



## รายงานการวิจัย

การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งขนมจีน

Production of Biofuel from Waste of Traditional Thai  
Vermicelli Production Plant

ศรีอุบล ทองประดิษฐ์

Sriubol THONGPRADISTHA

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557-2558

## การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งขนมจีน

ศรีอุบล ทองประดิษฐ์<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งขนมจีน โดยศึกษากระบวนการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งความเข้มข้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่าจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ  $497.91 \pm 0.69$  กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design (ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup>) แล้วหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 แล้วทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> จะได้สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล คือ ไม่ต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนลงในน้ำหมักก่อนทำการหมักด้วยเชื้อยีสต์ แต่ต้องปรับพีเอชของน้ำหมักเริ่มต้นให้เท่ากับ 4.5 ก่อนทำการหมักด้วยยีสต์ และควบคุมอุณหภูมิในการหมักให้ได้เท่ากับ 32.5 องศาเซลเซียส (ในทางปฏิบัติสามารถปรับตั้งค่าอุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียสได้) ซึ่งจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.27 ที่ระยะเวลาการหมัก 8 วัน แต่ในการปฏิบัติการขยายปริมาณการผลิตเป็น 18 ลิตร ต้องปรับรูปแบบการหมักจากแบบกะมาเป็นการหมักแบบกึ่งกะ และใช้เวลานานขึ้นเป็น 30 วัน เมื่อนำน้ำแป้งแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อยีสต์ปริมาตร 40 ลิตร มากลั่นให้เอทานอลมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ  $92.50 \pm 0.71$  ปริมาตร 2.295 ลิตร และมีผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อปริมาตรเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 5.74 เมื่อนำเอทานอลที่ผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์แล้วมาผลิตเป็นเอทานอลเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอลล์) เบนซินออกเทน 91 ได้ปริมาตรเท่ากับ 7.80 ลิตร สามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์ขนาดเล็กได้

**คำสำคัญ :** แป้งขนมจีนเหลือทิ้ง, เอทานอล, กรดซัลฟิวริก, Box-Behnken Design, พื้นผิวตอบสนอง, แก๊สโซฮอลล์

<sup>1</sup> อาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช

## Production of Biofuel from Waste of Traditional Thai Vermicelli Production Plant

Sriubol THONGPRADISTHA<sup>1</sup>

### Abstract

A research was aimed to produce bioethanol derived from waste of Traditional Thai Vermicelli by investigation of hydrolysis process of the waste at the concentration of 20% using 5% sulfuric acid and enzyme. It revealed that its reducing sugar content derived by 5% sulfuric acid digestion was higher than by  $\alpha$ -amylase degradation method or was equivalent to  $497.91 \pm 0.69$  g/ml. The optimization condition of ethanol fermentation by sulfuric acid digestion was carried out by using Box-Behnken Design (Design-Expert<sup>®</sup>-related application software) and was further fermented by 10% starter of *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 and prediction of proper parameters related to bioethanol fermentation from waste of Traditional Thai vermicelli production plant by Response Surface Methodology (RSM) using Design Expert<sup>®</sup> software. It was clearly demonstrated that optimized condition of bioethanol production was no supplementation of ammonium sulfate as nitrogen source into fermentation broth prior to yeast fermentation was carried out but it required to adjust its initial pH to be 4.5 before the fermentation and temperature control throughout fermentation process was 32.5°C (in practice, temperature should be adjusted to be 33°C) with maximum ethanol concentration of 8.27% for 8 days' fermentation. However, on the large scale of fermentation (18 liter), the fermentation process should be performance into fed-batch fermentation and fermentation time should be extended to 30 days. After 40 Liter waste of traditional Thai vermicelli production plant was fermented yeast starter, the distillation process was begun, its final volume of distilled ethanol was 2.295-liter which concentration was  $92.50 \pm 0.71\%$ . The final yield of distilled ethanol per the initial of Thai Rice Vermicelli Waste Starch volume was 5.74. Finally, the production of biofuel (gasohol) by mixing the purified ethanol with 91 octane number gasoline oil, its final volume was 7.80-liter and could be successfully used as fuel for small engine.

**Key words:** Thai Rice Vermicelli Waste Starch, Ethanol, Sulfuric Acid, Box-Behnken Design, Response Surface Methodology, Gasohol

---

<sup>1</sup> Lecturer, Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thung Yai, Nakhon Si Thammarat.

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อ   | ก    |
| Abstract   | ข    |
| สารบัญ   | ค    |
| สารบัญตาราง  | ง    |
| สารบัญรูป  | ฉ    |
| บทที่  |      |
| 1. บทนำ  | 1    |
| 1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย        | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย                        | 2    |
| 1.3 ขอบเขตการวิจัย                                 | 2    |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ                      | 3    |
| 2. ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย | 4    |
| 3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ                        | 20   |
| 4. ผลและวิจารณ์                                    | 28   |
| 5. บทสรุป และข้อเสนอแนะ                            | 44   |
| เอกสารอ้างอิง                                      | 46   |
| ภาคผนวก  |      |
| ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ                                | 50   |
| ข. วิธีการวิเคราะห์                                | 50   |
| ค. ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน                       | 57   |
| ง. การเผยแพร่ผลงานวิจัย                            | 59   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |   | หน้า |
|----------|---|------|
| 2.1      | เปรียบเทียบปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ   | 6    |
| 3.1      | ชุดการทดลองสำหรับศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®                         | 24   |
| 4.1      | องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำแข็งนมจืดเหลือทิ้ง   | 28   |
| 4.2      | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำแข็งนมจืดเหลือทิ้งที่ความเข้มข้น เริ่มต้น 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ 10 และ 20 ยูนิต ระยะเวลาในการย่อย 20 ชั่วโมง                                    | 29   |
| 4.3      | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำแข็งนมจืดเหลือทิ้งที่ความเข้มข้น เริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต พีเอช เท่ากับ 5, 6 และ 7 ระยะเวลาในการย่อย 20 ชั่วโมง | 30   |
| 4.4      | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากย่อยน้ำแข็งนมจืดเหลือทิ้งที่ความเข้มข้น เริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ  | 30   |
| 4.5      | ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®                           | 32   |
| 4.6      | การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยในการหมัก ต่าง ๆ ต่อปริมาณเอทานอลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®  | 33   |
| 4.7      | ปริมาณเอทานอลและผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้จากหมักน้ำแข็งนมจืดเหลือทิ้งให้มีความเข้มข้นร้อยละ 50 ด้วยเครื่องกลั่นลำดับส่วน อุณหภูมิที่กลั่น 90 องศาเซลเซียส และเวลาที่กลั่น 60 นาที            | 39   |
| 4.8      | ปริมาณเอทานอลและผลได้ของเอทานอลที่กลั่นจากเอทานอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 54 ด้วยเครื่องสกัดของแข็ง-ของเหลว อุณหภูมิที่กลั่น 84 องศาเซลเซียส และเวลาที่กลั่น 60 นาที                    | 40   |
| 4.9      | ปริมาณเอทานอลและผลได้ของเอทานอลที่กลั่นจากเอทานอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 88 ด้วยเครื่องสกัดของแข็ง-ของเหลว อุณหภูมิที่กลั่น 84 องศาเซลเซียส และเวลาที่กลั่น 60 นาที                    | 40   |
| 4.10     | ปริมาณน้ำในเอทานอลที่ถูกดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟที่ปริมาณต่าง ๆ  | 41   |
| 4.11     | ความเข้มข้นของเอทานอลหลังผ่านตัวดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟที่อุณหภูมิและ ระยะเวลาในการดูดซับต่าง ๆ   | 42   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ |   | หน้า |
|----------|---|------|
| 4.12     | ปริมาณและความเข้มข้นของเอทานอลที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในคอลัมน์ที่มีโมเลกุลาร์ซีฟร้อยละ 25 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเวลาในการดูดซับ 50 นาที | 43   |
| 4.13     | การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากเอทานอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว  | 43   |



สารบัญรูป

| รูปที่ |  | หน้า |
|--------|--|------|
| 2.1    | ปฏิกิริยาของน้ำตาลในกระบวนการหมัก  | 6    |
| 2.2    | การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมัก   | 8    |
| 2.3    | สมการเคมีของกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาล   | 8    |
| 2.4    | กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง  | 9    |
| 2.5    | กระบวนการแยกน้ำออกจากเอทานอลโดยเทคโนโลยีโมเลกุลาร์ซีฟ  | 10   |
| 2.6    | การแยกน้ำออกจากเอทานอลโดยกระบวนการกลั่นอะซีโโทรป   | 11   |
| 2.7    | การแยกน้ำออกจากเอทานอลโดยกระบวนการอีแวปเพอเรชัน  | 12   |
| 2.8    | หากลั่นแบบ Homogeneous Azeotropic Distillation   | 14   |
| 2.9    | หากลั่นแบบ Heterogeneous Azeotropic Distillation - Direct sequences  | 14   |
| 2.10   | หากลั่นแบบ Heterogeneous Azeotropic Distillation - Indirect sequences  | 15   |
| 2.11   | ภาพถ่ายเซลล์เดี่ยวของเชื้อ <i>Zymomonas mobilis</i> ZM 4 (A) และตะกอนเซลล์กลายพันธุ์ <i>Zymomonas mobilis</i> ZM 401(B)  | 15   |
| 4.1    | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ยูนิต ที่เวลาต่าง ๆ   | 29   |
| 4.2    | กราฟพื้นผิวตอบสนองของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการหมักเอทานอลสูงสุด  | 34   |
| 4.3    | ปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design-Expert® ที่ค่าความพอใจสูงสุดเท่ากับ 0.981   | 35   |
| 4.4    | ปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด โดยการกำหนดค่าอุณหภูมิสูงสุด (maximize) ที่ 35°C ค่าพีเอช (target) ที่ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมน้อยที่สุด (minimize) ที่ 0 กรัมต่อลิตรในโปรแกรม Design-Expert® Software Version 9 Free Trial | 36   |
| 4.5    | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอลที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5339 แบบกึ่งกะที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการหมัก 30 วัน   | 38   |
| 4.6    | กราฟเส้นตรงสำหรับหาค่า Langmuir isotherm ระหว่าง $C_e/q_e$ และ $C_e$   | 42   |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

น้ำมันเชื้อเพลิงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยมานาน เนื่องจากแหล่งผลิตในประเทศมีสัดส่วนเพียงเล็กน้อยของการใช้น้ำมันทั้งประเทศ ส่วนใหญ่ต้องพึ่งพาการนำเข้า ประเทศไทยสูญเสียเงินตราต่างประเทศเพื่อนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงกว่าแสนล้านบาท นอกจากนี้ราคาน้ำมันมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ มีการประมาณการอย่างคร่าว ๆ ว่าโลกเราจะมีน้ำมันสำรองใช้ได้อีก 40-50 ปี การคิดค้นแหล่งพลังงานใหม่ ๆ เพื่อทดแทนน้ำมันเกิดขึ้นมานานแล้ว แต่เพิ่งจะเริ่มตื่นตัวกันอย่างจริงจังเมื่อราคาน้ำมันพุ่งขึ้นสูงเกินกว่าที่จะยอมรับได้ในขณะนี้

พลังงานทดแทนมีหลายประเภทด้วยกัน ได้แก่ พลังงานที่ได้จากแก๊สธรรมชาติ แก๊สปิโตรเลียมเหลว ถ่านหิน เอทิลแอลกอฮอล์ หินน้ำมัน พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานความร้อนใต้พิภพ และพลังงานนิวเคลียร์ ซึ่งจะกล่าวถึงรายละเอียดเฉพาะพลังงานที่ได้จากเอทิลแอลกอฮอล์ เพราะกำลังเป็นเรื่องที่สนใจของประชาชนทั่วไป เอทิลแอลกอฮอล์ หรือ เอทานอล เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการหมักผลิตผลหรือเศษเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีส่วนผสมของแป้งหรือน้ำตาล ได้แก่ อ้อย น้ำตาล กากน้ำตาล กากอ้อย ปีทูล (หัวผักกาดหวาน) แป้งมันสำปะหลัง มันเทศ ธัญพืชต่าง ๆ เช่น ข้าวโพดข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง เพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชให้เป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์อีกต่อหนึ่ง แอลกอฮอล์ที่ทำให้บริสุทธิ์ร้อยละ 95 โดยปริมาตร จะเรียกว่า เอทานอล 190 proof (วุฒิชัย และคณะ, 2547) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด ยีสต์ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลาย เพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว และมีปริมาณมาก แต่มีข้อจำกัดในคุณสมบัติบางประการ เช่น สมบัติในเรื่องความทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก ชนิดของแหล่งคาร์บอน เป็นต้น จึงได้มีการพัฒนาเพื่อคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล (ณิรณู และ สุจิตรา, 2550) ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่าเมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน และให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกับยีสต์

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งขนมจีน เป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และมีปริมาณที่สูง ซึ่งหลังจากกระบวนการผลิต ยังคงมีปริมาณแป้งที่สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

ผลผลิตที่ได้สามารถนำไปพัฒนาให้เกิดศักยภาพเชิงพาณิชย์ได้อีก 2 แนวทาง คือ แนวทางแรก เป็นการผลิตเอทานอลโดยผ่านกระบวนการหมัก และการกลั่นเอทิลแอลกอฮอล์ หรือเอทานอล ซึ่งสามารถนำมาผสมน้ำมันเบนซินเป็นแก๊สโซฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์และเครื่องยนต์

เบนซิน แนวทางที่สอง เป็นการผลิตเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์แข็ง โดยนำเอทานอลที่กลั่นได้มา ผสมกับกรดไขมันและต่าง เพื่อแปรรูปเป็นแอลกอฮอล์แข็ง เป็นวัสดุสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงหุงต้มหรือ อุ่นอาหาร การวิจัยนี้เสนอเฉพาะการวิจัยและพัฒนาใช้เอทานอลที่กลั่นได้จากแนวทางแรกเท่านั้น เพื่อมุ่งเป้าหมายนำเอทานอลที่กลั่นได้ไปผสมน้ำมันเบนซินผลิตเป็นแก๊สโซฮอล์ เพื่อพลังงานทดแทนต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 เพื่อเปรียบเทียบกระบวนการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์และกรด
- 2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง
- 2.3 เพื่อพัฒนากระบวนการกลั่นแยกเอทานอลที่ได้จากการหมักและการทำให้บริสุทธิ์
- 2.4 เพื่อศึกษากรรมวิธีการผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิงจากเอทานอลที่กลั่นบริสุทธิ์แล้ว

## 3. ขอบเขตของการวิจัย

3.1 การเปรียบเทียบกระบวนการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์และกรด โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase กับกรดย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกในระดับห้องปฏิบัติการ

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์และเปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก คือ อุณหภูมิ (25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส) พีเอชเริ่มต้น (3.5, 4.5 และ 5.5) และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ 0, 0.05 และ 0.10) โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design (ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® Version 9 Free Trial) แล้วหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 แล้วทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® Version 9 Free Trial และหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลโดยใช้ปัจจัยที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา

3.3 การพัฒนากระบวนการกลั่นแยกเอทานอลที่ได้จากการหมักและการทำให้บริสุทธิ์ โดยทำการหมักน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรด ด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ในระดับที่ขยายขนาดการหมัก แล้วนำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักมาแยกเอทานอลออกโดยใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วน ให้ได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 และนำมากลั่นซ้ำในหอกลั่นลำดับส่วนเพื่อให้ได้เอทานอลร้อยละ 95 จากนั้นจะทำให้บริสุทธิ์ด้วยกรรมวิธีในการแยกน้ำ โดยการใช้โมเลกุลาร์ซีฟ (molecular sieve separation) โดยทำการศึกษาปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟ อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการแยกน้ำออกจากเอทานอล

3.4 การศึกษากรรมวิธีการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอล์) โดยนำเอทานอลที่กลั่นบริสุทธิ์แล้วมาศึกษาอัตราส่วนผสมกับน้ำมันเบนซิน โดยตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีและกายภาพตาม

ข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันแก๊สโซฮอล์ ของกรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน พ.ศ. 2551

#### 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จะได้ผลิตภัณฑ์เอทานอลเพื่อใช้ในการผสมน้ำมันเบนซินเป็นแก๊สโซฮอล์เพื่อเป็นพลังงานทดแทน



## บทที่ 2

### ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้ศึกษาค้นคว้าทฤษฎี แนวคิดจากเอกสารและรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ เพื่อนำมาใช้เป็นกรอบแนวคิดและยุทธวิธีของการวิจัยดังต่อไปนี้

#### 1. ทฤษฎี

##### 1.1 แป้ง

##### 1.1.1 องค์ประกอบของแป้ง

แป้งประกอบด้วยโพลีเมอร์พื้นฐาน 2 ชนิด คือ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน โดยอะไมโลสเป็นโพลีเมอร์เชิงเส้น ที่ประกอบด้วยกลูโคสไม่เกิน 6,000 หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 กลูโคซิดิก ส่วนอะไมโลเพคตินเป็นโพลีเมอร์เชิงกิ่งที่ประกอบด้วยโพลีเมอร์เชิงเส้นของกลูโคส 10-60 หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 กลูโคซิดิก และโพลีเมอร์ของกลูโคส 15-45 หน่วย ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,6 กลูโคซิดิก (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2543)

##### 1.1.2 กลไกการย่อยแป้ง

การย่อยแป้งโดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (พักตร์ประไพ, 2546) ดังต่อไปนี้

1) การเจลาติไนเซชัน (gelatinization) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ทำให้เม็ดแป้งพองตัว โดยเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำขณะที่ได้รับความร้อนทำให้เม็ดแป้งพองตัว เรียกอุณหภูมิช่วงนี้ว่า อุณหภูมิการเกิดเจล

2) การเกิดลิกเวฟาคชัน (liquefaction) เป็นการลดความหนืดของแป้งที่เกิดเจล กว่า 30 ปีที่ผ่านมามีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแทนการใช้กรดย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า

3) การเกิดแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) เป็นการย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส มอลโตส หรือมอลโตไตรออส

##### 1.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม (พักตร์ประไพ, 2546) ดังนี้

1) Endoamylase เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลของแป้งจะตัดพันธะ  $\alpha$ -1,4 กลูโคซิดิก เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ Oligosaccharide และ  $\alpha$ -limit-dextrin

2) Exoamylase เป็นเอนไซม์ที่จับกับของกลูโคสทั้งพันธะ  $\alpha$ -1,4 และ  $\alpha$ -1,6 กลูโคซิดิก เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ กลูโคอะไมเลส เบต้าอะไมเลส และ แอลฟาไกลูโคซิเดสผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ กลูโคสเพียงอย่างเดียวเมื่อใช้ได้แก่ กลูโคอะไมเลส และ แอลฟาไกลูโคซิเดส หรือได้มอลโตส และ  $\alpha$ -limit-dextrins เมื่อใช้เบต้าอะไมเลส

3) Debranching enzyme เป็นเอนไซม์ที่ตัดกับพันธะ  $\alpha$ -1,6 กลูโคซิดิกเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ไอโซอะไมเลส และ พูลูแลนเนส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือโพลีแซคคาไรด์

4) Transferase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับ  $\alpha$ -1,4 กลูโคซิดิก เอนไซม์ กลุ่มนี้ได้แก่ อะไมโลมอลเตส และไซโคลเดกตรินกลูโคซิลทรานเฟอร์ส (Cyclodextrin Glucosyl Transferase, CGTase)

### 1.3 เอทานอล

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีสูตรเคมี  $C_2H_5O$  มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง (เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8 มีค่าออกเทนสูงถึง 113) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย อาทิ ใช้ผลิตอาหาร และเครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิง ฯลฯ (สุภาพร, 2548)

เอทานอล ผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้เอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมี โดยใช้พืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยมและมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายชนิดตามความเหมาะสมของแต่ละประเทศ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล สาหร่าย ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีความพยายามพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสสูง เช่น ฟางข้าว ชีเลื่อย หญ้า เป็นต้น

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเอทานอลของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ได้จัดประเภทของเอทานอลเป็น 3 ประเภท (ปิ่นกมล และอภิญญา, 2545) คือ

- เอทานอลที่ใช้เป็นริเอเจนท์ในห้องปฏิบัติการ
- เอทานอลที่ใช้ในทางการแพทย์ เกษษกรรม และเป็นวัตถุดิบอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม
- เอทานอลที่ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ นอกจากอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม
- เอทานอลที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง พลังงานทดแทน

#### 1.3.1 วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรได้หลายชนิด แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

- 1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้าข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น
- 2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีทรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น
- 3) วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ชีเลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

สำหรับประเทศไทย วัตถุดิบที่ได้รับการพิจารณาว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอล คือ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง โดยเฉพาะหัวมันสำปะหลังสด (ตารางที่ 2.1)

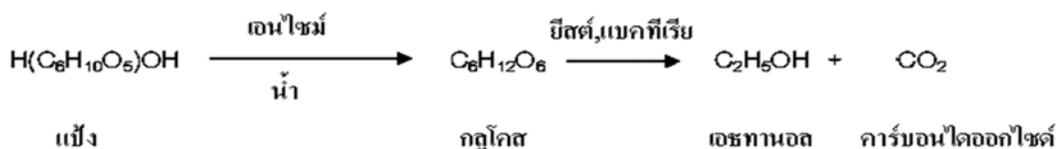
ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบปริมาณของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ

| วัตถุดิบที่มีน้ำหนัก 1 ตัน(1,000 กิโลกรัม) | ปริมาณของเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร) |
|--|-----------------------------------|
| กากน้ำตาล                                  | 260                               |
| อ้อย                                       | 70                                |
| หัวมันสำปะหลังสด                           | 180                               |
| ข้าวฟ่าง                                   | 70                                |
| ธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด                   | 375                               |
| น้ำมันมะพร้าว                              | 83                                |

ที่มา : ฉิรนุช และสุจิตรา (2550)

### 1.3.2 เอทานอลจากจุลินทรีย์

เอทานอล แหล่งพลังงานใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้พบว่าร้อยละ 90 ได้มาจากกระบวนการหมัก ที่เหลือได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมา ในกระบวนการผลิตเอทานอลกระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์จะเป็นตัวไปเปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ปฏิกริยาของน้ำตาลในกระบวนการหมัก

ที่มา : ฉิรนุช และ สุจิตรา (2550)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิดแต่ ยีสต์ ก็ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบว่า แบคทีเรีย สายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่าเมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน ให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกับทฤษฎี แต่ข้อดีของยีสต์ก็คือ แบคทีเรียใช้น้ำตาลได้จำกัดคือใช้ได้ 3 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส แต่ยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายกว่าแบคทีเรีย แต่เพื่อให้แบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์ได้เยอะขึ้นจึงมีการแก้ไขทางพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นคือ สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย, ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้นแม้ว่าจะได้แบคทีเรีย สายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นแต่การนำแบคทีเรียมาใช้ค่อนข้างที่จะยาก เพราะโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่คุ้นเคยกับยีสต์มากกว่า

### 1.3.3 การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ในปัจจุบันเอทานอลไม่เพียงมีความสำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ยังได้รับการคาดหมายว่าจะเป็นแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคตอีกด้วย แต่ปัญหาใหญ่ของยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์คือ มีข้อจำกัดในคุณสมบัติบางประการ เช่น สมบัติในเรื่องความทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอล อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก ชนิดของแหล่งคาร์บอน เป็นต้น จึงได้มีการพัฒนาเพื่อคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล (ฉวีรุช และ สุจิตรา, 2550)

### 1.3.4 กระบวนการผลิตเอทานอล

ในการผลิตเอทานอลโดยใช้วิธีทางชีวเคมี จะใช้วัสดุทางการเกษตรที่มืองค์ประกอบประเภท แป้ง น้ำตาล หรือ เซลลูโลส เป็นวัตถุดิบ เอทานอลที่ได้เรียกว่า ไบโอเอทานอล ตัวอย่างผังกระบวนการผลิตเอทานอลดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งสามารถสรุปกระบวนการผลิตเอทานอลเป็น 4 ขั้นตอน ( ฉวีรุช และ สุจิตรา, 2550) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้คือ

#### ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก

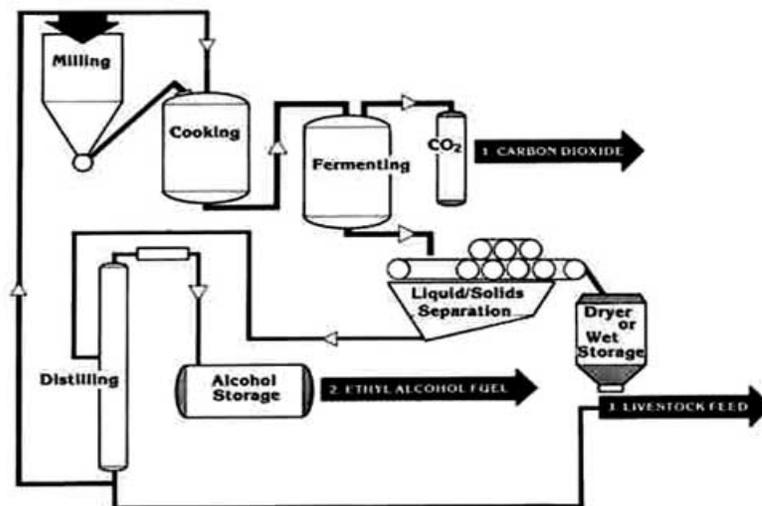
ขั้นตอนแรกในกระบวนการผลิตเอทานอล คือ การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก ซึ่งมีหลายแบบขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ เช่น

- วัตถุดิบที่สามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์และการจัดเตรียมทำงานได้ง่าย ได้แก่ วัตถุดิบที่เป็นกากน้ำตาล เพียงเจือจางด้วยน้ำเพื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม ก็สามารถนำไปหมักได้

- วัตถุดิบที่ใช้อยากและการจัดเตรียมค่อนข้างซับซ้อน ได้แก่ วัตถุดิบประเภทเส้นใย และแป้ง เช่น หัวมันสำปะหลังจะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์เพื่อให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมก่อนจะทำการหมักต่อไป

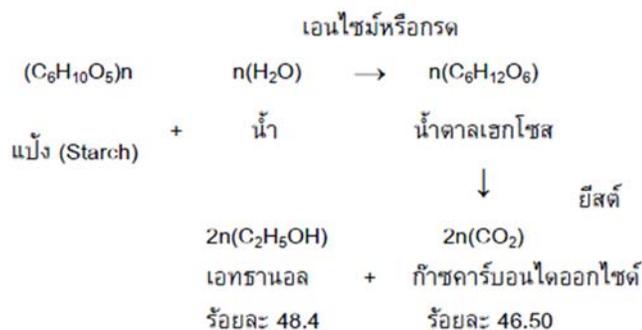
#### ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมหัวเชื้อและการหมักเตรียมหัวเชื้อ

ขั้นตอนที่สองในกระบวนการผลิตเอทานอล คือ ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการหมัก รวมทั้งต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ เมื่อเตรียมหัวเชื้อเรียบร้อยแล้วจึงถ่ายลงในถังหมักผสมกับวัตถุดิบ จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมัก เช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวนพีเอช และอุณหภูมิภายในระหว่างการหมัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของการหมัก ชนิดของผลิตภัณฑ์ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ เชื้อยีสต์ที่นำมาใช้จะเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว เช่น *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ซึ่งใช้ในการหมักหัวมันสำปะหลัง เป็นต้น เมื่อใช้วัตถุดิบต่างประเภทกัน ก็จะใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันด้วย (ฉวีรุช และ สุจิตรา, 2550)



รูปที่ 2.2 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมัก  
ที่มา : ฉิรนุช และ สุจิตรา (2550)

ขั้นตอนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็น แอลกอฮอล์ โดยทั่วไปการหมักจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น ประมาณร้อยละ 8 - 12 โดยปริมาตร ตามทฤษฎี ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 51.1 และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 48.9 โดยน้ำหนัก และมีความร้อนเกิดขึ้นตามสมการเคมี (นิรนาม, มปป.) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



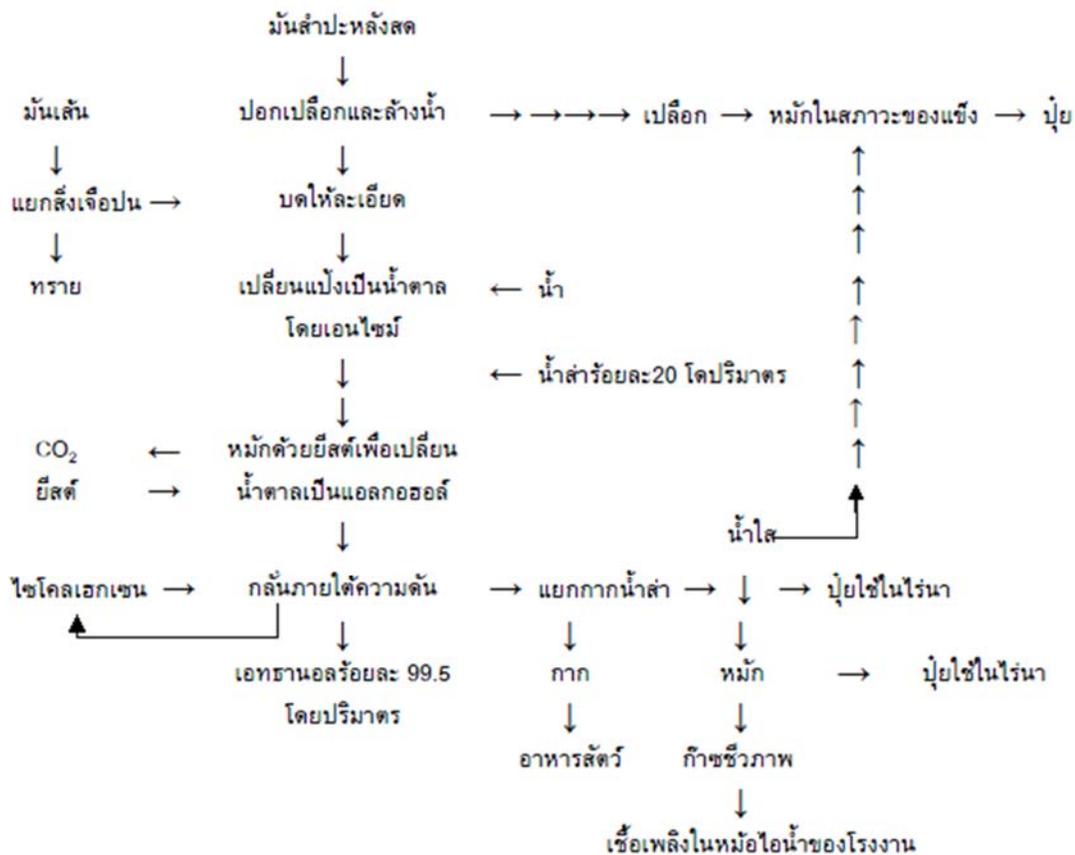
รูปที่ 2.3 สมการเคมีของกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาล  
ที่มา : นิรนาม (มปป.)

### กระบวนการหมักสารพวกคาร์โบไฮเดรต

การเปลี่ยนสารพวกคาร์โบไฮเดรตอันได้แก่ แป้งและน้ำตาลให้เป็นเอทานอลนั้น ถ้าสารเริ่มต้นเป็นน้ำตาลก็สามารถจะใช้ยีสต์ทำการหมักได้เลย ยีสต์ที่นิยมใช้กันเป็นยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลที่ต้องการความเข้มข้นเอทานอลสูง ๆ ส่วนใหญ่ใช้ยีสต์ในสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ดังแสดงในรูปที่ 2.4

### สารเริ่มต้นเป็นพวกแป้ง

มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าว สามารถใช้มอลต์เอนไซม์ หรือ เอนไซม์มอลเทส ซึ่งได้จากพวกราใน *Class Phycomycetes* และ *Ascomycetes* มาเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล นอกจากนี้เชื้อราแล้วยังสามารถใช้กรดเกลือไปรวมกับแป้งแล้วต้มให้เกิดปฏิกิริยาการย่อย ก็จะได้น้ำตาลที่มีโมเลกุลเล็กกว่าที่ใช้อยู่ด้วยเอนไซม์ (ซึ่งสามารถใช้ทำให้เกิดแอลกอฮอล์ได้ดีกว่าน้ำตาลโมเลกุลใหญ่) แต่การใช้กรดจะต้องควบคุมปริมาณให้พอเหมาะ โดยปริมาณกรดที่เหลือจะต้องไม่ทำให้น้ำตาลเสียไป (เนื่องจากปฏิกิริยารุนแรงเกินไป) และจะต้องทำการปรับความเป็นกรดต่างให้เหมาะสมในปฏิกิริยาการหมักที่จะดำเนินต่อไป



รูปที่ 2.4 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง  
ที่มา : ฉีรนุช และ สุจิตรา (2550)

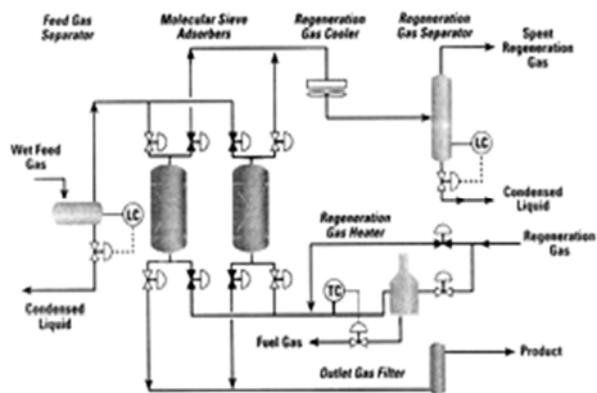
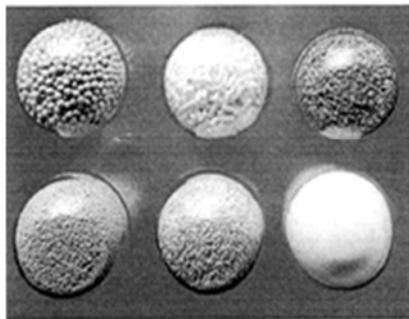
สารเริ่มต้นเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล เช่น น้ำตาลจากอ้อยสด กากน้ำตาล หรือผลไม้บางชนิด เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ย่อยสลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ จนกลายเป็นเอทานอลล้วนแล้วแต่ได้จากยีสต์ทั้งสิ้น

### ขั้นตอนที่ 3 การแยกเอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์

เป็นขั้นตอนที่ต้องการแยกเอทานอลที่เกิดขึ้นออกจากน้ำหมักซึ่งกระบวนการแยกน้ำออกจากเอทานอลทำได้ 3 วิธี (ณิรุช และ สุจิตรา, 2550) คือ

#### 1) การดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟ (Molecular sieve)

โมเลกุลาร์ซีฟ เป็นสารประเภทซีโอไลต์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยทั่วไปจะเป็นชนิด  $3A \cdot [(K_2O \cdot Na_2O) \cdot Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot xH_2O]$  ซึ่งมีสมบัติพิเศษคือ สามารถดูดน้ำในสถานะที่เย็นและคายน้ำออกเมื่อได้รับความร้อน หลักการของเทคโนโลยีชนิดนี้ จะใช้สมบัติพิเศษนี้ในการกำจัดน้ำออกจากเอทานอล โดยยอมให้โมเลกุลน้ำผ่านเข้าไปในโมเลกุล ขณะที่โมเลกุลของเอทานอล ที่มีขนาดใหญ่กว่าจะผ่านไปได้ กระบวนการแยกน้ำนี้ (ดังรูปที่ 2.5) เริ่มจากการใช้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ในช่วงร้อยละ 92-96 ผ่านไปยังปฏิกรณ์ที่บรรจุโมเลกุลาร์ซีฟ ภายในเป็นชั้น ๆ ประมาณ 2-3 ชั้นในแนวขนาน โมเลกุลน้ำจะถูกจับไว้ในขณะที่เอทานอลบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 99.8-99.9 จะผ่านลงมา และถูกนำไปยังถังเก็บ หลังจากเสร็จสิ้นจากกระบวนการแยกน้ำ ชั้นของโมเลกุลาร์ซีฟแต่ละชั้นจะชุ่มไปด้วยน้ำ ซึ่งสามารถทำให้แห้งทำได้โดยผ่านไอน้ำเพื่อไล่น้ำที่ถูกดูดซับในโมเลกุลาร์ซีฟออก ข้อดีของเทคโนโลยีนี้ คือ เป็นเทคโนโลยีที่ง่าย ใช้ไอน้ำและพลังงานที่ต่ำเมื่อเทียบกับวิธีการกลั่น (วิธีที่ 2) นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้สารเคมีอื่น ๆ มาช่วยในการแยกน้ำ การกำจัดของเสียจึงไม่จำเป็นต้องคำนึงถึง แต่เทคโนโลยีนี้มีข้อเสียตรงที่ อัตราการสึกกร่อน หรือเกิดการเนาของโมเลกุลาร์ซีฟมีค่อนข้างสูง เมื่อมีการใช้งานมากกว่า 5 ปี จำเป็นต้องเปลี่ยนใหม่ ทำให้ค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตค่อนข้างสูง

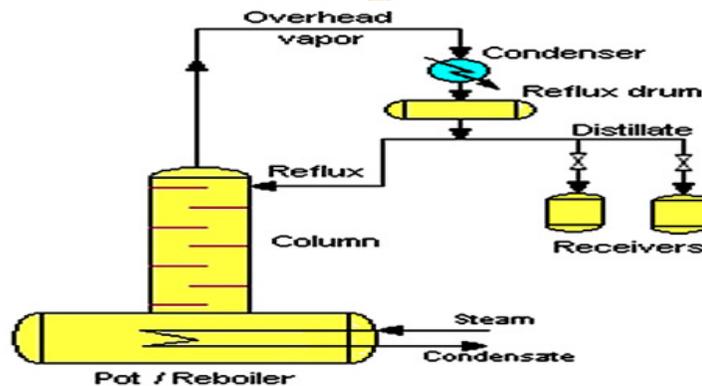


รูปที่ 2.5 กระบวนการแยกน้ำออกจากเอทานอลโดยเทคโนโลยีโมเลกุลาร์ซีฟ

ที่มา : ณิรุช และ สุจิตรา (2550)

## 2) การกลั่นอะซีโอโทรป (Azeotropic distillation)

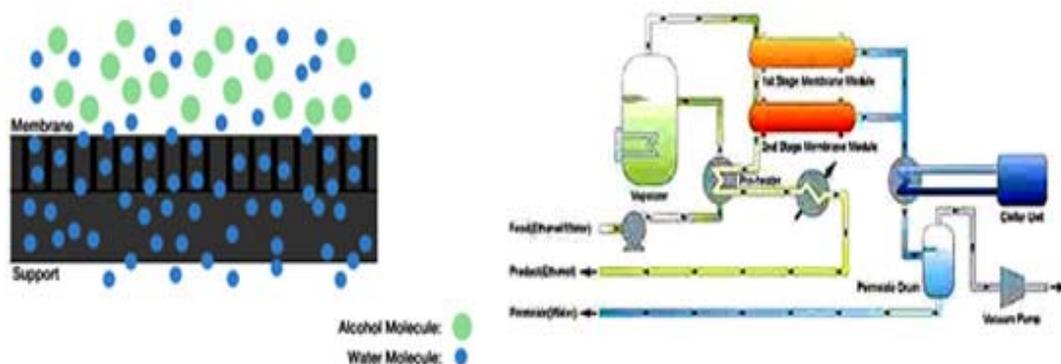
ตามหลักทฤษฎีการกลั่นเอทานอลเพื่อให้มีความบริสุทธิ์สูง จะพบปัญหาของการแยกออกจากกันไม่ได้ของน้ำและเอทานอล จุดนี้เรียกว่า จุดอะซีโอโทรป การกลั่นเอทานอลจึงจำเป็นต้องเติมสารประกอบที่ 3 เพื่อทำให้น้ำแยกออกจากเอทานอลได้ดียิ่งขึ้น สารประกอบนี้ เรียกว่า อินทรินเนอร์ (entrainer) ได้แก่ ไซโคลเฮกเซน, เบนซีน, โทลูอิน, อีเทอร์ หรือคีโตน วิธีนี้เป็นวิธีที่คิดค้นกันมานาน และเป็นที่นิยมใช้กันอย่างมาก ถึงแม้มีข้อเสียอยู่มากมาย ข้อเสียที่สำคัญมากที่สุดคือ ต้องใช้พลังงานมหาศาลในการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่บริสุทธิ์มาก ๆ ข้อเสียถัดมา คือ สารที่ใช้เป็นอินทรินเนอร์เป็นสารมีพิษ บางตัวเป็นสารก่อโรคมะเร็งอีกด้วย



รูปที่ 2.6 การแยกน้ำออกจากเอทานอลโดยกระบวนการกลั่นอะซีโอโทรป  
ที่มา : ณีรนุช และ สุจิตรา (2550)

## 3) เทคโนโลยีเมมเบรน

เทคโนโลยีนี้ นอกจากจะเป็นเทคโนโลยีใหม่ล่าสุด ยังเป็นเทคโนโลยีที่ง่ายและใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพในการแยกสารละลายผสมผ่านเมมเบรน โดยใช้เทคนิคการซึมผ่านของน้ำผ่านเมมเบรนในรูปของไอน้ำ ด้วยแรงดึงดูดจากภายนอกที่มีความดันต่ำกว่าสารที่ผ่านเมมเบรน เรียกว่า เพอมีเอท การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากองค์ประกอบของสารในสารผสมมีความเป็นขั้วต่างกัน เช่นในกรณีของ น้ำในเอทานอล น้ำมีความเป็นขั้วที่สูงกว่าเอทานอล ความสามารถในการแพร่ผ่านเมมเบรนของน้ำจึงมีค่าสูงกว่า ขณะที่มีการซึมผ่านของน้ำ ความดันต่ำจากภายนอกจะช่วยดึงน้ำออกมาในรูปของไอน้ำ เมื่อทำการลดอุณหภูมิเพื่อให้ไอน้ำกลั่นตัวเป็นของเหลว ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การแยกน้ำออกจากเอทานอลโดยกระบวนการอีแวปเพอเรชัน  
ที่มา : ฉวีรุช และ สุจิตรา (2550)

เมมเบรนที่นำมาใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ ชนิดที่เป็นพอลิเมอร์และชนิดที่เป็นเซรามิกชนิดที่เป็นเมมเบรนเซรามิกได้รับความสนใจมากกว่า เนื่องจากสามารถทนต่ออุณหภูมิ สารเคมี และจุลินทรีย์ได้ดี เมมเบรนเซรามิกที่นิยมใช้ในการแยกน้ำออกจากเอทานอล คือ ซีโอไลต์ชนิดโซเดียมเอ (NaA zeolite) ซึ่งมีสมบัติของความมีขั้วสูงกว่าซีโอไลต์ชนิดอื่น ๆ ทำให้เป็นปัจจัยสำคัญในการคัดสรรโมเลกุลที่ถูกดูดซับ โดยอาศัยความเข้ากันได้ของระหว่างความมีขั้วของโมเลกุลน้ำกับเมมเบรน นอกจากนี้ ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งในการเลือกใช้ซีโอไลต์ชนิดโซเดียมเอ คือ ความแตกต่างของขนาดโมเลกุลที่ผ่านรูเปิดของซีโอไลต์ เนื่องจากซีโอไลต์มีโครงสร้างเป็นผลึกที่มีรูพรุน และมีรูเปิดขนาดเล็ก (4 อังสตรอม) เหมาะสำหรับการคัดสรรโมเลกุลน้ำที่มีขนาดเล็ก

#### 4) การกลั่น (Distillation)

การกลั่นจัดว่าเป็นวิธีที่สำคัญที่สุดวิธีหนึ่งสำหรับการทำของเหลวให้บริสุทธิ์ ใช้แยกของเหลวหรือของแข็งกับของเหลวที่ผสมกันเป็นสารละลายเนื้อเดียวออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของจุดเดือด

การกลั่นเป็นกระบวนการที่ทำให้ของเหลวได้รับความร้อนจนกลายเป็นไอ แล้วทำให้ควบแน่นกลับมาเป็นของเหลวอีก ในขณะที่กลั่นของผสม ของเหลวที่มีจุดเดือดต่ำจะกลายเป็นไ้อยกออกมาก่อน ของเหลวที่มีจุดเดือดสูงจะแยกออกมาภายหลัง การกลั่นมีหลายประเภท (วุฒิชัย, 2547 อ้างโดย อดุลย์สมาน และ ประเมศวร์, 2549) เช่น การกลั่นแบบธรรมดา การกลั่นลำดับส่วน การกลั่นด้วยไอน้ำ และการกลั่นแบบพิเศษ

##### 4.1) การกลั่นแบบธรรมดา (Simple distillation)

การกลั่นแบบธรรมดาเหมาะสำหรับการแยกสารละลายที่ตัวถูกละลายเป็นสารที่ระเหยยาก และตัวถูกละลายมีจุดเดือดสูงกว่าตัวทำละลายมาก เช่น น้ำเชื่อม น้ำเกลือ นอกจากนั้นยังใช้แยกของเหลว 2 ชนิด ที่มีจุดเดือดต่างกันมาก ๆ เช่น ต่างกันมากกว่า 80 องศาเซลเซียส ออกจากกันได้ ในขณะที่กลั่นตัวทำละลายจะแยกออกมา ตัวถูกละลายจะยังคงอยู่ในขวดกลั่น ทำให้ตัวทำ

ละลายที่บริสุทธิ์แยกออกจากสารละลาย ตัวอย่าง เช่น การกลั่นน้ำเกลือ ซึ่งประกอบด้วยน้ำ (จุดเดือด 100 องศาเซลเซียส) และเกลือโซเดียมคลอไรด์ (จุดเดือด 1,413 องศาเซลเซียส) เมื่อสารละลายได้รับความร้อน จะมีแต่น้ำเท่านั้นที่กลายเป็นไอออกมา เมื่อไอน้ำผ่านเข้าไปในเครื่องควบแน่นซึ่งมีน้ำเย็นไหลเวียนตลอดเวลาไอน้ำจะควบแน่นได้ของเหลว คือน้ำบริสุทธิ์ออกมา ในขณะที่เกลื่อยังคงอยู่ในสารละลายในขวดกลั่น ถ้ายังคงกลั่นต่อไปจนแห้งจะเหลือแต่เกลืออยู่ในขวดกลั่น จึงทำให้สามารถแยกน้ำกับเกลือออกจากกันได้

#### 4.2) การกลั่นลำดับส่วน (Fractional distillation)

การกลั่นลำดับส่วนเหมาะสำหรับกลั่นแยกของเหลวที่มีจุดเดือดใกล้เคียงกัน หรือแยกสารละลายที่ตัวทำละลายและตัวถูกละลายเป็นสารที่ระเหยง่ายทั้งคู่ ซึ่งถ้ากลั่นแบบธรรมดาเพียงครั้งเดียวจะได้สารที่ไม่บริสุทธิ์ เช่น การกลั่นน้ำผสมเอทานอล ต้องกลั่นซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จึงจะได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นทุกครั้ง แต่ในทางปฏิบัติแทนที่จะนำของเหลวไปกลั่นซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง ซึ่งจะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและใช้เวลามาก จึงได้นำไปกลั่นในคอลัมน์ลำดับส่วนหรือในหอกลั่น ซึ่งทำหน้าที่เหมือนกับเป็นการกลั่นซ้ำหลาย ๆ ครั้ง การกลั่นในหอกลั่นนี้เรียกว่า การกลั่นลำดับส่วน เช่น การกลั่นน้ำมันดิบหรือน้ำมันปิโตรเลียม

#### 4.3) การสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation)

การกลั่นด้วยไอน้ำเป็นเทคนิคอย่างหนึ่งของการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ไอน้ำเป็นตัวทำละลาย ละลายสารและพาสารที่ต้องการออกจากของผสมได้ ส่วนใหญ่การกลั่นด้วยไอน้ำมักจะใช้สกัดสารอินทรีย์ออกจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่อยู่ตามธรรมชาติ เช่น การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ใบมะกรูด เป็นต้น (อดุลย์สมาน และ ปรมศวรรค์, 2549)

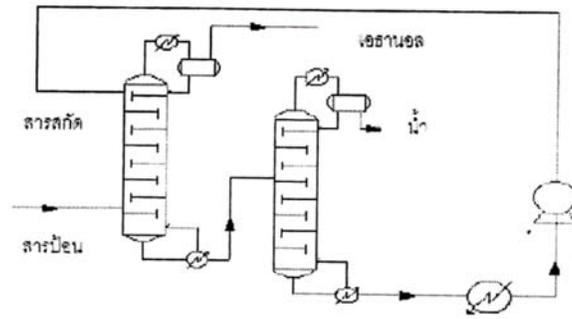
หลักการที่สำคัญ การสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำอาศัยหลักการที่ว่า "สารที่ต้องการสกัดจะต้องระเหยได้ง่าย สามารถให้ไอน้ำพาออกมาจากของผสมได้ และสารที่สกัดได้จะต้องไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำหรือไม่ละลายน้ำนั่นเอง" (ถ้าของเหลวที่กลั่นได้ละลายน้ำ หรือรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำจะต้องนำไปกลั่นแยกอีกครั้งหนึ่ง)

หลังจากที่สกัดด้วยไอน้ำแยกออกมาจากของผสมแล้ว ของเหลวจะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นหนึ่งเป็นน้ำ อีกชั้นหนึ่งเป็นสารที่ต้องการ ซึ่งสามารถใช้กรวยแยก แยกออกจากกัน

#### 4.4) การกลั่นแบบพิเศษ

##### 4.4.1) การกลั่นแบบ Azeotropic (Azeotropic Distillation)

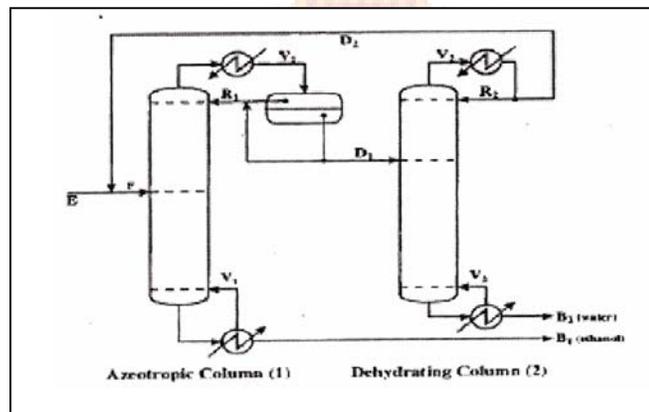
4.4.1.1) Homogeneous Azeotropic Distillation เป็นวิธีการกลั่นโดยการเติมสารสกัด (entrainer) ในสถานะของเหลวผสมกับเอทานอลเดิม (เอทานอลก่อนการกลั่น) แล้วได้ของเหลวสถานะเดียว



รูปที่ 2.8 หอกลิ้นแบบ Homogeneous Azeotropic Distillation  
ที่มา : Dirk และคณะ (1998) อ้างโดย อุดลย์สมาน และ ประเมศวร์ (2549)

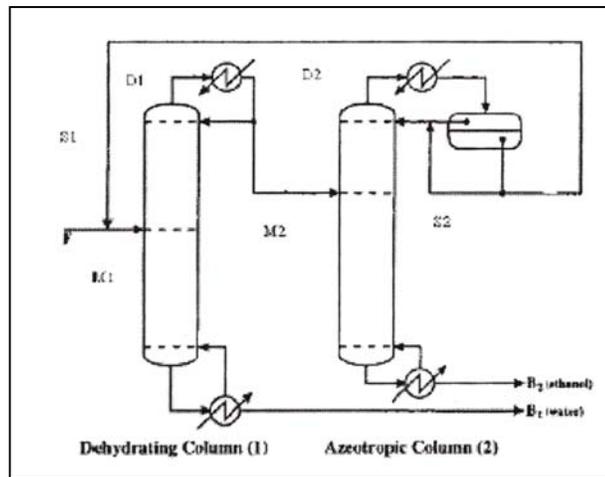
4.4.1.2) Heterogeneous Azeotropic Distillation มี 2 แบบ คือ

แบบที่ 1 Direct sequences



รูปที่ 2.9 หอกลิ้นแบบ Heterogeneous Azeotropic Distillation - Direct sequences  
ที่มา : Esbjerg และคณะ (1998) อ้างโดย อุดลย์สมาน และ ประเมศวร์ (2549)

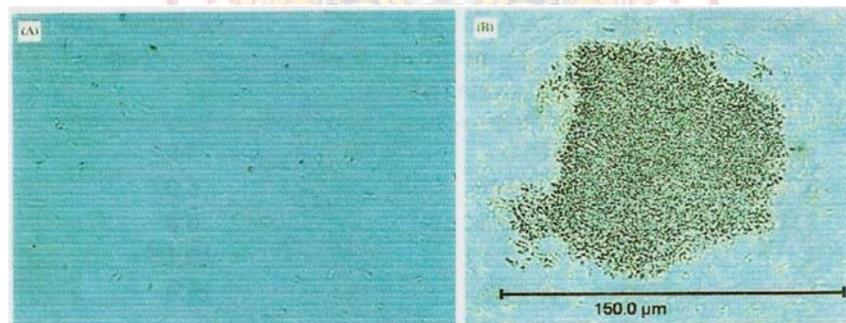
แบบที่ 2 Indirect sequences



รูปที่ 2.10 หอกลับแบบ Heterogeneous Azeotropic Distillation - Indirect sequences  
ที่มา : Esbjerg และคณะ (1998) อ้างโดย อุดุทธ์สมาน และ ประเมศวร์ (2549)

#### 4.5) การตกตะกอน

คุณสมบัติการตกตะกอนของเซลล์จะทำให้ลดขั้นตอนในการกรอง คือ ทำให้การกรองน้อยครั้ง ถ้าเซลล์ไม่มีคุณสมบัติจับกันตกตะกอนจะทำให้ต้องมีการกรองหลายครั้ง ทำให้เปลืองแผ่นกรอง อย่างไรก็ตามยีสต์จะหมักน้ำตาลได้ดีจะต้องลอยตัวอยู่ในสารละลาย ถ้าตกตะกอนเป็น Sedimentation จะหมักได้ไม่ดี เพราะฉะนั้นยีสต์ที่ต้องการควรมีความสามารถในการหมักได้ดี และมีคุณสมบัติในการตกตะกอนทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ใส (สุนิดา, 2547)



รูปที่ 2.11 ภาพถ่ายเซลล์เดี่ยวของเชื้อ *Zymomonas mobilis* ZM 4 (A) และตะกอนเซลล์ที่กลายเป็นฟlocs *Zymomonas mobilis* ZM 401(B)

ที่มา : Davis และคณะ (2006)

#### ขั้นตอนที่ 4 การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์รอง และของเสีย

การใช้ประโยชน์จากเอทานอล สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ใน 3 รูปแบบ (ประสาน, 2549) คือ

**แบบที่ 1** เป็นเอทานอลร้อยละ 95 ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซิน และน้ำมันดีเซลใช้ได้กับเครื่องยนต์ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง บราซิลเป็นประเทศแรกที่มีการศึกษาวิจัยและเริ่มใช้เอทานอลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงตั้งแต่ปี 2516 โดยผลิตเอทานอลจากอ้อย และกากน้ำตาล ยานพาหนะที่ใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงมีมากถึงประมาณร้อยละ 41 สำหรับในเครื่องยนต์ดีเซลสามารถใช้เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 95 ผสมในน้ำมันดีเซลเรียกว่า ดีโซฮอล (Diesohol) ในอัตราส่วนร้อยละ 15 และเพิ่มสารปรับปรุงคุณสมบัติบางตัวในปริมาณร้อยละ 1-2

**แบบที่ 2** เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร ผสมในน้ำมันเบนซินซึ่งจะเรียกว่า แก๊สโซฮอล (gasohol) โดยทั่วไปใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินอัตราส่วนร้อยละ 10 ในลักษณะของสารเติมแต่งเพื่อปรับปรุงค่าออกเทนของน้ำมันเบนซิน ซึ่งสามารถนำมาใช้งานกับเครื่องยนต์โดยทั่วไป ไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์แต่อย่างใด ซึ่งบราซิลก็ใช้เอทานอลผสมในน้ำมันเบนซินที่อัตราส่วนร้อยละ 22

**แบบที่ 3** เป็นสารเคมีเพิ่มค่าออกเทนแก่เครื่องยนต์ โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอลมาเป็นสาร ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่ง MTBE เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่น ๆ

ผลิตภัณฑ์รองที่เกิดขึ้นได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ฟิวเซลอยล์และอื่น ๆ ส่วนเสียได้แก่น้ำเสียจากกระบวนการกลั่น กากจากการเตรียมวัตถุดิบและการหมัก เป็นต้น ซึ่งมีการใช้ประโยชน์จากสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ คือ

- ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จะถูกทำให้บริสุทธิ์และแปรรูปไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องทำความเย็น น้ำอัดลม น้ำโซดา น้ำแข็งแห้ง อุปกรณ์ดับเพลิง เป็นต้น

- ฟิวเซลอยล์ จะถูกแปรรูปและนำไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตแกล็กเกอร์ ผสมทำกาว น้ำหอมบางชนิด ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช เป็นต้น

- น้ำเสีย หรือเรียกว่าน้ำกากสา จะถูกแปรรูปไปเป็นปุ๋ยชีวภาพ และก๊าซชีวภาพเป็นต้น

## 5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Anderson และคณะ(1986) อ้างโดย ณีรนุช และ สุจิตรา (2550) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* (974) มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงถึง 47 องศาเซลเซียสได้ โดยใช้น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน โดยจากผลการทดลองที่ 43 องศาเซลเซียส สามารถผลิต เอทานอลได้มากกว่าร้อยละ 6 (โดยปริมาตร) ภายใน 12 – 14 ชั่วโมง และมีเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม คือ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* (CBS 712) ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณร้อยละ 6 (โดยปริมาตร) แต่ใช้ระยะเวลาในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส นาน 24 – 30 ชั่วโมง และมีเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเหลือเพียงร้อยละ 30 – 50

Kannan และคณะ (1998) อ้างโดย ณีรนุช และ สุจิตรา (2550) ได้ทำการทดลองผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส โดยใช้การตรึงเซลล์ *Zymomonas mobilis* LS1A ที่กลายพันธุ์จากสายพันธุ์เดิม (B-806) โดยไม่ให้มี levansucrase (Sac B) และ intracellular sucrase (Sac A) พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 73.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการหมักเพียง 18 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมที่ผลิตเอทานอลได้เพียง 65.2 กรัมต่อลิตร เนื่องจากผู้วิจัยพบว่า การที่ไม่มี levansucrase (Sac B) และ intracellular sucrase (Sac A) จะช่วยลดการเกิด by-product 2 ชนิด คือ levan และ sorbitol ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพในการหมักลดลง

Sree และคณะ (1999) อ้างโดย ณีรนุช และ สุจิตรา (2550) พบว่า การผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (VS3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทำงานได้ในที่มีอุณหภูมิสูงร่วมกับเชื้อ *Bacillus* sp. (VB9) ในกระบวนการหมักแบบ Solid Substrate Fermentation (SSF) ที่ใช้วัตถุดิบผสมระหว่างข้าวฟ่างและมันเทศจะสามารถผลิตเอทานอลได้ 5 กรัมต่อ 100 กรัมวัตถุดิบ และ 3.5 กรัมต่อ 100 กรัมวัตถุดิบ ที่อุณหภูมิในกระบวนการหมัก 37 องศาเซลเซียส และ 42 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Jamai และคณะ (2001) อ้างโดย ณีรนุช และ สุจิตรา (2550) พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* สามารถเจริญเติบโตได้จากแหล่งคาร์บอนหลากหลายชนิดกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เช่น น้ำตาลโมเลกุลคู่ ฟีนอล อัลเคน อัลคีน อนุพันธ์ของอัลเคนและกรดไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้เชื้อ *Candida tropicalis* สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิที่สูงถึง 40 องศาเซลเซียส และสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

Hargreaves และคณะ (2004) อ้างโดย ณีรนุช และ สุจิตรา (2550) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* จะสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณมากเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความยาวของสายคาร์บอน 6 อะตอม เช่น กลูโคส และฟรุคโตส แต่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มี

ความยาวของสายคาร์บอน 2 อะตอม (sodium acetate), กลีเซอรอล 3 อะตอม และน้ำตาลโรโบส 5 อะตอม ในการผลิตเอทานอล

Gunasekaran และคณะ (2004) อ้างโดย ฉิรณูช และ สุจิตรา (2550) แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* มีคุณสมบัติที่ดีกว่าเมื่อเปรียบกับการใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตเอทานอล คือ ให้ปริมาณเอทานอลสูง ปริมาณมวลชีวภาพต่ำ ทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงได้ และควบคุมปริมาณออกซิเจนในระหว่างกระบวนการหมักได้ง่าย

Tao และคณะ (2005) อ้างโดย ฉิรณูช และ สุจิตรา (2550) ได้ทำการทดลองผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* ที่กลายพันธุ์จากสายพันธุ์เดิมให้มีคุณสมบัติที่สามารถทำงานได้ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดสูง โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกระบวนการหมัก 3 สภาวะ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดสูง (พีเอช 4.5) ได้แก่ การหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ การหมักภายใต้สภาวะที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง และการหมักภายใต้สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อและภายใต้สภาวะทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองให้ปริมาณเอทานอลเท่ากัน คือ 73.1 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อและภายใต้สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อโดยใช้ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ พบว่า การหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อจะให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 70.3 กรัมต่อลิตร เป็น 73.2 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่ลดลงจาก 5.3 กรัมต่อลิตร เป็น 1.3 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 40 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* นอกจากจะเพิ่มปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ให้มีปริมาณสูงขึ้นแล้วยังสามารถช่วยประหยัดพลังงานที่สูญเสียไปในกระบวนการฆ่าเชื้อ

## 2. สมมติฐาน

ปัจจุบันจะเห็นได้ว่าน้ำมันปิโตรเลียมที่ใช้กับเครื่องยนต์มีแนวโน้มที่ลดลงเนื่องจากการบริโภคมีอัตราที่สูงขึ้นตามความต้องการของประชากร (ซันนัท และ เฉลิม, 2555) การแก้ไขโดยใช้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนเพื่อใช้ผสมในน้ำมัน ก็เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดปัญหาวิกฤตพลังงานได้ (Niblick and Landis, 2016) การที่ผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานเริ่มต้นสามารถหาได้หลากหลายแหล่ง ได้แก่ 1) แหล่งที่เป็นกลุ่มลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น เป็นแหล่งพลังงานที่น่าสนใจเพราะมีต้นทุนต่ำ แต่ปัญหาของการย่อยโดยใช้แหล่งพลังงานนี้มักมีความยุ่งยากต่อการย่อยสลายเป็นน้ำตาลและจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคหลายๆเทคนิคมาเชื่อมโยงต่อกัน 2) แหล่งที่เป็นกลุ่มแป้ง เช่น มันสำปะหลัง สามารถย่อยได้ดีกว่ากลุ่มแรกเพราะแป้งมีโครงสร้างโมเลกุลที่เล็กกว่า และไม่มีความซับซ้อนต่อการย่อยสลาย แต่ปัญหาในวัตถุดิบดังกล่าวจะมีต้นทุนที่สูงอยู่ และ 3) แหล่งที่เป็นกลุ่มน้ำตาล เช่น กากน้ำตาล น้ำอ้อย เป็นต้น เป็นแหล่งพลังงานที่สามารถนำมาหมักได้ และมีต้นทุนสูงไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน (Khoo, 2015) เมื่อเปรียบเทียบความคุ้มค่าต่อการนำแหล่งวัตถุดิบมาย่อยเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลนั้น เห็นว่าแหล่งพลังงานจากแป้งเป็น

แหล่งพลังงานที่เหมาะสมต่อการนำมาย่อยเพื่อให้เกิดประโยชน์ได้ แม้ว่าแหล่งดังกล่าวจะต้องใช้  
ต้นทุนในการผลิตอยู่ แต่ถ้าหากมีการนำแบ่งขุมเงินเหลือทิ้งนอกจากเป็นการลดในเรื่องค่าใช้จ่ายใน  
วัตถุดิบเริ่มต้นต่อการย่อยเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานเอทานอลแล้วยังสามารถช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม  
อีกทางหนึ่ง



### บทที่ 3

#### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

##### 1. วัสดุ

น้ำแป้งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนจากโรงงานผลิตขนมจีนน้องขวัญ ตำบลนาโพธิ์ อำเภอร่องาง จังหวัดนครศรีธรรมราช

##### 1.1 เอนไซม์

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทางการค้า (Enzyme Termamyl® 2X) ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ยี่ห้อ Sigma จากบริษัท Novo Nordisk Co., Bagsvaerd, ประเทศเดนมาร์ค

##### 1.2 จุลินทรีย์

ใช้เชื้อยีสต์บริสุทธิ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มีวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้ คือ นำเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ถ่ายลงในอาหารวุ้นเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ถ่ายเชื้อทุก ๆ 3 เดือน เพื่อใช้เตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น

##### 1.3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

สูตรอาหาร Yeast Malt Medium (YM) สำหรับเตรียมหัวเชื้อยีสต์

##### 1.4 สารเคมี

สารเคมีระดับ analytical grade สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด, ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี,

##### 2. อุปกรณ์

- 1) ตู้บ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ SANYO รุ่น Gallenkamp
- 2) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Menmert รุ่น KB
- 3) หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HICLAVE-50
- 4) เครื่องชั่งเลขทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ OHAUS รุ่น GT 4100
- 5) เครื่องชั่งเลขทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ OHAUS รุ่น AP 210S
- 6) เครื่องวัดความเข้มข้นแอลกอฮอล์แบบความถ่วงจำเพาะ (Alcoholmeter, Gay Lussac – Cartier scale) ช่วงร้อยละ 0-100
- 7) เครื่องวัดความเข้มข้นแอลกอฮอล์วินิโอมิเตอร์ (Vinometer) ช่วงร้อยละ 0-17
- 8) เครื่องกลั่นลำดับส่วน รุ่น CT1SX ของบริษัท Wisdom Asia จำกัด
- 9) เครื่องสกัดของแข็ง-ของเหลว รุ่น CT6S ของบริษัท Wisdom Asia จำกัด
- 10) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 11) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Spectronic Genesys 20

- 12) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น Clarus 600
- 13) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ RUSELL รุ่น RL150
- 14) เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมด (Hand refractometer)
- 15) ขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 500, 2,000 มิลลิลิตร
- 16) ขวดบรรจุน้ำดื่มขนาดความจุ 20 ลิตร
- 17) อุปกรณ์กันอากาศ (Air-locker)
- 18) โมเลกุลาร์ซีฟ (Molecular sieve) ชนิด  $3A \cdot [(K_2O \cdot Na_2O) \cdot Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot xH_2O]$
- 19) หลอดชนิดยาขนาด 5 และ 60 มิลลิลิตร
- 20) ปัมพ์จ่ายของเหลวแบบรีดท้อ (Peristaltic Pump) ยี่ห้อ EYELA รุ่น MP3 ประเทศญี่ปุ่น
- 21) อุปกรณ์เครื่องแก้ว

### 3. วิธีการ

#### 3.1 การศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง

นำน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนนำมาศึกษาองค์ประกอบต่าง ๆ ได้แก่ พีเอช ปริมาณแป้งทั้งหมด (Pintado, *et al.*, 1999) และปริมาณของแข็งทั้งหมด เพื่อเป็นข้อมูลในการเก็บเกี่ยวแป้ง

#### 3.2 การเปรียบเทียบกระบวนการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสและกรดซัลฟิวริก

##### 3.2.1 เตรียมผงแป้งจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง

โดยนำน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งมากรองแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของแข็งด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่เป็นของแข็งไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมา ร้อนด้วยตะแกรงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 125 ไมครอน แล้วเก็บในถุงพลาสติกเก็บที่ อุณหภูมิห้อง (ศรีอุบล และอดุลย์สมาน, 2559) ไว้สำหรับเตรียมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 20

##### 3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส

###### ก. การศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเวลาที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้ง

1) เตรียมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยชั่งแป้งที่ได้จากวิธีการข้อที่ 3.2.1 ปริมาณ 20 กรัม บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มี ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร (ไม่ปรับพีเอช) แล้วนำไปทำให้มีลักษณะเป็นเจล (gelatinization) โดยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็น ประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส

2) ตูดสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ผ่านการทำให้เจลาติไนซ์แล้ว จำนวน 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร

3) เติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 มิลลิลิตร โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์จำนวน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 10 และ 20 ยูนิต

4) ทำการศึกษาเวลาในการย่อยสารละลายน้ำแป้งจากข้อ 3) โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยแป้งดังนี้ คือ 0, 10, 30, 60, 120, 180, 240 และ 20 ชั่วโมง

5) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

6) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อคัดเลือกปริมาณเอนไซม์และเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

#### ข. การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้ง

1) เตรียมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยชั่งแป้งที่ได้จากวิธีการข้อที่ 3.2.1 ปริมาณ 20 กรัม บรรจุลงในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชจำนวน 3 ระดับ คือ สารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 5 และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6 และ 7 แล้วนำไปทำให้มีลักษณะเป็นเจล ด้วยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งปรับความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2) ตูดสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ผ่านการทำให้มีลักษณะเป็นเจลแล้ว จำนวน 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร

3) เติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 มิลลิลิตร โดยใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่เหมาะสมจากการศึกษาในวิธีการข้อที่ 3.2.2 (ก)

4) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

5) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ระดับพีเอชต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อคัดเลือกพีเอชที่เหมาะสม

### 3.3 การศึกษาการย่อยน้ำแป้งด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก

1) เตรียมน้ำหมักที่มีน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยชั่งแบ่งที่ได้จากวิธีการข้อที่ 3.2.1 ปริมาณ 20 กรัม บรรจุลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 50 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษา คือ ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 เข้มข้นเท่ากับ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3) นำไปย่อยและกวนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 30 นาที

4) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2

5) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

6) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

### 3.4 การหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง

1) คัดเลือกกระบวนการย่อยแป้งเหลือทิ้งที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด จากวิธีการข้อที่ 3.2 และ 3.3

2) กำหนดปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษา 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ (25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส) พีเอชเริ่มต้น (3.5, 4.5 และ 5.5) และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ 0, 0.05 และ 0.10) โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design (ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® Version 9 Free Trial) จำนวน 17 ชุดการทดลอง โดยทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลางจำนวน 5 ครั้ง (ชุดการทดลองที่ 13-17) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

3) นำน้ำหมักให้มีพีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามชุดการทดลองที่ออกแบบไว้ดังตารางที่ 3.1 แล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

4) เติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 แล้วหมักแบบกะป๋อมปิดปากขวดด้วยอุปกรณ์กันอากาศ (air-locker) โดยใช้อุณหภูมิตามชุดการทดลองที่ออกแบบไว้ดังตารางที่ 3.1 หมักเป็นระยะเวลา 10 วัน

5) เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยวินิเตอร์

6) นำข้อมูลที่ได้มาทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® Version 9 Free Trial (Anonymous, 2016; Pourfarzad, et al., 2014; Schneiderman, et al., 2015)

### การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล

1) ทำการทดลองเหมือนวิธีการข้อที่ 3.4 แต่เพิ่มปริมาณของน้ำหมักที่มีน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 18 ลิตร บรรจุลงในถังหมักขนาดความจุ 18 ลิตร พร้อมอุปกรณ์กันอากาศ และใช้ปัจจัยที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหมักและอุณหภูมิในการหมักที่ได้จากการศึกษาในข้อที่ 3.4

2) ทำการหมักแบบกะ โดยแบ่งช่วงเวลาในการเติมน้ำหมักที่ผ่านการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง ด้วยกรดซัลฟิวริกลงไปจนถึงหมัก คือ เติมน้ำหมักครั้งละ 500 มิลลิลิตรต่อระยะเวลา 2 วัน ไปจนปริมาณ 18 ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

3) นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล แล้วหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมัก

**ตารางที่ 3.1** ชุดการทดลองสำหรับศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®

| ชุดการทดลองที่ | ปัจจัยที่ศึกษา             |                   |                            |
|----------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|
|                | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | พีเอช<br>เริ่มต้น | ปริมาณ<br>แอมโมเนียมซัลเฟต |
| 1              | 25                         | 3.5               | 0.05                       |
| 2              | 35                         | 3.5               | 0.05                       |
| 3              | 25                         | 5.5               | 0.05                       |
| 4              | 35                         | 5.5               | 0.05                       |
| 5              | 25                         | 4.5               | 0.00                       |
| 6              | 35                         | 4.5               | 0.00                       |
| 7              | 25                         | 4.5               | 0.10                       |
| 8              | 35                         | 4.5               | 0.10                       |
| 9              | 30                         | 3.5               | 0.00                       |
| 10             | 30                         | 5.5               | 0.00                       |
| 11             | 30                         | 3.5               | 0.10                       |
| 12             | 30                         | 5.5               | 0.10                       |
| 13             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |
| 14             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |
| 15             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |
| 16             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |
| 17             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |

### 3.5 การศึกษากระบวนการกลั่นแยกเอทานอลที่ได้จากการหมักให้ได้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95

1) ทำการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งความเข้มข้นร้อยละ 5 เหมือนการทดลองเหมือนข้อที่ 3.4 ปริมาตร 18 ลิตร ในถังหมักขนาดความจุ 20 ลิตรพร้อมอุปกรณ์กันอากาศ (air-locker) และใช้ปัจจัยที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหมักและอุณหภูมิในการหมักที่ได้จากการศึกษาในข้อที่ 3.4

2) นำน้ำหมักที่ได้จากหมักน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งปริมาตร 10 ลิตร บรรจุลงในเครื่องกลั่นลำดับส่วน แล้วกลั่นแยกเอทานอลออกให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปรับตั้งอุณหภูมิในการกลั่นเท่ากับ  $90^{\circ}\text{C}$  และเวลาในการกลั่น 60 นาที ซึ่งสภาวะที่ ศรีอุบล และสุภาชิต (2552) ได้ศึกษาในการกลั่นน้ำหมักเงาะคุณภาพต่ำและได้เอทานอลเท่ากับร้อยละ  $50.20 \pm 0.40$  ทำการกลั่นจำนวน 4 ครั้ง เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอทานอลโดยวิธีวัดความถ่วงจำเพาะ และคำนวณผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้

3) นำเอทานอลที่กลั่นได้ความเข้มข้นร้อยละ 50 จากการกลั่นด้วยเครื่องกลั่นลำดับส่วน ปริมาตร 1.5 ลิตร มากลั่นต่อในเครื่องสกัดของแข็ง-เหลว ให้ได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นร้อยละ 95 เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอทานอลโดยวิธีวัดความถ่วงจำเพาะ และคำนวณผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้

### 3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เอทานอลที่กลั่นได้มีความบริสุทธิ์ด้วยโมเลกุลาร์ซีฟ

1) การศึกษาปริมาณ (dose) โมเลกุลาร์ซีฟที่เหมาะสมในดูดซับน้ำออกจากเอทานอล

1.1) เตรียมคอลัมน์โดยบรรจุโมเลกุลาร์ซีฟที่ผ่านการอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ  $105^{\circ}\text{C}$  นาน 2 ชั่วโมง ลงในหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ปริมาณ 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อปริมาตรเอทานอล 10 มิลลิลิตร

1.2) ตวงสารละลายเอทานอลที่เตรียมจากเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับเอทานอลที่กลั่นได้ในขั้นตอนสุดท้ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วใช้ปั๊มแบบรีดท่อสุบจ่ายเอทานอลให้ไหลวนผ่านตัวดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์จากล่างขึ้นด้านบนตลอดเวลา ควบคุมอัตราการไหลที่ 10 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นระยะเวลา 60 นาที ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่  $30^{\circ}\text{C}$

1.3) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี และคัดเลือกปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟที่เหมาะสมสำหรับศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล โดยพิจารณาจากค่าปริมาณน้ำในเอทานอลที่ถูกดูดซับต่อน้ำหนักของโมเลกุลาร์ซีฟ (กรัม น้ำ ต่อกรัมโมเลกุลาร์ซีฟ) หรือ ค่า  $q_e$  ซึ่งหาได้จากสมการที่ (2) (ดัดแปลงจาก Thongpradistha, 2007)

$$q_e = \frac{(C_o - C_e) \times V}{W} \quad (2)$$

เมื่อ  $q_e$  คือ ปริมาณน้ำในเอทานอลที่ถูกดูดซับต่อน้ำหนักของโมเลกุลาร์ซีฟ (กรัม น้ำต่อกรัมโมเลกุลาร์ซีฟ)

$C_o$  คือ ปริมาณน้ำเริ่มต้นที่อยู่ในเอทานอลที่ใช้ศึกษา (กรัม) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 92.5 (กรัมต่อมิลลิลิตร)

$C_e$  คือ ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในเอทานอลที่ผ่านการดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟ (กรัม)

$V$  คือ ปริมาตรของเอทานอลที่ใช้ศึกษา (มิลลิลิตร) ในงานวิจัยนี้จะใช้ปริมาตรเอทานอลเท่ากับ 10 มิลลิลิตร

$W$  คือ น้ำหนักแห้งของโมเลกุลาร์ซีฟ (กรัม)

1.4) ศึกษา Langmuir isotherm  $q_{\max}$  ตามสมการที่ (3) (Thongpradistha, 2007) โดยวิธีเขียนกราฟเส้นตรงระหว่าง แกน Y ด้วย  $C_e/q_e$  และ แกน X ด้วยค่า  $C_e$  จะได้ความชันเท่ากับ  $1/q_{\max}$  และจุดตัดแกน Y เท่ากับ  $1/q_{\max} b$

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{\max} b} + \frac{C_e}{q_{\max}} \quad (3)$$

เมื่อ  $q_{\max}$  คือ ปริมาณสูงสุดของน้ำที่ถูกดูดซับแบบ monolayer ต่อน้ำหนักของ โมเลกุลาร์ซีฟ (กรัมต่อกรัมตัวดูดซับ)

$b$  คือ สัมประสิทธิ์ของการดูดซับ (ต่อกรัม)

## 2) การศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล

1.1) เตรียมคอลัมน์โดยบรรจุโมเลกุลาร์ซีฟที่ผ่านการอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105°C นาน 2 ชั่วโมง ลงในหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ตามปริมาณที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล

1.2) ตวงสารละลายเอทานอลที่เตรียมจากเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับเอทานอลที่กลั่นได้ในขั้นตอนสุดท้ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วใช้ปั๊มแบบรีดท่อสูบน้ำเข้าเอทานอลให้ไหลผ่านตัวดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์จากล่างขึ้นด้านบนตลอดเวลา ควบคุมอัตราการไหลที่ 10 มิลลิลิตรต่อนาที โดยทำการศึกษาการดูดซับที่อุณหภูมิ 25°C, 35°C และ 40°C และศึกษาระยะเวลาในการดูดซับที่ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที

1.3) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี และคัดเลือกอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล

### 3) การทำให้เอทานอลที่กลั่นได้มีความบริสุทธิ์ด้วยสภาวะที่เหมาะสม

1.1) เตรียมคอลัมน์โดยบรรจุโมเลกุลาร์ซีฟที่ผ่านการอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105°C นาน 2 ชั่วโมง ลงในหลอดฉีดยาขนาด 60 มิลลิลิตร ตามปริมาณที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟที่เหมาะสมในชุดชั้นน้ำออกจากเอทานอล (คำนวณปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟสำหรับชุดชั้นน้ำในเอทานอลปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

1.2) ตวงเอทานอลที่จะทำการกลั่นในวิธีการข้อที่ 3.5 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วใช้ปั๊มแบบบริดท์ท่อสุบจ่ายเอทานอลให้ไหลวนผ่านตัวดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์จากล่างขึ้นด้านบน ตลอดเวลา ควบคุมอัตราการไหลที่ 10 มิลลิลิตรต่ออนาที ใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการดูดซับด้วยค่าที่ได้จากการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล

1.3) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

### 3.7 การศึกษาการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากเอทานอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

โดยนำเอทานอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาผลิตเป็นเอทานอลเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอลล์) ในอัตราส่วนผสมเอทานอลร้อยละ 10 และน้ำมันเบนซินออกเทน 91 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

## 4. วิธีการวิเคราะห์ (ภาคผนวก ข)

- 5.1 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมดด้วยวิธีของ Pintado และคณะ 1999
- 5.2 การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธีฟีโนล-ซิลเฟต (ดัดแปลงจาก Dobios และคณะ 1956 ดัดแปลงโดย ศรีอุบล, 2545)
- 5.3 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)
- 5.4 การวัดปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยวิธีวินมิเตอร์
- 5.5 การวัดปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยวิธีวัดความถ่วงจำเพาะ
- 5.6 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

## 5. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Designed (CRD) ชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ความเข้มข้นของเอทานอลแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

## บทที่ 4 ผลและวิจารณ์

### 1. องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง

การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง พบว่าน้ำแป้งมีพีเอชเท่ากับ 3.69 ซึ่งมีความสม่ำเสมอกันทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างมาศึกษาวิจัย อาจเป็นผลมาจากกระบวนการของการผลิตขนมจีนมีการควบคุมคุณภาพของการผลิตอาหารสำหรับการบริโภคที่ได้มาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมดและปริมาณของแข็งทั้งหมดพบว่า มีค่าเท่ากับ  $32.73 \pm 0.01$  และ  $35.57 \pm 0.60$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยหากนำมาใช้ในการย่อยเพื่อผลิตเอทานอลจำเป็นต้องกำจัดน้ำบางส่วนออกจากน้ำแป้งเพื่อให้แป้งมีความเข้มข้นมากขึ้น

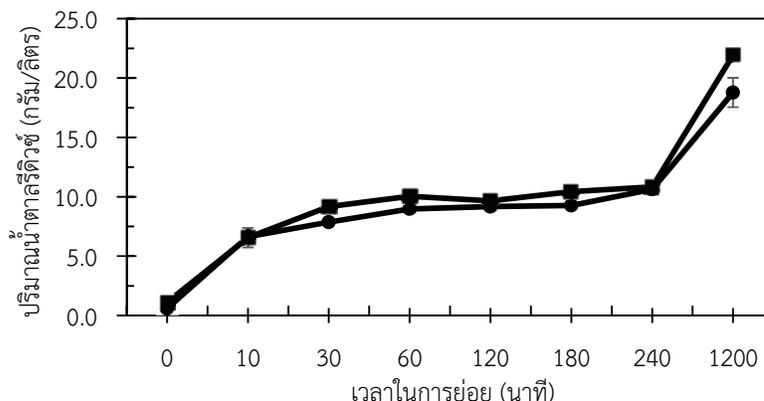
#### ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง

| องค์ประกอบ                         | ปริมาณ           |
|------------------------------------|------------------|
| พีเอช                              | $3.69 \pm 0.00$  |
| ปริมาณแป้งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)    | $32.73 \pm 0.01$ |
| ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) | $35.57 \pm 0.60$ |

### 2. สภาพที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

#### 2.1 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง

จากการศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ยูนิต ในการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ในสภาพที่ไม่มีการปรับพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง และมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาในการย่อยนาน 1,200 นาที (20 ชั่วโมง) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 20 ยูนิต สามารถย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งได้ดีที่สุด ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $21.94 \pm 0.35$  กรัมต่อลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต ที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ  $18.78 \pm 1.24$  กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งจะเห็นว่า การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในปริมาณมาก ๆ สำหรับย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งจะไม่ส่งผลให้มีการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้มากขึ้น ทั้งนี้อาจสืบเนื่องมาจากการยับยั้งไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Karimi and Biria, 2016) ดังนั้นความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 10 ยูนิต และเวลาในการย่อยที่ 20 ชั่วโมง จึงเป็นสภาพที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพื่อผลคุ้มค่าการลงทุนทางเศรษฐศาสตร์สำหรับผลิตเป็นเอทานอลต่อไป จึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ 10 ยูนิต และระยะเวลาที่ใช้ย่อยที่ 20 ชั่วโมง สำหรับการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 (●) และ 20 (■) ยูนิต ที่เวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ 10 และ 20 ยูนิต ระยะเวลาในการย่อย 20 ชั่วโมง

| ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ยูนิต) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| 10                                | 18.78 <sup>n</sup> ±1.24        |
| 20                                | 21.94 <sup>n</sup> ±0.35        |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสทมภ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ )

## 2.2 พีเอชที่เหมาะสมในการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง

จากการศึกษาพีเอชที่ใช้ในการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต โดยผันแปรพีเอชเท่ากับ 5, 6 และ 7 ที่เวลาในการย่อยที่ 20 ชั่วโมง พบว่าการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่มีพีเอชเท่ากับ 5 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ  $31.20 \pm 0.49$  ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ ) เมื่อเทียบกับการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีพีเอชเท่ากับ 7 ที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $29.88 \pm 3.67$  กรัมต่อลิตร ส่วนการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่มีพีเอชเท่ากับ 6 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดเท่ากับ  $19.20 \pm 0.88$  กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่มีพีเอชเท่ากับ 5 และ 7 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งจะเห็นว่าหากใช้พีเอชไม่เหมาะสมในการย่อน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งจะทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง ซึ่งเกิดการสูญเสียสภาพแบบถาวร (irreversible inactivate) จากการเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลเดี่ยวในเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทำให้เกิดการรวมกันของเอนไซม์ (Silveira, *et al.*, 2014) ดังนั้นการปรับพีเอชของน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ให้มีค่าเท่ากับ 5 ด้วย

สารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์ จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

**ตารางที่ 4.3** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต พีเอชเท่ากับ 5, 6 และ 7 ระยะเวลาในการย่อย 20 ชั่วโมง

| พีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) |
|-------|---------------------------------|
| 5     | 31.20 <sup>a</sup> ±0.49        |
| 6     | 19.20 <sup>b</sup> ±0.88        |
| 7     | 29.88 <sup>a</sup> ±3.67        |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ )

### 3. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริก

จากการศึกษาการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5) พบว่า การย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 497.91±0.69 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P\leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกรดย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งเห็นว่าการใช้กรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะทำให้ประสิทธิภาพของการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีขึ้น แต่การใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นไปมากกว่าร้อยละ 5 จะทำให้ในน้ำหมักมีสารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักและส่งผลทำให้จุลินทรีย์ไม่สร้างเอทานอล (Torre-González, *et al*, 2016) ดังนั้น ผลการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าน้ำตาลที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถนำมาหมักเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้

**ตารางที่ 4.4** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) |
|-----------------------|-----------------------------------|
| 1                     | 220.32 <sup>a</sup> ±3.43         |
| 2                     | 259.15 <sup>a</sup> ±0.69         |
| 3                     | 408.13 <sup>b</sup> ±2.75         |
| 4                     | 303.31 <sup>a</sup> ±4.12         |
| 5                     | 497.91 <sup>a</sup> ±0.69         |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ )

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบสถานะที่เหมาะสมในการย่อน้ำแบ่งขมเงินเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ที่ดีที่สุดด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ การปรับพีเอชของน้ำแบ่งขมเงินเหลือทิ้งให้มีค่าเท่ากับ 5 ด้วยสารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์ และสถานะที่เหมาะสมในการย่อน้ำแบ่งขมเงินเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ที่ดีที่สุดด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เห็นว่าการย่อน้ำแบ่งขมเงินเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริกจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะเลือกใช้วิธีการย่อน้ำแบ่งขมเงินเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5

#### 4. ปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแบ่งขมเงินเหลือทิ้ง

การศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจะใช้กระบวนการย่อน้ำแบ่งขมเงินที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองขั้นต้น คือ การย่อน้ำแบ่งขมเงินร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 5 แบบกะ โดยกำหนดปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษา 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ (25, 30 และ 35°C) พีเอชเริ่มต้น (3.5, 4.5 และ 5.5) และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ 0, 0.05 และ 0.10) ที่ออกแบบแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> ได้ปริมาณเอทานอลดังแสดงในตารางที่ 4.5

และเมื่อนำข้อมูลจากตารางที่ 4.6 ไปวิเคราะห์หาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> จะได้กราฟพื้นผิวตอบสนองของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการหมักเอทานอลสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และได้แบบจำลองทางสถิติที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (quadratic relationship) สำหรับใช้ทำนายการเกิดเอทานอลจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ดังสมการที่ (1)

$$\text{ปริมาณเอทานอล (ร้อยละ)} = 210C^2 + 0.025B^2 - 0.049A^2 - 5BC + 1.51479 \times 10^{-15} AC + 0.05AB + 4C - 0.975B + 2.715A - 31.11875$$

เมื่อ A คือ ระดับอุณหภูมิ (°C) B คือ ระดับพีเอช และ C คือ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®

| ชุดการทดลองที่ | ปัจจัยที่ศึกษา             |                   |                            | ปริมาณเอทานอล<br>(ร้อยละ) |
|----------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------|
|                | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | พีเอช<br>เริ่มต้น | ปริมาณแอมโมเนียม<br>ซัลเฟต |                           |
| 1              | 25                         | 3.5               | 0.05                       | 7.5                       |
| 2              | 35                         | 3.5               | 0.05                       | 7.0                       |
| 3              | 25                         | 5.5               | 0.05                       | 7.5                       |
| 4              | 35                         | 5.5               | 0.05                       | 8.0                       |
| 5              | 25                         | 4.5               | 0.00                       | 8.0                       |
| 6              | 35                         | 4.5               | 0.00                       | 8.0                       |
| 7              | 25                         | 4.5               | 0.10                       | 8.0                       |
| 8              | 35                         | 4.5               | 0.10                       | 8.0                       |
| 9              | 30                         | 3.5               | 0.00                       | 8.0                       |
| 10             | 30                         | 5.5               | 0.00                       | 10.0                      |
| 11             | 30                         | 3.5               | 0.10                       | 9.0                       |
| 12             | 30                         | 5.5               | 0.10                       | 10.0                      |
| 13             | 30                         | 4.5               | 0.05                       | 10.0                      |
| 14             | 30                         | 4.5               | 0.05                       | 8.0                       |
| 15             | 30                         | 4.5               | 0.05                       | 9.0                       |
| 16             | 30                         | 4.5               | 0.05                       | 8.0                       |
| 17             | 30                         | 4.5               | 0.05                       | 8.5                       |

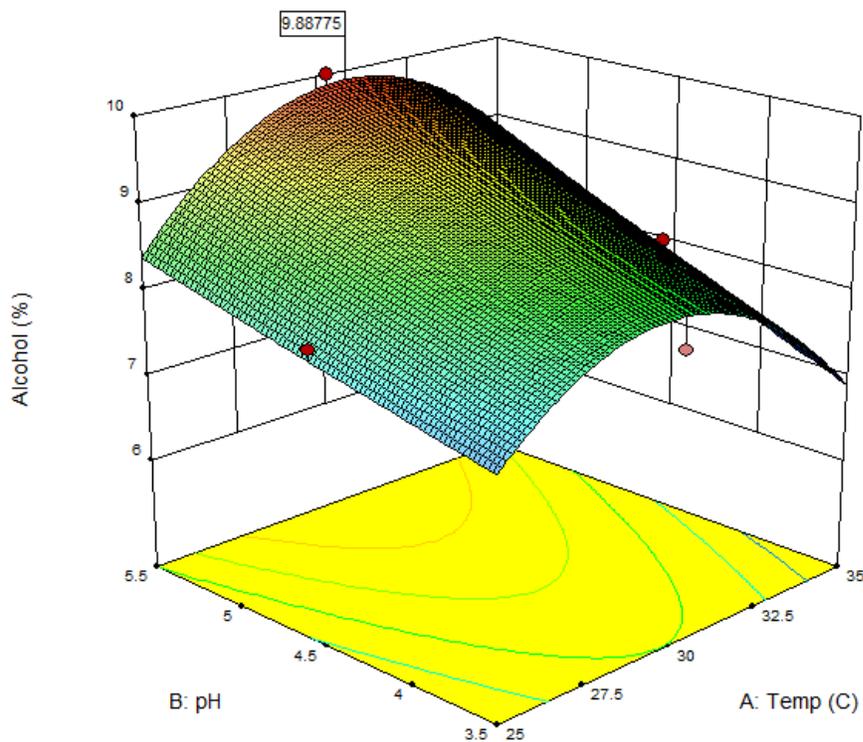
ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ต่อ ปริมาณเอทานอลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®

| SOV            | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F |    |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------------------|----|
| Model          | 9.84           | 9  | 1.09        | 2.23    | 0.1509           | NS |
| A-Temp         | 5.329E-        | 1  | 5.329E-     | 1.089E- | 1.0000           |    |
| B-pH           | 2.00           | 1  | 2.00        | 4.09    | 0.0829           |    |
| C-             | 0.13           | 1  | 0.13        | 0.26    | 0.6288           |    |
| AB             | 0.25           | 1  | 0.25        | 0.51    | 0.4979           |    |
| AC             | 5.329E-        | 1  | 5.329E-     | 1.089E- | 1.0000           |    |
| BC             | 0.25           | 1  | 0.25        | 0.51    | 0.4979           |    |
| A <sup>2</sup> | 6.32           | 1  | 6.32        | 12.91   | 0.0088           |    |
| B <sup>2</sup> | 2.632E-        | 1  | 2.632E-     | 5.378E- | 0.9436           |    |
| C <sup>2</sup> | 1.16           | 1  | 1.16        | 2.37    | 0.1674           |    |
| Residual       | 3.42           | 7  | 0.49        |         |                  |    |
| Lack of Pure   | 0.62           | 3  | 0.21        | 0.30    | 0.8265           | NS |
|                | 2.80           | 4  | 0.70        |         |                  |    |
| Cor Total      | 13.26          | 16 |             |         |                  |    |

ความน่าเชื่อถือ = ร้อยละ 8.34

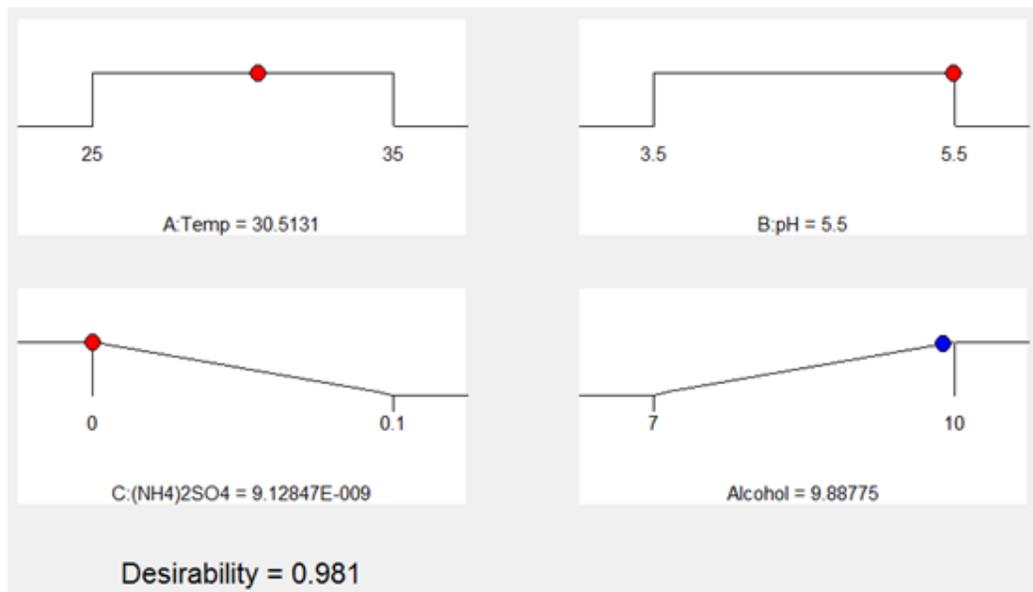
เมื่อ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) B คือ พีเอชเริ่มต้น และ C คือ ปริมาณ แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)

จากกราฟพื้นผิวตอบสนองของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (รูปที่ 4.2) สีที่ปรากฏในกราฟแสดงถึงปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากปัจจัยการหมักที่ศึกษา โดยที่สีแดงที่เข้มมากที่สุดคือ ปริมาณเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดของสภาวะนั้น ๆ ซึ่งเมื่อทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® โดยกำหนดค่าต่ำสุดและสูงสุดของปัจจัยที่ศึกษาจำนวน 3 ปัจจัย ให้อยู่ในช่วงที่ใช้ศึกษา ดังนี้ คือ ค่าอุณหภูมิต่ำสุด 25 องศาเซลเซียส และสูงสุด 35 องศาเซลเซียส, พีเอชเริ่มต้นต่ำสุด 3.5 และสูงสุด 5.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตต่ำสุด 0 กรัมต่อลิตร และสูงสุด 0.1 กรัมต่อลิตร พบว่าโปรแกรมจะทำนายหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลตามแบบจำลองทางสถิติ (สมการที่ 1) คือ อุณหภูมิ เท่ากับ 30.5 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ  $9.13 \times 10^{-9}$  กรัมต่อลิตร (หรือไม่ต้องเติม) ซึ่งสภาวะการหมักด้วยปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด (ร้อยละ 9.89) ที่ค่าความพอใจ (desirability) สูงที่สุดเท่ากับ 0.981 ดังแสดงในรูปที่ 4.3



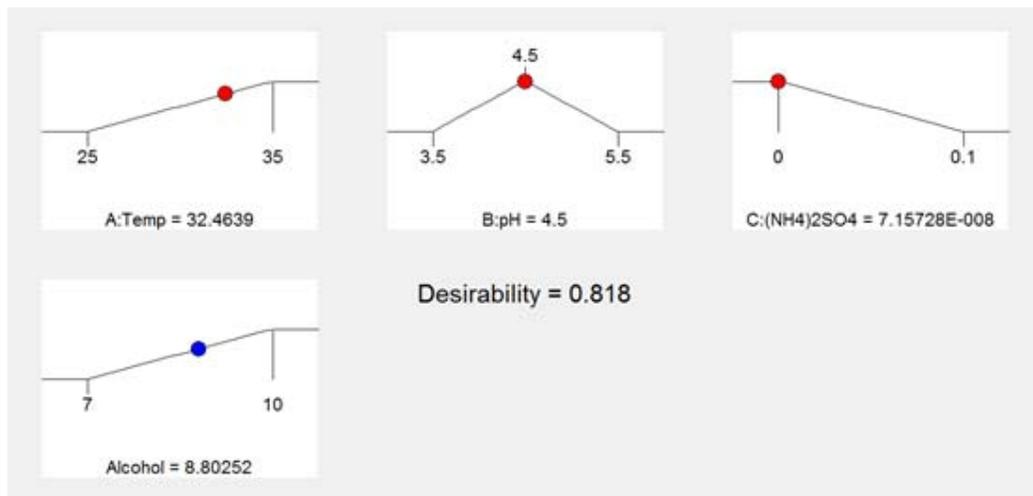
รูปที่ 4.2 กราฟพื้นผิวตอบสนองของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการหมักเอทานอลสูงสุด

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์ จากกราฟพื้นผิวตอบสนองของระดับอุณหภูมิ พีเอช และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (รูปที่ 4.2) สีที่ปรากฏในกราฟแสดงถึงปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากสภาวะการหมักของปัจจัยที่ศึกษา โดยที่สีแดงที่เข้มมากที่สุดคือปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดของสภาวะนั้น ๆ ซึ่งเมื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® Software Version 9 Free Trial โดยกำหนดค่าต่ำสุดและสูงสุดของปัจจัยที่ศึกษาจำนวน 3 ปัจจัย ให้อยู่ในช่วงที่ใช้ศึกษา ดังนี้ คือ ค่าอุณหภูมิต่ำสุด 25°C และสูงสุด 35°C, ค่าพีเอชต่ำสุด 3.5 และสูงสุด 5.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตต่ำสุด 0 กรัมต่อลิตร และสูงสุด 0.1 กรัมต่อลิตร เมื่อโปรแกรมคำนวณหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากการย่อยแป้งขนมจีนที่ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด (ร้อยละ 9.89) โดยอัตโนมัติ จะได้ปัจจัยที่เหมาะสม ดังนี้ คือ อุณหภูมิเท่ากับ 30.5°C พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และไม่ต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design-Expert® ที่ค่าความพอใจสูงที่สุดเท่ากับ 0.981

จากรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าปัจจัยที่เหมาะสมของอุณหภูมิเท่ากับ 30.5 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม ค่าความพอใจ (desirability) สูงที่สุดเท่ากับ 0.981 นั้น เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ที่ศึกษาซึ่งพบว่า ปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 3) ซึ่งสามารถเลือกใช้ปัจจัยต่าง ๆ ในการหมักที่กำหนดในแผนการทดลองที่ระดับใดระดับหนึ่งได้ทั้งหมด ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการหมักเอทานอล ในขั้นตอนการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริกแล้ว ก็ไม่จำเป็นต้องปรับ พีเอชเริ่มต้นให้สูง และไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำ รวมทั้งไม่ต้องเติมสารอาหารเสริมที่เป็นแหล่งไนโตรเจน จึงจำเป็นต้องทำการทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® ใหม่อีกครั้ง โดยกำหนดให้ค่าอุณหภูมิสูงสุด (maximize) ที่ 35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้น (target) ที่ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมน้อยที่สุด (minimize) ที่ 0 กรัมต่อลิตร พบว่าโปรแกรม Design-Expert® จะทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลให้ใหม่ คือ สภาวะการหมักที่มีอุณหภูมิเท่ากับ 32.46 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ  $7.16 \times 10^{-9}$  กรัมต่อลิตร (หรือไม่ต้องเติม) ซึ่งสภาวะการหมักด้วยปัจจัยนี้จะให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับร้อยละ 8.80 โดยมีค่าความพอใจเท่ากับ 0.818 ดังแสดงในรูปที่ 4.4



**รูปที่ 4.4** ปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด โดยการกำหนดค่าอุณหภูมิสูงสุด (maximize) ที่ 35°C ค่าพีเอช (target) ที่ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียต่ำสุด (minimize) ที่ 0 กรัมต่อลิตรในโปรแกรม Design-Expert® Software Version 9 Free Trial

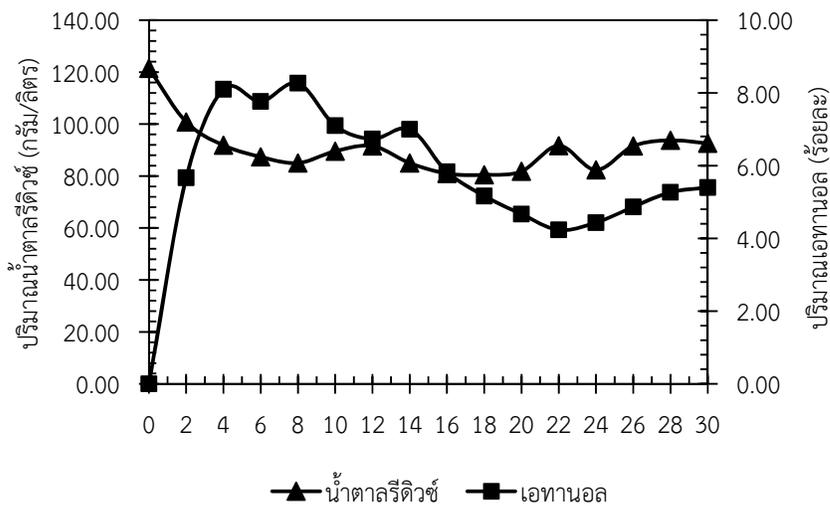
#### การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากสภาวะที่ได้จากข้อที่ 4

ในการหมักน้ำหมักที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งขนมจีนด้วยกรดด้วยเชื้อยีสต์แบบกะ และในระดับขยายปริมาตรการหมักเป็น 18 ลิตร มักจะเกิดปรากฏการณ์ที่เชื้อยีสต์ไม่เจริญหรือเจริญได้น้อย ถึงแม้ใช้ปัจจัยที่เหมาะสมจากการศึกษาแล้วก็ตาม ทั้งนี้เป็นผลสืบเนื่องมาจากการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่มีองค์ประกอบเป็นไคแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ ถูกย่อยด้วยกรด ได้เป็นมอนอแซ็กคาไรด์ (ซูกลารรณ และคณะ, 2547) อยู่ในสารละลายกรดเจือจาง และมีอุณหภูมิสูงขึ้นน้ำตาลทั้งชนิด เพนโทส และ เฮกโซส จะเกิดการเสียน้ำ(dehydration) สามโมเลกุล (วรรณ, 2549) ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลได้นั่นเอง เช่น เกิดสารเฟอร์ฟูรัล, 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (HMF) เป็นต้น (เสรี และ เฉลิม, 2012) ทำให้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ไม่สามารถนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมได้ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและทำให้ความสามารถของการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ลดลง และผู้วิจัยได้พยายามแก้ปัญหาดังกล่าว โดยการปรับเปลี่ยนรูปแบบการหมักจากแบบกะมาเป็นการหมักแบบกึ่งกะ ซึ่งจะแบ่งช่วงเวลาในการเติมน้ำหมักที่ผ่านการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง ด้วยกรดซัลฟิวริกลงไปจนถึงหมัก คือ เติมน้ำหมักครั้งละ 500 มิลลิลิตรต่อระยะเวลา 2 วัน ไปจนปริมาตร 18 ลิตร โดยจะต้องทำการหมักน้ำหมักด้วยเชื้อยีสต์แบบกะให้เชื้อยีสต์เจริญและมีปริมาณเซลล์มากก่อนที่จะเริ่มทำการหมักแบบกึ่งกะ ซึ่งพบว่า เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ในช่วงร้อยละ 6 – 8.5 ดังนั้นในการทดลองต่อไปที่ทำการหมักน้ำแป้ง

ขนมจีนเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกในระดับขยายปริมาตรการหมักเป็น 18 ลิตร เพื่อนำมาศึกษาการกลั่น จะปรับเปลี่ยนรูปแบบการหมักเป็นแบบกึ่งกะแทนการหมักแบบกะ

ผลจากหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> คือ สภาวะการหมักที่มีอุณหภูมิเท่ากับ 32.46<sup>°</sup>ซ พีเอชเท่ากับ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.0000000716 กรัมต่อ ซึ่งในการทดลองขั้นต่อไป จะนำสภาวะที่เหมาะสมในการหมักนี้มาใช้โดยมีการปรับเปลี่ยนมาใช้อุณหภูมิที่สามารถปรับค่าได้ง่าย คือ 33<sup>°</sup>ซ พีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 4.5 และไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปในน้ำหมัก เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนไม่มีผลต่อการผลิตแอลกอฮอล์และลดต้นทุนในการผลิตดังที่กล่าวไปแล้วในขั้นต้น

เมื่อนำปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักที่ได้ปรับเปลี่ยนมาใช้ศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตแอลกอฮอล์ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 สำหรับหมักเอทานอล เป็นระยะเวลา 30 วัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งจะพบว่า เชื้อยีสต์จะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการผลิตเอทานอลส่งผลให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง ที่ 8 วันเชื้อจะมีการผลิตเอทานอลสูงสุด คือ ร้อยละ 8.27 หลังจากนั้นเอทานอลก็จะมีผลลดลงเรื่อย ๆ และน้ำตาลรีดิวซ์ก็ไม่ได้ลดลง นอกจากนี้ความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 8 วัน และมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ เพราะเชื้อมีการใช้เอทานอลในกระบวนการเมทาบอลิซึม และความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นจากกระบวนการหมักมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์โดยจากผลรายงานวิจัยของ Loureiro และ Uden (1982) อ้างโดย รัชนิกร (2552) กล่าวว่าสภาวะที่เอทานอลถูกผลิตขึ้นมาจะมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์ยีสต์ โดยปริมาณเอทานอลที่ถูกผลิตขึ้นจะไปเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของลิพิด และฟอสโฟลิพิดเมมเบรน ของยีสต์ ทำให้ความสามารถในการทนต่อความร้อนของยีสต์ลดลง



**รูปที่ 4.5** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอลที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 แบบกึ่งกะที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการหมัก 30 วัน

## 5. ผลของการศึกษากระบวนการกลั่นแยกเอทานอลที่ได้จากการหมักให้ได้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95

ผลจากการกลั่นเอทานอลจากน้ำหมักที่ได้จากหมักน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งปริมาณ 10 ลิตร ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 8 แล้วกลั่นแยกเอทานอลออกให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 50 ด้วยเครื่องกลั่นลำดับส่วน โดยปรับตั้งอุณหภูมิในการกลั่นเท่ากับ 90°C และเวลาในการกลั่น 60 นาที (ศรีอุบล และสุภาชิต, 2552) ทำการกลั่นจำนวน 4 ครั้ง (ปริมาตรรวมเท่ากับ 40 ลิตร) แล้ววัดความเข้มข้นของเอทานอลโดยวิธีวัดความถ่วงจำเพาะ พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลที่กลั่นได้รวมเท่ากับ 7.395 ลิตร และมีความเข้มข้นของเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ  $54 \pm 0.82$  ซึ่งคิดเป็นผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อปริมาตรเริ่มต้น (40 ลิตร) เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ  $18.49 \pm 0.48$  ดังแสดงในตารางที่ 4.7

เมื่อนำเอทานอลที่กลั่นได้จากเครื่องกลั่นลำดับส่วนที่มีความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นร้อยละ  $54 \pm 0.82$  มากลั่นซ้ำด้วยเครื่องสกัดของแข็ง-ของเหลว โดยปรับตั้งอุณหภูมิที่กลั่นเท่ากับ 84 องศาเซลเซียส และเวลาที่กลั่น 60 นาที พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลที่กลั่นได้รวมเท่ากับ 2.925 ลิตร และมีความเข้มข้นของเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ  $87.50 \pm 4.56$  ซึ่งคิดเป็นผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อปริมาตรเริ่มต้น (7.395 ลิตร) เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ  $39.74 \pm 11.24$  ดังแสดงในตารางที่ 4.8

เมื่อนำเอทานอลที่กลั่นได้จากเครื่องกลั่นลำดับส่วนที่มีความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นร้อยละ 87.50±4.56 มากลั่นซ้ำด้วยเครื่องสกัดของแข็ง-ของเหลว โดยปรับตั้งอุณหภูมิที่กลั่นเท่ากับ 84 องศาเซลเซียส และเวลาที่กลั่น 60 นาที พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลที่กลั่นได้รวมเท่ากับ 2.295 ลิตร และมีความเข้มข้นของเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 92.50±0.71 ซึ่งคิดเป็นผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อปริมาณเริ่มต้น (2.925 ลิตร) เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 78.39±4.17 ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ซึ่งเมื่อคิดผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้โดยคิดจากปริมาตรน้ำหมักน้ำแป้งแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่นำมากลั่นเริ่มต้น 40 ลิตร จนได้เอทานอลที่ผ่านการกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 92.50±0.71 ปริมาตร 2.295 ลิตร จะมีผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อปริมาณเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 5.74 จะเห็นว่าผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ยังต่ำ ทั้งนี้ในกระบวนการศึกษาข้อมูลการกลั่นที่ให้ค่าที่ถูกต้องนี้ไม่ได้นำเอทานอลที่เหลือในหม้อต้มกลั่นซึ่งมีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 12.81 มาทำการกลั่นให้มีความเข้มข้นขึ้นอีก แต่ในทางปฏิบัติผู้วิจัยได้รวบรวมรวมน้ำที่เหลือจากการกลั่นเพื่อทำการกลั่นให้มีความเข้มข้นแล้ว

**ตารางที่ 4.7** ปริมาณเอทานอลและผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้จากหมักน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งให้มีความเข้มข้นร้อยละ 50 ด้วยเครื่องกลั่นลำดับส่วน อุณหภูมิที่กลั่น 90 องศาเซลเซียส และเวลาที่กลั่น 60 นาที

| ค่าที่ศึกษา  | ครั้งที่กลั่น |       |       |       | ค่าเฉลี่ย  | รวมทั้งหมด |
|--|---------------|-------|-------|-------|------------|------------|
|  | 1             | 2     | 3     | 4     |            |            |
| ปริมาตรที่เริ่มต้นกลั่น (ลิตร)                         | 10            | 10    | 10    | 10    | -          | 40         |
| ความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้น (ร้อยละ)                 | 8             | 8     | 8     | 8     | -          | -          |
| ปริมาตรที่กลั่นได้ (ลิตร)                              | 1.840         | 1.785 | 1.880 | 1.890 | -          | 7.395      |
| ความเข้มข้นของเอทานอลที่กลั่นได้ (ร้อยละ)              | 53            | 54    | 55    | 54    | 54         | -          |
| ผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อ ปริมาตรเริ่มต้น (ร้อยละ) | 18.40         | 17.85 | 18.80 | 18.90 | 18.49±0.48 | -          |

**ตารางที่ 4.8** ปริมาณเอทานอลและผลได้ของเอทานอลที่กลั่นซ้ำจากเอทานอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น ร้อยละ 54 ด้วยเครื่องสกัดของแข็ง-ของเหลว อุณหภูมิที่กลั่น 84 องศาเซลเซียส และ เวลาที่กลั่น 60 นาที

| ค่าที่ศึกษา  | ครั้งที่กลั่น |       |       |       |       | ค่าเฉลี่ย   | รวมทั้งหมด |
|--|---------------|-------|-------|-------|-------|-------------|------------|
|  | 1             | 2     | 3     | 4     | 5     |             |            |
| ปริมาณที่เริ่มต้นกลั่น (ลิตร)                          | 1.5           | 1.5   | 1.5   | 1.5   | 1.395 | -           | 7.395      |
| ความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้น (ร้อยละ)                 | 54            | 54    | 54    | 54    | 54    |             |            |
| ปริมาณที่กลั่นได้ (ลิตร)                               | 0.395         | 0.445 | 0.685 | 0.665 | 0.735 | -           | 2.925      |
| ความเข้มข้นของเอทานอลที่กลั่นได้ (ร้อยละ)              | 92            | 80    | 90    | 87.5  | 88    | 87.50±4.56  | -          |
| ผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อ ปริมาตรเริ่มต้น (ร้อยละ) | 26.33         | 29.67 | 45.67 | 44.33 | 52.69 | 39.74±11.24 | -          |

**ตารางที่ 4.9** ปริมาณเอทานอลและผลได้ของเอทานอลที่กลั่นซ้ำจากเอทานอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น ร้อยละ 88 ด้วยเครื่องสกัดของแข็ง-ของเหลว อุณหภูมิที่กลั่น 84 องศาเซลเซียส และ เวลาที่กลั่น 60 นาที

| ค่าที่ศึกษา  | ครั้งที่กลั่น |       | ค่าเฉลี่ย  | รวมทั้งหมด |
|--|---------------|-------|------------|------------|
|  | 1             | 2     |            |            |
| ปริมาณที่เริ่มต้นกลั่น (ลิตร)                          | 1.5           | 1.425 | -          | 2.925      |
| ความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้น (ร้อยละ)                 | 88            | 88    |            |            |
| ปริมาณที่กลั่นได้ (ลิตร)                               | 1.225         | 1.075 | -          | 2.295      |
| ความเข้มข้นของเอทานอลที่กลั่นได้ (ร้อยละ)              | 92            | 93    | 92.50±0.71 | -          |
| ผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อ ปริมาตรเริ่มต้น (ร้อยละ) | 81.33         | 75.44 | 78.39±4.17 | -          |

#### 6. ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการทำให้เอทานอลที่กลั่นได้มีความบริสุทธิ์ด้วยโมเลกุลาร์ชิฟ

ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการทำให้เอทานอลที่กลั่นได้มีความบริสุทธิ์ด้วยโมเลกุลาร์ชิฟ จะใช้สารละลายเอทานอลที่เตรียมจากเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 92.5 ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลที่กลั่นได้ในขั้นตอนสุดท้ายในช่วง 92-95 เป็นช่วงที่สามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ชิฟได้ (ณิรนุช และ สุจิตรา, 2550) โดยขั้นแรกจะทำการศึกษาหาปริมาณตัวดูดซับที่เหมาะสมสำหรับดูดซับน้ำออกจากเอทานอล จากนั้นจะ

ทำการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล ก่อนที่จะนำสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้มาใช้สำหรับดูดซับน้ำออกจากเอทานอลที่ผ่านการกลั่นจริง

### 6.1 ผลการศึกษาปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล

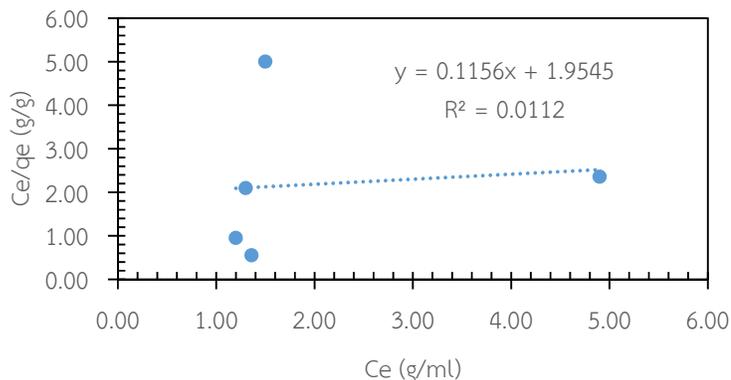
จากการศึกษาปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอลที่ระดับต่าง ๆ ได้แก่ 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 กรัม สำหรับดูดซับน้ำในเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร และคัดเลือกปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟที่เหมาะสมจากค่าปริมาณน้ำในเอทานอลที่ถูกดูดซับต่อน้ำหนักของโมเลกุลาร์ซีฟ (กรัมเอทานอลต่อกรัมโมเลกุลาร์ซีฟ) หรือ  $q_e$  พบว่า เมื่อใช้โมเลกุลาร์ซีฟในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ไม่ทำให้ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้น และเมื่อพิจารณาค่า  $q_e$  จะพบว่า ที่ปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟเท่ากับ 0.25 กรัม จะมีค่า  $q_e$  ที่มากที่สุดเท่ากับ 2.456 กรัมต่อกรัมโมเลกุลาร์ซีฟ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบค่า  $q_e$  ที่ปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.10 ซึ่งหมายความว่า ที่ปริมาณของโมเลกุลาร์ซีฟเท่ากับ 0.25 กรัม สามารถดูดซับน้ำจากเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตรได้มากที่สุด หรือคิดเป็นปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟ 25 กรัมต่อปริมาตรเอทานอล 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้ปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟนี้สำหรับการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอลต่อไป

ตารางที่ 4.10 ปริมาณน้ำในเอทานอลที่ถูกดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟที่ปริมาณต่าง ๆ

| ปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟ (กรัม) | ความเข้มข้นของ                |  |
|----------------------------|-------------------------------|--|
|                            | เอทานอลหลังการดูดซับ (ร้อยละ) | $q_e$<br>(กรัมน้ำต่อกรัมโมเลกุลาร์ซีฟ) |
| 0.125                      | 95.10±0.14                    | 2.080 <sup>1</sup> ±0.11               |
| 0.250                      | 98.64±0.23                    | 2.456 <sup>1</sup> ±0.09               |
| 0.500                      | 98.80±0.00                    | 1.260 <sup>2</sup> ±0.00               |
| 1.000                      | 98.70±0.14                    | 0.620 <sup>3</sup> ±0.01               |
| 2.000                      | 98.50±0.42                    | 0.300 <sup>3</sup> ±0.02               |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

เมื่อศึกษา Langmuir isotherm เพื่อทราบค่าปริมาณสูงสุดของน้ำที่ถูกดูดซับแบบ monolayer ต่อน้ำหนักของโมเลกุลาร์ซีฟ (กรัมต่อกรัมตัวดูดซับ) ( $q_{\max}$ ) โดยวิธีเขียนกราฟเส้นตรงระหว่าง แกน Y ด้วย  $C_e/q_e$  และ แกน X ด้วยค่า  $C_e$  จะได้ความชันเท่ากับ  $1/q_{\max}$  และจุดตัดแกน Y เท่ากับ  $1/q_{\max} b$  ดังแสดงในรูปที่ 4.6 เมื่อหาค่า  $q_{\max}$  จะได้ค่าเท่ากับ 8.65 กรัมต่อกรัมโมเลกุลาร์ซีฟ ซึ่งหมายความว่า โมเลกุลาร์ซีฟ 1 กรัม มีความสามารถดูดซับน้ำในเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 8.65 กรัม (เมื่อความหนาแน่นของน้ำเท่ากับ 1 กรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ 4.6 กราฟเส้นตรงสำหรับหาค่า Langmuir isotherm ระหว่าง  $C_e/q_e$  และ  $C_e$

## 6.2 การศึกษาอุณหภูมิต่ำและเวลาที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล

จากการศึกษาอุณหภูมิต่ำและเวลาที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอล โดยจัดให้หน่วยทดลองตามแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล มีปัจจัยที่ศึกษาคือ อุณหภูมิจำนวน 3 ระดับ คือ 25, 35 และ 40 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการดูดซับจำนวน 6 ระดับ คือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที และใช้ปริมาณโมเลกุลาร์ซีฟที่เหมาะสมจากการศึกษา คือ 25 กรัมต่อเอทานอล 100 มิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลหลังผ่านตัวดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟที่อุณหภูมิต่ำกับ 35 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการดูดซับ 50 นาที จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ  $99.21 \pm 0.01$  ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของเอทานอลที่ดูดซับที่อุณหภูมิต่ำและเวลาอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ดังนั้นจึงในการทดลองทำบริสุทธิ์เอทานอลที่กลั่นได้ในงานวิจัยนี้จะใช้อุณหภูมิต่ำกับ 35 องศาเซลเซียส และเวลาในการดูดซับ 50 นาที

ตารางที่ 4.11 ความเข้มข้นของเอทานอลหลังผ่านตัวดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟที่อุณหภูมิต่ำและเวลาในการดูดซับต่าง ๆ

| เวลา (นาที) | อุณหภูมิในการดูดซับ (องศาเซลเซียส) |                              |                              |
|-------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|             | 25                                 | 35                           | 40                           |
|             | ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ)     |                              |                              |
| 10          | 95.60 <sup>ม</sup> ± 0.04          | 96.32 <sup>ขขม</sup> ± 0.03  | 97.32 <sup>จจข</sup> ± 2.15  |
| 20          | 96.20 <sup>ขม</sup> ± 0.01         | 97.44 <sup>จขข</sup> ± 0.04  | 96.60 <sup>นขขม</sup> ± 0.08 |
| 30          | 96.90 <sup>จขข</sup> ± 0.06        | 98.08 <sup>กขคจ</sup> ± 0.08 | 97.40 <sup>จจขข</sup> ± 0.04 |
| 40          | 97.30 <sup>จจขข</sup> ± 0.03       | 98.88 <sup>กข</sup> ± 0.03   | 97.70 <sup>ขคจจ</sup> ± 0.03 |
| 50          | 98.20 <sup>กขคจ</sup> ± 0.18       | 99.21 <sup>ก</sup> ± 0.01    | 97.60 <sup>คจจ</sup> ± 0.01  |
| 60          | 98.69 <sup>กข</sup> ± 0.16         | 99.20 <sup>ก</sup> ± 0.06    | 97.52 <sup>คจจข</sup> ± 0.06 |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

## 7. การทำให้เอทานอลที่กลั่นได้มีความบริสุทธิ์ด้วยสภาวะที่เหมาะสม

จากนำสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับน้ำออกจากเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 คือ ปริมาณ โมเลกุลาร์ซีฟเท่ากับ 25 กรัมต่อเอทานอล 100 มิลลิลิตร บรรจุในคอลัมน์ (ไม่มีการนำกลับมาใช้ใหม่) อุณหภูมิในการดูดซับเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส และเวลาในการดูดซับ 50 นาที มาใช้ดูดซับน้ำในเอทานอลที่ผ่านการกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ  $92.50 \pm 0.71$  ปริมาตร 2.295 ลิตร ควบคุมอัตราการไหลของเอทานอลเท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่า ได้เอทานอลที่ผ่านการดูดซับน้ำออกมีความเข้มข้นร้อยละ  $99.23 \pm 0.02$  ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.12

**ตารางที่ 4.12** ปริมาตรและความเข้มข้นของเอทานอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์ที่มีโมเลกุลาร์ซีฟร้อยละ 25 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเวลาในการดูดซับ 50 นาที

| ค่าที่ศึกษา                    | ครั้งที่กลั่น     | ครั้งที่กลั่น |       |       | ค่าเฉลี่ย        | รวมทั้งหมด |
|--------------------------------|-------------------|---------------|-------|-------|------------------|------------|
|                                |                   | 1             | 2     | 3     |                  |            |
| ปริมาตรเอทานอล (มิลลิลิตร)     | เริ่มต้น          | 1,000         | 1,000 | 295   | -                | 2,295      |
|                                | หลังผ่านการดูดซับ | 345           | 340   | 110   | -                | 750        |
| ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ) | เริ่มต้น          | 92.50         | 92.50 | 92.50 | $92.50 \pm 0.00$ | -          |
|                                | หลังผ่านการดูดซับ | 99.21         | 99.23 | 99.24 | $99.23 \pm 0.02$ | -          |

## 8. การศึกษาการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากเอทานอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

เมื่อนำเอทานอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ  $99.23 \pm 0.02$  ปริมาตร 750 มิลลิลิตร มาผลิตเป็นเอทานอลเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอล์) ในอัตราส่วนผสมเอทานอลร้อยละ 10 และน้ำมันเบนซินออกเทน 91 ร้อยละ 90 โดยปริมาตร จะได้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ออกเทน 91 ปริมาตรทั้งหมด 7.80 ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.13 ซึ่งในขั้นตอนหลังจากผลิตเป็นน้ำมันแก๊สโซฮอล์ ออกเทน 91 แล้วยังไม่ได้ส่งตัวอย่างไปตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีและกายภาพตามข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันแก๊สโซฮอล์ ของกรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน พ.ศ. 2551 เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องระยะเวลา แต่ได้นำน้ำมันแก๊สโซฮอล์ดังกล่าวมาทดลองใช้กับเครื่องยนต์ขนาดเล็ก (เครื่องตัดหญ้า) และจากการสังเกตระหว่างการใช้งานไม่พบผลกระทบใด ๆ

**ตารางที่ 4.13** การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากเอทานอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

| อัตราส่วนผสม (ร้อยละ)           |                        | ปริมาตร (ลิตร)                  |                        |                         |
|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------------------|
| เอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 99.23 | น้ำมันเบนซิน ออกเทน 91 | เอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 99.23 | น้ำมันเบนซิน ออกเทน 91 | น้ำมันแก๊สโซฮอล์ (ลิตร) |
| 10                              | 90                     | 0.78                            | 7.02                   | 7.80                    |

## บทที่ 5

### บทสรุป และข้อเสนอแนะ

#### 1. บทสรุป

งานวิจัยเรื่องการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งขนมจีนสามารถสรุปได้ดังนี้

1) กระบวนการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งความเข้มข้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ  $497.91 \pm 0.69$  กรัมต่อลิตร

2) สภาพที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 5 คือ ไม่ต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนลงในน้ำหมักก่อนทำการหมักด้วยเชื้อยีสต์ แต่ต้องปรับพีเอชของน้ำหมักเริ่มต้นให้เท่ากับ 4.5 ก่อนทำการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 และควบคุมอุณหภูมิในการหมักให้ได้เท่ากับ 32.5 องศาเซลเซียส (ในทางปฏิบัติสามารถปรับตั้งค่าอุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียสได้) ซึ่งจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.27 ที่ระยะเวลาการหมัก 8 วัน แต่ในการปฏิบัติการขยายปริมาตรการผลิตเป็น 18 ลิตร จะต้องปรับรูปแบบการหมักจากแบบกะมาเป็นการหมักแบบกึ่งกะ และใช้เวลาหมักเพิ่มขึ้นเป็น 30 วัน

3) การกลั่นเอทานอลให้มีความเข้มข้นจากปริมาตรน้ำหมักน้ำแป้งแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่นำมากลั่นเริ่มต้น 40 ลิตร จนได้เอทานอลที่ผ่านการกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ  $92.50 \pm 0.71$  ปริมาตร 2.295 ลิตร จะมีผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อปริมาตรเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 5.74

4) เอทานอลที่ผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์แล้ว (ความเข้มข้นร้อยละ  $99.23 \pm 0.02$ ) สามารถมาผลิตเป็นเอทานอลเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอล์) เบนซินออกเทน 91 ได้ปริมาตรเท่ากับ 7.80 ลิตร ซึ่งสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์ขนาดเล็กได้

#### 2. ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ยังมีข้อเสนอแนะหรือปัญหาในการทำวิจัย พอจะสรุปได้ดังนี้

1) น้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งสามารถนำมากรอง แล้วย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์และหมักกับเชื้อยีสต์ให้เกิดเอทานอลได้ แต่ในขั้นตอนการย่อยด้วยกรดจะมีสารที่จะไปยับยั้งไม่ให้ยีสต์เจริญ ซึ่งจำเป็นต้องหาวิธีการแยกสารเหล่านั้นออก เพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพมากที่สุด

2) ในขั้นตอนการกลั่นน้ำหมักให้ได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ถ้าหากใช้เครื่องกลั่นที่มีประสิทธิภาพ จะทำให้ได้ผลได้ของเอทานอลที่กลั่นได้ต่อปริมาตรเริ่มต้นสูงขึ้นโดยไม่สูญเสียทางเศรษฐศาสตร์

3) ในขั้นตอนการทำให้เอทานอลที่ผ่านการกลั่นมีความบริสุทธิ์พร้อมที่จะนำไปเป็นส่วนผสมในการผลิตเป็นเอทานอลเชื้อเพลิง หรือน้ำมัน (แก๊สโซฮอล์) นั้น จะต้องใช้เทคโนโลยีอื่นที่ทันสมัยกว่าการใช้โมเลกุลาร์ซีฟ เพื่อการแยกน้ำออกจากเอทานอลที่มีประสิทธิภาพและมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ เช่น เทคโนโลยีเยื่อบาง



### เอกสารอ้างอิง

- กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543. เทคโนโลยีแปง. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ฯ.
- ซันนันท นิवासวงษ์ และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลลูโลสเอทานอลในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 4 (4): 1073-1088.
- ณีนุช ควรเชิดชู และ สุจิตรา วงเกษมจิตต์. 2550. การผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงผสมเอทานอล. วิทยาลัย โปไตรเลียมและปิโตรเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิรนาม. 2546. การผลิตเอทานอลแอลกอฮอล์ <http://www.geocities.com/zoe595/2.html>. 25 กรกฎาคม 2546.
- นิรนาม. มปป. เทคโนโลยีการผลิตเอทานอล <http://www.teenet.chula.ac.th/sustainable/detail8-2.asp?ID=775H>. 18 กันยายน 2551.
- ประสาน รัตนสาลี. 2549. การผลิตเอทานอลใช้น้ำมันใต้พิภพ <http://www.technoinhome.com/vspcite/front/board/show.php?tbl=tblwb03&gid=22&id=783&PHPSESSID=36cb3d92cc75c2454bf4c64ea9bbf270H>. 18 กันยายน 2551.
- ปิ่นกมล นิยมวิทย์ และ อภิญญา จินดาประเสริฐ. 2545. การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจาก วัสดุดีบุกทางการเกษตร, กรุงเทพฯ ฯ. 125 น.
- พัทตร์ประไพ ประจำเมือง. 2546. การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ใน ถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- รัชนิกร หมวดพล. 2552. การผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม. คณะ บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 150 น.
- วรรณ ตูลยธัญ. 2549. เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ ฯ. 166 น.
- วุฒิชัย คำดี, สุกิจ แจ่มแจ่ม และ สุรเดช ภูพานนา. 2547. การศึกษาการกลั่นเอทานอลโดยระบบการ กลั่นแบบ azeotrop, น. 2-20. ใน. รายงานโครงการหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต. คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- ศรีอุบล ทองประดิษฐ์ และ สุภาจิต ชุกลิน. 2552. การผลิตเอทานอลจากเงาะคุณภาพต่ำเพื่อใช้เป็น พลังงานทดแทน (แก๊สโซฮอลล์). รายงานการวิจัย คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

- ศรีอุบล ทองประดิษฐ์ และ อุดุลย์สมาน สุขแก้ว. 2559. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส. การประชุมวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 12, น. 513-517.
- ศรีอุบล ทองประดิษฐ์, ธนิกันต์ ธรสินธุ์, อุดุลย์สมาน สุขแก้ว และ วีรพงศ์ เขียรสงค์. 2559. สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนที่ผ่านการแปรสภาพ. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 8, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ, 24-26 สิงหาคม 2559, น. 311-313.
- ศุภวรรณ ตันตยานนท์ และคณะ. 2547. ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์บนพื้นฐานความปลอดภัยทางเคมีและการลดมลพิษ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ ฯ 306 น.
- สุนิดา วีระสุข. 2547. การหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ถูกตรึงในถังหมัก. สัมมนาทางเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.
- สุนี ลาวัณยากุล. 2546. แอลกอฮอล์ “เอทานอล”  
[http://www.thaienvironment.net/update\\_area/article\\_txt](http://www.thaienvironment.net/update_area/article_txt). 25 กรกฎาคม 2546
- สุภาพร ชูช่วย. 2548. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ถูกต้อง. ปัญหาพิเศษสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.
- เสรี มหาวิชัย และ เฉลิม เรื่องวีริยะชัย. 2555. การผลิตกลีโคเซลลูโลสเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048. Veridian E-Journal (วิทย์). 5 (3): 429-445.
- อุดุลย์สมาน สุขแก้ว และ ประเทศร์ รักนาม. 2549. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 405. ปัญหาพิเศษสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาอุตสาหกรรม คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.
- A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis: The association of official analytical chemists. Arlington, Virginia.
- Anonymous. 2016. Multifactor RSM Tutorial. Stat-Ease, Inc. Access to:  
<http://www.statease.com/productattachments/index/download?id=11>. July 03, 2016.
- Davis, L., Rogers, P., Pearce, J. and peiris, P. 2006. Evaluation of Zymomonas - based ethanol production from hydrolysed waste starch steam. Biomass and Bioenergy. 30: 809-814.
- Karimi, M. and Biri, D. 2016. The synergetic effect of starch and alpha amylase on the biodegradation of n-alkanes. Chemosphere. 152: 166-172.

- Khoo, H. H. 2015. Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 46: 100-119.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Niblick, B. and Landis, A. E. 2016. Assessing renewable energy potential on united states marginal and contaminated sites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 60: 489-497.
- Pintado, J., P., G. J. and Raimbault, M. 1999. Lactic acid production from mussel processing wastes with an amylolytic bacterial strain. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 590-598.
- Pourfarzad, A., Najafi, M. B. H., Khodaparast, M. H. H., Khayyat, M. H. and Malekpour, A. 2014. Fractionation of *eremurus spectabilis* fructans by ethanol: Box-behknen design and principal component analysis. *Carbohydrate Polymers*. 106: 374-383.
- Prado, J. M., Lachos-Perez, D., Forster-Carneiro, T. and Rostagno, M. A. 2016. Sub- and supercritical water hydrolysis of agricultural and food industry residues for the production of fermentable sugars: A review. *Food and Bioproducts Processing*. 98: 95-123.
- Schneiderman, S. J., Johnson, R. W., Menkhaus, T. J. and Gilcrease, P. C. 2015. Quantifying second generation ethanol inhibition: Design of experiments approach and kinetic model development. *Bioresource Technology*. 179: 219-226.
- Silveira, M. H. L., Aguiar, R. S., Siika-aho, M. and Ramos, L. P. 2014. Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. *Bioresource Technology*. 151: 392-396.
- Thongpradistha, S. 2007. Decolorization of Sugar Syrup by using Bagasse Fly Ash. M.S. Thesis in biotechnology School of bioresources and Technology. King Mongkut's University of Technology. 111 p.
- Torre-González, F. J. D. l., Narváez-Zapata, J. A., López-y-López, V. E. and Larralde-Coron, C. P. 2016. Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *LWT - Food Science and Technology*. 67: 1-7.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร Yeast Malt Medium (YM) สำหรับเชื้อยีสต์ ประกอบด้วย

|           |      |      |
|-----------|------|------|
| ยีสต์สกัด | 3.0  | กรัม |
| มอลต์สกัด | 5.0  | กรัม |
| เบปโตน    | 5.0  | กรัม |
| กลูโคส    | 10.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น  | 1.0  | ลิตร |

นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาละลายกับน้ำกลั่น 1.0 ลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 นอร์มัล และสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: YM Agar เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ YM broth แต่เติมวุ้นร้อยละ 1.5 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์

### 1. การวิเคราะห์หาปริมาณแบ่งทั้งหมด (Pintado, *et al.*, 1999)

#### 1.1 สารเคมี

- 1) ไอโอดีน
- 2) โพแทสเซียมไอโอไดด์

#### 1.2 วิธีการ

1) การเตรียมสารละลายไอโอดีน (Iodine Solution) ชั่งโพแทสเซียม 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง นำไปเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 4:100 ก่อนใช้

#### 1.3 วิธีการวิเคราะห์

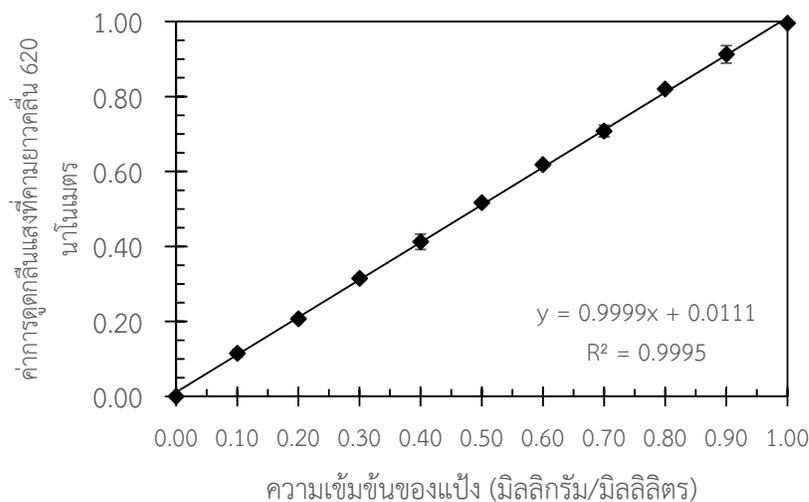
##### ก. การเตรียมกราฟมาตรฐานของแบ่ง

- 1) โดยเตรียมสารละลายแบ่งให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 2) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (blank ใช้ น้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร แทน)
- 3) เติมสารละลายไอโอดีนปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

- 4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
- 5) นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

#### ข. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปีเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งเช่นเดียวกันกับข้อ 1)



รูปผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาความเข้มข้นของแป้งที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

2. การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟินอล-ซัลเฟต (ดัดแปลงจาก Dobios, *et al.* 1956 โดย ศรีอุบล, 2545)

#### 2.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร

#### 2.2 สารเคมี

- 1) สารละลายฟินอลความเข้มข้นร้อยละ 5 (ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังเพราะอาจจะทำให้เกิดมะเร็งได้ และควรเก็บสารเคมีดังกล่าวไว้ในที่เย็นเสมอ)
- 2) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
- 3) สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งกลูโคสที่อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

### 2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

4) เจือจางสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตร

5) ใส่สารละลายตัวอย่างต่อแบลงค์ หรือสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

6) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

7) เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วพร้อมกัน เขย่าให้เข้ากัน

8) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หรือจนเย็น

9) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร โดยเทียบจากแบลงค์ ซึ่งใช้น้ำกลั่น แทนสารละลายตัวอย่าง

### 2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

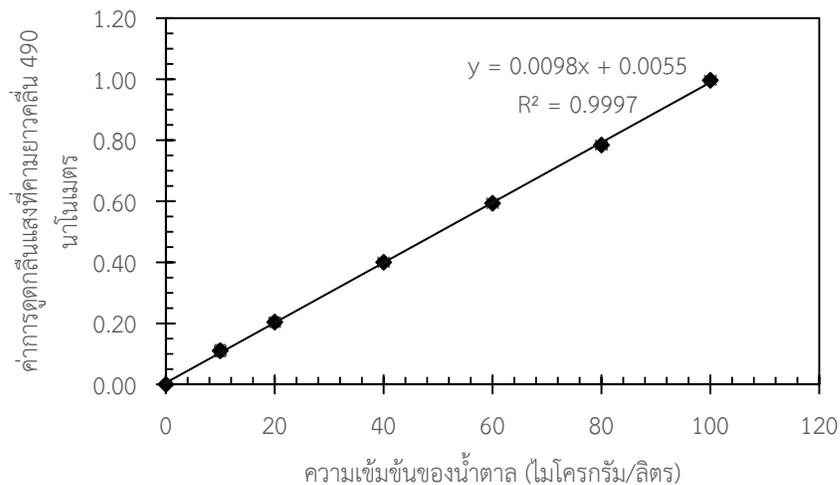
1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2) เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วพร้อมกัน เขย่าให้เข้ากัน (โดยปล่อยกรดลงไปทีผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วกว่าการค่อย ๆ ปล่อยลงข้าง ๆ)

3) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หรือจนเย็น

4) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร

5) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน



รูปผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานสำหรับหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

### 3. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

#### 3.1 สารเคมี

1) สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เตรียมโดยชั่ง DNS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายต่างที่ละลาย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate ลงไปที่ละลายจนครบ 300 กรัม เติม sodium sulphite 0.5 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

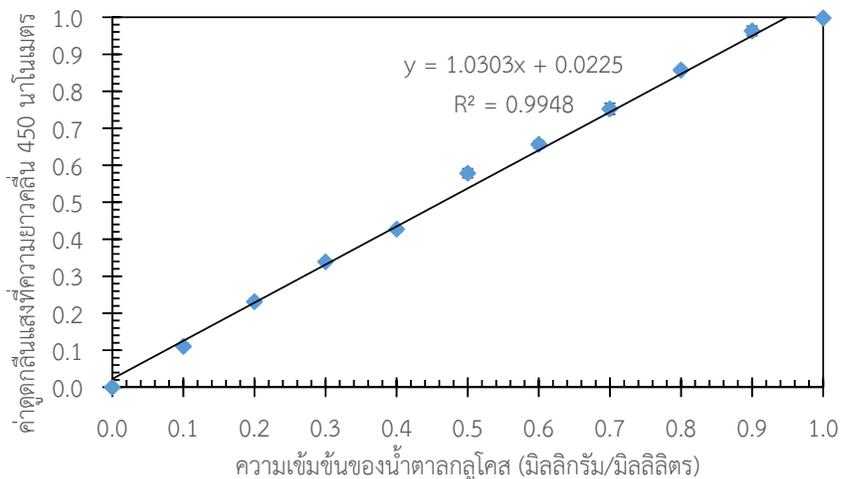
2) สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางผนวก ข1 ความเข้มข้นมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

| หลอดที่ | สารละลายกลูโคส<br>(มล.) | น้ำกลั่น<br>(มล.) | ความเข้มข้นของ<br>กลูโคส (มก./มล.) |
|---------|-------------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1       | 0.0                     | 1.0               | 0.0                                |
| 2       | 0.2                     | 0.8               | 0.2                                |
| 3       | 0.4                     | 0.6               | 0.4                                |
| 4       | 0.6                     | 0.4               | 0.6                                |
| 5       | 0.8                     | 0.2               | 0.8                                |
| 6       | 1.0                     | 0.0               | 1.0                                |

### 3.2 วิธีการ

- 1) ดูดสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (0.0-1.0 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องการวิเคราะห์ 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง
- 2) เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดโดยคลายเกลียวให้หลวมแล้วนำหลอดไป ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
- 3) แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็นทันทีเป็นเวลา 5 นาที
- 4) เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
- 5) นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง



รูปผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

#### 4. การวัดปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยวินิโอมิเตอร์ (vinometer)

วินิโอมิเตอร์เป็นเครื่องมือกะทัดรัด พกพาสะดวก เหมาะสำหรับใช้วัดปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักไวน์ และใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย ได้อย่างสะดวกรวดเร็ว ภายในเพียง 2-3 นาที

##### วิธีการ

- 1) เทน้ำหมักที่ปรับอุณหภูมิเท่ากับ 20°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแล้ว ลงในเครื่องวินิโอมิเตอร์ ปล่อยให้ไวน์ไหลลง จนหยดลงด้านล่าง ดูให้แน่ใจว่า ไม่มีฟองอากาศอยู่ในท่อ
- 2) คว่ำวินิโอมิเตอร์ลง ไวน์จะไหลย้อนกลับ จนกระทั่งมาหยุดอยู่ที่จุด ๆ หนึ่ง ในท่อ
- 3) อ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์เป็นร้อยละ (โดยปริมาตร) ได้จากขีดของเครื่อง ณ จุดที่น้ำไวน์ในท่อหยุดไหล

หมายเหตุ: ในกรณีที่มีฟองอากาศอยู่ในท่อ ให้ใช้ตัวเป่าและติดก้านเพื่อช่วยให้ไวน์ไหล และดันฟองอากาศให้เคลื่อนออกจากท่อ

#### 5. การวัดปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยวิธีวัดความถ่วงจำเพาะ

สำหรับวัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0-100

##### วิธีการ

- 1) โดยนำแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทในลงในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาปรับอุณหภูมิให้ได้เท่ากับ 20°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 2) หย่อนเครื่องวัดแอลกอฮอล์แบบวัดความถ่วงจำเพาะ (Alcoholometer, Gay Lussac – Cartier scale) แล้วอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์

## 6. การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

### อุปกรณ์

- 1) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น Clarus 600
- 2) ขวดใส่ตัวอย่าง (vial)
- 3) ตัวกรองตัวอย่าง

### วิธีการ

- 1) สร้างกราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 99.99 จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอลกับพื้นที่ใต้กราฟ และสมการดังตารางผนวก ข2
- 2) เตรียมตัวอย่างที่จะวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล กรองใส่ในขวด Vial
- 3) นำขวดใส่ตัวอย่างไปวางบนถาดป้อนตัวอย่างของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี
- 4) คำนวณปริมาณเอทานอลจากสมการเส้นตรงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอลกับพื้นที่ใต้กราฟ

### สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เอทานอล

- Carrier gas: Helium 10 ml/min, Hydrogen 45 ml/min, Air zero 450 ml/min
- Carrier flow rate: 1 ml/min
- Split flow: 20 ml/min
- Column: Wax 0.32 mm ID, 30-meter Length, Max Temp 230°C
- Temperature: Inject 50°C, Oven: 700°C 9 min, FID 150°C

ตารางผนวก ข2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอลกับพื้นที่ใต้กราฟ

| ปริมาณเอทานอล (ร้อยละ) | พื้นที่ใต้กราฟ         |
|------------------------|------------------------|
| 20.00                  | $2.236550 \times 10^5$ |
| 40.00                  | $2.274878 \times 10^5$ |
| 60.00                  | $3.507660 \times 10^5$ |
| 80.00                  | $4.937442 \times 10^5$ |
| 99.99                  | $6.186478 \times 10^5$ |

Retention time: 2.084 min

จะได้สมการสำหรับหาปริมาณเอทานอล (Y) จากพื้นที่ใต้กราฟ (X) คือ

$$Y = 11341.835285X - 10020.560311$$

$$R^2 = 0.999080$$

ภาคผนวก ค. ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

**ตารางผนวกที่ ค1** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ 10 และ 20 ยูนิต ระยะเวลาในการย่อย 20 ชั่วโมง

| แหล่งของความแปรปรวน | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F               |
|---------------------|----|----------------|-------------|---------|----------------------|
| ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ | 1  | 9.95402500     | 9.95402500  | 12.18   | 0.0732 <sup>ns</sup> |
| ความคลาดเคลื่อน     | 2  | 1.63385000     | 0.81692500  |         |                      |
| รวม                 | 3  | 516.8750000    |             |         |                      |

ความน่าเชื่อถือ = ร้อยละ 4.44

หมายเหตุ ns ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแสดงดังตารางที่ 4.2

**ตารางผนวกที่ ค2** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต พีเอชเท่ากับ 5, 6 และ 7 ระยะเวลาในการย่อย 20 ชั่วโมง

| แหล่งของความแปรปรวน | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F  |
|---------------------|----|----------------|-------------|---------|---------|
| ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ | 2  | 259.7424222    | 129.8712111 | 26.88   | 0.0010* |
| ความคลาดเคลื่อน     | 6  | 28.9939333     | 4.8323222   |         |         |
| รวม                 | 8  | 288.7363556    |             |         |         |

ความน่าเชื่อถือ = ร้อยละ 8.21

หมายเหตุ \* ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแสดงดังตารางที่ 4.3

**ตารางผนวกที่ ค3** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากย้อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| แหล่งของความแปรปรวน | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F  |
|---------------------|----|----------------|-------------|---------|---------|
| ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ | 4  | 103519.3215    | 25879.8304  | 3481.70 | <.0001* |
| ความคลาดเคลื่อน     | 5  | 37.1656        | 7.4331      |         |         |
| รวม                 | 9  | 103556.4870    |             |         |         |

ความน่าเชื่อถือ = ร้อยละ 0.81

หมายเหตุ \* ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแสดงดังตารางที่ 4.4

**ตารางผนวกที่ ค4** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำในเอทานอลที่ถูกดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟที่ปริมาณต่าง ๆ

| แหล่งของความแปรปรวน            | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F  |
|--------------------------------|----|----------------|-------------|---------|---------|
| ปริมาณน้ำในเอทานอลที่ถูกดูดซับ | 4  | 6.79880960     | 1.69970240  | 392.69  | <.0001* |
| ความคลาดเคลื่อน                | 5  | 0.02164200     | 0.00432840  |         |         |
| รวม                            | 9  | 6.82045160     |             |         |         |

ความน่าเชื่อถือ = ร้อยละ 4.90

หมายเหตุ \* ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำในเอทานอลที่ถูกดูดซับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแสดงดังตารางที่ 4.10

**ตารางผนวกที่ ค5** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอทานอลหลังผ่านตัวดูดซับด้วยโมเลกุลาร์ซีฟที่อุณหภูมิและเวลาในการดูดซับต่าง ๆ

| แหล่งของความแปรปรวน                    | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F  |
|--|----|----------------|-------------|---------|---------|
| ความเข้มข้นของเอทานอลหลังผ่านตัวดูดซับ | 17 | 35.77008889    | 2.10412288  | 8.04    | <.0001* |
| ความคลาดเคลื่อน                        | 18 | 4.71200000     | 0.26177778  |         |         |
| รวม                                    | 35 | 40.48208889    |             |         |         |

ความน่าเชื่อถือ = ร้อยละ 0.52

หมายเหตุ \* ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของเอทานอลหลังผ่านตัวดูดซับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแสดงดังตารางที่ 4.11

## ภาคผนวก ค. การเผยแพร่ผลงานวิจัย

### ผลงานตีพิมพ์:

ศรียุบล ทองประดิษฐ์, ธนิกานต์ ธรสินธุ์, อุดุลย์สมาน สุขแก้ว และ วีรพงศ์ เขียรสงค์. 2559. สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนที่ผ่านการแปรสภาพ. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 8, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล กรุงเทพมหานคร, 24-26 สิงหาคม 2559, หน้า 311-313.

ศรียุบล ทองประดิษฐ์, อุดุลย์สมาน สุขแก้ว, ธนิกานต์ ธรสินธุ์ และ วีรพงศ์ เขียรสงค์. 2559. สภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งโรงงานผลิตขนมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก. การประชุมนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ ครั้งที่ 1, โรงแรมแกรนด์ฮิลล์รีสอร์ทแอนด์สปา จังหวัดนครสวรรค์, 10 สิงหาคม 2559, หน้า 110.

ศรียุบล ทองประดิษฐ์ และ อุดุลย์สมาน สุขแก้ว. 2559. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส. การประชุมวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 12, โรงแรมวังจันทร์ ริเวอร์วิว จังหวัดพิษณุโลก, 8 - 10 มิถุนายน พ.ศ. 2559, หน้า 513 - 517.

### การนำเสนอผลงานวิจัยแบบ Oral:

ศรียุบล ทองประดิษฐ์. 2559. สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนที่ผ่านการแปรสภาพ. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 8, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล กรุงเทพมหานคร, 24-26 สิงหาคม 2559.

ศรียุบล ทองประดิษฐ์. 2559. สภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งโรงงานผลิตขนมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก. การประชุมนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ ครั้งที่ 1, โรงแรมแกรนด์ฮิลล์รีสอร์ทแอนด์สปา จังหวัดนครสวรรค์, 10 สิงหาคม 2559.

ศรียุบล ทองประดิษฐ์. 2559. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส. การประชุมวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 12, โรงแรมวังจันทร์ ริเวอร์วิว จังหวัดพิษณุโลก, 8 - 10 มิถุนายน พ.ศ. 2559.

รางวัลที่ได้รับ:

The 1<sup>st</sup> Best Thai Oral Presentation Award on Recognition of the Outstanding  
in The 1<sup>st</sup> National & International Conference of Nakhon Sawan Rajabhat University



ENETT12-BT-23

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว  
ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

Optimum Conditions for Waste Starch Hydrolysis from Thai Rice Vermicelli Factory to  
Monosaccharides by using  $\alpha$ -Amylase Enzyme

ศรีอุบล ทองประดิษฐ์<sup>1\*</sup> และอดุลย์สมาน สุขแก้ว<sup>2</sup>

<sup>1</sup> คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 133 หมู่ที่ 5 ตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่  
จังหวัดนครศรีธรรมราช รหัสไปรษณีย์ 80240

<sup>2</sup> คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 133 ถนนเทศบาล 3 ตำบลสะเตง อำเภอเมือง  
จังหวัดยะลา รหัสไปรษณีย์ 95000

\*E-mail: sriubol@gmail.com

### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน พบว่าแป้งเหลือทิ้งที่นำมาศึกษามีพีเอชที่สม่ำเสมอเท่ากับ 3.69 มีปริมาณแป้งทั้งหมดเท่ากับ  $32.73 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร และปริมาณของแข็งทั้งหมดเท่ากับ  $35.57 \pm 0.60$  กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้น 10 ยูนิต ที่เวลา 20 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $18.78 \pm 1.24$  กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาความเหมาะสมของพีเอชในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเดียวกัน พบว่าการปรับพีเอชของน้ำแป้งด้วยสารละลายอะซิเตตที่พีเอช 5 สามารถย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งได้ดีที่สุดและได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $31.20 \pm 0.49$  กรัมต่อลิตร ซึ่งในอนาคตการนำสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยกำจัดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์สำหรับใช้เป็นแหล่งผลิตพลังงานทดแทน

**คำสำคัญ:** การย่อยสลาย แป้งเหลือทิ้ง ขนมจีน น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

### Abstract

The objective of this study was to optimum conditions for waste starch hydrolysis from Thai rice vermicelli factory to monosaccharides by using  $\alpha$ -amylase enzyme. The results found that usual pH of waste starch was 3.69. The total starch content and total solid content of the residual starch were  $32.73 \pm 0.01$  and  $35.57 \pm 0.60$  g/L, respectively. An optimized condition of wasted starch hydrolysis was initial 20% waste starch for 10 hours with 10 unit  $\alpha$ -amylase enzyme and  $18.78 \pm 1.24$  g/L reducing sugar content. To investigate pH suitability for waste starch hydrolysis by  $\alpha$ -amylase in the similar condition, it found that pH adjustment of waste starch with acetate buffer solution to reach pH 5 was the best condition of waste starch hydrolysis with  $31.20 \pm 0.49$  g/L reducing sugar concentration. Therefore, in the future, utilization of such optimum conditions for waste starch hydrolysis with  $\alpha$ -amylase enzyme would be a promising alternative approach to eliminate environmentally affected waste and, at the same time, economical valorization of the waste into an alternative energy source.

**Keywords:** Hydrolysis, Waste Starch, Thai Rice Vermicelli, Monosaccharide,  $\alpha$ -Amylase Enzyme



## 1. บทนำ

น้ำมันเชื้อเพลิงจัดเป็นแหล่งทรัพยากรพลังงานที่สำคัญ และสร้างความสะดวกต่อผู้บริโภคของประเทศไทยมานาน แต่ปัจจุบันแหล่งผลิตน้ำมันในประเทศมีสัดส่วนไม่เพียงพอกับความ ต้องการของผู้บริโภค ประเทศไทยต้องสูญเสียเงินตราหลายแสน ล้านบาทต่อปีในการนำน้ำมันจากต่างประเทศมาใช้ และมี แนวโน้มที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง มีการประมาณการอย่างคร่าวๆ ว่า โลกเราจะมีน้ำมันสำรองใช้ได้อีกประมาณ 30-40 ปี [1, 2] การคิดค้นแหล่งพลังงานใหม่ๆ เพื่อทดแทนน้ำมันเกิดขึ้นมานาน แล้ว แต่เพิ่งจะเริ่มตื่นตัวกันอย่างจริงจังเมื่อราคาน้ำมันพุ่งขึ้นสูง เกินกว่าที่จะยอมรับได้ในขณะนี้ ซึ่งแหล่งพลังงานมีหลาย ประเภททั้งที่เป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปและแหล่ง พลังงานที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ ได้แก่ พลังงานก๊าซ ธรรมชาติ ก๊าซปิโตรเลียมเหลว ถ่านหิน หินน้ำมัน พลังงาน แสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงาน นิวเคลียร์ ก๊าซชีวภาพ และพลังงานจากเอทานอล เป็นต้น [3] เอทานอลจัดเป็นแหล่งพลังงานที่ได้รับความสนใจจากประชาชน ทั่วไป เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่เกิดจากการหมัก ผลผลิตหรือเศษเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีส่วนผสมของแป้ง หรือน้ำตาล ได้แก่ อ้อย น้ำตาล กากน้ำตาล กากอ้อย ปีรุธ (หัวผักกาดหวาน) แป้งมันสำปะหลัง มันเทศ ธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวโพดข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง โดยจะเปลี่ยนแป้ง จากพืชให้เป็นน้ำตาลต่างๆ เป็นน้ำตาล และหมักเป็นเอทานอล [4] ด้วยยีสต์เพราะยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว และเพิ่ม ปริมาณได้มาก แต่มีคุณสมบัติที่เป็นข้อจำกัดบางประการ เช่น ความทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่สูง อุณหภูมิที่ใช้ ในการหมัก ชนิดของแหล่งคาร์บอน เป็นต้น จึงมีการพัฒนา เพื่อคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์อื่นๆ ให้มี ประสิทธิภาพที่ดีในการผลิตเอทานอล [5] แต่สิ่งสำคัญที่ควร พิจารณาในการผลิตเอทานอล คือ การใช้วัตถุดิบมีต้นทุนต่ำและ สามารถย่อยสลายได้ง่าย มาเป็นแหล่งวัตถุดิบเริ่มต้นที่ใช้ใน กระบวนการหมัก ซึ่งน้ำแป้งที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต ขนมนมจืด เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลสูง [6, 7] นอกจากนี้หากระบายน้ำแป้งเหลือทิ้งดังกล่าวลงสู่แหล่งน้ำ ธรรมชาติ จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเพื่อ แก้ไขปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงนำ น้ำแป้งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมนมจืดมาใช้ประโยชน์ใน การผลิตเอทานอล โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย สลายด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพื่อเปลี่ยนเป็นสารละลาย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในกระบวนการ หมักเอทานอลต่อไป

## 2. วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย

### 2.1 วัตถุดิบ

น้ำแป้งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมนมจืดจาก โรงงานผลิตขนมนมจืดน้องขวัญ ตำบลนาโพธิ์ อำเภอทุ่งสง จังหวัด นครศรีธรรมราช และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทางการค้า (Enzyme Termamyl® 2X) ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ยี่ห้อ Sigma จากบริษัท Novo Nordisk Co., Bagsvaerd, ประเทศเดนมาร์ก

### 2.2 การศึกษาของคัพประกอบเบื้องต้นของน้ำแป้งเหลือ ทิ้งจากโรงงานผลิตขนมนมจืด

นำน้ำแป้งเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมนมจืดนำมา ศึกษาของคัพประกอบต่างๆ ได้แก่ พีเอช ปริมาณแป้งทั้งหมด [8] และปริมาณของแข็งทั้งหมด [9]

### 2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำ แป้งเหลือทิ้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

2.3.1 เตรียมผงแป้งจากน้ำแป้งเหลือทิ้ง โดยนำ น้ำแป้งที่ได้จากโรงงานผลิตขนมนมจืดมากรองแยกเอาเฉพาะส่วน ที่เป็นของแข็งด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่เป็นของแข็งไปอบใน ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมาร่อนด้วยตะแกรงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 125 ไมโครครอน แล้วเก็บในถุงพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิห้อง [10]

2.3.2 เตรียมน้ำแป้งให้มีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยใช้ผงแป้งที่เตรียมได้จากข้อที่ 2.3.1 จำนวน 20 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วทำให้มี ลักษณะเป็นเจล (gelatinization) โดยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ว ทิ้งให้เย็นประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส จากนั้นจะดูตัวอย่งน้ำแป้งปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร [11] เติมน้ำเอนไซม์แอลฟา อะไมเลสที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ยูนิท จำนวน 1 มิลลิลิตร [12-15] แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 10, 30, 60, 120, 180, 240 นาที และ 20 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างมา วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS Method [15, 16] ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟา อะไมเลสที่เวลาต่างๆ

2.3.3 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำ แป้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์สำหรับใช้ปรับพี เอชให้ได้เท่ากับ 5 และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับ

ใช้ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6 และ 7 ทำการทดลองเหมือนกับข้อที่ 2.3.2 จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พีเอชต่างๆ [16-18]

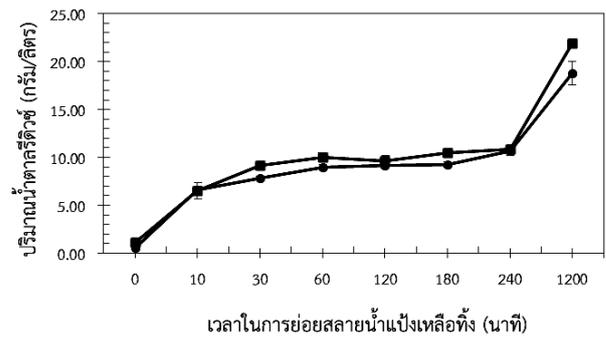
### 3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 3.1 ผลการศึกษาขององค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน

การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำแป้งเหลือทิ้งที่ได้จากโรงงานผลิตขนมจีน พบว่าน้ำแป้งมีพีเอชเท่ากับ 3.69 ซึ่งมีความสม่ำเสมอกันทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างมาศึกษาวิจัย อาจเป็นผลมาจากกระบวนการของการผลิตขนมจีนมีการควบคุมคุณภาพของการผลิตอาหารสำหรับการบริโภคที่ได้มาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดและปริมาณของแข็งทั้งหมดพบว่า มีค่าเท่ากับ  $32.73 \pm 0.01$  และ  $35.57 \pm 0.60$  กรัมต่อลิตรตามลำดับ

#### 3.2 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน

จากการศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ยูนิต ในการย่อยสลายสารละลายน้ำแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ในสภาพที่ไม่มีการปรับพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำแป้ง และมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาในการย่อยสลายนาน 1,200 นาที (20 ชั่วโมง) โดยปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 20 ยูนิต สามารถย่อยสลายน้ำแป้งเหลือทิ้งได้ดีที่สุด ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $21.94 \pm 0.35$  กรัมต่อลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟา อะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต ที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ  $18.78 \pm 1.24$  กรัมต่อลิตรดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่า การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในปริมาณมากๆ สำหรับย่อยสลายน้ำแป้งจะไม่ส่งผลให้มีการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้มากขึ้น ทั้งนี้อาจสืบเนื่องมาจากการยับยั้งไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว [19] ดังนั้นความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 10 ยูนิต และเวลาในการย่อยที่ 20 ชั่วโมง จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพื่อผลคุ้มค่าการลงทุนทางเศรษฐศาสตร์สำหรับผลิตเป็นเอทานอลต่อไป



ภาพที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งเหลือทิ้งที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟา อะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 (●) และ 20 (■) ยูนิต ที่เวลาต่างๆ

#### 3.3 ผลของพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน

จากการศึกษาพีเอชที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำแป้งจากโรงงานผลิตขนมจีนที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต โดยผันแปรพีเอชเท่ากับ 5, 6 และ 7 ที่เวลาในการย่อยสลายที่ 20 ชั่วโมง พบว่าการย่อยสลายน้ำแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีพีเอชเท่ากับ 5 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ  $31.20 \pm 0.49$  ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับการย่อยสลายน้ำแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีพีเอชเท่ากับ 7 ที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $29.88 \pm 3.67$  กรัมต่อลิตร ส่วนการย่อยสลายน้ำแป้งที่มีพีเอชเท่ากับ 6 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดเท่ากับ  $19.20 \pm 0.88$  กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายน้ำแป้งที่มีพีเอชเท่ากับ 5 และ 7 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าหากใช้พีเอชไม่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำแป้งจะทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง ซึ่งเกิดการสูญเสียสภาพแบบถาวร (irreversible inactivate) จากการเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลเดี่ยวในเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทำให้เกิดการรวมกันของเอนไซม์ [18] ดังนั้นการปรับพีเอชของน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ให้มีค่าเท่ากับ 5 ด้วยสารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์ จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำแป้งเหลือทิ้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่พีเอชเท่ากับ 5, 6 และ 7

| พีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) |
|-------|---------------------------------|
| 5     | 31.20 <sup>ก</sup> ±0.49        |
| 6     | 19.20 <sup>ข</sup> ±0.88        |
| 7     | 29.88 <sup>ค</sup> ±3.67        |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรในแนวสทมภ์ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P≤0.05)

#### 4. สรุปผลการทดลอง

องค์ประกอบเบื้องต้นของแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน คือ มีพีเอชที่สม่ำเสมอเท่ากับ 3.69 และมีปริมาณแป้งทั้งหมดเท่ากับ 32.73±0.01 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณของแข็งทั้งหมดเท่ากับ 35.57±0.60 กรัมต่อลิตร

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิห้อง คือ ใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 ยูนิต เวลาในการย่อยที่ 20 ชั่วโมง และพีเอชเท่ากับ 5

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัยให้กับคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขต นครศรีธรรมราช พื้นที่ทุ่งใหญ่

#### 6. เอกสารอ้างอิง

[1] Guo, H., Tang, Y., Yu, Y., Xue, L. and Qian, J.-q. (2016). Covalent immobilization of  $\alpha$ -amylase on magnetic particles as catalyst for hydrolysis of high- amylose starch, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol.87, pp. 537-544.

[2] Silalertruksa, T., Gheewala, S. H. and Pongpat, P. (2015). Sustainability assessment of sugarcane biorefinery and molasses ethanol production in Thailand using eco- efficiency indicator, *Applied Energy*, vol.160, pp. 603-609.

[3] Bansal, A., Illukpitiya, P., Tegegne, F. and Singh, S. P. (2016). Energy efficiency of ethanol production from cellulosic feedstock, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol.58, pp. 141-146.

[4] Nichols, N. N., Sutivisedsak, N., Dien, B. S., Biswas, A., Lesch, W. C. and Cotta, M. A. (2011). Conversion of starch from dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to ethanol, *Industrial Crops and Products*, vol.33 (3), pp. 644-647.

[5] Khoo, H. H. (2015). Review of bio-conversion pathways of lignocellulose- to- ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol.46, pp. 100-119.

[6] Liu, Y., Zhou, H., Wang, L., Wang, S. and Fan, L. (2016). Improving *Saccharomyces cerevisiae* growth against lignocellulose-derived inhibitors as well as maximizing ethanol production by a combination proposal of  $\gamma$ - irradiation pretreatment with in situ detoxification, *Chemical Engineering Journal*, vol.287, pp. 302-312.

[7] Wood, I. P., Cook, N. M., Wilson, D. R., Ryden, P., Robertson, J. A. and Waldron, K. W. (2016). Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran, *Food Chemistry*, vol.198, pp. 125-131.

[8] Zhao, Y., Yan, S., He, Z., Anele, U. Y., Swift, M. L., McAllister, T. A. and Yang, W. (2015). Effect of starch content and processing method on in situ ruminal and in vitro intestinal digestion of barley grain in beef heifers, *Animal Feed Science and Technology*, vol.212, pp. 154-165.

[9] Chinique de Armas, Y., Buhay, W. M., Rodríguez Suárez, R., Bestel, S., Smith, D., Mowat, S. D. and Roksandic, M. (2015). Starch analysis and isotopic evidence of consumption of cultigens among fisher-gatherers in Cuba: the archaeological site of Canimar Abajo, Matanzas, *Journal of Archaeological Science*, vol.58, pp. 121-132.

[10] Cinelli, B. A., Castilho, L. R., Freire, D. M. G. and Castro, A. M. (2015). A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch, *Fuel*, vol.150, pp. 721-729.

- [11] Zhang, P., Chen, C., Shen, Y., Ding, T., Ma, D., Hua, Z. and Sun, D. (2013). Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production, *Bioresource Technology*, vol.128, pp. 835-838.
- [12] Kheyrandish, M., Asadollahi, M. A., Jeyhanipour, A., Doostmohammadi, M., Rismani-Yazdi, H. and Karimi, K. (2015). Direct production of acetone-butanol-ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*, *Fuel*, vol.142, pp. 129-133.
- [13] Yang, M., Kuittinen, S., Zhang, J., Vepsäläinen, J., Keinänen, M. and Pappinen, A. (2015). Co-fermentation of hemicellulose and starch from barley straw and grain for efficient pentoses utilization in acetone-butanol-ethanol production, *Bioresource Technology*, vol.179, pp. 128-135.
- [14] Contardo, I., Parada, J., Leiva, A. and Bouchon, P. (2016). The effect of vacuum frying on starch gelatinization and its' in vitro digestibility in starch-gluten matrices, *Food Chemistry*, vol.197 (Part A), pp. 353-358.
- [15] Ren, X., Chen, J., Wang, C., Molla, M. M., Diao, X. and Shen, Q. (2016). In vitro starch digestibility, degree of gelatinization and estimated glycemic index of foxtail millet-derived products: Effect of freezing and frozen storage, *Journal of Cereal Science*, vol.69, pp. 166-173.
- [16] Saqib, A. A. N. and Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars, *Biomass and Bioenergy*, vol.35 (11), pp. 4748-4750.
- [17] Başkan, K. S., Tütem, E., Akyüz, E., Özen, S. and Apak, R. (2016). Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction, *Talanta*, vol.147, pp. 162-168.
- [18] Silveira, M. H. L., Aguiar, R. S., Siika-aho, M. and Ramos, L. P. (2014). Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release, *Bioresource Technology*, vol.151, pp. 392-396.
- [19] Karimi, M. and Biria, D. (2016). The synergetic effect of starch and alpha amylase on the biodegradation of n- alkanes, *Chemosphere*, vol.152, pp. 166-172.

# สภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งโรงงานผลิตขนมจีนที่ผ่านการย่อย ด้วยกรดซัลฟิวริก

ศรีอุบล ทองประดิษฐ์\*, อุดุลย์สมาน สุขแก้ว,\*\* ธณิกานต์ ธรสินธุ์\* และ วีรพงศ์ เขียรสงค์\*  
Sriubol Thongpradistha, Adulsman Sukkaew, Thanikan Thorasin and Weerapong Chiansong

## Abstract

The objective of this study was to optimal study of the waste starch hydrolysis from Thai rice vermicelli factory with concentrations of sulfuric acid for converting monosaccharide. The results found that the waste starch hydrolysis with sulfuric acid 5%v/v had a highest reducing sugar equal to 497.91±0.69 g/L. The optimal of reducing sugar solution fermented with 10% of *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 found that the highest amount of ethanol equal to 8.27% of the 8-day of fermentation.

**Keywords:** Waste Starch, Thai Rice Vermicelli, Fermentation, Sulfuric Acid

## บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ผลการวิจัยพบว่า การย่อยแป้งจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 5 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 497.91±0.69 กรัมต่อลิตร เมื่อนำสารละลายดังกล่าวมาหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.27 ที่ระยะเวลาของการหมัก 8 วัน

**คำสำคัญ:** แป้งเหลือทิ้ง, ขนมจีน, เอทานอล, การหมัก, กรดซัลฟิวริก

---

\* อาจารย์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 133 หมู่ที่ 5 ตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช รหัสไปรษณีย์ 80240 E-mail: [sriubol@gmail.com](mailto:sriubol@gmail.com)

\*\* อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 133 ถนนเทศบาล 3 ตำบลสะเตง อำเภอเมือง จังหวัดยะลา รหัสไปรษณีย์ 95000

## บทนำ

กระบวนการย่อยเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเป็นพลังงานทดแทนได้ อาทิ ก๊าซชีวภาพ บิวทานอล และเอทานอล เป็นต้น (วราวุฒิ ครุสง และ รุ่งนภาพงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532) การที่จะย่อยให้แป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีปริมาณสูงนั้น สามารถทำได้ยากและต้องอาศัยปัจจัยด้านต่างๆมาควบคุมเพื่อสามารถนำน้ำตาลดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ได้ต่อไป (ศิริวัฒนา บัญชรเทวกุล, 2547) ปัจจุบันจะเห็นได้ว่าน้ำมันปิโตรเลียมที่ใช้กับเครื่องยนต์มีแนวโน้มที่ลดลงเนื่องจากการบริโภคมีอัตราที่สูงขึ้นตามความต้องการของประชากร (ชัชพันธ์ นิवासวงษ์ และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย, 2555) การแก้ไขโดยใช้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนเพื่อใช้ผสมในน้ำมัน ก็เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดปัญหาวิกฤตพลังงานได้ (Niblick and Landis, 2016) การที่ผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานเริ่มต้นสามารถทำได้หลากหลายแหล่ง ได้แก่ 1) แหล่งที่เป็นกลุ่มลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น เป็นแหล่งพลังงานที่น่าสนใจเพราะมีต้นทุนต่ำ แต่ปัญหาของการย่อยโดยใช้แหล่งพลังงานนี้มีทั้งความยุ่งยากต่อการย่อยสลายเป็นน้ำตาลและจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคหลายๆเทคนิคมาเชื่อมโยงต่อกัน 2) แหล่งที่เป็นกลุ่มแป้ง เช่น มันสำปะหลัง สามารถย่อยได้ดีกว่ากลุ่มแรกเพราะแป้งมีโครงสร้างโมเลกุลที่เล็กกว่า และไม่มีพันธะซับซ้อนต่อการย่อยสลาย แต่ปัญหาในวัตถุดิบดังกล่าวจะมีต้นทุนที่สูงอยู่ และ 3) แหล่งที่เป็นกลุ่มน้ำตาล เช่น กากน้ำตาล น้ำอ้อย เป็นต้น เป็นแหล่งพลังงานที่สามารถนำมาหมักได้ และมีต้นทุนสูงไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน (Khou, 2015) เมื่อเปรียบเทียบความคุ้มค่าต่อการนำแหล่งวัตถุดิบมาย่อยเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลนั้น เห็นว่าแหล่งพลังงานจากแป้งเป็นแหล่งพลังงานที่เหมาะสมต่อการนำมาย่อยเพื่อให้เกิดประโยชน์ได้ แม้ว่าแหล่งดังกล่าวจะต้องใช้ต้นทุนในการผลิตอยู่ แต่ถ้าหากมีการนำแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนนอกจากเป็นการลดในเรื่องค่าใช้จ่ายในวัตถุดิบเริ่มต้นต่อการย่อยเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานเอทานอลแล้วยังสามารถช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่ง ดังนั้นในงานวิจัยจึงมุ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งโรงงานผลิตขนมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกในระดับขจัดทดลอง โดยย่อยแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนโดยใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสูงสุดนำมาหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 เพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. วัตถุดิบ

- 1) แป้งจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช
- 2) เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งเตรียมหัวเชื้อยีสต์โดยถ่ายเชื้อยีสต์จากอาหารร่วนเอียงประมาณ 2 ลูก ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YM เลี้ยงยีสต์เริ่มต้น 100 มิลลิลิตรและผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 2. วิธีการ

### 2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำแป้งเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริก

1) เตรียมผงแป้งจากน้ำแป้งเหลือทิ้ง โดยนำน้ำแป้งที่ได้จากโรงงานผลิตขนมจีนมากรองแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของแข็งด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่เป็นของแข็งไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมาร่อนด้วยตะแกรงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 125 ไมครอน แล้วเก็บในถุงพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิห้อง (ศรีอุบล ทองประดิษฐ์ และอดุลย์สมาน สุขแก้ว, 2559)

2) เตรียมน้ำแป้งให้มีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยใช้ผงแป้งที่เตรียมได้จากข้อที่ 1) จำนวน 20 กรัม บรรจุลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษา คือ ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ปริมาตรโดยปริมาตร ที่มีเข้มข้นที่เท่ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยพร้อมกวนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Rocha et al, 2015; Teramura, et al, 2013; Zhu, 2015) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี Duncan' New Multiple Range Test (DMRT) และคัดเลือกระดับความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่สามารถย่อยแป้งแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด

### 2.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริก

นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ระดับความเข้มข้นที่ผ่านการคัดเลือก มาปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน แล้วหมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตรที่ปิดปากขวดด้วยอุปกรณ์กันอากาศ (air-locker) (ศรีอุบล ทองประดิษฐ์ และคณะ, 2559) จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวัดความเข้มข้นของเอทานอลด้วยวิโนมิเตอร์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (Yücel et al, 2015; Joannis-Cassan et al, 2014; Tan et al, 2015) ในแต่ละวันเป็นเวลา 30 วัน

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### 1. ผลการศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้ง

จากการศึกษาการย่อยน้ำแป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5) พบว่า การย่อยน้ำแป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ  $497.91 \pm 0.69$  กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกรดย่อยน้ำแป้งด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเห็นว่าการใช้กรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้ประสิทธิภาพของการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีขึ้น แต่การใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปมากกว่าร้อยละ

5 จะทำให้ในน้ำหมักมีสารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมัก และส่งผลทำให้จุลินทรีย์ไม่สร้างเอทานอล (Torre-González et al, 2016) ดังนั้นผลการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าน้ำตาลที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถนำมาหมักเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้

**ตารางที่ 1** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากย่อน้ำแบ่งเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) |
|-----------------------|-----------------------------------|
| 1                     | 220.32 <sup>a</sup> ±3.43         |
| 2                     | 259.15 <sup>a</sup> ±0.69         |
| 3                     | 408.13 <sup>b</sup> ±2.75         |
| 4                     | 303.31 <sup>a</sup> ±4.12         |
| 5                     | 497.91 <sup>b</sup> ±0.69         |

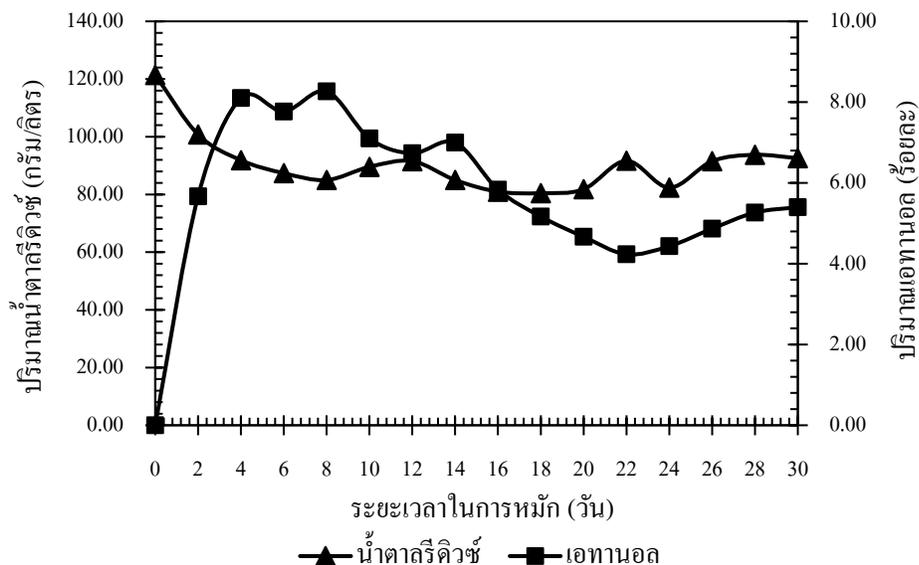
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

## 2. ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแบ่งที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก

ผลจากการศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการย่อยน้ำแบ่งเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำหมักเท่ากับ 4.5 และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนไม่มีผลต่อการหมักเอทานอล และสามารถลดต้นทุนในการผลิตเอทานอล แล้วเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 และหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร ที่อุณหภูมิ 32.46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน (ศรีอุบล ทองประดิษฐ์ และคณะ, 2559) พบว่า เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จะใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้หมัก โดยจะมีปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.27 ในวันที่ 8 ของการหมัก และเมื่อระยะเวลาการหมักหลังวันที่ 8 ปริมาณเอทานอลจะลดลงอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่ลดลง ดังแสดงในภาพที่ 1

ทั้งนี้เนื่องมาจากในการย่อยน้ำแบ่งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนที่มีองค์ประกอบเป็นไดแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์ถูกย่อยด้วยกรดได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (ศุภวรรณ ตันตยานนท์ และคณะ, 2547) ซึ่งในน้ำแบ่งที่ถูกย่อยด้วยกรดเจือจางและที่ใช้อุณหภูมิสูงขึ้นน้ำตาลเฮกโซสจะเกิดการเสียน้ำ 3 โมเลกุล (วรรณ ตูยธัญ, 2549; Prado et al, 2016) ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลได้ ส่งผลให้เกิดสารเฟอร์ฟูรัล, 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (HMF) เป็นต้น (เสรี มหาวิชาติ และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย, 2555) ทำให้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ไม่สามารถนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมได้ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและทำให้ความสามารถของการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ลดลง นอกจากนี้ปริมาณของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 8 ของการหมักและมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ เป็นเพราะเชื้อยีสต์นำเอทานอลไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม และปริมาณของเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นเกิดจากกระบวนการหมักจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยจากผลการศึกษาของ รัชนิกร หมวดพล (2552) พบว่าสภาวะที่เอทานอลถูกผลิตขึ้นมาจะมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์ยีสต์ โดยปริมาณเอทานอลที่ถูกผลิตขึ้นจะไปเปลี่ยนองค์ประกอบของลิพิด และฟอสโฟลิพิดเมมเบรนของเซลล์ยีสต์ ทำให้ความสามารถในการทนต่อความร้อนของยีสต์ลดลง และนอกจากนี้การที่มีปริมาณเอทานอลลดลงอาจเป็นไปได้ว่าเกิดสภาวะสิ้นสุดของกระบวนการหมัก ซึ่งสามารถสังเกตจากเชื้อยีสต์ที่ตกตะกอนเกิดการย่อยสลายตัวเองอย่างช้า ๆ แล้ววัยะภายในเซลล์จะเกิดการย่อยสลายกลุ่มสารชีวโมเลกุล ได้แก่ กรดนิวคลีอิก ไขมันโปรตีน และโพลีแซ็กคาไรด์

เมื่อมีการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ และเซลล์ยีสต์จะปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ ได้แก่ เปปไทด์ กรดอะมิโน กรดไขมัน และนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ ได้ (Alexandre, 2013) อย่างไรก็ตามการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้นและใช้ต้นทุนที่ต่ำจะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคตต่อไป



ภาพที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอลที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ที่อุณหภูมิ 32.5 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการหมัก 30 วัน

### สรุปผลการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นเท่ากับ ร้อยละ 5 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ  $497.91 \pm 0.69$  กรัมต่อลิตร

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 คือ ระยะเวลาการหมัก 8 วัน จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.27 และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือเท่ากับ 85.01 กรัมต่อลิตร

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนสำหรับการวิจัย ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้จัดสรรให้กับ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช พื้นที่ทุ่งใหญ่

## เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุช หาญนั้นทวัฒน์ และ ศิริวัฒนา บัญชรเทวกุล.

2547. การผลิตน้ำตาลจากการย่อยสลายโมเลกุลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยใช้การฉายรังสีแกมมา ร่วมกับกรดซัลฟูริก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชัชพันธ์ นิวาสวงษ์ และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย.

2555. การผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 4 (4): 1073-1088.

รัชนีกร หมวดพล.

2552. การผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยหมักโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะบัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรรณภา ตูยธัญ.

2549. เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต. กรุงเทพฯ ฯ สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรารุณี ครูสง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต.

2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ ฯ โอเดียนส์โตร์.

ศรีอุบล ทองประดิษฐ์ และ อุดลย์สมาน สุขแก้ว.

2559. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส. ในการประชุมวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 12. กรุงเทพฯ ฯ DVDMaker co.,Ltd. หน้า 513-517.

ศรีอุบล ทองประดิษฐ์, ธนิกานต์ ธรสินธุ์, อุดลย์สมาน สุขแก้ว และ วีรพงศ์ เขียรสงค์.

2559. สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากแป้งเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนที่ผ่านการแปรสภาพ. ในการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 8. หน้า 311-313.

ศุภวรรณ ตันตยานนท์ และคณะ.

2547. ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์บนพื้นฐานความปลอดภัยทางเคมีและการลดมลพิษ. กรุงเทพฯ ฯ สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เสรี มหาวิชุด และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย.

2555. การผลิตลิกโนเซลลูโลสิกเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048. Veridian E-Journal: 429-445.

Alexandre, H.

2013. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*-Their ecology, genetics and metabolism.

International Journal of Food Microbiology. 167 (2): 269-275.

Joannis-Cassan, C., Riess, J., Jolibert, F. and Taillandier, P.

2014. Optimization of very high gravity fermentation process for ethanol production from industrial sugar beet syrup. *Biomass and Bioenergy*. 70: 165-173.

Khoo, H. H.

2015. Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 46: 100-119.

Niblick, B. and Landis, A. E.

2016. Assessing renewable energy potential on united states marginal and contaminated sites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 60: 489-497.

Prado, J. M., Lachos-Perez, D., Forster-Carneiro, T. and Rostagno, M. A.

2016. Sub- and supercritical water hydrolysis of agricultural and food industry residues for the production of fermentable sugars: A review. *Food and Bioproducts Processing*. 98: 95-123.

Rocha, G. J. M., Gonçalves, A. R., Nakanishi, S. C., Nascimento, V. M. and Silva, V. F. N.

2015. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops and Products*. 74: 810-816.

Tan, L., Sun, Z.-Y., Okamoto, S., Takaki, M., Tang, Y.-Q., Morimura, S. and Kida, K.

2015. Production of ethanol from raw juice and thick juice of sugar beet by continuous ethanol fermentation with flocculating yeast strain kf-7. *Biomass and Bioenergy*. 81: 265-272.

Teramura, H., Oshima, T., Matsuda, F., Sasaki, K., Ogino, C., Yamasaki, M. and Kondo, A.

2013. Glucose content in the liquid hydrolysate after dilute acid pretreatment is affected by the starch content in rice straw. *Bioresource Technology*. 149: 520-524.

Torre-González, F. J. D. I., Narváez-Zapata, J. A., López-y-López, V. E. and Larralde-Coron, C. P.

2016. Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *LWT - Food Science and Technology*. 67: 1-7.

Yücel, H. G. and Aksu, Z.

2015. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. *Fuel*. 158: 793-799.

Zhu, S., Huang, W., Huang, W., Wang, K., Chen, Q. and Wu, Y.

2015. Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. *Applied Energy*. 154: 190-196.

# การหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง โดยวิธีพื้นผิวตอบสนองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®

ศรัอุบล ทองประดิษฐ์<sup>1</sup>/อดุลย์สมาน สุขแก้ว<sup>2</sup>

<sup>1</sup>คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย เลขที่ 133 หมู่ที่ 5 ตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช  
รหัสไปรษณีย์ 80240

<sup>2</sup>คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา เลขที่ 133 ถนนเทศบาล 3 ตำบลสะเตง อำเภอเมือง จังหวัดยะลา  
รหัสไปรษณีย์ 95000

sriubol@gmail.com

## ABSTRACT

This research aimed to determine the optimum factors of batch ethanol fermentation of starch waste from Thai rice vermicelli factory via Surface Response Methodology using Box- Behnken experimental design, and experimental design was carried out by Design-Expert® Software. Three factors were involved as follows: temperature (25, 30 and 35°C), pH (3.5, 4.5 and 5.5) and ammonium sulfate percentage (0, 0.05, and 0.10). The results showed that all these 3 ethanol fermentation factors were not statistically different ( $P>0.05$ ). The predictive values derived from Design-Expert® Software demonstrated that temperature of 32.46°C, pH 4.5 and ammonium sulfate percentage of  $7.16 \times 10^{-9}$  g/liter (or no supplementation) would provide the optimal factors or 8.80% ethanol content. When compared to amount of ethanol obtained from ethanol fermentation from starch waste by the above mentioned factors, 8.27% ethanol content within 8 hours fermentation time, as tolerances factor was 6.02% or less than the value predicted by Design-Expert® Software.

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลแบบกะจากน้ำแป้งน้ำเงินเหลือทิ้งโดยวิธีพื้นผิวตอบสนองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® Version 9 Free Trial โดยใช้ปัจจัยในการหมักจำนวน 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ (25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส) พีเอชเริ่มต้น (3.5, 4.5 และ 5.5) และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ 0, 0.05 และ 0.10) แล้ววางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® ผลการทดลองพบว่า ปัจจัยต่าง ๆ ในการหมักให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ ) และเมื่อทำนายปัจจัยที่เหมาะสมและลดต้นทุนในการหมักเอทานอลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® จะได้ปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล คือ อุณหภูมิเท่ากับ 32.46 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ  $7.16 \times 10^{-9}$  กรัมต่อลิตร (หรือไม่เติม) ซึ่งจะให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับร้อยละ 8.80 เมื่อเปรียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักเอทานอลแบบกะจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยปัจจัยที่เหมาะสมดังกล่าว จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.27 ที่เวลาในการหมัก 8 ชั่วโมง โดยมีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่าค่าที่ทำนายด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปคิดเป็นร้อยละ 6.02

## คำสำคัญ

น้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง เอทานอล Box-Behnken Design พื้นผิวตอบสนอง Design-Expert®

## 1. บทนำ

เอทานอลเป็นพลังงานที่มีบทบาทในการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สามารถนำมาผสมกับน้ำมันเบนซินเรียกว่าแก๊สโซฮอล์ [1] ซึ่งแก๊สโซฮอล์นั้นจัดเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเครื่องยนต์ได้ [2] แต่ในการผลิตแหล่งพลังงานทดแทนนั้นย่อมจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยด้านต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง [3] ซึ่งในกระบวนการผลิตเอทานอลไม่มีความคุ้มค่าต่อการลงทุน เพราะต้นทุนที่ใช้ในกระบวนการผลิตนั้นมีค่าใช้จ่ายที่สูง นอกจากนี้ การศึกษาในกระบวนการก็มีความยุ่งยากตั้งแต่กระบวนการจากการคัดเลือกวัตถุดิบและจุลินทรีย์ กระบวนการหมัก และกระบวนการกลั่น ซึ่งในหัวใจของการได้เอทานอลมานั้นคือ ขั้นตอนของกระบวนการหมัก ซึ่งกระบวนการหมักมีหลายรูปแบบ เช่น การหมักแบบกะ การหมักแบบกึ่งกะ และการหมักแบบต่อเนื่อง เป็นต้น แต่โดยส่วนใหญ่มักนิยมใช้การหมักแบบกะเพราะสามารถทำการทดลองได้ง่ายกว่าการหมักแบบอื่น ๆ ซึ่งในการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักที่มีปัจจัยจำนวนมากและให้ได้ซึ่งข้อมูลที่ต้องการสำหรับสร้างแบบจำลองทางสถิติเพื่อใช้สำหรับทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมก่อนทำการทดลองจริงนั้น จำเป็นต้องใช้แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) ซึ่งวิธีดังกล่าวจะให้จำนวนสิ่งทดลองจำนวนมากและต้องทำการทดลองมากเช่นกัน ส่งผลให้สิ้นเปลืองวัสดุในการทดลอง รวมทั้งใช้เวลาในการทดลองนานขึ้น วิธีการสำหรับแก้ปัญหาข้างต้น โดยทั่วไปมักนิยมสร้างแบบจำลองทางสถิติ (model) เพื่อใช้สำหรับทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสม จะใช้วิธีการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design โดยใช้โปรแกรมคำนวณอื่น ๆ ร่วมหลายโปรแกรม เช่น โปรแกรม LINDO ใช้สำหรับการวิเคราะห์และแก้ปัญหาของการโปรแกรมเชิงเส้นตรง โปรแกรม SX และ SPSS ใช้สำหรับวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยทั่วไป เช่น แบบ T-test, ANOVA และ Regression โปรแกรม JMP ใช้สำหรับช่วยในการวางหรือกำหนดจุดของการทดลอง (หรือสิ่งทดลองนั่นเอง) โปรแกรม MathCAD และ Statistica นั้น จะใช้สำหรับสร้างกราฟทั้งแบบ 2 และ 3 มิติ [4] จะเห็นว่ามีความยุ่งยากและอาจเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนการใช้งานได้ ซึ่งแผนการทดลองแบบ Central Composite Design เป็นการออกแบบที่ทุกระดับของแต่ละปัจจัยห่างจากจุดกึ่งกลางของ design เท่ากัน และทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง แต่ละปัจจัยจะมีระดับการทดลอง 5 ระดับ ทำให้ไม่สามารถกำหนดระดับของปัจจัยการทดลองได้เอง ซึ่งต่างกับแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ซึ่งเป็นการออกแบบที่คล้ายกับ Central Composite Design แต่ต่างกันที่จุดบนแกนจะอยู่ในระนาบเดียวกับจุดที่เป็น Factorial และทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง แต่ละปัจจัยจะมี 3 ระดับ และสามารถกำหนดระดับของปัจจัยที่ใช้ศึกษาเองได้ [5]

รวมทั้งใช้สิ่งทดลองน้อย ทำให้มีการนำแผนการทดลองนี้มาใช้ในการศึกษาอย่างแพร่หลาย [6] ซึ่งปัจจุบันได้มีโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> ซึ่งเป็นโปรแกรมมีความยืดหยุ่นมาก มีฟังก์ชันที่พร้อมใช้งานเสร็จสรรพในตัว เช่น สามารถออกแบบแผนการทดลอง การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตาราง ANOVA การสร้างแบบจำลองทางสถิติ และสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่ต้องการศึกษาโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ที่วางแผนการทดลอง Box-Behnken Design ที่สามารถกำหนดรายละเอียดได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลแบบกะจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งโดยวิธีพื้นผิวตอบสนองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup>

## 2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 2.1 วัตถุดิบ

- 1) น้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนในอำเภอยางชุมน้อย จังหวัดนครศรีธรรมราช
- 2) เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มีวิธีการเตรียมดังนี้ คือ นำเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ถ่ายลงในอาหารวุ้นเยียง YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น

### 2.2 วิธีการทดลอง

- 1) การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ โดยถ่ายเชื้อยีสต์จากอาหารวุ้นเยียงประมาณ 2 ลูก ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YM เลี้ยงยีสต์เริ่มต้น 100 มิลลิลิตรและผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) การเตรียมน้ำหมัก โดยนำน้ำแป้งน้ำเงินเหลือทิ้งมากรองเอาเฉพาะของแข็งและอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้เป็นแป้งลักษณะผง แล้วชั่งแป้งมา 20 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 50 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ร้อยละ 5 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปย่อยและกวนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 ก่อนจะนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป [7-9]
- 3) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง

3.1) กำหนดปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษา 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ (25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส) พีเอชเริ่มต้น (3.5, 4.5 และ 5.5) และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ 0, 0.05 และ 0.10) โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design (ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® Version 9 Free Trial) จำนวน 17 ชุดการทดลอง โดยทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลางจำนวน 5 ครั้ง (ชุดการทดลองที่ 13-17) ดังแสดงในตารางที่ 1

3.2) เติมหิวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร้อยละ 10 แล้วหมักแบบกะเป็นระยะเวลา 10 วัน

3.3) เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอทานอลด้วยวิธีป็นิมิเตอร์

3.4) นำข้อมูลที่ได้มาทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยวิธีพื้นผิวดตอบสนองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® Version 9 Free Trial [10-12]

**ตารางที่ 1** ชุดการทดลองสำหรับศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®

| ชุดการทดลองที่ | ปัจจัยที่ศึกษา             |                   |                            |
|----------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|
|                | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | พีเอช<br>เริ่มต้น | ปริมาณ<br>แอมโมเนียมซัลเฟต |
| 1              | 25                         | 3.5               | 0.05                       |
| 2              | 35                         | 3.5               | 0.05                       |
| 3              | 25                         | 5.5               | 0.05                       |
| 4              | 35                         | 5.5               | 0.05                       |
| 5              | 25                         | 4.5               | 0.00                       |
| 6              | 35                         | 4.5               | 0.00                       |
| 7              | 25                         | 4.5               | 0.10                       |
| 8              | 35                         | 4.5               | 0.10                       |
| 9              | 30                         | 3.5               | 0.00                       |
| 10             | 30                         | 5.5               | 0.00                       |
| 11             | 30                         | 3.5               | 0.10                       |
| 12             | 30                         | 5.5               | 0.10                       |
| 13             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |
| 14             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |
| 15             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |
| 16             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |
| 17             | 30                         | 4.5               | 0.05                       |

### 3. ผลและอภิปรายผลการวิจัย

จากการหมักน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 5 แบบกะด้วยชุดการทดลองที่มีปัจจัยที่เหมาะสมของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ออกแบบด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ได้ปริมาณเอทานอลดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®

| ชุดการ<br>ทดลองที่ | ปัจจัยที่ศึกษา             |                   |                                | ปริมาณ<br>เอทานอล<br>(ร้อยละ) |
|--------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                    | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | พีเอช<br>เริ่มต้น | ปริมาณ<br>แอมโมเนียม<br>ซัลเฟต |                               |
| 1                  | 25                         | 3.5               | 0.05                           | 7.5                           |
| 2                  | 35                         | 3.5               | 0.05                           | 7.0                           |
| 3                  | 25                         | 5.5               | 0.05                           | 7.5                           |
| 4                  | 35                         | 5.5               | 0.05                           | 8.0                           |
| 5                  | 25                         | 4.5               | 0.00                           | 8.0                           |
| 6                  | 35                         | 4.5               | 0.00                           | 8.0                           |
| 7                  | 25                         | 4.5               | 0.10                           | 8.0                           |
| 8                  | 35                         | 4.5               | 0.10                           | 8.0                           |
| 9                  | 30                         | 3.5               | 0.00                           | 8.0                           |
| 10                 | 30                         | 5.5               | 0.00                           | 10.0                          |
| 11                 | 30                         | 3.5               | 0.10                           | 9.0                           |
| 12                 | 30                         | 5.5               | 0.10                           | 10.0                          |
| 13                 | 30                         | 4.5               | 0.05                           | 10.0                          |
| 14                 | 30                         | 4.5               | 0.05                           | 8.0                           |
| 15                 | 30                         | 4.5               | 0.05                           | 9.0                           |
| 16                 | 30                         | 4.5               | 0.05                           | 8.0                           |
| 17                 | 30                         | 4.5               | 0.05                           | 8.5                           |

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (ตารางที่ 2) ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับพื้นผิวดตอบสนองของปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ที่ศึกษาต่อปริมาณเอทานอล ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® พบว่า ปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ที่ศึกษาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติต่อปริมาณเอทานอล ( $P > 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 3

และเมื่อนำข้อมูลจากตารางที่ 3 ไปวิเคราะห์หาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® จะได้กราฟพื้นผิวตอบสนองของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการหมักเอทานอลสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 2 และได้แบบจำลองทางสถิติที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (quadratic relationship) สำหรับใช้ทำนายการเกิดเอทานอลจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ดังสมการที่ (1)

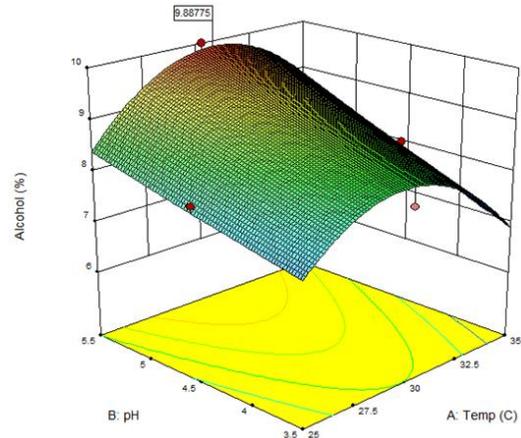
$$\text{ปริมาณเอทานอล (ร้อยละ)} = 210C^2 + 0.025B^2 - 0.049A^2 - 5BC + 1.5479 \times 10^{-15}AC + 0.05AB + 4C - 0.975B + 2.715A - 31.11875 \quad (1)$$

เมื่อ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) B คือ พีเอชเริ่มต้น และ C คือ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)

**ตารางที่ 3** การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ต่อปริมาณเอทานอลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert®

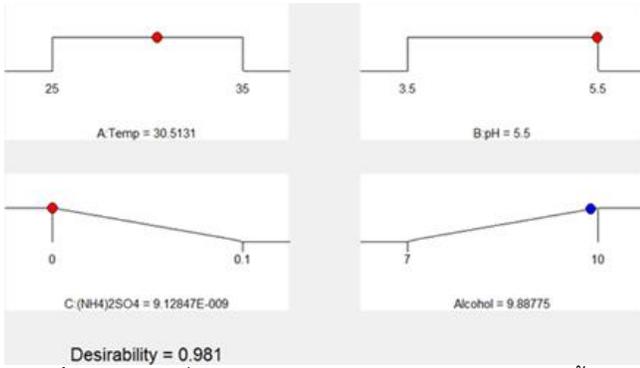
| SOV                                  | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value    | p-value  |    |
|--------------------------------------|----------------|----|-------------|------------|----------|----|
|                                      |                |    |             |            | Prob > F |    |
| Model                                | 9.84           | 9  | 1.09        | 2.23       | 0.1509   | NS |
| A-Temp                               | 5.329E-015     | 1  | 5.329E-015  | 1.089E-014 | 1.0000   |    |
| B-pH                                 | 2.00           | 1  | 2.00        | 4.09       | 0.0829   |    |
| C-(NH4) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.13           | 1  | 0.13        | 0.26       | 0.6288   |    |
| AB                                   | 0.25           | 1  | 0.25        | 0.51       | 0.4979   |    |
| AC                                   | 5.329E-015     | 1  | 5.329E-015  | 1.089E-014 | 1.0000   |    |
| BC                                   | 0.25           | 1  | 0.25        | 0.51       | 0.4979   |    |
| A <sup>2</sup>                       | 6.32           | 1  | 6.32        | 12.91      | 0.0088   |    |
| B <sup>2</sup>                       | 2.632E-003     | 1  | 2.632E-003  | 5.378E-003 | 0.9436   |    |
| C <sup>2</sup>                       | 1.16           | 1  | 1.16        | 2.37       | 0.1674   |    |
| Residual                             | 3.42           | 7  | 0.49        |            |          |    |
| Lack of Fit                          | 0.62           | 3  | 0.21        | 0.30       | 0.8265   | NS |
| Pure Error                           | 2.80           | 4  | 0.70        |            |          |    |
| Cor Total                            | 13.26          | 16 |             |            |          |    |

C.V. = 8.34% เมื่อ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) B คือ พีเอชเริ่มต้น และ C คือ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)



**ภาพที่ 2** กราฟพื้นผิวตอบสนองของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการหมักเอทานอลสูงสุด

จากกราฟพื้นผิวตอบสนองของอุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (รูปที่ 2) สีที่ปรากฏในกราฟแสดงถึงปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากปัจจัยการหมักที่ศึกษา โดยที่สีแดงที่เข้มมากที่สุดคือ ปริมาณเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดของสภาวะนั้น ๆ ซึ่งเมื่อทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert® โดยกำหนดค่าต่ำสุดและสูงสุดของปัจจัยที่ศึกษาจำนวน 3 ปัจจัย ให้อยู่ในช่วงที่ใช้ศึกษา ดังนี้ คือ ค่าอุณหภูมิต่ำสุด 25 องศาเซลเซียส และสูงสุด 35 องศาเซลเซียส, พีเอชเริ่มต้นต่ำสุด 3.5 และสูงสุด 5.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตต่ำสุด 0 กรัมต่อลิตร และสูงสุด 0.1 กรัมต่อลิตร พบว่าโปรแกรมจะทำนายหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลตามแบบจำลองทางสถิติ (สมการที่ 1) คือ อุณหภูมิเท่ากับ 30.5 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ  $9.13 \times 10^{-9}$  กรัมต่อลิตร (หรือไม่ต้องเติม) ซึ่งสภาวะการหมักด้วยปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด (ร้อยละ 9.89) ที่ค่าความพอใจ (desirability) สูงที่สุดเท่ากับ 0.981 ดังแสดงในภาพที่ 3



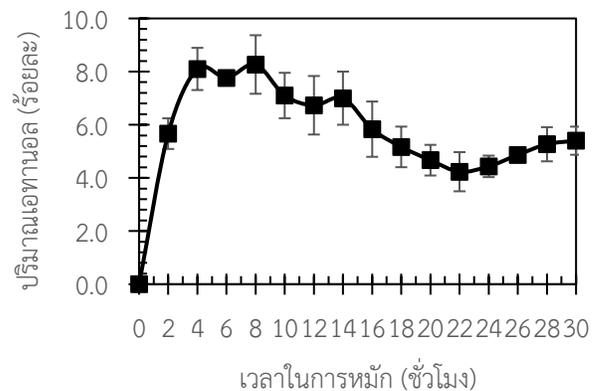
ภาพที่ 3 ปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design-Expert<sup>®</sup> ที่ค่าความพอใจสูงที่สุดเท่ากับ 0.981

จะเห็นว่าปัจจัยที่เหมาะสมของอุณหภูมิเท่ากับ 30.5 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม ค่าความพอใจ (desirability) สูงที่สุดเท่ากับ 0.981 นั้น เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยในการหมักต่าง ๆ ที่ศึกษาซึ่งพบว่า ปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 3) ซึ่งสามารถเลือกใช้ปัจจัยต่าง ๆ ในการหมักที่กำหนดในแผนการทดลองที่ระดับใดระดับหนึ่งได้ทั้งหมด ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการหมักเอทานอล ในขั้นตอนการย่อยน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยกรดซัลฟิวริกแล้ว ก็ไม่จำเป็นต้องปรับพีเอชเริ่มต้นให้สูง และไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำ รวมทั้งไม่ต้องเติมสารอาหารเสริมที่เป็นแหล่งไนโตรเจน จึงจำเป็นต้องทำการทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> ใหม่อีกครั้ง โดยกำหนดให้ค่าอุณหภูมิสูงสุด (maximize) ที่ 35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้น (target) ที่ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมน้อยที่สุด (minimize) ที่ 0 กรัมต่อลิตร พบว่าโปรแกรม Design-Expert<sup>®</sup> จะทำนายหาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลให้ใหม่ คือ สภาวะการหมักที่มีอุณหภูมิเท่ากับ 32.46 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ  $7.16 \times 10^{-9}$  กรัมต่อลิตร (หรือไม่ต้องเติม) ซึ่งสภาวะการหมักด้วยปัจจัยนี้จะให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับร้อยละ 8.80 โดยมีค่าความพอใจเท่ากับ 0.818 ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งเมื่อนำปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> มาใช้ทำการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งแบบกะ พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.27 ที่เวลาในการหมัก 8 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยมีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่าค่าที่ทำนายด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปคิดเป็นร้อยละ 6.02 ซึ่งถือได้ว่ามีค่าที่ไม่

แตกต่างกันมากนักและสามารถนำไปใช้ในการหมักเอทานอลในระดับขยายขนาดได้



ภาพที่ 4 ปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design-Expert<sup>®</sup> โดยการกำหนดค่าอุณหภูมิสูงสุด (maximize) ที่ 35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้น (target) ที่ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมน้อยที่สุด (minimize) ที่ 0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 5 ปริมาณเอทานอลได้จากการหมักน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยปัจจัยการหมักต่าง ๆ ที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup>

#### 4. สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยต่าง ๆ ในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้ง คือ อุณหภูมิ (25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส) พีเอชเริ่มต้น (3.5, 4.5 และ 5.5) และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ 0, 0.05 และ 0.10) ที่วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> ให้ค่าปริมาณเอทานอลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

ปัจจัยที่เหมาะสมและลดต้นทุนในการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งแบบกะจากการทำนายนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert<sup>®</sup> คือ สภาวะการหมักที่มีอุณหภูมิเท่ากับ 32.46 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ  $7.16 \times 10^{-9}$  กรัมต่อลิตร (หรือไม่เติม) ซึ่งจะให้เอทานอลเท่ากับร้อยละ 8.80 เมื่อเปรียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักเอทานอลจากน้ำแป้งขนมจีนเหลือทิ้งด้วยปัจจัยที่เหมาะสม จะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.27 ที่เวลาในการหมัก 8 ชั่วโมง โดยมีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่าค่าที่ทำนาคิดเป็นร้อยละ 6.02

## 5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2557-2558 ให้กับคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช พื้นที่ทุ่งใหญ่

## 6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Pereira, P. F., Marra, M. C., Munoz, R. A. A. and Richter, E. M. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. *Talanta* 90, (2012), 99-102.
- [2] Saravanan, S., Pitchandi, K. and Suresh, G. An experimental study on premixed charge compression ignition-direct ignition engine fueled with ethanol and gasohol. *Alexandria Engineering Journal* 54, 4 (2015), 897-904.
- [3] Guan, J. C. and Yan, Y. Technological proximity and recombinative innovation in the alternative energy field. *Research Policy* 45, 7 (2016), 1460-1473.
- [4] อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 2550.
- [5] Cavazzuti, M. *Optimization Methods: From Theory to Design*, Springer, Heidelberg, 2013.
- [6] Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brand, G. C., Silva, E. G. P. d., Portugal, L. A., Reis, P. S. d., Souza, A. S. and Santos, W. N. L. d. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597, (2007), 179-186.
- [7] Balto, A. S., Lapis, T. J., Silver, R. K., Ferreira, A. J., Beaudry, C. M., Lim, J. and Penner, M. H. On the use of differential solubility in aqueous ethanol solutions to narrow the DP range of food-grade starch hydrolysis products. *Food Chemistry* 197, Part A (2016), 872-880.
- [8] Lamsal, B. P. and Johnson, L. A. Flaking as a corn preparation technique for dry-grind ethanol production using raw starch hydrolysis. *Journal of Cereal Science* 56, 2 (2012), 253-259.
- [9] Scholz, M. J., Riley, M. R. and Cuello, J. L. Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy* 48, (2013), 59-65.
- [10] Anonymous. 2016. Multifactor RSM Tutorial. Stat-Ease, Inc. Available: <http://www.statease.com/productattachments/index/download?id=11> [July 03, 2016].
- [11] Pourfarzad, A., Najafi, M. B. H., Khodaparast, M. H. H., Khayyat, M. H. and Malekpour, A. Fractionation of eremurus spectabilis fructans by ethanol: Box-behken design and principal component analysis. *Carbohydrate Polymers* 106, (2014), 374-383.
- [12] Schneiderman, S. J., Johnson, R. W., Menkhous, T. J. and Gilcrease, P. C. Quantifying second generation ethanol inhibition: Design of experiments approach and kinetic model development. *Bioresour Technology* 179, (2015), 219-226.