเทนและลดปริมาณเชื้อเพลิง โดยนำไปผสมกับน้ำมันเบนซีนเป็นแก๊สโซฮอล์ (สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอล, 2557)

2.2.1 เทคโนโลยีการผลิตเอทานอล (สยามเคมี, 2557)

แบ่งออกได้เป็น 2 วิธี ดังนี้

2.2.1.1 การสังเคราะห์เอทานอลจากกระบวนการทางเคมีโดยสังเคราะห์เอทานอลจากเอทิลีน สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

1). ไดเรคไฮเดรชันเอทิลีน (Direct hydration ethylene) แสดงดังปฏิกิริยาที่ (1)

$$\underset{\text{เอทิลีน}}{C_2H_4\,(g)} + \underset{\text{ไอน้ำ}}{H_2O\,(g)} \longrightarrow \underset{\text{เอทานอล}}{C_2H_5OH} \qquad (1)$$

2). อินไดเรคไฮเดรชันเอทิลีน (Indirect hydration ethylene) แสดงดังปฏิกิริยาที่ (2-3) และ (4-5)

$$\underset{\text{เอทิลีน}}{C_2H_4} + \underset{\text{กรดซัลฟูริก}}{H_2SO_4} \longrightarrow \underset{\text{เอทิลเอซิดซัลเฟต}}{C_2H_5OSO_3H} \qquad (2)$$

$$\underset{\text{เอทิลเอซิดซัลเฟต}}{C_2H_5OSO_3H} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O} \longrightarrow \underset{\text{เอทานอล}}{C_2H_5OH} + \underset{\text{กรดซัลฟูริก}}{H_2SO_4} \qquad (3)$$

$$\underset{\text{เอทิลีน}}{2C_2H_4} + \underset{\text{กรดซัลฟูริก}}{H_2SO_4} \longrightarrow \underset{\text{ไดเอทิลซัลเฟต}}{(C_2H_5O)_2SO_2} \qquad (4)$$

$$\underset{\text{ไดเอทิลซัลเฟต}}{(C_2H_5O)_2SO_2} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O} \longrightarrow \underset{\text{เอทานอล}}{2C_2H_5OH} + \underset{\text{กรดซัลฟูริก}}{H_2SO_4} \qquad (5)$$

แต่ปัจจุบันนี้ไม่นิยมผลิตเอทานอลด้วยวิธีการสังเคราะห์เนื่องจากมีต้นทุนสูงและไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน

2.2.1.2 การหมักเอทานอล (Ethanol Fermentation) (อัสมา, 2551) ขั้นตอนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปการหมักจะให้เวลาประมาณ 2-3 วันเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีความสามารถในการเจริญได้อย่างรวดเร็ว มีความคงทนต่อแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณสูง รวมถึงสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณสูงด้วย สามารถแสดงดังปฏิกิริยาที่ (6)

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \quad (6)$$

กลูโคส เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์

จากปฏิกิริยาที่ (6) โดยทฤษฎีพบว่า กลูโคส 1 กรัม สามารถผลิตเอทานอลได้ 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม แต่ในความจริงจะเกิดเอทานอลน้อยกว่า 0.511 กรัม เพราะยีสต์ใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตและยังมีการเกิดผลผลิตข้างเคียง (by product) เช่น กลีเซอรอล และซัลนิเคท เป็นต้น (สยามเคมี, 2557)

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักเอทานอล

2.2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

1). จุลินทรีย์ธรรมชาติ ในผลไม้ต่างๆจะพบจุลินทรีย์ที่ผิวผลไม้ภายนอกโดยเฉพาะผลไม้ที่สุกจัดมีรสหวาน เมื่อทำการคั้นน้ำผลไม้ปล่อยทิ้งไว้ น้ำผลไม้จะเกิดการหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่ติดมากับผลไม้แต่ละชนิด ปริมาณของจุลินทรีย์ธรรมชาติไม่แน่นอนแตกต่างตามสภาวะแวดล้อม อุณหภูมิและความชื้น (ลูกจันทร์, 2551) ในช่วงแรกของการหมักจะพบยีสต์สายพันธุ์ *Kloeckera apiculata* แต่ยีสต์เหล่านี้สามารถทนต่อแอลกอฮอล์ได้ที่ปริมาณต่ำ ดังนั้นเมื่อกระบวนการหมักดำเนินต่อไปจะมียีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ติดอยู่บนเครื่องมือที่ใช้ผลิตซึ่งสามารถทนต่อแอลกอฮอล์ปริมาณสูงเจริญขึ้นแทน (พลอยใส, 2553)

2.) จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกแล้ว แบ่งตามสภาพการเก็บได้ 2 แบบ คือ เชื้อสดเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (Nutrient agar) และสภาพผงแห้งซึ่งสามารถเก็บได้นานและมีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อสด (ลูกจันทร์, 2551) ในการผลิตเอทานอลเชิงอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้ชนิดผงแห้ง (ประดิษฐ์, 2545)

ยีสต์ผง *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ได้รับการยอมรับในอุตสาหกรรมการหมัก คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดี ทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูง เชื้อที่หมักแอลกอฮอล์จะสังเกตุได้จากการเขย่าขวดจะปรากฏฟองเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก (วนัสยา, 2545) และยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลได้ดี มีราคาถูกแต่มีความบริสุทธิ์น้อยกว่าคือ ยีสต์ขนมปัง (Baker's-yeast) ชนิดผง ซึ่งเป็นยีสต์ตระกูล *Saccharomyces cerevisiae* เช่นกัน แต่ชนิด คุณภาพ วิธีสกัด

และแหล่งที่มาต่างกันจึงมีราคาต่ำกว่า ซึ่งประเทศไทยสามารถผลิตได้เอง เช่น ผลิตจากน้ำอ้อย (ประไพศรี, 2535) และผลิตจากน้ำส่าเหล้า (สมหวัง และคณะ, 2534) โดยปัจจุบันได้มีการนำยีสต์ขนมปังแบบผงมาใช้ผลิตสุราชุมชนมากขึ้นเนื่องจากมีราคาต่ำกว่ายีสต์ชนิดอื่น (วุฒิ, 2556)

2.2.2.2 ปริมาณอาหารและสับสเตรท - สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ แร่ธาตุและวิตามินต่างๆ เป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นการหมักเอทา-นอลโดยสารอาหารจะใช้ในการเจริญเติบโตของยีสต์ และสับสเตรททำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น (สาวิตรี, 2549)

2.2.2.3 พีเอชเริ่มต้น - ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในสภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.5-6.5 โดยมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5 ซึ่งในสภาพเป็นกรดอ่อนนี้สามารถช่วยควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ดี (สาวิตรี, 2549)

2.2.2.4 อุณหภูมิ - ยีสต์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่จะทนได้คือ 5-10 องศาเซลเซียส ในสภาพที่อาหารอุดมสมบูรณ์ยีสต์จะทนอุณหภูมิสูงได้ดี และจะหยุดเจริญเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 และเกินกว่า 40 องศาเซลเซียส การควบคุมอุณหภูมิในการหมักเชิงอุตสาหกรรมเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อประสิทธิภาพการหมักที่ดี และจำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิในถังหมัก (สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2556)

2.2.2.5 อากาศ - ยีสต์ต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการหายใจ การให้อากาศมีความจำเป็นในช่วงการเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์แต่ไม่จำเป็นในขณะที่มีการผลิตแอลกอฮอล์ (ดวงพร, 2546) ในช่วงการเจริญของยีสต์จะให้เอทานอลน้อย เพราะออกซิเจนจะส่งเสริมให้เกิดการออกซิเดชั่นอย่างสมบูรณ์ มีการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2556)

2.2.2.6 เอทานอล - ในสภาพที่มีเอทานอลสูง การเจริญและการหมักของยีสต์จะถูกยับยั้งเพราะเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์ โดยยีสต์จะถูกยับยั้งที่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 14 โดยปริมาตร (สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2556)

2.2.2.7 ความเข้มข้นของน้ำตาล - เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้แก่ยีสต์ โดยใช้ความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้เกิดเอทานอลมาก โดยปรับในช่วงร้อยละ 5-30 โดยน้ำหนัก ถ้าสูงกว่าระดับนี้จะทำให้ยีสต์ตายได้ (เพราะน้ำตาลเข้มข้นสูงมีผลทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ) (ลูกจันทร์, 2551)

2.2.2.8 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลยับยั้งการเติบโตของยีสต์ ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ที่ความดันบรรยากาศปกติ หากมีคาร์บอนไดออกไซด์สูงจะเกิดการยับยั้งการเจริญและการหมักอย่างรุนแรง โดยคาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่น และคาร์บอนไดออกไซด์ยังมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การขนถ่ายสารเข้าออกเซลล์เปลี่ยนไป (สาวิตรี, 2549)

2.2.3 กระบวนการการหมักเอทานอล

สามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้ (กลยุทธและนิสิต, 2535)

2.2.3.1 การหมักแบบกะ (Batch Fermentation) ต้องทำการเตรียมเชื้อใหม่ทุกครั้ง ระยะเวลาหมักประมาณ 48 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเอทานอลร้อยละ 8-10 โดยปริมาตร นิยมใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เป็นถังหมักที่สามารถกวนผสมวัตถุดิบและเชื้อ พร้อมควบคุมอุณหภูมิ และพีเอชเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น มีข้อดี คือ เหมาะกับการผลิตปริมาณไม่มากและควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อได้ง่าย แต่ข้อเสียคือต้องเตรียมวัตถุดิบและเชื้อเริ่มต้นใหม่ทุกครั้งของการหมักแต่ละชุด ทำให้เสียเวลา เสียค่าใช้จ่าย และต้องเสียเวลารอให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง

2.2.3.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch Fermentation or Fed-Batch Culture) เป็นการหมักที่มีการเตรียมอาหารอย่างต่อเนื่องเป็นช่วงๆไม่มีการถ่ายผลผลิตออก ถูกใช้ในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ เช่น การผลิตยีสต์ขนมปัง เป็นต้น

2.2.3.3 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) เป็นถังหมักที่ปริมาตรอาหารคงที่อัตราการเติมอาหารหรือเชื้อเท่ากับที่ปล่อยออก มีข้อดีคือ ควบคุมอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ และสามารถศึกษาผลของการเปลี่ยนปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพต่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ส่วนข้อเสียคือ อาจทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อน

เนื่องจากวัตถุดิบน้ำหวานจากสดปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งชนิดที่ทำให้เกิดการบูดได้ง่ายด้วย ซึ่งวิธีการในปัจจุบันที่สามารถช่วยชะลอการทำงานของแบคทีเรียคือการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยม จึงมีการใส่เกล็ดไม้เคี่ยมในกระบอกไม้ไผ่ที่ใช้เก็บรองรับน้ำหวานเพื่อชะลอการบูดของน้ำหวาน

2.3 ไม้เคี่ยม

มีชื่อสามัญ คือ Resak tembage มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Cotylelobium melanoxylon Pierre.* เป็นพืชในวงศ์ *Dipterocarpaceae* มีชื่ออื่น คือ เคี่ยม (ทั่วไป) เคี่ยมขาว เคี่ยมดำ เคี่ยมแดง (ภาคใต้)

เคี่ยมมีลักษณะทั่วไป คือ เป็นไม้ยืนต้นมีมากในป่าดิบ ต้นเปล่ากลม เรือนยอดเป็นพุ่มคล้ายพุ่มสน มีกิ่งใบทึบ เปลือกลำต้นสีน้ำตาล มีรอยแต้มสีเทาและเหลือง แตกเป็นร่องทางยาว มีต่อมระบายอากาศ ใบเดี่ยวสลับกันโคนใบมน ปลายสอบเรียว หลังใบลื่นเป็นมัน ท้องใบมีขนเป็นกระจุกสีน้ำตาล ดอกเล็กสีขาวออกดอกตามง่ามใบ ปลายกิ่งเป็นช่อยาว กลิ่นหอม ผลกลมเล็กสีน้ำตาลมีขนเหมือนกำมะหยี่

การนำเปลือกไม้เคี่ยมมาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1x2 นิ้ว เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน ใส่กระบอกไผ่รองรับน้ำหวานจากต้นจาก จะเกิดรสฝาดรักษาน้ำตาลไม่ให้บูด (ปาริชาติ, 2557)

2.4 บทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา, 2556)

2.4.1 การหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation)

ใช้จุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นการหมักน้ำตาลกลูโคสเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เพื่อผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (alcoholic beverage) ได้แก่ เบียร์ ไวน์และใช้ในการหมักขนมปังเพื่อให้ขึ้นฟู

2.4.2 การหมักให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid fermentation)

โดยใช้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ได้แก่ *Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus* และ *Leuconostoc* ที่สามารถหมักให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid) โดยมีวัตถุดิบเป็นน้ำตาลกลูโคส ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อย ในอุตสาหกรรมอาหารการหมักประเภทนี้ เพื่อผลิตอาหาร เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว สามารถแสดงดังปฏิกิริยาที่ (7)

$$\underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{ไม่มี } O_2} \underset{\text{กรดแลกติก}}{2CH_3CHOHCOOH} \qquad (7)$$

2.4.3 การหมักให้เกิดกรดอะซิติก (acetic acid fermentation)

ใช้แบคทีเรียในกลุ่ม Acetic acid bacteria เช่น *Acetobacter* ซึ่งสามารถออกซิไดส์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก (acetic acid) ในสภาวะที่มีอากาศ ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เพื่อการผลิตน้ำส้มสายชู (vinegar) สามารถแสดงดังปฏิกิริยาที่ (8)

$$\underset{\text{เอทานอล}}{C_2H_5OH} + \underset{\text{ออกซิเจน}}{O_2} \longrightarrow \underset{\text{กรดอะซิติก}}{CH_3CHOOH} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O} \qquad (8)$$

2.5 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodoligy, RSM) (วรลักษณ์, 2013)

วิธีการพื้นผิวตอบสนองเป็นการนำข้อมูลสถิติและเทคนิคทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ใช้ในการออกแบบการทดลองและหาสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการป้อนค่าตัวแปรอิสระที่อาจมีตัวแปรเดียวหรือหลายตัวแปรเพื่อให้โปรแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตามในรูปแบบของพื้นผิวตอบสนองและสมการ

ตัวแปรอิสระที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีและเคมีนั้นมีหลายตัวแปร แต่การกำหนดตัวแปรอิสระเพื่อหาค่าผลตอบสนองที่เหมาะสมต้องเลือกตัวแปรที่ส่งผลกระทบโดยตรงกับผลตอบสนอง เนื่องจากการกำหนดความสำคัญของตัวแปรอิสระนั้นสามารถกำหนดความแม่นยำในการหาสภาวะที่เหมาะสมได้ สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามนั้นจะแสดงผลในรูปของพื้นผิวตอบสนองแบบสองมิติ (Contour plot) หรือสามมิติ (Surface plot) ทำให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามอย่างชัดเจน

การวิเคราะห์แบบสมการถดถอย (Regression analysis) จะใช้แบบจำลองของสมการกำลังสอง (Quadratic equation) โดยค่า Y เป็นตัวแปรตามและ b_0, b_i, b_{ii}, b_{ij} เป็นค่าสัมประสิทธิ์แบบจุดตัด (Intercept coefficient), สัมประสิทธิ์เชิงเส้น (Linear coefficient) สัมประสิทธิ์กำลังสอง (Quadratic coefficient) และสัมประสิทธิ์เชิงซ้อน (Interaction coefficient) ตามลำดับ ขณะที่ X_i และ X_j เป็นตัวแปรอิสระ($i \neq j$) ตัวอย่างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จำนวน 3 ตัวแปร แสดงดังสมการที่ (2.1)

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

แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) นั้นเป็นการออกแบบการทดลองโดยให้ค่ากลางของตัวแปรอิสระส่งผลที่เหมาะสมต่อตัวแปรตาม โดยพัฒนามาจากแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลเชิงส่วน (Fractional Factorial design) หรือแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ ซึ่งการออกแบบการทดลองนั้นต้องมีระดับปัจจัยอย่างน้อย 3 ระดับและสภาวะในการทดลองจะมีการทดลองซ้ำเพื่อดูความแม่นยำของการทดลอง จึงส่งผลให้มีการทดลองมากหากมีปัจจัยอิสระมาก

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tamunaidu et al. (2012) ศึกษาโดยการนำน้ำหวานจากมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยเลือกพื้นที่สี่แบบในการศึกษาที่ต้นจากอายุ 8-100 ปีสามารถผลิตน้ำหวานได้ 0.4-1.2 ลิตรต่อวันต่อต้น มีองค์ประกอบทางเคมีซึ่งส่วนใหญ่เป็นซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส 159-214 กรัมต่อกิโลกรัม มีสารอนินทรีย์ 5 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งส่วนใหญ่ คือ โซเดียม คลอไรด์ และ โพแทสเซียม ทำการทดลองโดยนำน้ำหวานมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 150 กรัมต่อกิโลกรัม แล้วนำไปหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเวลา 30-48 ชั่วโมง แบบใส่และไม่ใส่สารอาหาร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วเปรียบเทียบผลเอทานอลกับการหมักด้วยน้ำอ้อยและซูโครส จากการทดลองสรุปได้ว่าการหมักแบบใส่สารอาหารในเวลา 30-32 ชั่วโมง ได้ผลได้เอทานอลร้อยละ 96.9 โดยปริมาตรซึ่งใกล้เคียงกับน้ำอ้อย ส่วนการหมักแบบไม่ใส่สารอาหารในเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลได้เอทานอลร้อยละ 95.5 โดยปริมาตรซึ่งใกล้เคียงกับน้ำอ้อยเช่นกัน จึงสรุปได้ว่าน้ำหวานจากมีสารอาหารในตัวเพียงพอต่อการผลิตเอทานอล และการปลูกต้นจากให้ได้น้ำหวานมาก คือ 1,000 ต้นต่อเฮกตา จะให้น้ำหวาน 4,550-9,100 ลิตรต่อเฮกตาต่อปี จากผลการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่าน้ำหวานจากเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

Kosugi et al. (2010) ศึกษาเกี่ยวกับต้นปาล์มเก่าที่ถูกโค่นพบว่า ประกอบด้วยน้ำหวานที่มีน้ำตาลกลูโคสสูง ซึ่งน้ำหวานส่วนในสุดของลำต้นปาล์มมีน้ำหวานหนักถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักทั้งหมด และมีความเข้มข้นของกลูโคสสูงถึง 85.2 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลชนิดอื่นอยู่ด้วย อีกทั้งยังมีกรดอะมิโน กรดอินทรีย์ แร่ธาตุและวิตามินอีกด้วย ซึ่งการทดลองนี้จะทำการหมักเอทานอลแบบไม่ใส่สารอาหารเพิ่มและเทียบผลเอทานอลกับการหมักอ้างอิง คือ การหมักด้วย YPD medium กับกลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตกรดแลคติกนั้นจะเทียบกับการผลิตอ้างอิง คือ การผลิตกรดแลคติกด้วย MSR medium กับกลูโคสความเข้มข้น 18 กรัมต่อลิตร การสกัดน้ำหวานทำ

โดยบีบอัดไม้ด้วยความดัน 80 เมกะปาสคาล แล้วนำน้ำหวานไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการหมักเอทานอลทำการปรับความเข้มข้นกลูโคสของน้ำหวานให้เป็น 55 กรัมต่อลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับพีเอชเป็น 6 แล้วฆ่าเชื้อด้วย membrane filter หลังจากนั้นเติมยีสต์ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตร แล้วหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแบบไม่ต้องเขย่า จากการทดลองพบว่าผลได้เอทานอลเป็นร้อยละ 94.2 ของผลได้ตามทฤษฎี และพบว่าน้ำหวานมีสารอาหารเพียงพอต่อการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักอ้างอิง ส่วนการผลิตกรดแลคติกนั้น เจือจางน้ำหวานด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นกลูโคส 16.7 กรัมต่อลิตรแล้วปรับพีเอชเป็น 7 แล้วฆ่าเชื้อด้วย membrane หลังจากนั้นเติม *Lactococcus* ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตร แล้วหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยไม่ต้องเขย่า จากผลการทดลองพบว่า และมีผลได้กรดแลคติกเป็นร้อยละ 89.9 ของผลได้ตามทฤษฎี จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าน้ำหวานจากต้นปาล์มเก่าที่ถูกโค่นเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลและกรดแลคติก และจะเป็นวัตถุดิบหลักที่สำคัญในประเทศที่มีต้นปาล์มมาก เช่น มาเลเซีย และอินโดนีเซีย

Abdullah et al. (2015) ศึกษาเกี่ยวกับใบปาล์มน้ำมัน (Oil Palm Frond: OPF) ซึ่งเป็นสารชีวมวลที่มีมากที่สุดในอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันพบว่า น้ำหวานจากใบปาล์มน้ำมันนั้นสามารถบีบอัดออกมาได้เช่นเดียวกับอ้อยและมีองค์ประกอบทั้งน้ำตาลและสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน แมกนีเซียม แคลเซียม ซิงค์ ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ ซึ่งถือเป็นข้อได้เปรียบสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลและยังเป็นวัตถุดิบที่ไม่ใช่อาหารอีกด้วย จากการทดลองหมักน้ำหวานใบปาล์มน้ำมันด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) โดยไม่เติมสารอาหารและไม่ควบคุมพีเอช เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าผลได้เอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลซึ่งถือว่าใกล้เคียงกับการหมักโดยใช้ตัวกลางสังเคราะห์ที่มีผลได้เอทานอล 0.4 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล อีกทั้งยังใกล้เคียงกับผลได้เอทานอลที่เกิดจากการหมักน้ำอ้อยในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในประเทศบราซิลอีกด้วย ดังนั้นน้ำหวานใบปาล์มน้ำมันจึงเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมที่น่าสนใจ เพราะเป็นพลังงานหมุนเวียน ไม่ใช่อาหาร และไม่ใช่วัตถุดิบที่เป็นเซลลูโลสอีกด้วย

Joannis-Cassan et al. (2014) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการลดต้นทุนการผลิตและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากบีตรูท (sugar beet) ที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจะทำการทดสอบสองปฏิกรณ์ในการผลิต คือ multistage batch และ fed batch process ด้วยสภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดสอบพบว่าการหมักด้วยปฏิกรณ์แบบ fed batch process นั้นสามารถให้ความเข้มข้นเอทานอลมากที่สุด อีกทั้งยังสามารถลดตัวยับยั้งการเกิดเอทานอลได้อีกด้วย สภาวะการทดลองที่เหมาะสม (ปริมาตรเริ่มต้นและอัตราการป้อนสารเข้า) สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 15.2 โดยปริมาตรภายในระยะเวลา 53 ชั่วโมงโดยไม่มีน้ำตาลซูโครสเหลือและมีอัตราการผลิตเอทานอล 2.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Kawa-Rygielska et al. (2013) ศึกษาเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำหวานบีตรูท (sugar beet) หลังจากผ่านการกรองด้วย membrane และเพื่อเลือกสภาวะในการหมัก (ชนิดของยีสต์และชนิดของตัวกลางการหมัก) น้ำหวานบีตรูทจะถูกหมักด้วยยีสต์สองชนิดของ *Saccharomyces cerevisiae* (Ethanol Red and Safdistil C-70) ในถังหมักแบบกะ (Batch ethanol fermentation) โดยจะทำการศึกษาผลกระทบจากการเติมสารอาหารที่แตกต่างกันในตัวกลางการหมัก (mineral salt urea+$Mg_3(PO_4)_2$ และ ยีสต์สกัด) ความเข้มข้นน้ำหวานบีตรูทที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับปริมาณยีสต์ ความเข้มข้นเอทานอล 85-87 กรัมต่อลิตร ผลได้เอทานอลร้อยละ 82 และ น้ำตาลถูกใช้ไปมากกว่าร้อยละ 95 ภายในระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง สารอาหารที่เข้มข้นจะส่งผลให้ผลได้เอทานอลเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารอาหารจากตัวกลาง urea+$Mg_3(PO_4)_2$ ทำให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลที่สูงที่สุด คือ 91.16-92.06 กรัมต่อลิตร, ผลได้เอทานอลร้อยละ 84.78-85.62 และน้ำตาลถูกใช้จนหมด

Sasaki et al. (2014) ศึกษาการผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงโดยน้ำข้าวฟ่างหวานที่ผ่านการแยกด้วยเมมเบรน 2 ขั้นตอน ซึ่งขั้นตอนแรกคือ Ultrafiltration เป็นการกรองเศษของแข็งออกแล้วตามด้วยขั้นตอนที่สองคือ Nanofiltration เป็นการทำน้ำข้าวฟ่างหวานให้เข้มข้นจนมีความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดดังนี้ ซูโครส 180 กรัมต่อลิตร กลูโคส 59.3 กรัมต่อลิตร และฟรุคโตส 49.3 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการเติมไนโตรเจน (10 และ 20 กรัมต่อลิตรของยีสต์สกัดและโพลี-เปปโทนตามลำดับ) แล้วนำไปหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตเอทานอล ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลคือ 133.5 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 87.6 ของผลได้ตามทฤษฎี) ภายในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง การเติมไนโตรเจนความเข้มข้นต่ำ (3 และ 6 กรัมต่อลิตรของยีสต์สกัดและโพลี-เปปโทนตามลำดับ) หรือการไม่เติมไนโตรเจนเลยนั้นทำให้ได้ความเข้มข้นเอทานอล 131.4 และ 132.8 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 84.8 และ 86.0 ของผลได้ตามทฤษฎี) ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

Luo et al. (2014) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับน้ำข้าวฟ่างหวานที่ถูกหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ให้เป็นเอทานอล ซึ่งมีการใช้วิธี Factorial experiment design regression analysis และ response surface methodology เพื่อวิเคราะห์ผลกระทบของตัวแปรกระบวนการประกอบด้วย ความเข้มข้นของแข็งในน้ำข้าวฟ่างหวานในช่วงร้อยละ 6.5-26 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์ในช่วง 0.5-2 กรัมต่อลิตร และอุณหภูมิในการหมักช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ที่ส่งผลต่อผลได้เอทานอล ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้าย และอัตราการผลิตเอทานอล จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่ได้อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดและไม่ส่งผลต่อผลได้เอทา-นอลและความเข้มข้นเอทานอลสุดท้าย สำหรับค่าปริมาณยีสต์ที่ทำให้ได้ผลได้เอทานอลสูงสุด และไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายและอัตราการผลิตเอทานอล คือ 1 กรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของของแข็งในน้ำข้าวฟ่างหวานแปรผกผันกับผลได้เอทานอลและความเข้มข้นเอทานอลสุดท้าย แต่มีผลเพียงเล็กน้อยต่ออัตราการผลิตเอทานอล เมื่อน้ำข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นของของแข็งร้อยละ 13 โดยน้ำหนัก มาใช้ในการหมักได้โดยตรง โดยใช้ปริมาณยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมงสามารถทำนายค่าผลได้เอทานอลได้

ร้อยละ 101.1 และทำนายความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายได้เป็น 49.48 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะในการหมักนี้ สามารถทำนายอัตราการผลิตเอทานอลได้ 2.37 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Chana-Thaworn และคณะ (2011) ได้ศึกษาสมบัติและยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากไม้เคี่ยม (*Cotyleobium lanceotatum*) โดยจะใช้หน่วย ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (minimum- bactericidal concentration; MBC) ของสารสกัดจากไม้เคี่ยม ซึ่งความเข้มข้นที่สามารถกำจัดแบคทีเรียได้สมบูรณ์คือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเชื้อที่นำมาทดสอบคือเชื้อ *Escherichia coli 0175:H7 Staphylococcus- aureus* และ *Listeria monocytogenes* พบว่าสารสกัดจากไม้เคี่ยมมีประสิทธิภาพในการลดการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. monocytogenes* มากกว่าเชื้อ *S. aureus* และ *E.coli* แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดไม้เคี่ยมเป็น 1-2 เท่าของ MBC ก็ไม่ส่งผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่มากขึ้น ผลของงานวิจัยชี้ให้เห็นว่าการรวมตัวกันของสารสกัดจากไม้-เคี่ยมเป็นตัวต้านเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติที่มีศักยภาพสำหรับใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารได้

Polczynski (2009) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากต้น tree sap พบว่ามีประสิทธิภาพกว่าวัตถุดิบหลักชนิดอื่น เช่น ข้าวโพด อ้อย เนื่องจากไม่ต้องการเอนไซม์และความร้อนในการย่อยวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลก่อนการนำไปหมักด้วยยีสต์ อีกทั้งยังสามารถเก็บน้ำหวานได้โดยไม่ต้องตัดต้นไม้ ซึ่งหากเป็นวัตถุดิบชนิดอื่นจะสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วเท่านั้น แต่สาเหตุที่ไม่นิยมนำมาเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอลด้วยน้ำหวานจากต้น tree sap เนื่องจากการเก็บน้ำหวานจากต้นไม้ต้องใช้ทักษะมาก ทำได้ยาก สิทธิบัตรนี้จึงเสนอวิธีการนำน้ำหวานออกจากต้นไม้เพื่อให้เป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพและใช้ในการผลิตเอทานอลกันได้ทั่วไป และนำเสนอวิธีการผลิตเอทานอล สำหรับขั้นตอนการเก็บน้ำหวานจากต้น tree sap นั้นจะใช้วิธี tapping โดยที่จะใส่ tap hole ไปในต้นไม้เพื่อให้น้ำหวานไหลออกมา เมื่อเก็บเสร็จจะต้องนำไปแช่เย็นทันทีเพื่อป้องกันการบูด หลังจากนั้นทำน้ำหวานให้เข้มข้นโดยการระเหยน้ำออก หรือวิธี Reverse Osmosis filtration เพื่อให้น้ำหวานมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 10-12 โดยน้ำหนัก แล้วจึงนำไปหมักด้วยยีสต์ให้ได้เอทานอล ซึ่งปริมาณเอทานอลที่น้อยที่สุดที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิง คือ ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เมื่อหมักเสร็จจึงทำการกลั่นเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลให้เข้าใกล้ร้อยละ 100 โดยปริมาตร

小杉昭彦 et al. (2007) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับวิธีผลิตเอทานอลและกรดแลคติกจากงวงปาล์มซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและราคาถูก โดยทำการสกัดน้ำหวานออกมาจากงวงปาล์มแล้วเก็บรักษาทันทีเพื่อป้องกันการบูด เช่น แช่เย็น แช่แข็ง ให้ความร้อน vacuum treatment เป็นต้น หลังจากนั้นเอางวงปาล์มที่ผ่านการเอาน้ำหวานออกแล้วมาย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้เกิดเป็นน้ำตาลโดยเรียกส่วนนี้ว่า saccharified solution ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และกาแลคโตส เป็นต้น หลังจากนั้นนำทั้งน้ำหวานและ saccharified solution ผสมกันแล้วหมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งการผลิตเอทานอลและกรดแลคติกมีความแตกต่างกันที่จุลินทรีย์ที่ใช้ โดยการผลิตเอทานอลจะใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมัก ส่วนการผลิตกรดแลคติกนั้นใช้ *Lactobacillus* ในการ

หมัก ส่วนขั้นตอนอื่นจะดำเนินเหมือนกันคือ ช่วงน้ำตาลก่อนหมักร้อยละ 5-30 โดยน้ำหนัก ปริมาณจุลินทรีย์เทียบกับน้ำหวานที่ใช้อยู่ในช่วงร้อยละ 0.01-2 โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิในการหมักอยู่ในช่วง 25-45 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

น้ำหวานจากสดจากชุมชนป่าจาก ตำบล ขนาบนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช แสดงดังภาพประกอบที่ 3-1

ภาพประกอบที่ 3-1 น้ำหวานจากสด

3.1.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) Laboratory grade ผลิตโดย Merck

3.1.3 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) Laboratory grade ผลิตโดย Macron chemical

3.1.4 ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ยี่ห้อ Fermipan Brown

3.1.5 ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก (Isolated yeast) แยกและเลี้ยงเชื้อโดยภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.1.6 สารเคมีที่ใช้เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) Laboratory grade ผลิตโดย Merck
2. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate) Laboratory grade ผลิตโดย Ajax
3. ฟีนอล (Phenol) Laboratory grade ผลิตโดย Fishe scientific
4. 3, 5 – dinitrosalicylic acid Laboratory grade ผลิตโดย Sigma

3.1.7 สารเคมีที่ใช้เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

1. ฟีนอล (Phenol) Laboratory grade ผลิตโดย Fishe scientific
2. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) Laboratory grade ผลิตโดย Macron chemical

3.1.8 สารเคมีที่ใช้เพื่อวิเคราะห์เอทานอล

1. อะซิโตน (Acetone) Laboratory grade ผลิตโดย Fishe scientific
2. เอทานอล (Ethanol) ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.98 โดยปริมาตร Laboratory grade ผลิตโดย Macron chemical

3.1.9 สารเคมีที่ใช้เพื่อวิเคราะห์กรดอะซิติก

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) Laboratory grade ผลิตโดย Merck
2. โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Sodium hydrogen phthalate) Laboratory grade
3. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
2. เครื่องให้ความร้อน (Heater)
3. อ่างน้ำมันแบบเขย่า (Oil bath with shaker) Memmert รุ่น WNB 45
4. เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller)
6. ชุดขวดหมัก (Air locked flask)
7. ผ้ากรอง
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking incubator) รุ่น LSI-3016A แสดงดังภาพประกอบที่ 3-2

ภาพประกอบที่ 3-2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking incubator)

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. UV Visible Spectrophotometer (UV) รุ่น HP 8453 เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด แสดงได้ดังภาพประกอบที่ 3-3

ภาพประกอบที่ 3-3 UV Visible Spectrophotometer (UV) รุ่น HP 8453

2. Gas chromatography (GC) รุ่น 6890 flame ionization ยี่ห้อ Agilent แสดงได้ดังภาพประกอบที่ 3-4 เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดค่าเอทานอลโดยใช้เทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสม โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (Stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) สารที่ต้องการวัดค่าจะถูกเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นแก๊สแล้ววัดค่าด้วยตัววัดหลังจากนั้นแสดงผลออกมาเป็นพื้นที่ใต้พีค (Peak area) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

ภาพประกอบที่ 3-4 Gas chromatography (GC) รุ่น 6890 flame ionization ยี่ห้อ Agilent

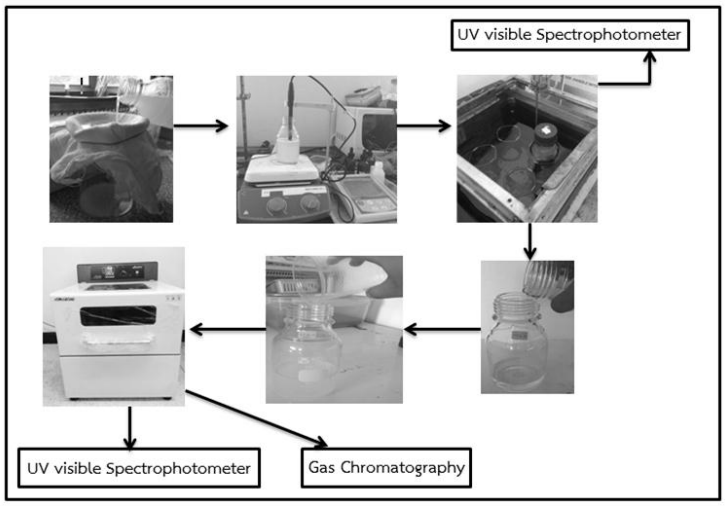
3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำหวานจาก

นำน้ำหวานจากส่งวิเคราะห์ปริมาณยีสต์ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พีเอช ปริมาณเอทานอล ปริมาณความชื้น ปริมาณกรดอะซิติกและความหนาแน่น

3.3.2 ศึกษาการเตรียมวัตถุดิบน้ำหวานจาก

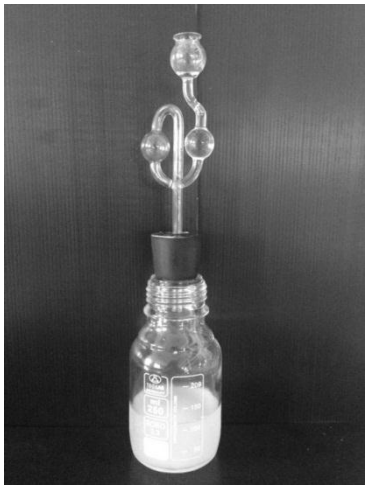
นำวัตถุดิบน้ำหวานจากมากรองแยกของแข็งออกแล้วนำไปปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5-6.5 หลังจากนั้นนำไปอุ่นในอ่างน้ำมันแบบเขย่าที่ช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-30 นาที เมื่ออุ่นเสร็จตั้งไว้เพื่อให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วแบ่งน้ำหวานที่ผ่านการเตรียมแล้วออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดด้วยเครื่อง UV สำหรับส่วนที่สองนั้นนำมาผสมกับน้ำสะอาดในชุดขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร โดยอัตราส่วนโดยน้ำหนักของน้ำหวานจากต่อน้ำกลั่นเป็น 1:1 (การทดลองใช้น้ำหวานจาก 50 กรัมและน้ำกลั่น 50 กรัม) แล้ววัดค่าพีเอชหลังเติมน้ำกลั่น เมื่อผสมน้ำหวานจากกับน้ำกลั่นแล้วจึงนำไปใส่ยีสต์ขนมปังปริมาณ 10^9 CFU ต่อสารละลายรวม 100 กรัม (0.1 กรัม) แล้วเติมแก๊สไนโตรเจนเพื่อแทนที่อากาศในขวดหมัก หลังจากนั้นนำไปหมักในตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อัตราการเขย่า 80 รอบต่อนาที หลังหมักเสร็จนำน้ำหมักมากรองผ่านผ้าขาวบางแล้วนำของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยเครื่อง UV และปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC แสดงดังภาพประกอบที่ 3-5



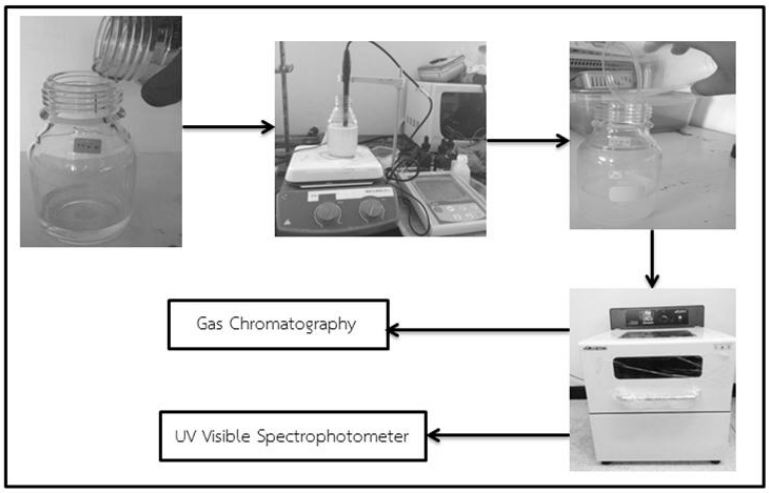
ภาพประกอบที่ 3-5 ขั้นตอนการศึกษาการเตรียมน้ำหวานจาก

3.3.3 ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast)

นำผลผลิตหลังอุ่นด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.3.2 ใส่ชุดขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตรแสดงดังภาพประกอบที่ 3-6 แล้วปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นให้อยู่ในช่วงร้อยละ 10-30 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไปปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 4.5-6.5 (ใช้สารละลายกรดซัลฟูริกหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์) แล้วใส่ยีสต์ขนมปังในช่วง 10^{8}-10^{10} CFU ต่อสารละลายรวม 100 กรัม (0.01, 0.1 และ 1 กรัมต่อสารละลายรวม 100 กรัม) หลังจากนั้นใส่แก๊สไนโตรเจนแทนที่อากาศในชุดขวดหมักแล้วนำไปหมักในตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิช่วง 28-40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 – 144 ชั่วโมง ที่อัตราการเขย่า 80 รอบต่อนาที หลังหมักเสร็จนำน้ำหมักมากรองผ่านผ้าขาวบางแล้วนำของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยเครื่อง UV และปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC แสดงดังภาพประกอบที่ 3-7



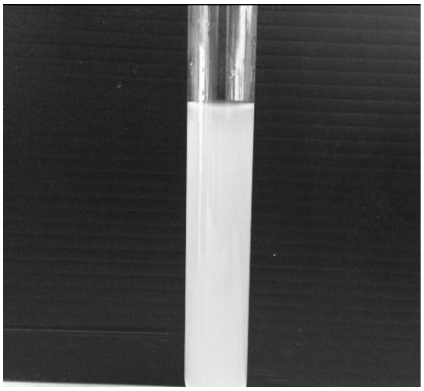
ภาพประกอบที่ 3-6 ชุดขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร



ภาพประกอบที่ 3-7 ขั้นตอนการศึกษาการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

3.3.4 ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

นำผลผลิตหลังอุ่นด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.3.2 ใส่ชุดขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตรแล้วปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นให้อยู่ในช่วงร้อยละ 10-30 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไปปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 4.5-6.5 (ใช้สารละลายกรดซัลฟูริกหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์) แล้วใส่ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากดังภาพประกอบที่ 3-8 ในช่วง 10^{8}-10^{10} CFU ต่อสารละลายรวม 100 กรัม (0.01, 0.1 และ 1 กรัมต่อสารละลายรวม 100 กรัม) หลังจากนั้นใส่แก๊สไนโตรเจนแทนที่อากาศในชุดขวดหมักแล้วนำไปหมักในตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิช่วง 28-40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 – 144 ชั่วโมง ที่อัตราการเขย่า 80 รอบต่อนาที หลังหมักเสร็จนำน้ำหมักมากรองผ่านผ้าขาวบางแล้วนำของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยเครื่อง UV และปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC แสดงดังภาพประกอบที่ 3-7



ภาพประกอบที่ 3-8 ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

3.3.5 ศึกษาการเพิ่มขนาดการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์

นำสภาวะที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.3.3 และ 3.3.4 มาเพิ่มขนาดการหมักจากชุดขวดหมัก 250 มิลลิลิตรเป็นถังหมักขนาด 5 ลิตร แสดงดังภาพประกอบที่ 3-9 แล้วนำผลผลิตของเหลวหลังหมักไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC

ภาพประกอบที่ 3-9 ถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร (สร้างจากงานวิจัย ผศ. ดร. สินินาฏ จงคง ทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2554)

3.3.6 ศึกษาสภาวะในการเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลโดยการกลั่น

นำผลผลิตหลังการหมักที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.3.3.และ 3.3.4 มากลั่นด้วยชุดเครื่องกลั่นแบบแพ็คคอลัมน์ โดยมีขนาด Packing 0.5 นิ้ว ความสูงคอลัมน์ 50 เซนติเมตร อัตราการไหลของน้ำหล่อเย็นเพื่อควบแน่นไอเอทานอล 5 ลิตรต่อนาที แสดงดังภาพประกอบที่ 3-10

ภาพประกอบที่ 3-10 ชุดเครื่องกลั่น (สร้างจากงานวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สินินาฏ จงคง ทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2554)

3.3.7 ประมาณค่าใช้จ่ายเบื้องต้นในการผลิตเอทานอล

ประมาณค่าใช้จ่ายเบื้องต้นในการผลิตเอทานอลเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายการผลิตในเชิงพาณิชย์ โดยคำนวณจากการผลิตเอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 โดยปริมาตรตามมาตรฐานทางการค้า

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบของน้ำหวานจาก

ตารางที่ 4-1 แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจาก[Δ]

องค์ประกอบ	วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
น้ำตาลรีดิวซ์	Modified Dinitosalicylic Acid	96.01±4.12 g/L
น้ำตาลทั้งหมด	Modified Phenol Sulfuric Method	363.98±5.69 g/L
เอทานอล	Internal standard method	3.78±0.54 %v
ปริมาณความชื้น	AOAC (Loss on Drying at 95-100 $^{\circ}$C)	82.60±3.81 %w
พีเอช	ใช้เครื่องวัดพีเอช	5.76±0.43
ความหนาแน่น	ใช้พิคโนมิเตอร์	1071.23±1.42 kg/m^3
กรดอะซิติก	การไตเตรต	0.04 M
ปริมาณเซลล์ยีสต์	Standard plate count *	7.0x10^4 CFU/ml

[Δ] น้ำหวานจากในช่วงเดือนเมษายน – พฤศจิกายน 2558

* ส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำหวานจาก แสดงดังตารางที่ 4-1 พบว่าน้ำหวานจากมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดสูง และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าวัตถุดิบน้ำตาลชนิดอื่นประมาณ 2 เท่าแสดงดังตารางที่ 4-2 อีกทั้งน้ำหวานจากมีเอทานอลเริ่มต้นอยู่แล้วแสดงให้เห็นว่าในน้ำหวานจากนั้นมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ นั่นคือ ยีสต์ น้ำหวานจากจึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่จะนำไปผลิตเอทานอล น้ำหวานจากสามารถกลายเป็นน้ำส้มจากได้เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพราะมีจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะซิติกอยู่ ดังนั้นน้ำหวานจากจะต้องถูกแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียสไว้ตลอดเวลาก่อนนำมาใช้ในการทดลอง เพื่อป้องกันการบูดของน้ำหวานจาก เนื่องจากน้ำหวานจากประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายตัวทั้งยีสต์ จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะซิติก และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งอย่างที่ทราบกันว่าจุลินทรีย์ผลิตกรดอะซิติกนั้นทำให้น้ำหวานกลายเป็นน้ำส้มจาก โดยในปัจจุบันนั้นชาวบ้านได้ทำการเคี่ยวเพื่อให้ความร้อนและระเหยน้ำออกเพื่อฆ่าจุลินทรีย์ทุกชนิดเพื่อป้องกันการบูดของน้ำหวานจาก แต่พบว่าวิธีนี้ได้มองข้ามประโยชน์ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในน้ำหวานจากและยังเปลืองพลังงานในการให้ความร้อน ที่อุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนที่ไม่แน่นอน งานวิจัยนี้จึงสนใจการเตรียมน้ำหวานจากเพื่อเอื้อให้ยีสต์สามารถทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยการเตรียมน้ำหวานจากด้วยการปรับพีเอชและอุ่นให้ความร้อนเพื่อเตรียมพร้อมก่อนนำไปผลิตเอทานอล ต่างจากงานวิจัยอื่นที่ใช้วัตถุดิบน้ำตาลในการผลิตเอทานอลที่ทำการเตรียม

โดยฆ่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อุณหภูมิสูงแล้วเติมยีสต์ใหม่ในขั้นตอนการหมักซึ่งเป็นการมองข้ามประโยชน์ของจุลินทรีย์ที่มีในน้ำหวาน

ตารางที่ 4-2 แสดงน้ำตาลทั้งหมดของวัตถุดิบน้ำตาล

วัตถุดิบ	น้ำตาลทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
น้ำหวานจาก	28-34
อ้อย	13-18
ชูการ์บีท	17-18

4.2 การเตรียมวัตถุดิบน้ำหวานจาก

จุดประสงค์ของขั้นตอนการเตรียมน้ำหวานคือ เพื่อเตรียมน้ำตาลให้พร้อมสำหรับการหมักโดยยีสต์ได้อย่างเหมาะสม ซึ่งงานวิจัยนี้นอกจากต้องการเตรียมเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลเพียงพอต่อการหมักแล้วยังต้องรักษายีสต์ที่มีอยู่แล้วในน้ำหวานจากจะได้ช่วยลดการเติมยีสต์เพิ่มในขณะขั้นตอนการหมัก ดังนั้นปัจจัยสำคัญในขั้นตอนการเตรียมน้ำหวานจากที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลและจุลินทรีย์ คือ พีเอช อุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อน

ผลได้จากขั้นตอนการเตรียมงานวิจัยทั่วไปจะพิจารณาเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด แต่งานวิจัยนี้ต้องการเลือกสภาวะที่ให้ผลได้น้ำตาลทั้งหมดมาก เนื่องจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเปลี่ยนได้ทั้งน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสซึ่งรวมอยู่ในค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดไปเป็นเอทานอล

โดยการออกแบบสภาวะการทดลองโดยโปรแกรม RSM ด้วยตัวแปรอิสระ 3 ตัวคือ พีเอช (A), อุณหภูมิในการอุ่น (B , องศาเซลเซียส), และระยะเวลาในการอุ่น (C , นาที) และมีตัวแปรตามคือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Y, กรัมต่อลิตร) ได้สภาวะการทดลองและผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-3

จากตารางที่ 4-3 เมื่อพิจารณาผลผลิตที่สำคัญเป็นน้ำตาลทั้งหมดหลังการอุ่น พบว่าผลการทดลองของน้ำตาลทั้งหมดสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายโดยมี R^2 เท่ากับ 0.942 และมีแบบจำลองสำหรับทำนายค่าน้ำตาลทั้งหมดหลังการอุ่นด้วยสภาวะต่างๆ แสดงดังสมการที่ (4.1)

$$Y = 2441.2 - 326.19A - 57.72B - 14.45C + 25.33A^2 + 0.404B^2 - 0.168C^2 + 1.847AB - 3.478AC + 0.961BC \quad (4.1)$$

ข้อมูลจากตารางที่ 4-3 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดหลังอุ่นได้เพิ่มขึ้นจากวัตถุดิบเริ่มต้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลทั้งสองตัวนั้นมีสาเหตุมาจากการให้ความร้อนในระหว่างการอุ่นเพราะความร้อนจะส่งผลให้แป้งที่ละลายน้ำถูกย่อยเป็นน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลโมเลกุลคู่ (ซูโครส) ที่อยู่รวมอยู่ในน้ำตาลทั้งหมดถูกย่อยกลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

จากข้อมูลแบบจำลองทำนายค่าน้ำตาลทั้งหมดตามปัจจัยต่างๆดังสมการที่ (4.1) นั้นสามารถแสดงได้ในรูปของกราฟพื้นผิว ดังภาพประกอบที่ 4-1 ถึง 4-3 ซึ่งสามารถทำให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อน้ำตาลทั้งหมด

ตารางที่ 4-3 สภาวะการทดลองจากโปรแกรม RSM ผลน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมดหลังการอุ่นน้ำหวานจากและเอทานอลหลังการหมักเบื้องต้น*

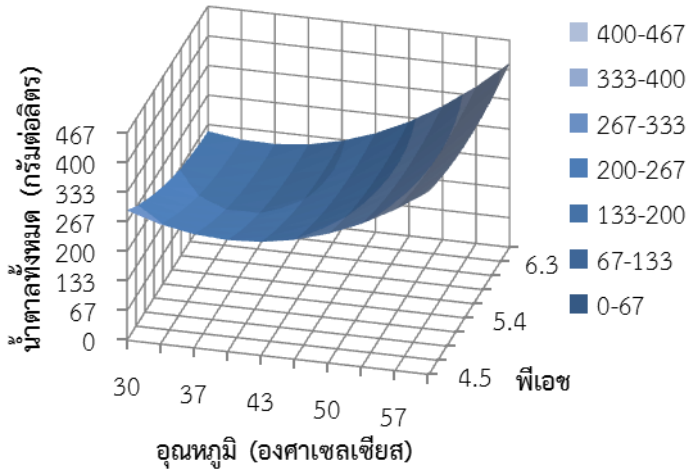
ลำดับที่	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	หลังอุ่น		หลังหมัก
				น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)
1	5.5	30	18	58.41	235.07	8.37
2	4.9	36	25	73.04	195.01	7.39
3	4.9	36	10	62.98	202	7.39
4	6.1	36	10	92.52	213.96	8.37
5	6.1	36	25	45.42	111.34	5.42
6	4.5	45	18	55.87	280.74	7.79
7	5.5	45	18	78.79	234.6	8.57
8	5.5	45	18	70.41	204.37	8.37
9	5.5	45	18	80.25	194.01	8.4
10	6.5	45	18	82.06	192.03	8.37
11	5.5	45	5	62.47	159.07	6.4
12	5.5	45	30	70.63	206.72	7.39
13	4.9	54	10	50.11	190.24	7.22
14	6.1	54	10	88.98	207.15	8.37
15	4.9	54	25	61.31	410.58	10.34
16	6.1	54	25	64.22	401.74	9.85
17	5.5	60	18	70.36	368.89	10.29

* การหมักเอทานอลเบื้องต้นโดยใช้น้ำหวานจากที่ผ่านการอุ่นแล้วผสมกับน้ำสะอาดที่อัตราส่วน 1:1 แล้วเติมยีสต์ขนมปัง 0.1 กรัม (10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม) หลังจากนั้นนำไปหมักใน Shaking incubator ที่อุณหภูมิห้อง อัตราการเขย่า 80 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(1) ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อน้ำตาลทั้งหมด

ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อน้ำตาลทั้งหมดที่ระยะเวลาการอุ่น 18 นาทีแสดงดังภาพประกอบที่ 4-1 พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการอุ่นจะส่งผลให้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นที่ทุก

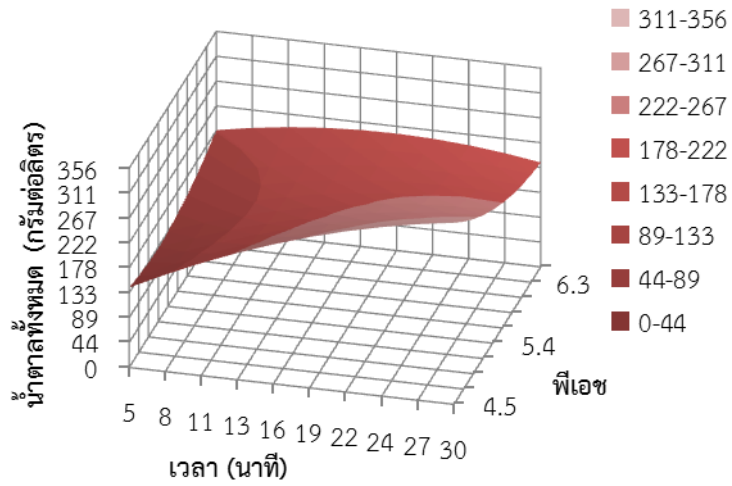
ค่าพีเอช ซึ่งจะได้น้ำตาลทั้งหมดในช่วงค่าที่เหมาะสมประมาณ 400-467 กรัมต่อลิตร เมื่ออุ่นที่อุณหภูมิในช่วง 53-60 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบที่ 4-1 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิต่อน้ำตาลทั้งหมดที่ระยะเวลาในการอุ่น 18 นาที

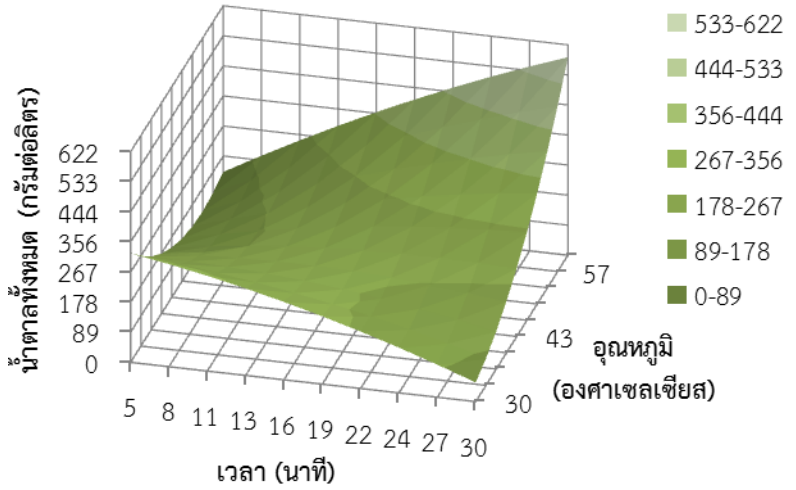
(2) ผลของพีเอชและระยะเวลาในการอุ่นต่อน้ำตาลทั้งหมด

ผลของพีเอชและระยะเวลาในการอุ่นต่อน้ำตาลทั้งหมดที่อุณหภูมิอุ่น 45 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบที่ 4-2 พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการอุ่นจะทำให้น้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นแต่น้ำตาลทั้งหมดจะลดลงเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ซึ่งสรุปได้ว่าควรปรับพีเอชให้อยู่ในช่วงที่ค่อนข้างเป็นกรดประมาณ 4.5-4.6 และอุ่นประมาณ 25-30 นาที จะทำให้ได้น้ำตาลทั้งหมดสุดในช่วง 311-356 กรัมต่อลิตร



ภาพประกอบที่ 4-2 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการอุ่นต่อน้ำตาลทั้งหมดที่อุณหภูมิในการอุ่น 45 องศาเซลเซียส

(3) ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการอุ่นต่อน้ำตาลทั้งหมด



ภาพประกอบที่ 4-3 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการอุ่นต่อน้ำตาลทั้งหมดที่พีเอชเท่ากับ 5.5

ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการอุ่นต่อน้ำตาลทั้งหมด ที่พีเอช 5.5 แสดงดังภาพประกอบที่ 4-3 พบว่าควรอุ่นด้วยเวลานานกว่า 20 นาที จึงจะทำให้น้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการอุ่น โดยจะได้ค่าน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 533-622 กรัมต่อลิตร เมื่ออุ่นที่อุณหภูมิ 54-60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25-30 นาที

การพิจารณาเพียงน้ำตาลทั้งหมดอาจไม่เพียงพอเนื่องจากการเตรียมน้ำหวานจากนั้นต้องเตรียมเพื่อให้ยีสต์สามารถทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นดังที่กล่าวมาข้างต้น เราจึงควรพิจารณาว่าสภาวะจากตารางการทดลองใดส่งผลให้ยีสต์ทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น จึงทดลองเพื่อตรวจสอบว่าสภาวะการเตรียมเหมาะสมต่อกระบวนการหมักจริง จึงได้นำผลผลิตหลังอุ่นในแต่ละสภาวะจากตารางที่ 4-3 มาทดลองหมักเบื้องต้นภายใต้สภาวะเดียวกันคือ ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นโดยเติมน้ำสะอาด 50 กรัมต่อน้ำหวานจาก 50 กรัม ใส่ยีสต์ขนมปัง 0.1 กรัม (10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม) และหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อพิจารณาว่ายีสต์สามารถทำงานได้จริง เนื่องจากเบื้องต้นผู้วิจัยคิดว่ายีสต์ที่มีอยู่ในน้ำหวานจากอาจไม่เพียงพอจึงออกแบบการทดลองหมักเบื้องต้นให้มีการใส่ยีสต์ขนมปังเพิ่มลงไปในปริมาณที่เท่ากันเพื่อยืนยันว่ามียีสต์เพียงพอสำหรับการหมัก การออกแบบสภาวะการทดลองด้วยโปรแกรม RSM มีตัวแปรอิสระ 3 ตัว คือ พีเอช (A), อุณหภูมิในการอุ่น (B , องศาเซลเซียส), และระยะเวลาในการอุ่น (C , นาที) โดยมีตัวแปรตามคือ ปริมาณเอทานอล (Y, ร้อยละโดยปริมาตร) แสดงดังตารางที่ 4-3

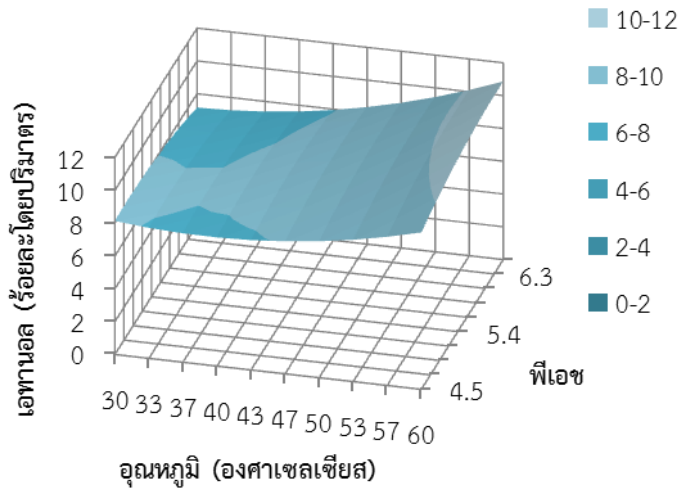
จากการพิจารณาผลผลิตด้วยการอุ่นตามสภาวะจากตารางที่ 4-3 และหมักที่สภาวะเดียวกัน พบว่าผลของเอทานอลที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายโดยมี R^2 เท่ากับ 0.963 และมีแบบจำลองสำหรับทำนายค่าเอทานอลหลังการหมักแสดงดังสมการที่ (4.2)

$$Y = 5.037 + 4.779A - 0.717B + 0.452C - 0.38A^2 + 0.00386B^2 - 0.00993C^2 + 0.3816AB - 0.126AC + 0.01384BC \quad (4.2)$$

จากข้อมูลแบบจำลองทำนายค่าเอทานอลจากปัจจัยต่างๆดังสมการที่ (4.2) นั้นสามารถแสดงได้ในรูปของกราฟพื้นผิว ดังภาพประกอบที่ 4-4 ถึง 4-6 ซึ่งสามารถทำให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อเอทานอล

(1) ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล

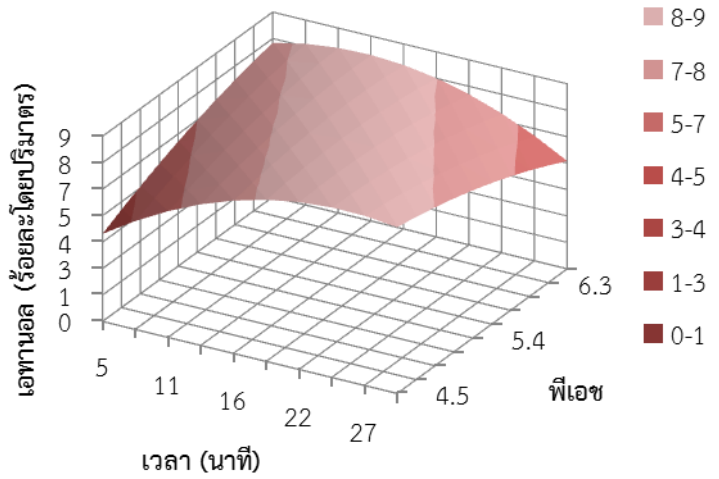
ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ระยะเวลาการอุ่น 18 นาทีแสดงดังภาพประกอบที่ 4-4 พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการอุ่นจะส่งผลให้มีปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่พีเอชส่งผลต่อปริมาณเอทานอลน้อยมาก ซึ่งจะได้เอทานอลในช่วงค่าที่เหมาะสมประมาณร้อยละ 10-12 โดยปริมาตร เมื่ออุ่นที่อุณหภูมิในช่วง 57-60 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบที่ 4-4 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ระยะเวลาในการอุ่น 18 นาที

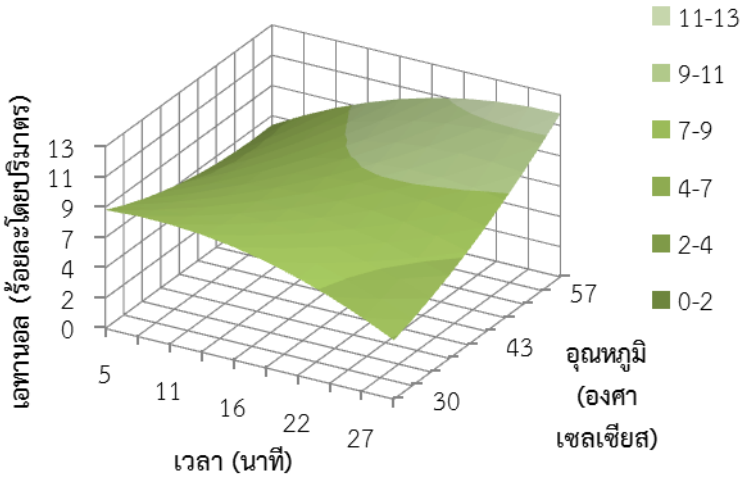
(2) ผลของพีเอชและระยะเวลาในการอุ่นต่อเอทานอล

ผลของพีเอชและระยะเวลาในการอุ่นต่อเอทานอลที่อุณหภูมิในการอุ่น 45 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบที่ 4-5 พบว่า ควรใช้ระยะเวลาในการอุ่นมากกว่า 8 นาที เพื่อจะได้เอทานอลในปริมาณที่เหมาะสมประมาณร้อยละ 8-9 โดยปริมาตร



ภาพประกอบที่ 4-5 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการอุ่นต่อเอทานอลที่อุณหภูมิในการอุ่น 45 องศาเซลเซียส

(3) ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการอุ่นต่อเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-6 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการอุ่นต่อเอทานอลที่พีเอชเท่ากับ 5.5

ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการอุ่นต่อเอทานอลที่พีเอช 5.5 แสดงดังภาพประกอบที่ 4-6 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาในการอุ่น ซึ่งจะได้เอทานอลในปริมาณที่เหมาะสมประมาณร้อยละ 11-13 โดยปริมาตร เมื่ออุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 57-60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20-30 นาที

จากการพิจารณาทั้งน้ำตาลทั้งหมดและเอทานอล เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการอุ่นน้ำหวานจาก พบว่าสภาวะที่พีเอชเท่ากับ 4.9 อุณหภูมิในการอุ่น 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาทีเป็นสภาวะที่น่าสนใจเนื่องจากมีน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุดและเมื่อนำน้ำหวานหลังการอุ่นด้วยสภาวะนี้ไปหมักจะได้เอทานอลร้อยละ 10.34 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นค่าเอทานอลที่สูงที่สุด (ตารางที่ 4-2)

แสดงให้เห็นได้ว่าสภาวะนี้มีทั้งน้ำตาลทั้งหมดที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลและยังเป็นสภาวะที่เอื้อในการทำงานของยีสต์ได้ดีอีกด้วยเพราะทำให้ได้เอทานอลสูง จึงเลือกเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการอุ่นน้ำหวานจาก

จากกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อทั้งน้ำตาลทั้งหมดและเอทานอลแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด รองลงมาคือระยะเวลาในการอุ่นและพีเอช พบว่าต้องอุ่นที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงเป็นระยะเวลานานพอเพื่อให้สามารถชะลอการทำงานของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ขัดขวางการผลิตเอทานอลและช่วยให้ยีสต์ทำงานได้ดีที่สุด ส่วนพีเอชนั้นควรดำเนินการในช่วงที่ค่อนข้างเป็นกรดเพื่อให้เหมาะกับเมทาบอลิซึมในการหมักของยีสต์

4.3 การหมักเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast)

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการอุ่นน้ำหวานจากแล้วจึงมาศึกษาหาสภาวะการหมักเอทานอลที่เหมาะสมด้วยยีสต์ขนมปัง

การศึกษาสภาวะในการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังนั้นทำการออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม RSM โดยมีตัวแปรอิสระ 5 ตัว คือ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (A, ร้อยละโดยน้ำหนัก), พีเอช (B), ปริมาณยีสต์ (10^C, CFU/สารละลาย 100 กรัม), อุณหภูมิในการหมัก (D, องศาเซลเซียส) และระยะเวลาในการหมัก (E, ชั่วโมง) โดยมีตัวแปรตามคือ ปริมาณเอทานอล (Y, ร้อยละโดยปริมาตร) แสดงดังตารางที่ 4-4

จากการพิจารณาผลผลิตที่ต้องการคือเอทานอล พบว่าผลของเอทานอลที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนาย โดยมี R^2 เท่ากับ 0.934 และมีแบบจำลองสำหรับทำนายค่าเอทานอลหลังการหมักแสดงดังสมการที่ (4.3)

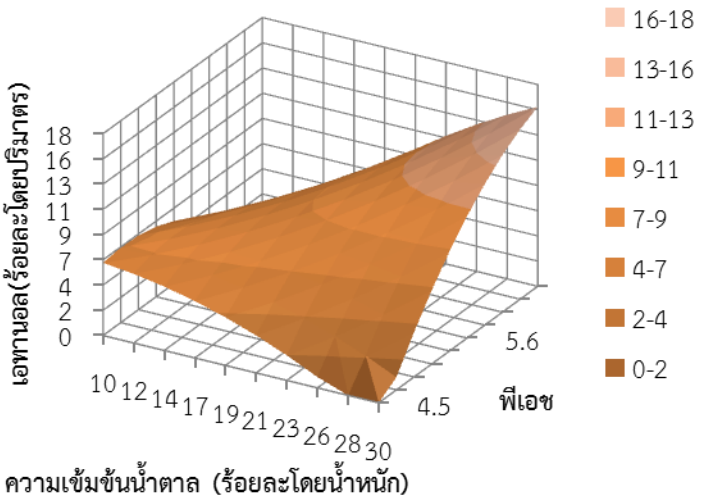
$$Y = - 253.83 - 3.731A + 65.09B + 18.55C + 0.676D + 0.735E - 0.01585A^2 - 2.897B^2 - 1.522C^2 + 0.03777D^2 - 0.000289E^2 + 0.655AB + 0.192AC - 0.01558AD - 0.002AE - 0.578BC - 1.102BD - 0.01877BE + 0.327CD - 0.04596CE - 0.00397DE \quad (4.3)$$

จากข้อมูลแบบจำลองทำนายค่าเอทานอลจากปัจจัยต่างๆ ดังสมการที่ (4.3) นั้นสามารถแสดงได้ในรูปของกราฟพื้นผิว ดังภาพประกอบที่ 4-7 ถึง 4-16 ซึ่งสามารถทำให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อเอทานอล

ตารางที่ 4-4 สภาวะการทดลองจากโปรแกรม RSM และผลเอทานอลหลังการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง

ลำดับที่	น้ำตาล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	พีเอช	ปริมาณยีสต์ (CFUต่อสารละลาย 100 กรัม)	อุณหภูมิ (องศา-เซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)
1	20	5.5	10^{9}	28	77	13.79
2	20	5.5	10^{9}	34	10	6.39
3	20	5.5	10^{9}	34	77	9.36
4	30	5.5	10^{9}	34	77	11.79
5	20	4.5	10^{9}	34	77	4.14
6	10	5.5	10^{9}	34	77	3.84
7	20	6.5	10^{9}	34	77	8.87
8	20	5.5	10^{9}	34	77	8.23
9	20	5.5	10^{8}	34	77	8.37
10	20	5.5	10^{9}	34	77	9.01
11	20	5.5	10^{10}	34	77	6.87
12	20	5.5	10^{9}	34	144	9.87
13	20	5.5	10^{9}	40	77	7.73
14	15	5	10^{9}	31	44	6.68
15	25	6	10^{9}	31	44	15.57
16	15	6	10^{8}	31	44	8.18
17	25	5	10^{8}	31	44	3.55
18	25	6	10^{8}	31	111	16.06
19	15	6	10^{9}	31	111	8.37
20	25	5	10^{9}	31	111	5.24
21	15	5	10^{8}	31	111	9.85
22	25	5	10^{9}	37	44	7.04
23	15	6	10^{9}	37	44	4.42
24	25	6	10^{8}	37	44	5.62
25	15	5	10^{8}	37	44	4.38
26	25	6	10^{9}	37	111	5.75
27	15	6	10^{8}	37	111	3.45
28	15	5	10^{9}	37	111	6.99
29	25	5	10^{8}	37	111	4.43

(1) ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชต่อเอทานอล

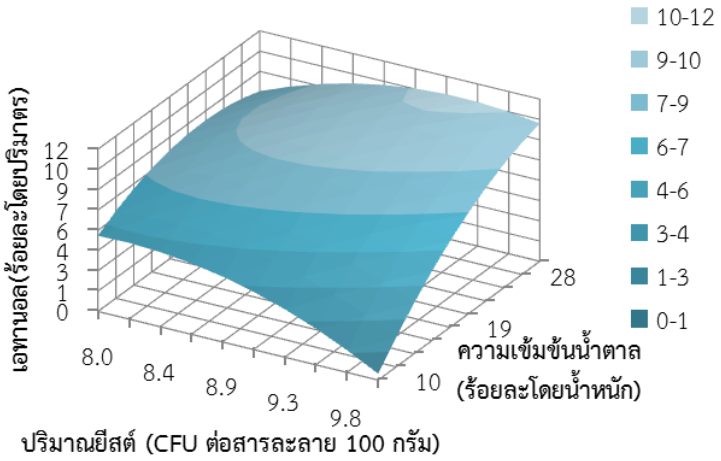


ภาพประกอบที่ 4-7 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชต่อเอทานอล ที่ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชมีผลต่อเอทานอล ที่ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-7 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชเพิ่มขึ้น โดยจะได้เอทานอลที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 16-18 โดยปริมาตร เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในช่วงร้อยละ 28-30 โดยน้ำหนัก และพีเอชในช่วง 6.3-6.5

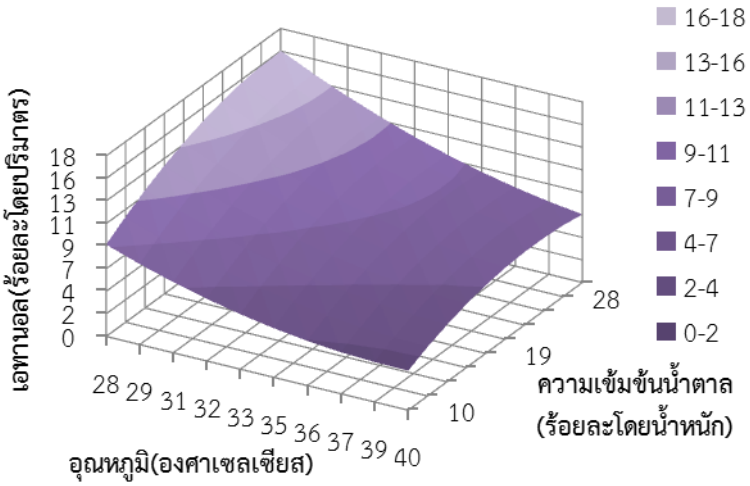
(2) ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณยีสต์ต่อเอทานอล

ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณยีสต์ขนมปังต่อเอทานอลที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-8 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของยีสต์นั้นไม่ค่อยส่งผลต่อเอทานอล เนื่องจากยีสต์ต้องเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล หากมีปริมาณยีสต์มากแต่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นน้อยก็ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ หากไม่มีสารตั้งต้น โดยช่วงความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วงร้อยละ 28-30 โดยน้ำหนัก จะทำให้ได้เอทานอลที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 10-12 โดยปริมาตร



ภาพประกอบที่ 4-8 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณยีสต์ ขนมปังต่อเอทานอลที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

(3) ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและอุณหภูมิต่อเอทานอล

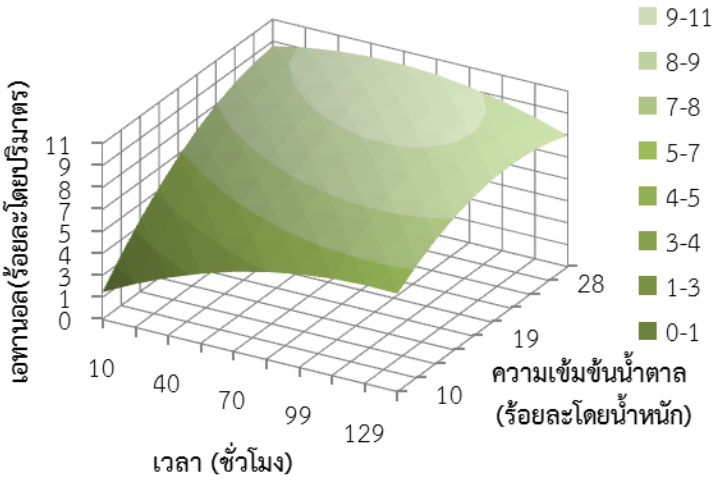


ภาพประกอบที่ 4-9 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและอุณหภูมิต่อเอทานอลที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและและอุณหภูมิในการหมักต่อเอทานอลที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-9 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้น แต่เอทานอลจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ เพราะอุณหภูมิที่สูงเกินไปสามารถทำให้ยีสต์ตายได้ จึงส่งผลให้ได้เอทานอลในปริมาณต่ำ โดยเอทานอลที่เหมาะสมอยู่ในช่วงร้อยละ 16-18 โดยปริมาตร เมื่อดำเนินการที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นช่วงร้อยละ 20-30 โดยน้ำหนักและอุณหภูมิในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส

(4) ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล

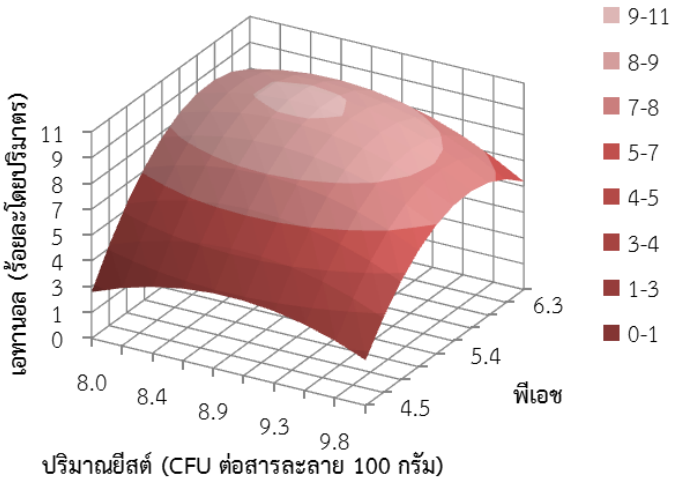
ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบที่ 4-10 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้น การเพิ่มเวลาในการหมักนั้นส่งผลให้เอทานอลเพิ่มขึ้นในช่วงแรก แต่หากเพิ่มเวลามากเกินไป เอทานอลก็จะมีแนวโน้มคงที่เนื่องจากเมื่อหมักเป็นเวลานานเกินไป ยีสต์ก็จะใช้น้ำตาลเป็นสารอาหารจนหมด ส่งผลให้เอทานอลไม่เพิ่มขึ้น ซึ่งเอทานอลที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงร้อยละ 9-11 โดยปริมาตร เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในช่วงร้อยละ 20-30 โดยน้ำหนักและเวลาการหมักในช่วง 25-130 ชั่วโมง



ภาพประกอบที่ 4-10 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส

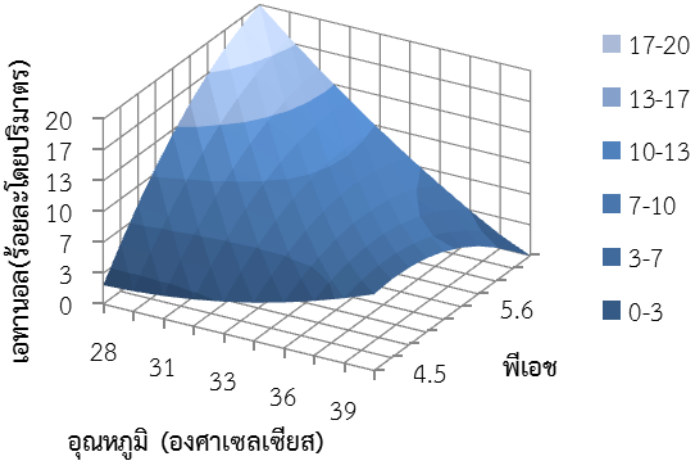
(5) ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์ต่อเอทานอล

ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-11 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น แต่หากพีเอชเพิ่มจนเกิน 6 ไปจะทำให้เอทานอลมีค่าลดลง ส่วนปริมาณยีสต์นั้นใช้เพียง 10^8-10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ก็เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลแล้ว หากดำเนินการที่ช่วงพีเอช 5.6-6.2 จะทำให้ได้เอทานอลที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 9-11 โดยปริมาตร



ภาพประกอบที่ 4-11 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์ขนมปังต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

(6) ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล

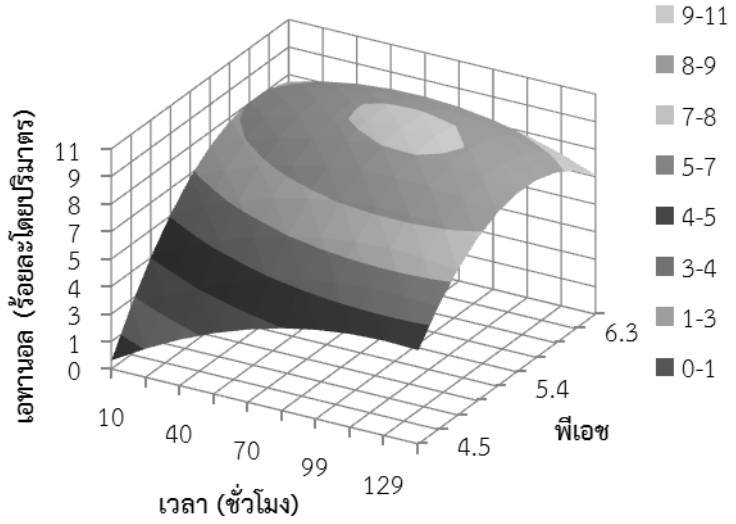


ภาพประกอบที่ 4-12 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-12 พบว่าเอทานอลจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ แต่เอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มพีเอช ซึ่งเอทานอลที่เหมาะสมอยู่ในช่วงร้อยละ 17-20 โดยปริมาตร เมื่อหมักที่พีเอชในช่วง 5.8-6.5 ด้วยอุณหภูมิในการหมัก 28-30 องศาเซลเซียส

(7) ผลของพีเอชและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล

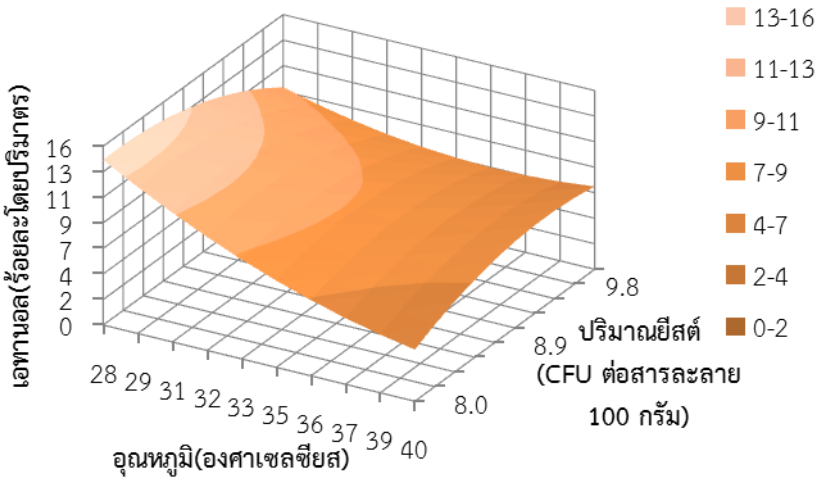
ผลของพีเอชและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบที่ 4-13 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชและเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น แต่หากเพิ่มพีเอชและเวลาในการหมักมากเกินไปจะทำให้เอทานอลลดลงและสิ้นเปลืองเวลาโดยเปล่าประโยชน์ จึงควรดำเนินการที่พีเอชในช่วง 5.6-6.2 และระยะเวลาในการหมักในช่วง 55-115 ชั่วโมงจะทำให้ได้เอทานอลที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 9-11 โดยปริมาตร



ภาพประกอบที่ 4-13 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส

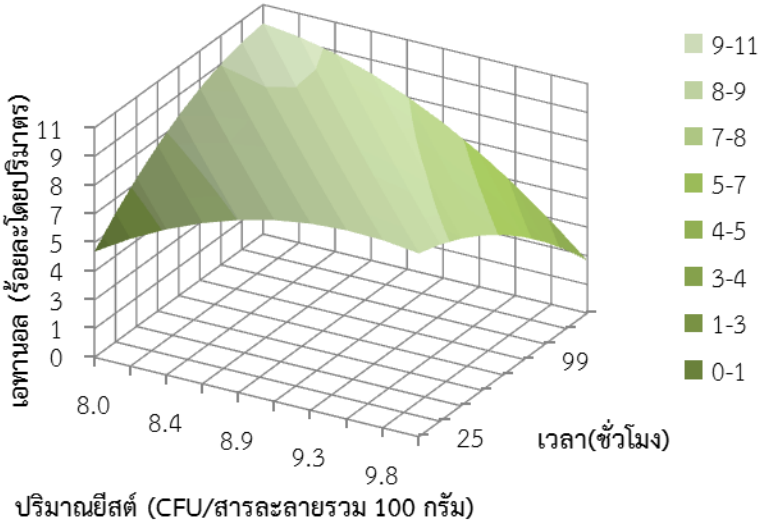
(8) ผลของปริมาณยีสต์และอุณหภูมิต่อเอทานอล

ผลของปริมาณยีสต์ขนมปังและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-14 พบว่าเมื่อลดอุณหภูมิในการหมักจะส่งผลให้เอทานอลเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณยีสต์นั้น ใช้เพียง 10^8-10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ก็เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลแล้ว โดยช่วงอุณหภูมิที่ส่งผลให้ได้เอทานอลในช่วงร้อยละ 13-16 โดยปริมาตร คือ 28-29 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบที่ 4-14 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยีสต์ขนมปังและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

(9) ผลของปริมาณยีสต์และระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล

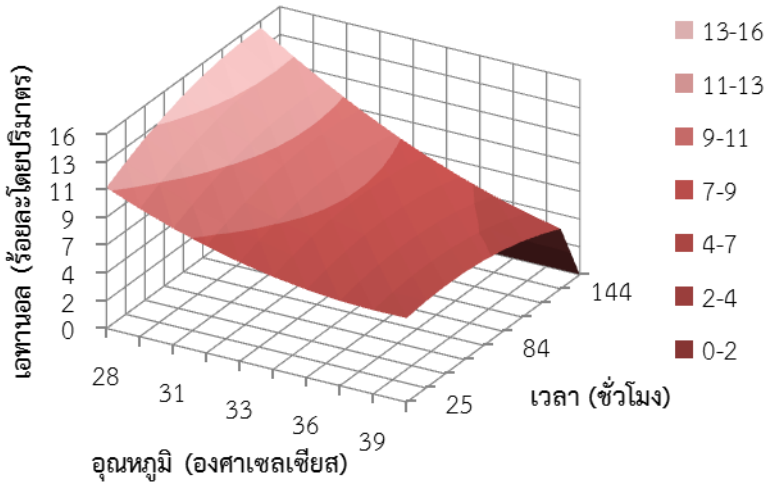


ภาพประกอบที่ 4-15 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยีสต์ขนมปังและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส

ผลของปริมาณยีสต์ขนมปังและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบที่ 4-15 พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมักจะทำให้เอทานอลเพิ่มขึ้น ปริมาณยีสต์ 10^8 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เพียงพอต่อการผลิตเอทานอล โดยจะได้เอทานอลที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 9-11 โดยปริมาตรเมื่อหมักในช่วงระยะเวลา 99-144 ชั่วโมง

(10) ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล

ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม แสดงดังภาพประกอบที่ 4-16 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมัก แต่เอทานอลจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการหมัก โดยจะได้เอทานอลที่เหมาะสมเมื่อดำเนินการที่อุณหภูมิในช่วง 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 70-144 ชั่วโมง



ภาพประกอบที่ 4-16 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอลที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม

จากการทำนายสภาวะการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังจากโปรแกรม RSM พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก พีเอช 6.5 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^8 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 130 ชั่วโมง จะทำให้ได้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 18.51 โดยปริมาตร และเมื่อทำการทดลองจริงพบว่าได้เอทานอลร้อยละ 18.39 โดยปริมาตร ซึ่งใกล้เคียงจากค่าเอทานอลจากการทำนาย แต่เนื่องจากวัตถุดิบน้ำหวานจากในแต่ละรอบที่ไปได้มาจากแหล่งผลิตนั้นมีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน (300.16-364.78 กรัมต่อลิตร) โดยในช่วงฤดูฝนจะมีความเข้มข้นน้ำตาลต่ำกว่าฤดูร้อน หากเราเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ความเข้มข้นน้ำตาลในช่วงฤดูฝนนั้นอาจจะไม่สามารถทำได้ และโปรแกรม RSM นั้นทำนายเฉพาะปัจจัยของยีสต์เพียงชนิดเดียว แต่น้ำหวานจากนั้นมีจุลินทรีย์หลายชนิด เราจึงต้องพิจารณาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยดูความเหมาะสมของวัตถุดิบด้วย แต่โปรแกรม RSM ก็สามารถใช้ดูแนวโน้มของตัวแปรต่างๆ ได้เพื่อใช้ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสม โดยสภาวะจากตารางที่ 4-4 ที่น่าสนใจคือ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก พีเอช 6 ปริมาณยีสต์ 10^8 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 111 ชั่วโมง เนื่องจากได้ค่าเอทานอลมากที่สุด จึงลองทำการทดลองซ้ำเพื่อดูความแม่นยำ พบว่าได้เอทานอลร้อยละ 16.87 โดยปริมาตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าเดิมจากตารางการทดลองคือ ร้อยละ 16.06 โดยปริมาตร เราจึงเลือกสภาวะนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสม แม้ว่าจะได้เอทานอลไม่มากเท่าสภาวะจากโปรแกรม RSM

แต่ด้วยความเหมาะสมกับวัตถุดิบเกี่ยวกับค่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น และยังใช้เวลาในการหมักน้อยกว่า ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการผลิตได้อีกด้วย จึงเป็นเหตุผลที่สมควรที่จะเลือกสภาวะที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก พีเอช 6 ปริมาณยีสต์ 10^8 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 111 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสม

จากกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด รองลงมาคือ อุณหภูมิ ระยะเวลาการหมักและพีเอช ส่วนปริมาณยีสต์นั้นใช้เพียง 10^8-10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัมก็เพียงพอต่อการหมักแล้ว โดยจะเห็นว่าหากความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจะทำให้เอทานอลเพิ่มขึ้นเนื่องจากน้ำตาลเป็นสารอาหารที่ยีสต์ใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อผลิตเอทานอล ส่วนอุณหภูมินั้นควรจะอยู่ในช่วง 28-31 องศาเซลเซียส เพราะอุณหภูมิที่สูงเกินไปจะส่งผลให้ยีสต์ตายได้ ระยะเวลาการหมักควรจะนานพอให้ยีสต์หมักและย่อยน้ำตาลได้แต่ไม่ควรนานเกินไป

4.4 การหมักเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก (Isolated yeast)

เนื่องจากในน้ำหวานจากมียีสต์ธรรมชาติอยู่แล้วจึงทดลองแยกยีสต์จากน้ำหวานจากมาทำการทดลองใช้ในการหมักเพื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์แห้ง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมนั้นทำการออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม RSM ด้วยตัวแปรอิสระ 5 ตัว คือ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (A, ร้อยละโดยน้ำหนัก), พีเอช (B), ปริมาณยีสต์ (10^C, CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม), อุณหภูมิในการหมัก (D, องศาเซลเซียส) และระยะเวลาในการหมัก (E, ชั่วโมง) และตัวแปรตามคือ ปริมาณเอทานอล (Y, ร้อยละโดยปริมาตร) แสดงดังตารางที่ 4-5

จากการพิจารณาผลผลิตที่สำคัญคือเอทานอล พบว่าผลของเอทานอลที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายโดยมี R^2 เท่ากับ 0.933 และมีแบบจำลองสำหรับทำนายค่าเอทานอลหลังการหมักแสดงดังสมการที่ (4.4)

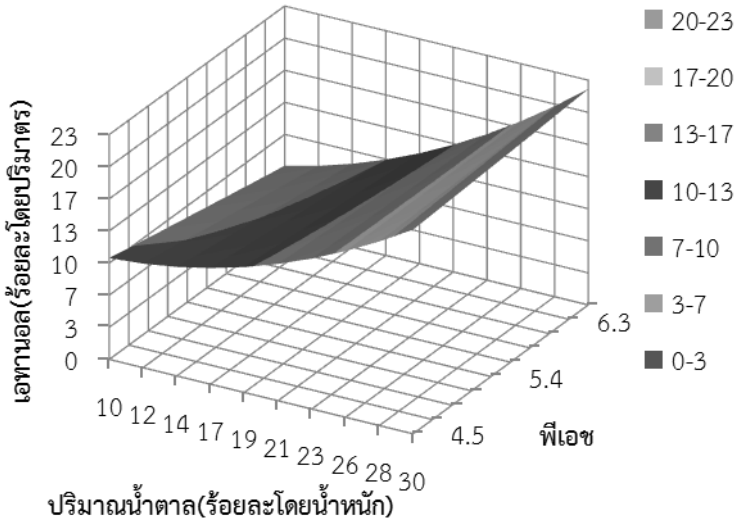
$$Y = 428.38 - 6.254A - 82.14B + 11.91C - 8.018D - 0.935E + 0.02269A^2 + 0.2929B^2 - 1.199C^2 - 0.01321D^2 - 0.000562E^2 + 0.125AB + 0.181AC + 0.08513AD + 0.01088AE + 2.622BC + 1.443BD + 0.08738BE - 0.266CD - 0.00647CE - 0.01239DE \quad (4.4)$$

จากข้อมูลแบบจำลองทำนายค่าเอทานอลจากปัจจัยต่างๆ ดังสมการที่ (4.4) นั้นสามารถแสดงได้ในรูปของกราฟพื้นผิว ดังภาพประกอบที่ 4-17 ถึง 4-26

ตารางที่ 4-5 สภาวะการทดลองจากโปรแกรม RSM และผลเอทานอลหลังการหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

ลำดับที่	น้ำตาล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	พีเอช	ปริมาณยีสต์ (CFUต่อสารละลาย 100 กรัม)	อุณหภูมิ (องศา-เซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)
1	20	5.5	10^{9}	28	77	18.33
2	20	5.5	10^{9}	34	10	8.42
3	20	5.5	10^{9}	34	77	13.27
4	30	5.5	10^{9}	34	77	20.69
5	20	4.5	10^{9}	34	77	12.79
6	10	5.5	10^{9}	34	77	7.91
7	20	6.5	10^{9}	34	77	11.33
8	20	5.5	10^{9}	34	77	13.3
9	20	5.5	10^{8}	34	77	11.82
10	20	5.5	10^{9}	34	77	12.32
11	20	5.5	10^{10}	34	77	10.32
12	20	5.5	10^{9}	34	144	10.55
13	20	5.5	10^{9}	40	77	4.78
14	15	5	10^{9}	31	44	15.76
15	25	6	10^{9}	31	44	10.99
16	15	6	10^{8}	31	44	8.87
17	25	5	10^{8}	31	44	17.73
18	25	6	10^{8}	31	111	15.76
19	15	6	10^{9}	31	111	9.85
20	25	5	10^{9}	31	111	19.21
21	15	5	10^{8}	31	111	13.3
22	25	5	10^{9}	37	44	10.69
23	15	6	10^{9}	37	44	6.32
24	25	6	10^{8}	37	44	10.34
25	15	5	10^{8}	37	44	7.24
26	25	6	10^{9}	37	111	26.91
27	15	6	10^{8}	37	111	10.34
28	15	5	10^{9}	37	111	4.79
29	25	5	10^{8}	37	111	17.09

(1) ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชต่อเอทานอล

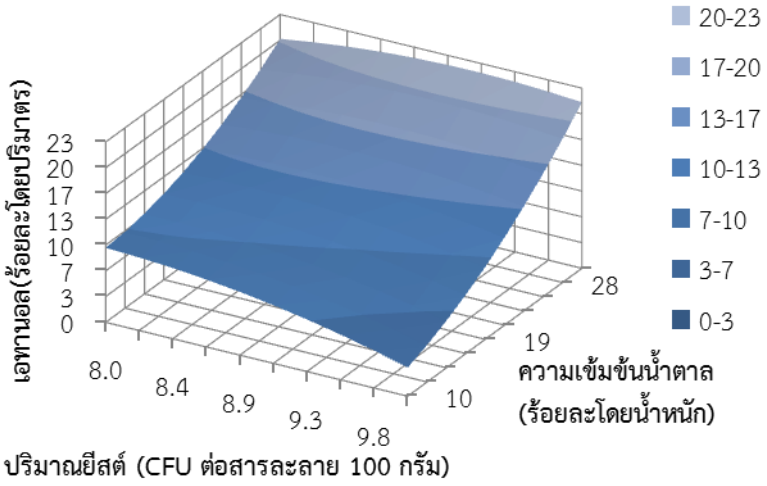


ภาพประกอบที่ 4-17 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชต่อเอทานอลที่ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและพีเอชต่อเอทานอลที่ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-17 พบว่าเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เอทานอลเพิ่มขึ้น ส่วน พีเอชส่งผลต่อปริมาณเอทานอลน้อย โดยจะได้เอทานอลร้อยละ 20-23 โดยปริมาตร เมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 28-30 โดยน้ำหนัก

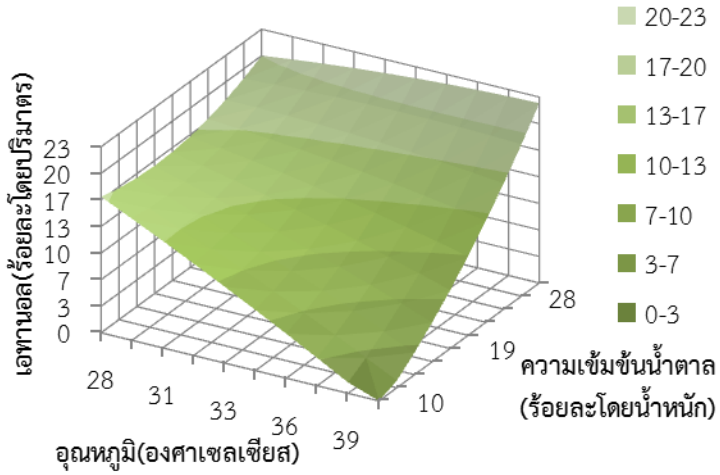
(2) ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากต่อเอทานอล

ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากต่อเอทานอลที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-18 พบว่าเอทา-นอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากนั้นไม่ค่อยส่งผลต่อปริมาณเอทานอล เห็นได้ว่ายีสต์เพียง 10^8 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ก็เพียงพอต่อการหมักเอทานอลแล้ว ซึ่งจะได้เอทานอลร้อยละ 20-23 โดยปริมาตรเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในช่วงร้อยละ 28-30 โดยน้ำหนัก



ภาพประกอบที่ 4-18 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

(3) ผลของความเข้มข้นน้ำตาลและอุณหภูมิต่อเอทานอล

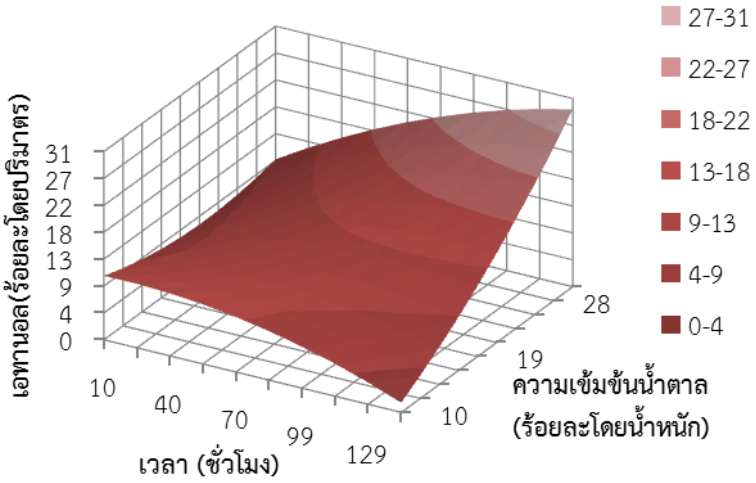


ภาพประกอบที่ 4-19 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและอุณหภูมิต่อเอทานอลที่ พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

ผลของความเข้มข้นน้ำตาลและและเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 ปริมาณ ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-19 พบว่าเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เอทานอลเพิ่มขึ้น สำหรับอุณหภูมิในการหมักนั้นควรจะใช้ในช่วงอุณหภูมิต่ำเพราะการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิไม่ค่อยส่งผลให้เอทานอลเพิ่มขึ้น ซึ่งหากใช้น้ำตาลเริ่มต้นในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 28-30 โดยน้ำหนักจะได้เอทา-นอลในช่วงที่เหมาะสมร้อยละ 20-23 โดยปริมาตร

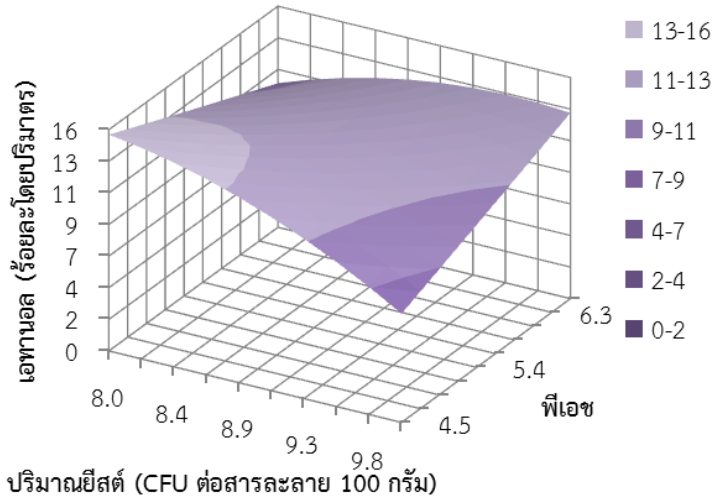
(4) ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล

ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบที่ 4-20 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น โดยต้องใช้น้ำตาลเริ่มต้นช่วงร้อยละ 25-30 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาในการหมักในช่วง 100-144 ชั่วโมง จะทำให้ได้เอทานอลที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 27-31 โดยปริมาตร



ภาพประกอบที่ 4-20 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส

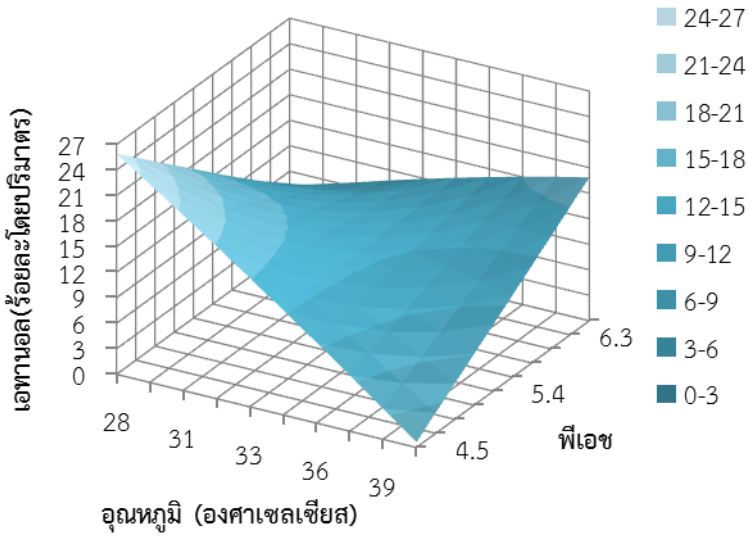
(5) ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากต่อเอทานอล



ภาพประกอบที่ 4-21 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

ผลของพีเอชและปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-21 พบว่าปริมาณเอทานอลลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณยีสต์นั้นใช้เพียง 10^8-10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ก็เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลแล้ว ซึ่งเมื่อใช้พีเอชในช่วง 4.5-5.3 จะทำให้ได้เอทานอลในปริมาณที่เหมาะสมช่วงร้อยละ 13-16 โดยปริมาตร

(6) ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล

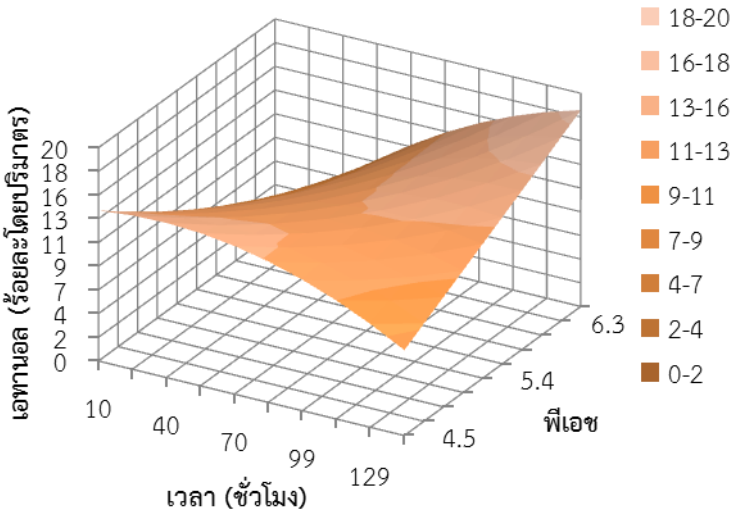


ภาพประกอบที่ 4-22 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-22 พบว่าเอทานอลลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและพีเอชในการหมัก โดยจะได้เอทานอลในช่วงร้อยละ 24-27 โดยปริมาตร เมื่อใช้พีเอชในช่วง 4.5-4.7 และอุณหภูมิในช่วง 28-29 องศา-เซลเซียส

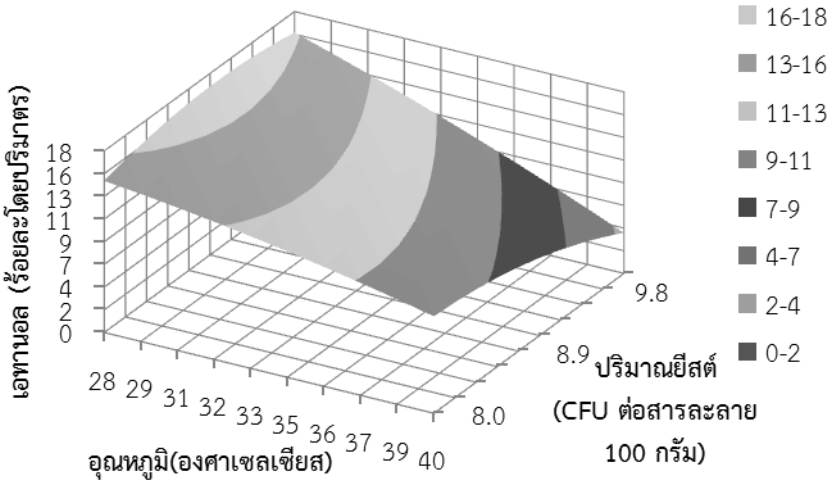
(7) ผลของพีเอชและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล

ผลของพีเอชและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบที่ 4-23 พบว่าหากต้องการเอทานอลความเข้มข้นสูงต้องดำเนินที่พีเอชต่ำในระยะเวลาการหมักที่สั้น โดยจะได้เอทานอลที่เหมาะสมในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 18-20 โดยปริมาตร



ภาพประกอบที่ 4-23 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอลที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส

(8) ผลของปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากและอุณหภูมิต่อเอทานอล

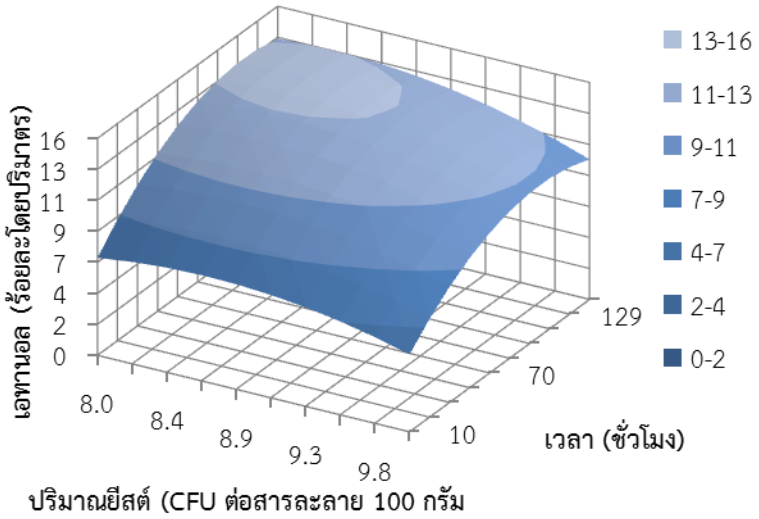


ภาพประกอบที่ 4-24 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 เป็นเวลา 77 ชั่วโมง

ผลของปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากและอุณหภูมิต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 เป็นเวลา 77 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบที่ 4-24 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการหมักลดลง ส่วนปริมาณยีสต์ไม่ค่อยส่งผลต่อปริมาณเอทานอล โดยจะได้ เอทานอลในช่วงที่เหมาะสมร้อยละ 16-18 โดยปริมาตร เมื่อใช้อุณหภูมิในการหมักประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส

(9) ผลของปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล

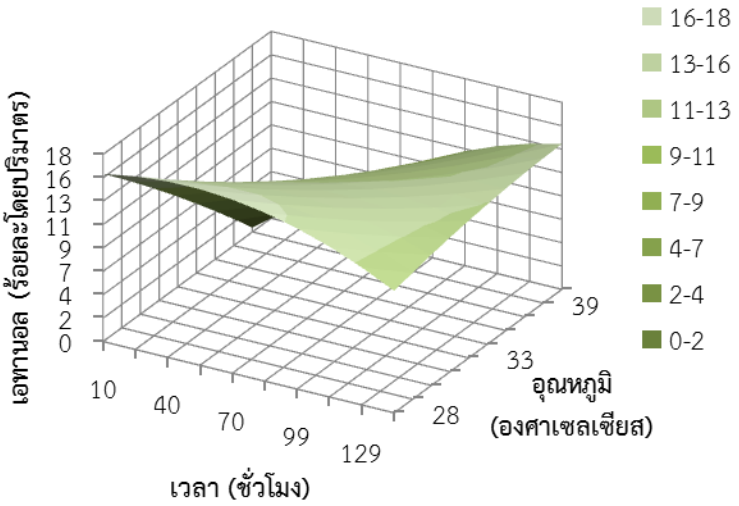
ผลของปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพประกอบที่ 4-25 พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมักจะส่งผลให้เอทานอลเพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณยีสต์นั้นที่ระยะเวลาหมักนานหากใช้ยีสต์ในปริมาณมากก็จะส่งผลให้เอทานอลมีค่าลดลง จึงควรดำเนินการหมักที่ช่วงปริมาณยีสต์ 10^{8}-10^{9} CFU ต่อสารละลาย 100 กรัมและระยะเวลาในการหมัก 90-144 ชั่วโมงจึงจะทำให้ได้เอทานอลในช่วงที่เหมาะสมร้อยละ 13-16 โดยปริมาตร



ภาพประกอบที่ 4-25 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 อุณหภูมิการหมัก 34 องศาเซลเซียส

(10) ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล

ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอล ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^{9} CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม แสดงดังภาพประกอบที่ 4-26 พบว่าเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิและเพิ่มระยะเวลาในการหมัก แต่ที่อุณหภูมิในการหมักต่ำนั้นสามารถใช้ระยะเวลาในการหมักได้ตั้งแต่ 10-129 ชั่วโมง โดยจะได้เอทา-นอลความเข้มข้นช่วงร้อยละ 16-18 โดยปริมาตร



ภาพประกอบที่ 4-26 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักต่อเอทานอลที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พีเอช 5.5 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม

จากการทำนายสภาวะการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก โดยโปรแกรม RSM พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก พีเอช 4.5 ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 67 ชั่วโมง จะทำให้ได้ เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 28.17 โดยปริมาตร เมื่อทำการทดลองจริงพบว่าได้เอทานอลร้อยละ 26.28 โดยปริมาตร แต่จากเงื่อนไขของวัตถุดิบที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดบางฤดูกาลต่ำกว่าร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ซึ่งควรเลือกสภาวะที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่วัตถุดิบมีได้ทุกฤดูกาลนั่นคือ ที่ร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่มีความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก พีเอช 6 ปริมาณยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 111 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสม (ค่ามากที่สุดจากตารางที่ 4-5)

จากกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด รองลงมาคือ อุณหภูมิ ระยะเวลาการหมักและพีเอช ส่วนปริมาณยีสต์นั้นส่งผลน้อยต่อการหมักเอทานอล เนื่องจากยีสต์ปริมาณ 10^8-10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม เป็นช่วงที่เพียงพอต่อการหมักเอทานอลแล้ว ส่วนปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นนั้นเห็นได้ชัดเจนว่ายิ่งสูงจะทำให้เอทานอลเพิ่มขึ้น แต่เราไม่ควรเลือกสภาวะที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูงเกินไปเพราะวัตถุดิบมีความเข้มข้นน้ำตาลที่แปรปรวนตามฤดูกาล ควรเลือกค่าสูงสุดที่มีได้ทุกฤดู สำหรับอุณหภูมิในการหมักนั้นไม่ควรหมักที่อุณหภูมิสูงเกินไปเพราะจะส่งผลให้ยีสต์ตายได้ ระยะเวลาในการหมักนั้นหากเพิ่มขึ้นก็จะส่งผลให้ได้เอทานอลมากขึ้น ส่วนค่าพีเอชนั้นควรหมักในช่วงที่ค่อนข้างเป็นกรดเพราะจะเหมาะต่อกระบวนการหมักของยีสต์

4.5 การเพิ่มขนาดการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์

การเพิ่มขนาดการหมักจากการใช้ขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตรเป็นใช้ถังปฏิกรณ์ที่มีเครื่องควบคุมอุณหภูมิ พีเอช และการกวนเพื่อเป็นต้นแบบสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ พบว่าการหมักทั้งสองแบบภายใต้สภาวะเดียวกันให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกัน โดยตารางที่ 4-5 แสดงการเปรียบเทียบเอทานอลหลังการหมักด้วยขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร กับถังหมักขนาด 5 ลิตร จะเห็นได้ว่าการหมักเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากนั้น สามารถสร้างต้นแบบการผลิตที่ใหญ่ขึ้นได้ง่าย

ตารางที่ 4-6 เปรียบเทียบเอทานอลหลังการหมักด้วยขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตรกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล	เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	
	ขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร	ถังหมักขนาด 5 ลิตร
ยีสต์ขนมปัง	16.78	16.00
ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	26.91	26.90

4.6 การกลั่นเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอล

การกลั่นเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลมีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 95 ปริมาตรตามมาตรฐานทางการค้าถูกดำเนินการด้วยเครื่องกลั่นแบบแพ็คคอลัมน์ โดยมีขนาด Packing 0.5 นิ้ว ความสูงคอลัมน์ 50 เซนติเมตร อัตราการไหลของน้ำหล่อเย็นเพื่อควบแน่นไอเอทานอล 5 ลิตรต่อนาที สภาวะที่ทำการศึกษาคือ อุณหภูมิไอเท่ากับ 76, 78 และ 80 องศาเซลเซียส จากตารางที่ 4-6 พบว่าที่อุณหภูมิไอ 78 องศาเซลเซียส ได้ค่าความบริสุทธิ์ของเอทานอลมากกว่าอุณหภูมิไอ 76 และ 80 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอทานอลมีจุดเดือดเท่ากับ 78 องศาเซลเซียส ซึ่งสำหรับเครื่องมือชุดนี้ต้องให้ความร้อนน้ำหมักที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียสจึงจะทำให้ได้อุณหภูมิไอ 78 องศาเซลเซียส ได้ความบริสุทธิ์เอทานอลมากกว่าร้อยละ 95 โดยปริมาตร

ตารางที่ 4-7 ค่าอุณหภูมิเครื่องให้ความร้อนและเอทานอลที่อุณหภูมิไอ 76, 78 และ 80 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิไอ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิเครื่องให้ความร้อน (องศาเซลเซียส)	เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)
76	101	94.4
78	103	95.32
80	104	93.12

4.7 ผลการประมาณต้นทุนการผลิตเบื้องต้น

การประมาณต้นทุนการผลิตเอทานอลและวิเคราะห์เศรษฐศาสตร์เบื้องต้นใช้ข้อมูลประกอบที่แสดงดังตารางที่ 4-8 ถึงตารางที่ 4-15

ตารางที่ 4-8 แสดงการเปรียบเทียบสภาวะในการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก พบว่าผลผลิตเอทานอลจากการหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากนั้นมีค่าสูงกว่าการหมักด้วยยีสต์ขนมปังที่การใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและเวลาเท่ากัน เนื่องจากยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากนั้นได้คัดยีสต์ที่มีประสิทธิภาพ แต่ยีสต์ขนมปังนั้นอาจมีทั้งเซลล์ยีสต์ที่มี active และ ไม่ active ผสมกัน ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากเป็นยีสต์ที่แข็งแรง สามารถหมักได้มากกว่ายีสต์ขนมปัง ทนอุณหภูมิได้สูงกว่า (สังเกตได้จากสภาวะในการหมัก) จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากนั้นได้ผลผลิตเอทานอลมากกว่า

ตารางที่ 4-8 สภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตเอทานอลแต่ละกระบวนการผลิต

กระบวนการผลิต	การเตรียมน้ำหวานจาก	การหมัก	ผลผลิตเอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)
หมักด้วยยีสต์ขนมปัง	พีเอช 4.9 อุ่นที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที	ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 25 โดยปริมาตร พีเอช 6 ปริมาณยีสต์ 10^8 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 111 ชั่วโมง	16.87
หมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก		ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 25 โดยปริมาตร พีเอช 6 ปริมาณยีสต์ 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 111 ชั่วโมง	26.91

ตารางที่ 4-9 ราคาวัตถุดิบ สารเคมีและ สาธารณูปโภคที่ใช้ประมาณคำนวณค่าใช้จ่ายในการผลิต

วัตถุดิบ สารเคมีและสาธารณูปโภค	ราคา (บาทต่อหน่วย)
กรดซัลฟูริก	0.2 บาทต่อมิลลิลิตร
โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5 บาทต่อกรัม
น้ำสะอาด	0.013 บาทต่อลิตร
ไฟฟ้า	1.7 บาทต่อหน่วย
ยีสต์ขนมปัง	0.055 บาทต่อกรัม
ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	0.06 บาทต่อกรัม
น้ำหวานจาก	0.0028 บาทต่อกรัม

หมายเหตุ ราคาวัตถุดิบและสารเคมี สืบค้นจาก www.gammaco.com (25 มี.ค. 2559)
อัตราค่าน้ำ คิดเฉลี่ยราคาระดับอุตสาหกรรม (การประปานครหลวง, 25 มี.ค. 2559)
อัตราค่าไฟฟ้า คิดเฉลี่ยราคาระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก (กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและเหมืองแร่, 25 มี.ค. 2559) โดย 1 หน่วย คือ กิโลวัตต์.ชั่วโมง

ตารางที่ 4-10 ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทา-นอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง ด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่ผลผลิตเอทานอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 โดยปริมาตร)

รายการ	**ปริมาณที่ใช้**	**ค่าใช้จ่าย (บาท)**
1. การเตรียมน้ำหวานจาก		
- น้ำหวานจาก	4372.3 กรัม	12.24
- กรดซัลฟูริก 3 โมลาร์ (ปรับพีเอช)	6.6 มิลลิลิตร	0.28
- ไฟฟ้า	0.756 หน่วย	1.29
2. การหมัก		
- น้ำสะอาด	1.328 ลิตร	0.17
- ยีสต์ขนมปัง	0.57 กรัม	0.031
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 โมลาร์ (ปรับพีเอช)	8.6 มิลลิลิตร	0.62
- ไฟฟ้า	2 หน่วย	3.4
3. การกลั่น		
- ไฟฟ้า	0.2 หน่วย	0.34
รวม		18.37

ตารางที่ 4-11 ประมาณการของปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมีต่างๆ และค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทา-นอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก ด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่ผลผลิตเอทา-นอล 1 ลิตร (ความบริสุทธิ์ ร้อยละ 95 โดยปริมาตร)

รายการ	ปริมาณที่ใช้	ค่าใช้จ่าย (บาท)
1. การเตรียมน้ำหวานจาก		
- น้ำหวานจาก	2604.04 กรัม	7.29
- กรดซัลฟูริก 3 โมลาร์ (ปรับพีเอช)	3.9 มิลลิลิตร	0.17
- ไฟฟ้า	0.756 หน่วย	1.29
2. การหมัก		
- น้ำสะอาด	0.449 ลิตร	0.0058
- ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก	341.93 กรัม	20.52
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 โมลาร์ (ปรับพีเอช)	5.09 มิลลิลิตร	0.37
- ไฟฟ้า	2 หน่วย	3.4
3. การกลั่น		
- ไฟฟ้า	0.2 หน่วย	0.34
รวม		33.39

สำหรับตารางที่ 4-10 และ 4-11 วิธีประมาณค่าไฟฟ้าในการกลั่นคือ จะนำผลผลิตของเหลวหลังการหมักมากลั่นเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ ให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 โดยใช้อุณหภูมิในการอุ่นน้ำหมัก 103 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันบรรยากาศ เพื่อหาระยะเวลาในการกลั่นเอทานอลให้บริสุทธิ์ปริมาณ 1 ลิตร พบว่า ใช้ระยะเวลาในการกลั่นประมาณ 15 นาที ที่กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ ซึ่งจะนำข้อมูลนี้ไปประมาณการค่าไฟฟ้าสำหรับการกลั่นเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอทานอล

ตารางที่ 4-12 สรุปต้นทุนในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีที่แตกต่างกันด้วยสภาวะการหมักที่เหมาะสมของแต่ละวิธี

รายการ	การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	การหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก
ต้นทุนในการผลิต (บาท/ลิตร)	18.37	33.39

การเปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้และต้นทุนเบื้องต้นในการผลิตเอทานอลทั้งสองวิธีแสดงดังตารางที่ 4-10 ถึงตารางที่ 4-13 พบว่าต้นทุนในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังนั้นเท่ากับ 18.37 บาทต่อลิตร โดยต้นทุนการผลิตจะสามารถลดลงได้อีกหากเจ้าของไร่จากเป็นผู้ผลิตเอทานอลเอง เนื่องจากราคาน้ำหวานจากคิดเป็นต้นทุนสูงสุดถึงร้อยละ 66.63 ของต้นทุนทั้งหมด จะทำให้เหลือต้นทุนในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังเพียง 6.13 บาทต่อลิตร โดยราคาขายเอทานอลในปัจจุบันนั้นอยู่ที่ประมาณ 25 บาทต่อลิตร จะเห็นได้ว่าหากชาวบ้านเจ้าของไร่จากขายเอทานอลจะมีรายได้มากกว่าการขายน้ำหวานจากหรือที่เรียกว่าน้ำตาลสดที่ราคาเพียง 10 บาทต่อลิตร แม้น้ำตาลสดอาจมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า แต่ก็เป็นการสร้างทางเลือกด้านอาชีพ สร้างรายได้เพิ่มขึ้นและการผลิตสุราพื้นบ้านในปัจจุบันนั้นใช้เชื้อยีสต์ที่สืบทอดกันมาเป็นรุ่นๆ ไม่มีความเข้มข้นที่แน่นอน และยังต้องให้ความร้อนสูงก่อนการหมักเพื่อฆ่าจุลินทรีย์อีกด้วย ซึ่งเห็นได้ว่ากระบวนการมีการสิ้นเปลืองทั้งเวลา พลังงาน แรงงาน และค่าใช้จ่าย หากนำกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังมาทดแทนวิธีการผลิตสุราพื้นบ้านในปัจจุบันก็จะสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ มีวิธีการดำเนินการเป็นขั้นตอนด้วยอัตราส่วนและวิธีทำที่ชัดเจน แน่นอน

สำหรับต้นทุนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก นั้นเท่ากับ 33.39 บาทต่อลิตร ซึ่งค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับราคาขายเอทานอล แต่หากจะมีการลงทุนเปิดโรงงานเพื่อผลิตเอทานอลนั้นก็สามารถลดต้นทุนของยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากลงไปได้เพราะเป็นต้นทุนสูงสุด โดยสามารถทำการแยกเชื้อและเพาะเชื้อได้เอง ซึ่งพบว่าการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากนั้นเหมาะสมกับการผลิตในรูปแบบโรงงานเพราะสามารถเตรียมเชื้อเองได้ แต่สำหรับชาวบ้านเจ้าของไร่จากนั้นเหมาะกับการใช้ยีสต์ขนมปังมากกว่า

ตารางที่ 4-13 การเปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบต่างๆ

วัตถุดิบ	ผลผลิตเอทานอล (ลิตรต่อตันวัตถุดิบ)	อ้างอิง
น้ำหวานจาก (ยีสต์ขนมปัง)	229	งานวิจัยนี้
น้ำหวานจาก (ยีสต์ที่แยกจากน้ำหวานจาก)	384	งานวิจัยนี้
อ้อย	70	(Yoosin, 2007)
กากน้ำตาล	240	(Yoosin, 2007)

การเปรียบเทียบต้นทุนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก นั้นพบว่าต้นทุนของการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังต่ำกว่าต้นทุนการหมักเอทานอลด้วย ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก ร้อยละ 44.98 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง แต่การหมักเอทานอลด้วย ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก นั้นมีผลได้เอทานอลสูงกว่าการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปัง จึงเห็นได้ว่าแต่ละกระบวนการก็มีข้อดี ข้อเสียที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกกระบวนการเพื่อนำไปผลิตเอทานอลนั้นต้องดูความเหมาะสมและข้อจำกัดของผู้ผลิตเป็นหลัก

จากผลได้เอทานอลในตารางที่ 4-13 นั้น พบว่า ผลได้เอทานอลจากการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก สูงกว่าผลได้เอทานอลจากอ้อยและใกล้เคียงกากน้ำตาล แสดงให้เห็นว่าน้ำหวานจากเป็นวัตถุดิบที่มีประสิทธิภาพในการนำมาผลิตเอทานอล เนื่องจากมีผลได้เอทา-นอลสูงและจากยังไม่ได้ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยังไม่มีความหลากหลายในการแปรรูปทางเศรษฐกิจ จึงเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 4-14 การเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการผลิตเอทานอลโดยการหมักด้วยยีสต์ขนมปังและการหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

รายการ	กระบวนการผลิตเอทานอล	
	การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง	การหมักด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก
ข้อดี	- ต้นทุนการผลิตต่ำกว่า - ยีสต์ขนมปังราคาถูก - ยีสต์ขนมปังเก็บรักษาง่าย - เหมาะกับการผลิตเอทานอลในระดับชุมชน	- ผลผลิตเอทานอลสูง - เหมาะกับการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม
ข้อเสีย	- ผลผลิตเอทานอลต่ำกว่า	- ต้นทุนการผลิตสูงกว่า - การแยกและเพาะเชื้อต้องทำโดยผู้มีความชำนาญด้านจุลชีววิทยา

การเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากแสดงดังตารางที่ 4-14 เห็นได้ว่าการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ขนมปังมีต้นทุนที่ต่ำกว่ายีสต์ขนมปังหาซื้อได้ง่ายและราคาถูก ไม่ต้องมีความชำนาญในการเพาะเชื้อยีสต์ อีกทั้งยังเก็บรักษาได้ง่ายเพียงแช่ในตู้เย็น แต่ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากนั้นต้องใช้ความชำนาญด้านจุลชีววิทยาและกระบวนการในการเพาะเชื้อยีสต์มีราคาสูงกว่ายีสต์ขนมปัง การผลิตเอทานอลด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจากได้ผลได้เอทานอลมากกว่าเพราะเลือกเฉพาะเชื้อที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการหมัก จะเห็นได้ว่าทั้งสองกระบวนการมีความเหมาะสมกับระดับการผลิตที่แตกต่างกันไป

ตารางที่ 4-15 เปรียบเทียบปริมาณยีสต์ขนมปังที่ใช้ในการผลิตเอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 โดยปริมาตรที่ผลผลิตเอทานอล 1 ลิตร

วัตถุดิบ	ปริมาณยีสต์ขนมปัง (กรัม)	เอทานอล	อ้างอิง
น้ำหวานจากเปลือกสับปะรด (ปรับสภาพและย่อยโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติ)	28.14	5.84	(อักษรภัค, 2557)
น้ำหวานจาก	0.57	16.87	งานวิจัยนี้

การเปรียบเทียบปริมาณยีสต์ขนมปังที่ใช้ในการผลิตเอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 โดยปริมาตรที่ผลผลิตเอทานอล 1 ลิตรแสดงดังตารางที่ 4-15 จะเห็นได้ว่าการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังนั้นใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังต่ำกว่าวัตถุดิบอื่นอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าน้ำหวานจากเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอลที่เหมาะสม เพราะใช้ปริมาณยีสต์ขนมปังเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำการหมักเอทานอลได้ในปริมาณที่เหมาะสม ประกอบกับว่าน้ำหวานจากหลังการอุ่นด้วยสภาวะที่เหมาะสมทำให้มียีสต์ธรรมชาติอยู่แล้วในน้ำหวาน $6x10^4$ CFU ต่อมิลลิลิตร (กนก กานต์และคณะ, 2558) ยีสต์ทั้งสองส่วนจึงช่วยกันส่งเสริมให้การหมักเอทานอลดีขึ้น

งานวิจัยนี้เลือกกระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากที่เหมาะสมคือ หมักด้วยยีสต์ขนมปังเพราะเป็นวิธีที่คุ้มค่าต่อการผลิต อีกทั้งยังเหมาะสมกับการนำไปผลิตเอทานอลในระดับชุมชน สามารถถ่ายทอดให้ชาวบ้านได้ง่าย แต่ต้นทุนการผลิตนี้เป็นเพียงการประมาณการจากการผลิตเอทา-นอลในขนาดทดลอง หากประมาณค่าใช้จ่ายในการผลิตที่ใหญ่ขึ้น ต้นทุนอาจจะลดลงเพราะวัตถุดิบ สารเคมี ค่าน้ำและค่าไฟราคาต่ำลง ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปพัฒนาสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาการเตรียมวัตถุดิบน้ำหวานจาก

การเตรียมน้ำหวานจากโดยการอุ่นเพื่อเอื้อให้ยีสต์ทำงานดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น มีข้อได้เปรียบกว่างานวิจัยที่ทำการเตรียมโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงเพื่อทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมด เพราะสามารถใช้ประโยชน์จากยีสต์ที่มีอยู่แล้วในน้ำหวาน ทำให้เติมยีสต์ในขณะหมักในปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหวานจาก คือ การปรับพีเอชเป็น 4.9 แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จะได้น้ำตาลทั้งหมดหลังอุ่น 410.58 กรัมต่อลิตรและเอทานอลร้อยละ 10.34 โดยปริมาตร

5.1.2 การศึกษาการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง

สภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง คือ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ปรับพีเอชเป็น 6 ปริมาณยีสต์ขนมปัง 10^8 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม (0.01 กรัมต่อสารละลาย 100 กรัม) หมักที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 111 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เอทานอลร้อยละ 16.87 โดยปริมาตร

5.1.3 การศึกษาการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

สภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก คือ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ปรับพีเอชเป็น 6 ปริมาณยีสต์ 10^9 CFU ต่อสารละลาย 100 กรัม หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 111 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เอทานอลร้อยละ 26.91 โดยปริมาตร

5.1.4 การศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลโดยการกลั่น

การเพิ่มความบริสุทธิ์เอทานอลควรกลั่นที่อุณหภูมิอุ่นน้ำหมัก 103 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้อุณหภูมิไอ 78 องศาเซลเซียส โดยจะให้เอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.32 โดยปริมาตร

5.1.5 การเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสีย และการประมาณต้นทุนการผลิตเอทานอล

จากการประเมินค่าใช้จ่ายเบื้องต้น สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง สามารถผลิตเอทานอลได้ 229 ลิตรต่อตัน มีค่าใช้จ่ายในการผลิต 18.37 บาทต่อลิตร
2. การผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก ได้ผลผลิตเอทานอล 384 ลิตรต่อตัน มีค่าใช้จ่ายในการผลิต 33.39 บาทต่อลิตร

จากการเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังและยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก พบว่าการผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังมีค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอล 18.37 บาทต่อลิตรซึ่งต่ำกว่าการใช้ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก แม้ว่าจะมีผลผลิตเอทานอลน้อยกว่า แต่ต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า การเก็บรักษายีสต์ที่ง่ายกว่านั้นส่งผลให้การผลิตเอทานอลจากน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปังเป็นกระบวนการที่น่าสนใจและเหมาะแก่การพัฒนาสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

5.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยเพิ่มเติม

5.2.1 ทดลองใช้ยีสต์ที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์เอง

5.2.2 ศึกษาวัตถุดิบชนิดอื่นที่จะนำมาผลิตเอทานอล

5.2.3 ศึกษาการหมักแบบกึ่งกะ (Semi-batch) ซึ่งอาจจะได้ผลผลิตและผลได้เอทานอลดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กนกกานต์ ศรีนุ่น, ฟารุก ยุมิง และสินินาฏ จงคง. 2558. การผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำหวานจาก. ต้นฉบับโครงงานภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

กลยุทธ โชติพัฒนา และ นิสิต ตัณฑเชฐ. 2535. การศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของระบบหมักยีสต์ขนมปัง. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ดวงพร คันธโชติ. 2546. เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและการได้พลังงาน. ตำราอ่านประกอบวิชาสรีระวิทยาของจุลินทรีย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นาตยา จริตงาม. 2557. การแยกและคัดเลือกยีสต์เพื่อผลิตไบโอเอทานอลโครงงานทางจุลชีววิทยาตามหลักสูตรปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิดดา หงส์วิวัฒน์ และ ทวีทอง หงส์วิวัฒน์. 2550. จากในผลไม้ 111 ชนิด. คุณค่าอาหารและการกิน. สำนักพิมพ์แสงแดด.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. 2545. ไวน์. ศาสตร์และศิลป์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประไพศรี สมใจ. 2535. การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำอ้อยในระดับห้องปฏิบัติการ. รายงานโครงการวิจัยที่ ภ.30-09 ปี พ.ศ. 2535. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. 2551. คู่มือการอบรมโครงการฝึกอบรมเพื่อคุณภาพสุราชนิดผลไม้และสุราพื้นบ้าน ที่มีแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี และผลิตภัณฑ์จากผลผลิตทางการเกษตร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วนัสยา สุอังคะวาทิน. 2545. การเพิ่มอายุการเก็บรักษายีสต์ขนมปังแห้งด้วยสารกันหืน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วรลักษณ์ คงจินดามุณี. 2556. การผลิตเอทานอลจากแกนข้าวโพด. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมหวัง วีระวุฒิวงศ์, นวลพรรณ ณ ระนอง และ ดุษฎี ธนะบริพัฒน์. การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำกากส่า. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทวิโรฒ. 7(2): 43-51.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัสมา หมาดหล้า. 2551. การผลิตเอทานอลจากส่วนผสมเปลือกอ่อนของเต้าตาลโตนดและเปลือกส้ม. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อักษรภัค เต็งรัง. 2557. การผลิตไบโอเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยยีสต์ขนมปัง. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abdullah, S., Shirai, Y. and Bahrin E. 2015. Fresh oil palm frond juice as a renewable, non-food, non-cellulosic and complete medium for direct bioethanol production. Industrial Crops and Products. 63: 357-361.

Chana-Thaworn, J., Chanthachum, S. and Wittaya, T. 2011. Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract. Food Science and Technology. 44: 284-292.

Dubois, M., Gilles, K.A., Atmelton, G.K., Rabers, P.A. and Smith, F. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28: 50-56.

Joannis-Cassan, C., Riess, J., Jolibert, F. and Taillandier, P. 2014. Optimization of very high gravity fermentation process for ethanol production from industrial sugar beet syrup. Biomass and Bioenergy. 70: 165-173.

Kawa-Rygielska, J., Pietrzak, W., Regiec, P. and Stencel, P. 2013. Utilization of concentrate after membrane filtration of sugar beet thin juice for ethanol production. Bioresource Technology. 133: 134-141.

Kosugi, A., Tanaka, R., Magara, K., Murata, Y., Arai, T., Sulaiman, O., Hashim, R., Hamid, Z., Yahya, M., Yosof, M., Ibrahim, W. and Mori, Y. 2010. Ethanol and lactic production using sap squeezed from old oil palm trunks felled for replanting. Journal of Bioscience and Bioengineering. 110: 322-325.

Luo, Z., Wang, L. and Shahbazi, A. 2014. Optimization of ethanol production from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) juice using response surface methodology. Biomass and Bioenergy. 67: 53-59.

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

Polczynski, A. 2009. Production of Ethanol from Tree Sap. US20110008859 A1.

Sasaki, K., Tsuge, Y., Sasaku, D., Teramura, H., Wakai, S., Kawaguchi, H., Sazuka, T., Ogino, C. and Kondo, A. 2014. Increased ethanol production from sweet sorghum juiceconcentrated by a membrane separation process. Bioresource Technology.169: 821-825.

Tamunaidu, P., Matsui, N., Okimori, Y. and Saka, S. 2013. Nipa (*Nypa fruticans*) sap as a potential feedstock for ethanol production. Biomass and Bioenergy. 52: 96-102.

Yoosin, S. and Sorapipatana, C. 2007. A Study of ethanol production cost for gasoline substitution on Thailand and its competitiveness. Thammasat International Journal of Science and Technology. 12: 69-80.

小杉昭彦，村田善则，隆 森，田中良平，真柄谦吾. 2007. Method for production of ethanol or lactic acid. CN101589151 A.

คมสันติ์ ศรีคงเพ็ชร. 2555. เอทานอล: โอกาสและความท้าทายของพลังงานไทย. เข้าถึงได้จาก: http://www.bot.or.th/Thai/EconomicCondition/Thai/Northeast/Research/Article2555_Ethanol_opportunity.pdf (สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2558).

ผลไม้ไทย. 2556. จาก. เข้าถึงได้จาก: http://thaifruitclub.blogspot.com/2013/03/nipa-palm-atap-palm.html (สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2558).

ฟรินน์ดอทคอม. 2558. สรรพคุณและประโยชน์ของต้นจาก 14 ข้อ. เข้าถึงได้จาก: http://frynn.com/จาก/ (สืบค้นเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม 2558).

นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2551. ต้นจาก: พืชใหม่เพื่อพลังงานทดแทน. มติชน. เข้าถึงได้จาก: http://www.palangthai.org/th/story/140 (สืบค้นเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม 2558).

ปาริชาติ เข็มทอง. 2557. ต้นไม้ประจำจังหวัดสุราษฎร์ธานี. ต้นเคี่ยม. เข้าถึงได้จาก: http://chm-thai.onep.go.th/ /chm/data_province/suratthani/ton_keam.html (สืบค้นเมื่อวันที่ 22 พฤษภาคม 2558).

พลอยใส หม่อมวิสัย. 2553. งานวิจัยไวน์ในไทย. เข้าถึงได้จาก: http://ploysai-ying.blogspot.com /2010/02/blog-post_5059.html (สืบค้นเมื่อวันที่ 19 พฤษภาคม 2558).

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2556. Colony forming unit/cfu. ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร.เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetwork solution.com/wiki/word/1563/colony-forming-unit-cfu (สืบค้นเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม 2558).

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2556. Fermentation/ การหมัก. ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร. เข้าถึงได้จาก: hppt://www.foodnetworksolution.com /wiki/ word/0316/fermentation-การหมัก (สืบค้นเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม 2558).

วุฒิ สุวพานิช. 2556. ยีสต์ผงกับการผลิตสุราชุมชน. เข้าถึงได้จาก: http://www.surathai.net /index.phplay=boardshow&ac=webboard_show&WBntype=1&... (สืบค้นเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม 2558).

สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอล. 2557. เข้าถึงได้จาก: http://www.thaiethanol.com/en /ethanol/what-is-ethanol.html (สืบค้นเมื่อวันที่ 15 พฤษภาคม 2558).

สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย. 2556. การผลิตเอทานอลจากพืช. เข้าถึงได้จาก: http://www. thaitapiocastarch.org/admin/manage/Support/การผลิตเอทานอลจากพืช.pdf (สืบค้นเมื่อวันที่ 19 พฤษภาคม 2558).

สยามเคมี. 2557. เอทานอล/เอทิลแอลกอฮอล์. แหล่งความรู้สารเคมีและผลิตภัณฑ์เคมี. เข้าถึงได้จาก: http://www.siamchemi.com/เอทานอล/ (สืบค้นเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม 2558).

หัสชัย สิทธิรักษ์. 2552. สารพัดประโยชน์ของต้นจาก. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. เข้าถึงได้จาก: http://race.nstru.ac.th/home/e-weblog/member/%20hussachai/index.php?entry_id=927 (สืบค้นเมื่อวันที่ 15 พฤษภาคม 2558).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

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

1.1 การเตรียมสารละลาย DNS

ประกอบด้วยสารเคมีต่างๆดังต่อไปนี้ 3,5-Dinitrosalicylic Acid, ฟีนอล, โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต และโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำบีกเกอร์ใส่น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตรเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 5 กรัม จากนั้นเติม 3,5-Dinitrosalicylic Acid ปริมาณ 5 กรัม ฟีนอลปริมาณ 1 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต ปริมาณ 50 กรัม จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic Stirrer ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น สารละลายจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองส้มใส

1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง

1.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

(1) เตรียม Stock สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร 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 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

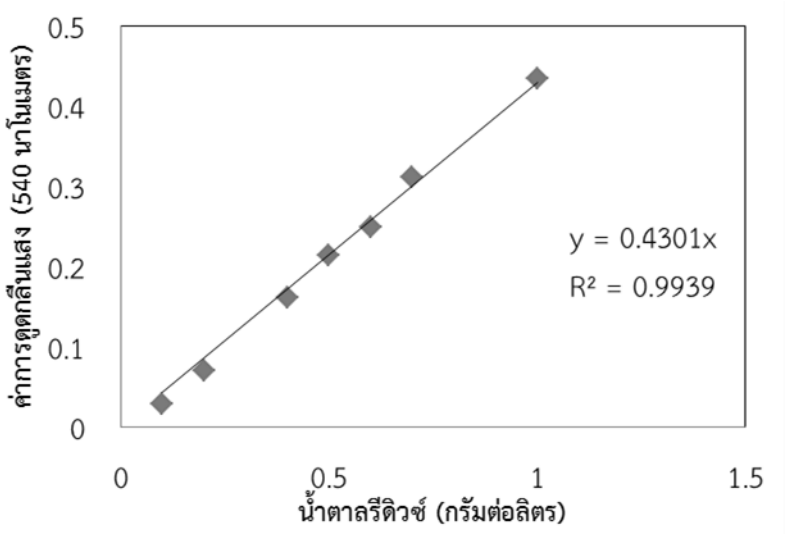
1.2.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารละลายกลูโคสเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

(1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

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

(3) นำสารตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

(4) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในสารตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงให้เห็นในภาพประกอบที่ ก-1



ภาพประกอบที่ ก-1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง

(1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 25 มิลลิลิตร

(2) ปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้วในข้อที่ (1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

(3) ปิเปตสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที

(3) นำสารตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

(4) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในสารตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานมาคูณด้วย 25 เนื่องจากสารตัวอย่างโดนเจือจาง 25 เท่า

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

2.1 สารเคมี

(1) สารละลายฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก

(2) กรดซัลฟูริกร้อยละ 98 โดยปริมาตร

2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสารตัวอย่าง

2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารละลายกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

(1) เตรียม Stock สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร 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 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

2.2.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารละลายกลูโคสเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

(1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

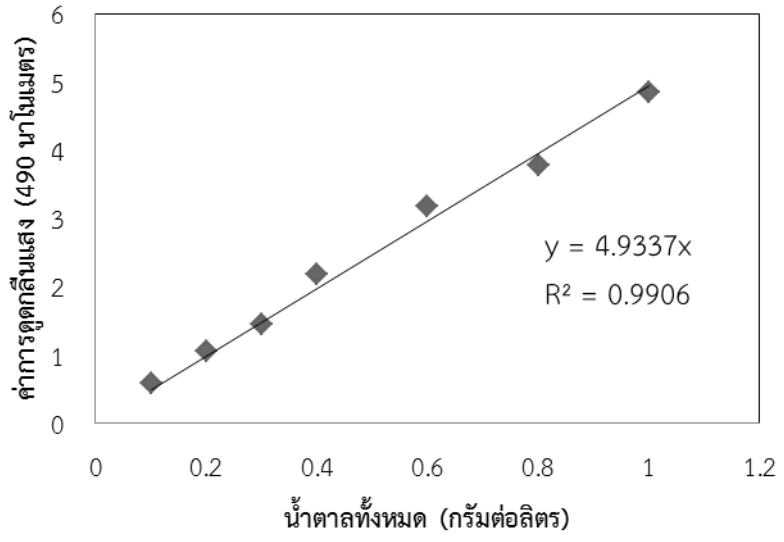
(2) ปิเปตสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

(3) ปิเปตกรดซัลฟูริกร้อยละ 98 โดยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

(4) นำสารตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 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 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 100 มิลลิลิตร

(2) ปิเปตสารละลายจากข้อ (1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง

(3) ปิเปตสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

(4) ปิเปตกรดซัลฟูริกร้อยละ 98 โดยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

(5) นำสารตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 นาที

(6) นำสารตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

(7) นำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานมาคูณด้วย 1,000 เนื่องจากสารตัวอย่างโดนเจือจาง 1,000 เท่า

3. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้

(1) เอทานอลร้อยละ 99.9 โดยปริมาตร

(2) อะซิโตนร้อยละ 50 โดยปริมาตร

(3) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC)

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล

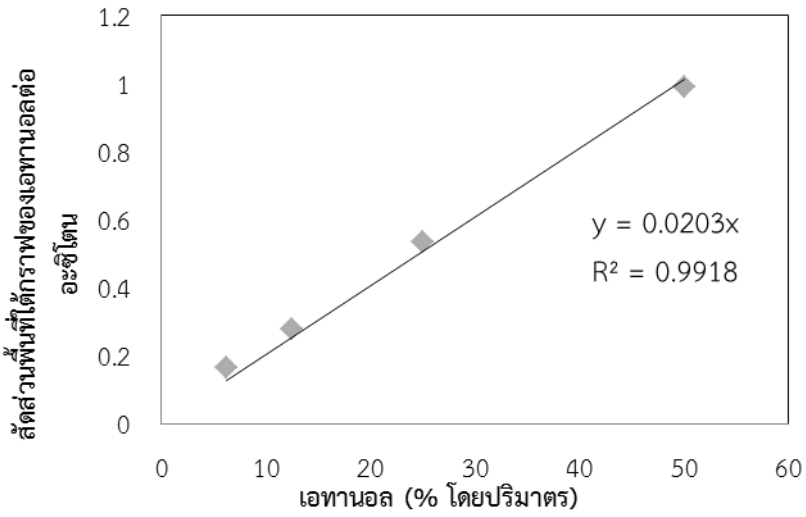
เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 6.25, 12.5, 25 และ 50 โดยปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยปิเปตเอทานอลร้อยละ 99.9 โดยปริมาตร ปริมาณ 6.25, 12.5, 25 และ 50 มิลลิลิตรใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอลเพื่อใช้วิเคราะห์หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของเอทานอล

นำสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 4 มิลลิลิตรผสมกับอะซิโตนร้อยละ 50 โดยปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ที่สภาวะดังตารางที่ ก-1 จากนั้นนำค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้พีคของเอทานอลต่ออะซิโตนที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงในภาพประกอบที่ ก-3

ตารางที่ ก-1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

	Condition
Back Inlet	150°C, 3.4 psi, total floe He 44.7 mL/min
Back detector	250°C, H_2 44.6 mL/min, N2 25 mL/min, Air 300 mL/min
Oven temperature	Initial temperature 60 °C held for 1 min 100 °C held for 1 min 120 °C held for 0 min 230 °C held for 0 min
Column	HP-FFAP Polyethylene Glycol TPA



ภาพประกอบที่ ก-3 กราฟมาตรฐานเอทานอล

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก

4.1 สารเคมี

(1) NaOH

(2) KHP

(3) 1% Phenolphthalein

4.2 การเตรียมและวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

(1) ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 4 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายเข้ากัน

(2) เทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้ลงในบิวเรต

(3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน KHP โดยชั่ง KHP ประมาณ 1 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยแล้วรินใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

(4) ดูดสารละลาย KHP มา 25 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปชมพู่ หยดสารละลาย 1%Phenolphthalein 3 หยด แล้วนำมาไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในบิวเรตไตเตรตไปจนกระทั่ง สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอย่างถาวร บันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

(5) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากการคำนวณ ดังนี้

จากปฏิกิริยา $C_8H_5O_4K + NaOH \longrightarrow C_8H_4O_4KNa + H_2O$

จะเห็นว่า จำนวนโมลของ KHP = จำนวนโมลของ NaOH

จากสูตร $\text{mol} = \frac{\text{MV}}{1000}$ จะได้ว่า $\frac{(MV)KHP}{1000} = \frac{(MV)NaOH}{1000}$

ดังนั้น $\text{M}_{\text{NaOH}} = \frac{(MV)KHP}{V\ NaOH}$

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะซิติกในสารตัวอย่าง

(1) ดูดสารตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปชมพู่ หยด 1% Phenolphthalein ลงไป 3 หยด

(2) นำมาไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในบิวเรต จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอย่างถาวร บันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

(3) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชู จากการคำนวณดังนี้

จากปฏิกิริยา $CH_3COOH + NaOH \longrightarrow CH_3COONa + H_2O$

จะพบว่า จำนวนโมลของ NaOH = จำนวนโมลของ CH_3COOH

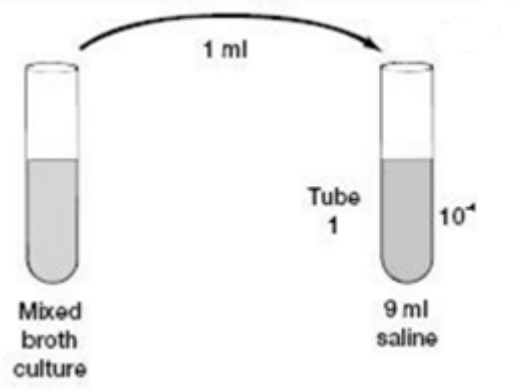
จากสูตร $\text{mol} = \frac{\text{MV}}{1000}$ จะได้ว่า $\frac{(MV)CH3COOH}{1000} = \frac{(MV)NaOH}{1000}$

ดังนั้น $\text{M}_{\text{CH3COOH}} = \frac{(MV)NaOH}{V\ CH3COOH}$

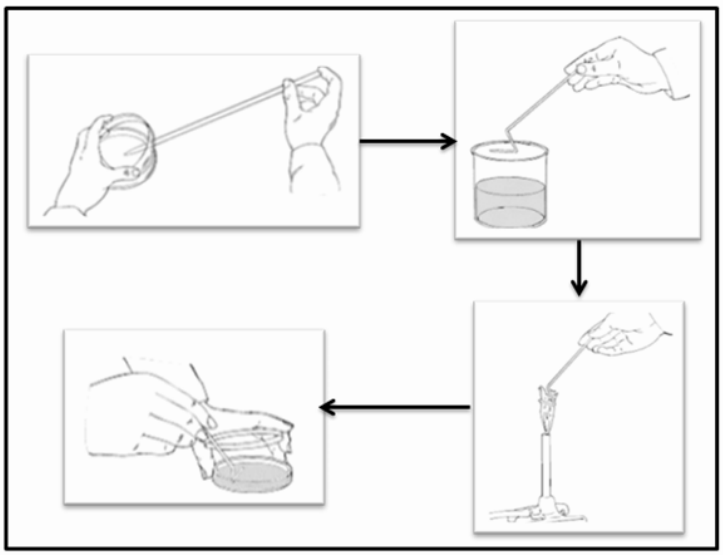
5. การคัดแยกยีสต์ทั้งหมด (yeast isolation) และการเก็บเชื้อยีสต์จากน้ำหวานจาก

ทำการเจือจางน้ำหวานจากด้วยวิธี serial dilution ดังภาพประกอบที่ ก-4 โดยนำตัวอย่างน้ำหวานจาก 1 มิลลิลิตร เจือจางใน 0.85% NSS 9 มิลลิลิตร แล้วทำการเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate แสดงดังภาพประกอบที่ ก-5 โดยใช้ปิเปตดูดมา 0.1 มิลลิลิตร นำมา ลงบนอาหาร YM agar แล้วนำไม้เกลี่ยไปแช่แอลกอฮอล์หลังจากนั้นนำมาลนไฟจนแอลกอฮอล์แห้ง วางไว้จนเย็นแล้วนำไปเกลี่ยเชื้อบนถาด ปรับพีเอชเป็น 4.5 หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร YM agar ที่มีลักษณะแตกต่างกันที่คาดว่าจะเป็นของยีสต์นำไปทำให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบโดยวิธี Wet mount โดยใช้ Lacto phenol cotton blue (LPCB) ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และเก็บใน YM slant ที่ 4°C เพื่อเก็บรักษายีสต์ (นาตยา, 2557)

นำยีสต์ที่เลี้ยงเก็บไว้มาทำให้ active โดยการเลี้ยงบน YM agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้กระจายตัวกับ 0.855% NSS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^{8}-10^{10} CFU ต่อสารละลาย 100 กรัมเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล



ภาพประกอบที่ ก-4 การเจือจางแบบ serial number



ภาพประกอบที่ ก-5 วิธีการ spread plate

CFU คือ Colony forming unit เป็นหน่วยที่ได้จากวิธีตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ (microbial population count) เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ หรือ รา ที่มีชีวิต ซึ่งเจริญขึ้นมาบนผิวหน้าของอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ โดยเจริญและแบ่งตัวจนเป็นกลุ่มเรียกว่า โคโลนี (colony) ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตา มีสมมุติฐานคือ

(1) หนึ่งโคโลนีที่ตามองเห็นได้มาจากการเจริญและแบ่งตัวจากจุลินทรีย์หนึ่งเซลล์

(2) ไม่มีเซลล์ใดๆ ที่อยู่รวมกัน (no aggregate)

(3) จุลินทรีย์เริ่มต้น (original inoculum) ในอาหารที่นำมาเพาะเลี้ยงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อ (nutrient agar) มีความสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous)

หน่วย CFU มักพบจากวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ เช่น วิธี standard plate count (หรือ aerobic plate count) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ นิยมใช้สำหรับการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (total viable count) ในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องดื่ม น้ำบริโภค

- ตัวอย่างที่เป็นอาหารที่เป็นชิ้น ซึ่งสามารถชั่งน้ำหนัก CFU มีหน่วยเป็นน้ำหนักกรัม เช่น มาตรฐานเนื้อหอยแมลงภู่สด (green mussel) กำหนดให้มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (total viable count) ไม่เกิน $5x10^4$ CFU/กรัม

- ตัวอย่างเป็นอาหารเหลวที่ใช้การวัดปริมาตร CFU มีหน่วยเป็นปริมาตร เช่น น้ำนมมีปริมาณแบคทีเรีย 1,000 CFU/มิลลิลิตร (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา, 2556)

ภาคผนวก ข

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ตารางที่ ข-1 แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจากรอบวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2558

องค์ประกอบ	วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
น้ำตาลรีดิวซ์	Modified Dinitosalicylic Acid	99.83 g/L
น้ำตาลทั้งหมด	Modified Phenol Sulfuric Method	365.32 g/L
เอทานอล	Internal standard method	4.53 %v
ปริมาณความชื้น	AOAC (Loss on Drying at 95-100 $^{\circ}$C)	79.57 %w
พีเอช	ใช้เครื่องวัดพีเอช	5.45
ความหนาแน่น	ใช้พิคโนมิเตอร์	1,071.9 kg/m^3
กรดอะซิติก	การไตเตรต	0.0415 mol/L
ปริมาณเซลล์ยีสต์	Standard plate count *	7.0x10^4 CFU/ml

ตารางที่ ข-2 แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจากรอบวันที่ 18 มิถุนายน พ.ศ. 2558

องค์ประกอบ	วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
น้ำตาลรีดิวซ์	Modified Dinitosalicylic Acid	91.94 g/L
น้ำตาลทั้งหมด	Modified Phenol Sulfuric Method	369.7 g/L
เอทานอล	Internal standard method	3.36 %v
ปริมาณความชื้น	AOAC (Loss on Drying at 95-100 $^{\circ}$C)	84.96 %w
พีเอช	ใช้เครื่องวัดพีเอช	5.57
ความหนาแน่น	ใช้พิคโนมิเตอร์	1072.8 kg/m^3
กรดอะซิติก	การไตเตรต	0.041 mol/L
ปริมาณเซลล์ยีสต์	Standard plate count *	7.0x10^4 CFU/ml

ตารางที่ ข-3 แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจากรอบวันที่ 4 กันยายน พ.ศ. 2558

องค์ประกอบ	วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
น้ำตาลรีดิวซ์	Modified Dinitosalicylic Acid	99.27 g/L
น้ำตาลทั้งหมด	Modified Phenol Sulfuric Method	356.16 g/L
เอทานอล	Internal standard method	3.82 %v
ปริมาณความชื้น	AOAC (Loss on Drying at 95-100 $^{\circ}$C)	79.15 %w
พีเอช	ใช้เครื่องวัดพีเอช	6.40
ความหนาแน่น	ใช้พิคโนมิเตอร์	1069.6 kg/m^3
กรดอะซิติก	การไตเตรต	0.041 mol/L
ปริมาณเซลล์ยีสต์	Standard plate count *	7.0x10^4 CFU/ml

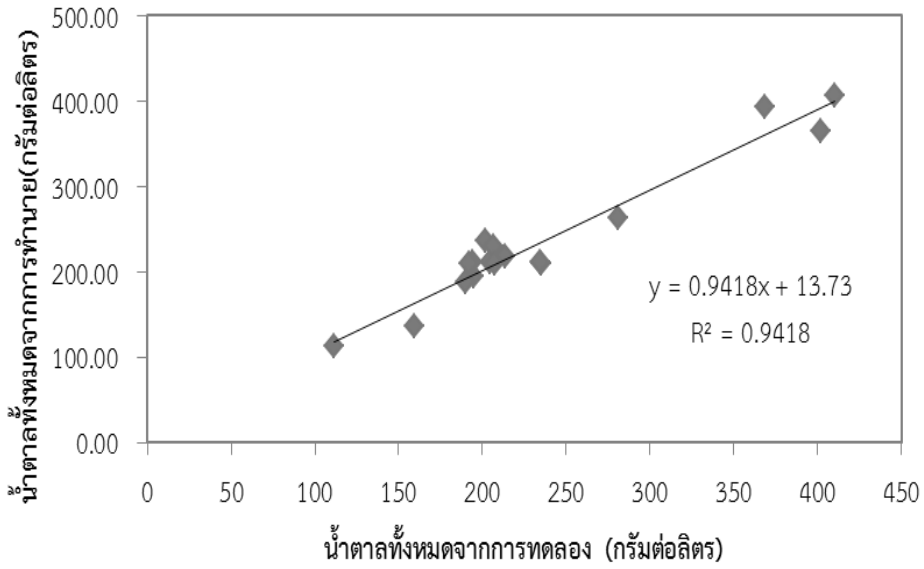
ตารางที่ ข-4 แสดงองค์ประกอบของน้ำหวานจากรอบวันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558

องค์ประกอบ	วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
น้ำตาลรีดิวซ์	Modified Dinitosalicylic Acid	92.98 g/L
น้ำตาลทั้งหมด	Modified Phenol Sulfuric Method	364.78 g/L
เอทานอล	Internal standard method	3.42 %v
ปริมาณความชื้น	AOAC (Loss on Drying at 95-100 $^{\circ}$C)	86.71 %w
พีเอช	ใช้เครื่องวัดพีเอช	5.61
ความหนาแน่น	ใช้พิคโนมิเตอร์	1070.6 kg/m^3
กรดอะซิติก	การไตเตรต	0.04 mol/L
ปริมาณเซลล์ยีสต์	Standard plate count *	7.0x10^4 CFU/ml

* ส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตารางที่ ข-5 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังการอุ่นน้ำหวานจาก

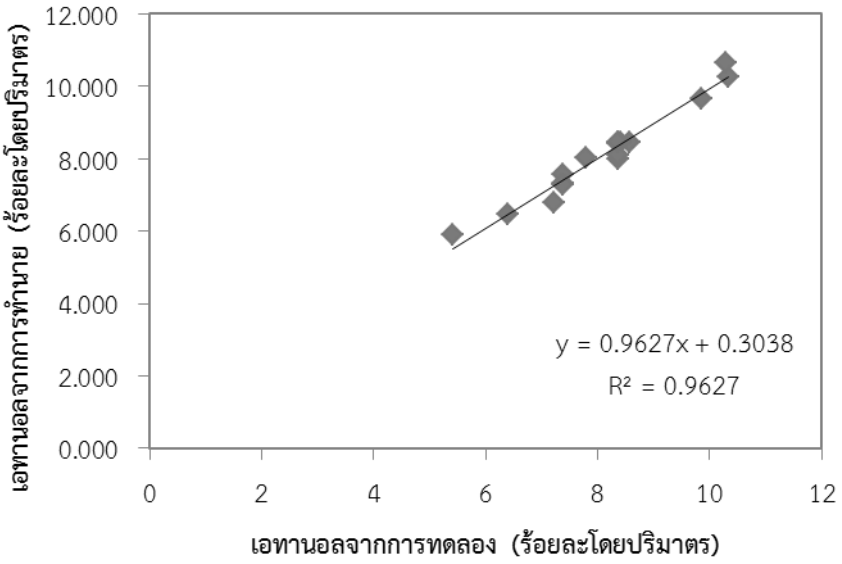
ลำดับที่	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	น้ำตาลทั้งหมด(กรัมต่อลิตร)	
				ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	5.5	30	18	235.07	210.32
2	4.9	36	25	195.01	195.20
3	4.9	36	10	202.00	236.89
4	6.1	36	10	213.96	217.90
5	6.1	36	25	111.34	113.60
6	4.5	45	18	280.74	263.37
7	5.5	45	18	234.60	211.00
8	5.5	45	18	204.37	211.00
9	5.5	45	18	194.01	211.00
10	6.5	45	18	192.03	209.30
11	5.5	45	5	159.07	135.54
12	5.5	45	30	206.72	230.15
13	4.9	54	10	190.24	188.46
14	6.1	54	10	207.15	209.36
15	4.9	54	25	410.58	406.29
16	6.1	54	25	401.74	364.59
17	5.5	60	18	368.89	393.54



ภาพประกอบที่ ข-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการอุ่นน้ำหวานจาก

ตารางที่ ข-6 แสดงปริมาณเอทานอลหลังหมักเบื้องต้นน้ำหวานจากที่ผ่านการอุ่นแล้ว

ลำดับที่	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	
				ผลการทดลอง	ผลการทำนาย
1	5.5	30	18	8.37	7.98
2	4.9	36	25	7.39	7.33
3	4.9	36	10	7.39	7.58
4	6.1	36	10	8.37	8.43
5	6.1	36	25	5.42	5.91
6	4.5	45	18	7.79	8.03
7	5.5	45	18	8.57	8.45
8	5.5	45	18	8.37	8.45
9	5.5	45	18	8.4	8.45
10	6.5	45	18	8.37	8.11
11	5.5	45	5	6.4	6.48
12	5.5	45	30	7.39	7.29
13	4.9	54	10	7.22	6.78
14	6.1	54	10	8.37	8.46
15	4.9	54	25	10.34	10.27
16	6.1	54	25	9.85	9.67
17	5.5	60	18	10.29	10.66



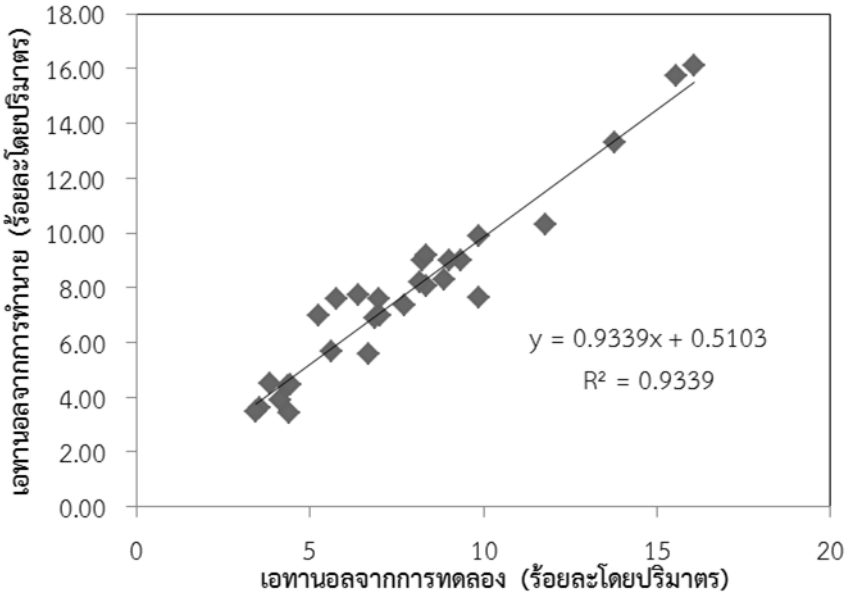
ภาพประกอบที่ ข-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการอุ่นน้ำหวานจาก

ตารางที่ ข-7 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดหลังหมักน้ำหวานจากที่ผ่านการอุ่นแล้ว

ลำดับที่	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	น้ำตาลหลังหมัก (กรัมต่อลิตร)	
				น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลทั้งหมด
1	5.5	30	18	0.49	55.46
2	4.9	36	25	0.17	128.40
3	4.9	36	10	0.30	74.41
4	6.1	36	10	0.51	77.00
5	6.1	36	25	0.20	86.89
6	4.5	45	18	0.08	32.65
7	5.5	45	18	0.09	27.16
8	5.5	45	18	0.42	26.41
9	5.5	45	18	0.48	25.62
10	6.5	45	18	0.39	61.60
11	5.5	45	5	0.28	23.37
12	5.5	45	30	0.73	28.07
13	4.9	54	10	0.01	7.46
14	6.1	54	10	0.13	42.48
15	4.9	54	25	0.11	9.20
16	6.1	54	25	0.39	8.05
17	5.5	60	18	0.09	13.62

ตารางที่ ข-8 แสดงปริมาณเอทานอลหลังหมักที่ได้จากการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง

ลำดับที่	น้ำตาล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	พีเอช	ปริมาณยีสต์ (CFUต่อสารละลาย100 กรัม)	อุณหภูมิ (องศา-เซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	
						ผลจากการทดลอง	ผลจากการทำนาย
1	20	5.5	10^{9}	28	77	13.79	13.31
2	20	5.5	10^{9}	34	10	6.39	7.74
3	20	5.5	10^{9}	34	77	9.36	8.99
4	30	5.5	10^{9}	34	77	11.79	10.29
5	20	4.5	10^{9}	34	77	4.14	3.88
6	10	5.5	10^{9}	34	77	3.84	4.52
7	20	6.5	10^{9}	34	77	8.87	8.30
8	20	5.5	10^{9}	34	77	8.23	8.99
9	20	5.5	10^{8}	34	77	8.37	8.06
10	20	5.5	10^{9}	34	77	9.01	8.99
11	20	5.5	10^{10}	34	77	6.87	6.87
12	20	5.5	10^{9}	34	144	9.87	7.64
13	20	5.5	10^{9}	40	77	7.73	7.38
14	15	5	10^{9}	31	44	6.68	5.57
15	25	6	10^{9}	31	44	15.57	15.72
16	15	6	10^{8}	31	44	8.18	8.22
17	25	5	10^{8}	31	44	3.55	3.59
18	25	6	10^{8}	31	111	16.06	16.09
19	15	6	10^{9}	31	111	8.37	9.20
20	25	5	10^{9}	31	111	5.24	7.00
21	15	5	10^{8}	31	111	9.85	9.89
22	25	5	10^{9}	37	44	7.04	6.97
23	15	6	10^{9}	37	44	4.42	3.41
24	25	6	10^{8}	37	44	5.62	5.66
25	15	5	10^{8}	37	44	4.38	4.41
26	25	6	10^{9}	37	111	5.75	7.60
27	15	6	10^{8}	37	111	3.45	3.49
28	15	5	10^{9}	37	111	6.99	7.60
29	25	5	10^{8}	37	111	4.43	4.46



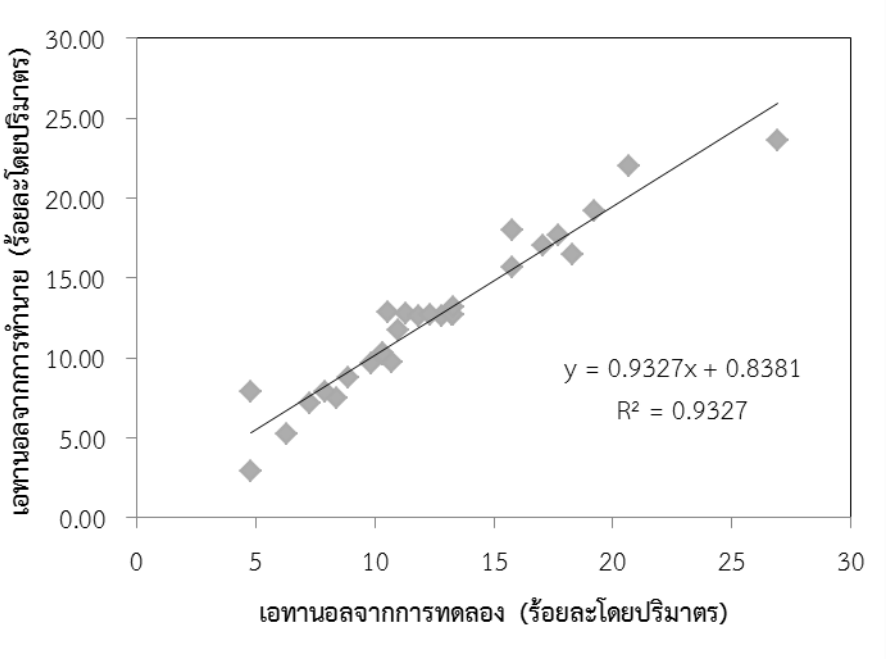
ภาพประกอบที่ ข-3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง

ตารางที่ ข-9 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และพีเอชหลังหมักที่ได้จากการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์ขนมปัง

ลำดับที่	น้ำตาล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	พีเอช	ปริมาณยีสต์ (CFUต่อสารละลาย100 กรัม)	อุณหภูมิ (องศา-เซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลหลังหมัก (กรัมต่อลิตร)		พีเอชหลังหมัก
						น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลทั้งหมด	
1	20	5.5	10^{9}	28	77	2.92	3.18	5.6
2	20	5.5	10^{9}	34	10	67.08	83.10	5.2
3	20	5.5	10^{9}	34	77	4.25	4.78	5.5
4	30	5.5	10^{9}	34	77	11.26	13.73	5.5
5	20	4.5	10^{9}	34	77	63.68	63.95	4.9
6	10	5.5	10^{9}	34	77	0.79	3.22	5.4
7	20	6.5	10^{9}	34	77	2.96	20.47	5.7
8	20	5.5	10^{9}	34	77	4.99	5.27	5.5
9	20	5.5	10^{8}	34	77	27.05	40.13	5.3
10	20	5.5	10^{9}	34	77	3.8	3.91	5.6
11	20	5.5	10^{10}	34	77	2.08	2.72	5.6
12	20	5.5	10^{9}	34	144	3.95	4.81	5.4
13	20	5.5	10^{9}	40	77	11.28	12.53	5.4
14	15	5	10^{9}	31	44	0.28	11.55	6.7
15	25	6	10^{9}	31	44	5.74	17.63	6.0
16	15	6	10^{8}	31	44	0.81	4.56	6.1
17	25	5	10^{8}	31	44	100.09	233.05	5.7
18	25	6	10^{8}	31	111	4.95	22.49	6.3
19	15	6	10^{9}	31	111	0.64	5.27	6.2
20	25	5	10^{9}	31	111	110.40	256.40	5.4
21	15	5	10^{8}	31	111	0.76	7.40	5.8
22	25	5	10^{9}	37	44	141.1	201.67	5.1
23	15	6	10^{9}	37	44	35.63	49.15	6.6
24	25	6	10^{8}	37	44	82.25	135.47	6.0
25	15	5	10^{8}	37	44	90.36	104.48	5.2
26	25	6	10^{9}	37	111	61.43	110.26	5.9
27	15	6	10^{8}	37	111	50.85	62.63	5.2
28	15	5	10^{9}	37	111	98.49	121.30	5.0
29	25	5	10^{8}	37	111	139.40	160.40	4.6

ตารางที่ ข-10 แสดงปริมาณเอทานอลหลังหมักที่ได้จากการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

ลำดับที่	น้ำตาล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	พีเอช	ปริมาณยีสต์ (CFUต่อสารละลาย 100 กรัม)	อุณหภูมิ (องศา-เซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	
						ผลจากการทดลอง	ผลจากการทำนาย
1	20	5.5	10^{9}	28	77	18.33	16.49
2	20	5.5	10^{9}	34	10	8.42	7.47
3	20	5.5	10^{9}	34	77	13.27	12.68
4	30	5.5	10^{9}	34	77	20.69	22.00
5	20	4.5	10^{9}	34	77	12.79	12.64
6	10	5.5	10^{9}	34	77	7.91	7.893
7	20	6.5	10^{9}	34	77	11.33	12.77
8	20	5.5	10^{9}	34	77	13.3	12.68
9	20	5.5	10^{8}	34	77	11.82	12.63
10	20	5.5	10^{9}	34	77	12.32	12.68
11	20	5.5	10^{10}	34	77	10.32	10.32
12	20	5.5	10^{9}	34	144	10.55	12.84
13	20	5.5	10^{9}	40	77	4.78	7.91
14	15	5	10^{9}	31	44	15.76	18.00
15	25	6	10^{9}	31	44	10.99	11.76
16	15	6	10^{8}	31	44	8.87	8.78
17	25	5	10^{8}	31	44	17.73	17.64
18	25	6	10^{8}	31	111	15.76	15.66
19	15	6	10^{9}	31	111	9.85	9.67
20	25	5	10^{9}	31	111	19.21	19.16
21	15	5	10^{8}	31	111	13.30	13.19
22	25	5	10^{9}	37	44	10.69	9.77
23	15	6	10^{9}	37	44	6.32	5.26
24	25	6	10^{8}	37	44	10.34	10.22
25	15	5	10^{8}	37	44	7.24	7.13
26	25	6	10^{9}	37	111	26.91	23.61
27	15	6	10^{8}	37	111	10.34	10.25
28	15	5	10^{9}	37	111	4.79	2.94
29	25	5	10^{8}	37	111	17.09	17.00



ภาพประกอบที่ ข-4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Essential regression ของกระบวนการหมักน้ำหวานจากด้วย ยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

ตารางที่ ข-11 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และพีเอชหลังหมักที่ได้จากการหมักน้ำหวานจากด้วยยีสต์คัดแยกจากน้ำหวานจาก

ลำดับที่	น้ำตาล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	พีเอช	ปริมาณยีสต์ (CFUต่อสารละลาย100 กรัม)	อุณหภูมิ (องศา-เซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลหลังหมัก (กรัมต่อลิตร)		พีเอชหลังหมัก
						น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลทั้งหมด	
1	20	5.5	10^{9}	28	77	0.07	7.50	4.2
2	20	5.5	10^{9}	34	10	62.12	88.15	4.3
3	20	5.5	10^{9}	34	77	0.01	8.72	4.3
4	30	5.5	10^{9}	34	77	0.32	2.23	4.3
5	20	4.5	10^{9}	34	77	0.01	7.09	4.1
6	10	5.5	10^{9}	34	77	0.13	1.30	3.9
7	20	6.5	10^{9}	34	77	0.09	3.04	4.7
8	20	5.5	10^{9}	34	77	0.36	3.34	4.3
9	20	5.5	10^{8}	34	77	0.01	8.84	3.8
10	20	5.5	10^{9}	34	77	0.12	8.92	4.3
11	20	5.5	10^{10}	34	77	0.08	0.45	4.3
12	20	5.5	10^{9}	34	144	1.01	2.53	3.9
13	20	5.5	10^{9}	40	77	110.90	152.42	3.9
14	15	5	10^{9}	31	44	1.05	0.20	4.1
15	25	6	10^{9}	31	44	14.82	30.61	4.1
16	15	6	10^{8}	31	44	0.25	0.73	4.4
17	25	5	10^{8}	31	44	2.30	4.86	4.4
18	25	6	10^{8}	31	111	0.30	1.40	4.0
19	15	6	10^{9}	31	111	0.26	6.28	4.3
20	25	5	10^{9}	31	111	0.16	3.04	4.5
21	15	5	10^{8}	31	111	0.30	0.20	4.2
22	25	5	10^{9}	37	44	33.06	45.40	4.0
23	15	6	10^{9}	37	44	1.45	7.09	3.8
24	25	6	10^{8}	37	44	83.35	132.55	3.9
25	15	5	10^{8}	37	44	38.42	69.32	3.5
26	25	6	10^{9}	37	111	14.47	32.43	4.0
27	15	6	10^{8}	37	111	1.57	1.20	3.5
28	15	5	10^{9}	37	111	0.38	13.58	3.9
29	25	5	10^{8}	37	111	40.80	60.60	3.6

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล ศิรินันท์ พ่วงพี
รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810120047
วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนโครงการตรี-โท 5 ปี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2558
- ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2559

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sirinun Puangpee, Sininart Chongkhong. 2016. Optimization of Nipa Sap Preparation for Ethanol Production. Proceeding of 2016 International conference on Advanced Materials Science and Environmental Engineering (AMSEE2016); June 26-27, 2016, Chiang Mai, Thailand.