การพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของขนุน ด้วยเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ขนาดกลาง

The Development of Ethanol Fermentation of Jackfruit Wastes by a Medium Size Distillation Machine

ชัญญา วงค์จันทร์

เนตรนภิศ น้อยทิม

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

พ.ศ. 2555

การพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของขนุน ด้วยเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ขนาดกลาง

The Development of Ethanol Fermentation of Jackfruit Wastes by a Medium Size Distillation Machine

ชัญญา วงค์จันทร์

เนตรนภิศ น้อยทิม

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ชื่อปริญญานิพนธ์	การพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของขนุน ด้วยเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ขนาดกลาง
ชื่อ นามสกุล	ชัญญา วงค์จันทร์
	เนตรนภิศ น้อยทิม
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ
คณะ	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ดวงฤทัย นิคมรัฐ

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ได้ให้ความเห็นชอบปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว

ดร.ภัทริกา สูงสมบัติ
ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ผิวทอง
กรรมการ

ดร.ดวงฤทัย นิคมรัฐ
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
อนุมัติให้นับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ชื่อปริญญานิพนธ์ การพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของขนุนด้วยเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ขนาดกลาง

ชื่อ นามสกุล ชัญญา วงค์จันทร์
เนตรนภิศ น้อยทิม

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาและคณะ วิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

การพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของขนุนด้วยเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ขนาดกลาง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์ให้ได้ปริมาณสูงสุด งานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของจุลินทรีย์ 4 กลุ่มสายพันธุ์ คือ เชื้อธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 โดยมีขั้นตอน 1) การเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ (350 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 20 วัน พบว่าจุลินทรีย์ทุกกลุ่มสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในสับสเตรทน้ำตาล 2) การหมักขนาดเล็ก (1 ลิตร) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 มีประสิทธิภาพสูงในการให้น้ำตาลและให้แอลกอฮอล์ 14 และ 13% (v/v) ตามลำดับ 3) พัฒนากระบวนการหมักเป็นขนาดกลาง (20 ลิตร) หมักให้ได้น้ำตาลโดยใช้เชื้อธรรมชาติเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้องเติมน้ำตาลกลูโคสเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลสูง 25% Brix เชื้อจุลินทรีย์จึงสามารถใช้เป็นสับสเตรทได้มากและเพียงพอในการผลิตแอลกอฮอล์ในขั้นตอนต่อไป ในขั้นตอนหมักแอลกอฮอล์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ให้ปริมาณแอลกฮอล์สูงสุดที่ 16% (v/v) ในเวลา 10 วัน และ 8 วัน ตามลำดับ ดังนั้นในการพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์ครั้งนี้ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 มีประสิทธิภาพสูงสุดในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่ใช้วัตถุดิบ คือ ส่วนเหลือทิ้งของขนุน และเมื่อนำมากลั่นเอทานอลบริสุทธิ์ 99% พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก และยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ให้เอทานอลปริมาณ 720 และ 740 มิลลิลิตร ตามลำดับ

Independent Study Title	The Development of Ethanol Fermentation of Jackfruit Wastes by a Medium Size Distillation Machine
Author	Chanya Wongjan
	Nednapit Noitim
Degree	Bachelor of Science
Major program	Environmental Science and Natural Resources
	Faculty of Science and Technology
Academic Year	2012

ABSTRACT

The development of ethanol fermentation of jackfruit wastes by a medium size distillation machine aimed to study and develop an ethanol fermentation method that gives optimal production of ethanol. In this research, the ethanol production capability of 4 different groups of microorganisms including natural microbes, microorganisms in stock rice fermented, *Saccharomyces cerevisiae* EDV 492 and *S. cerevisiae* EC 118 is compared. The following procedure was implemented to allow the prescribed comparison: 1) microbes culturing (350 ml) for a total period of 20 days. Based on the study results, all four groups of microorganism were capable of growing in the given culture medium, which is sugar substrate. 2) Small sized fermentation (1 liter) for a total period of 4 days. From this second procedure, it can be discovered that microorganism in stock rice fermented and *S. cerevisiae* EC 118 were highly efficient in producing sugar and ethanol 14% and 13% (v/v), respectively. 3) Develop small sized fermentation to a medium sized fermentation (20 liters) by fermenting natural microbes for a total period of 4 weeks until sugar is obtained. According to the study, glucose must be added to increase the sugar level up to 25% Brix in order to provide sufficient substrate to allow ethanol production of the studied microorganisms. During ethanol fermentation process, it can be found that microorganisms in stock rice fermented and *S. cerevisiae* EC 118 produced the highest amount of ethanol at 16% (v/v) within the period of 10 days and 8 days, respectively. Hence, according to this development of ethanol fermentation, *S. cerevisiae* EC 118 is the most efficient microorganism in terms of ethanol fermentation of jackfruit wastes. In addition, after the distillation of 99% ethanol it can also be found that both microorganisms in stock rice fermented and *S. cerevisiae* EC 118 produced 720 ml and 740 ml of ethanol, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ดร.ดวงฤทัย นิคมรัฐ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ ดูแลให้คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาโดยตลอด ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ผิวทอง และ ดร.ภัทริกา สูงสมบัติ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ปริญญานิพนธ์ให้เรียบร้อยสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์วรวุฒิ กาญจนกิตติชัย ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ เพื่อใช้ในขั้นตอนการกลั่นเอทานอล ตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมสิ่งประดิษฐ์และนวัตกรรมเพื่อคนรุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนครที่ได้อุดหนุนทุนวิจัยสำหรับการศึกษานี้

ขอขอบพระคุณ คุณครูและอาจารย์ทุกท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ให้ผู้วิจัย สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนญาติ ๆ พี่ ๆ เพื่อน ๆ ทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนการศึกษาด้วยดีตลอดมา

ชัญญา วงค์จันทร์
เนตรนภิศ น้อยทิม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
Abstract	(ข)
กิตติกรรมประกาศ	(ค)
สารบัญ	(ง)
สารบัญตาราง	(ช)
สารบัญภาพ	(ฌ)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 กรอบแนวคิดในการศึกษา	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	4
1.4 ขอบเขตการศึกษา	4
1.5 คำนิยามศัพท์	5
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 เอทานอล	6
2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป	7
2.1.2 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี	7
2.1.3 กระบวนการหมักทางชีวเคมี	8
2.1.4 ชนิดกระบวนการหมักเอทานอล	11
2.2 ขนุน	12
2.3 คาร์โบไฮเดรต	14
2.3.1 โมโนแซคคาไรด์	14
2.3.2 ไดแซคคาไรด์	15
2.3.3 ไตรแซคคาไรด์	15
2.3.4 พอลิแซคคาไรด์	16
2.4 ลิกโนเซลลูโลส	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.1 เซลลูโลส	16
2.4.2 เฮมิเซลลูโลส	16
2.4.3 ลิกนิน	17
2.5 ยีสต์	17
2.5.1 ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล	18
2.5.2 ลักษณะของจุลินทรีย์เหมาะสมสำหรับผลิตเอทานอล	18
2.6 กระบวนการผลิตเอทานอล	19
2.6.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ	20
2.6.2 กระบวนการย่อยน้ำตาลเพื่อให้ได้เอทานอล	22
2.6.3 กระบวนการหมักเอทานอล	23
2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล	27
2.7.1 ขั้นตอนเกี่ยวกับเชื้อและการเตรียมกล้าเชื้อ	27
2.7.2 ขั้นตอนการหมักให้ได้เอทานอล	27
2.7.3 ขั้นตอนการกลั่นให้ได้เอทานอล	33
2.8 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์	33
2.8.1 ทฤษฎีการกลั่น	33
2.8.2 การทำให้เอทานอลบริสุทธิ์	33
2.9 ประโยชน์ของเอทานอล	35
2.9.2 ด้านอุตสาหกรรม	35
2.9.1 ด้านพลังงาน	35
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	36
2.10.1 วัตถุดิบประเภทแป้ง	36
2.10.2 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล	37
2.10.3 วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส	38
2.10.4 การกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการ	40
3.1 รูปแบบการศึกษา	40
3.2 วัตถุดิบ สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ	45
3.3 แนวทางการวิจัย	42
3.3.1 ขั้นเตรียมการ	42
3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์	43
3.3.3 การหมักขนาดเล็ก (ขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม)	44
3.3.4 การหมักขนาดกลาง (การศึกษากระบวนการหมักเอทานอล)	45
3.3.5 สรุปและนำเสนอ	48
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล	51
4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	51
4.1.1 กระบวนการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์	51
4.1.2 กระบวนการหมักขนาดเล็ก	53
4.1.3 กระบวนการหมักขนาดกลาง	59
4.1.4 การกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์ 99%	65
4.2 อภิปรายผล	67
บทที่ 5 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	69
5.1 สรุปผล	69
5.2 ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารอ้างอิง	72
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์	78
ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลอง	81
ประวัติผู้วิจัย	87

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	องค์ประกอบของขนุนแก่ ซังขนุน และเมล็ดขนุนดิบ	14
2.2	ข้อแตกต่างระหว่างการปรับสภาพทางเคมีและทางกายภาพ	22
2.3	ผลผลิตพลอยได้ที่เกิดจากการใช้สับสเตรทน้ำตาล	24
2.4	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด	25
4.1	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์	51
4.2	ผลของการกลั่นเอทานอลรอบที่ 1 จากน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยใช้จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก	65
4.3	ผลของการกลั่นเอทานอลรอบที่ 2 จากน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยใช้จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก	66
4.4	ผลของการกลั่นเอทานอลรอบที่ 1 จากน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118	66
4.5	ผลของการกลั่นเอทานอลรอบที่ 2 จากน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118	67
ข.1	การใช้น้ำตาล (%Brix) ของจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอทานอลในขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์	81
ข.2	การใช้น้ำตาล (%Brix) ของจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอทานอลในขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์หลังจากปรับด้วยโมลาส 40 มิลลิลิตร	81
ข.3	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลของขวดควบคุมในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	82
ข.4	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มีเชื้อธรรมชาติในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	82
ข.5	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มีจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	82
ข.6	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	83
ข.7	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	83

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
ข.8	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลของขวดควบคุมในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	83
ข.9	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มีเชื้อธรรมชาติในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	84
ข.10	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มีจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	84
ข.11	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	84
ข.12	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	85
ข.13	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในกระบวนการหมักให้ได้น้ำตาล โดยเชื้อธรรมชาติในถังหมักที่ 1	85
ข.14	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในกระบวนการหมักให้ได้น้ำตาล โดยเชื้อธรรมชาติในถังหมักที่ 2	85
ข.15	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในกระบวนการหมักขนาดกลาง ในถังหมักที่ 1 โดยจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก	86
ข.16	ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในกระบวนการหมักขนาดกลาง ในถังหมักที่ 2 โดยยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118	86

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1.1	กรอบความคิดในการศึกษา	3
2.1	ลักษณะด้านนอกของขนุน	13
2.2	ลักษณะเนื้อในของขนุน	13
2.3	กระบวนการผลิตเอทานอล	20
3.1	ลักษณะซังของขนุน	40
3.2	ลักษณะแกนของขนุน	40
3.3	ลักษณะเปลือกของขนุน	41
3.4	การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 ตามลำดับ	43
3.5	การหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนสับละเอียดที่ผ่านการต้มและไม่ต้ม	44
3.6	การหมักขนาดเล็กที่ต้ม ได้แก่ เชื้อธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 ตามลำดับ	45
3.7	การหมักขนาดเล็กที่ไม่ต้ม ได้แก่ เชื้อธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 ตามลำดับ	45
3.8	ส่วนเหลือทิ้งของขนุนหั่นและสับละเอียด	46
3.9	ส่วนเหลือทิ้งของขนุนหั่นและสับละเอียดหมักให้ได้ปริมาณสูงสุด	46
3.10	การแยกและกรองน้ำหมัก	47
3.11	การเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้หมักเอทานอล	47
3.12	ลักษณะการหมักในสภาพไร้อากาศ	48
3.13	การกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์ 99% โดยใช้เครื่องกลั่นแบบหม้อต้ม	48
3.14	แผนภาพการทดลองที่ 1 ในขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์	49
3.15	แผนภาพการทดลองที่ 2 ในขั้นตอนการหมักขนาดเล็ก ปริมาณการหมัก 1.2 ลิตร	49
3.16	แผนภาพการทดลองที่ 3 ในขั้นตอนการหมักขนาดกลาง ปริมาณการหมัก 20.5 ลิตร	49
4.1	กราฟการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มในขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์	52
4.2	กราฟการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดควบคุมขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	54
4.3	กราฟการเจริญของเชื้อธรรมชาติในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
4.4	กราฟการเจริญของจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	54
4.5	กราฟการเจริญยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	55
4.6	กราฟการเจริญยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม	55
4.7	กราฟการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดควบคุมขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	56
4.8	กราฟการเจริญของเชื้อธรรมชาติในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	56
4.9	กราฟการเจริญของจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	56
4.10	กราฟการเจริญยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	56
4.11	กราฟการเจริญยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม	57
4.12	ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มสายพันธุ์ผลิตได้ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่ไม่ต้มและต้ม	58
4.13	กราฟปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักที่ 1	60
4.14	ลักษณะเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักที่ 1	60
4.15	กราฟปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักที่ 2	61
4.16	ลักษณะเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักที่ 2	61
4.17	กราฟปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก	63
4.18	ลักษณะจุลินทรีย์ในถังหมักที่มีจุลินทรีย์แป้งในข้าวหมาก	63
4.19	กราฟปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118	64
4.20	ลักษณะจุลินทรีย์ในถังหมักยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118	64
5.1	ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป	71
ก.1	ลักษณะการอ่านค่า Hand Refractometer	79
ก.2	เครื่อง Hand Refractometer	79
ก.3	Vino-o-Meter อุปกรณ์ใช้วัดแอลกอฮอล์	80
ก.4	ขั้นตอนการวัดแอลกอฮอล์ โดย Vino-o-Meter	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาความสำคัญและปัญหา

ปัจจุบันน้ำมันเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญกับการดำเนินชีวิตและการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทยและยังเป็นปัญหาสำคัญของประเทศ เนื่องจากมีไม่เพียงพอกับความต้องการที่สูงขึ้นตามความเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ จึงจำเป็นต้องมีการพึ่งพาการนำเข้าเป็นหลัก ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศเพื่อนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง ดังนั้นความต้องการในการคิดค้นแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ ๆ เพื่อช่วยลดการใช้น้ำมันจึงเป็นสิ่งสำคัญและมีความตื่นตัวกันมาก

เอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่ง ซึ่งสามารถผลิตในกระบวนการหมัก โดยเกิดจากกิจกรรมการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ด้วยสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้ในการเจริญและให้เอทานอลในสภาวะไร้อากาศ (กล้าณรงค์ ครีรอต และคณะ, 2550) ประเทศไทยผลิตเอทานอลได้จากมันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด ซึ่งถือเป็นพืชพลังงาน (ธราพงษ์ วิฑิตศานต์ และคณะ, 2553) อย่างไรก็ตามเนื่องจากพืชพลังงานยังเป็นแหล่งอาหารของประเทศไทยและของโลก รวมทั้งราคาวัตถุดิบประมาณร้อยละ 20 ของการผลิต ดังนั้นจึงเป็นการเหมาะในการเลือกวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่มีอยู่มากในประเทศมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล เนื่องจากไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านบริโภคแต่ยังคงให้ผลผลิตเอทานอลในปริมาณเท่าหรือใกล้เคียงกับพืชพลังงานที่ใช้ผลิตเอทานอลในปัจจุบัน การเลือกวัตถุดิบเหล่านี้จะเป็นแนวทางลดปัญหาการขาดแคลนพืชพลังงาน ซึ่งเป็นการลดมลภาวะของขยะจากปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดในรูปของพลังงานทดแทน โดยเอทานอลสามารถนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (ไตรวุฒิ นพรัตน์, 2552)

จากปัญหาความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงและการเหลือทิ้งของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทำให้คณะผู้วิจัยจึงมีความต้องการผลิตเอทานอลเพื่อช่วยลดการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในปัจจุบัน ในการนี้จะทำการคัดเลือกวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีต้นทุนต่ำและมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตหรือ ปริมาณน้ำตาลสูงเหมาะแก่การใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ดังนั้น

การศึกษาในครั้งนี้ คือ ส่วนเหลือทิ้งของขนุน ซึ่งได้แก่ ซัง แกน และเปลือกขนุน เนื่องจากขนุนเป็นผลไม้ประเภทที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 23.70-29.20 (วีระพงศ์ พรสมิทธิกุล, 2552) จึงสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเอทานอล ประกอบกับการหมักเอทานอลในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาการหมักที่นาน มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ได้ปริมาณเอทานอลที่ไม่แน่นอนหรือปริมาณน้อยและมีผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการปนมาด้วย คณะผู้วิจัยจึงต้องการทำการพัฒนาการหมักเอทานอลด้วยส่วนเหลือทิ้งของขนุนเพื่อให้ได้เอทานอลปริมาณสูงและมีคุณภาพ

ในรายละเอียดการพัฒนากระบวนหมักเอทานอล คณะผู้วิจัยจะเน้นการพัฒนาการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพทั้งในการย่อยแป้ง การย่อยลิกโนเซลลูโลส การหมักเอทานอลเพื่อให้ได้เอทานอลความเข้มข้นที่สูงมากที่สุดที่คาดไว้ คือ ร้อยละ 15 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่จำกัดสูงสุดเท่าที่ตามเกณฑ์ของการหมักที่สามารถทำได้ในขณะนี้ นอกจากนั้นด้วยความร่วมมือกับคณะวิศวกรรมศาสตร์ ในกระบวนการกลั่นคณะผู้วิจัยได้ใช้อุปกรณ์การกลั่นที่มีกรรมวิธีที่ดัดแปลงเพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 99 ในเวลาอันสั้น เพื่อเพิ่มปริมาณและความเข้มข้นของเอทานอล

1.2 กรอบแนวคิดในการศึกษา

ภาพ 1.1 กรอบความคิดในการศึกษา

1.3 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.3.1 เพื่อศึกษากระบวนการหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนจากเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด

1.3.2 เพื่อศึกษากระบวนการหมักเอทานอลของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณสูงจากวัตถุดิบน้ำตาลที่ได้จากการย่อยส่วนเหลือทิ้งของขนุน

1.3.3 เพื่อพัฒนาวิธีหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนในระดับขนาดกลางเพื่อการผลิตเอทานอล

1.4 ขอบเขตการศึกษา

ในการพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลมีขอบเขตการศึกษา ดังนี้

1.4.1 วัตถุดิบที่ใช้ ได้แก่ ส่วนเหลือทิ้งของขนุน จำนวน 20 กิโลกรัมต่อถังหมัก

1.4.2 หมักกล้าเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณการหมัก 1 ลิตรต่อเชื้อจุลินทรีย์

1.4.3 หมักเอทานอล ปริมาณการหมัก 20 ลิตรต่อถังหมัก

1.4.4 เชื้อจุลินทรีย์ในการหมัก

1.4.4.1 เชื้อธรรมชาติ จากส่วนเหลือทิ้งขนุนผ่านการแช่น้ำ 2 วัน

1.4.4.2 เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก

1.4.4.3 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492

1.4.4.4 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118

1.4.5 ใช้เครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ที่พัฒนากระบวนการกลั่นได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงอย่างน้อย 90% ได้ในเวลาน้อยกว่า 6 ชั่วโมง

1.5 คำนิยามศัพท์

1.5.1 ส่วนเหลือทิ้งของขนุน

เศษชิ้นส่วนที่ไม่สามารถนำไปบริโภคหรือใช้ประโยชน์อื่นได้อีก ดังนั้น ส่วนเหลือทิ้งของขนุน ได้แก่ ซัง แกน และเปลือกขนุน

1.5.2 เอทานอล

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีสูตรเคมี C_2H_5OH เป็นพลังงานหมุนเวียน ผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร เอทานอลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง

1.5.3 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนวัตถุดิบน้ำตาลกลูโคส (Glucose) ไปเป็นเอทานอล โดยอาศัยเอนไซม์และยีสต์ แล้วแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลทำให้บริสุทธิ์ 99%

1.5.4 เครื่องกลั่นแอลกอฮอล์

เครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ คือ เครื่องมือที่มีความสามารถในการกลั่นแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักวัสดุชีวมวลให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 95-99%

1.5.5 แก๊สโซฮอล์

แก๊สโซฮอล์ คือ น้ำมันเชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมระหว่างน้ำมันเบนซินไร้สารตะกั่วผสมกับเอทานอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 99% โดยปริมาตร

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยส่วนเหลือทิ้งของขนุนเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด

1.6.2 ทราบปริมาณและความเข้มข้นของเอทานอลจากวัตถุดิบน้ำตาลที่ได้จากการย่อยส่วนเหลือทิ้งของขนุน

1.6.3 ได้วิธีการที่เหมาะสม เพื่อผลิตเอทานอลจากส่วนเหลือทิ้งของขนุน

1.6.4 ได้วิธีการลดของเสียที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้อย่างเหมาะสม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษางานวิจัยในครั้งนี้ มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับความรู้และทฤษฎีต่าง ๆ ซึ่งต้องนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบพิจารณาอ้างอิงและวิเคราะห์ในการทำงานวิจัย ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจได้อย่างชัดเจน ภายในบทนี้จึงกำหนดหัวข้อความรู้และทฤษฎีที่เกี่ยวข้องไว้ 10 หัวข้อ ดังนี้

2.1 เอทานอล (Ethanol)

2.2 ขนุน (Jackfruit)

2.3 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)

2.4 ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)

2.5 ยีสต์ (Yeast)

2.6 กระบวนการผลิตเอทานอล

2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล

2.8 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์

2.9 ประโยชน์ของเอทานอล

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (Ethanol)

เอทานอล (Ethanol) หรือเรียกอีกชื่อว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) เป็นสารอินทรีย์ มีสัญลักษณ์ทางเคมี คือ C_2H_5OH เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย จุดไฟติด ละลายในน้ำและในสารอินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี

ประโยชน์ใช้สอยของเอทานอลมีหลายประการ เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้ผลิตยา ใช้เป็นตัวทำละลายในการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหลายชนิด ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและสารชีวเคมี ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อขับเคลื่อนเครื่องยนต์และสามารถใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนให้แก่น้ำมันเบนซินสำหรับรถยนต์ เมื่อเทคโนโลยีทางด้านเคมีสูงขึ้นจึงมีการสังเคราะห์เอทานอลจากสารเคมีพวกปิโตรเลียม (Petrochemical Product)

ดังนั้นในกระบวนการผลิตเอทานอลที่ใช้กันอยู่จึงมี 2 ชนิด คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical Synthesis) และกระบวนการหมักสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (Alcoholic Fermentation of Carbohydrate)

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป

เอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล เป็นสารประกอบอินทรีย์มีคุณสมบัติเป็นของเหลวใส ไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยง่าย มีจุดเดือดที่ 78.32 องศาเซลเซียส ความดันไอ 20 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 0.7939 ที่ 15 องศาเซลเซียส ค่าความร้อนจำเพาะ 2.43 J/g และค่าความร้อนแฝง 920.3 J/g เอทานอลบริสุทธิ์มีแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 99.7 ซึ่งโดยทั่วไปมีน้ำเจือปนไม่เกินร้อยละ 0.5 ละลายน้ำได้ดีและตัวละลายอินทรีย์อื่น ๆ เช่น เมทิลแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น (ศกุนตลา ภู่เจริญ, 2551)

2.1.2 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีมี 2 กระบวนการ คือ

2.1.2.1 เอทานอลจากกระบวนการแคตาไลติกไฮเดรชั่นของเอธิลีน (Ethanol from Ethylene by Catalytic Hydration)

ปฏิกิริยา ดังสมการ 2.1 :

$$CH_2 = CH_2 + H_2O \rightarrow C_2H_5OH \qquad (2.1)$$

ประสิทธิภาพในการผลิต (Yield) 85%

วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิต :

เป้าหมายในการผลิต (Basis)	=	1,000	ลิตรเอทิลแอลกอฮอล์ (95%)
Ethylene (97%)		515	กิโลกรัม
Phosphoric acid		เล็กน้อย	
Sodium hydroxide (NaOH)		เล็กน้อย	

2.1.2.2 เอทานอลจากกระบวนการเอสเทอริฟิเคชั่นและไฮโดรไลซีสของเอธิลีน (Ethanol from Ethylene by Esterification and Hydrolysis)

ปฏิกิริยา (ดังสมการ 2.2-2.5) :

$$CH_2 = CH_2 + H_2SO_4 \rightarrow C_2H_5OSO_2OH \qquad (2.2)$$

$$2CH_2 = CH_2 + H_2SO_4 \rightarrow C_2H_5OSO_2OC_2H_5 \qquad (2.3)$$

$$C_2H_5OSO_2OH + C_2H_5OSO_2OC_2H_5 \rightarrow 3C_2H_5OH + 2H_2SO_4 \quad (2.4)$$

$$2C_2H_5OH \rightarrow C_2H_5OC_2H_5 + H_2O \quad (2.5)$$

ประสิทธิภาพในการผลิต (Yield) 90 - 95%

วัตถุดิบและพลังงานที่ใช้ในกระบวนการผลิต

เป้าหมายในการผลิต (Basis) =	1,000	ลิตรเอทิลแอลกอฮอล์ (95%)
Ethylene	480	กิโลกรัม
Sulfuric acid (H_2SO_4)	72	กิโลกรัม
Sodium hydroxide (NaOH)	15.9	กิโลกรัม
น้ำ	240	ลูกบาศก์เมตร
ไอน้ำ	2,400	กิโลกรัม
ไฟฟ้า	5.3	กิโลวัตรต่อชั่วโมง
น้ำมันเชื้อเพลิง	186,400	กิโลแคลอรี

วิธีการสังเคราะห์เอทานอลทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมา ซึ่งแต่เดิมนิยมใช้กันมากและนิยมใช้มากกว่าวิธีการหมัก ทั้งนี้เพราะเป็นกระบวนการที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก กระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับปัจจัยเพียงไม่กี่อย่าง แต่เนื่องจากวิธีการสังเคราะห์ดังกล่าวต้องใช้สารเริ่มต้นที่เป็นผลผลิตจากปิโตรเลียม ซึ่งในช่วงระยะหลังที่มีการขึ้นราคาน้ำมันปิโตรเลียม จึงทำให้ต้นทุนการผลิตในวิธีทั้ง 2 วิธีนี้สูงขึ้นมาก (แต่เดิมต่ำกว่าวิธีการผลิตแบบการหมัก) จนทำให้มีผู้สนใจและหันเหการผลิตเอทานอลมาทางด้านการหมักจากสารพวกคาร์โบไฮเดรตแทน (กนกวรรณ แก้วแกมเสือ, 2547)

2.1.3 กระบวนการหมักทางชีวเคมี

กระบวนการหมักทางชีวเคมีใช้วัตถุดิบ 3 ประเภท คือ

2.1.3.1 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

พืชที่มีน้ำตาลปกติประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ ซึ่งทำให้การเตรียมสับสเตรท เพื่อนำไปหมักทำได้ง่าย

การผลิตเอทานอลโดยการหมักน้ำอ้อยโดยตรงทำได้โดยนำน้ำอ้อยมาทำให้ใสด้วยการใส่น้ำปูนและกรดซัลฟูริก เพื่อตกตะกอนสารอนินทรีย์ ผลที่ได้หลังจากตกตะกอนจะเป็นของเหลวสีเขียว มีลักษณะเหนียวข้นกว่าน้ำเล็กน้อย มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 12-13 เมื่อต้องการนำมาใช้ในการหมักเอทานอลอาจจะทำให้เข้มข้นถึงระดับที่ต้องการโดยการระเหยน้ำ ข้อเสียของการใช้น้ำอ้อยเพื่อการผลิตเอทานอล คือ เก็บได้ไม่นาน เสียง่าย ส่วน

กากน้ำตาลชนิด Black Strap Molasses ซึ่งเป็นส่วนเหลือหลังจากตกผลึกน้ำตาลซูโครสออกจากน้ำอ้อยที่ผ่านกรรมวิธีแล้ว เป็นของเหลวที่มีลักษณะเหนียวข้นสีเข้ม มีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดร้อยละ 50-60 โดยน้ำหนัก ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส มีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ค่อนข้างสมบูรณ์ กากน้ำตาลเสียยากเพราะมีคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นสูงทำให้เก็บไว้ได้นาน เมื่อต้องการนำมาใช้หมักเอทานอลก็ทำการเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลตามที่ต้องการ แต่เนื่องจากกากน้ำตาลไม่ได้มีธาตุอาหารทั้งหมดที่ยีสต์ต้องการเสมอไป ดังนั้นในการนำมาใช้ผลิตเอทานอลอาจต้องเติมธาตุอาหารบางอย่าง เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตหรือแอมโมเนียมฟอสเฟต เพื่อแก้ปัญหาการขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส สำหรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ใช้ในการหมักมักปรับให้ได้ 4-5 ด้วยกรดซัลฟูริก ในการใช้น้ำอ้อยเพื่อผลิตเอทานอลนั้นพบว่าผลผลิตที่ได้ประมาณ 70-90 ลิตรต่อตันอ้อย แต่เมื่อใช้กากน้ำตาลผลผลิตที่ได้ประมาณ 245 ลิตรต่อตันกากน้ำตาล โดยในการผลิตน้ำตาลทรายแต่ละตันจะให้กากน้ำตาล 300 กิโลกรัม (รัชนีกร หมวดพล, 2552)

2.1.3.2 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

พืชที่ให้แป้งมีหลายชนิด เช่น ธัญพืชชนิดต่าง ๆ ซึ่งรวมทั้งข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวมันสำปะหลัง มันเทศ สาคูและเผือก สำหรับการผลิตเอทานอลในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาเหนือใช้ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว มันฝรั่งและผักกาดหวานเป็นวัตถุดิบ ในขณะที่ประเทศในเขตร้อน เช่น บราซิล วัตถุดิบที่สำคัญสำหรับการผลิตเอทานอล คือ อ้อย กากน้ำตาล มันสำปะหลังและมันเทศ

มันสำปะหลัง (*Monihot esculenta*) ชื่อเรียกหลายชื่อ คือ Cassava, Manioc หรือ Tapioca (ไกรยศ แซ่ลิ้ม, 2550) เป็นพืชที่ปลูกมากในประเทศเขตร้อน หัวมันสำปะหลังประกอบด้วยแป้งร้อยละ 20-35 โดยน้ำหนัก และโปรตีนร้อยละ 2

เนื่องจากยีสต์ *S. cerevisiae* ตลอดจนยีสต์ส่วนใหญ่ที่ใช้ผลิตเอทานอลไม่มีความสามารถในการใช้แป้งและการหมักแป้ง ดังนั้นในการนำแป้งมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลจึงจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลซึ่งยีสต์สามารถหมักได้ การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลอาจทำได้โดยวิธีการใช้เอนไซม์ ความร้อนหรือวิธีการใช้กรด

2.1.3.3 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) เป็นสารอินทรีย์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในพืชบก ในผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ไม้ เยื่อของพืชต่าง ๆ ซึ่งลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน อัตราส่วนของทั้ง 3 อย่างมีความแตกต่างกันไป

ตามชนิดของพืช การนำเอามาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ คือ การเปลี่ยนเป็นสารเคมีที่มีราคาสูงขึ้น ปัญหาในการนำมาใช้ประโยชน์เกิดขึ้น เนื่องจากมีลิกนิน ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรง เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จะเข้าไปย่อยสลาย การใช้ประโยชน์จากลิกโนเซลลูโลสต้องมีการแยกส่วนประกอบต่าง ๆ ออกจากกัน เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่มีมากและเป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรต เมื่อนำมาผ่านการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ก็จะได้น้ำตาลกลูโคส เฮมิเซลลูโลส เมื่อนำมาย่อยสลายก็จะได้น้ำตาลไซโลส ซึ่งน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด มีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง

การนำวัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมาใช้ผลิตเอทานอลจำเป็นต้องไฮโดรไลซ์เซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งหมักเป็นเอทานอลได้โดยยีสต์ เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่ไฮโดรไลซ์ยาก เนื่องจากมีโครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary Structure) และตติยภูมิ (Tertiary Structure) (ปรียารัตน์ โยวะผุย, 2550)

1) โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary Structure)

เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการขดหรือม้วนตัวของโครงสร้างปฐมภูมิ ซึ่งแสดงรูปร่างที่เป็นระเบียบของโปรตีนที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่าง C=O ในหน่วยของกรดอะมิโนกับหมู่ $–NH_2$ ในหน่วยของกรดอะมิโนอีกหน่วยหนึ่ง โครงสร้างแบบทุติยภูมิจึงมีได้ 2 แบบ คือ

- โครงสร้างแบบเกลียวแอลฟาหรือแอลฟาเฮลิกซ์ (α–helix)

หนึ่งในประเภทที่พบมากที่สุดของโครงสร้างทุติยภูมิ ที่เรียกว่าแบบเกลียวแอลฟา เกิดจากการม้วนตัวของโครงสร้างปฐมภูมิ คล้ายกับการม้วนกระดาษ มีรูปร่างเป็นเกลียว เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิล (–CO–) กับหมู่อะมิโน ($–NH_2$) อีก 4 หน่วยสายพอลิเพปไทด์เดียวกันในโซ่เดียวกัน

- โครงสร้างแบบพลีตบีตา (β–pleated sheet)

โครงสร้างแบบพลีตบีตามีสายโซ่ที่พับเป็นจีบเนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนระหว่าง C=O กับ N–H ของกรดอะมิโนระหว่างสายโซ่ที่ขนานกัน การวางขนานสายโซ่อาจหันซี-เทอร์มินัล (C–terminal : ปลายด้านที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ) ไปทางทิศเดียวกันหรือวางขนานแบบหันซี–เทอร์มินัลให้สวนทิศทางกันก็ได้ นอกจากพันธะไฮโดรเจนแล้ว ยังมีพันธะอื่น ๆ เกิดขึ้นด้วย คือ พันธะไอออนิกหรือพันธะไดซัลไฟด์ (–S–S–) ในกรณีที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลอยู่ด้วย

2) โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary Structure)

โครงสร้างตติยภูมิเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้น เนื่องจากมีพันธะ และ/หรือ แรงกระทำระหว่างหมู่ที่อยู่ในหน่วยของกรดอะมิโน ได้แก่ แรงไฮโดรโฟบิก พันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิกและพันธะไดซัลไฟด์ (–S–S–)

โครงสร้างตติยภูมิเกิดจากโครงสร้างเกลียวแอลฟา (α–helix) ม้วนเข้าหากันและไขว้เข้าหากันโดยมีแรงยึดเหนี่ยวอ่อน ๆ คล้ายกับโครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนแต่ละชนิดจะมีลักษณะจำเพาะขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่มีความเหมาะสมสำหรับทำหน้าที่ต่าง ๆ ของโปรตีน (บุญรอด วงษ์สวาท, 2555)

นอกจากนั้นเซลลูโลสมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับสารอื่นที่อยู่ในผนังเซลล์ของพืช ดังนั้นก่อนที่จะไฮโดรไลซ์จำเป็นจะต้องมีการปรับสภาพเพื่อลดโครงสร้างที่เป็นผลึก (Crystallinity) และเพื่อเพิ่มผิวหน้าที่จะสัมผัสกับการไฮโดรไลซ์ โดยการทำลายโครงสร้างที่เป็นไฟเบอร์และการเกาะระหว่างโมเลกุลของซูโครส วิธีการปรับสภาพอาจใช้วิธีทางเคมีหรือทางกายภาพ (ปรียารัตน์ โยวะผุย, 2550) เช่น

- วิธีทางกายภาพมีหลายวิธีทั้งการใช้รังสี การบด และการใช้ความร้อน
- การใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เพื่อทำลายพันธะระหว่างลิกนินและเซลลูโลส ทำโดยการรักษาไม้ที่มีความชื้นด้วยแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ภายใต้ความดันที่ 120 องศาเซลเซียส 2-3 ชั่วโมง พบว่ามีศักยภาพสูงในการปฏิบัติขนาดใหญ่ ๆ
- วิธีการใช้ด่างเจือจาง (Beckmenn Process) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1 ที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ใช้ได้ดีกับฟางและชานอ้อย

2.1.4 ชนิดกระบวนการหมักเอทานอล

2.1.4.1 การหมักแบบ Separated Hydrolysis and Fermentation (SHF)

การหมักแบบ Separated Hydrolysis and Fermentation หรือกระบวนการแยกน้ำตาลก่อนหมัก เป็นกระบวนการที่ต้องทำการย่อยให้เกิดน้ำตาลกลูโคสก่อนด้วยกรดหรือเอมไซม์ แล้วนำไปหมักต่อให้ได้ปริมาณเอทานอล โดยการย่อยสลายด้วยเอมไซม์เซลลูโลสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น หอยทาก จุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น โปรโตซัว แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีส เป็นต้น ลักษณะการย่อยด้วยเอมไซม์มีความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอมไซม์และเซลลูโลส ซึ่งจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงไม่รุนแรง น้ำตาลกลูโคสจะไม่ถูกย่อยสลายต่อไป ส่วนการย่อยด้วยกรด จำเป็นต้องใช้กรดความเข้มข้นสูงและอุณหภูมิที่สูงจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาเกิดขึ้นรวดเร็วภายใน 15-20 นาที และเกิดอย่างไม่

เฉพาะเจาะจง ดังนั้นบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่นและกรดอาจทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

2.1.4.2 การหมักแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

การหมักแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) หรือกระบวนการน้ำตาลพร้อมหมัก เป็นกระบวนการที่ไม่จำเป็นต้องแยกน้ำตาลกลูโคสออกก่อนกระบวนการหมัก สามารถผลิตทั้งน้ำตาลและเอทานอลในเวลาเดียวกันซึ่งเป็นการลดระยะเวลาและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ก็เพิ่มขึ้นด้วย แต่เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่างการย่อยเซลลูโลสอยู่ที่ 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของการหมักเอทานอลอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการนี้จึงอยู่ที่ 38 องศาเซลเซียส แบคทีเรียหรือยีสต์โดยทั่วไปไม่สามารถทำงานได้ในอุณหภูมินี้ ปัจจุบันจึงต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์หรือแบคทีเรียให้ทนอุณหภูมิสูงได้ (ปรียารัตน์ โยวะผุย, 2550)

2.2 ขนุน

ขนุนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus heterophyllus* Lamk. อยู่ในตระกูล Moraceae (อัมพิกา ทั่งพรม, 2549) ขนุนเป็นไม้ยืนต้นเนื้อแข็ง ตระกูลเดียวกับต้นสาเก ต้นขนุนสูงประมาณ 15-30 เมตร ปลูกง่าย โตเร็ว ลำต้นและกิ่งเมื่อมีบาดแผลจะมีน้ำยางสีขาวข้นคล้ายน้ำนมไหล ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ แผ่นใบรูปรี ขนาดกว้าง 5-8 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ปลายใบทู่ถึงแหลม โคนใบมน ผิวในด้านบนสีเขียวเข้มเป็นมัน เนื้อใบหนา ดอกออกเป็นช่อสีเขียว ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในต้นเดียวกัน ช่อดอกตัวผู้ออกบริเวณปลายกิ่งหรือออกใบ เป็นแท่งยาว ช่อดอกตัวเมียเป็นแท่งกลมยาว ออกตามลำต้นหรือกิ่งก้านใหญ่

ขนุนไม่ค่อยมีโรคและแมลงรบกวน สามารถปลูกในดินทั่วไปและปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย แหล่งปลูกอยู่ที่จังหวัดปราจีนบุรี ชลบุรี ระยอง นครปฐม นครสวรรค์ พิษณุโลกและอุตรดิตถ์ ขนุนสามารถให้ผลดกออกดอกตลอดปี ดังนั้นจึงมีขนุนสุกให้กินตลอดปี ในช่วงเดือนมกราคมถึงพฤษภาคมเป็นฤดูกาลที่ขนุนสุกมากที่สุด ต้นขนุนที่สมบูรณ์สามารถให้ผลได้เต็มที่มากถึง 200-300 ผล ผลดิบเปลือกสีเขียวสด มีหนามทู่เล็ก ๆ รอบผล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางผล 20-35 เซนติเมตร เมื่อขนุนแก่เปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง หนามบนผิวเปลือกจะแบนป้านออก ดังภาพ 2.1 ภายในผลจะมีซังขนุนลักษณะเป็นเส้น ๆ หุ้มยวงสีเหลืองไว้ ดังภาพ 2.2 ภายในยวงมีเมล็ดกลมรี สีครีมและมีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง ๆ

ขนุนมีหลายพันธุ์ หลายสี หลายเนื้อและหลายระดับความหวาน ซังขนุนบางผลจะหวานหอม เช่นเดียวกับยวง สามารถนำมากินได้เช่นเดียวกับเนื้อขนุน แต่ซังขนุนส่วนมากมักเหนียว มีรสหวานจืดจึงถูกทิ้ง ขนุนมีหลายขนาด ขนาดใหญ่หนักถึง 40 กิโลกรัม นับเป็นผลไม้ผลใหญ่ที่สุดในโลก ขนุนมีหลายพันธุ์ ยกตัวอย่างเช่น พันธุ์ขุนวิชาญ อีถ่อ แม่น้อยทะวาย และละแม เป็นต้น (สิริลักษ์ เพ็ชรขาว, 2542) องค์ประกอบทางเคมีในส่วนต่าง ๆ ของผลขนุน มีรายละเอียด ดังตาราง 2.1

ภาพ 2.1 ลักษณะด้านนอกของขนุน

ภาพ 2.2 ลักษณะเนื้อในของขนุน

ตาราง 2.1 องค์ประกอบของขนุนแก่ ซังขนุน และเมล็ดขนุนดิบ

องค์ประกอบ	ขนุนแก่	ซังขนุน	เมล็ดขนุนดิบ
ความชื้น (ร้อยละ)	72.90	66.60	60.70
ไขมัน (ร้อยละ)	0.30	0.00	0.20
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	23.70	29.20	30.60
ใยอาหาร (ร้อยละ)	0.90	1.80	1.60
โปรตีน (ร้อยละ)	1.70	1.40	5.50
พลังงานความร้อน (kcal/100g)	94.00	122.00	146.00
แคลเซียม (mg/100g)	27.00	21.00	0.00
ฟอสฟอรัส (mg/100g)	38.00	13.00	105.00
เหล็ก (mg/100g)	0.60	0.20	2.90
วิตามินบี 1 (mg/100g)	0.09	0.08	1.74
วิตามินบี 2 (mg/100g)	0.11	0.15	0.02
วิตามินซี (mg/100g)	9.00	13.00	3.25
ไนอาซิน (mg/100g)	0.70	-	24.00
วิตามินเอ (หน่วยสากล IU)	392.00	-	22.00

ที่มา: วีระพงศ์ พรสมิทธิกุล (2552)

2.3 คาร์โบไฮเดรต

โมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยธาตุคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) เป็นธาตุหลัก โดยพืชจะใช้พลังงานจากแสงแดดในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศและน้ำ ซึ่งดูดจากดินและจะสะสมอาหารในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เมล็ด ใบ หัว ลำต้น คาร์โบไฮเดรตมีหลายชนิดสามารถจำแนกตามขนาดของโมเลกุลเป็น 4 พวกใหญ่ ดังนี้

2.3.1 โมโนแซคคาไรด์ (Monosaccharide)

โมโนแซคคาไรด์เป็นสารประกอบที่มีสูตรเคมีเป็น $(CH_2O)_n$ และ n จะมีค่าตั้งแต่ 3 ขึ้นไป คาร์บอนอะตอมจะต่อกันเป็นโซ่ยาวและไม่แยกเป็นกิ่ง แต่ละคาร์บอนอะตอมจะมี -OH จับอยู่ โมโนแซคคาไรด์เกือบทั้งหมดมีลักษณะเป็นผลึกขาว ละลายน้ำได้ดีและมักมีรสหวาน ตัวที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ คือ กลูโคส เนื่องจากในโมเลกุลของน้ำตาลมีหมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตนอิสระ ซึ่งสามารถเป็น Weak Reducing Agent ได้ จึงเรียกน้ำตาลที่มีคุณสมบัตินี้ว่าเป็น Reducing Sugar หรือน้ำตาลรีดิวซิ่ง ซึ่งน้ำตาลทุกชนิดทั้งโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ มีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซิ่ง ยกเว้น น้ำตาลซูโครสซึ่งในโมเลกุลไม่มีหมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตนอิสระ จึงเรียกน้ำตาลซูโครสว่าเป็น Non-Reducing Sugar เมื่อน้ำตาลซูโครสถูกไฮโดรไลซ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส สารละลายที่ได้จะมีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซิ่งได้

2.3.2 ไดแซคคาไรด์ (Disaccharide)

ไดแซคคาไรด์ ได้แก่ น้ำตาลซึ่งประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ 2 โมเลกุลต่อกันอยู่ด้วยพันธะไกลโคซิดิค (Glycosidic Bond) ไดแซคคาไรด์ที่พบมากในธรรมชาติ ได้แก่

2.3.2.1 ซูโครส (Sucrose)

ซูโครสหรือน้ำตาลอ้อย เป็นไดแซคคาไรด์ซึ่งประกอบขึ้นด้วยหนึ่งโมเลกุลของกลูโคสต่ออยู่กับหนึ่งโมเลกุลของฟรุคโตส น้ำตาลอ้อยนี้เป็นน้ำตาลซึ่งพบมากที่สุดในพืช เนื่องจากซูโครสใช้ α-OH ของคาร์บอนที่หนึ่งกลูโคส จับกับฟรุคโตส ดังนั้นหมู่นี้จึงไม่เป็นอิสระและไม่ทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดส์ ดังนั้นซูโครสจึงไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลซูโครสอาจถูกสลายได้ง่ายด้วยน้ำ ให้กลูโคสและฟรุคโตส น้ำตาลที่ได้หลังจากการสลายด้วยน้ำ เรียกว่า น้ำตาลอินเวอร์ท (Invert Sugar) ปฏิกิริยาสลายด้วยน้ำของน้ำตาลซูโครสนี้อาจถูกเร่งให้เกิดเร็วขึ้นได้ โดยเอนไซม์ซึ่งเรียกว่า Invertase

2.3.2.2 แล็คโตส (Lactose)

แล็คโตสหรือน้ำตาลนม สามารถพบประมาณร้อยละ 5 ในน้ำนมของสัตว์ ประกอบด้วย กาแล็คโตสและกลูโคส แล็คโตส เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เพราะมีหมู่ –OH ของคาร์บอนที่หนึ่งของกาแล็คโตสเป็นอิสระและสามารถเกิดปฏิกิริยากับเฟนิลไฮดราซีน

2.3.2.3 มัลโตส (Maltose)

มัลโตสเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง โดยเอนไซม์อะไมเลส น้ำตาลมัลโตสประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสสองโมเลกุล ตามปกติจะไม่พบน้ำตาลมัลโตสอยู่เป็นอิสระในธรรมชาติ น้ำตาลมัลโตสมีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

2.3.3 ไตรแซคคาไรด์ (Trisaccharide)

ไตรแซคคาไรด์ ได้แก่ น้ำตาลซึ่งประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์สามตัวต่อเนื่องกัน เช่น ราฟฟีโนส (Raffinose) ประกอบด้วยกาแล็คโตส กลูโคส และฟรุคโตสอย่างละหนึ่งโมเลกุล เป็นไตรแซคคาไรด์ที่พบมากในธรรมชาติ เป็นน้ำตาลที่มาจากหัวบีท (Beet) และพบในพืชชั้นสูงอื่น ๆ อีกหลายชนิด เมเลไซโตส (Melezitose) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และกลูโคส พบในพืชจำพวกสน เช่น สนเขา สนเกี๊ยะ เป็นต้น

2.3.4 **พอลิแซคคาไรด์** (Polysaccharide)

คาร์โบไฮเดรตซึ่งพบในธรรมชาติส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปพอลิแซคคาไรด์และมีน้ำหนักโมเลกุลมาก ถ้าสลายพอลิแซคคาไรด์เหล่านี้ด้วยกรดหรือเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ก็จะได้โมโนแซคคาไรด์ กลูโคสเป็นโมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่สุดของพอลิแซคคาไรด์ แต่ก็มีพอลิแซคคาไรด์อื่น ๆ ซึ่งประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ตัวอื่น ๆ และอนุพันธ์ของมัน ซึ่งพอลิแซคคาไรด์ที่สำคัญ ได้แก่ แป้ง (Starch)

แป้งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญมากสำหรับสิ่งมีชีวิตและยังเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอีกหลายชนิด สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาการใช้แสงของพืช (Photosynthesis) ลักษณะของแป้งเป็นเม็ดเล็ก ๆ (Small Granules) โดยทั่วไปมักพบแป้งในราก ลำ ต้น เมล็ดของพืช คุณสมบัติและขนาดของแป้งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (ดาวัลย์ ฉิมภู่, 2551)

2.4 **ลิกโนเซลลูโลส** (Lignocellulose)

ลิกโนเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์สายยาวและมีมวลโมเลกุลสูง (ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์, 2545) ประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบตา (1,1) (β-(1,4) Glucosidic Linkage) ประมาณ 10,000 หน่วย พบทั่วไปในธรรมชาติ โดยเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืชและมีการเรียงตัวอยู่ในรูปของผลึก พบในพืชบกจำนวนมากและในผลพลอยได้จากการเกษตร (อัมพิกา ทั่งพรม, 2549) เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ไม้ เยื่อของพืชชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด ดังนี้

2.4.1 **เซลลูโลส**

เซลลูโลสเป็นพอลิแซคคาไรด์โครงสร้างกว่าครึ่งหนึ่งของสารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอน เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในหมู่พืชของโลกและเป็นอนุพันธุ์ของคาร์โบไฮเดรต เมื่อนำมาย่อยสลายด้วยกรดหรือเอมไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคส ในไม้ประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณร้อยละ 50 ส่วนสำลีหรือฝ้าย คือ เซลลูโลสบริสุทธิ์ ถ้าต้มเซลลูโลสในกรดแก่ก็จะได้กลูโคสอย่างเดียว ถ้าการสลายไม่สมบูรณ์ก็จะได้ไดแซคคาไรด์เซลโลไบโอส เซลลูโลสเป็น

โมเลกุลที่ไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วยหน่วยกลูโคสต่อกันอยู่เป็นเส้นยาว ๆ โดยพันธะแบบ β (1-4) เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000-500,000 ซึ่งเท่ากับ 300-3,000 หน่วย

2.4.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำและมีปริมาณการเกิดเป็นพอลิเมอร์ (Degree of Polymerization, DP) ประมาณ 200 โดยมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลสหลายชนิด กล่าวคือ มีไซโลสมากที่สุดถึงร้อยละ 85-90 และส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม กรดแมนนูโรนิก (Mannuronic acid) และกรดกาแลกตูโรนิก (Galacturonic acid) เป็นองค์ประกอบ เฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยกรดหรือเบสเจือจางหรือเอนไซม์ เพราะเฮมิเซลลูโลสไม่มีรูปร่างแน่นอน ไม่เป็นเส้นตรง และมีลำดับของหน่วยย่อยน้ำตาลที่เรียงตัวแบบสุ่ม จึงทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่างไซโลสถูกทำลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ได้ง่าย

2.4.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่พบในผนังเซลล์พืชที่มีความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างร่วมกับเซลลูโลสและพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ลิกนินประกอบด้วยโมเลกุลที่เป็นวงแหวนที่ต่อกันแบบสุ่มเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยภายในโครงสร้างจะเชื่อมกันด้วยพันธะอีเธอร์หรือคาร์บอนระหว่าง 2 โมเลกุล ทำให้ลิกนินทนทานต่อการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์มากกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ ดังนั้นจึงต้องอาศัยสารเคมีในการแยกลิกนินออกจากพอลิแซ็กคาไรด์

2.5 **ยีสต์** (Yeast)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีขนาดเล็กมาก มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Eukaryotic Micro-organisms) มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษ ซึ่งมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์นานมาแล้ว โดยเฉพาะการผลิตอาหารที่มีแอลกอฮอล์ ยีสต์จัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (Fungi) ซึ่งเป็นกลุ่มจำพวกเดียวกับเห็ด รา (Mold) ที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีเซลล์ชนิดยูคาริโอต (Eukariote) มีรูปร่างกลม รูปไข่หรือเหมือนผลเลมอน มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย (Bacteria) มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 5 ไมครอน โดยทั่วไปยีสต์มีความแตกต่างกันจากเชื้อราอื่นอย่างชัดเจนในแง่ของสัณฐานโคโลนี ซึ่งโคโลนีของยีสต์บนอาหารวุ้นจะมีลักษณะคล้ายแบคทีเรีย แต่ทึบแสงกว่าและยีสต์ส่วนใหญ่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งของพลังงานและคาร์บอน

ยีสต์มีการเพิ่มจำนวนหรือการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ส่วนมากเกิดโดยการแตกหน่อและมีส่วนน้อยเกิดโดยการแบ่งแยกเซลล์ การแบ่งชนิดของยีสต์สามารถแบ่งตามลักษณะการขยายพันธุ์ ดังนี้ ยีสต์ที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอย่างเดียว เรียกว่า ดิวเทอโรมัยซีสหรือยีสต์

เทียม ส่วนยีสต์ที่ขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบไม่อาศัยเพศก็ได้และอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ เป็นยีสต์แท้ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม แอสโคมัยซีส (*Ascomycete*) ได้แก่ *Saccharomyces*

ยีสต์มีกระบวนการไกลโคติก 2 กระบวนการ คือ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะใช้กระบวนการเอมบ์เดน เมเยอร์ฮอฟ พาร์นาส (EMP) ได้ถึงร้อยละ 90 (ใน *S. cerevisiae* และ *C. utilis*) ส่วนในสภาพที่มีออกซิเจน นอกจากกระบวนการเอมบ์เดน เมเยอร์ฮอฟ พาร์นาส ใน *S. cerevisiae* จะใช้กระบวนการเฮกโซสมอนฟอสเฟตร้อยละ 6-30 และใน *C. utilis* ร้อยละ 30-50 ในสภาพการหมักที่ไม่มีออกซิเจนน้ำตาลจะเข้าสู่กระบวนการหมักได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ในการหมักให้ได้เอทานอลนี้ไม่ได้เกิดขึ้นในสภาพไม่มีออกซิเจนเท่านั้น อาจเกิดขึ้นได้เมื่อมียีสต์ในน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูง แม้อยู่ในสภาพที่มีออกซิเจน ทั้งนี้เป็นเพราะกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 5 จะยับยั้งการสังเคราะห์เอมไซม์ที่เกี่ยวกับการหายใจ

2.5.1 ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล

การคัดเลือกเชื้อยีสต์สำหรับการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมขึ้นกับชนิดของคาร์โบไฮเดรต การหมักเอทานอลจากน้ำตาลโดยทั่วไป มักจะเหมาะกับเชื้อยีสต์พวก *Saccharomyces* sp. เช่น *S cerevisiae*, *S. ellipsoideus* และ *S. uvarum (carlsbergensis)* นอกจากนั้น เชื้อ *Candida pseudotropicalis* สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลแลคโตสได้ เชื้อ *C. utilis* ใช้หมักน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ เนื่องจากเชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลเพนโตสได้ เชื้อ *Pachysolen tannophilus* และ *Pichia stipitis* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสในการหมักเอทานอลได้ ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักน้ำตาลกลูโคส เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจนเป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมการหมัก คุณสมบัติ คือ เจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโครส มอลโทส กาแลคโตส และราฟฟิโนส เชื้อที่หมักเอทานอลจะสังเกตได้ง่ายจากการเขย่าขวดจะเห็นฟองเกิดขึ้นมาก *Saccharomyces* เป็นเชื้อตัวสำคัญที่ถูกพิจารณาเนื่องจากคุณสมบัติหลายอย่างที่ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ เซลล์ของ *Saccharomyces* มีลักษณะรูปไข่ ทรงกลม หรือค่อนไปทางทรงกระบอก และมีการแบ่งตัวแบบ Multipolar Budding

นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียในจีนัสต่าง ๆ เช่น จีนัส *Zymomonas* คือ *Z. mobilis* และยีนัส *Clostridium* คือ *C. Thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียไม่

ต้องการออกซิเจน สามารถหมักเซลลูโลส และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (คุณากร เชื้อสุวรรณ์, 2548)

2.5.2 ลักษณะของจุลินทรีย์เหมาะสมสำหรับผลิตเอทานอล

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ดีและเหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล มีดังนี้ (ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546)

2.5.2.1 มีอัตราการหมักเอทานอลได้อย่างรวดเร็วและให้ผลผลิตสูงทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง

2.5.2.2 มีความทนทานต่อเอทานอลและสารต่าง ๆ (Ethanol Tolerance) เนื่องจากระหว่างการหมักจะมีเอทานอลบางส่วนสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ยีสต์แตก (Lysis) ได้ ยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงจึงส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

2.5.2.3 ทนอุณหภูมิสูง (Thermotolerance) เพราะในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น มีผลต่อการอยู่รอดและกิจกรรมการทำงานของยีสต์ ยีสต์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

2.5.2.4 ไม่เปลี่ยนง่ายในสภาวะต่าง ๆ ของการหมักและมีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้ประสิทธิภาพและคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ

2.5.2.5 ทนความเป็นกรดหรือทนพีเอสต่ำ (Acid Tolerance) ในกระบวนการหมักจะเกิดกรดทำให้พีเอชของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทนพีเอสต่ำได้จึงช่วยให้มีผลผลิตเอทานอลสูงขึ้น

2.5.2.6 มีความสามารถในการตกตะกอน (Flocculation) ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวและสามารถนำเซลล์ยีสต์กับมาใช้ใหม่ได้

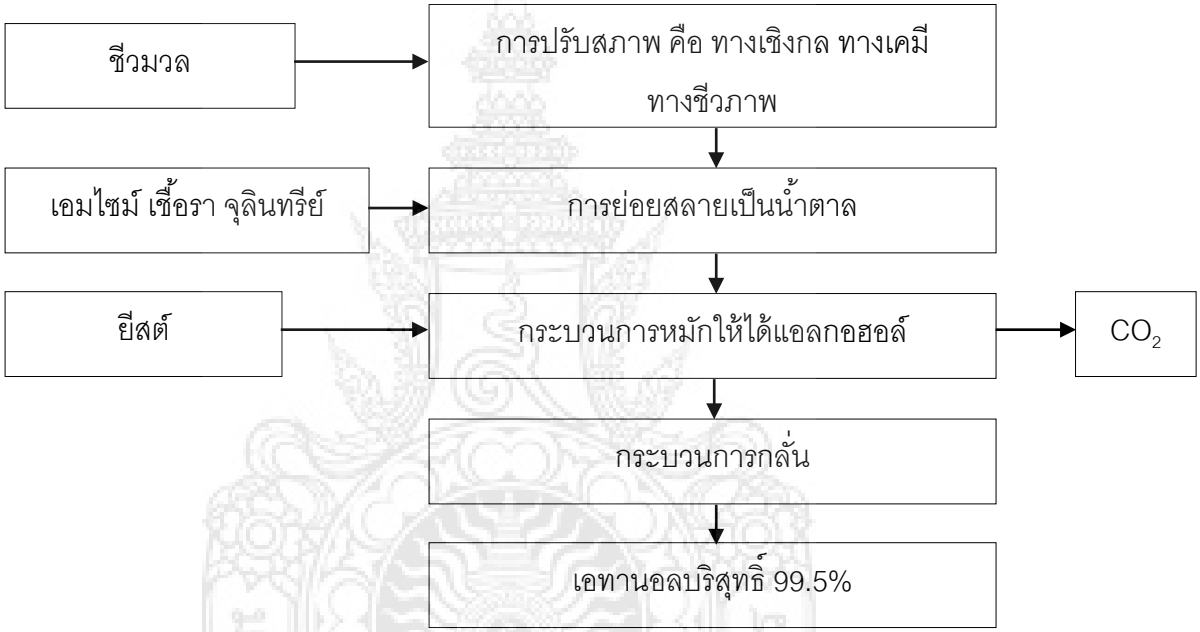
2.5.2.7 ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่าง ๆ ของการหมักและมีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้ประสิทธิภาพและคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ

2.5.2.8 ทนต่อแรงดันออสโมซิส (Osmotolerance) ทำให้สามารถใช้อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูง ๆ และช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทนต่อแรงดัน ออสโมซิส จึงมีผลผลิตเอทานอลมากขึ้น

2.5.2.9 สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายทั้งกลุ่มน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซส

2.6 กระบวนการผลิตเอทานอล

แป้งเป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้น เพื่อเก็บไว้เป็นอาหารสะสมอยู่ในเซลล์ของพืช ส่วนเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช การใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นสับสเตรทมักพบว่า ต้องใช้จุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิด โดยอาศัยกระบวนการเปลี่ยนโพลิเมอร์พวกคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาลและหมักน้ำตาลเป็นเอทานอล ทำให้มีการผลิตเอทานอลได้เร็วและยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย กระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลประเภทคาร์โบไฮเดรตจึงมี 3 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพ การย่อยสลายเป็นน้ำตาลและการหมักให้ได้แอลกอฮอล์ (ณัตติญา จันทวงษา, 2553) ดังภาพ 2.3



ภาพ 2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล

2.6.1 **การปรับสภาพวัตถุดิบ**

กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนที่จะได้เซลลูโลส แบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ การปรับสภาพด้วยวิธีเชิงกล วิธีทางเคมี วิธีทางชีวภาพ

2.6.1.1 กระบวนการปรับสภาพเชิงกล

กระบวนการปรับสภาพเชิงกล เป็นการใช้แรงกลหรือกระบวนการทางกายภาพเพื่อทำความสะอาด ปรับขนาดและทำลายโครงสร้างเซลล์ของวัตถุดิบเพื่อให้ปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีในขั้นต่อไปเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง การตัดหรือการบดขนาดชิ้นวัตถุดิบให้มีขนาดเล็กลงจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว ทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยาเอมไซม์ จุลินทรีย์ทำงานได้ดีขึ้น

2.6.1.2 กระบวนการปรับสภาพทางเคมี

กระบวนการปรับสภาพทางเคมีที่นิยมใช้แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ การใช้กรดอ่อน กรดแก่หรือเบส กระบวนการใช้กรดอ่อนจะใช้กรดเกลือหรือกรดไนตริกเจือจางกระบวนการที่ได้รับความนิยมมากที่สุด คือ การใช้กรดกำมะถันเจือจาง (ร้อยละ 0.5-1.5, 160 องศาเซลเซียส) เนื่องจากในสภาวะนี้จะได้ยีสต์ของเฮมิเซลลูโลสสูงถึงร้อยละ 75-90 ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ การใช้อุณหภูมิที่สูงจะทำให้เกิดสารข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์และเป็นพิษต่อกระบวนการหมักในขั้นตอนต่อไป ถึงแม้ว่าการใช้กรดอ่อนจะมีต้นทุนต่ำแต่การกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นมีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการคิดกระบวนการใหม่โดยเพิ่มความเข้มข้นของกรดที่ใช้และทำให้อุณหภูมิต่ำกว่า ทำให้สามารถลดการเกิดสารพิษลงได้ (รัชนีกร หมวดพล, 2552)

การย่อยด้วยด่างการปรับสภาพสามารถทำได้ด้วยด่างเช่นกันเชื่อกันว่าด่างจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสบู่ของพันธะเอสเตอร์ระหว่างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสกับสารอื่น เช่น ลิกนิน การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้เกิดการแยกตัวของโครงสร้างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางนี้สามารถลดเปอร์เซ็นต์ของลิกนินลงได้ในเนื้อไม้แข็งและส่งผลดีต่อสารจำพวกฟางที่มีปริมาณลิกนินต่ำ แต่ไม่เหมาะกับวัสดุที่มีลิกนินสูง แอมโมเนียมก็สามารถใช้กับลิกนินได้ประสิทธิภาพอยู่ที่ร้อยละ 60-80 สำหรับซังข้าวโพด แม้ว่าการใช้ด่างในการย่อยเซลลูโลสในขั้นต่อไปมีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่วิธีนี้นอกจากต้องใช้เกลือที่มีราคาแพงแล้วยังสร้างของเสียที่เป็นเบสซึ่งยากต่อการกำจัด ทำให้เป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้

การย่อยด้วยโอโซน โดยโอโซนจะทำปฏิกิริยากับลิกนินและเฮมิเซลลูโลสซึ่งไม่ทำให้เซลลูโลสเปลี่ยนแปลง การทดสอบวิธีนี้กับวัสดุหลายชนิด เช่น ฟางข้าวสาลี ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง ขี้เลื่อย แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน โดยไม่สร้างสารยับยั้งและสามารถทำได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ แต่เนื่องจากจำเป็นต้องใช้โอโซนในปริมาณมากทำให้เป็นวิธีที่มีต้นทุนสูง

การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพและเคมี วิธีทางกายภาพอีกวิธีหนึ่ง คือ การใช้น้ำร้อนความดันสูงกว่าจุดอิ่มตัวในการย่อยเฮมิเซลลูโลส ซึ่งการอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปทำให้น้ำร้อนกลายเป็นกรดคาร์บอเนตและใช้ร่วมกับไอน้ำ จะช่วยเพิ่มผลผลิตได้ทั้งยังไม่สร้างสารยับยั้งหรือก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

2.6.1.3 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ

เห็ด รา หลายชนิดสามารถย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้ โดยทั่วไปราสีน้ำตาลจะย่อยเซลลูโลส ส่วนราสีขาวและ Soft Rot จะย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ราขาวจะเป็น

ตัวเลือกที่ดีที่สุด โดยสามารถให้น้ำตาลได้ถึงร้อยละ 35 ในเวลา 5 สัปดาห์ เพื่อป้องกันไม่ให้ราใช้เซลลูโลส จึงมีการพัฒนาราสายพันธุ์ที่ไม่มีเซลลูเลสขึ้น แม้ว่าวิธีทางชีวภาพนี้จะสามารถทำได้ในสภาวะปกติและมีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ว่าการย่อยลิกนินทางชีวภาพต้องอาศัยเวลาที่ยาวนานมากจึงไม่ค่อยเหมาะสมกับการนำมาใช้จริง (ณัตติยา จันทวงษา, 2553)

การปรับสภาพวัตถุดิบ ไม่ว่าจะเป็นวิธีทางเคมีหรือวิธีทางกายภาพ มีข้อแตกต่างระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพ ดังตาราง 2.2

ตาราง 2.2 ข้อแตกต่างระหว่างการปรับสภาพทางเคมีและทางกายภาพ

การปรับสภาพทางเคมี	การปรับสภาพทางกายภาพ
1. มีสารใหม่เกิดขึ้น	1. ไม่มีสารใหม่เกิดขึ้น
2. น้ำหนักเปลี่ยนไป	2. น้ำหนักคงเดิม
3. รูปร่างลักษณะทั่ว ๆ ไป เช่น สถานะ ขนาด สี กลิ่น เปลี่ยนไป	3. รูปร่างลักษณะทั่ว ๆ ไป อาจเปลี่ยนได้
4. มีความร้อนเกิดขึ้นหรือลดลง	4. ไม่มีความร้อนเกิดขึ้น
5. เป็นการเปลี่ยนแปลงอย่างถาวรจะทำให้กลับมาเป็นสภาพเดิม โดยวิธีง่าย ๆ ไม่ได้	5. เป็นการเปลี่ยนแปลงชั่วคราว ทำให้กลับมาเป็นสภาพเดิมได้ง่าย
6. เป็นการเปลี่ยน ซึ่งเกิดขึ้นจากอิเล็กตรอนระหว่างอะตอมของธาตุ	6. ไม่เกิดอิเล็กตรอนระหว่างอะตอมของธาตุ

ที่มา: ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์ (2552)

2.6.2 กระบวนการย่อยน้ำตาลเพื่อให้ได้เอทานอล

กระบวนการนี้เป็นการย่อยเซลลูโลส โดยใช้จุลินทรีย์ ใช้ความเป็นกรด-ด่างหรือใช้เอมไซม์เซลลูเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ถ้าวัตถุดิบผ่านการปรับสภาพแล้วจะได้น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับการไม่ปรับสภาพจะให้น้ำตาลเพียงร้อยละ 20

2.6.2.1 การย่อยด้วยกรด

การย่อยด้วยกรดจะทำต่อจากกระบวนการปรับสภาพ ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถใช้ได้ทั้งกรดอ่อนและกรดแก่ ถ้าใช้กรดแก่จะได้ประสิทธิภาพที่สูงกว่า คือ น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 90 และสามารถใช้กับวัตถุดิบที่หลากหลายกว่า แต่ราคาอุปกรณ์ที่ใช้แพงกว่า การนำกรดกลับมาใช้ใหม่เพื่อลดปริมาณกรดที่ต้องใช้จึงถือเป็นเรื่องสำคัญมาก

2.6.2.2 การย่อยด้วยเอมไซม์

การใช้เอมไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลสมีข้อได้เปรียบการใช้กรดตรงสภาวะการทำงานไม่รุนแรงทำให้มีต้นทุนการบำรุงรักษาต่ำ มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้กับกระบวนการปรับสภาพเกือบทุกชนิด ยกเว้นการปรับสภาพทางกายภาพเพียงอย่างเดียว การใช้เอมไซม์นี้มีศักยภาพสูงที่สุดในระยะยาว เนื่องจากมีต้นทุนที่ต่ำกว่า ประสิทธิภาพของวิธีนี้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนวัตถุดิบต่อเอมไซม์ ถ้าอัตราส่วนเอมไซม์สูงเกินไปจะยับยั้งการทำงานของเอมไซม์ในขณะที่สัดส่วนเอมไซม์ต่ำเกินไปอัตราการเกิดปฏิกิริยาและประสิทธิภาพลดลงตามไปด้วย อัตราการเกิดปฏิกิริยาสามารถทำให้เพิ่มขึ้นโดยการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยการ Desorption ของเอมไซม์หลังเกิดปฏิกิริยา การใช้เอมไซม์หลาย ๆ ชนิดผสมกัน ไม่ว่าจะเป็นเซลลูโลสหลาย ๆ แหล่งหรือผสมเอมไซม์ชนิดอื่นจะทำให้อัตราการย่อยเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (ณัตติยา จันทวงษา, 2553)

2.6.3 กระบวนการหมักเอทานอล

ในทางชีวเคมี การหมัก หมายถึง การสร้างพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวรับและตัวให้อิเล็กตรอนในสภาพไม่มีออกซิเจน ส่วนในทางจุลชีววิทยา การหมัก หมายถึง กระบวนการผลิตใด ๆ ก็ตาม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในจำนวนมาก ซึ่งครอบคลุมทั้งกระบวนการใช้และไม่ใช้ออกซิเจน

การหมักเอทานอลเป็นกรรมวิธีที่รู้จักกันมานาน เนื่องจากปัญหาพลังงานทำให้เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลก้าวหน้าไปอย่างมากมีการค้นคว้าวิจัยหลายแนวทาง ซึ่งปกติเอทานอลสามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติจากจุลินทรีย์หลายชนิด ตั้งแต่แบคทีเรีย รา หรือยีสต์ และเกิดจากสับสเตรทเป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตหรือน้ำตาล การหมักเอทานอลของยีสต์นั้นเกิดจากการที่น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซีสจนได้ไพรูเวต จากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะได้ไพรูเวต 2 โมเลกุล (ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์, 2545) ดังสมการ 2.6

$$(C_6H_{12}O_5)n + nH_2O \xrightarrow{\text{Enzyme}} nC_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{Yeast}} 2nC_6H_{12}OH + 2nCO_2 \qquad (2.6)$$

(แป้ง) (น้ำตาล) (เอทานอล)

180 กรัม 92 กรัม 88 กรัม

จากสมการนี้ให้ผลสรุปทางทฤษฎีได้ว่าคาร์โบไฮเดรตจะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอมไซม์และเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยยีสต์ โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น

คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และเอทานอล 2 โมเลกุล ภายใต้สะภาวะไร้ออกซิเจน ปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีน้ำตาล 1 กรัม ได้เอทานอล 0.511 กิโลกรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.498 กรัม สำหรับในทางปฏิบัติการผลิตเอทานอลเท่ากับร้อยละ 51.1 เนื่องจากน้ำตาลประมาณร้อยละ 6-12 จะถูกยีสต์ใช้เพื่อการเจริญและบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนท เป็นต้น ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎีเสมอ เอทานอลจะอยู่ในช่วงไม่เกินร้อยละ 90-95 ของผลผลิตทางทฤษฎีโดยผลผลิตพลอยได้ที่เกิดขึ้นเกิดจากการที่ใช้สับสเตรทร้อยละ 4-5 และถ้าสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างผลผลิตพลอยได้เหล่านั้น จะได้เอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.7 (ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) ดังตาราง 2.3

ตาราง 2.3 ผลผลิตพลอยได้ที่เกิดจากการใช้สับสเตรทน้ำตาล

ผลผลิตที่ได้จากการหมักเอทานอล	ปริมาณที่เกิด (เปอร์เซ็นต์)
Ethanol	48.40%
carbon dioxide	46.50%
Acetaldehyde	0.00-0.03%
Acetic acid	0.05-0.25%
Glycerol	3.50-3.60%
Lactic acid	0.00-0.20%
Succinic acid	0.50-0.77%
Fusel Oil	0.25-0.50%

ที่มา: ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์ (2545)

การหมักเอทานอลมีวิธีการแตกต่างกันออกไป แต่ทั้งนี้เพื่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอทานอลและหาทางลดต้นทุนการผลิตลงให้มากที่สุด โดยเทคโนโลยีการหมักแบ่ง ดังนี้

2.6.3.1 ประเภทของการหมักแบ่งตามลักษณะของผลผลิต

ประเภทของการหมักแบ่งตามลักษณะของผลผลิต แบ่งเป็น 2 ประเภท

ก) Homofermentation หมายถึง ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักนั้นเป็นสารชนิดเดียวกันหมด เช่น ได้เอทานอลทั้งหมด ดังสมการ 2.7

$$\text{Glucose} \rightarrow 2\text{Ethyl alcohol} + \text{Lactic} + 2CO_2 + 2ATP \qquad (2.7)$$

ข) Heterofermentation หมายถึง ผลผลิตที่ได้จากการหมักเป็นสารหลายชนิด ในกระบวนการหมักของคาร์โบไฮเดรตจะผ่านวิธีไกลโคไลซีสได้กรดไพรูวิคซึ่งจุลินทีย์จะเปลี่ยนกรดไพรูวิคไปเป็นผลิตภัณฑ์ของการหมัก ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของสับเตรทที่ใช้ จุลินทรีย์ และเอมไซม์ที่มีอยู่ (ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์, 2545) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด ดังตาราง 2.4

ตาราง 2.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด

ไกลโคไลซีส	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์สุดท้าย
	Organism	Fermentation End Product
	Streptococcus and *Lactobacillus*	Lactic acid
	Sacchromyces (yeasts)	Ethanol and CO_2
	Propionibacterium	Propionic acid, Acetic acid, CO_2 and H_2O
Pyruvic acid	*Clostridium*	Butyric acid, Butyric, Acetone, Isoproply alcohol and CO_2
	Escherichia Coli and *Salmonella*	Ethanol, Lactic acid, Succinie acid, Acetic acid, CO_2 and H_2O
	Enterobacter	Ethanol, Lactic acid, Formic acid, Butanedinol, CO_2 and H_2O

ที่มา: ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์ (2545)

2.6.3.2 ประเภทของการหมักแบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ

ประเภทของการหมักแบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ แบ่งเป็น 3 ประเภท

ก) Septic Fermentation เป็นกระบวนการหมักสภาพเปิดซึ่งไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกที่อาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักหรือปนเปื้อนเข้ามาระหว่างการหมัก แต่ใช้วิธีการปรับสภาพต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการและไม่เหมาะสมหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

ข) Semi-Septic Fermentation เป็นกระบวนการหมักสภาพปิด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจากภายนอก แต่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่ใช้หมัก แต่จะใช้วิธีการปรับสภาพต่าง ๆ ให้ไม่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในกากน้ำตาลและน้ำที่ใช้หมัก แต่ใช้วิธีปรับพีเอชเป็น 3.5 เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น แต่ยีสต์ที่ใช้ในการหมักต้องสามารถเจริญได้ดี

ค) Aseptic Fermentation เป็นกระบวนการหมักสภาพปิด ที่ต้องมีขั้นตอนการทำให้วัตถุดิบในการหมักปราศจากเชื้อปนเปื้อน และการปนเปื้อนของเชื้ออื่นในระหว่างการหมัก หากมีเชื้อปนเปื้อนอาจส่งผลทำให้เกิดความเสียหายอย่างมาก เช่น การหมักสารปฏิชีวนะ

2.6.3.4 ประเภทของการหมักแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้

ประเภทของการหมักแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ แบ่งเป็น 3 ประเภท

ก) การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch Fermentation)

กระบวนการการหมักแบบไม่ต่อเนื่องหรือการหมักแบบกะ จะมีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ซึ่งมีปริมาณอาหารเริ่มต้นในปริมาณจำกัด และไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เพิ่มลงไปอีก ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่กำหนด ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่เกิดจากการสะสมของเสียที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายจุลินทรีย์ เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปในอาหาร ระยะแรก เซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน ระยะนี้เรียกว่า Lag Phase เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว ระยะเวลาในช่วงนี้จะต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุน โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์มีอัตราการเพิ่มขึ้นตามลำดับ กระทั่งเข้าสู่ระยะ Log Phase ซึ่งจะเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุดและคงที่ การเจริญของจุลินทรีย์ถูกจำกัดไปด้วยสารอาหารและสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเอง ดังนั้นหลังจากจุลินทรีย์เติบโตอย่างรวดเร็วได้ในระยะหนึ่งอัตราการเจริญจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งหยุดการเจริญเติบโต เนื่องจากแหล่งอาหารได้ถูกใช้หมดหรือถูกยับยั้งด้วยสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น (สมใจ ศิริโภค, 2550)

ข) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation)

การหมักแบบต่อเนื่องมีการเติมสารอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกัน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีข้อจำกัด แต่ถ้ามีการถ่ายอาหารเก่าออกจากภาชนะจำนวนหนึ่งต้องเติมอาหารใหม่เข้าไปแทนที่ในปริมาณเท่า

เดิมอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เหมาะสมจะทำให้สภาวะคงที่ ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญหรือเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง (รัชนีกร หมวดพล, 2552)

ค) การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch Fermentation)

การหมักแบบกึ่งกะ เป็นการหมักที่เติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มเติมลงไปในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะ ๆ จนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่าเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก จากการหมักแบบนี้ส่วนใหญ่จะใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่ม ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หรืออาจทำให้มีปัญหาในการใช้ออกซิเจนในปริมาณเพียงพอยาก (พรพจน์ นาราคาม, 2547)

2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล

ปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการหมัก เพื่อให้ประสิทธิภาพหมักสูงสุดและได้ปริมาณเอทานอลสูง จำเป็นต้องมีปัจจัยที่เหมาะสมและองค์ประกอบด้านแวดล้อมอื่น ๆ

2.7.1 ขั้นตอนเกี่ยวกับเชื้อและการเตรียมกล้าเชื้อ

ขั้นตอนเกี่ยวกับเชื้อและการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในการหมักให้ถึงขีดสุดในการหมัก เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความแข็งแรง และอยู่ในระยะที่กำลังเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (วัฒนชัย ภัทรเธียรสกุล, 2553) เพราะถ้าเชื้อไม่ดี อ่อนแอหรือมีแบคทีเรียแปลกปลอมอยู่ตั้งแต่ขั้นนี้ จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อการหมัก ข้อควรคำนึงในขั้นตอนนี้ ได้แก่

2.7.1.1 เลือกใช้ยีสต์สายพันธุ์ดี มีความสำคัญเป็นอันดับแรก เพราะมีหน้าที่ในการหมักโดยตรง

2.7.1.2 เลือกเชื้อบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อแปลกปลอม ถ่ายเชื้อและเก็บรักษาเชื้ออย่างดีไม่ให้เชื้ออื่นลงไปปะปนโดยเด็ดขาด

2.7.1.3 เลือกใช้อาหารที่อุดมสมบูรณ์สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุ และวิตามินต่าง ๆ ครบถ้วน

2.7.1.4 เตรียมกล้าเชื้อโดยกรรมวิธีที่ปราศจากเชื้อ ป้องกันไม่ให้มีเชื้ออื่นปะปนลงไปในการเตรียมกล้าเชื้อทุกขั้นตอน

2.7.1.5 ใช้กล้าเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมไม่น้อยเกินไป การใช้ปริมาณกล้าเชื้อค่อนข้างสูง คือ ร้อยละ 5 ขึ้นไป จะช่วยป้องกันเชื้อแปลกปลอมได้เป็นอย่างดี และอย่างน้อยไม่ควรใช้กล้าเชื้อต่ำกว่าร้อยละ 3

2.7.1.6 ปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ เพื่อให้เซลล์ยีสต์แข็งแรงสมบูรณ์เต็มที่ ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาล ความเป็นกรดด่าง (pH) อุณหภูมิ เป็นต้น

2.7.2 ขั้นตอนการหมักให้ได้เอทานอล

เป็นอีกขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก เพื่อให้จุลินทรีย์ทำงานได้เต็มประสิทธิภาพและปริมาณเอทานอลสูงสุด ซึ่งในกระบวนการนี้มีปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการหมักเอทานอล ดังนี้

2.7.2.1 สายพันธุ์ยีสต์

ปกติยีสต์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญต่ำกว่าแบคทีเรีย ยีสต์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส จนกระทั่งต่อมาพบยีสต์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส และจัดเป็นยีสต์ทนร้อน ความสามารถในการทนร้อนและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของยีสต์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ซึ่งยีสต์ทนร้อนส่วนใหญ่มักพบอยู่ในจีนัส *Saccharomyces* และ *Kluyveromyces* นอกจากนี้ *Fabospora fragilis* CCY51-1-1 (Szczodrak and Targonski, 1988) และ *Candida* (ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) ก็เป็นอีก 2 จีนัส ที่ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้เช่นกัน

Kadam and Schmidt (1997) กล่าวว่า *Candida acidothermophilum* เป็นสายพันธุ์ทนร้อนที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้สารพวกลิกโนเซลลูโลสเป็นสับสเตรทที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณเอทานอลเป็นร้อยละ 80 ของผลได้ทางทฤษฎี นอกจากนี้ *Candida pseudotropicalis* สามารถเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้เช่นกัน ซึ่งลักษณะทั่วไปของยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* และ *Kluyveromyces* มีดังนี้

Saccharomyces พบทั่วไปในดิน และผลไม้ สามารถหมักน้ำตาลได้เร็ว ใช้สับสเตรทได้กว้าง เช่น น้ำตาล Glucose, Sucrose, Fructose, Galactose, Maltose, Xylose, Arabinose และ Sorbitol รวมทั้งสับสเตรท พวกแป้ง (Kiransree *et al.*, 2000) ซึ่งการใช้น้ำตาลเป็นคุณลักษณะหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ในจีนัสนี้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 20-35 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงรวมทั้งความทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลนั้นเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *S. cerevisiae*

สามารถเจริญ ผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส และทนต่อเอทานอลร้อยละ 12 (w/v) ส่วน *S. diastaticus* No.62 เจริญและหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

Kluyveromyces พบทั่วไปในดิน ผลไม้ และวัสดุพวกพืช สามารถหมักน้ำตาลได้เร็วและใช้สับสเตรทได้หลายชนิด ซึ่งยีสต์จีนัสนี้สามารถผลิตเอนไซม์ Lactase มาย่อยน้ำตาลแล็คโตสได้ (ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) *Kluyveromyces* มีความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เช่น *K. marxianus* เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 52 องศาเซลเซียส และหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ *K. fragilis* เจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *K. lactis* เจริญ และผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้แล้วการใช้เทคนิคต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้น เช่น Sridhar *et al*. (2002) นำยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 มาปรับปรุงสายพันธุ์ โดยการฉายรังสี UV พบว่าทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 350 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม

2.7.2.2 ธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามิน

เมื่อพิจารณาถึงผลของธาตุอาหารแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์สามารถแยกออกเป็นพวก ดังนี้

ก) ไนโตรเจน

ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น แต่ในยีสต์บางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่เฉพาะเท่านั้น เพราะกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นตัวควบคุมการทำงานของวิถีไกลโคซีส อย่างไรก็ตามเซลล์ยีสต์เองซึ่งประกอบด้วย Purine, Pyrimidines และกรดอะมิโน ดังนั้นจึงอาจใช้ตัวยีสต์เองเป็นแหล่ง Aminonitrogen เช่น ในการนำน้ำกากส่ากลับมาใช้ละลายกากน้ำตาล (ประมาณร้อยละ 10-30) เราเรียกกระบวนการนี้ว่า Sloppingback ซึ่งนอกจากจะได้ธาตุอาหารแล้ว ยังช่วยเพิ่ม Buffering Capacity และลดปริมาณน้ำที่ต้องใช้ รวมทั้งเป็นการกำจัดน้ำกากส่าทิ้งไปในตัวด้วย หรือโดยการนำเอาเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยสลาย (Lysed Yeast Cell) กลับมาใช้ใหม่ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล นิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นส่วนใหญ่

ข) ฟอสฟอรัส

โดยมากใช้ในรูปเกลือฟอสเฟต ฟอสเฟตมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ไขมันและคาร์โบไฮเดรตและรักษาสภาพของผนังเซลล์ ดังนั้นฟอสเฟตจึงเป็น Ionic Factor ที่สำคัญต่อการหมัก

ค) ซัลเฟอร์

ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักแห้งโดยอยู่ในรูปของเมไธโอนีน (Methionine) แต่เนื่องจากเมไธโอนีนมีราคาแพงมาก ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน

ง) แร่ธาตุต่าง ๆ

แร่ธาตุเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตในการหมักยีสต์ ได้แก่ Macroelements (K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn และ Cl), Microelements (Co, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni และ Va), Inhibitors (Ag, As, Bd, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se และ Te) และวิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ โดยจะควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะวิตามินเป็นสารเริ่มต้น (Precursors) ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ยีสต์ต้องการส่วนใหญ่เป็นไบโอตินและแพนธีโอนิคแอซิด

2.7.2.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมินับว่ามีความสำคัญมากต่อการหมักเอทานอล สำหรับยีสต์ที่ใช้กันอยู่ตามโรงงานทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส และจะทนได้ไปถึง 37 องศาเซลเซียส ถ้าสูงขึ้นไปถึง 40 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่แล้วจะชะงักการเจริญ แม้ว่าการหมักจะดำเนินไปได้ถ้ามีปริมาณยีสต์มากพอ ดังนั้นหลังการหมักไปแล้ว 1-10 ชั่วโมง ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส หลังจาก 10 ชั่วโมง ไปแล้วควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิในช่วง 10 ชั่วโมง สูงกว่า 37 องศาเซลเซียส แล้วอาจเกิดปัญหาแบคทีเรียเจริญขึ้นมามากเกินไป เป็นผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ การควบคุมอุณหภูมิจึงจำเป็นและเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตที่ได้ สำหรับกระบวนการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลสูงร้อยละ 15-20 และให้ได้กลิ่นรสดีจะหมักไม่เกิน 15 องศาเซลเซียส การหมักที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดแอลกอฮอล์หนัก (Fusel Oil) มากขึ้น การลดอุณหภูมิของถังหมักจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น แต่ก็อาจจะคุ้มทุนได้ถ้าสามารถหมักเอทานอลได้ในระดับร้อยละ 9-10 ภายใน 24-36 ชั่วโมง สาเหตุที่อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากกิจกรรมของยีสต์ กล่าวคือในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสจะเกิดความร้อน 149.5 แคลอรี่ต่อกรัมซูโครส หรือในกรณีน้ำตาลกลูโคสจะเกิดพลังงานความร้อนจากการหมัก 140.2 แคลอรี่ต่อกรัมกลูโคส ความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นพลังงานคาย

ความร้อน (Exothermic Energy) จึงทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น ปกติอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลโดยยีสต์จะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ในสภาวะที่มีเอทานอลผลิตออกมาแล้วจะมีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเอทานอลเป็นสำคัญ รวมถึงสายพันธุ์ของยีสต์ด้วย

2.7.2.4 ความเป็นกรดด่าง (pH)

ยีสต์และราเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรดพอสมควร คือในระดับ 3.8-5.5 ถ้า pH ต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้า pH ต่ำถึง 3 หรือต่ำกว่านั้นก็จะไม่เจริญ ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้มี pH ในช่วง 4-4.5 ทั้งนี้นอกจากยีสต์จะเจริญได้ดีที่ระดับ pH ดังกล่าวแล้วยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ด้วย เพราะแบคทีเรียทั่วไปเจริญได้ดีในสภาพที่ pH เป็นกลาง แต่ก็มีแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่เจริญได้ดีในระดับ pH ที่ยีสต์เจริญและมักจะสร้างปัญหาเมื่อแบคทีเรียพวกนี้สร้างกรดขึ้นมามากเกินไปจนยีสต์ทนไม่ได้ ปกติจะใช้กรดซัลฟูริกแบบราคาถูกมาใช้ในการปรับ pH การปรับ pH จะช่วยลดระยะเวลาการต้มให้ความร้อนแก่ถังหมักเพื่อการฆ่าเชื้อ เพราะความร้อนที่อุณหภูมิเท่ากันจะฆ่าแบคทีเรียในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดได้มากกว่าในสภาพที่เป็นกลาง โดยปกติจะใช้อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาทีก็เพียงพอ สำหรับต้มฆ่าเชื้อในถังเตรียมกล้าเชื้อเมื่อปรับ pH ลงมาแล้วให้เป็น 4-4.5 การติดตามวัดค่า pH ในช่วงการหมักนับว่าจำเป็น บ่อยครั้งปัญหาที่เกิดขึ้นเราสามารถคาดคะเนได้ว่าการหมักผิดปกติ โดยการสังเกตอุณหภูมิของถังหมักที่ขึ้นอย่างรวดเร็วควบคู่กับการที่ pH ลดลงอย่างรวดเร็วอย่างผิดปกติโดยที่แอลกอฮอล์ไม่เพิ่มขึ้น เมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนั้นขึ้น บางโรงงานก็แก้ปัญหาโดยการสูบถ่ายไปในถังหมักอื่นที่หมักได้ดีมีแอลกอฮอล์สูงเกินกว่าร้อยละ 5 แล้วและเติมกล้าเชื้อยีสต์เพิ่มควบคู่กันไปก็พอช่วยแก้ปัญหาได้

2.7.2.5 ความเข้มข้นของน้ำตาล

ในกรณีที่สารละลายมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินขีดจำกัดอันหนึ่ง คือ ประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย จะเกิดการรบกวนการเจริญเติบโตของยีสต์ทำให้เติบโตได้ยาก การหมักจะเป็นไปอย่างเชื่องช้าและไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดกรดแลคติก กรดน้ำส้มและสารอินทรีย์ต่าง ๆ ขึ้นได้ ซึ่งส่วนมากจะเกิดในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยปกติแล้วกระบวนการหมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไม่เกินร้อยละ 18 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย เพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปโดยปกติและได้เอทานอลในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่น คือ ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ถ้าน้ำตาลเป็นแบบโมเลกุลเล็ก ๆ เช่น

กลูโคส ฟรักโทส แล้ว การหมักจะเกิดได้เร็วกว่าพวกที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ เช่น ซูโครส มัลโตส ทั้งนี้เพราะว่ายีสต์สามารถนำน้ำตาลโมเลกุลเล็กไปใช้ได้ทันที

2.7.2.6 ความเข้มข้นของเอทานอล

ในกรณีที่ความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นถึงขีดจำกัดอันหนึ่ง คือ ประมาณร้อยละ 15 โดยปริมาตร (ขีดจำกัดนี้อาจสูงหรือต่ำกว่านี้ขึ้นกับชนิดของยีสต์ แต่เท่าที่พบจะสูงไม่เกินร้อยละ 18 โดยปริมาตร) ปริมาณของเอทานอลที่สูงนี้จะขัดขวางหรือหยุดยั้งการทำงานของยีสต์ (End Product Inhibition) การหมักจะหยุดชะงัก แม้จะยังคงมีน้ำตาลเหลืออยู่ในน้ำหมักในปริมาณเท่าใดก็ตาม ซึ่งถือว่าเป็นข้อจำกัดสำหรับอุตสาหกรรมการหมัก เช่น ไวน์ เบียร์ เหล้า สาเก เป็นต้น ดังนั้นเครื่องดื่มที่ต้องการปริมาณแอลกอฮอล์สูงจึงต้องนำไปผ่านกระบวนการกลั่นภายหลังจากผ่านกระบวนการหมัก

2.7.2.7 คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน

คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของยีสต์จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบ ความดันในถังหมักจะสูงขึ้น ซึ่งถ้าสูงขึ้นจนถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลง จนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

2.7.2.8 ออกซิเจน

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ทั้งนี้นอกจากออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและเป็นองค์ประกอบของไซโตรโครมในกระบวนการลูกโซ่หายใจแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันพันธะคู่และสเตอรอลของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งช่วยให้ยีสต์ทนต่อความเป็นพิษของเอทานอลได้มากขึ้น แต่กระบวนการผลิตเอทานอลต้องการออกซิเจนในปริมาณไม่มากนัก ออกซิเจนจะถูกใช้ในการเจริญเติบโตและการแตกหน่อ (Budding) ในกระบวนการหายใจ เพื่อทำให้เกิดพลังงานในการดำรงชีพ ซึ่งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของยีสต์ในที่มีออกซิเจนจะไม่ให้เอทานอลออกมาแต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้น

ในสภาพไม่มีออกซิเจน น้ำตาลจะเข้ากระบวนการหมักได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนในสภาพที่มีออกซิเจน จะเกิดเอทานอลได้ ก็ต่อเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสความปริมาณเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 5 เนื่องจากจะยับยั้งการสังเคราะห์เอมไซม์ที่เกี่ยวกับการหายใจ

2.7.2.9 กรดน้ำส้มหรือกรดแอซิติก

กรดน้ำส้มมีผลทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์ชะงัก ความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญ คือ ร้อยละ 0.1-0.5 ถ้ามี Propionic acid และ Butyric acid เกิดขึ้นด้วยก็มีผลเช่นเดียวกันกับกรดน้ำส้ม โดยกรดน้ำส้มเกิดจากแบคทีเรียซึ่งเป็นพวกต้องการออกซิเจน (Aerobacter) ซึ่งในบางครั้งกรดน้ำส้มจะทำให้เซลล์ของยีสต์แตกได้

2.7.2.10 Growth Factor

Growth Factor คือ สารที่มีฤทธิ์ที่กระตุ้นเซลล์ต่าง ๆ ให้มีการเจริญเติบโต ซึ่งนอกจากน้ำตาลแล้วยีสต์ยังต้องการสารประกอบอื่น เพื่อการเจริญเติบโตและการแตกหน่อเพิ่มจำนวน สารเหล่านี้ได้แก่ Vitamin B-complex เช่น Biotin, Thiamine, Riboflavin, Nicotinic acid และ Panthothenic acid หน้าที่ของ Thiamine Phosphate เป็นองค์ประกอบร่วมในการเปลี่ยน Pyruvic acid ให้กลายเป็นเอทานอล (รัชนีกร หมวดพล, 2552)

2.7.3 ขั้นตอนการกลั่นให้ได้เอทานอล

กำหนดระยะเวลากลั่นที่เหมาะสม ควรทำการกลั่นทันทีที่ยีสต์ใช้น้ำตาลหมดและได้แอลกอฮอล์สูงสุดแล้วไม่ควรทิ้งข้ามวัน เพราะแบคทีเรียจะเจริญมากขึ้นและสร้างกรด ทำให้ความเป็นกรดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด กลิ่นที่ไม่ดีก็เพิ่มมากขึ้นและยีสต์หรือแบคทีเรียจะหันมาใช้แอลกอฮอล์แทนน้ำตาล ทำให้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ลดลง ผลผลิตที่ควรจะได้ก็ลดน้อยลง

2.8 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์

การผลิตเอทานอลประกอบด้วยกระบวนการเตรียมวัตถุดิบสำหรับหมัก กระบวนการหมักและการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์หรือการกลั่นเอทานอล ซึ่งในขั้นตอนการกลั่นเอทานอลนั้นจำเป็นต้องใช้เครื่องมือในการการกลั่นที่มีประสิทธิภาพ เพื่อปริมาณและประสิทธิภาพเอทานอลสูงสุด

2.8.1 ทฤษฎีการกลั่น

พื้นฐานหลักของการกลั่นเป็นการแยกสารละลายที่เป็นของเหลวออกจากของผสมโดยอาศัยหลักการระเหยกลายเป็นไอแล้วนำไปควบแน่น โดยอาศัยหลักการที่สารบริสุทธิ์แต่ละชนิดเปลี่ยนสะถานะที่ได้อุณหภูมิจำเพาะต่างกัน สารที่มีจุดเดือดต่ำจะเดือดเป็นไอออกมาก่อน ส่วนของเหลวที่มีจุดเดือดสูงขึ้นจะกลั่นแยกออกมาทีหลังและเมื่อทำให้ไอของสารมีอุณหภูมิต่ำลงจะควบแน่นออกมาเป็นของเหลวอีกครั้ง

2.8.2 การทำให้เอทานอลบริสุทธิ์

ขั้นตอนนี้เป็นการกลั่นเพื่อผลิตเอทานอลและทำให้บริสุทธิ์ เอทานอลใช้เป็นเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอล์) นั้นจะต้องทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคหรือเทคโนโลยีในการกลั่นเพื่อแยกน้ำให้ได้เอทานอลที่บริสุทธิ์

ปัญหาหลักของการนำเอทานอลมาใช้แทนน้ำมัน คือ การกำจัดน้ำออกจากเอทานอลหรือการผลิตเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์ได้สูงถึงอย่างน้อยร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร เนื่องจากเอทานอลที่มีน้ำในปริมาณมากกว่าร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นองค์ประกอบจะส่งผลกระทบต่อเครื่องยนต์และทำให้เครื่องยนต์ได้รับความเสียหายได้ นอกจากนี้เอทานอลที่ได้จากการหมักมีความบริสุทธิ์เพียงประมาณร้อยละ 12 โดยปริมาตร ส่วนมากจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในปัจจุบันการกำจัดน้ำออกจากเอทานอลจะใช้วิธีการกลั่น เพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์สูงแต่ปัญหาใหญ่ที่พบ คือ การแยกออกจากกันไม่ได้ของน้ำและเอทานอลที่อัตราส่วนเอทานอลกับน้ำที่ 95:5 โดยน้ำหนัก ณ จุดนี้เรียกว่า จุดอะซีโอโทรป (Azeotropic Point) เป็นจุดที่ไม่สามารถกำจัดน้ำออกจากเอทานอลได้มากกว่านี้ถ้าใช้กระบวนการกลั่นแบบธรรมดา ดังนั้นจำเป็นต้องใช้กระบวนการอื่นมาช่วยในการผลิตเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์สูงถึงร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร กระบวนการที่ใช้ในการผลิตเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์เท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตรนั้น มีด้วยกัน 6 วิธี ได้แก่ (สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ และ เดโช ขุนนคร, 2555)

2.8.2.1 กระบวนการกลั่นอะซีโอโทรป (Azeotropic Distillation)

วิธีนี้สามารถทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์สูงโดยการเติมสารประกอบที่ 3 เพื่อทำให้น้ำแยกออกจากเอทานอลได้ดียิ่งขึ้น สารประกอบนี้เรียกว่า เอ็นเทรเนอร์ (Entrainer) ได้แก่ ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) หรือเบนซีน (Benzene) ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้พลังงานมหาศาลในการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์มาก ๆ และสารที่ใช้เป็น Entrainer เป็นสารมีพิษ บางตัวเป็นสารก่อโรคมะเร็งอีกด้วย (กฤษณะ แก้วมณี, 2549)

2.8.2.2 การดูดซับ (Adsorption)

การดูดซับ โดยใช้ Molecular Sieve Dehydrator ซึ่งเป็นสารจำพวก Zeolite ที่เป็นตัวดูดความชื้นของอากาศดูดซับน้ำออกจากเอทานอลที่ได้จากการกลั่น

2.8.2.3 กระบวนการดูดซับด้วยโมเลกุลาซีฟ (Molecular Sieve)

โดยที่โมเลกุลาซีฟนี้ สามารถดูดน้ำในสภาวะที่เย็นและคายน้ำออกเมื่อได้รับความร้อน แต่เทคโนโลยีนี้มีข้อเสียตรงที่อัตราการสึกกร่อนของ Molecular Sieve ค่อนข้างสูง ทำให้ค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตค่อนข้างสูง

2.8.2.4 กระบวนการแยกโดยเทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง (Membrane Technology)

กระบวนการแยกโดยเทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง เป็นเทคโนโลยีใหม่ล่าสุด เป็นเทคโนโลยีที่ง่ายและใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ โดยการแยกสารละลายผสมผ่านเยื่อแผ่นบาง (Membrane) ใช้เทคนิคการซึมผ่าน (Permeation) ของน้ำผ่านแผ่นเยื่อบางในรูปของไอน้ำด้วยแรงดึงดูดจากภายนอกที่มีความดันต่ำกว่า โดยแผ่นเยื้อบางต้องมีสมบัติในการยอมให้โมเลกุลน้ำผ่านได้ดีกว่าโมเลกุลเอทานอล การแยกน้ำออกจากเอทานอลจึงเกิดขึ้นได้

2.8.2.5 กระบวนการกลั่นแบบหม้อต้ม

กระบวนการกลั่นแบบหม้อต้ม เป็นกระบวนการกลั่นอย่างง่ายเป็นแบบที่ใช้กันทั่วไป หลักการ คือ เป็นกระบวนการเปลี่ยนของเหลวให้เป็นไอโดยใช้ความร้อนแล้วทำให้ไอควบแน่นกลับเป็นของเหลวอีก ใช้ในการทำให้ของเหลวบริสุทธิ์หรือใช้แยกของเหลวชนิดหนึ่งออกจากของเหลวอื่น ๆ ได้ โดยหม้อต้มจะให้ความร้อนแบบไอน้ำจากไฟฟ้าหรือก๊าซหุงต้ม ทำให้น้ำหมักร้อนขึ้นและเกิดระเหยขึ้นไป ส่งผ่านคอหงส์ไปยังคอนเดนเซอร์ควบแน่นให้เป็นของเหลว

2.8.2.6 การกลั่นลำดับส่วน

การกลั่นลำดับส่วนเป็นการแยกตัวถูกละลายและตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่างกันเล็กน้อย (น้อยกว่า 80 องศาเซลเซียส) โดยจะมีคอลัมน์บรรจุแก้วหรือที่รู้จักกันว่า หอกลั่นเพิ่มขึ้นมา ซึ่งหอกลั่นนี้จะทำหน้าที่ให้สารระเหยออกมาได้ช้าลง โดยหอกลั่นยิ่งสูงสารที่ออกมาก็จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น แต่ก็ทำให้ต้องเสียเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นด้วย (ปรียารัตน์ โยวะผุย, 2550)

2.9 ประโยชน์ของเอทานอล

ปัจจุบันเอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านพลังงานและใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตสินค้าได้หลายอย่างด้วยกัน ดังนี้

2.9.1 ด้านพลังงาน

2.9.1.1 เอทานอลสามารถใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง โดยผสมเอทานอลกับน้ำมันดีเซลเรียกว่า ดีโซฮอล์ และผสมเอทานอลกับน้ำมันเบนซีน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ เช่น แก๊สโซฮอล์ E10 แก๊สโซฮอล์ E20 แก๊สโซฮอล์ E85 หรือใช้กับเครื่องยนต์โดยตรงซึ่งใช้กับเครื่องยนต์ที่มีแรงอัดสูง

2.9.1.2 ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซีนทดแทนสาร MTBE ซึ่งพบว่าเป็นสารที่มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

2.9.2 ด้านอุตสาหกรรม

2.9.2.1 เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์สารเคมี พวกอีเทอร์ เอทีลีน

2.9.2.2 เป็นสารช่วยในการเจือจางและตัวทำละลายนำมาใช้อุตสาหกรรมการผลิตสี เช่น น้ำยาเคลือบ น้ำมันชักเงา น้ำยาแลกเกอร์

2.9.2.3 ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา กระบวนการสกัดสารอื่น ๆ ในสมุนไพรและการทำให้บริสุทธิ์ ใช้เป็นส่วนประกอบในการผสมยาใช้เป็นตัวทำละลายเวชภัณฑ์ที่มีอำนาจในการฆ่าตัวแมลง ฆ่าเชื้อโรค ฆ่าเชื้อเชื้อราและน้ำยาดับกลิ่น

2.9.2.4 ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้

2.9.2.5 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นส่วนประกอบในการผลิตเครื่องสำอาง เช่น น้ำหอม แชมพูยาสระผมและน้ำยาบำรุงผิว

2.9.2.6 อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ๆ เช่น ไวน์ สุรา เบียร์ สาเก บรั่นดี วอดก้า วิสกี้ เป็นต้น

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของขนุนโดยเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ขนาดกลาง กิจกรรมที่จำเป็นและสำคัญอย่างยิ่งในการวิจัย คือ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพราะจะช่วยให้ผู้วิจัยเข้าใจทฤษฎี แนวคิด และการศึกษาผลงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้วิจัยเกี่ยวกับแนวทางในการดำเนินการวิจัยให้มีคุณภาพและช่วยให้ทำการวิจัยสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

2.10.1 วัตถุดิบประเภทแป้ง

ณัตติยา จันทวงษา (2553) ได้ทำการพัฒนาการแปรรูปเปลือกทุเรียนและผลกล้วยน้ำว้าเป็นน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอล โดยการทำให้เป็นน้ำตาลแยกจากการหมัก (SHF) และการทำให้เป็นน้ำตาลพร้อมหมัก (SSF) ใช้ยีสต์ผสม *S. cerevisiae* 5221 และ *C. tropicalis* 5048 ในอัตราส่วน 1:2 ปริมาณเปลือกทุเรียนร้อยละ 1.5 และปริมาณผลกล้วยร้อยละ 0.75 พบว่าการใช้เปลือกทุเรียนร้อยละ 1.5 ทำเป็นน้ำตาลพร้อมหมัก (SSF) เวลานาน 16-20 ชั่วโมง ได้เอทานอลสูงสุดที่ 5.27 กรัมต่อลิตร และการทำให้เป็นน้ำตาลแยกจากการหมัก (SHF) เวลานาน 48 ชั่วโมง ได้เอทานอลสูงสุดที่ 4.50 กรัมต่อลิตร และพบว่าปริมาณผลกล้วยร้อยละ 0.75 ทำให้เป็นน้ำตาลพร้อมหมัก (SSF) ได้เอทานอลสูงสุดที่ 9.12 กรัมต่อลิตร และการทำให้เป็นน้ำตาลแยกจากการหมัก (SHF) ได้เอทานอลสูงสุดที่ 6.77 กรัมต่อลิตร ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าผลกล้วยให้ผลผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงจากกระบวนการหมักนี้

บัญชา โลหรัตน์, สินินาฏ จงคง และผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์ (2554) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเม็ดขนุนสดเปรียบเทียบกับเมล็ดขนุนที่ผ่านกระบวนการสกัดพรีไบโอติกส์แล้ว โดยการทดลองจะเริ่มด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักด้วยเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก โดยทำการทดลองในชุดขวดมีปัจจัยสำคัญที่ศึกษา คือ ปริมาณลูกแป้งร้อยละ 1-6 โดยน้ำหนัก เวลาในการหมัก 1-10 วัน ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยอัตราการเขย่า 60 รอบต่อนาที พบว่าสภาวะที่ผลิตเอทานอลจากเมล็ดขนุนที่ผ่านการสกัดพรีไบโอติกส์ความบริสุทธิ์สูงสุดที่ร้อยละ 14.6 โดยปริมาตร ด้วยการใช้ลูกแป้งร้อยละ 4 หมักเป็นเวลา 6 วัน และเอทานอลจากเมล็ดขนุนสดอยู่ที่ร้อยละ 9.6 ใช้เวลาการหมัก 4 วัน และในขั้นตอนสุดท้าย คือ กระบวนการเพิ่มความบริสุทธิ์ผลผลิตด้วยการกลั่นเป็นร้อยละ 95 โดยปริมาตร

ปรียารัตน์ โยวะผุย (2550) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากและเปลือกมันสำปะหลัง ด้วยวิธีการแปรรูปเป็นน้ำตาลก่อนกระบวนการหมัก (Separated Hydrolysis and Fermentation หรือ SHF) โดยใช้ความเข้มข้นแป้งร้อยละ 0.25 หมักยีสต์ *S. cerevisiae* อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ได้เอทานอล 0.89 กรัมต่อลิตร และหมักยีสต์ผสม *S. cerevisiae* และ *C. tropicalis* อัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ได้เอทานอล 0.70 และ 0.64 กรัมต่อลิตร

วรายุทธ เนติกานต์ และนพพล เล็กสวัสดิ์ (2552) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากสารผสมระหว่างกากของแข็งที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องและกากน้ำตาล ที่ปริมาณร้อยละ 7.5 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีแหล่งอาหารคาร์บอนเป็นเศษเมล็ดข้าวโพดบดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและผสมกับกากน้ำตาล (Molasses) เพื่อให้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ในสภาวะตั้งนิ่งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* 5020 และ 5606 สามารถใช้น้ำตาลทั้งหมดจนเหลือระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร ได้ภายใน 48 ชั่วโมง พร้อมกับผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นเฉลี่ย 56.5 และ 49.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ตรวจพบกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก 6 ชนิด ได้แก่ กรดซักซินิก กรดฟอร์มิก กรดซิตริก กรดอะซิติก กรดโพรไพโอนิก และกรดแลกติก ซึ่งกรดอินทรีย์ชนิดสุดท้ายมีระดับการผลิตสูงสุดที่ 12.95 กรัมต่อลิตร

2.10.2 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

กนกวรรณ รวมชัย และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากลำไยอบแห้งคุณภาพต่ำ โดยใช้เครื่องอีบูลิโอมิเตอร์ พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.82-5.67 และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* Fermivin PDM ซึ่งผลิตเอทานอลสูงสุดที่ร้อยละ 9.84

พรพจน์ นาราคาม และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกและแกนสับปะรด น้ำบีบสดจากเปลือกและแกนสับปะรดทิ้งไว้ 1 สัปดาห์และเปลือกและแกนสับปะรดที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซีสไม่พบปริมาณเอทานอล โดยการหมักแบบกะ โดยวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยเครื่อง Gas Chromatography พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของจำนวนเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เริ่มต้นที่ร้อยละ 5 และค่าพีเอชอยู่ที่ 4 และผลิตเอทานอลสูงสุดร้อยละ 1.58 โดยปริมาตรสำหรับน้ำบีบสดจากเปลือกและแกนสับปะรดและร้อยละ 1.40 โดยปริมาตรสำหรับน้ำบีบจากเปลือกสับปะรดและแกนสับประลด ส่วนเปลือกและแกนสับปะรดที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซีสไม่พบปริมาณเอทานอล

2.10.3 วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส

ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์ (2552) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากปาล์มในปริมาณร้อยละ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 4.5-5.0 พบว่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดปริมาณร้อยละ 2.43 ต่อปริมาตร ในเวลา-48-ชั่วโมง และพบกรดแอซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวไทริกมีผลทำให้มีการเจริญของยีสต์ชะงัก

วนิดา ปานอุทัย และคณะ (2553) ได้ทำการผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสด้วยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน พบว่าการใช้ปริมาณเยื้อไม้ยูคาลิปตัสร้อยละ 10 น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ การสกัดด้วยน้ำและด่างตามด้วยการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณเอทานอล 28.47 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมงของการหมักและได้ยีสต์ของเอทานอลสูงถึงร้อยละ 79.01 เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเยื่อและอุณหภูมิส่งผลให้มีปริมาณเอทานอลสูงขึ้น

สมถวิล พรอินทร์ (2551) ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของ *Candida shehatae* TISTR 5843 จากไซโลสและกลูโคส โดยใช้วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส พบว่าการผลิตเอทานอลจากไซโลสเริ่มต้นที่ 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร น้ำตาลถูกใช้ไปเกือบสมบูรณ์และมีการ

ผลิตเอทานอล 8.7, 16.1 และ 21.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ที่ 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ไซโลสถูกใช้ไปเพียง 70 กรัมต่อลิตร และผลิตเอทานอลได้ค่าใกล้เคียงกัน โดยแนวโน้มไม่เกิน 26 กรัมต่อลิตร ซึ่งคาดว่าเอทานอลที่ผลิตมีผลยับยั้งการใช้ไซโลสของเซลล์ ส่วนการผลิตเอทานอลจากกลูโคส พบว่า กลูโคสถูกใช้อย่างสมบูรณ์ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร โดยได้เอทานอลที่ผลิตได้ คือ 10.3 11.3 และ 27.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งสัมพันธ์กับน้ำตาลที่ใช้ไป แต่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 80 และ 100 กรัมต่อลิตร กลูโคสถูกใช้ไปประมาณ 30 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตเอทานอล 12.33 และ 12.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 กับยีสต์ *S. cerevisiae* NP 01 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงพบว่าความสามารถในการผลิตเอทานอลจากกลูโคสของยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 นั้น ด้อยกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* NP 01 จึงอาจใช้ *C. shehatae* TISTR 5843 ในการผลิตเอทานอลจากไซโลสเท่านั้น

2.10.4 การกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์

ณัฐกานต์ ยิ้มวารี และดร.กิตติชัย ไตรรัตนศิริชัย (2554) ได้ทำการกลั่นเอทานอลจากวัตถุดิบข้าวฟ่างหวานด้วยกระบวนการรีฟลักซ์ ทีมงานได้ศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอทานอลตั้งต้นและอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการกลั่นเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์สูง โดยทำกระบวนการกลั่นมีการกลั่น 4 ขั้นตอน แบบรีฟลักซ์ (Reflux Distillation) ขนาดเครื่องกลั่น 20 ลิตร ให้ความร้อนผ่านฮิตเตอร์ (Heater) ภายในเครื่องกลั่นเพื่อต้มสารละลายเอทานอลใช้อุณหภูมิในการกลั่น 90-93 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปกลั่นซ้ำครั้งที่ 2 โดยปริมาตรใช้อุณหภูมิในการกลั่น 79-80 องศาเซลเซียส นำไปกลั่นซ้ำครั้งที่ 3 ใช้อุณหภูมิในการกลั่น 76-77 องศาเซลเซียส และนำไปกลั่นซ้ำครั้งที่ 4 ใช้อุณหภูมิในการกลั่น 76 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณเอทานอลที่ความเข้มข้น 10.0 58.0 85.0 90 92.3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ตามลำดับ

จิระเดช ฮายุกต์ และวิทยา เทพไพฑูรย์ (2555) ได้ศึกษาการแยกของผสมเอทานอลน้ำ โดยกระบวนการดูดซับในสภาวะก๊าซด้วย Molecular Sieve ชนิด 4A จากการกลั่น พบว่า Molecular Sieve ชนิด 4A สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 99.5 โดยน้ำหนัก ความเร็วการไหลของไอผสมผ่านคอลัมน์ดูดซับที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า Breakthrough Time (tb) ลดลง, ค่า Length of Unused Bed (LUB) และค่า Length of Mass Transfer Zone (LMTZ) จะมีค่าสูงขึ้น และความเร็วการไหลของไอผสมผ่านคอลัมน์ดูดซับไม่มีผลต่อค่าความจุใน

การดูดซับน้ำของ Molecular Sieve ผลครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการขยายขนาดคอลัมน์ดูดซับเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการ

3.1 รูปแบบการศึกษา

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลจากส่วนเหลือทิ้งของขนุน ให้ได้เอทานอลปริมาณสูงสุด วัตถุดิบที่ใช้ คือ ส่วนเหลือทิ้งของขนุน ซึ่งได้แก่ ซัง แกน และเปลือกของขนุน โดยศึกษาการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มสายพันธุ์ เพื่อการผลิตเอทานอลให้ได้คุณภาพและปริมาณสูงสุด

3.2 วัตถุดิบ สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.2.1 วัตถุดิบ

3.2.1.1 ส่วนเหลือทิ้งของขนุน ได้แก่ ซัง แกน และเปลือกขนุน ดังภาพ 3.1-3.3

ภาพ 3.1 ลักษณะซังของขนุน

ภาพ 3.2 ลักษณะแกนของขนุน

ภาพ 3.3 ลักษณะเปลือกของขนุน

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 สารละลายเบเนดิกซ์ (Benedict's Solution)

3.2.2.2 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)

3.2.2.3 น้ำตาลทราย (Table Sugar)

3.2.3 อุปกรณ์

3.2.3.1 ขวดกล้าเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด

3.2.3.2 ขวดหมักขนาดเล็ก ขนาด 2 ลิตร จำนวน 5 ขวด

3.2.3.3 ถังหมักขนาดกลาง ขนาด 50 ลิตร จำนวน 2 ถัง

3.2.3.4 แผ่นสไลด์ (Slides)

3.2.3.5 กระจกปิดสไลด์ (Cover Slide)

3.2.3.6 หลอดทดลอง (Test Tube)

3.2.3.7 กระบอกตวง (Cylinder)

3.2.3.8 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.2.3.9 สำลี (Flannel)

3.2.3.10 ผ้าขาวบาง (Filter Cloth)

3.2.3.11 ถังพลาสติก (Plastic Buckets)

3.2.4 เครื่องมือ

3.2.4.1 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) ยี่ห้อ KERN รุ่น ALS 120-4N

3.2.4.2 เครื่องวัดปริมาณน้ำตาล (Hand Refractometer) รุ่น RHB-32ATC

3.2.4.3 เครื่องวัดเอทานอล (Vino-o-Meter)

3.2.4.4 เตาไฟฟ้าสำหรับให้ความร้อน (Hot Plate)

3.2.4.5 กล้องจุลทรรศน์ (Bright Field Microscope) ยี่ห้อ Aotic รุ่น BA 200

3.2.4.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
ยี่ห้อ Biochrom รุ่น Libra S32

3.2.4.7 หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (Autoclave) ยี่ห้อ All American รุ่น No. 75X

3.2.4.8 เครื่องกลั่นเอทานอล

3.2.5 จุลินทรีย์

3.2.5.1 เชื้อธรรมชาติ จากส่วนเหลือทิ้งขนุนผ่านการแช่น้ำ 2 วัน

3.2.5.2 เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก

3.2.5.3 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ EDV 492

3.2.5.4 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ EC 118

3.3 แนวทางการวิจัย

3.3.1 ขั้นเตรียมการ

3.3.1.1 ศึกษาความเป็นไปได้และรวบรวมความคิดของเรื่องที่จะทำการศึกษาโดยศึกษา ค้นคว้าข้อมูลจากหนังสือ เอกสาร ตลอดจนปรึกษาสอบถามกับบุคคลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง

3.3.1.2 ตั้งกรอบและเขียนแนวคิด เพื่อช่วยนำทางสู่การศึกษาในขั้นต่อไปได้ชัดเจน

3.3.1.3 ตั้งกรอบการศึกษา ซึ่งอยู่ในขอบเขตของกรอบแนวคิด

3.3.1.4 กำหนดพื้นที่การศึกษา คือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร (ศูนย์เทเวศร์) ตั้งอยู่เลขที่ 399 ถนนสามเสน แขวงวชิรพยาบาล เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300

เหตุผลที่เลือก ส่วนเหลือทิ้งของขนุนเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากขนุนเป็นผลไม้ประจำฤดูกาลที่มีอยู่มากในประเทศไทย ซึ่งนิยมรับประทานเฉพาะเนื้อและส่วนอื่น ๆ ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีก จากข้อมูลส่วนประกอบทางเคมีของขนุนพบว่า ขนุนมีคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 23.70-29.20 (วีระพงศ์ พรสมิทธิกุล, 2552) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ประกอบกับปัญหาด้านพลังงานผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำส่วนเหลือทิ้งของขนุนมาใช้หมักเอทานอล เพื่อเป็นทางหนึ่งในการแก้ปัญหาด้านพลังงาน

เหตุผลที่เลือกนำเชื้อธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 มาใช้ในการวิจัยเชิงทดลองหมักเอทานอล เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลที่ต่างกันไป เชื้อธรรมชาติเป็นเชื้อจากส่วนเหลือทิ้งขนุนที่ผ่านการแช่น้ำมา 2 วัน เชื้อจุลินทรีย์แป้งข้าวหมากเป็นเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากที่ผ่านการหมักแล้วทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้ดี เนื่องจากมีจุลินทรีย์ที่หลากหลาย เช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรีย เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 เป็นเชื้อที่มีขายใน

ตลาดและนิยมใช้หมักเอทานอล เนื่องจากมีคุณสมบัติทนความเข้มข้นของเอทานอล ดังนั้นเชื้อแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไปผู้วิจัยจึงต้องการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดในวัตถุดิบที่เป็นส่วนเหลือทิ้งของขนุน

3.3.2 **การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์**

1. เตรียมอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ โดยเติมโมลาสต่อน้ำกลั่น 15:50 มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ในน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน ปริมาณ 350 มิลลิลิตร หมักในภาชนะขนาด 500 มิลลิลิตร

2. ใส่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

- ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์
- เชื้อธรรมชาติ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร
- เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก ปริมาณ 2 มิลลิลิตร
- เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ปริมาณ 0.5 กรัม
- เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ปริมาณ 0.5 กรัม ตามลำดับ ดังภาพ 3.4

3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล โดยเก็บตัวอย่างทุก 5 วัน

4. หมักให้จุลินทรีย์อยู่ในระยะการเจริญอย่างต่อเนื่อง โดยสังเกตจากปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นและปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง เพื่อเตรียมใช้ในการหมักขนาดเล็กต่อไป

ภาพ 3.4 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 ตามลำดับ

3.3.3 การหมักขนาดเล็ก (ขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม)

การหมักขนาดเล็ก เป็นขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเอทานอล เพื่อใช้หมักเอทานอลในถังหมักขนาดกลางต่อไป

1. เตรียมอาหารสำหรับการหมักขนาดเล็ก โดยหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนขนาด 1 ลิตร หมักในภาชนะขนาด 2 ลิตร ซึ่งการหมักแบ่งเป็น 2 ชุดการทดสอบ

ชุดที่ 1 คือ ส่วนเหลือทิ้งของขนุนสับละเอียดต้ม

ชุดที่ 2 คือ ส่วนเหลือทิ้งของขนุนสับละเอียดที่ไม่ต้ม ดังภาพ 3.5

ภาพ 3.5 การหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนสับละเอียดที่ผ่านการต้มและไม่ต้ม

2. นำกล้าเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในขวดหมักขนาดเล็ก (ทั้งส่วนเหลือทิ้งของขนุนสับละเอียดที่ต้มและไม่ต้ม) เพื่อให้จุลินทรีย์มีปริมาณมากพอ แข็งแรงและว่องไว โดย

ขวดที่ 1 ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์

ขวดที่ 2 ใส่เชื้อธรรมชาติ

ขวดที่ 3 ใส่เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก

ขวดที่ 4 ใส่เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492

ขวดที่ 5 ใส่เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ตามลำดับ ดังภาพ 3.6 และ 3.7

3. หมักนาน 28 วัน เก็บตัวอย่างทุก 7 วัน วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและเอทานอล

4. เลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้มากที่สุด 2 กลุ่มสายพันธุ์ เพื่อใช้ในการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 20 ลิตร

ภาพ 3.6 การหมักขนาดเล็กที่ต้ม ได้แก่ เชื้อธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 ตามลำดับ

ภาพ 3.7 การหมักขนาดเล็กที่ไม่ต้ม ได้แก่ เชื้อธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 และ *S. cerevisiae* EC 118 ตามลำดับ

3.3.4 การหมักขนาดกลาง (การศึกษากระบวนการหมักเอทานอล)

การหมักขนาดกลาง ปริมาณการหมัก 20 ลิตรต่อถังหมัก ในภาชนะขนาด 50 ลิตร จำนวน 2 ถัง ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษากระบวนการหมักให้ได้เอทานอลปริมาณสูงสุด โดยแบ่งเป็น 2 กระบวนการ คือ หมักให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดและหมักให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดยขั้นตอนการหมักให้ได้เอทานอลจะใช้จุลินทรีย์ 2 กลุ่มสายพันธุ์ จากขั้นตอนการหมักขนาดเล็ก

3.3.4.1 หมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด

1. สับละเอียดส่วนเหลือทิ้งของขนุน ได้แก่ เปลือก ซังและแกน ดังภาพ 3.8

2. ปรับสภาพส่วนเหลือทิ้งของขนุนสับละเอียด ปริมาณ 20 กิโลกรัมต่อถังหมัก ด้วยความร้อน โดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และต้มให้เปื่อยยุ่ยนาน 30 นาที

3. ถังหมักขนาด 50 ลิตร จำนวน 2 ถัง ใส่ส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่ต้มจนเปื่อยยุ่ยกับน้ำ ปริมาณ 20 ลิตรต่อถังหมัก ในอัตราส่วน 1:1

4. หมักโดยเชื้อธรรมชาติ

5. ปิดถังหมักด้วยพลาสติกและฝา หมักในสภาวะไร้อากาศ ดังภาพ 3.9

6. หมักนาน 28 วัน เก็บตัวอย่างทุก 7 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล

ภาพ 3.8 ส่วนเหลือทิ้งของขนุนหั่นและสับละเอียด

ภาพ 3.9 ส่วนเหลือทิ้งของขนุนหั่นและสับละเอียดหมักให้ได้ปริมาณสูงสุด

3.3.4.2 หมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด

1. ทำการแยกและกรองน้ำหมัก ดังภาพ 3.10

2. เติมน้ำตาลทรายให้ความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ 25% Brix เพื่อเป็นแหล่งอาหารที่เพียงพอให้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณสูงสุด

3. เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้หมักเอทานอล จากขั้นตอนการหมักขนาดเล็ก (ที่ได้ทำการคัดเลือกแล้ว) ลงในแต่ละถังหมัก ปริมาณ 1 ลิตร ดังภาพ 3.11 ปิดถังหมักด้วยพลาสติกและฝา หมักในสภาวะไร้อากาศ ดังภาพ 3.12

4. หมักให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล

5. นำน้ำหมักที่ได้ไปกลั่นให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ 99% ดังภาพ 3.13

ภาพ 3.10 การแยกและกรองน้ำหมัก

ภาพ 3.11 การเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้หมักเอทานอล

ภาพ 3.12 ลักษณะการหมักในสภาพไร้อากาศ

ภาพ 3.13 การกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์ 99% โดยใช้เครื่องกลั่นแบบหม้อต้ม

3.3.5 **สรุปและนำเสนอ**

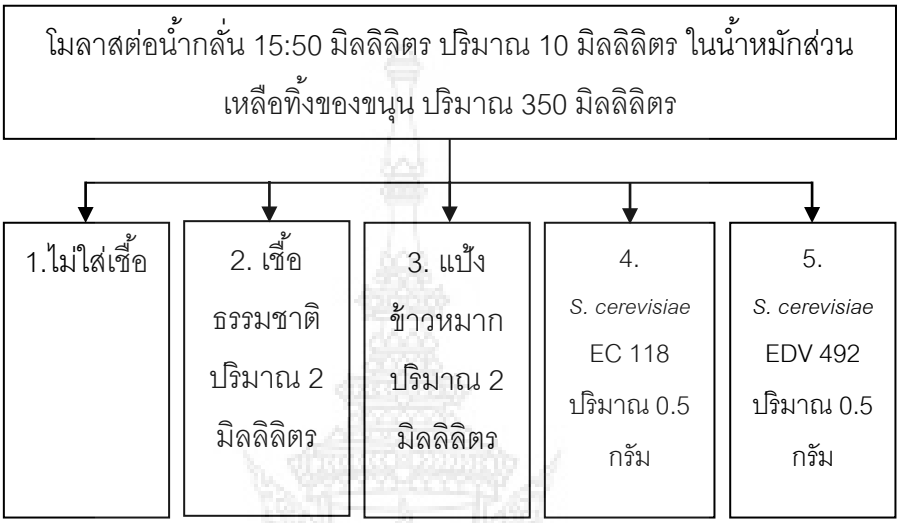
1. สรุปผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ในบทที่ 1

2. นำเสนอ

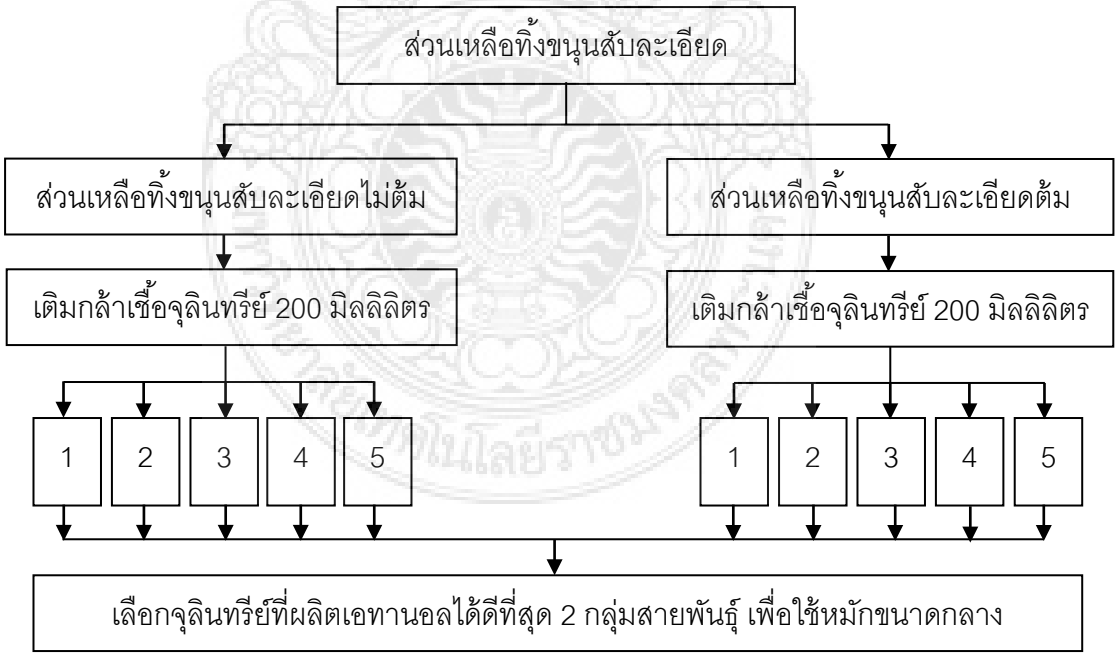
- เสนอแนะที่เป็นข้อจำกัดหรือส่วนที่จะทำให้การศึกษาครั้งนี้เป็นไปได้ในทางปฏิบัติมากขึ้น

- เสนอแนะแนวทางสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป เพื่อพัฒนางานทางด้านการศึกษาและด้านการวิจัยที่จะเกิดประโยชน์ในอนาคต

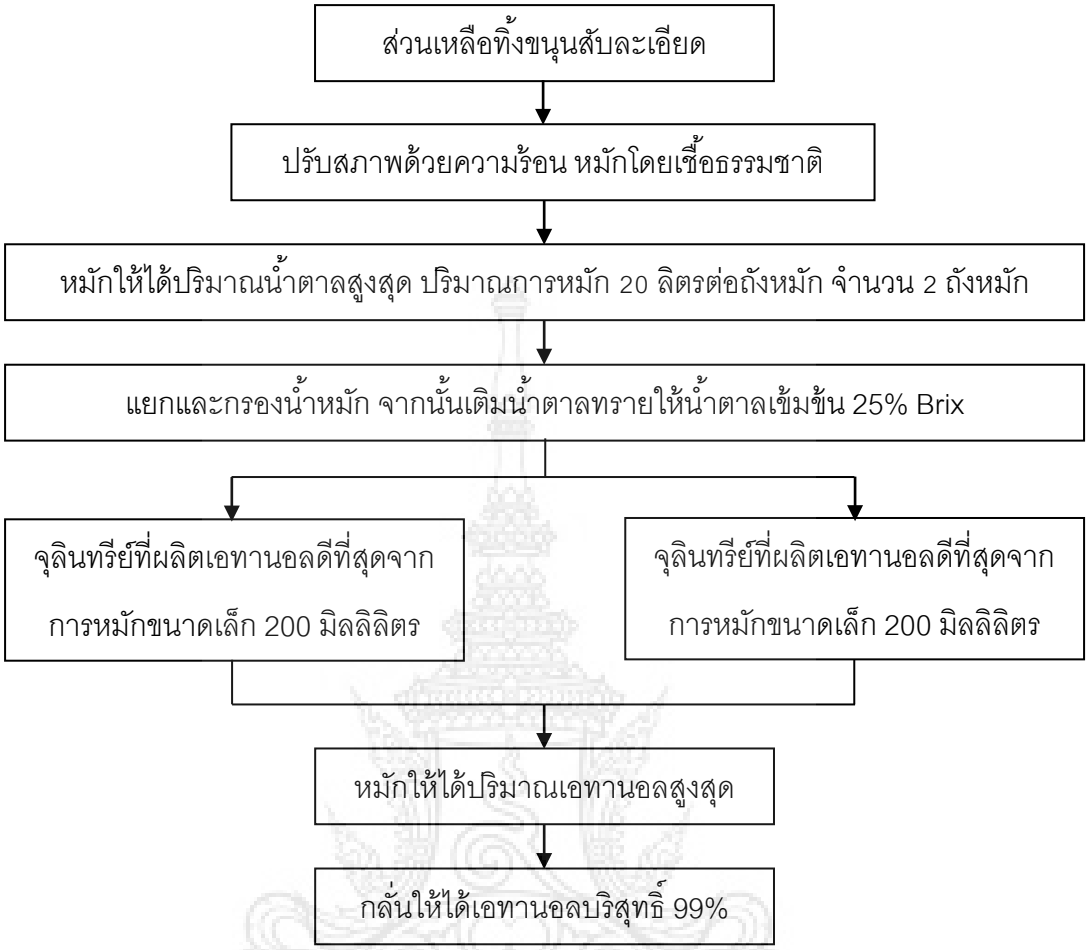
การพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของขนุน แบ่งกระบวนการหมักเป็น 3 ขั้นตอน ตามที่ได้เสนอวิธีการวิจัยไว้ในเบื้องต้นแล้ว เพื่อความเข้าใจมากยิ่งขึ้นผู้วิจัยได้เสนอแผนภาพการทดลองไว้ ดังนี้



ภาพ 3.14 แผนภาพการทดลองที่ 1 ในขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์



ภาพ 3.15 แผนภาพการทดลองที่ 2 ในขั้นตอนการหมักขนาดเล็ก



ภาพ 3.16 แผนภาพการทดลองที่ 3 ในขั้นตอนการหมักขนาดกลาง

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

จากการศึกษาและพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลจากส่วนเหลือทิ้งของขนุน ผู้วิจัยสามารถแบ่งกระบวนการออกเป็น 4 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ ขั้นตอนการหมักขนาดเล็ก (เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลขั้นต่อไป) ขั้นตอนการหมักให้ได้เอทานอลและขั้นตอนการกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์ 99% โดยมีผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล ดังต่อไปนี้

4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ผลข้อมูลแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน คือ กระบวนการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ กระบวนการหมักขนาดเล็ก กระบวนการหมักขนาดกลางและกระบวนการกลั่นให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ 99% ดังนี้

4.1.1 กระบวนการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

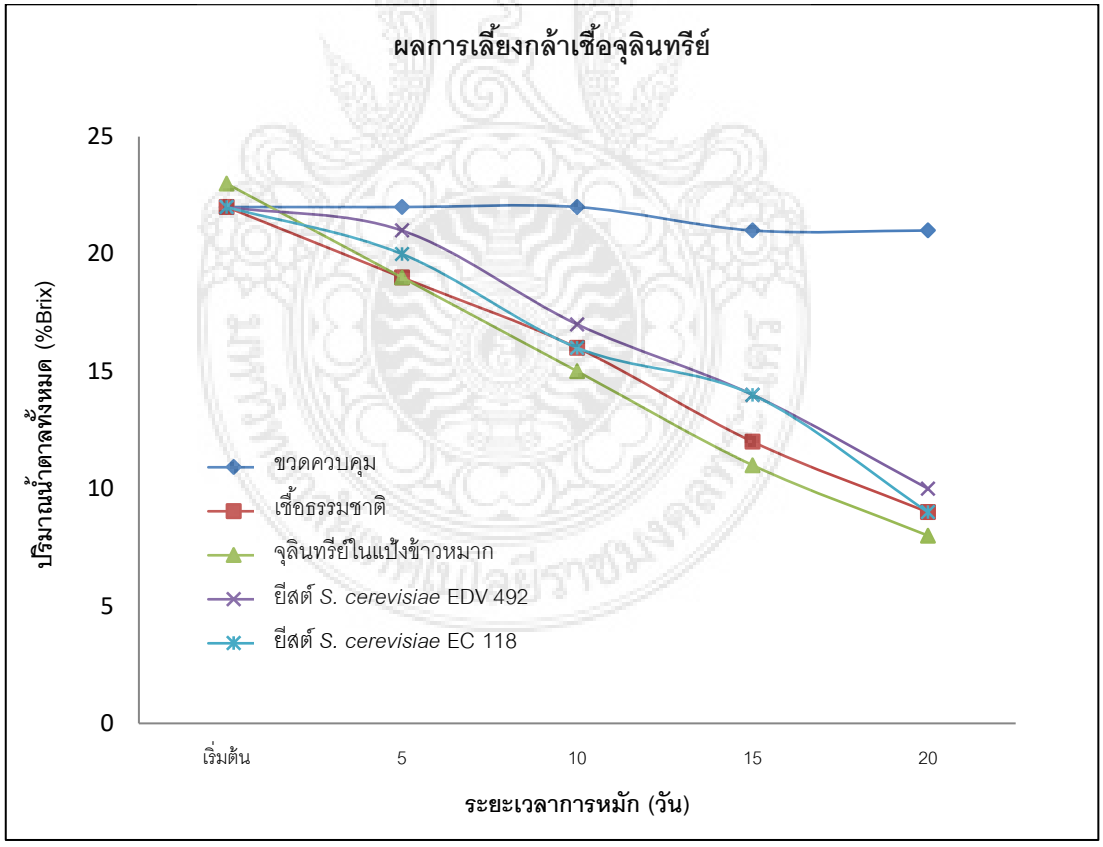
จากการเตรียมในขวดเลี้ยงเชื้อด้วยการเติมโมลาสต่อน้ำกลั่น 15:50 มิลลิลิตร (ปริมาณน้ำตาล 25% Brix) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร น้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน ปริมาณ 350 มิลลิลิตร และเติมเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณ 10^{8}-10^{10} Cell/ml พบว่าจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตช้า อันเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้เวลาในการปรับตัวและหลังจากนั้นจำเป็นต้องเร่งการเจริญเติบโตด้วยโมลาส ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ดังตาราง 4.1

ตาราง 4.1 แสดงปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	**ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น** (% Brix)	**ปรับด้วยโมลาส 40 มิลลิลิตร** (% Brix)
ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ (ขวดควบคุม)	2	22
เชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติ	2	22
เชื้อจุลินทรีย์แป้งข้าวหมาก	3	23
ยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492	2	22
ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118	2	22

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในกระบวนการหมัก เพราะหากเชื้อไม่มีคุณภาพ อ่อนแอหรือมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ อยู่ในขั้นตอนนี้จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อกระบวนการหมักต่อไป จากการศึกษาที่ใช้ระยะเวลาในการหมักขั้นแรก 20 วัน หลังจากเติมโมลาส ปริมาณ 40 มิลลิลิตร พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในสับสเตรทที่เป็นน้ำตาลได้ดี จุลินทรีย์มีความแข็งแรง (Viable) และอยู่ในระยะที่กำลังเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งสังเกตจากปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง

จากภาพ 4.1 จุลินทรีย์ที่ทดสอบทุกกรณีเจริญได้ใกล้เคียงกัน ยกเว้นขวดควบคุม ซึ่งมีการเจริญของจุลินทรีย์น้อยมาก (>10^2 Cell/ml) โดยรวมเชื้อจุลินทรีย์ทุกกลุ่มที่ทดลองสามารถใช้สับสเตรทน้ำตาลได้ค่อนข้างมากในระดับที่ไม่แตกต่างกัน โดยจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากมีการใช้น้ำตาล 15% Brix เชื้อธรรมชาติมีการใช้น้ำตาล 14% Brix ยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 มีการใช้น้ำตาล 13% Brix และยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 มีการใช้น้ำตาล 13% Brix ทั้งนี้ พบว่าจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากมีการเจริญเติบโตค่อนข้างดีสุดโดยใช้ปริมาณน้ำตาลในโมลาส



ภาพ 4.1 กราฟการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มในขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์

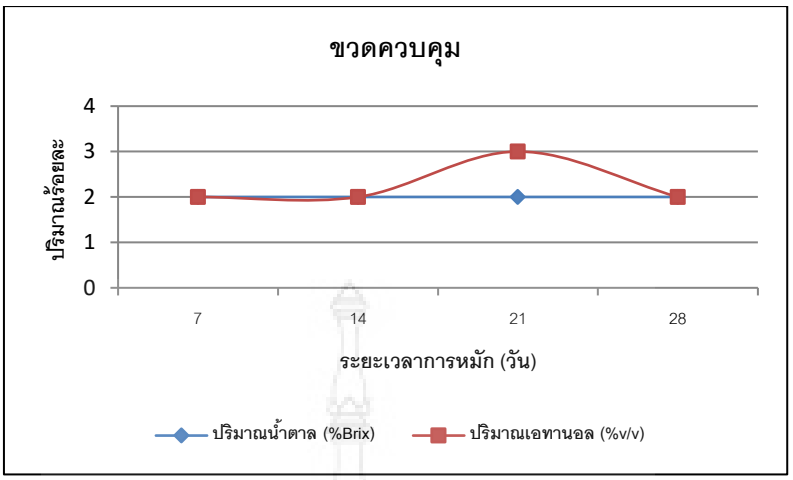
4.1.2 กระบวนการหมักขนาดเล็ก (เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม)

กระบวนการหมักขนาดเล็กเป็นขั้นตอนของการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล โดยระยะเวลาการหมัก 28 วัน โดยหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนปริมาณ 1 ลิตร เลือกแบ่งเป็น 2 ชุดการทดสอบ คือ ส่วนเหลือทิ้งของขนุนสับละเอียดไม่ต้มและต้ม และแบ่งชุดการทดสอบหมักอย่างละ 5 ขวด โดยการนำกล้าเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ 20% (ปริมาณ 200 มิลลิลิตร) ใส่ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนให้มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มากและทดสอบดูประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล เพื่อใช้หมักในถังขนาดกลางต่อไป

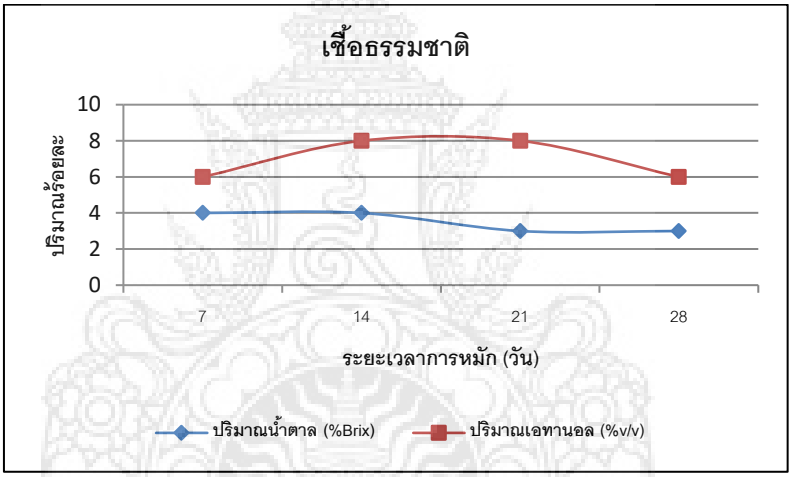
4.1.2.1 ส่วนเหลือทิ้งของขนุนสับละเอียดไม่ต้ม

จากการหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่ไม่ต้ม พบว่าเริ่มต้นเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มสายพันธุ์สามารถย่อยคาร์โบไฮเดรต ย่อยลิกโนเซลูโลส ผลิตน้ำตาลและยังผลิตเอทานอลไปพร้อมกันได้ด้วย โดยน้ำตาลได้มาจากการย่อยคาร์โบไฮเดรตหรือลิกโนเซลลูโลสและจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้เอง

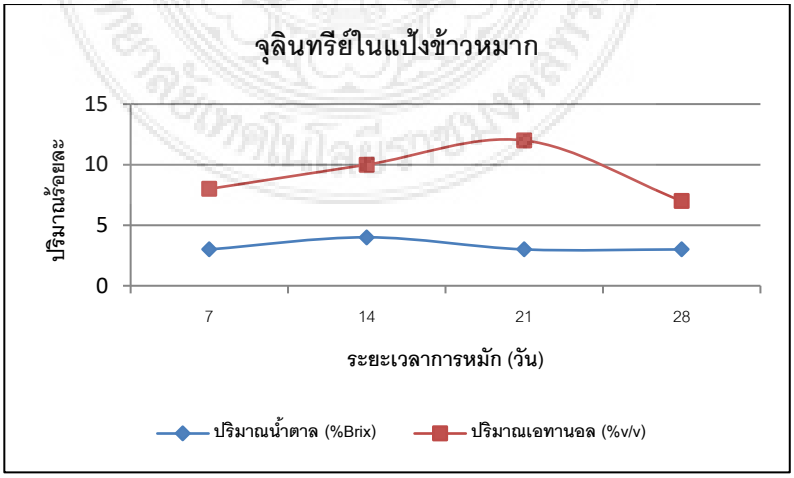
จากภาพ 4.2-4.6 สังเกตได้ว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลลดลงหรือหมดมีผลต่อปริมาณเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้นและลดลง เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำตาลได้จะเปลี่ยนแทนที่ด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เอทานอลเป็นสับสเตรทแทนน้ำตาล ในขณะที่ขวดควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อจุลินทรีย์ แสดงถึงผลของจุลินทรีย์ที่มีน้อยมาก ในกรณีนี้ในขวดควบคุมมีจุลินทรีย์น้อยจึงไม่สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลหรือใช้น้ำตาลเป็นสับสเตรทได้ดีเหมือนขวดอื่น ๆ ในสภาวะที่ควบคุม ขวดที่มีเชื้อธรรมชาติ พบว่าจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้ไปเป็นเอทานอลสูงสุดที่(8%((v/v) ขวดที่มีจุลินทรีย์แป้งข้าวหมาก(จุลินทรีย์สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 12% (v/v) ขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 จุลินทรีย์สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 11% (v/v) ขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 จุลินทรีย์สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 13% (v/v) และจากเชื้อจุลินทรีย์ทุกกลุ่มสายพันธุ์ พบว่าภายในระยะเวลา 21 วัน ควรเก็บผลิตภัณฑ์เอทานอล ไม่ควรให้กระบวนการหมักถึง 28 วัน เนื่องจากเอทานอลมีปริมาณลดลงเพราะเอทานอลถูกใช้นำไปใช้เป็นอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักต่อไป



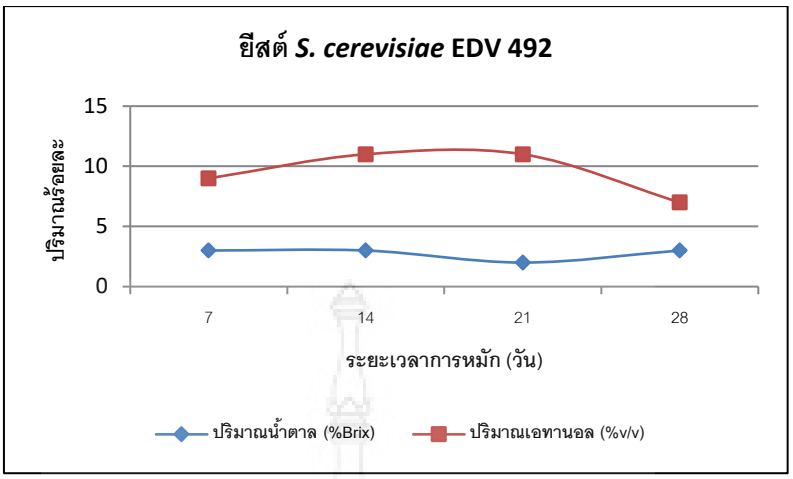
ภาพ 4.2 กราฟการเจริญของเชื้อจุลินทรียตัวขวดควบคุมในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม



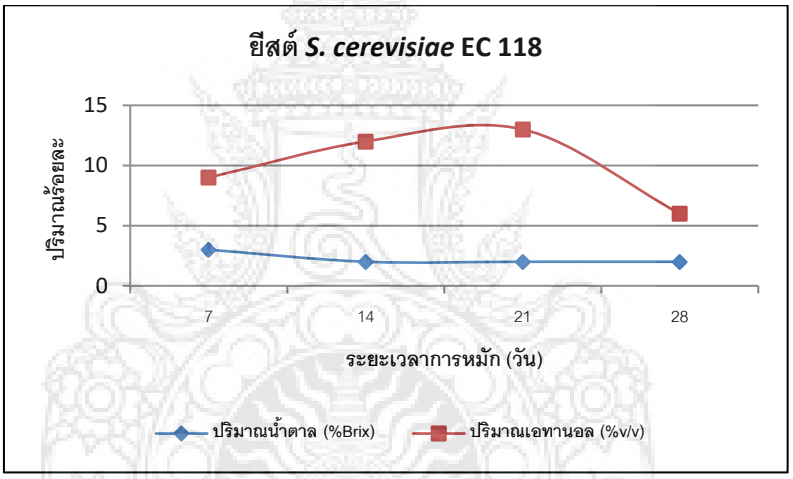
ภาพ 4.3 กราฟการเจริญของเชื้อธรรมชาติในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม



ภาพ 4.4 กราฟการเจริญของจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม



ภาพ 4.5 กราฟการเจริญยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม

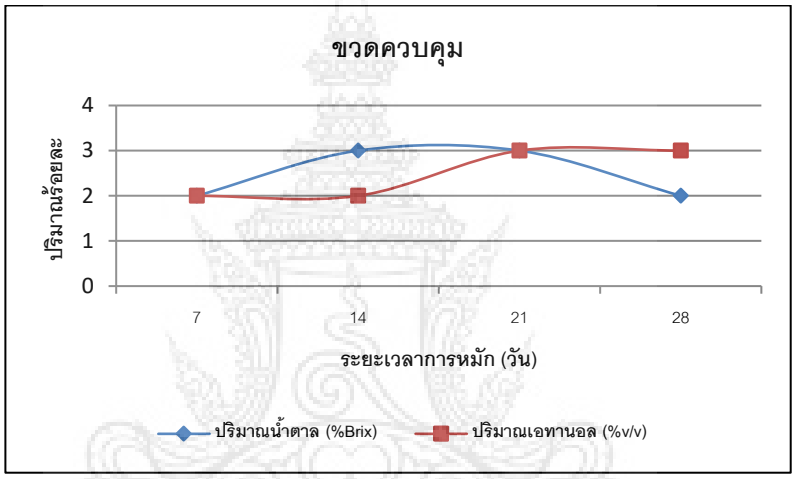


ภาพ 4.6 กราฟการเจริญยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม

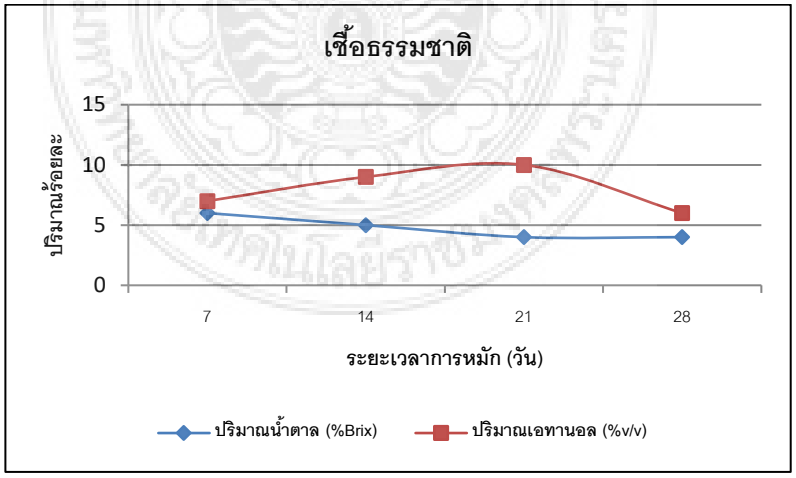
4.1.2.2 จากการหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่ต้ม

จากการหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่ต้มทั้งหมดนี้ พบว่าจุลินทรีย์ผลิตน้ำตาลและเอทานอลพร้อมกัน ซึ่งปริมาณน้ำตาลจะมีผลต่อปริมาณเอทานอลหากปริมาณน้ำตาลถูกใช้ไปจนเหลือน้อยหรือหมดไป กลุ่มจุลินทรีย์จะเลือกใช้เอทานอลเป็นสับสเตรทแทนน้ำตาลและเปลี่ยนเป็นกรดต่อไป ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณเอทานอลลดลง ดังภาพ 4.7-4.11 ในขวดควบคุม พบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้น้อย ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่าการต้มจะช่วยย่อยสลายเซลล์พืชทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นอาหารได้ดีกว่าขวดที่ไม่ต้ม แต่ทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนความร้อน เช่น จุลินทรีย์ที่มีสปอร์ จะยังสามารถเจริญอยู่รอดได้

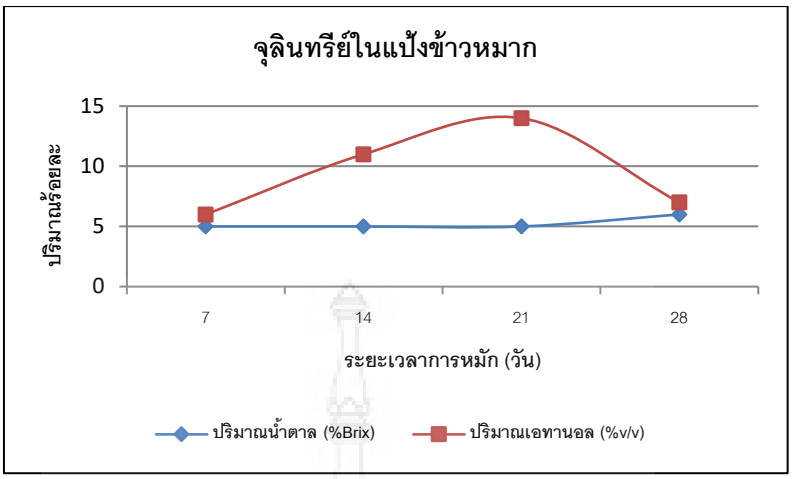
จากการทดลองในขวดที่มีเชื้อธรรมชาติ พบว่าจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลสูงสุดที่ 10% (v/v) ขวดที่มีจุลินทรีย์แป้งข้าวหมาก จุลินทรีย์สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 14% (v/v) ขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 จุลินทรีย์สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 10% (v/v) ขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 จุลินทรีย์สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 13% (v/v) และจากเชื้อจุลินทรีย์ทุกกลุ่มสายพันธุ์ พบว่าในระยะเวลา 21 วัน ควรเก็บเอทานอลไม่ควรให้กระบวนการหมักถึง 28 วัน เนื่องจากเอทานอลมีปริมาณลดลง เพราะเอทานอลถูกใช้นำไปใช้เป็นอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักต่อไป



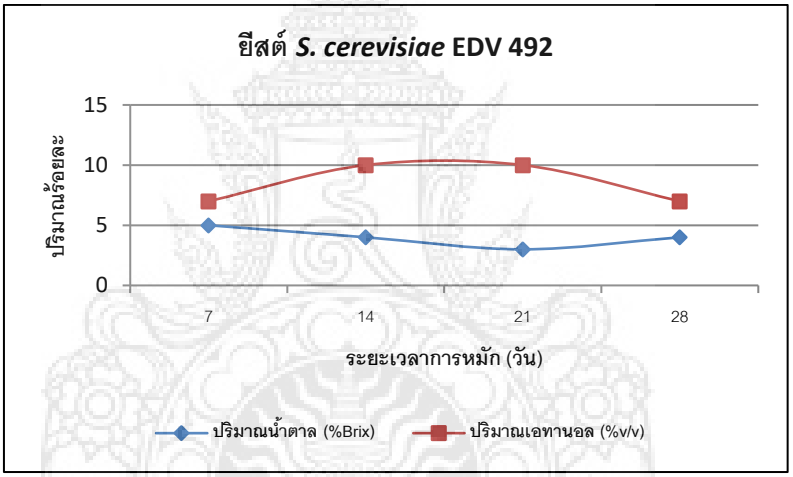
ภาพ 4.7 กราฟการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตัวขวดควบคุมขวดในหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม



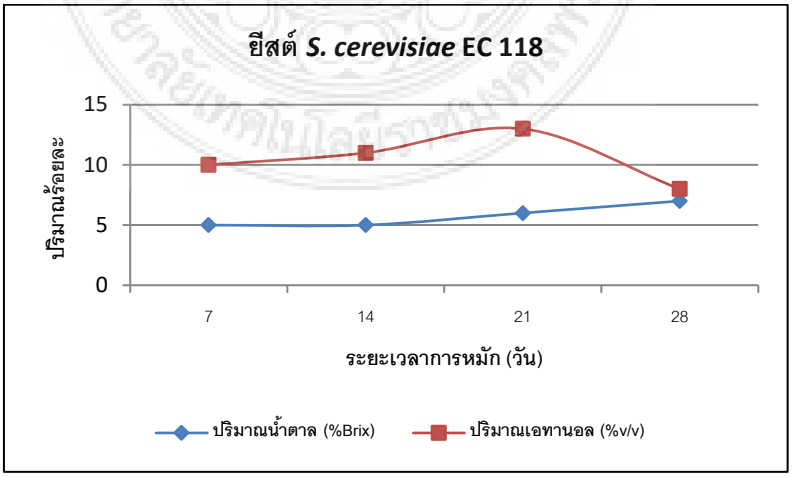
ภาพ 4.8 กราฟการเจริญของเชื้อธรรมชาติในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม



ภาพ 4.9 กราฟการเจริญของจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม



ภาพ 4.10 กราฟการเจริญยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม



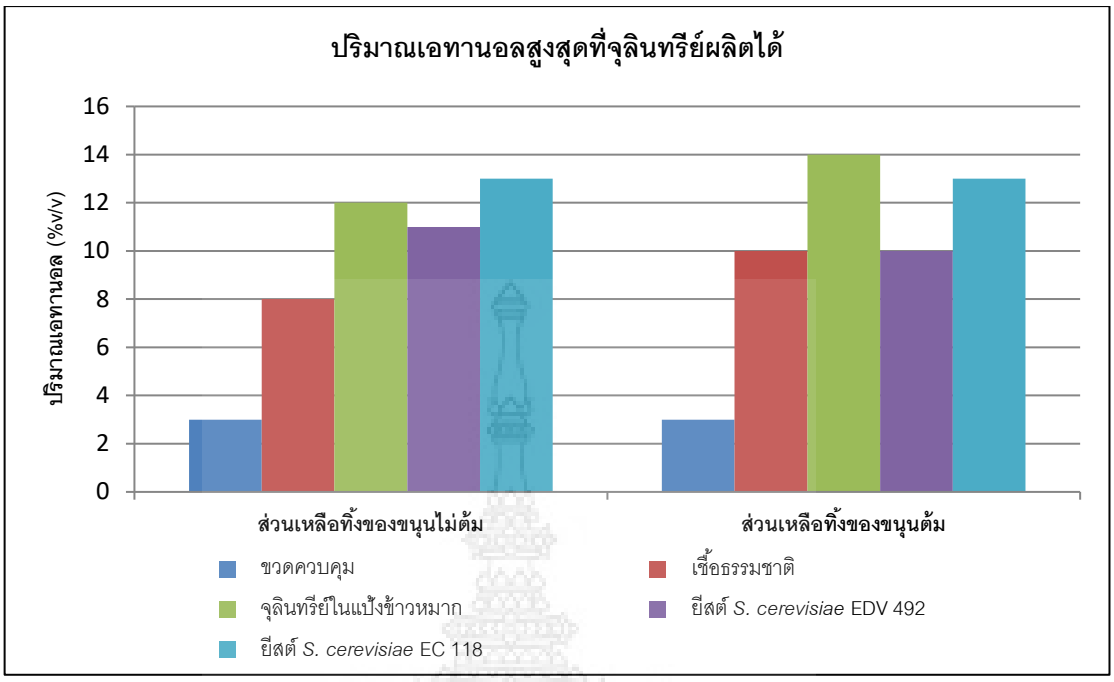
ภาพ 4.11 กราฟการเจริญยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม

4.1.2.3 สรุปการหมักขนาดเล็กจากส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้มและต้ม

จากกระบวนการหมักขนาดเล็กจากส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้มและต้ม พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกกลุ่มสามารถเจริญได้ในสับสเตรทที่เป็นคาร์โบไฮเดรตและลิกโนเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลมีความสัมพันธ์กันอย่างผกผัน โดยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่าง แต่ใช้เวลาในการหมักต่างกัน ทั้งนี้การไม่ต้มและต้มส่วนเหลือทิ้งของขนุนมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายยากขึ้น จากตัวอย่างที่ไม่ต้มพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อธรรมชาติด้วย และยังพบว่าการย่อยคาร์โบไฮเดรต เซลลูโลสได้ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลที่ต่ำกว่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น ๆ ทั้งนี้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่าถ้ามีเชื้ออื่น ๆ ปนเปื้อนกับเชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก หรือ ยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 หรือ ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 จะทำให้เชื้อเจริญได้แย่ลง (จากการเปรียบเทียบขวดต้มและไม่ต้ม ในขวดที่มีการเติมเชื้อลงไป)

จากการหมักขนาดเล็ก พบว่าขวดที่หมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้มสามารถให้ปริมาณเอทานอลมากและเร็วดีกว่าขวดที่ไม่ต้ม เนื่องจากย่อยสลายโครงสร้างพืช เช่น คาร์โบไฮเดรต เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน ทำให้จุลินทรีย์ย่อยง่ายกว่าและลดการปนเปื้อนของเชื้อธรรมชาติที่แย่งอาหาร จึงทำให้กระบวนการหมักในขวดที่ไม่ต้มได้เอทานอลในปริมาณน้อย นอกจากนั้นความสามารถในการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มสายพันธุ์ พบว่าจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ขวดที่ต้ม มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้ไวและสามารถให้ปริมาณสูงสุดที่ 14 และ 13% (v/v) ตามลำดับ โดยจะช่วยให้ปริมาณน้ำตาลมากขึ้น และแสดงถึงความสามารถในการย่อยโครงสร้างของพืชที่มีทั้งคาร์โบไฮเดรตและลิกโนเซลลูโลสได้ดี ดังภาพ 4.12

ดังนั้นขั้นตอนการหมักขนาดกลาง (ปริมาณการหมัก 20 ลิตรต่อถังหมัก) ผู้วิจัยเลือกใช้ขวดที่มีจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในขวดหมักขนาดเล็กที่ต้ม เพื่อให้ได้เอทานอลปริมาณสูงที่สุดและสามารถทนน้ำตาลความเข้มข้นสูงด้วย กับส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่ต้มเพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนของเชื้อธรรมชาติอื่น ๆ ที่จะแย่งอาหารและทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้พบว่าที่สามารถเจริญได้มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลภายใน 20-25 วัน มีความสามารถในการทนรับปริมาณน้ำตาลสูงถึง 25% Brix ทั้งยังสามารถทนปริมาณเอทานอลที่สูงถึง 15-16%



ภาพ 4.12 ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มสายพันธุ์ผลิตได้ในขวดหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่ไม่ต้มและต้ม

4.1.3 กระบวนการหมักขนาดกลาง

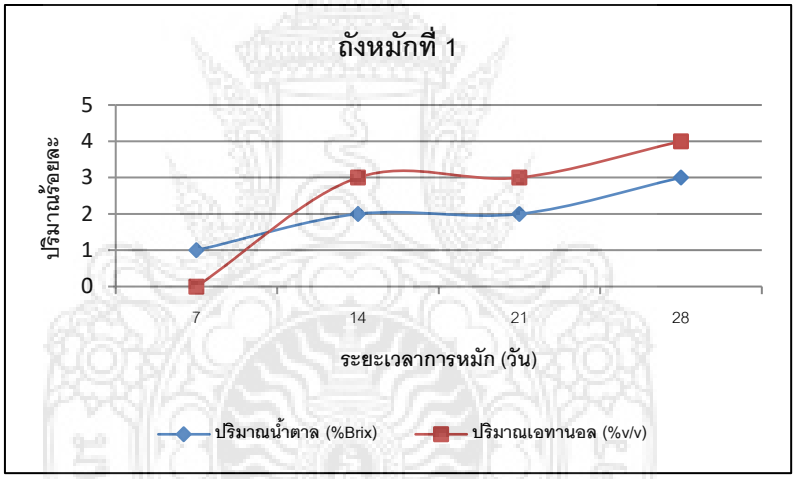
การหมักขนาดกลาง เพื่อศึกษากระบวนการหมักให้ได้เอทานอลปริมาณสูงสุด ผู้วิจัยใช้การหมักแบบ Separated Hydrolysis and Fermentation (SHF) หรือ กระบวนการแยกน้ำตาลก่อนหมัก เป็นกระบวนการที่แยกกากคาร์โบไฮเดรตและลิกโนเซลลูโลสออกจากน้ำตาลก่อนแล้วนำไปหมักต่อให้ได้เอทานอล ดังต่อไปนี้

4.1.3.1 กระบวนการหมักให้ได้น้ำตาล

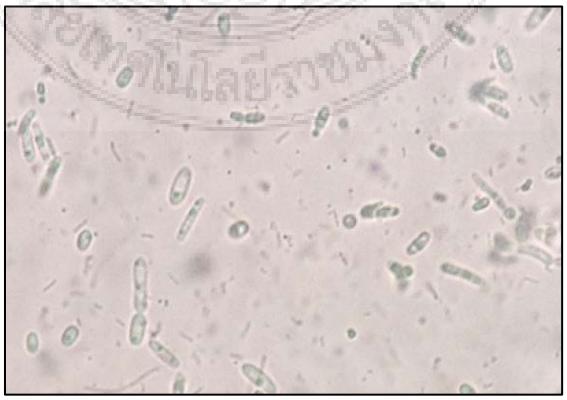
จากการหมักขนาดเล็กสรุปได้ว่า การต้มส่วนเหลือทิ้งของขนุนมีผลต่อการย่อยสลายพันธะพืชทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้เร็ว ลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ เชื้อที่สามารถเจริญได้จะเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ย่อยคาร์โบไฮเดรตและลิกโนเซลลูโลส ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงทำการต้มแล้วหมักให้ได้น้ำตาลในระยะเวลา 28 วัน โดยในกระบวนการหมักให้ได้น้ำตาลผู้วิจัยใช้หลักการของการหมักทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อธรรมชาติซึ่งลักษณะการย่อยด้วยจุลินทรีย์จะเป็นไปอย่างธรรมชาติ จึงไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงเป็นไปอย่างช้า ในการศึกษาครั้งนี้จะหมักให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด โดยมีการปรับความเข้มข้นน้ำตาล 25% Brix ด้วยการเติม Sucrose หรือที่เรียกน้ำตาลทราย เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนที่มากและเพียงพอให้จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเพื่อการผลิตเอทานอล

ดังนั้นในถังหมักที่ 1 ส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้มและหมักในสภาวะไร้อากาศ พบว่าระยะเวลา 28 วัน จุลินทรีย์ผลิตน้ำตาลและเอทานอลพร้อมกัน โดยสามารถผลิตน้ำตาลปริมาณ 3% Brix พร้อมกับผลิตเอทานอลปริมาณ 4% (v/v) ทั้งนี้จุลินทรีย์เริ่มผลิตเอทานอล ตั้งแต่วันที่ 14 ของการหมัก ดังภาพที่ 4.13 ลักษณะเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักเป็นยีสต์แบบรีและค่อนข้างกลม ส่วนแบคทีเรียแบบท่อนพบในปริมาณใกล้เคียงกันกับยีสต์ ดังภาพ 4.14

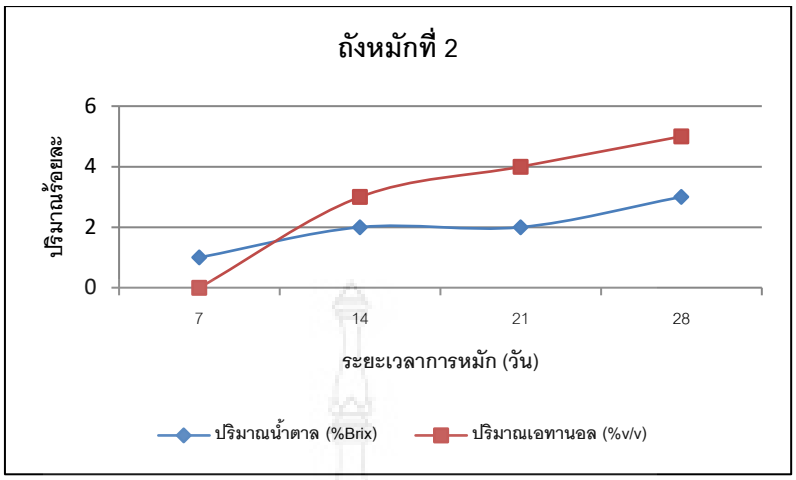
ถังหมักที่ 2 ส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้มและหมักในสภาวะไร้อากาศ พบว่าระยะเวลา 28 วัน จุลินทรีย์ผลิตน้ำตาลและเอทานอลพร้อมกัน โดยสามารถผลิตน้ำตาลปริมาณ 3% Brix พร้อมกับผลิตเอทานอลปริมาณ 5% (v/v) ทั้งนี้จุลินทรีย์เริ่มผลิตเอทานอล ตั้งแต่วันที่ 14 ของการหมัก ดังภาพ 4.15 พบลักษณะเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักเป็นยีสต์แบบรีและกลมจำนวนมาก 108-109 เซลล์/มิลลิลิตร แบคทีเรียแบบท่อนในปริมาณที่เล็กน้อย ดังภาพ 4.16



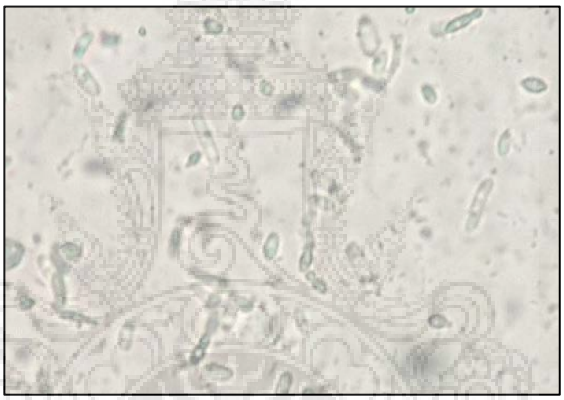
ภาพ 4.13 กราฟปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักที่ 1



ภาพ 4.14 ลักษณะเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักที่ 1



ภาพ 4.15 กราฟปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักที่ 2



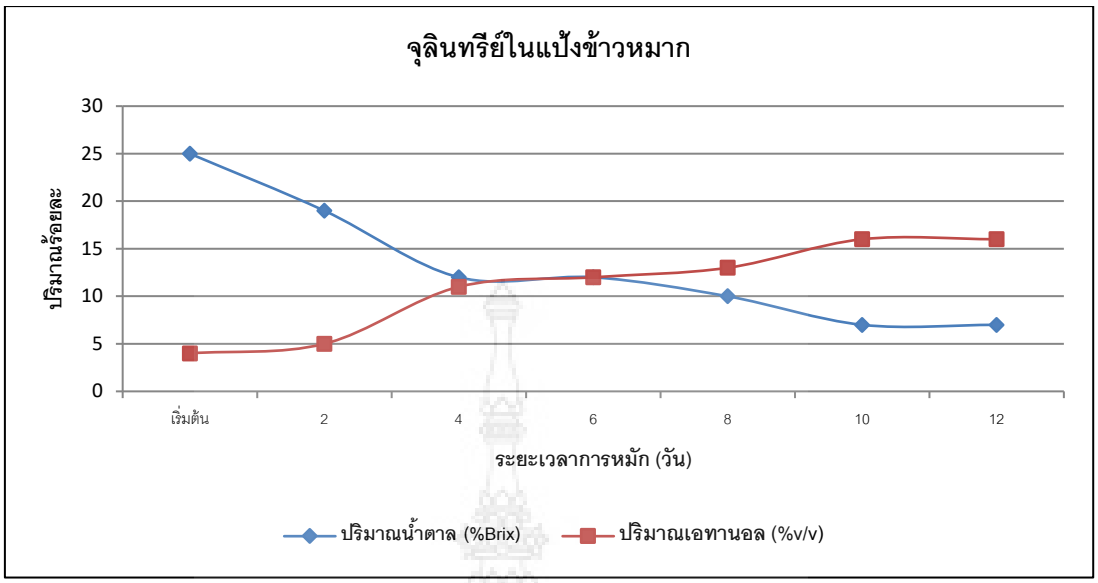
ภาพ 4.16 ลักษณะเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักที่ 2

จากภาพที่ 4.13 และ 4.15 แสดงปริมาณน้ำตาลและเอทานอลทั้ง 2 ถังหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลที่สร้างขึ้นได้น้อย เนื่องจากในกระบวนการหมักทางชีวภาพ โดยการใช้เชื้อธรรมชาติ พบว่าเป็นไปได้ช้าและต้องใช้ระยะเวลาการหมักนาน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายโครงสร้างพืชได้ในระยะเวลาอันสั้น อีกทั้งกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำตาลได้จะเปลี่ยนแทนที่ด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เอทานอลเป็นสับสเตรทแทน ซึ่งสังเกตจากปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากภาพที่ 4.14 และ 4.16 เชื้อจุลินทรีย์ที่หลากหลายแย่งกันใช้สับสเตรทน้ำตาลมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้ลดลงไม่ได้สูงในระดับที่เหมาะสมกับขั้นตอนกระบวนการหมักให้ได้เอทานอล ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความจำเป็นต้องเติมน้ำตาลทรายในปริมาณ 5.5 กิโลกรัมต่อถังหมัก เพื่อให้ปริมาณน้ำตาลสูงถึง 25% Brix เชื้อจุลินทรีย์จะสามารถใช้เป็นสับสเตรทได้มากและเพียงพอในการผลิตเอทานอลในขั้นตอนต่อไป

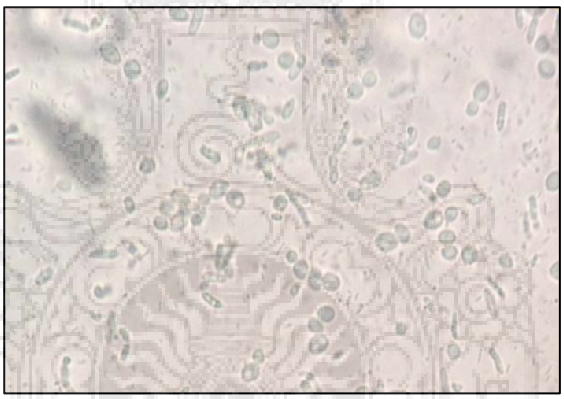
4.1.3.2 กระบวนการหมักให้ได้เอทานอล

ในกระบวนการนี้เป็นกระบวนการหมักให้ได้เอทานอลในปริมาณสูงสุด ดังนั้น ผู้วิจัยได้ทำการกรองและแยกน้ำหมักออกจากเศษส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่ผ่านการหมักขั้นแรก เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลที่มากขึ้นและหยุดยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่จะย่อยคาร์โบไฮเดรตหรือลิกโนเซลลูโลสได้อีก เพราะฉะนั้นปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนและการเกิดปฏิกิริยาอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ ซึ่งติดมากับส่วนเหลือทิ้งของขนุน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยเลือกจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือก 2 กลุ่มสายพันธุ์ เพราะสามารถผลิตและทนปริมาณเอทานอลได้สูง คือ จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ขวดที่ต้ม โดยใส่ในปริมาณ 200 มิลลิลิตรต่อถังหมัก และหมักในสภาวะไร้อากาศให้ได้เอทานอลปริมาณสูงสุด

ถังหมักที่ 1 หมักโดยจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก พบว่า ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลมีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ เมื่อปริมาณเอทานอลเพิ่มมากขึ้นปริมาณน้ำตาลจะลดลง ซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์แป้งในข้าวหมากสามารถใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่อง การหมักได้หยุดลงเมื่อเอทานอลปริมาณสูงสุดที่ 16% (v/v) ในระยะเวลา 10 วัน และปริมาณน้ำตาลเหลือ 7% Brix ทั้งนี้เกิดจากความเข้มข้นของเอทานอลยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ ดังภาพ 4.17 ลักษณะจุลินทรีย์ในถังหมักที่มีจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก พบเชื้อจุลินทรีย์ที่หลากหลายทั้งยีสต์แบบกลม แบคทีเรียแบบท่อนและแบบกลม ดังภาพ 4.18 ซึ่งจะผลิตเอทานอลช้าเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถแย่งใช้สับเสตรทน้ำตาลได้ แต่ไม่ให้ผลิตภัณฑ์เอทานอล

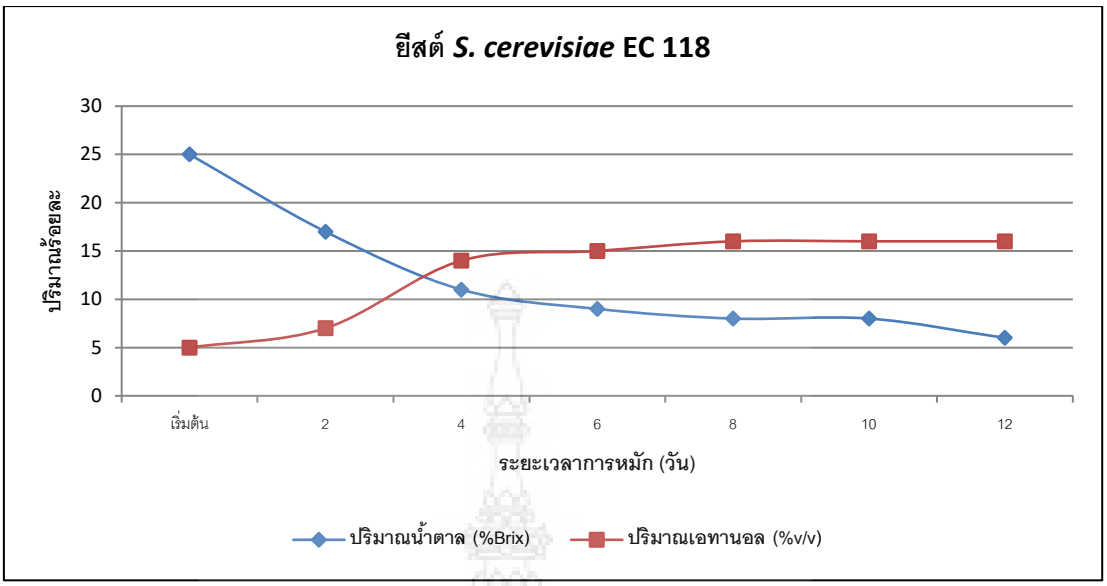


ภาพ 4.17 กราฟปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก



ภาพ 4.18 ลักษณะจุลินทรีย์ในถังหมักที่มีจุลินทรีย์แป้งในข้าวหมาก

ถังหมักที่ 2 หมักโดยยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 พบว่าปริมาณน้ำตาลและเอทานอลมีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ เมื่อปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลจะลดลงเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล โดยในระยะเวลา 8 วัน สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 16% (v/v) และปริมาณน้ำตาลเหลือ 6% Brix โดยจุลินทรีย์ไม่เพิ่มการเจริญ ไม่มีการใช้น้ำตาลเพิ่มมากขึ้น จนวันสุดท้ายของการหมัก ดังภาพ 4.19 ลักษณะจุลินทรีย์ในถังหมักที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 พบยีสต์แบบรีจำนวนมากและแบบกลมเล็กน้อย ดังภาพ 4.20



ภาพ 4.19 กราฟปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118

ภาพ 4.20 ลักษณะจุลินทรีย์ในถังหมักยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118

4.1.3.3 สรุปการหมักเอทานอลขนาดกลาง

จากกราฟ 4.17 และ 4.19 แสดงปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในถังหมักที่มีจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและถังหมักที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 พบว่าปริมาณน้ำตาลและเอทานอลมีความสัมพันธ์กัน (ปริมาณน้ำตาลจะลดลงเมื่อปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น) เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มสายพันธุ์ สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 16% (v/v) ทั้งนี้ต่างที่ระยะเวลาของการหมัก ดังนั้นสรุปได้ว่า จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มสายพันธุ์มีคุณสมบัติต่างกัน โดยจากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากใช้ระยะเวลาการหมัก 10 วัน เนื่องจากมีเชื้อจุลินทรีย์ที่หลากหลายและจุลินทรีย์บางชนิดใช้น้ำตาลเป็นสับสเตรทแต่ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้

ส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ใช้ระยะเวลาการหมัก 8 วัน เนื่องจากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ และจากกราฟ 4.17 และ 4.19 เมื่อเอทานอลปริมาณสูงสุดที่ 16% (v/v) การหมักจะหยุดชะงัก เนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ กระบวนการหมักจึงไม่สามารถไปต่อได้ แต่มีการใช้น้ำตาลเล็กน้อยในถังหมักยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาวะความเข้มข้นของเอทานอลสูงและไม่ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอทานอล ปริมาณของเอทานอลจึงไม่เพิ่มขึ้น

4.1.4 กระบวนการกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์ 99%

ขั้นตอนการกลั่นเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่ทำให้ได้เอทานอล โดยแยกเอทานอลและน้ำออกจากกัน ซึ่งในกระบวนการกลั่นนี้ผู้วิจัยใช้อุปกรณ์การกลั่นแบบหม้อต้ม ทั้งนี้เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงถึง 99% จึงทำการกลั่นซ้ำรอบที่ 2

4.1.4.1 การกลั่นเอทานอลจากการหมักแอลกอฮอล์ โดยใช้จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก

จากการหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุนโดยใช้จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก ปริมาณการหมัก 20 ลิตร หลังจากกระบวนการหมัก พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์สูง 16% (v/v) จึงทำการกลั่นให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ 99% (v/v) ดังตาราง 4.2 และ 4.3

ตาราง 4.2 ผลของการกลั่นเอทานอลรอบที่ 1 จากน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยใช้จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก

การกลั่นเอทานอลรอบที่ 1						
ครั้งที่	**ปริมาณที่กลั่น** (ml)	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**		**เวลา (นาที)**	**ปริมาณที่ได้** (ml)	**ความเข้มข้น** (%v/v)
		เริ่มกลั่น	**หยุดกลั่น**			
1	2,000	67.0	92.0	11	100	77
2	4,000	75.0	85.0	27	200	77
3	4,000	92.0	101.0	23	200	77
4	4,200	97.0	103.0	17	200	77
5	5,000	98.0	103.0	17	225	77
รวม	19,200	-	-	-	925	77

ตาราง 4.3 ผลของการกลั่นเอทานอลรอบที่ 2 จากน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยใช้จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก

การกลั่นเอทานอลรอบที่ 2						
ครั้งที่	**ปริมาณที่กลั่น (ml)**	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**		**เวลา (นาที)**	**ปริมาณที่ได้ (ml)**	**ความเข้มข้น (%v/v)**
		เริ่มกลั่น	**หยุดกลั่น**			
1	925	97.2	103.0	17	720	99
รวม	925	-	-	-	720	99

จากตาราง 4.2 เอทานอลที่ได้จากการหมักแอลกอฮอล์ โดยใช้จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก ในการกลั่นรอบที่ 1 ใช้อุณหภูมิที่เริ่มกลั่นเอทานอลเฉลี่ย 85.8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิหยุดที่กลั่นเอทานอลเฉลี่ย 96.8 องศาเซลเซียส ใช้เวลาโดยเฉลี่ย 19 นาที จากปริมาณน้ำหมักทั้งหมด 19,200 มิลลิลิตร ได้ปริมาณเอทานอลบริสุทธิ์ 77% (v/v) ปริมาณ 925 มิลลิลิตร และจากตาราง 4.3 ทำการกลั่นซ้ำรอบที่ 2 เพื่อให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ 99% (v/v) ได้ปริมาณเอทานอล 720 มิลลิลิตร

4.1.4.1 การกลั่นเอทานอลจากการหมักแอลกอฮอล์ โดยยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118

จากการหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน ปริมาณการหมัก 20 ลิตร โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 หลังจากกระบวนการหมัก พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์สูง 16% (v/v) จึงทำการกลั่นให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ 99% (v/v) ดังตาราง 4.4 และ 4.5

ตาราง 4.4 ผลของการกลั่นเอทานอลรอบที่ 1 จากน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118

การกลั่นเอทานอลรอบที่ 1						
ครั้งที่	**ปริมาณที่กลั่น (ml)**	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**		**เวลา (นาที)**	**ปริมาณที่ได้ (ml)**	**ความเข้มข้น (%v/v)**
		เริ่มกลั่น	**หยุดกลั่น**			
1	4000	96.2	101.1	47.4	200	80
2	4000	96.7	101.5	42.5	200	70
3	4000	98.4	101.2	45	200	80
4	4000	95.8	102.0	46.2	200	85
5	3800	97.3	101.6	45.1	185	65
รวม	19,800	-	-	-	985	75

ตาราง 4.5 ผลของการกลั่นเอทานอลรอบที่ 2 จากน้ำหมักส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118

การกลั่นเอทานอลรอบที่ 2						
ครั้งที่	**ปริมาณที่กลั่น (ml)**	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**		**เวลา (นาที)**	**ปริมาณที่ได้ (ml)**	**ความเข้มข้น (%v/v)**
		เริ่มกลั่น	**หยุดกลั่น**			
1	985	97.9	103.0	19	740	99
รวม	985	-	-	-	740	99

จากตาราง 4.4 การกลั่นเอทานอลที่ได้จากการหมักแอลกอฮอล์ โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในการกลั่นรอบที่ 1 จากน้ำหมักแอลกอฮอล์ทั้งหมด 19,800 มิลลิลิตร โดยใช้อุณหภูมิที่เริ่มกลั่นเอทานอลเฉลี่ย 96.9 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่หยุดกลั่นเอทานอลเฉลี่ย 101.5 องศาเซลเซียส และใช้เวลาโดยเฉลี่ย 45.24 นาที ได้เอทานอลความบริสุทธิ์ 75% (v/v) ปริมาณ 985 มิลลิลิตร และจากตาราง 4.5 ทำการกลั่นรอบที่ 2 ได้เอทานอลบริสุทธิ์ 99% (v/v) ได้ปริมาณ 740 มิลลิลิตร

4.1.4.1 สรุปการกลั่นเอทานอลจากการหมักแอลกอฮอล์

จากขั้นตอนการกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์ 99% โดยทำการกลั่นจากน้ำหมักจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 พบว่าการกลั่นรอบที่ 1 จุดเดือดของเอทานอลค่อนข้างสูง ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลต่ำลง จึงต้องทำการกลั่นซ้ำรอบที่ 2 เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์เป็น 99% ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล 720 มิลลิลิตร และ 740 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่าการกลั่นซ้ำ ทำให้ปริมาณเอทานอลบางส่วนหายไป เนื่องจากเอทานอลมีคุณสมบัติระเหยง่าย และทั้งนี้กระบวนการกลั่นของเครื่องกลั่นไม่ได้ผ่านการปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพเพื่อการหมักนี้ก่อน และจากปริมาณการหมัก 20 ลิตร ในกระบวนการหมักเอทานอลผู้วิจัยทำการกรอง แยกน้ำหมัก ทำให้ปริมาณน้ำหมักบางส่วนหายไปจึงมีผลต่อปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลง โดยปริมาณเอทานอลบริสุทธิ์ 99% ที่กลั่นได้คิดเป็น 23.43% และ 23.35% ตามลำดับของปริมาณเอทานอลที่ควรจะได้จริง

4.2 อภิปรายผล

จากการทดลองหมักเอทานอลจากส่วนเหลือทิ้งของขนุน โดยคัดเลือกจากจุลินทรีย์ 4 กลุ่มสายพันธุ์ คือ เชื้อธรรมชาติ จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก ยีสต์ *S.cerevisiae* EC 118 ยีสต์

S. cerevisiae EDV 492 ในขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุด คือ จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงสุด เมื่อพัฒนากระบวนการหมักเป็นขนาดกลาง โดยในขั้นตอนการหมักให้ได้น้ำตาลใช้การต้มด้วยความร้อนและหมักต่อด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่าใช้เวลาในการหมักนาน ผลงานวิจัยจึงสอดคล้องกับผลที่ได้จากงานวิจัยของณัตติญา จันทวงษา, (2553) เนื่องจากในการหมักให้ได้น้ำตาล นั้นสามารถทำได้โดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งสามารถทำได้ในสภาวะปกติและมีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ว่าการย่อยทางชีวภาพต้องอาศัยเวลาที่ยาวนานมากจึงไม่ค่อยเหมาะสมกับการนำมาใช้จริง ในกระบวนการหมักเอทานอล พบว่าปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและพบว่าหยุดชะงัก เมื่อเอทานอลที่ควมเข้มข้นสูงสุดที่ 16% (v/v) เนื่องจากยีสต์เจริญในสับสเตรทที่มีน้ำตาล โดยยีสต์จะเมทาบอริซึมน้ำตาล โดยวิถีไกโคไลซีส เปลี่ยน glucose-6-phosphate ไปเป็น pyruvate จากนั้นถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอล กล่าวคือ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในของเหลว (TSS) มีค่าลดลง ทำให้ปริมาณเอทานอลมีค่าเพิ่มสูงขึ้น เมื่อปริมาณเอทานอลสูงมากกว่า 7% (v/v) การเจริญของยีสต์จะช้าหรือชะงัก แต่จะสามารถผลิตเอทานอลได้จนถึง 16% (v/v) (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) แม้ว่าในทางทฤษฎีที่น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 51% (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้) และได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อีก 49% (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้) (วนิดา ปานอุทัย และคณะ, 2553) แต่ความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ขึ้นอยู่กับสารอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม จากการศึกษาที่ใช้ส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่สูงจะเหมาะสมในการศึกษาการผลิตเอทานอลได้ พบว่าการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลได้สูงสุด สามารถคัดเลือกได้จุลินทรีย์จำนวน 2 กลุ่มสายพันธุ์ ดังนี้ จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก ที่ให้เอทานอลสูงสุดที่ 16% (v/v) ใช้ระยะเวลาการหมัก 10 วัน และยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 16% (v/v) ใช้ระยะเวลาการหมัก 8 วัน กระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องสามารถทำได้โดยไม่ต้องกำจัดเชื้อธรรมชาติออกจากน้ำหมักก่อน แต่จำเป็นต้องแยกน้ำหมักออกจากกากหมักที่เหลือ นอกจากนี้ พบว่ามีความจำเป็นต้องมีการเพิ่มน้ำตาลหากต้องการหมักในระยะสั้นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลที่สูงตามที่ต้องการ ในกระบวนการกลั่นเอทานอลบริสุทธิ์ 99% โดยทำการกลั่นจากน้ำหมักจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ได้ปริมาณเอทานอล 720 มิลลิลิตร และ 740 มิลลิลิตร ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาการนำส่วนเหลือทิ้งของขนุน อันได้แก่ เปลือก ซัง และแกนขนุน เพื่อการผลิตเอทานอล ผู้วิจัยเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทดสอบดูประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลและเอทานอลทั้งหมด 4 กลุ่มสายพันธุ์ คือ เชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติ เชื้อจุลินทรีย์จากแป้งข้าวหมาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการพัฒนาหาวิธีหมักเอทานอลจากส่วนเหลือทิ้งของขนุนที่เหมาะสม โดยศึกษาจากกระบวนการย่อยน้ำตาลและกระบวนการหมักเอทานอลของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มสายพันธุ์ ผู้วิจัยสามารถสรุปผลและข้อเสนอแนะบางประการไว้ ดังต่อไปนี้

5.1 สรุปผล

จากการพัฒนาวิธีการผลิตเอทานอลจากส่วนเหลือทิ้งของผลขนุนทำให้สามารถสรุปได้ว่าส่วนเหลือทิ้งของขนุนมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล ในขั้นตอนการหมักให้ได้น้ำตาล ผู้วิจัยปรับสภาพกระบวนการหมักด้วยใช้ความร้อนช่วยย่อยส่วนเหลือทิ้งของขนุนและหมักต่อด้วยเชื้อธรรมชาติ พบว่ากระบวนการย่อยน้ำตาลเป็นไปได้อย่างช้า เพราะจำเป็นต้องใช้เวลาในการที่จุลินทรีย์กำจัดส่วนลิกโนเซลลูโลส (อย่างน้อย 2-3 สัปดาห์) กระบวนการหมักจึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลานาน เพราะโครงสร้างที่ซับซ้อนของลิกโนเซลลูโลสขัดขวางการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ ผู้วิจัยจึงต้องเติมน้ำตาลกลูโคส เพื่อเป็นแหล่งอาหารที่มากและเพียงพอสำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้หมักเอทานอล

ขั้นตอนการหมักเอทานอลใช้จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากและยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25% Brix จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก ให้เอทานอลสูงสุดที่16% (v/v) ในระยะเวลา 10 วัน และยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ให้เอทานอลสูงสุดที่ 16% (v/v) ในระยะเวลา 8 วัน เนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ ดังนั้นในการพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลครั้งนี้ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 มีประสิทธิภาพมากกว่าจุลินทรีย์แป้งข้าวหมากในกระบวนการหมักเอทานอลที่ใช้วัตถุดิบ คือ ส่วนเหลือทิ้งของขนุน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมด้วย

ขั้นตอนการกลั่นเอทานอล หลังจากการกลั่นรอบที่ 2 ผู้วิจัยสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์เป็น 99% โดยปริมาตร โดยเชื้อจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากสามารถให้เอทานอลในปริมาณ 720 มิลลิลิตร ในขณะที่ยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 สามารถให้เอทานอลปริมาณ 740 มิลลิลิตร และพบว่าการกลั่นซ้ำครั้งที่ 2 มีผลทำให้ปริมาณเอทานอลลดลงตามไปด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาและพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลจากส่วนเหลือทิ้งของขนุนในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้พบปัญหาและอุปสรรคบางประการที่สามารถสรุปไว้ในที่นี้ ทั้งนี้จะรวมทั้งข้อเสนอแนะเพื่อการปรับปรุงแก้ไขการทดลอง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาในโอกาสต่อไป โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

5.2.1 ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาครั้งนี้

1. จากการศึกษากระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตและลิกโนเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลของจุลินทรีย์ พบว่าประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลของจุลินทรีย์เป็นไปได้ช้าต้องใช้เวลาหมักค่อนข้างนาน เพื่อให้ได้น้ำตาลที่มากพอในกระบวนการหมักเอทานอลต่อไป

2. จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากเหมาะแก่การนำมาใช้ย่อยเบื้องต้น เพื่อเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาล แต่ไม่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอลเท่ากับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118

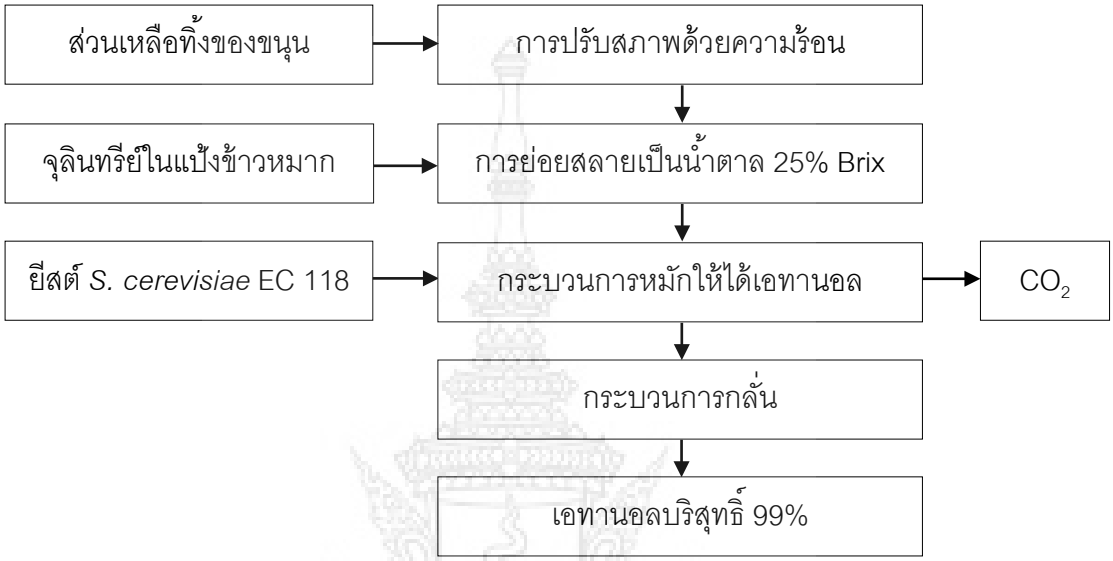
3. ในกระบวนการหมักขนาดกลาง (ปริมาณการหมัก 20 ลิตร) เมื่อกลั่นให้ได้เอทานอลที่บริสุทธิ์ 99% ต้องมีการกลั่นครั้งที่ 2 และพบมีการสูญเสียเอทานอลไปในระหว่างการกลั่น ทั้งนี้เนื่องจากระบบกลั่นต้องปรับสภาวะให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่จะนำมากลั่นและสารเจือปนที่ต่างกัน จึงทำให้จุดเดือด จุดควบแน่นของเอทานอลเปลี่ยนแปลงไป และทั้งนี้เครื่องกลั่นเป็นเครื่องที่ประกอบเพื่อใช้ในการกลั่นระดับเล็ก เหมาะในการทดสอบคุณภาพของเอทานอลจึงต้องมีการออกแบบเครื่องที่เหมาะสมกับการกลั่นในระดับขนาดกลางและใหญ่ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้แม่นยำ การป้องการรั่วไหลของเอทานอล ในขณะกลั่นจำเป็นต้องควบคุมให้ดีขึ้น ทั้งนี้จำเป็นต้องใช้งบประมาณในการผลิตเครื่องกลั่นที่สูง แล้วได้ปริมาณเอทานอลน้อยจึงไม่คุ้มกับการลงทุน

5.2.2 ข้อเสนอแนะในการศึกษาครั้งต่อไป

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดและการทำงานของจุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำตาลแล้วนำไปใช้ประโยชน์ อาจนำผลที่ได้ไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้น

2. ควรปรับเปลี่ยนชนิดวัตถุดิบ วิธีการปรับสภาพ ปริมาณการหมักและกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้หมักเอทานอลเพื่อปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น

จากที่กล่าวมาเบื้องต้นผู้วิจัยได้พบปัญหาและอุปสรรคบางประการและได้ให้ข้อเสนอแนะเพื่อการปรับปรุงแก้ไขการทดลอง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาในโอกาสต่อไป เพื่อความเข้าใจมากยิ่งขึ้นผู้วิจัยได้เสนอแผนภาพการทดลองที่ใช้สำหรับการศึกษาครั้งต่อไป ดังภาพ 5.1



ภาพ 5.1 ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ แก้วแกมเสือ. 2547. “**การศึกษาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักการน้ำตาลในโรงงาน บริษัท แสงโสม จำกัด จ.กาญจนบุรี**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ). คณะเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

กนกวรรณ รวมชัย และคณะ. 2555. “การผลิตเอทานอลจากลำไยอบแห้งที่มีคุณภาพต่ำ.” **การประชุมวิชาการสมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย**. 9, 13 (4-5 เมษายน) : 385-389.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และคณะ. 2550. **เทคโนโลยีการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากข้าว**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โครงการพัฒนาการศึกษาที่เป้าหมายสัมพันธ์กับการแก้ไขปัญหาเศรษฐกิจของประเทศมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กฤษณะ แก้วมณี. 2549. “**การศึกษาความเป็นไปได้ของเครื่องกลั่นเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยพลังงานแสงอาทิตย์**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาครุศาสตร์อุตสาหกรรมมหาบัณฑิต. (ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล). คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ไกรยศ แซ่ลิ้ม. 2550. “**การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อลูกแป้ง**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ). คณะวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คุณากร เชื้อสุวรรณ์. 2548. “**การคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ). คณะวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. มหาวิทยาลัยบูรพา.

เครื่องวัดความหวาน. 2556. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : http://www.lek11.com/product.detail_0_en_59266, 9 กุมภาพันธ์ 2556.

จิระเดช ฮายุกต์ และวิทยา เทพไพฑูรย์. 2555. “**การแยกของผสมเอทานอล-น้ำโดยกระบวนการดูดซับ**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาวิศวกรรมเคมี). คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ณัฐกานต์ ยิ้มวารี และ กิตติชัย ไตรรัตนศิริชัย. 2554. “การกลั่นเอทานอลจากข้างฟ่างหวานด้วยกระบวนการรีฟลักซ์.” **สารวิจัย มข. (บศ.)**. 11, 4 (ตุลาคม-ธันวาคม) : หน้า 19-28.

ณัตติญา จันทวงษา. 2553. “**การพัฒนาการแปรรูปเปลือกทุเรียนและเปลือกกล้วยน้ำว้าเป็นน้ำตาล สำหรับการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร). คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์. 2552. **การผลิตเอทานอลจากกากปาล์ม**. รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.

ดาวัลย์ ฉิมภู่. 2551. **ชีวเคมี**. พิมพ์ครั้งที่ 3. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

ไตรวุฒิ นพรัตน์. 2552. “อนาคตอุตสาหกรรมเอทานอลไทย.” **สารวิจัยธุรกิจ**. ปีที่ 13, ฉบับที่ 23 (สิงหาคม) : หน้า 2.

ทัศนีย์ เจียรพสุอนันต์. 2545. “**การผลิตเอทานอลจากขยะเศษอาหาร**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม). คณะพลังงานและวัสดุ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ธราพงษ์ วิฑิตศานต์ และคณะ. 2553. **รายงานสถานภาพของการวิจัยและผลิตเอทานอลไบโอดีเซล ไบโอแก๊สและน้ำมันชีวภาพในประเทศไทย**. สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว), กรุงเทพฯ.

บัญชา โลหรัตน์, สินินาฏ จงคง และ ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์. 2554. “การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากเมล็ดขนุนสดและเมล็ดขนุนที่ผ่านการพรีไบโอติกส์.” **การเปรียบเทียบ**. 42, 1 (มกราคม-เมษายน) : 675-678.

บุญรอด วงษ์สวาท. 2555. **สารประกอบอินทรีย์**. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd.htm, 27 กุมภาพันธ์ 2556.

ปนิดา กิตติรัตน์หมาย. 2546. “**การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตกตะกอนและเทคนิครีพีทเฟดแบทช์**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ภาควิชาจุลชีววิทยา). คณะวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ปิยะพร ปะระมะ และคณะ. 2551. “**การผลิตเอทานอลจากการหมักข้าวเปลือกด้วยวิธีบดหยาบ**.” รวมบทความวิชาการ เล่มที่ 3 การประชุมวิชาการเครือข่ายวิศวกรรมเครื่องกลแห่งประเทศไทยครั้งที่ 22. (ตุลาคม). มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.

ปรียารัตน์ โยวะผุย. 2550. “**การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมักจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวเคมี). คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

พรพจน์ นาราคาม และคณะ. 2547. “**การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกและแกนสับปะรดโดยการหมักแบบกะ**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาวิศวกรรมเคมี). คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

รัชนีกร หมวดพล. 2552. “**การผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae***.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ภาควิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม). คณะวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วัชรา กาญจนรัช. 2550. ลักษณะของแบคทีเรียกรดน้ำส้มทนอุณหภูมิที่แยกจากลูกแป้งส่าเหล้าและลูกแป้งข้าวหมาก. **วารสาร มมส**. ฉบับที่ 26 : หน้า 16-23.

วัฒนชัย ภัทรเธียรสกุล. 2553. “**ศักยภาพการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสในประเทศไทย**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการพลังงาน). คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วนิดา ปานอุทัย และคณะ. 2553. “**การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน**.” ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร. สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ.

วีระพงศ์ พรสมิทธิกุล. 2552. “**การสกัดพรีไบโอติกส์จากเปลือกด้านในและเม็ดขุนด้วยกระบวนการแบบต่อเนื่อง**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาวิศวกรรมเคมี). คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

วรายุทธ เนติกาน และ นภดล เล็กสวัสดิ์. 2551. “**การผลิตเอทานอลและการผลิต R-phenylacetylcarbinol จากสารผสมระหว่างกากของแข็งที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องและกากน้ำตาล**.” คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. กรุงเทพฯ.

วิโรจน์ พุทธวิถี. 2553. **รู้จักเอทานอล**. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : http://water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37, 9 ธันวาคม 2555.

สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ และ เดโช ขุนนคร. 2555. “**พลังงานทดแทนในวิถีพอเพียง**” วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ ศิริโภค. 2550. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ.

สมถวิล พรอินทร์. 2551. “**ความสามารถในการผลิตเอทานอลของ *Candida shehatae* จากกลูโคสและไซโลส**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ). คณะเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สิริลักษ์ เพ็ชรขาว. 2542. “**สมบัติทางกายภาพและทางความร้อนของเนื้อขนุน**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. (ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร). คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. **ยีสต์และเทคโนโลยียีสต์**. (ภาควิชาจุลชีววิทยา). คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง, มาลี สุวรรณอัตถ์, Toshiomi Yoshida และ Hisaharu Taguchi. 2529. อิทธิพล ของเกลืออนินทรีย์บางชนิดต่อการเจริญ และการหมักแอลกอฮอล์ของ Saccharomyces cerevisiae AM 12. **วารสารเกษตรศาสตร์**. 20 (20) : 186-197.

ศกุนตลา ภู่เจริญ. 2551. “**ประสิทธิภาพการใช้พลังงานในการผลิตเอทานอลโดยใช้มันสำปะหลังและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการพลังงาน). คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อุปกรณ์ใช้วัดแอลกอฮอล์. 2556. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : www.thebrewshopuk.com, 9 กุมภาพันธ์ 2556.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

อภิชาติ บุญทาวัน. 2548. “**การศึกษาการพัฒนาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องจากกากน้ำตาลอ้อย โดยใช้เชื้อยีสต์** ***Saccharomyces cerevisiae.***” รายงานการวิจัย. (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ). คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อัมพิกา ทั่งพรม. 2549. “**การพัฒนาวิธีการผลิตเอทานอลจากซังขนุน ชานอ้อย และกากมะพร้าว**.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. (ภาควิชาเคมี). คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม.

Hamelinck, C.N., Ven Hooijdonk, G. and Faaij, A.P.C., 2005, “Ethanol from lignoellulosic biomass : techno-ecnomic performance in short, middle and long-term” , **Biomass and Bioenergy**, Vol.28, pp. 384-410.

Kamada, K. and M. Marata. 1984. On the mechanism of brewer’s yeast flocculation. **Agric. Biol. Chem.** 48 (10) : 2423-2433

Kiransree, N., M. Sridhar and L. Venkateswar Rao. 2000. Characterisation of thermotolerant, ethanol tolerant termentative *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioproc. Eng.** 22 : 243-246

Mishima, D., Tateda, M., Ike, M. and Fujita, M., 2006, “Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes” , **Bioresource Technology**, Vol. 97, pp. 2166-2172

Sridhar, M., N. Kiransree and L. Venkateswar Rao. 2002. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *saccharomyces cerevisiae* VS_1 and VS_3 strains. **Bioresouree Tech.** 83 : 199-202

Szezodrak, J. and Targonski, Z., 1988, “Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose”, **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 31, pp. 300-303

Vino-o-meter. 2556. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : http://www.stillcooker.com/materials-vinometer.php, 9 กุมภาพันธ์ 2556.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์

ภาคผนวก ข ผลการทดลอง

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์

1. การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand Refractometer

1.1 หลักการ

สารละลายที่มีเข้มข้นต่างกันเมื่อแสงส่องผ่าน จะเกิดการหักเห และให้ค่าดัชนีหักเหของแสงต่างกันซึ่งจากความสัมพันธ์ดังกล่าวจึงนำมาประยุกต์ใช้วัดค่าความเข้มข้นของสารละลายได้

การใช้ Hand Refractometer วัดน้ำปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เพื่อใช้ประเมินความหวาน (Sweetness) เช่น กลูโคส (Glucose) ฟรุกโตส (Fructose) ซูโครส (Sucrose) ซึ่งค่า Brix ที่อ่านเป็นค่ารวมของความเข้มข้นน้ำตาลทุกชนิดและกรดอินทรีย์ที่ละลายได้ในน้ำหมักนั้น

1.2 วิธีการ

1.1.1 ใช้ผ้าสะอาดนุ่มซับน้ำทำความสะอาดปริซึมของเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์และเช็ดให้แห้ง

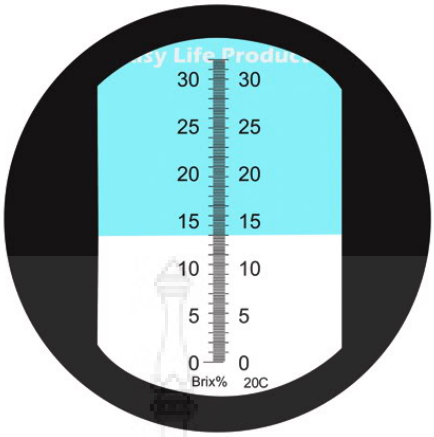
1.1.2 หยดน้ำกลั่นลงบนปริซึม 1-2 หยด ปิดฝาครอบ เพื่อให้น้ำกลั่นกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นมองผ่านเลนส์ตา และปรับตัวเลขให้เป็น “0” เมื่อปรับแล้วให้ทำความสะอาดปริซึมอีกครั้ง

1.1.3 ใช้หลอดดูดตัวอย่างที่ต้องการวัดแล้วหยดลงบนปริซึม 1-2 หยด

1.1.4 ปิดฝาครอบเพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วพื้นผิวปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เพราะจะทำให้ค่าที่อ่านได้ผิดไป

1.1.5 มองเลนส์ตา และอ่านค่าที่ระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นที่สีฟ้า ดังภาพ ก.1 ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (จำนวนกรัมของสารที่ละลายได้ ต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง)

1.1.6 ใช้กระดาษเช็ดเลนส์เช็ดตัวอย่างที่ติดอยู่กับปริซึมออกและทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง



ภาพ ก.1 แสดงลักษณะการอ่านค่า Hand Refractometer

ที่มา : http://www.lek11.com/product.detail_0_en_59266 (2556)

ภาพ ก.2 แสดงเครื่อง Hand Refractometer

2. การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ Vino-o-Meter

2.1 หลักการ

วิธีน้ำใช้ง่าย สะดวก อุปกรณ์เป็นหลอดแก้วเล็ก ๆ ใช้วัดปริมาณแอลกอฮอล์ (%v/v) เป็นอุปกรณ์ที่อาศัยความถ่วงจำเพาะและอาจค่าจะเพี้ยนไปขึ้นอยู่กับของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลายนั้น

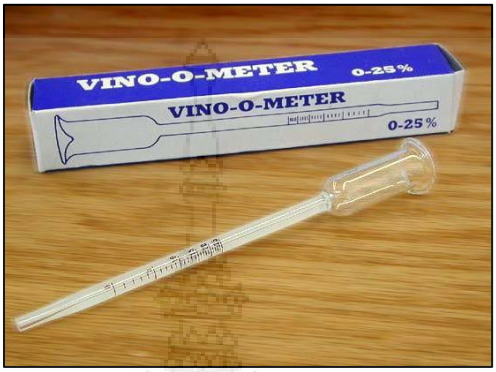
2.2 วิธีการ

2.2.1 ทำความสะอาด Vino-o-Meter ด้วยน้ำกลั่น และซับน้ำให้แห้ง

2.2.2 ดูดสารละลายใส่ช่องว่างด้านบน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ สารละลายจะไหลลงสู่ด้านปลายของ Vino-o-Meter ดังภาพ ก.5

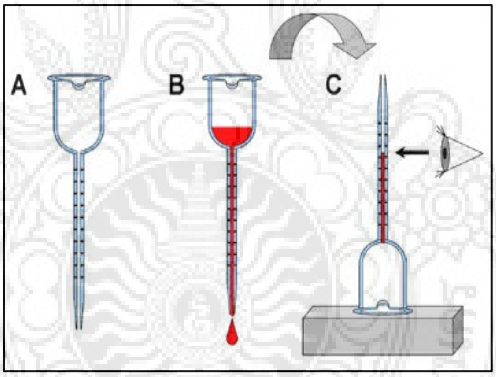
2.2.3 เมื่อสารละลายไหลสู่ปลายของ Vino-o-Meter แล้วคว่ำเพื่ออ่านค่าแอลกอฮอล์ที่ได้ ดังภาพ ก.5

2.2.4 ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น % (v/v)



ภาพ ก.3 แสดง Vino-o-Meter อุปกรณ์ใช้วัดแอลกอฮอล์

ที่มา : www.thebrewshopuk.com (2556)



ภาพ ก.4 แสดงขั้นตอนการวัดแอลกอฮอล์ โดย Vino-o-Meter

ที่มา : http://www.stillcooker.com/materials-vinometer.php (2556)

ภาคผนวก ข
ผลการทดลอง

1. ผลการทดลองขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์

ตาราง ข.1 การใช้น้ำตาล (%Brix) ของจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอทานอลในขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์

วันที่	ตัวควบคุม	เชื้อธรรมชาติ	แป้งข้าวหมาก	*S. cerevisiae* EDV492	*S. cerevisiae* EC118
เริ่มต้น	5	5	5	5	5
5	5	3	4	4	3
10	4	3	4	4	3
15	3	3	3	4	2
20	2	2	3	2	2

ตาราง ข.2 การใช้น้ำตาล (%Brix) ของจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอทานอลในขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์หลังจากปรับด้วยโมลาส 40 มิลลิลิตร

วันที่	ตัวควบคุม	เชื้อธรรมชาติ	แป้งข้าวหมาก	*S. cerevisiae* EDV492	*S. cerevisiae* EC118
เริ่มต้น	2	2	3	2	2
หลังปรับด้วยโมลาส	22	22	23	22	22
3	22	19	19	21	20
6	22	16	15	17	16
9	21	12	11	14	14
12	21	9	8	10	9

2. ผลการทดลองขั้นตอนการหมักขนาดเล็ก (คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม)

2.1 ส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม

ตาราง ข.3 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลของขวดควบคุมในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม

วันที่	Control	
	น้ำตาล (%Brix)	**เอทานอล** (%v/v)
7	2	2
14	2	2
21	2	3
28	2	2

ตาราง ข.4 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มีเชื้อธรรมชาติในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม

วันที่	**เชื้อธรรมชาติ**	
	น้ำตาล (%Brix)	**น้ำตาล** (%v/v)
7	4	6
14	4	8
21	3	8
28	3	6

ตาราง ข.5 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มีจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม

วันที่	**จุลินทรีย์แป้งข้าวหมาก**	
	น้ำตาล (%Brix)	**เอทานอล** (%v/v)
7	3	8
14	4	10
21	3	12
28	3	7

ตาราง ข.6 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม

วันที่	**ยีตส์** *S. cerevisiae* EDV 492	
	น้ำตาล (%Brix)	**เอทานอล** (%v/v)
7	3	9
14	3	11
21	2	11
28	3	7

ตาราง ข.7 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม

วันที่	**ยีตส์** *S. cerevisiae* EC 118	
	น้ำตาล (%Brix)	**เอทานอล** (%v/v)
7	3	9
14	2	12
21	2	13
28	2	6

2.2 **ส่วนเหลือทิ้งของขนุนไม่ต้ม**

ตาราง ข.8 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลของขวดควบคุมในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม

วันที่	Control	
	น้ำตาล (%Brix)	**เอทานอล** (%v/v)
7	2	2
14	3	2
21	3	3
28	2	3

ตาราง ข.9 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มีเชื้อธรรมชาติในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม

วันที่	**เชื้อธรรมชาติ**	
	น้ำตาล (%Brix)	**น้ำตาล** (%v/v)
7	6	7
14	5	10
21	4	9
28	4	6

ตาราง ข.10 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มีจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมากในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม

วันที่	**จุลินทรีย์แป้งข้าวหมาก**	
	น้ำตาล (%Brix)	**เอทานอล** (%v/v)
7	5	8
14	5	11
21	5	14
28	6	7

ตาราง ข.11 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EDV 492 ในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม

วันที่	**ยีตส์** *S. cerevisiae* EDV 492	
	น้ำตาล (%Brix)	**เอทานอล** (%v/v)
7	5	7
14	4	10
21	3	10
28	4	7

ตาราง ข.12 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลขวดที่มียีสต์ *S. cerevisiae* EC 118 ในส่วนเหลือทิ้งของขนุนต้ม

วันที่	**ยีตส์** *S. cerevisiae* EC 118	
	น้ำตาล (%Brix)	**เอทานอล** (%v/v)
7	5	10
14	5	11
21	6	13
28	7	8

3. ผลการทดลองขั้นตอนการหมักขนาดกลาง

ตาราง ข.13 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในกระบวนการหมักให้ได้น้ำตาล โดยเชื้อธรรมชาติในถังหมักที่ 1

วันที่	**ถังหมักที่** 1	
	ปริมาณน้ำตาล (%Brix)	**ปริมาณเอทานอล** (%v/v)
7	1	0
14	2	3
21	2	3
28	3	4

ตาราง ข.14 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในกระบวนการหมักให้ได้น้ำตาล โดยเชื้อธรรมชาติในถังหมักที่ 2

วันที่	**ถังหมักที่** 1	
	ปริมาณน้ำตาล (%Brix)	**ปริมาณเอทานอล** (%v/v)
7	1	0
14	2	3
21	2	4
28	3	5

ตาราง ข.15 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในกระบวนการหมักขนาดกลาง ในถังหมักที่ 1 โดยจุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก

วันที่	**จุลินทรีย์ในแป้งข้าวหมาก**	
	ปริมาณน้ำตาล (%Brix)	**ปริมาณเอทานอล** (%v/v)
เริ่มต้น	25	4
2	19	5
4	12	11
6	12	12
8	10	13
10	7	16
12	7	16

ตาราง ข.16 ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลในกระบวนการหมักขนาดกลาง ในถังหมักที่ 2 โดยยีสต์ *S. cerevisiae* EC 118

วันที่	**ยีสต์** *S. cerevisiae* EC 118	
	ปริมาณน้ำตาล (%Brix)	**ปริมาณเอทานอล** (%v/v)
เริ่มต้น	25	5
2	17	7
4	11	14
6	9	15
8	8	16
10	8	16
12	8	16

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวชัญญา วงค์จันทร์

วัน เดือน ปีเกิด 7 มิถุนายน 2534

ภูมิลำเนา อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี

ประวัติการศึกษา

ระดับมัธยมศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนรัตนาธิเบศร์ จังหวัดนนทบุรี พ.ศ.2550

ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สาขาวิชาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร พ.ศ. 2555

ทุนการศึกษา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมสิ่งประดิษฐ์และนวัตกรรมเพื่อคนรุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวเนตรนภิศ น้อยทิม

วัน เดือน ปีเกิด 9 เมษายน 2534

ภูมิลำเนา อำเภอบางระจัน จังหวัดสิงห์บุรี

ประวัติการศึกษา

ระดับมัธยมศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนบางระจันวิทยา จังหวัดสิงห์บุรี พ.ศ.2550

ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สาขาวิชาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร พ.ศ. 2555

ทุนการศึกษา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมสิ่งประดิษฐ์และนวัตกรรมเพื่อคนรุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร