ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมการอาหาร)

ปริญญา

วิศวกรรมการอาหาร	วิศวกรรมการอาหาร
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การออกแบบและสร้างถังหมักสาหรับหมักเอทานอลโดยการควบคุมค่า Oxidation Reduction Potential

Design and Construction of Fermentor for Ethanol Fermentation by Controlling Oxidation Reduction Potential Value

นามผู้วิจัย นายสกานต์ เหลืองเกรียงไกร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เชาว์ อินทร์ประสิทธิ์, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์รังสินี โสธรวิทย์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์รังสินี โสธรวิทย์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การออกแบบและสร้างถังหมักสำหรับหมักเอทานอลโดยการควบคุมค่า Oxidation Reduction Potential

Design and Construction of Fermentor for Ethanol Fermentation by Controlling Oxidation Reduction Potential Value

โดย

นายสกานต์ เหลืองเกรียงไกร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมการอาหาร)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สกานต์ เหลืองเกรียงไกร 2555: การออกแบบและสร้างถังหมักสำหรับหมักเอทานอลโดยการควบคุมค่า Oxidation Reduction Potential ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมการอาหาร) สาขาวิชาวิศวกรรมการอาหาร ภาควิชาวิศวกรรมการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เชาว์ อินทร์ประสิทธิ์, D.Eng. 283 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบและสร้างถังหมักที่ใช้ในการผลิตเอทานอลโดยการควบคุมค่า Oxidation Reduction Potential (ORP) และศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 (การหมักแบบปกติ) แบบให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก และแบบควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก

การออกแบบถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลโดยการควบคุมค่า ORP ทำโดยการให้อากาศด้วยหัวพ่นอากาศแบบ Ring Sparger และมีใบพัดกวนแบบ Open Turbine เพื่อกวนผสมน้ำหมัก และช่วยให้การกระจายตัวของอุณหภูมิและอากาศภายในถังหมักสม่ำเสมอ

การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 คือ 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.91 ± 0.08% และค่า Dextrose Equivalent (DE) 21.46 ± 0.37 จากนั้นศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 คือ 1 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 10.40 ± 0.22% ซึ่งเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ และจากนั้นหมักต่อด้วยยีสต์แห้ง *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green ซึ่งเป็นการหมักแบบปกติ (ไม่ให้อากาศ) พบว่า ค่า ORP แปรผกผันกับปริมาณเอทานอล แต่แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังนั้น ค่า ORP จึงมีประโยชน์สำหรับใช้ในการติดตามกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักเอทานอล และได้เวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสม คือ 60 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.73 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของเอทานอล 0.46 กรัมเอทานอล/กรัมแป้ง และมีประสิทธิภาพการหมัก 82.14%

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP พบว่า การหมักแบบควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV เป็นกระบวนการผลิตเอทานอลที่ดีที่สุด ซึ่งได้เวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมเร็วกว่าการหมักแบบปกติ 6 ชั่วโมง หรือใช้เวลาหมักนาน 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.76 กรัมต่อลิตร ผลได้ของเอทานอล 0.46 กรัมเอทานอล/กรัมแป้ง และมีประสิทธิภาพหารหมัก 82.18%

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sakan Luangkriangkrai 2012: Design and Construction of Fermentor for Ethanol Fermentation by Controlling Oxidation Reduction Potential Value. Master of Engineering (Food Engineering), Major Field: Food Engineering, Department of Food Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Chouw Inprasit, D.Eng. 283 pages.

The aim of this research was to design and construct the fermentor for ethanol fermentation by controlling Oxidation Reduction Potential value (ORP). Moreover, the fermentation of ethanol from ground cassava chips by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) by Pre-Saccharification of enzyme type GC147 (Conventional Fermentation), aeration in the fermentation, and controlled ORP in the fermentation were studied.

The fermentor was designed for ethanol fermentation by controlling ORP with aeration by jet air Ring Sparger and Open Turbine to mix the materials and the distribution of temperature and air in the fermentor.

The optimum time of liquefaction of enzyme type GC358 was 2 hrs providing content of reducing sugar of 3.91 ± 0.08% and Dextrose Equivalent (DE) 21.46 ± 0.37. The optimum time of Pre-Saccharification of enzyme type GC147 was 1 hr with content of reducing sugar 10.40 ± 0.22% suitable for growth of yeast cells. Thereafter, fermented by *Saccharomyces cerevisiae* or Fali Green instant dry yeast, the process was called a Conventional Fermentation (no aeration). It was found that ORP was inversely with the amount of ethanol production but varied directly with the amount of reducing sugar. Therefore, the ORP was useful for monitoring the activities of the ethanol fermentation process. The optimum time of conventional process was 60 hrs. The results found that the content of ethanol, remaining content of reducing sugar, yield of ethanol per starch, and theoretical yield were 75.73 g/L, 0.56%, 0.46 g ethanol/g starch, and 82.14% respectively.

Fermentation the ground cassava chips by controlling ORP, the result showed that controlling ORP at -5 ± 5 mV was the best methods. The optimum time was faster than that of conventional methods or 54 hrs with the content of ethanol, remaining content of reducing sugar, yield of ethanol per starch, and theoretical yield were 75.76 g/L, 0.44%, 0.46 g ethanol/g starch, and 82.18% respectively.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยของกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. เชาว์ อินทร์ประสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รศ.ดร. รังสินี โสธรวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณอาจารย์ รศ.ดร. ปานมนัส ศิริสมบูรณ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกสถาบัน และ ผศ.ดร. มนต์ทิพย์ ช่ำชอง ประธานการสอบ ที่ได้ให้ความกรุณาช่วยเหลือชี้แนะสิ่งที่เป็นประโยชน์และตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

งายวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน ประจำปีงบประมาณ 2552 และทุนคณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมการอาหารทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอนสิ่งต่าง ๆ ระหว่างการศึกษาและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์

สกานต์ เหลืองเกรียงไกร

เมษายน 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	71
อุปกรณ์	71
วิธีการ	89
ผลและวิจารณ์	131
สรุปและข้อเสนอแนะ	185
สรุป	185
ข้อเสนอแนะ	188
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	189
ภาคผนวก	195
ภาคผนวก ก ข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลอง	196
ภาคผนวก ข วิธีการคำนวณปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ ปริมาณเอนไซม์ GC358 ปริมาณเอนไซม์ GC147 และปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักมันเส้นบด	256
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	260
ภาคผนวก ง วิธีการคำนวณผลได้และประสิทธิภาพการหมัก	279
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	283

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae*	18
2	อัตราส่วนต่าง ๆ ของถังหมักที่ประกอบด้วย 3 ใบพัดกวน	40
3	อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ใช้ในการควบคุมค่า ORP ในถังหมัก	63
4	คุณสมบัติของเครื่องควบคุมค่า ORP	65
5	ค่า Retention time, พื้นที่ใต้พีก และอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐานเอทานอลกับสารละลายมาตรฐานภายใน	122
6	ค่า Retention time, พื้นที่ใต้พีก และอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของเอทานอลในตัวอย่างน้ำหมักกับสารละลายมาตรฐานภายใน	124
7	สมการเส้นตรง และค่าสหสัมพันธ์ (R^2) ของการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมัก	133
8	ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ	149
9	ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)	156
10	ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง	163
11	การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศ กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ	170
12	ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV	176
13	ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV	178
14	ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV	180

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการวิธีควบคุมค่า ORP กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ	182
16	ประสิทธิภาพการหมัก, ผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้นบด และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดแบบปกติ, แบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง และแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV	183

ตารางผนวกที่

ก1	อุณหภูมิของน้ำเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิ ครั้งที่ 1	197
ก2	อุณหภูมิของน้ำเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิ ครั้งที่ 2	197
ก3	อุณหภูมิของน้ำเมื่อทำการลดอุณหภูมิ ครั้งที่ 1	198
ก4	อุณหภูมิของน้ำเมื่อทำการลดอุณหภูมิ ครั้งที่ 2	199
ก5	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการหาปริมาณความชื้นของมันเส้นบด 300 กิโลกรัม	200
ก6	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการหาปริมาณความชื้นของมันเส้นบด 100 กิโลกรัม	200
ก7	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการหาปริมาณแป้งของมันเส้นบด 300 และ 100 กิโลกรัม	201
ก8	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 ครั้งที่ 1	202
ก9	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 ครั้งที่ 2	204
ก10	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 ครั้งที่ 3	206
ก11	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ครั้งที่ 1	208
ก12	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ครั้งที่ 2	211

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก13	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ครั้งที่ 3	214
ก14	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า ORP, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ ครั้งที่ 1	217
ก15	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า ORP, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ ครั้งที่ 2	220
ก16	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า ORP, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ ครั้งที่ 3	223
ก17	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ครั้งที่ 1	226
ก18	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ครั้งที่ 2	229
ก19	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก (0-12 ชั่วโมง) ครั้งที่ 1	232
ก20	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก (0-12 ชั่วโมง) ครั้งที่ 2	235
ก21	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ครั้งที่ 1	238
ก22	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ครั้งที่ 2	241
ก23	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ครั้งที่ 1	244

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก24	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ครั้งที่ 2	247
ก25	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ครั้งที่ 1	250
ก26	ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ครั้งที่ 2	253
ค1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ	261
ค2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ	261
ค3	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ ตามวิธี Duncan	262
ค4	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ ตามวิธี Duncan	263
ค5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)	264
ค6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)	264
ค7	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ตามวิธี Duncan	265
ค8	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ตามวิธี Duncan	266

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ค9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก (0-12 ชั่วโมง)	267
ค10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก (0-12 ชั่วโมง)	267
ค11	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก (0-12 ชั่วโมง) ตามวิธี Duncan	268
ค12	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก (0-12 ชั่วโมง) ตามวิธี Duncan	269
ค13	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV	270
ค14	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV	270
ค15	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ตามวิธี Duncan	271
ค16	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ตามวิธี Duncan	272
ค17	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV	273

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV 273

ค19 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ตามวิธี Duncan 274

ค20 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ตามวิธี Duncan 275

ค21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV 276

ค22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV 276

ค23 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ตามวิธี Duncan 277

ค24 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ตามวิธี Duncan 278

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กราฟแบบฉบับการเจริญแบบแบตช์ (typical batch growth cure)	24
2	กระบวนการผลิตเอทานอลจากอ้อย	26
3	กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล	28
4	การทำงานของเอนไซม์ α-amylase	31
5	การทำงานของเอนไซม์ Glucoamylase	32
6	กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง	36
7	รูปแบบมาตรฐานของถังหมักทั่ว ๆ ไป	38
8	รูปแบบของถังหมักที่ประกอบด้วย 3 ใบพัดกวน	39
9	ตัวอย่างของถังหมักขนาดเล็กทำด้วยแก้วและด้านบนเป็นเหล็กกล้าไร้สนิม	40
10	ตัวอย่างของถังหมักขนาดเล็กทำด้วยแก้ว ทั้งด้านบนและด้านล่างเป็นเหล็กกล้าไร้สนิม	40
11	ตัวอย่างของถังหมักขนาดใหญ่ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม	41
12	ส่วนประกอบของฝาปิดด้านบนของถังหมัก	42
13	ท่อที่ใช้สำหรับเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสารเคมีต่าง ๆ ลงไปในถังหมัก	43
14	รูปแบบของใบพัดกวนที่นิยมใช้	44
15	รูปแบบการกวนของใบพัด	45
16	หัวพ่นอากาศ Orifice sparger แบบท่อวงกลม (Ring sparger)	46
17	ตัวอย่างการติดตั้ง Baffle ภายในถังหมัก	47
18	แผนภาพแสดงวิธีการง่าย ๆ ในการประกอบแกนหมุนใบพัดเข้ากับถังหมัก	48
19	Mechanical seal	49
20	Magnetic seal	49
21	Aseptic joint seals for glass-glass, glass-metal and metal-metal	50
22	ทิศทางการหมุนของ Peristaltic pump	51
23	การใช้งานโดยขนถ่ายของเหลวผ่านสายยางของ Peristaltic pump	51
24	Condenser	52

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	ระบบหล่อเย็นแบบ Jacket ใช้กับถังหมักขนาดเล็ก หรือถังหมักความจุไม่เกิน 500 ลิตร	54
26	ระบบหล่อเย็นแบบ Internal cooling coils ใช้กับถังหมักขนาดใหญ่	55
27	ตัวอย่างการควบคุม pH ในถังหมัก	56
28	pH probe ที่ประกอบด้วย Glass measuring electrode และ Reference electrode	56
29	องค์ประกอบหลักของ D.O. probe	57
30	กราฟแสดงการควบคุมค่า ORP ในถังหมัก	61
31	เครื่องควบคุมค่า ORP	62
32	เครื่องมือที่ใช้ควบคุมระดับน้ำในถังหมัก	65
33	การถ่ายเชื้อลงสู่ถังเตรียมกล้าเชื้อในสภาพปลอดจากเชื้อ	67
34	การถ่ายหัวเชื้อจากถังเตรียมกล้าเชื้อไปยังถังหมัก	68
35	ระบบการเก็บตัวอย่างของถังหมักขนาดเล็ก	69
36	วิธีการเก็บตัวอย่างโดยวิธีปลอดจากเชื้อ	69
37	ถังหมักขนาด 60 ลิตร ที่ใช้ในการย่อยและหมักเอทานอลจากมันเส้นบด	74
38	หม้อกำเนิดไอน้ำ (Steam boiler)	74
39	เครื่องควบคุมค่า pH (pH controller)	75
40	หัววัดค่า pH (pH sensor)	75
41	เครื่องควบคุมค่า ORP (ORP controller)	75
42	หัววัดค่า ORP (ORP sensor)	75
43	น้ำยาปรับตั้งค่า pH 4.01 (ซ้าย) และ pH 7.01 (ขวา)	76
44	น้ำยาปรับตั้งค่า ORP 240 mV	76
45	เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller)	77
46	หัววัดอุณหภูมิ (Temperature sensor)	77
47	ปั๊มลม (Air compressor)	78
48	Regulator	78
49	Air flow meter	78

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
50	Solenoid Valve	79
51	Syringe filter nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร	79
52	เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 3200 กรัม ความละเอียด 0.01 กรัม	79
53	เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 220 กรัม ความละเอียด 0.0001 กรัม	80
54	เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 20 กิโลกรัม ความละเอียด 2 กรัม	80
55	นาฬิกาจับเวลา	80
56	เครื่องวัดความเร็วรอบแกนเพลา	81
57	เครื่องเหวี่ยงแยก	81
58	เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	81
59	หลอดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 ml	82
60	Gas Chromatography ต่อพ่วงกับ Headspace	82
61	Flat bottom headspace vials ขนาด 20 ml	82
62	Septa, tan PTFE/silicone ขนาด 20 mm	83
63	Aluminum crimp cap ขนาด 20 mm	83
64	Crimper, 20 mm	83
65	Decapper, 20 mm	84
66	Hot plate Stirrer	84
67	Burette ขนาด 50 ml	84
68	Hand Refractometer 0-32 ^{o}Brix	85
69	ตู้อบลมร้อน	85
70	โถดูดความชื้น (Desiccator)	85
71	มันเส้นบด	86
72	ยีสต์แห้ง *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green	87
73	เอนไซม์ α-amylase ชื่อทางการค้า GC358	87
74	เอนไซม์ Glucoamylase ชื่อทางการค้า GC147	88

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
75	ตู้ควบคุมถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147	89
76	ถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ที่ประกอบเสร็จเรียบร้อย	90
77	ส่วนประกอบของถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147	91
78	ขนาดของถังหมักที่ประกอบด้วย 3 ใบพัดกวน ที่ได้จากการคำนวณ	92
79	ลักษณะตัวถังหมัก	93
80	ลักษณะฝาปิดด้านบนของถังหมัก	94
81	ระบบควบคุมค่า ORP ของถังหมักเอทานอล	95
82	หัวพ่นอากาศแบบ Ring sparger	96
83	ลักษณะของ Internal coil ที่ติดตั้งในถังหมัก	97
84	ลักษณะของใบพัดกวนที่ติดตั้งในถังหมัก	98
85	ใบพัดกวนของถังหมัก	99
86	ตำแหน่งในการติดตั้ง Sensor วัดอุณหภูมิ ที่ใช้ในการทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมัก	100
87	แผนผังการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC 358	105
88	แผนผังการย่อยครั้งที่ 2 หรือการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147	106
89	แผนผังการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147	108
90	แผนผังการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) และ 0-12 ชั่วโมงของกระบวนการหมัก	110

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
91	แผนผังการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก ที่ 20 ± 5 mV, -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV	113
92	แผนผังการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และความเข้มข้นของเอทานอล	114
93	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเอทานอลกับสารละลายมาตรฐานภายในจากการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในน้ำหมักด้วยเทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้สารมาตรฐานภายใน	122
94	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในน้ำหมักด้วยเทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้สารมาตรฐานภายใน	123
95	โครมาโทแกรมของน้ำหมักกับสารละลายมาตรฐานภายในจากการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในน้ำหมักด้วยเทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้สารมาตรฐานภายใน	124
96	การกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมัก เมื่อเพิ่มอุณหภูมิครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 และการลดอุณหภูมิครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2	131
97	ลักษณะของมันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	134
98	มันเส้นบดผสมกับน้ำก่อนการย่อย	134
99	มันเส้นบดผสมกับน้ำหลังจากการย่อย	135
100	ลักษณะของยีสต์แห้ง *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green	136
101	ลักษณะของกล้าเชื้อยีสต์แห้ง *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green ที่ผ่านการรีไฮเดรต (Rehydrated)	136
102	ผลของเวลากับค่า DE และค่า TSS ต่อการทำ Liquefaction ด้วยเอนไซม์ GC358 เฉลี่ย	138
103	การเปรียบเทียบผลต่างของค่า DE ต่อ ผลต่างของเวลาในการทำ Liquefation ด้วยเอนไซม์ GC358 เฉลี่ย	139

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
104	ผลของเวลาและ %น้ำตาลรีดิวซ์ ต่อการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 เฉลี่ย	141
105	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%RD) ค่า pH ปริมาณเอทานอล และค่า ORP ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ	144
106	การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบปกติ	149
107	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%RD) ค่า pH ปริมาณเอทานอล และค่า ORP ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)	151
108	การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)	156
109	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%RD) ค่า pH ปริมาณเอทานอล และค่า ORP ที่ได้มาจากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง	158
110	การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง	163
111	การเปรียบเทียบการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง	164
112	การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง	165

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

113 การเปรียบเทียบค่า ORP ที่ได้มาจากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง 166

114 การเปลี่ยนแปลงของค่า ORP ในระหว่างการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV 171

115 การเปรียบเทียบการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV 172

116 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV 173

117 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV 176

118 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV 178

119 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV 180

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การออกแบบและสร้างถังหมักสำหรับหมักเอทานอลโดยการควบคุมค่า Oxidation Reduction Potential

Design and Construction of Fermentor for Ethanol Fermentation by Controlling Oxidation Reduction Potential Value

คำนำ

ปัจจุบันภาวะโลกร้อน หรือภาวะเรือนกระจกที่ผิดปกติ เกิดจาก การเพิ่มขึ้นของก๊าซที่ปกคลุมชั้นบรรยากาศของโลก ทำให้อุณหภูมิภายในโลกสูงขึ้น ก๊าซที่เพิ่มขึ้นมีหลายชนิด เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) มีเทน (CH_4) และ ซีเอฟซี (CFC หรือ Chlorofluorocarbon) เป็นต้น ก๊าซส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมาจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงต่าง ๆ ที่ใช้ในบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรม เชื้อเพลิงที่ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จำนวนมหาศาล คือ เชื้อเพลิงจากฟอสซิล ซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงสิ้นเปลือง และไม่สามารถสร้างขึ้นใหม่ได้ในเวลาอันสั้น เช่น ถ่านหิน น้ำมัน และก๊าซธรรมชาติ และเพื่อเป็นการลดการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิล จึงมีทางเลือกหนึ่ง นั่นคือ เชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งจัดเป็นพลังงานหมุนเวียนที่สามารถฟื้นฟูหรือสร้างขึ้นใหม่ได้ ตราบใดที่ต้นไม้และพืชไม่ถูกตัดโค่นในอัตราที่รวดเร็วเกินกว่าที่จะสามารถปลูกทดแทนให้เจริญเติบโตขึ้นมาได้ทัน การเผาเชื้อเพลิงชีวภาพไม่ก่อให้เกิดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นและยังก่อให้เกิดปริมาณก๊าซพิษน้อยกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่นเมื่อเทียบกันในอัตราต่อหน่วย ดังนั้น การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพจึงเท่ากับเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อมได้อย่างมาก ซึ่งเชื้อเพลิงชีวภาพมีหลายชนิด ได้แก่ ไบโอดีเซล น้ำมันจากขยะ เอทานอล เป็นต้น ดังนั้น เชื้อเพลิงชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการนำมาใช้แทนเชื้อเพลิงฟอสซิลกันเป็นจำนวนมาก โดยที่เอทานอลมีการผลิตมากที่สุดในบรรดาเชื้อเพลิงชีวภาพ

เอทานอล (ethanol) คือ เชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตจากชีวมวล (biomass) หรือเรียกว่า ไบโอเอทานอล (bioethanol) ที่ได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด รวมทั้งผลผลิตพลอยได้อุตสาหกรรมเกษตรและการเกษตรต่าง ๆ เช่น กากน้ำตาล เวย์จากการผลิตเนย และวัสดุเหลือทิ้งที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำพวกฟางข้าว ซังข้าวโพด) ซึ่งมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิลที่มีราคาสูงขึ้นมากในปัจจุบัน ทำให้เอทานอลมีความสำคัญต่อสภาวะเศรษฐกิจในปัจจุบัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับประเทศไทยได้ทำการพัฒนาการผลิตเอทานอลจากผลผลิตทางการเกษตรมาโดยตลอดทำให้ประเทศไทยมีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นทุกปี จากปีพ.ศ.2550 มีปริมาณการผลิตเอทานอล 191.75 ล้านลิตร เฉลี่ย 0.52 ล้านลิตรต่อวัน ในปีพ.ศ.2551 มีปริมาณการผลิตเอทานอล 336.21 ล้านลิตร เฉลี่ย 0.92 ล้านลิตรต่อวัน ในปีพ.ศ.2552 มีปริมาณการผลิตเอทานอล 397.66 ล้านลิตร เฉลี่ย 1.09 ล้านลิตรต่อวัน ในปีพ.ศ.2553 มีปริมาณการผลิตเอทานอล 425.80 ล้านลิตร เฉลี่ย 1.16 ล้านลิตรต่อวัน และในปีพ.ศ.2554 มีปริมาณการผลิตเอทานอล 509.61 ล้านลิตร เฉลี่ย 1.40 ล้านลิตรต่อวัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2555)

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ที่มีแหล่งชีวมวลจากภาคการเกษตรมากมาย จึงเป็นการส่งเสริมเกษตรกรในชนบทซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ของประเทศให้มีรายได้ ลดการนำเข้าน้ำมันปิโตรเลียมจากต่างประเทศ และลดมลภาวะที่เกิดจากการใช้พลังงานน้ำมันที่มีแหล่งกำเนิดจากฟอสซิล โดยสิ่งสำคัญสำหรับการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมคือ ต้นทุนการผลิตต้องต่ำ ซึ่งการลดต้นทุนการผลิตทำได้จากการเพิ่มผลผลิตการหมัก (fermentation yield) และเพิ่มความสามารถในการหมัก (productivity) รวมทั้งลดค่าใช้จ่ายสำหรับการลดอุณหภูมิของถังหมักและการกลั่นตลอดจนลดปริมาณน้ำเสีย ซึ่งสิ่งเหล่านี้ได้จากการหมักในอุณหภูมิสูง และการใช้ซับสเตรตความเข้มข้นสูง

การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก จะอาศัยกระบวนการทำงานของเชื้อยีสต์ โดยเชื้อยีสต์นั้นจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าไกลโคไลซิส (glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งตามทฤษฎีแล้วในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 51.11 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.89 กรัม นอกจากนั้นยังมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้น 28.7 กิโลแคลอรี่ จะเห็นได้ว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น มีปริมาณประมาณถึงครึ่งหนึ่งโดยน้ำหนักของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการหมัก จากการประมาณที่กำลังการผลิตเอทานอล 150,000 ลิตรต่อวัน จะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 100-120 ตันต่อวัน ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งสถานะที่เป็นก๊าซ (gas CO_2) ของเหลว (liquid CO_2) และของแข็ง (solid CO_2) โดยจะใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นสารทำความเย็น และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทที่มีการอัดก๊าซเป็นต้น (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ และกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหมักเอทานอล มีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล คือ ความเข้มข้นของซับสเตรต และสภาวะแวดล้อมในระหว่างการหมัก เช่น อุณหภูมิ pH ออกซิเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่มีการศึกษากันมานานแล้ว แต่ยังมีปัจจัยอีกหนึ่งที่มีการศึกษาเพิ่ม นั่นคือ ค่า Oxidation Reduction Potential (ORP)

การหมักเอทานอลโดยใช้ค่า Oxidation Reduction Potential; ORP ในการควบคุมกระบวนการหมัก จะทำให้ได้ผลผลิตการหมักเพิ่มขึ้น และลดการเกิด by product (กลีเซอรอล) และทำให้ระยะเวลาในการหมักลดลง โดยที่ค่า ORP เป็นพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน พารามิเตอร์ตัวนี้วัดปริมาณความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดจากการถ่ายเท (ให้/รับ) อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นในน้ำ ค่า ORP ที่วัดได้อาจเป็นบวกหรือลบ ในทางทฤษฎี ค่า ORP จะแสดงถึงความสามารถในการรับอิเล็กตรอนของสารละลาย เช่น ถ้าวัดค่า ORP ได้ค่าบวก แสดงว่าสารละลายนี้มีสารรับอิเล็กตรอนได้ดี แต่ถ้าวัดได้ค่า ORP เป็นค่าลบ แสดงว่าสารละลายมีความสามารถในการรับอิเล็กตรอนได้น้อย หรือมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ดี

ดังนั้น การออกแบบถังหมักเอทานอลโดยใช้ค่า ORP จะควบคุมด้วยการกวนและการให้อากาศ ให้ได้ผลผลิตของเอทานอลมากที่สุด และลดระยะเวลาในการหมัก โดยให้เหลือความเข้มข้นของกลูโคสน้อยที่สุด ซึ่งจะทำให้กระบวนการหมักเอทานอลเกิดได้มีประสิทธิภาพดีขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ออกแบบถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลโดยการควบคุมค่า Oxidation Reduction Potential (ORP)

2. การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลจากมันเส้นบดสำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

3. การศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า ORP, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดย SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ

4. เปรียบเทียบเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. เอทานอล

เอทานอลเป็นของเหลวใส ไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยง่าย สามารถละลายน้ำ และสารอินทรีย์อื่นได้ดี ให้ค่าพลังงานความร้อน (Calorific value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 12,800 บีทียูต่อปอนด์ มีจุดเดือด 78 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง -117.3 องศาเซลเซียส และมีค่าความถ่วงจำเพาะ 0.794 ที่ 60 องศาฟาเรนไฮด์ (สาวิตรี, 2549)

เอทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยมีข้อดี คือ เป็นของเหลวที่ใช้ได้ทันทีต่างกับปิโตรเลียมที่ต้องการกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ที่ซับซ้อน สามารถผลิตจากทรัพยากรธรรมชาติที่สร้างขึ้นมาทดแทนใหม่ได้ (Renewable resource) หลายชนิด และการเผาไหม้ของเอทานอลสะอาดกว่าการเผาไหม้ของน้ำมันเบนซิน ทั้งนี้เอทานอลอาจใช้เป็นเชื้อเพลิงตามลำพังหรือผสมกับน้ำมันเบนซินหรือดีเซล

1.1 ชีวเคมีของการหมักเอทานอล

การหมักเอทานอลของยีสต์เกิดขึ้นโดยการที่น้ำตาลถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลคอไลซิส หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway จนได้ไพรูเวต โดยถ้าเริ่มจากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะได้ไพรูเวต 2 โมเลกุล ดังแสดงในสมการ

$$\text{glucose} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{NAD}^{+} \longrightarrow 2\ \text{pyruvate} + 4\ \text{ATP} + 2\ (\text{NHDH} + \text{H}^{+})$$

ต่อจากนั้นไพรูเวตเกิดการแยกเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออก (De-carboxylation) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซีเลส (Pyruvate decarboxylase) เป็นตัวเร่งสร้างแอซีทาลดีไฮด์ ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยมีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากไม่มีตัวรับไฮโดรเจนจากภายนอก เช่น ออกซิเจน จึงต้องมีขั้นตอนการสร้างและการใช้ $NADH_2$ ในขณะที่เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสรีดิวซ์แอซีทาลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอล จะเกิดการออกซิไดซ์ $NADH_2$ ที่ได้จากวิถี EMP

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณของสารต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักน้ำตาลด้วยยีสต์ โดยการคำนวณจากได้สมการดังต่อไปนี้ (Ingledew, 1999)

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$

กลูโคส 1 โมเลกุล	เอทานอล 2 โมเลกุล	คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล
(180 กรัม)	(2 x 46 กรัม)	(2 x 44 กรัม)

สรุปได้ว่า การหมักเอทานอลจากกลูโคสโดยยีสต์นั้นจากกลูโคส 1 กรัม ให้เอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม นั่นคือมีค่าผลผลิตทางทฤษฎี (Theoretical yield หรือ Gay-Lussac yield) สำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับ 51.1 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องด้วยบางส่วนของน้ำตาลถูกยีสต์ใช้เพื่อการเจริญ และบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล ซักซิเนต และแอลกอฮอล์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่เรียกว่า ฟูเซลออลย์ ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎีเสมอ ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้อยู่ในช่วงไม่เกิน 90-95 เปอร์เซ็นต์ของค่าผลผลิตทางทฤษฎี โดยผลผลิตพลอยได้ที่สร้างขึ้นเกิด จากการใช้ซับสเตรต 4-5 เปอร์เซ็นต์ และถ้าสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างผลผลิตพลอยได้เหล่านั้นแล้วจะได้เอทานอลเพิ่มขึ้น 2.7 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันการผลิตระดับอุตสาหกรรม เอทานอลที่ได้จะมีค่าเพียง 80-90 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทางทฤษฎี (Kosaric *et al*., 1983; Panchal and Tavares, 1990)

การหมักเอทานอลมีการสร้างผลผลิตเอทานอลและสารอื่น ๆ ดังนี้ Paturau (1969) คือ

เอทานอล	48.4	เปอร์เซ็นต์
คาร์บอนไดออกไซด์	46.5	เปอร์เซ็นต์
แอซีทาลดีไฮด์	0 - 0.03	เปอร์เซ็นต์
กรดแอซีติก	0.05 – 0.25	เปอร์เซ็นต์
กลีเซอรอล	2.5 – 3.6	เปอร์เซ็นต์
กรดแลกติก	0 – 0.2	เปอร์เซ็นต์
กรดซักซินิก	0.5 – 0.77	เปอร์เซ็นต์
ฟูเซลออลย์	0.25 – 0.5	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์ฟูราล	ปริมาณน้อยมาก	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล

1.2.1 ยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

ยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม มีหลายสปีชีส์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* (carlsbergensis), *Schizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces gragilis* สำหรับ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า *S. uvarum* และยีสต์ชนิดอื่น ดังนั้นการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ในปัจจุบันมีการพัฒนาและการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Zymomonas* คือ *Z. mobilis* และสกุล *Clostridium* คือ *Cl. Thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน สามารถหมักเซลลูโลสและเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แต่แบคทีเรียทั้ง 2 สกุลที่กล่าวมามีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์

การหมักเอทานอลให้ได้ผลผลิตที่สูงเป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญเป็นอันดับแรกที่ใช้ในการพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับการผลิตเอทานอล นอกจากนั้นลักษณะอื่นที่ได้รับความสนใจในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง หรือสารเคมีในระยะที่ผ่านมาจนถึงขณะนี้คือ ความสามารถในการจับกลุ่มตกตะกอน (flocculation) ความทนต่อเอทานอล ความทนต่ออุณหภูมิสูง และความทนต่อแรงดันออสโมซิส แต่ไม่ได้หมายความว่ายีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอลของแต่ละโรงงานต้องมีลักษณะต่าง ๆ ข้างต้นครบถ้วน ลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ขึ้นอยู่กับความต้องการและปัจจัยอีกหลายอย่าง

ลักษณะของยีสต์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลมีหลายประการ (Kosaric *et al*., 1983; Walker, 1998) เช่น

1) ให้ผลผลิตเอทานอลสูง (ethanol yield)
2) มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
3) มีความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
4) มีความทนต่ออุณหภูมิสูง (thermotolerance)
5) มีความทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6) มีความสามารถในการจับกลุ่มตกตะกอน (flocculation) ซึ่งขึ้นอยู่กับกระบวนการว่าต้องการลักษณะการจับกลุ่มตกตะกอนนี้หรือไม่

7) ทน pH ต่ำหรือทนกรดสูง (Acid tolerance)

8) มีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย

9) ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่าง ๆ ของการหมัก

10) ใช้ซับสเตรตได้หลายชนิด

11) สร้างเมแทบอไลต์อื่นในระดับต่ำ เช่น กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล เอสเทอร์ และอัลดีไฮด์

12) ไม่มีการกดดัน (Reperssion) การใช้น้ำตาลอื่นเมื่ออยู่ในที่มีกลูโคส

13) มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งหรือย่อยเซลลูโลสเมื่อต้องการหมักโดยการใช้แป้งหรือเซลลูโลสเป็นซับสเตรต

14) มีอัตราการเจริญสูงแต่ให้ผลผลิตเซลล์ต่ำเพื่อให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนเชื้ออย่างรวดเร็วสำหรับการผลิตเอทานอล

15) เซลล์มีความมีชีวิตสูง

16) ทนต่อสารพิษและสารยับยั้งการเจริญ

17) ทนการปะปนของแบคทีเรีย

18) มีลักษณะเป็นคิลเลอร์ (Killer) คือมีฤทธิ์ในการฆ่า

19) เพิ่มจำนวนง่าย

20) ให้ความร้อนระหว่างการหมักน้อย

1.2.2 แหล่งของสารอาหารสำหรับยีสต์

1.2.2.1 คาร์บอน ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์เป็นคีโมออร์กาโนโทรฟ (Chemoorganotroph) ซึ่งต้องใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้ คือ แหล่งน้ำตาล กลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเมแทบอลิซึมได้ ยีสต์บางชนิดสามารถเมแทบอลิซึมกลูโคสโดยการหมักได้ด้วย โดยปกติในธรรมชาติกลูโคสจะไม่ได้มีอยู่อย่างอิสระแต่อยู่ในรูปของพอลิเมอร์จำพวกเซลลูโลส แป้ง และพอลิแซ็กคาไรด์อื่น อีกทั้งปกติกลูโคสไม่ได้เป็นซับสเตรตสำหรับการหมักในอุตสาหกรรม โดยซับสเตรตสำหรับการหมักในอุตสาหกรรมชนิดที่เป็นน้ำตาลมักเป็นมอลโทส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซูโครส ฟรุกโทส ไซโลส และแลกโทส นอกจากนั้นกลูโคสมักแสดงการกดดัน (Repression) และมีผลยับยั้ง (Inhibitory effect) การแอสซิทิเลตน้ำตาลอื่นของยีสต์

เมื่อยีสต์เจริญในที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูง หน้าที่ของไมโทคอนเดรียจะถูกกดดันที่เรียกว่า อิทธิพลแคร็บทรี (Crabtree effect) หรืออิทธิพลกลูโคส (Glucose effect) หรือการกดดันแคแทบอไลต์ (Catabolite repression) ทำให้ยีสต์มีการหายใจลดลง นอกจากนั้นในสภาวะที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูง ยีสต์แสดงการเจริญแบบ 2 ระยะหรือไดฟาซิก (Diphasic) คือ หลังจากระยะ lag phase ถึงระยะ exponential phase กลูโคสจะถูกหมักเป็นเอทานอล ระหว่างนี้การหายใจแบบใช้ออกซิเจนถูกกดดัน ช่วงการเจริญที่สอง ยีสต์จะใช้เอทานอลสำหรับการเจริญโดยเมแทบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจนและได้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตสุดท้าย ยีสต์บางชนิดเท่านั้นที่ไวต่อกลูโคสความเข้มข้นสูง ในกรณีของ *Candida, Rhodotorula* และ *Torulopsis* ไม่ผลิตเอทานอลแม้จะเจริญในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูงในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยจะใช้กระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนทำให้ได้ผลผลิตชีวมวล (Berry and Briwn, 1987; Walker, 1998)

ในโรงงานอุตสาหกรรมมักใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตจากวัตถุดิบที่มีสารประกอบหลายชนิด เช่น กากน้ำตาล ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส และราฟฟิโนส

1.2.2.2 ไฮโดรเจน ไฮโดรเจนไอออน (H ion) หรือโปรตอน (Proton) สำคัญมากสำหรับสรีรวิทยาของยีสต์ โดย pH ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ยีสต์มีอิทธิพลมากต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของยีสต์ มีรายงานว่า pH ที่เหมาะสม (Optimal pH) สำหรับการเจริญและการหมักกลูโคสคือ pH ที่ให้ไฮโดรเจนไอออนเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (pH 6) และ 10 ไมโครโมลาร์ (pH 5) ยีสต์ปกติเจริญดีมากเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมี pH เริ่มต้นอยู่ระหว่าง 4-6 แต่ยีสต์บางชนิดเจริญในช่วง pH ที่กว้างกว่าคือ pH 2-8 และยีสต์ส่วนใหญ่เจริญไม่ดีใน pH ที่เป็นด่าง ในขณะที่บางชนิดสามารถปรับตัวให้เจริญได้ในสภาพที่เป็นด่างเล็กน้อย เช่น ยีสต์ที่พบในน้ำทะเลสามารถปรับตัวให้เจริญในน้ำทะเลที่เป็นด่างเล็กน้อย การเจริญของยีสต์อย่างรวดเร็วทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด ซึ่งเป็นผลรวมจากการนำเข้าของไอออนต่างชนิดกัน การปลดปล่อยโปรตอนระหว่างการขนส่งสารอาหาร การปลดปล่อยกรดอินทรีย์ และการเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ การผลิตเอทานอลมีผลจากการเปลี่ยน pH ของอาหารมากเช่นกัน pH ภายในเซลล์ที่กำลังเจริญมีการควบคุมภายในช่วงแคบ ๆ โดยการทำงานของ ATPase ในโปรตอนปั๊ม (Proton pump) ที่พลาสมาเมมเบรนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการนำเข้าของสารอาหารและเมแทบอลิซึม การผันแปรของ pH ภายนอกเซลล์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีผลต่อ pH ในไซโทพลาสซึม ยกเว้นในอาหารที่ประกอบด้วยกรดอินทรีย์ เช่น แอซีเตต หรือซอร์เบต (Isaac and Jenning, 1995; Walker, 1998)

1.2.2.3 ออกซิเจน ยีสต์หลายชนิดเจริญเฉพาะในสภาวะที่มีออกซิเจน เรียกยีสต์เหล่านี้ว่า obligate aerobic yeast เช่น *Candida* ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนอย่างสมบูรณ์ และไม่มียีสต์ชนิดใดที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Obligate anaerobic yeast) ยีสต์บางชนิดเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เรียกว่า Facultative anaerobic yeast ซึ่งยีสต์ประเภทนี้มีลักษณะสำคัญ 3 อย่าง คือ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ชอบเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนมากกว่าเพราะได้รับพลังงานในรูป ATP มากกว่า และในสภาวะที่มีออกซิเจนจะมีอัตราการใช้กลูโคส (Glucose consumption) ต่ำกว่าในที่ไม่มีออกซิเจน

หน้าที่หลักของออกซิเจน คือ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่อิเล็กตรอน (Electron transport chain, ETC) นอกจากนั้นยังทำหน้าที่เป็น Growth factor โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับการเกิดไฮดรอกซีเลชัน (Hydroxylation) เพื่อรักษาการเจริญ เช่น ใช้ในการสังเคราะห์สเตรอล และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยีสต์บางชนิดต้องการโมเลกุลออกซิเจนสำหรับเอนไซม์ออกซิเดสชนิดที่มีหน้าที่หลายอย่าง (Mixed function oxidase) ที่ช่วยในการทำให้เกิดวงแหวน (Cyclization) ของสควอลีน 2,3-อีพอกไซด์ (Squalene 2,3-epoxide) เพื่อสร้างลาโนสเตรอล (Lanosterol) และสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังนั้นออกซิเจนจึงจัดเป็น Growth factor ที่สำคัญขององค์ประกอบของเซลล์ ในการสังเคราะห์ต้องการโมเลกุลของออกซิเจนอย่างน้อย 3 ชนิด คือ ส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว สเตรอล และกรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) ดังนั้นถ้าต้องการเลี้ยง *S. cerevisiae* ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจึงต้องเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัว สเตรอล และกรดนิโคตรนิก ลงในอาหารด้วย *S. cerevisiae* จึงจะเจริญได้

สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมจากยีสต์บางชนิด เช่น ยีสต์ขนมปัง และโปรตีนจากชีวมวลของยีสต์ หรือโปรตีนเซลล์เดี่ยวที่ต้องทำให้มีการเจริญโดยเมแทบอลิซึมแบบหายใจสูงสุด ในกระบวนการผลิตจึงต้องรักษาให้มีออกซิเจนพอเพียงที่จะสนับสนุนการเจริญอย่างรวดเร็วของยีสต์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) โดยออกซิเจนต้องค่อย ๆ ละลายลงในน้ำ และมีการปฏิบัติหลายอย่างเพื่อเพิ่มอัตราการดูดซึมออกซิเจน (Oxygen absorption rate) ซึ่งเท่ากับ K_L.a.c (K_L คือ อัตราที่ออกซิเจนจากบรรยากาศผ่านทาง Liquid interface และลงในสารละลาย ส่วน a คือ พื้นที่ของ Interface และ c คือความเข้มข้นของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในห้องปฏิบัติการนั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ที่ทำให้เป็นร่อง (Baffled indentation) ร่วมกับการเขย่า สามารถเพิ่มอัตราการดูดซึมออกซิเจนอย่างมาก ทำให้การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น ในขณะที่หมักเบียร์ซึ่งเป็นการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic fermentation) การมีออกซิเจนในช่วงต้นซึ่งยีสต์มีการเจริญแบบใช้ออกซิเจนจะเป็นประโยชน์ และสำคัญมากในการนำไปสู่การหมักต่อไป (Halasz and Laztity, 1991; Walker, 1998)

1.2.2.4 ไนโตรเจน เซลล์ยีสต์มีไนโตรเจนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต มักใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงยีสต์เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย ยีสต์บางชนิดใช้ไนเตรต เช่น *Citeromyces* และบางสายพันธุ์ของ *Pichia* และ *Candida* ในขณะที่บางชนิดไม่ใช้ไนเตรต เช่น *Debaryomyces, Kluyveromyces, Saccharomyces* และบางสายพันธุ์ของ *Pichia* และ *Candida* ยีสต์ที่ใช้ไนเตรตได้อาจใช้ไนไตรต์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่เป็นพิษกับยีสต์ได้

นอกจากอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้วอินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ พิวรีน และเอมีน (Amine) ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์บางชนิดได้ กรดอะมิโนส่วนใหญ่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แม้ว่ายีสต์มีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อใช้กรดอะมิโนแต่ละชนิดต่างกัน กรดอะมิโนกลูทามีน (Glutamine) และกรดแอสพาร์ติก (Aspartic acid) ถูกดีอะมิเนต (Deaminate) โดยยีสต์และเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีในอาหารสำหรับอุตสาหกรรมการหมัก เช่น เวิร์ตจากมอลต์มีกรดอะมิโนอยู่ด้วยกันหลายชนิดซึ่งยีสต์ใช้เป็นลำดับ โดยพบว่าการใช้กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ มีอัตราแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน แอสพาราจีน กรดแอสพาร์ติก กรดกลูทามิก กลูทามีน ซีรีน ไลซีน และทรีโอนีน ซึ่งถูกใช้อย่างรวดเร็วจนไม่เหลือในเวิร์ตหลังจากที่เพาะเชื้อนาน 20 ชั่วโมง กลุ่มสอง คือ ฮิสติดีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน เมไทโอนีน และวาลีน ซึ่งจะหมดไปจากเวิร์ตในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง กลุ่มสามประกอบด้วยอะลานีน ไกลซีน ฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน และไทโรซีน โดยกรดอะมิโนในกลุ่มนี้ยังไม่ถูกใช้ในระยะ 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก แต่ยีสต์จะเริ่มใช้หลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้ว และกลุ่มสี่ ซึ่งเป็นกลุ่มสุดท้ายมีโพรลีนเพียงชนิดเดียวพบว่าโพรลีนถูกยีสต์ใช้ไปเพียงเล็กน้อยเมื่อหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นาน 60 ชั่วโมง ในห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจใช้กรดอะมิโนผสมในรูปของไฮโดรไลเสตของโปรตีน เช่น เคซีนไฮโดรไลเสต สำหรับโปรตีนมียีสต์น้อยชนิดที่ย่อยสลายโปรตีนภายนอกเซลล์ได้ เช่น *Cryptococcus macerans* ที่สามารถย่อยสลายเจลาติน

ยีสต์บางชนิดใช้เพปไทด์ขนาดเล็ก ๆ ได้ และการนำเพปไทด์เข้าสู่เซลล์ยีสต์ถูกจำกัดด้วยขนาดโมเลกุล โดยเพปไทด์จะถูกย่อยโดยเอนไซม์เพปทิเดส (Peptidase) หลังจากผ่านเข้าไปในเซลล์ เช่น *S. cerevisiae* ใช้เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนสองโมเลกุล (Dipeptide) และเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนสามโมเลกุล (Tripeptide) นอกจากนั้น มีบางสายพันธุ์ที่ใช้เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนห้าโมเลกุล (Pentapeptide) ได้

ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับยีสต์ แต่เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น จำเป็นต้องมีการเติมไบโอตินลงในอาหารนั้นด้วย นอกจากนี้ การใช้ยูเรียของยีสต์จะลดลงเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนอื่นที่ยีสต์ใช้ได้ดีกว่าเนื่องจากการกดดันของไนโตรเจน (Nitrogen suppression)

ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนมากกว่าหนึ่งชนิดอย่างที่ปรากฏเสมอ ๆ ไนโตรเจนเหล่านั้นจะถูกใช้ในอัตราที่ต่างกันยีสต์จะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดก่อนเป็นอันดับแรก ซึ่งเข้าใจว่าเกิดโดยวิธีการกดดันและการแบ่งส่วนของเมแทบอไลต์ (Metabolite compartmentation) ดังนั้นการที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ดี เช่น กลูตาเมต ในอาหาร เป็นผลให้มีการกำจัดแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ดี (เช่น โพรลีน) จากเซลล์ โดยมีผู้เสนอว่าการที่จะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี สารประกอบนั้นจะต้องถูกนำเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยขั้นตอนที่น้อยที่สุด เพื่อสร้างกลูตาเมตหรือแอมโมเนียหรือทั้งสองอย่าง และต้องไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นพิษ (Copper, 1982; Berry and Briwn, 1987; Walker, 1998)

1.2.2.5 ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในเซลล์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดย 60 เปอร์เซ็นต์ของซัลเฟอร์ในเซลล์อยู่ที่กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในโปรตีน อีก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นอนินทรีย์ซัลเฟตอิสระ ส่วนที่เหลืออยู่ในรูปของซัลเฟตที่เกาะกันหรือกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนั้น ยังพบอยู่ในวิตามินบางชนิด เช่น ไบโอติน และสารที่มีซัลเฟอร์ อื่น ๆ ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในอันดับแรก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แหล่งซัลเฟอร์ได้จากสารประกอบซัลเฟอร์หลายชนิดรวมทั้งซัลเฟต (Sulfate) ซัลไฟต์ (Sufite) ไทโอซัลเฟต (Thiosulfate) อนินทรีย์ซัลเฟอร์ในรูปของซัลเฟตไอออน โดยเฉพาะแอมโมเนียซัลเฟต หรือโพแทสเซียมซัลเฟต เป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่นิยมใช้ในอาหาร โดยยีสต์ทุกชนิดสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์จากซัลเฟตได้ การนำเข้าซัลเฟตที่ว่องไวสัมพันธ์กับการมีเอนไซม์โฮโมซีสทีอีกซินเทส (Homocysteine synthase) ซึ่งทำให้ซัลเฟตถูกนำเข้าไปเพื่อสร้างซีสเทอีนโดยซัลเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นซัลไฟต์ทันทีแล้วจึงถูกเมแทบอไลซ์ต่อไป ดังนั้นซัลไฟต์จึงอาจใช้เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้เช่นกันแต่ต้องใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์บางชนิด เช่น *S. cerevisiae* ใช้ธาตุซัลเฟอร์เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้ โดยธาตุซัลเฟอร์ถูกรีดิวซ์นอกเยื่อหุ้มเซลล์กลายเป็นไทออลไอออน (Thiol ion) แล้วจึงผ่านเข้าไปในเซลล์ เมไทโอนีนเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เพียงชนิดเดียวที่ใช้เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้โดยเมไทโอนีน มีผลให้ยีสต์มีการเจริญดีกว่าซัลเฟต (Berry and Briwn, 1987; Walker, 1998)

1.2.2.6 ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสถูกแอสซิมิเลตในรูปของไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออนหรือออร์โทฟอสเฟตไอออน (Orthophosphate ion, $H_2PO_4^-$) เท่านั้น บทบาทหลักของฟอสฟอรัส คือเป็นองค์ประกอบของน้ำตาลฟอสเฟต (Sugar phoshate) กรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอไซด์ไดฟอสเฟต หรือนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต และยังพบอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปของพอลิเมอร์สายตรงคือพอลิฟอสเฟต มีความสำคัญในการควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ ให้ฟอสเฟตสะสม และให้พลังงาน ฟอสฟอรัส ทำให้มีประจุลบในไซโทรพลาสซึมของยีสต์จากการที่มีอนินทรีย์ฟอสเฟต และกลุ่มฟอสเฟตในสารอินทรีย์ ฟอสเฟตในเซลล์ยีสต์มีอยู่ประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของออร์โทฟอสเฟต

ในอาหารเลี้ยงยีสต์แหล่งฟอสเฟตที่สำคัญ คือ ออร์โทฟอสเฟต และอนินทรีย์ฟอสเฟตโดยออร์โทฟอสเฟตทำหน้าที่เป็นซับสเตรต และหน่วยปฏิบัติงานของเอนไซม์หลายชนิด ระดับของฟอสเฟตภายในไซโทพลาสซึมของยีสต์ต่ำมากคือประมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ระดับของฟอสเฟตจะผันแปรตามกลไกของแคแทบอลิซึมของน้ำตาล ยีสต์สามารถสะสมฟอสเฟตในออร์แกเนล เช่น อาจพบฟอสเฟตในแวคิวโอมากกว่าในไซโทพลาสซึมถึง 110 เท่า สำหรับอนินทรีย์ฟอสเฟจนั้นทั้งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตสามารถใช้เป็นแหล่งฟอสเฟส และเนื่องจากโพแทสเซียมไอออนสามารถเหนี่ยวนำการนำเข้าฟอสเฟตโดยถูกขนส่งร่วมกับฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ให้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสเฟตที่ดีกว่าแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในที่ขาด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แหล่งฟอสเฟตชนิดอื่น และลักษณะของแมแทบอลิซึมของฟอสเฟตอีกอย่างหนึ่งของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ฟอสฟอรัสจำกัด คือเซลล์จะขับเอนไซม์ฟอสโฟเอสเทอเรสที่ไม่จำเพาะ (Non-specific phosphoesterase) และแอซิดฟอสฟาเทส (Acid-phosphatase) ไปที่ผิวเซลล์ทำให้เซลล์ได้ฟอสฟอรัสจากฟอสเฟต เอสเทอร์ (Phosphate ester) (Berry and Briwn, 1987; Walker, 1998)

1.2.2.7 เกลือแร่ ยีสต์ต้องการเกลือแร่ (Mineral elements) เหมือนกับจุลิทรีย์อื่น ๆ เกลือแร่ที่ยีสต์ต้องการประกอบด้วยโพแทสเซียม แมกนีเซียม และธาตุที่ต้องการหลายชนิดในปริมาณต่ำ สำหรับโพแทสเซียมและแมกนีเซียมเป็นธาตุอาหาร Macroelement ที่ยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นเป็นมิลลิโมลาร์ เพื่อทำให้เกิดสภาวะที่มีประจุบวกภายในเซลล์ยีสต์

ปกติยีสต์มีโพแทสเซียมประมาณ 1-2.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยปริมาณโพแทสเซียมในเซลล์ผันแปรตามสภาวะของการเจริญ ยีสต์ทุกชนิดต้องการโพแทสเซียมสำหรับการเจริญโดยโพแทสเซียมทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวกับออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (Oxidation phosphorylation) การสังเคราะห์โปรตีน และเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เช่น ไพรูเวตไคเนส (Pyruvate kinase) อัลโดเลส (Aldolase) อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Aldehyde dehydrogenase) และเอทีพีเอส (ATPase) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นยังร่วมในการทำงานนำสารอาหารอื่นเข้าเซลล์ เช่น ฟอสเฟตเป็นตัวควบคุมการนำเข้าไอออนที่มีประจุบวกสอง (Divalent cation) โดยเมื่อมีการนำเข้าไอออนที่มีประจุบวกสองก็จะมีการขับโพแทสเซียมไอออนสองตัว จึงเป็นตัวที่ทำให้ประจุสมดุล ทำให้โมเลกุลใหญ่และไรโบโซมคงตัว ที่ pH ต่ำโพแทสเซียมจะกระตุ้นการหมักและการหายใจเนื่องจากทำให้ระดับของ NADP ADP และอนินทรีย์ฟอสเฟตในเซลล์เพิ่มขึ้น สารที่ใช้เป็นแหล่งโพแทสเซียม เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสฟอต และไดโพแทสเซียมฟอสเฟต

สำหรับแมกนีเซียมเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์ยีสต์เช่นกัน และมีอยู่ในเซลล์ประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำหน้าที่เกี่ยวกับโครงสร้างและเมแทบอลิซึม เช่น การทำงานของเอนไซม์สำหรับการเคลื่อนย้ายฟอสเฟต (Transphosphorylation) ต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน

เกลือแร่อื่น ๆ ที่ยีสต์ต้องการในปริมาณต่ำมาก ๆ ระดับไมโครโมลาร์ หรือนาโนโมลาร์ ประกอบด้วย แมงกานีส แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง นิเกิล โคบอลท์ และโมลิบดีนัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในขณะที่เกลือแร่อื่น คือ เงิน แบเรียม แคดเมียม ปรอท ลิเทียม และตะกั่ว เป็นสารพิษเพราะถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 100 ไมโครโมลาร์จะมีผลเสียต่อการเจริญ (Berry and Briwn, 1987; Walker, 1998)

1.2.2.8 Growth factor เป็นสารอินทรีย์ยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นต่ำมาก มีบทบาทในการเร่งหรือมีส่วนในโครงสร้าง สารที่เป็น Growth factor สำหรับยีสต์ คือ วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ (Nucleoside) กรดอะมิโน กรดไขมัน และสารอื่น ๆ เช่น พอลิเอมีน (Polyamine) โคลีน และมีโซ-อินอซินอล การที่ยีสต์ต้องการ Growth factor หมายความว่ายีสต์นั้นไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ในบางครั้งความต้องการอาจไม่ใช่ความต้องการที่แท้จริง แต่เมื่อเติม Growth factor ลงไป ยีสต์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น สำหรับ Growth factor แบบนี้เรียกว่า Relative growth factor

ยีสต์มักต้องการวิตามินที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมล เช่น ไบโอติน ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยคาร์บอกซีเลส (Carboxylase) กรดแพนโททีนิกในรูปที่ทำหน้าที่ คือ โคเอนไซม์เอ (Coenzyme A) ที่ร่วมในปฏิกิริยาแอซีทิลเลชัน (Acetylation) กรดนิโคตินิกในรูปของนิโคตินาไมด์ (Nicotinamide) ซึ่งร่วมในปฏิกิริยารีดอกซ์ และไทเอมีน (Thiamine) หรือวิตามินบี 1 ในรูปของไทเอมีนไพโรฟอสเฟต (Thiamine pyrophosphate) ซึ่งร่วมในปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชัน (Decarboxylation) (Walker, 1998)

1.2.3 สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมของยีสต์ในการหมักเอทานอล

1.2.3.1 ความเข้มข้นของเอทานอล การเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล โดยพบว่าเอทานอลความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงและการเจริญของยีสต์โดยทั่วไปจะหยุดเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังนั้นเอทานอลเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งที่จำกัดการผลิตเอทานอลของยีสต์ (Panchal and Tavares, 1990)

การค้นคว้าเกี่ยวกับการหมักและการทนต่อเอทานอลนั้น Panchal และ Tavares (1990) ได้แบ่งเป็นเรื่องต่าง ๆ ไว้ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) บทบาทของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์มีความสำคัญต่อความทนต่อเอทานอล เมื่อไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นทำให้ความทนต่อเอทานอลเพิ่มขึ้น และเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ในสภาพของไหล (fluidity) ในขณะที่ไขมันไม่อิ่มตัวลดลงจะทำให้ความทนต่อเอทานอลลดลงด้วย และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแกร่ง (rigid)

2) ปัจจัยอย่างเดียว หรือหลายอย่างในไมโทคอนเดรียมีความสำคัญต่อความทนเอทานอลของเซลล์ยีสต์

3) เซลล์ที่สร้างเอทานอลด้วยอัตราเร็วกว่า เพื่อให้ได้เอทานอลความเข้มข้นสูงไม่จำเป็นต้องทนเอทานอลที่เติมลงในอาหาร

4) สารอาหารบางอย่าง และไขมันที่เติมลงในอาหาร จะเพิ่มความทนเอทานอลและความสามารถในการหมักของยีสต์

5) ยีสต์ที่มีเซลล์ขนาดเล็ก ปกติทนเอทานอลได้มากกว่าและผลิตเอทานอลได้เร็วกว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่

6) ความทนหรือไม่ทนต่อเอทานอลเป็นลักษณะที่ควบคุมโดยพันธุกรรม

จากการศึกษาของ Brown *et al.* (1981) ชี้ว่าผลการยับยั้งการเจริญด้วยเอทานอลซับซ้อนและไม่ได้เป็นไปตามแบบการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน โดยมีผลยับยั้งอัตราการเจริญและลดความมีชีวิตของเซลล์ การเติมเอทานอลลงไปในระหว่างที่เชื้ออยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลมีผลทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับอัตราการสังเคราะห์เอทานอล แต่ผลของเอทานอลต่ออัตราการเจริญจะมีมากกว่าผลต่ออัตราการหมัก

ความทนเอทานอลเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ในบรรดายีสต์ชนิดต่าง ๆ พบว่ามีเพียงบางสปีชีส์ของ *Saccharomyces* และ *Schizosaccharomyces* ที่แสดงลักษณะนี้ โดย *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนเอทานอลมากกว่ายีสต์ชนิดอื่น (Rose, 1993)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวในฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ช่วยส่งเสริมการขับเอทานอลออกจากเซลล์ ทำให้ปริมาณเอทานอลที่จะเป็นพิษภายในเซลล์ลดลง โดยที่การสะสมเอทานอลภายในเซลล์จะทำให้เกิดความเสียหายกับองค์ประกอบของเซลล์หลายอย่างรวมทั้งเอนไซม์ ไขมัน และโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นความสามารถของยีสต์ที่จะขับเอทานอลออกจากเซลล์มีบทบาทหลักในการกำหนดความทนเอทานอลและความมีชีวิตอยู่ ส่วนเซลล์ที่มีขนาดเล็กจะทำให้ขนาดหรือพื้นที่ของผิวเซลล์ต่อปริมาตรเซลล์มากกว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ จะช่วยให้สามารถ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขับเอทานอลออกจากเซลล์ได้เร็วกว่าเซลล์ขนาดใหญ่ และเซลล์ที่มีส่วนประกอบของไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่าสามารถปลดปล่อยเอทานอลได้เร็วกว่า เช่นเดียวกับการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ (Panchal and Tavares, 1990)

1.2.3.2 ความเข้มข้นของน้ำตาล การใช้ซับสเตรตความเข้มข้นสูงในการหมักเอทานอลทำให้ปริมาณน้ำที่ใช้ทำให้ซับสเตรตเจือจางจนถึงระดับที่เหมาะสมลดลง และลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ ที่มากับซับสเตรต แต่การใช้การซับสเตรตความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล และยังพบว่าประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การยับยั้งส่วนหนึ่งเกิดจากการเพิ่มแรงดันออสโมซิส เพราะความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นทำให้มีการเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลภายในเซลล์ ซึ่งมีผลเสียต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์

การเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดลิโนลีนิก และสารอาหาร (เพปโตน-ยีสต์เอกซ์แทรกต์) ลงในอาหารสำหรับหมัก จะทำให้ลดผลการยับยั้งของแรงดันออสโมซิสต่อความสามารถในการหมักของยีสต์ลงอย่างมาก ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าแรงดันออสโมซิสที่สูงขึ้นจากการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลนั้นมีผลทำให้สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ และรักษาชีวิตของเซลล์หมดลง เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์กลายเป็นมีสภาพที่แข็งมากขึ้น ทำให้การแพร่ผ่านของสารอาหารเหล่านั้นเข้าไปในเซลล์เกิดขึ้นไม่ดี ดังนั้นการเติมสารอาหารบางอย่างรวมทั้งกรดลิโนลีอิก จะเพิ่มสภาพของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ยอมให้สารอาหารผ่านเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น เช่นเดียวกับยอมให้เอทานอลแพร่ออกจากเซลล์ดังที่กล่าวไว้แล้ว

ยีสต์ทนแรงดันออสโมซิสมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล เพราะสามารถเจริญและหมักเอทานอลในน้ำตาลความเข้มข้นสูง ซึ่งไม่เพียงแต่ลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ แต่ยังให้เอทานอลที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกลั่น การปรับปรุงการหมัก เอทานอลภายใต้แรงดันออสโมซิสทำได้โดยค่อย ๆ เติมซับสเตรตเป็นระยะ ๆ เพื่อลดแรงดันออสโมซิส และทำให้ความมีชีวิตของเซลล์สูงขึ้น เช่นในกรณีของการทำเฟด-แบตช์ (fed-batch) (Panchal and Tavares, 1990) แต่ผลของการยับยั้งของน้ำตาลความเข้มข้นสูงมีน้อยกว่าผลของเอทานอล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae*

Glucose (g/L)	Growth rate (mg dry wt/ml. hr)	Fermentation (mol ethanol/ml. hr)	Theoretical ethanol yield (%)
100	0.33	54.0	93.5
200	0.24	52.7	66.4
300	0.11	42.5	59.0
400	0.03	14.2	23.6

ที่มา : Panchal (1990)

เหตุผลอีกประการหนึ่งเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงมากเกินไปจะทำให้ความสามารถในการหายใจเสียไป หรือเรียกว่า Crabtree effect ซึ่งเป็นการกดดันแคตาบอไลต์ (catabolite repression) ที่เกิดขึ้นเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณกลูโคสหรือซูโครสความเข้มข้นสูงกว่า 0.02-0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำให้การหายใจถูกยับยั้งอย่างรุนแรง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) จากตารางที่ 1 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น มีผลทำให้อัตราการเจริญและการผลิตเอทานอลลดลง ดังนั้น ในการหมักเอทานอลจึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมปริมาณน้ำตาลไม่ให้สูงเกินไป เพื่อไม่ให้เกิด Crabtree effect ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ และการผลิตเอทานอล

1.2.3.3 อุณหภูมิ *Saccharomyces* เป็นสายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดและมีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิช่วง 28-35 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิสูงสุด (maximal temperature) สำหรับการเจริญ 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิสูงสุดซึ่งเชื้อเจริญได้นี้จะสูงขึ้นไปเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์

การหมักเอทานอลพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมัก จะสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 25 เป็น 38 องศาเซลเซียส เมแทบอลิซึมของยีสต์ในที่มีออกซิเจนจะเบนไปทางการหมัก เนื่องจากเกิดการทำให้เอนไซม์ที่สำคัญสำหรับออกซิเดชัน 4 ชนิด ไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยา มีผลทำให้เกิดการสะสมของไพรูเวตและเอทานอล (Panchal and Tavares, 1990)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหมักเอทานอลที่มีอัตราการหมักสูงจะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูง การหมักด้วยยีสต์ที่ใช้ทั่วไป ซึ่งมักจะเป็นยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ความสามารถในการหมักเอทานอลจะลดลงอย่างมาก เนื่องจากการยับยั้งด้วยเอทานอลมีมากขึ้น แนวทางการแก้ปัญหานี้ คือ การใช้ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง ซึ่งจะเจริญและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิต่ำแต่ยังคงเจริญและหมักเอทานอลได้ถึงแม้จะมีอุณหภูมิสูง ประโยชน์ของการใช้ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม คือ ลดการใช้ระบบหล่อเย็นทำให้ค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลดลงเป็นผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง นอกจากนั้นการหมักที่อุณหภูมิสูงยีสต์มักจะมีอัตราการหมักสูงทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้เร็ว และช่วยลดปัญหาการปะปนของเชื้ออื่น ๆ ด้วย (Seki *et al*., 1983; Limtong, 1987; Singh *et al*., 1998; Sree *et al*., 1999)

1.2.3.4 pH เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งในการหมักเอทานอลโดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก pH มีผลต่อการหมัก การสร้างผลผลิตพลอยได้ ตลอดจนควบคุมเชื้อปนเปื้อน ซึ่งมีผลต่อการเจริญของยีสต์ที่อยู่ในระหว่างการหมัก สำหรับการเลือก pH ที่จะใช้ในการหมักซึ่งไม่มีระบบควบคุม pH ระหว่างการหมักขึ้นอยู่กับความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ของอาหารสำหรับหมัก ในอาหารที่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมควรใช้ประมาณ 5.5 แต่ถ้าอาหารนั้นมีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์สูง pH ที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5-4.7 ในการหมักเอทานอลเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบใช้ pH 4-5 แต่เมื่อใช้เมล็ดธัญพืช pH ที่ควรเลือกใช้จะอยู่ในช่วง 4.8-5 สำหรับการหมักเอทานอลโดยใช้อาหารที่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำบางครั้งต้องควบคุม pH ในระหว่างการหมักซึ่งอาจทำได้โดยการเติมแอมโมเนียเหลว

pH ที่ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ คือ pH ในช่วง 2.4-8.6 โดยมี pH ที่เหมาะสม (optimal pH) สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาล เท่ากับ 4.5 โดยการหมักไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง pH 3.5-6.0 และพบว่าการหมักซูโครสจะมีความว่องไวต่อการเปลี่ยนแปลง pH มากกว่าการหมักกลูโคส ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์อินเวอร์เทสมีการเปลี่ยนแปลงที่ pH ต่ำมากกว่า (Kosaric *et al*., 1983; Reed, 1983)

1.2.3.5 ออกซิเจน หน้าที่หลักของอากาศหรือออกซิเจนในการหมักเอทานอล คือ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในลูกโซ่การหายใจ นอกจากนั้นออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวรวมทั้งกรดโอลีอิก กรด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิโนลีอิกและเออร์กอสเตอรอล ซึ่งนอกจากช่วยส่งเสริมการเจริญภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของยีสต์แล้วยังเพิ่มความทนเอทานอลของยีสต์ด้วย กรดไขมันไม่อิ่มตัวและสเตอรอลจำเป็นในการทำให้การหมักเอทานอลดำเนินต่อไปหลังจากการเจริญของยีสต์หยุดลงแล้ว โดยเฉพาะในที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูง สารประกอบเหล่านี้ช่วยทำให้เซลล์ที่อยู่ในระยะพักตัวยังคงมีชีวิตและกระตุ้นความสามารถในการหมัก เมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนเซลล์จะสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวและสเตอรอลหลายชนิดสะสมไว้ และการที่เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์มีกรดลิโนลีอิกและเออร์กอสเตอรอลทำให้สภาพการซึมได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อเอทานอลเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสิ่งที่ตามมา คือ เซลล์ยอมให้มีการขนถ่ายเอทานอลออกไปจากเซลล์ นั่นก็คือ สภาพซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลภายในเซลล์จะลดต่ำลง แต่ถ้ายีสต์ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะไม่สร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวและสเตอรอลขึ้นมาเลย ดังนั้นในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนจึงจำเป็นต้องเติมสารเหล่านี้ลงไปเพื่อที่ยีสต์จะสามารถเจริญได้หลายชั่วรุ่น

ออกซิเจนมีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในขั้นตอนของการเตรียมกล้าเชื้อ (starter) โดยทั่วไปกล้าเชื้อที่ใช้สำหรับการหมักแบบแบตช์จะเป็นแอโรบิกสตาร์เตอร์ (aerobic starter) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีออกซิเจน และกึ่งมีออกซิเจน (semiaerobic) ยีสต์จะให้เซลล์ปริมาณสูง

เมื่อเติมอากาศจะทำให้ชีวมวลหรือเซลล์ยีสต์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากยีสต์จะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นในขณะที่การผลิตเอทานอลลดลง ทั้งนี้โดยการมีออกซิเจนช่วยส่งเสริม Pasteur effect ทำให้มีการออกซิเดชันของกลูโคสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ โดยมีการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำจากวงจรกรดไทรคาร์บอกซิลิกและลูกโซ่หายใจ ซึ่งเท่ากับ ออกซิเจนส่งเสริมการหายใจ สำหรับ Pasteur effect พบได้เฉพาะใน *Saccharomyces* แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะอยู่ในสภาพที่มีการเติมอากาศ การหายใจของยีสต์ก็ยังถูกควบคุมด้วยความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำให้ยีสต์ยังคงผลิตเอทานอลได้ถึงแม้จะมีการเติมอากาศ ในกรณีของยีสต์ขนมปังพบว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลแม้อยู่ในสภาพที่มีการเติมอากาศอย่างรุนแรง ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจะควบคุมปริมาณการหายใจอาจเรียกได้หลายชื่อ คือ Reverse Pasteur effect หรือ Counter-Pasteur effect หรือ Crabtree effect ซึ่งรูปหนึ่งของปรากฏการณ์ที่เดิมเคยเรียกว่า glucose effect และในปัจจุบันอธิบายว่าเป็นการกดดันแคแทบอไลต์ (catabolite repression) ที่เกิดขึ้นเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นระดับหนึ่งคือที่กลูโคสหรือซูโครสความเข้มข้นสูงกว่า 0.02-0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งพบว่าการหายใจเมื่อมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำตาลความเข้มข้นดังกล่าวถูกยับยั้งอย่างรุนแรง โดยถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ถึงแม้จะมีการเติมอากาศเต็มที่การหายใจจะเกิดได้เพียงประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ของอัตราที่เกิดภายใต้สภาวะที่มีเติมอากาศเต็มที่ และมีกลูโคสต่ำกว่า 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (สาวิตรี , 2549)

อิทธิพลของออกซิเจนต่อการหมักกลูโคสที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องสำหรับ *S. cerevisiae* NCYC 239 พบว่า ในสภาวะที่มีน้ำตาลเหลือในอาหารประมาณ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะมีออกซิเจนอิ่มตัว จะมีกลูโคสเพียง 6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่ถูกใช้เพื่อการหายใจ คือ เมแทบอลิซึมจะเป็นการหมักเอทานอลมากกว่าการหายใจเนื่องจากผลของ Crabtree effect ปรากฏการณ์นี้สามารถใช้อธิบายการหมักเวิร์ตในการผลิตเบียร์ จึงพบว่าผลผลิตเซลล์ยีสต์สูงสุด อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ความมีชีวิต และอัตราการหมักเอทานอลรวมเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมอากาศเพิ่มจนถึงระดับประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของออกซิเจนอิ่มตัว แต่เมื่อเติมออกซิเจนเพิ่มจนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ของออกซิเจนอิ่มตัวพบว่าไม่เพิ่มอัตราการหมักเอทานอลหรือปริมาณเอทานอลที่สร้างขึ้นไปอีก ผลชี้ว่ามี Crabtree effect มาก เนื่องจากในการหมักแบบแบตช์ปกติใช้น้ำตาลเริ่มต้นความเข้มข้นสูง แต่เมื่อปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของออกซิเจนอิ่มตัวผลผลิตเซลล์ยีสต์สูงสุด อัตราการเจริญจำเพาะ และอัตราการหมักเอทานอลรวมลดลงนั้น เนื่องจากอิทธิพลของออกซิเจนที่ทำหน้าที่เป็นสารอาหารที่จำกัดการเจริญ (growth limiting nutrient) ด้วยเช่นกัน (Kosaric *et al*., 1983; Reed, 1983)

1.2.3.6 คาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญและการหมักอย่างรุนแรงมากขึ้น เช่นเดียวกับเมื่ออาหารมี pH ต่ำ และมีเอทานอลความเข้มข้นสูง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ดูเหมือนจะมีผลยับยั้งต่อปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันเท่านั้น แต่ก็ยังพบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมบางอย่างของเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมได้ และการขนส่งตัวถูกละลาย ผลของความสัมพันธ์เหล่านี้ต่อการผลิตเอทานอลยังไม่มีผู้ใดรู้แน่ชัด (Kosaric *et al*., 1983; Reed, 1983)

1.2.3.7 ORP (Oxidation-reduction potential) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวัดแนวโน้มของสารละลายที่จะมีการให้หรือรับอิเล็กตรอน ซึ่งมีหน่วยเป็น มิลลิโวลต์ ค่า ORP ที่วัดได้อาจเป็นบวกหรือลบก็ได้ ถ้า ORP เป็นบวกแสดงว่า ตัวอย่างน้ำมีสารละลายที่แสดงแนวโน้มใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การรับอิเล็กตรอน ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาการย่อยของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในถังบำบัดน้ำเสีย เกิดขึ้นน้อย หรือมีออกซิเจนในน้ำทำให้ ORP มีค่าเป็นบวกหลายร้อยมิลลิโวลท์ เนื่องจากออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่ดี เป็นต้น สารรับอิเล็กตรอนเรียกว่า Oxidizing Agent หรือ Oxidant

ในกรณีที่ค่า ORP เป็นลบ แสดงว่า ตัวอย่างน้ำมีสารละลายที่แสดงแนวโน้มในการให้อิเล็กตรอน ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาการย่อยของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในถังบำบัดน้ำเสียทำงานได้ดี หรือน้ำเสียที่มีไซยาไนด์ (CN^-) จะมี ORP เป็นลบได้หลายร้อยมิลลิโวลท์ หรือในน้ำที่ไม่มีออกซิเจนละลาย มักจะพบว่ามีค่า ORP เป็นลบ ซึ่งเกิดจากไอออนซัลไฟด์หรือซัลไฟต์ เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จะเห็นได้ว่า ORP ไม่ได้แสดงค่าของสารให้หรือรับอิเล็กตรอนตัวใดตัวหนึ่ง หากแต่แสดงถึงผลรวมของสารที่ให้หรือรับอิเล็กตรอนทุกตัว กล่าวคือ ตัวอย่างน้ำอาจมีสารรับอิเล็กตรอนหลายชนิด และสารให้อิเล็กตรอนหลายชนิด ผลรวมของสารให้และรับอิเล็กตรอนอาจเป็นบวกหรือลบก็ได้ (มั่นสิน และ มั่นรักษ์, 2545)

Yang *et al*. (2007) ได้ศึกษาผลของการควบคุมค่า ORP ต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* โดยควบคุมค่า ORP ให้คงที่และสม่ำเสมอ (-50 mV, -100 mV, -150 mV, -230 mV) โดยการปรับความเร็วในการกวนและการให้อากาศอย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอล ซึ่งค่า ORP มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอล การสร้างกลีเซอรอล ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลืออยู่ ตะกอนเซลล์ยีสต์ เวลาในการหมัก และอัตราการตายของเซลล์ยีสต์ เมื่ออัตราการให้อากาศเพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราการตายของเซลล์ลดลงจนถึงระดับต่ำสุด ดังนั้นที่ค่า ORP ค่าหนึ่งจะลดอัตราการตายลง และทำให้เซลล์ยีสต์ใช้กลูโคสได้มากขึ้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงขึ้น โดยที่ควบคุมค่า ORP ที่ -150 mV จะให้การผลิตเอทานอลดีที่สุด และที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

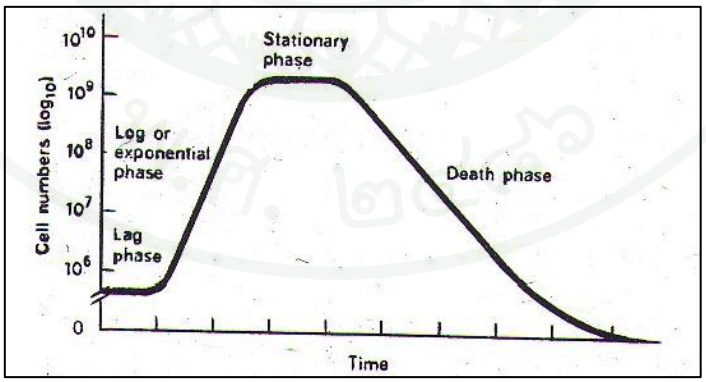
Kukec *et.al.* (2001) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า Redox potential ที่ได้จากกระบวนการหมักไวน์ โดยใช้น้ำองุ่น *Sauvignon blanc* ซึ่งในการทดลองได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบค่า Redox potential ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก กับ สารประกอบต่างที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก (ปริมาณออกซิเจน ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล ปริมาณกลีเซอรอล และค่า pH) โดยใช้อุณหภูมิต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ 15, 18 และ 24 องศาเซลเซียส พบว่า มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน ดังนั้น ค่า ORP สามารถบ่งบอกกิจกรรมของยีสต์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักไวน์ ทำให้สามารถควบคุมกระบวนการหมักได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lin *et al*. (2005) ได้ศึกษาการใช้ Redox potential ในการตรวจหากิจกรรมของจุลลินทรีย์ในระกว่างการผลิตกรด Clavulanic โดย *Streptomyces clavuligerus* พบว่าการผลิต Clavulanic acid (CA) ในอาหารเลี้ยงที่ถูกเขย่า เพิ่มขึ้นจาก 92 g/ml เป็น 180 g/ml เมื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทออกซิเจน (0.039 เป็น 0.058 s^{-1}) โดยการรักษาค่า Redox potential ไว้ที่ -250 mV ซึ่งค่า Redox potential มีความสัมพันธ์กับปริมาณ CA ที่ถูกผลิตขึ้น และยังสามารถใช้ค่า Redox potential ในการติดตามกิจกรรมต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักได้อีกด้วย

1.2.4 จลนศาสตร์ของการเจริญของยีสต์ (Growth kinetics of yeast) (วราวุฒิ, 2529 และ สาวิตรี, 2549)

การศึกษาการเจริญของยีสต์ ได้เพาะเลี้ยงจุนทรีย์หรือการหมักแบบแบตช์ ถือ ว่าเป็นระบบการเพาะเลี้ยงแบบปิด โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในสารอาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ ตลอดระยะที่เลี้ยงเชื้อไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่ม แต่อาจมีการเติมสารต่อต้านการเกิดฟอง และกรดหรือด่างเพื่อควบคุม pH องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของชีวมวล และความเข้มข้นของเมแทบอไลต์ มักมีการเปลี่ยนแปลงคงที่ เป็นผลจากเมแทบอลิซึมของเซลล์ เมื่อนำค่าประชากรเซลล์ที่มีชีวิตมาพล็อตกับเวลาจะได้กราฟแบบฉบับการเจริญแบบแบตช์ (Typical batch growth curve) ซึ่งประกอบด้วยระยะ (Phase) ต่าง ๆ คือ ระยะปรับตัว (Lag phase) ระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ระยะคงเดิม (Stationary phase) และระยะตาย (Death phase) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กราฟแบบฉบับการเจริญแบบแบตช์ (typical batch growth curve)

ที่มา: วราวุฒิ (2529)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) ระยะปรับตัว (Lag phase) เมื่อมีการย้ายจุลินทรีย์ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จำนวนจุลินทรีย์จะคงที่ในระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นช่วงสั้น ๆ หรือบางครั้งอาจยาวนานหลายชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม ภายในเซลล์แต่ละเซลล์จะมีการเตรียมพร้อมโดยมีการสังเคราะห์เอนไซม์ต่าง ๆ เพื่อเตรียมพร้อมที่จะแบ่งเซลล์ในระยะต่อไป โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เช่น อัตราการขยายขนาดสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ ดังนั้นขนาดของเซลล์จะใหญ่กว่าเซลล์ในระยะอื่น ๆ ระยะเวลาของ Lag phase ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สมบูรณ์ หรือมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลโดยตรงต่อ Lag phase และถ้ากล้าเชื้ออยู่ใน Log phase จุลินทรีย์เกือบจะไม่ต้องการ Lag phase เลย แต่ถ้ากล้าเชื้ออยู่ใน Stationary phase จะต้องการ Lag phase ค่อนข้างนาน นอกจากนี้แล้วปริมาณของกล้าเชื้อยังมีผลโดยตรงต่อ Lag phase ในทางปฏิบัตินิยมใช้ 5% แต่ถ้ากล้าเชื้อมีอายุน้อยเกินไป จะไม่ทนทานต่อการเปลี่ยนสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะความร้อน และสารเคมี ทำให้ต้องการ Lag phase ยาวนานกว่าปกติ

2) ระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) จำนวนเซลล์เริ่มเพิ่มขึ้นในอัตราเร็วคงที่ (Generation time คงที่) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม อัตราการเติบโต (Growth rate) จะมีค่าสูงสุดสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ ระยะนี้จะค่อนข้างสั้น เนื่องจากสารอาหารหมด โดยชนิดของสารอาหารมีผลต่อการเข้าสู่ Stationary phase เช่น เมื่อ *S. cerevisiae* ขาดแหล่งคาร์บอนจะเข้าสู่ Stationary phase

3) ระยะคงเดิม (Stationary phase) เป็นช่วงที่จำนวนเซลล์จะค่อนข้างคงที่ที่จุดสูงสุด ระยะนี้จะมีความสำคัญมากต่อขบวนการหมักเพื่อผลิตสารต่าง ๆ เช่น การหมักเอทานอล การหมักจะสิ้นสุดลงหลังจากที่ Viable cell ถึงจุดสูงสุดเล็กน้อย แต่กรณีของการผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน การสังเคราะห์เพนนิซิลินจะเริ่มเกิดขึ้นหลังจากถึง Stationary phase แล้ว

4) ระยะตาย (Death phase) เป็นระยะสุดท้ายในการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ ระยะนี้เซลล์จะตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากขาดแคลนสารอาหาร เกิดการสะสมของเสีย และสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม จนเซลล์ไม่สามารถเจริญได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 วัตถุดิบและวิธีการผลิตเอทานอล

1.3.1 อ้อย

อ้อย เป็นพืชที่ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์และไดแซ็กคาไรด์ ซึ่งทำให้การเตรียมซับสเตรตเพื่อนำไปหมักง่าย นอกจากนั้นการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยจะได้กากน้ำตาล และชานอ้อยเป็นผลผลิตพลอยได้ โดยที่กากน้ำตาลสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้เป็นอย่างดี ส่วนชานอ้อยสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในกระบวนการผลิตเอทานเอลได้ ช่วยให้ต้นทุนในส่วนของพลังงานลดลง (Zaldivear *et al.,* 2001)

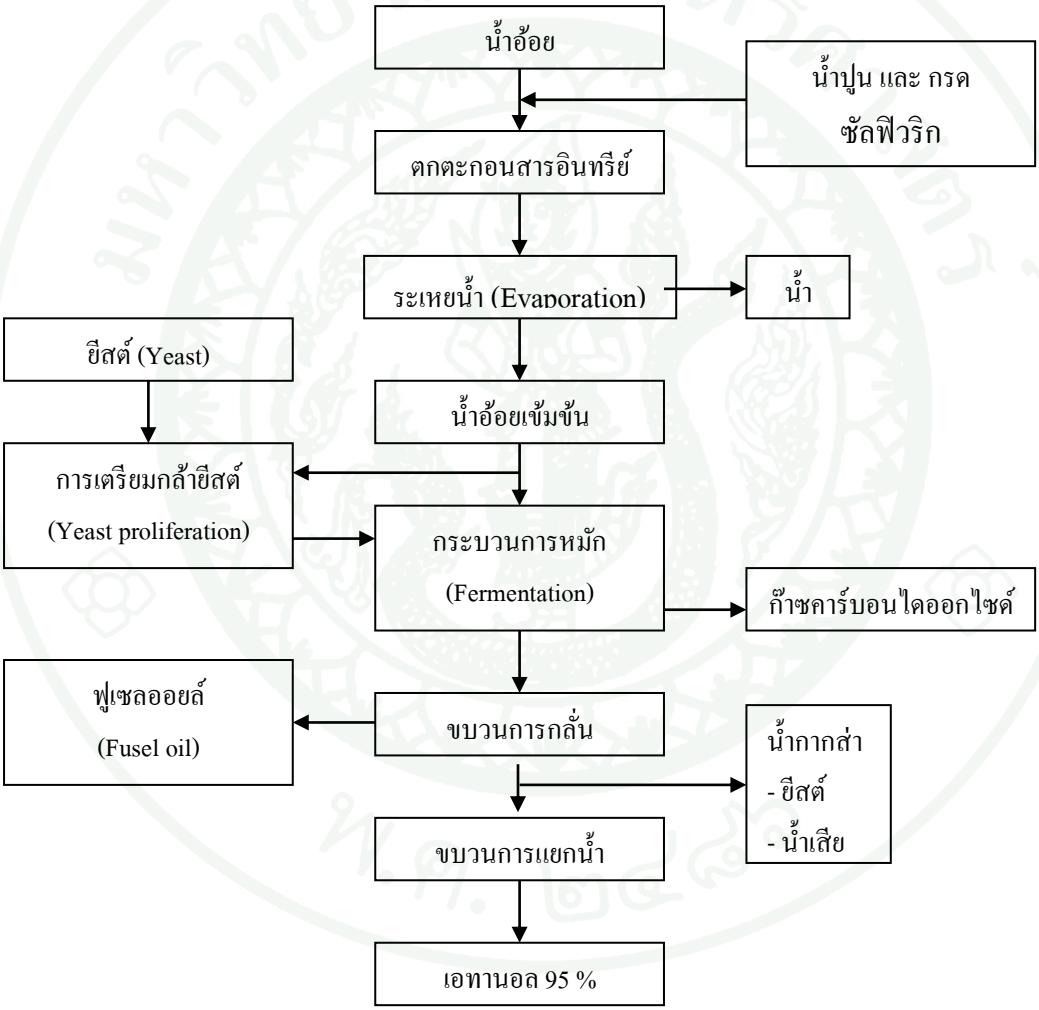
การหมักน้ำอ้อยให้เป็นเอทานอล ทำได้โดยนำน้ำอ้อยที่คั้นได้มาทำให้ใสด้วยการใส่น้ำปูน และกรดซัลฟิวริกเพื่อตกตะกอนสารอนินทรีย์ ผลที่ได้หลังจากตกตะกอนจะเป็นของเหลวสีเขียวมีลักษณะเหนียวข้นกว่าน้ำเล็กน้อย และมีซูโครสเป็นองค์ประกอบประมาณ 12-13 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้องการนำมาใช้ในการหมักเอทานอล อาจทำให้เข้มข้นสูงถึงระดับที่ต้องการโดยการระเหยน้ำออก ข้อเสียของการใช้น้ำอ้อยเพื่อผลิตเอทานอล คือ น้ำอ้อยนั้นเสียง่ายเก็บได้ไม่นาน

ศุภนิตย์ และคณะ (2536) ได้ทำการทดลองหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยซึ่งกำจัดเชื้อโดยวิธีต่าง ๆ คือ (1) การใช้หม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที (2) การต้มเดือดนาน 20 นาที (3) การเติมสารโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ 200 ppm (4) การนึ่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และน้ำอ้อยสดที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดเชื้อ โดยการหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ Y23 เป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยที่ผ่านการเตรียมโดยทั้งสี่วิธีนั้นลดลงจากปริมาณที่มีอยู่เดิม ส่วนเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ซึ่งเตรียมโดยสี่วิธีดังกล่าวเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหมัก ทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่ 37 องศาเซลเซียส แต่เพิ่มขึ้นช้ากว่าน้ำอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดเชื้อซึ่งให้เอทานอลสูงในการหมัก 3 วันแรก หลังจากนั้นเอทานอลจะไม่เพิ่มขึ้นอีก การเตรียมน้ำอ้อยทั้งสี่วิธีนั้นวิธีการต้มเดือดน้ำอ้อยนาน 20 นาทีก่อนนำไปหมัก ให้เอทานอลสูงกว่าวิธีอื่น และสูงกว่าน้ำอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดเชื้อ

ปราโมทย์ และคณะ (2536) ทำการศึกษาการหมักเอทานอลโดยใช้น้ำอ้อย ซึ่งทดลองหมักในถังหมักขนาด 10 ลิตร (Eyela M200) โดยไม่เติมสารอาหารเลย ปรากฏว่าอัตราการหมักรวดเร็วมาก สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดคือ 10.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และน้ำอ้อยที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 17.8 เปอร์เซ็นต์ ลดลงเหลือ 0.2 เปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดการหมัก โดยปริมาณยีสต์เพิ่มจาก 1.7×10^7 เป็น 2.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมง และ pH ลดลงจาก 5.0 เหลือ 4.0 ซึ่งผลการหมักนี้ไม่แตกต่างกับการหมักที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอย่างละ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักกากน้ำตาลซึ่งเติมสารอาหารในปริมาณที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.04 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำอ้อยสามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่ากากน้ำตาลและมีน้ำตาลเหลือตกค้างน้อยกว่า



ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตเอทานอลจากอ้อย

ที่มา: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ (2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3.2 กากน้ำตาล

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยนั้น เริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบได้น้ำอ้อย กรองเอากากออกจากน้ำอ้อยแล้วเคี่ยว น้ำอ้อยจนได้ผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมา แยกผลึกน้ำตาลทรายด้วยหม้อปั่น (centrifuge) ผลพลอยได้ที่สำคัญจาก การผลิตน้ำตาลทรายด้วยวิธีนี้ได้แก่ กากน้ำตาล ขี้ตะกอน (filter cake) และกากอ้อย (bagasses)

กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ที่มีคุณค่ามากที่สุด เป็นส่วนของของเหลวที่เหลือหลังจากการแยกเอาผลึกของน้ำตาลออกแล้วมีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึก ในการผลิตน้ำตาลทรายนั้นจะมีกากน้ำตาลซึ่งเป็น ผลพลอยได้เกิดขึ้นประมาณ 4 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามกรรมวิธีใน การผลิตน้ำตาลทราย คือ

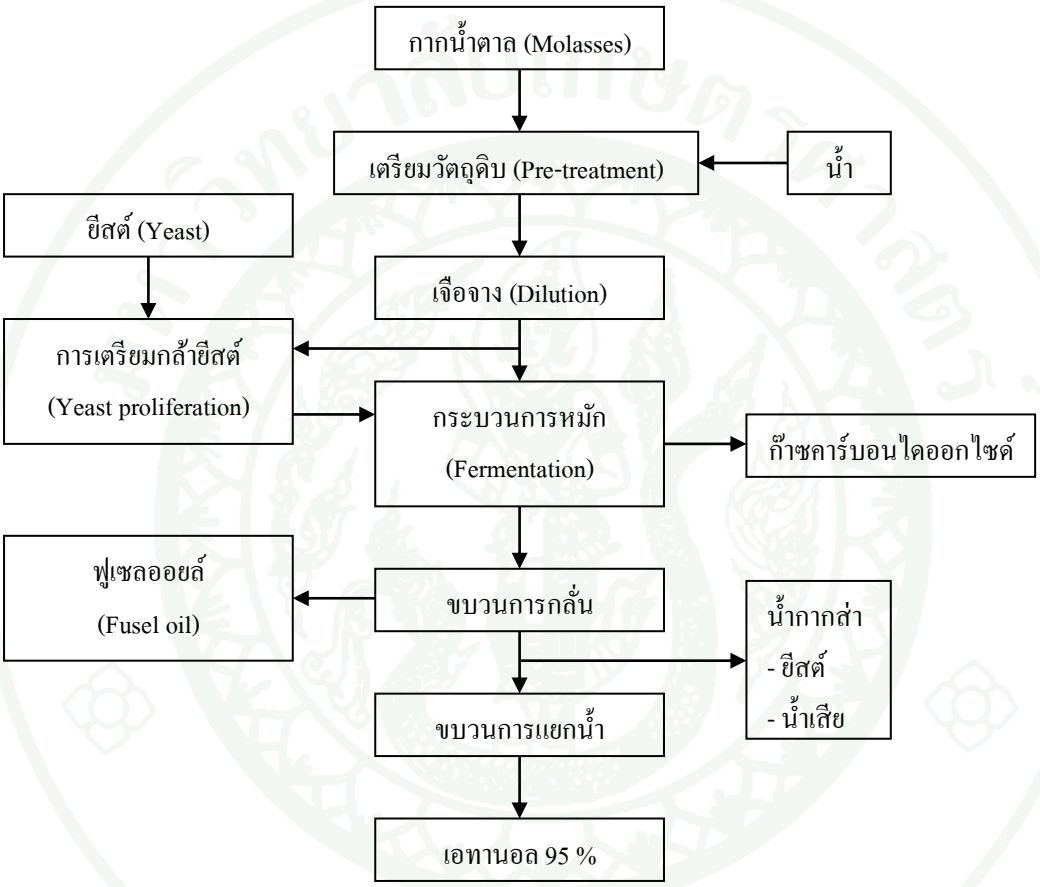
1.3.2.1 black strap molasses เป็นส่วนที่เหลือหลังจากตกผลึกซูโครสออกจากน้ำอ้อยที่ผ่านกรรมวิธีแล้วเป็นของเหลวที่มีลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลเข้ม มีองค์ประกอบแตกต่างกันไปตามแหล่งผลิต โดยทั่วไปเป็นคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 50-60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งประกอบด้วยซูโครส 30-40 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 4-9 เปอร์เซ็นต์ และฟรุกโทส 5-12 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นมีสารรีดิวซ์อื่น ๆ 1-5 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ 2-5 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 7-15 เปอร์เซ็นต์ สารประกอบไนโตรเจน 2-6 เปอร์เซ็นต์ กรดที่ไม่มีไนโตรเจน 2-8 เปอร์เซ็นต์ มี pH 5-6 นอกจากนั้นสำหรับการิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลในประเทศไทย พบว่ามีแคลเซียม 1.38 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียม 0.50 เปอร์เซ็นต์ (ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา, 2546)

1.3.2.2 refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการตกผลึกครั้งที่สองเพื่อผลิตเป็นน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีน้ำตาลประมาณ 58 เปอร์เซ็นต์

1.3.2.3 high-test molasses คือ น้ำอ้อยดิบซึ่งทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยน้ำออก ซึ่งจะมีน้ำตาลทั้งหมด 78 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนการนำมาใช้ในการหมักเอทานอลนั้นทำได้ง่าย โดยการเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลตามที่ต้องการ แต่เนื่องจากกากน้ำตาลไม่ได้มีสารอาหารทั้งหมดที่ยีสต์ต้องการ ดังนั้นในการนำมาใช้ผลิตเอทานอลจึงต้องเติมสารอาหารบางอย่าง เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตหรือแอมโมเนียมฟอสเฟต เพื่อแก้ปัญหาการขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส สำหรับ pH ที่ใช้ในการหมักมักปรับให้ได้ pH 4-5 ด้วยกรดซัลฟิวริก (Paturau, 1969)



ภาพที่ 3 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

ที่มา: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ (2549)

อนันต์ (2545) พบว่า ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 โดยใช้การหมักแบบ batch และ fed batch พบว่าการหมักแบบ batch เข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลิตเอทานอล คือ 21 องศาบริกซ์ ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด คือ 57.75 กรัมต่อลิตร ผลได้ (yield) 0.42 และอัตราผลผลิตเอทานอล (productivity) 1.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการหมักแบบ fed batch เข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล คือ 21 องศาบริกซ์ ให้ความเข้มข้นเอทานอล 49.77 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.25 และ อัตราผลผลิต 1.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ปริษฎางค์ (2547) พบว่าจากการศึกษาการปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยด้วย *Saccharomyces* cerevisiae SKP1 โดยใช้กล้าเชื้อ *S.* cerevisiae SKP1 อายุ 12 ชั่วโมง การเลี้ยงเชื้อแบบ batch ในอาหาร BSM medium ที่มีกากน้ำตาลคิดเป็นปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นต่างๆกัน และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ

ปนิดา (2546) ได้ศึกษาการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตกตะกอน พบว่า *S. cerevisiae* M30 เป็นยีสต์ตกตะกอนที่สามารถให้ผลการผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *S. cerevisiae* SC90 นอกจากนี้สายพันธุ์ *S. cerevisiae* M30 ยังหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 37 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส และได้ศึกษาต่อถึงอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* M30 ในระดับ flask พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารกากน้ำตาลที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์ และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยควบคุมอุณหภูมิการหมักไว้ที่ 33หรือ 35 องศาเซลเซียส ที่ pH เริ่มต้น 4.5 จะได้เอทานอล 9.66 และ 8.57 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักเอทานอลโดยสายพันธุ์ M30 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรยังคงพบว่าอุณหภูมิในการหมักที่เหมาะสมเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส โดยได้เอทานอล 8.91 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

1.3.3 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (*Monihot esculenta*) มีชื่อเรียกหลายชื่อ คือ cassava, manioc หรือ tapioca เป็นพืชที่เพาะปลูกมากในประเทศเขตร้อน โดยมีประเทศบราซิล อินโดนีเซีย และแซร์ เป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุด หัวมันสำปะหลังประกอบด้วยแป้ง 20-35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และโปรตีน 1-2 เปอร์เซ็นต์ ข้อดีของการใช้หัวมันสำปะหลังสำหรับการผลิตเอทานอล คือ ให้ผลผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอทานอลต่อพื้นที่เพาะปลูกสูง เนื่องจากเพาะปลูกได้ในดินคุณภาพต่ำ ดังนั้นจึงมีพื้นที่ปลูกได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอ้อย มันสำปะหลังทนต่อโรคดังนั้นจึงปลูกได้ง่าย หัวมันสำปะหลังก่อนการเก็บเกี่ยวสามารถปล่อยทิ้งไว้ในดินได้หลายเดือนจนกว่าจะต้องการใช้ มันเส้นสามารถทำให้แห้งได้ง่าย และสามารถเก็บได้นานถึงปีเมื่อมีความชื้นลดเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ การใช้เอนไซม์ย่อยแป้งสามารถเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล โดยมีผลผลิตการเปลี่ยน (conversion yield) สูงจากต้นทุนที่ไม่สูงจนเกินไป และในการหมักปริมาณมาก ๆ นั้นไม่จำเป็นต้องเติมกรดหรือธาตุอาหาร (National Research Council, 1983)

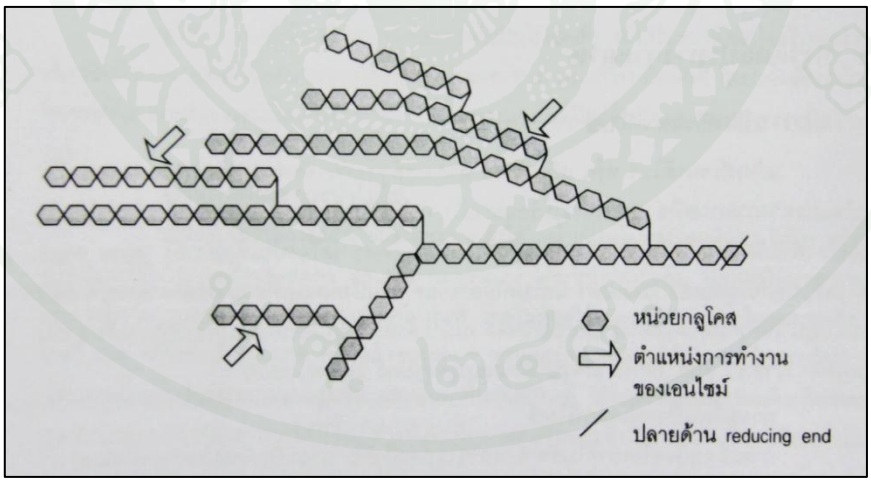
ข้อได้เปรียบของการใช้มันสำปะหลัง และพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ เมื่อเทียบกับอ้อย คือ มีส่วนประกอบที่หมักเป็นเอทานอลได้มากกว่า ส่วนข้อเสียเปรียบ คือ จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนนำไปหมักเอทานอล เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ผลิตเอทานอลไม่มีความสามารถในการใช้และหมักแป้ง ดังนั้นต้องมีขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยการใช้เอนไซม์หรือการใช้สารเคมี (กรด) และจากน้ำตาลที่ได้จึงใช้ยีสต์หมักเป็นเอทานอล สำหรับการเตรียมน้ำตาลจากแป้งนั้นทำโดยใช้เอนไซม์อัลฟา-อะมัยเลส และกลูโคอมัยเลส โดยอัลฟา-อะมัยเลส ที่นิยมใช้ คือ เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* และ*B. licheniformis* ซึ่งอัลฟา-อะมัยเลสที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังเริ่มจากการนำหัวมันมาชั่งน้ำหนัก ล้าง และปอกเปลือก จากนั้นเตรียมเป็นมันบดหรือแม็ช (mash) ส่วนหนึ่งของมันบดนั้นอาจนำไปผ่านไอน้ำและทำให้แห้งจะได้เป็นมันเส้นที่สามารถเก็บได้นานเป็นปี โดยแป้งสูญเสียไปเพียงเล็กน้อยและสารไซยาโนจีนิก กลูโคไซด์ (cyanogenic glucoside) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีอยู่ในมันสำปะหลังบางสายพันธุ์นั้นจะไม่ก่อให้เกิดปัญหาเพราะจะถูกทำลายด้วยความร้อนขณะที่ผ่านไอน้ำในระหว่างกระบวนการทำให้มันบดสุก ในการย่อยแป้งเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลจะต้องผ่านกระบวนการย่อย 2 ขั้นตอน คือการย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (Liquefaction) และขั้นตอนที่สอง คือ การย่อยแป้งครั้งที่สองเพื่อเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาลหรือการทำให้หวาน (Saccharification)

การย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (Liquefaction) ทำโดยการต้มให้ความร้อนจนแป้งเกิดการเจลาติไนซ์ (Gelatinization) กล่าวคือ เม็ดแป้งจะเกิดการพองตัวและสามารถจับกับน้ำได้ดีมากขึ้น โครงสร้างแป้งจะมีความแข็งแรงลดลง ทำให้แป้งมีความหนืดสูงขึ้น จากนั้นโมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟาอะมิเลส (α-amylase) ดังแสดงใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 4 โดยเอนไซม์ α-amylase จะทำหน้าที่ในการย่อยพันธะแอลฟา (1,4) ภายในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม (Endo-acting enzyme) ทำให้โมเลกุลของแป้งสั้นลงส่งผลให้ความหนืดของสารละลายลดลงอย่างรวดเร็ว การเติมเอนไซม์ลงในกระบวนการจะต้องมีความเข้มข้นที่เหมาะสม ถ้าไม่เพียงพอจะทำให้การย่อยไม่สมบูรณ์และใช้เวลานาน โดยทั่วไปในการเติมเอนไซม์ชนิดนี้ จะเติมลงไปก่อนที่อุณหภูมิจะสูงขึ้นจนเกิดการเจลาติไนซ์ (Gelatinize) เพื่อให้เกิดการผสมที่ดีระหว่างแป้งกับเอนไซม์ โดยอุณหภูมิที่แป้งจะเกิดการเจลลาติไนซ์ อยู่ที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของแป้ง) ช่วงอุณหภูมิที่ใช้จะต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสม (ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์) เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างมีประสิทธิภาพและสมบูรณ์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้จะได้แป้งโมเลกุลขนาดเล็กและเด็กซ์ทริน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยในครั้งแรก จะมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (Dextrose Equivalent ; DE ซึ่งเป็นค่าสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อคิดเทียบกับน้ำตาลกลูโคสต่อปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด) ประมาณ 20 กลุ่มเอนไซม์เพื่อการย่อยครั้งแรกเป็นเอนไซม์ประเภท Endo-enzyme คือ เป็นเอนไซม์ที่ทำงานหรือเกิดกิจกรรมภายในโมเลกุลของแป้ง ทำให้แป้งถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลขนาดย่อม ๆ หรือเล็ก ๆ เท่า ๆ กันในระยะเวลาอันรวดเร็ว เกิดเป็นของเหลวที่มีความหนืดต่ำ และมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรสประมาณ 20 ทำให้โอกาสที่แป้งจะจับตัว เนื่องจากเกิดการจัดเรียงตัวใหม่เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง (Retrogradation) เป็นไปได้ต่ำ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ แอลฟาอะมิเลส

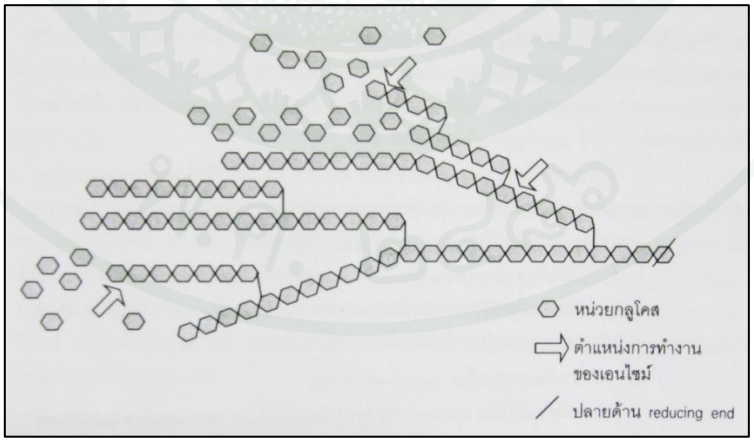


ภาพที่ 4 การทำงานของเอนไซม์ α-amylase

ที่มา: กล้าณรงค์ และเกื้อกลู (2543)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายเป็นน้ำตาลหรือการทำให้หวาน (Saccharification) จะเป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็ก หรือเด็กซ์ทรินให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยจะลดอุณหภูมิจาก 90 องศาเซลเซียส เหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งในขั้นตอนนี้จะอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มกลูโคอะไมเลสเพื่อที่จะย่อยแป้งโมเลกุลเล็กและเด็กซ์ทรินให้เป็นน้ำตาลที่หมักได้ เวลาในการย่อยจะนานกว่ากระบวนการย่อยในครั้งแรก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ รวมทั้งสภาวะในการย่อย ในการผลิตน้ำตาลกลูโคสเพื่อที่จะทำเป็นวัตถุดิบของการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องต่อไป เช่น น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลซอร์บิทอล จำเป็นต้องใช้น้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่สูง การย่อยจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ประเภท Exo-enzyme จากภาพที่ 5 แสดงการทำงานของเอนไซม์ประเภท Exo-enzyme ที่ย่อยพันธะจากภายนอกเข้ามาและสามารถย่อยพันธะได้ทั้ง แอลฟา (1,4) และแอลฟา (1,6) เอนไซม์ดังกล่าวคือ กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) หรือ อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus* ลักษณะของเอนไซม์ทางการค้า คือ มีความสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 55 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์) ค่า pH ประมาณ 4-9 (ค่า pH ที่เหมาะสมคือ 4.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์) ไม่ต้องการแคลเซียมในการทำกิจกรรม โดยทั่วไปเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยได้ทั้งพันธะแอลฟา (1,4) และพันธะแอลฟา (1,6) แต่การเกิดกิจกรรมการย่อยที่พันธะแอลฟา (1,6) จะเกิดได้ช้ากว่าพันธะแอลฟา (1,4) ดังนั้นในการย่อยอาจจะมีการเติมเอนไซม์อีกจำพวกคือ เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (Debranching Enzyme) ซึ่งสามารถย่อยพันธะแอลฟา (1,6) ได้ เอนไซม์จำพวกนี้ได้แก่ Pullulanase และ Iso-amylase



ภาพที่ 5 การทำงานของเอนไซม์ Glucoamylase

ที่มา: กล้าณรงค์ และเกื้อกลู (2543)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมการการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์ (Ingledew, 1999)

$$C_6H_{10}O_5 + H_2O \xrightarrow{\text{เอนไซม์}} C_6H_{12}O_6$$

แป้ง 1 โมเลกุล	น้ำ 1 โมเลกุล	กลูโคส 1 โมเลกุล
(162 กรัม)	(18 กรัม)	(180 กรัม)

สมการการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลด้วยยีสต์ (Ingledew, 1999)

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$

กลูโคส 1 โมเลกุล	เอทานอล 2 โมเลกุล	คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล
(180 กรัม)	(2 x 46 = 92 กรัม)	(2 x 44 = 88 กรัม)

ชลดา (2546) ได้ศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 89.2 กรัมต่อลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ปริมาตร 5 ลิตร ที่บรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิขณะหมักเท่ากับอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน โดยเพาะเซลล์ยีสต์เริ่มต้นจำนวน 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับหมัก ผลการทดลองพบว่ายีสต์ใช้น้ำตาลรวดเร็วในช่วง 18 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีการใช้น้ำตาลน้อยมาก น้ำตาลที่เหลือเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่กลูโคส เช่น โอลิโกแซ็กคาไรด์ หรือ เซลโลไบโอส โดยให้เอทานอลสูงสุด 4.91 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 93.6 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี อย่างไรก็ตามหากต้องการหมักให้ได้เอทานอลสูงขึ้นควรเพิ่มปริมาณกลูโคสเริ่มต้นให้สูงขึ้น โดยการเพิ่มปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือใช้เอนไซม์เซลโลไบเอสร่วมด้วยในขั้นตอนการย่อยเพื่อให้แป้งและเส้นใยในกากมันสำปะหลังถูกย่อยได้เป็นน้ำตาลกลูโคสอย่างสมบูรณ์ ซึ่งการใช้เอนไซม์ หรือพลังงานอื่นในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล เป็นข้อเสียของการใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล เพราะทำให้ต้นทุนโดยรวมของเอทานอลสูงขึ้น แม้ว่ามันสำปะหลังจะมีราคาไม่แพงก็ตาม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธันยาภรณ์ (2548) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันเส้นโดยกระบวนการหมักแบบปกติ (Conventional Fermentation, CF) คือ ขั้นตอนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล และขั้นตอนการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอล ในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลนั้นจะประกอบด้วยการย่อย 2 ครั้ง คือ การย่อยแป้งครั้งแรก (Liquefaction) และการย่อยแป้งครั้งที่สอง (Saccharification) จากนั้นหมักด้วยยีสต์ เปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) คือ ประกอบด้วยกระบวนการย่อยแป้งครั้งแรก และจากนั้นนำเอนไซม์ผสมกับยีสต์แล้วหมักพร้อมกัน โดยในกระบวนการหมักแบบ CF จะเตรียมส่วนผสมของมันเส้น (ปริมาณแป้งร้อยละ 80 โดยน้ำหนักแห้ง) เข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนักแห้ง ทำการย่อยครั้งแรกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (Termamyl120L, เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักแห้ง) ที่ค่า pH 6.5 อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และทำการย่อยครั้งที่สองด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG300L, เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักแห้ง) ที่ค่า pH 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ได้ตัวอย่างที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 24 องศาบริกซ์ และค่าสมมูลเด็กซ์โทรส 90-95 จากนั้นหมักด้วยยีสต์ ส่วนกระบวนการหมักแบบ SSF หลังจากย่อยครั้งแรกด้วยเอนไซม์ Termamyl120L แล้วจะนำส่วนผสมที่ได้มาผสมกับเอนไซม์ Rhizozyme™ หรือ AMG300L (ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักมันเส้นแห้ง) และยีสต์ จากผลการทดลองพบว่าผลได้ของเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบ CF กระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเอนไซม์ Rhizozyme™ และกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเอนไซม์ AMG300L เท่ากับ 0.521, 0.523 และ 0.488 กรัมเอทานอลต่อกรัมแป้ง ตามลำดับ และร้อยละประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 84, 84 และ 78 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลได้ทางทฤษฎี อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากมันเส้นแบบ SSF ด้วยเอนไซม์ AMG300L นั้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการทำ Pre-saccharification นาน 2 ชั่วโมงพบว่าผลได้ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นด้วยกระบวนการหมักแบบ CF และ SSF ที่ผ่านการ Pre-saccharification มีค่าเท่ากับ 0.565 และ 0.557 กรัมเอทานอลต่อกรัมแป้ง และประสิทธิภาพเท่ากับ 91 และ 90 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลได้ทางทฤษฎี ดังนั้น กระบวนการหมักแบบ SSF สามารถผลิตโดยให้ผลได้และประสิทธิภาพใกล้เคียงกับกระบวนการหมักแบบปกติ สามารถช่วยลดเวลาและพลังงานในขั้นตอนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลส่งผลทำให้ต้นทุน การผลิตลดลง

มาโนช (2546) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* โดยใช้น้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ แอลฟา-อะไมเลส และอะไมโลกลูโคซิเดส ในระดับขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร ทำการศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรีย

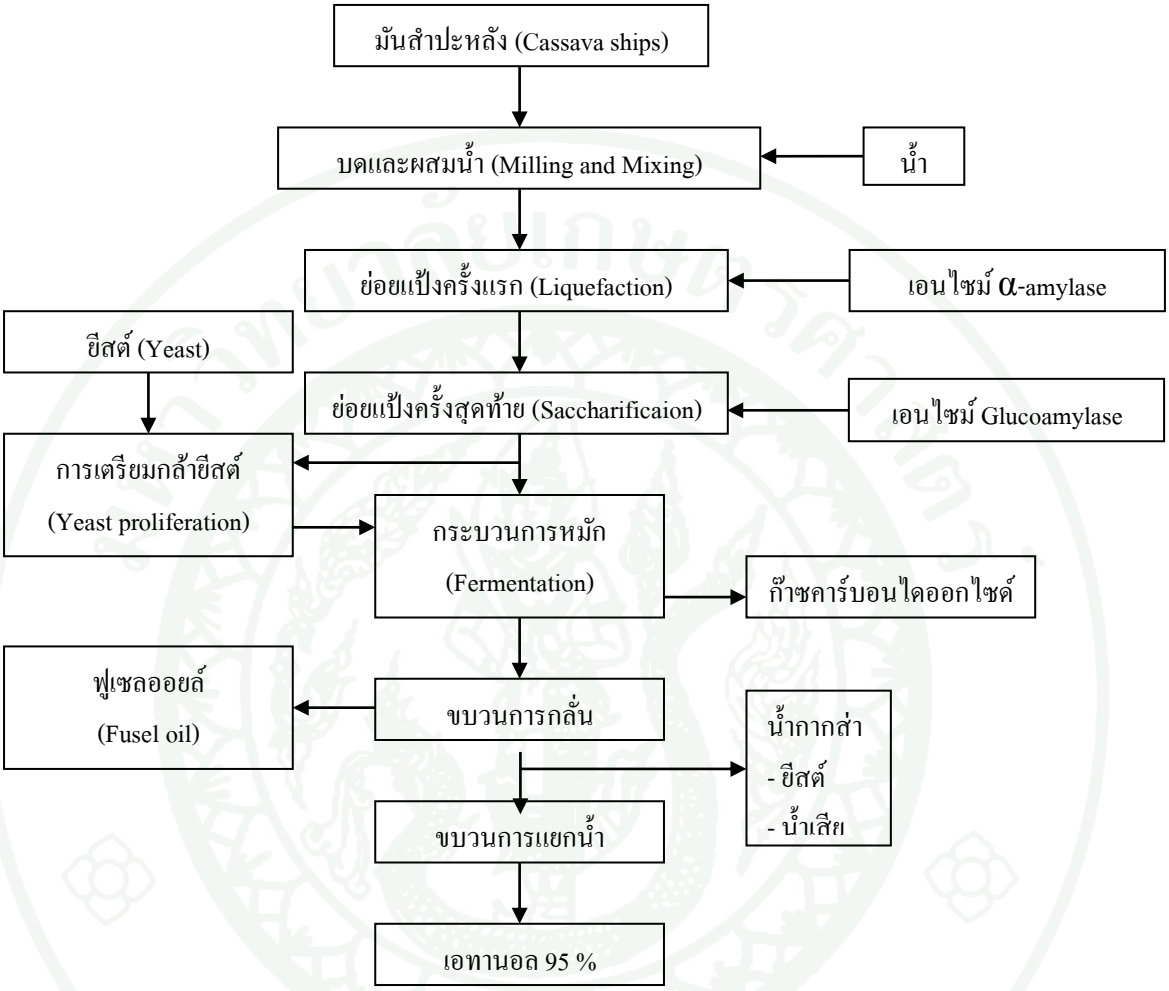
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Z. mobilis และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดม และการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ และการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ พบว่าแบคทีเรียที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลคือแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 สำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลคือการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งจะให้ผลได้ของเอทานอลเท่ากับ 0.463 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป สำหรับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ พบว่าการใช้เกลือ NH_4Cl ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดคือ 0.419 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ พบว่าการใช้ความเร็วรอบของใบกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.444 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป และการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ10 (โดยปริมาตร) จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.412 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป สำหรับการผลิตเอทานอลในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คงที่ พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คงที่เท่ากับ 5.5 จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.481 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปในขณะที่การหมักแบบกึ่งกะ พบว่าการเติมน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง จะให้เอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 71.70 กรัมต่อลิตร

Tao *et al.* (2005) ได้ทำการทดลองผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* ที่กลายพันธุ์จากสายพันธุ์เดิมให้มีคุณสมบัติที่สามารถทำงานได้ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดสูง โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกระบวนการหมัก 3 สภาวะ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดสูง (pH 4.5) ดังนี้ 1) การหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ 2) การหมักภายใต้สภาวะที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง และ 3) การหมักภายใต้สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อโดยการ Autoclave พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ และภายใต้สภาวะทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองให้ปริมาณเอทานอลเท่ากัน คือ 73.1 กรัม/ลิตร ในขณะที่การหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อและภายใต้สภาวะที่มีการฆ่าเชื้อโดยการ Autoclave พบว่า การหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการฆ่าเชื้อจะให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 70.3 กรัม/ลิตร เป็น 73.2 กรัม/ลิตร และมีปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่ลดลงจาก 5.3 กรัม/ลิตร เป็น 1.3 กรัม/ลิตร ในระยะเวลาการหมัก 40 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เห็นว่าการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* นอกจากจะเพิ่มปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ให้มีปริมาณสูงขึ้นแล้วยังสามารถช่วยประหยัดพลังงานที่สูญเสียไปในกระบวนการฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

ที่มา: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ (2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ถังหมักเอทานอล

หน้าที่สำคัญของถังหมัก ได้แก่ การทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการ การออกแบบถังหมักเพื่อใช้ในกระบวนการหมักแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปจะต้องมีสมบัติพื้นฐาน ดังนี้

1) มีความแข็งแรง ทนความร้อนและความดันได้สูง
2) มีระบบการให้อากาศและระบบการกวนผสมที่ดี
3) มีระบบควบคุมอุณหภูมิ
4) มีระบบควบคุม pH
5) มีระบบควบคุมฟองที่เกิดขึ้น
6) มีที่เก็บตัวอย่างจากถังหมักได้สะดวกโดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
7) มีการสูญเสียเนื่องจากการระเหยจากถังหมักได้น้อย
8) มีรูปแบบการควบคุมการทำงาน การเก็บเกี่ยวผลผลิต การทำความสะอาด และการบำรุงรักษาง่าย ใช้แรงงานน้อย
9) ควรใช้กับกระบวนการหมักได้หลายชนิด
10) ด้านในของถังหมักควรมีผิวเรียบ
11) อยู่ในสภาพปลอดเชื้อในขณะใช้งานได้เป็นเวลานาน
12) ทนต่อการกัดกร่อนและไม่เป็นพิษ
13) ทำจากวัสดุราคาถูกที่สุด แต่ต้องมีคุณภาพตามต้องการ

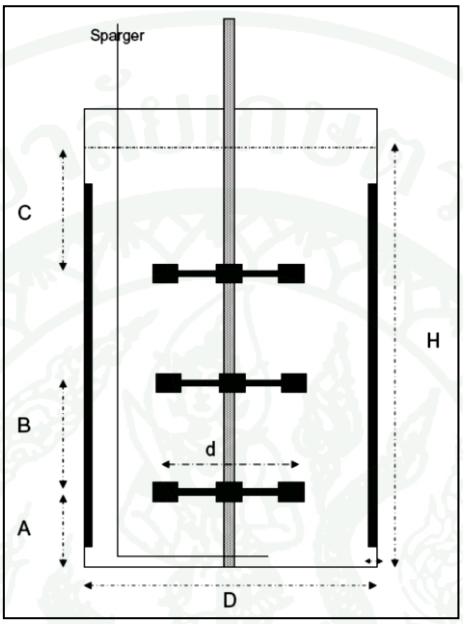
2.1 ส่วนประกอบของถังหมักเอทานอล

2.1.1 ตัวถังหมัก (Fermentation vessels)

โดยทั่วไปปริมาตรที่ใช้งาน หมายถึงปริมาตรรวมของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งรวมทั้งจุลินทรีย์และอากาศที่แทรกตัวอยู่ จะเหลือส่วนว่างด้านบนไว้สำหรับกักอากาศและฟองที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก ซึ่งปริมาตรใช้งานของถังหมักสามารถใช้งานได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรของถังหมักทั้งหมด (Total volume)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยปกติขนาดของตัวถัง (Vessel) ของถังหมักจะมีอัตราส่วนของส่วนสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง (H/D) เท่ากับ 1-3 รูปทรงของตัวถังมักเป็นรูปทรงกระบอกทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) ก้นถังจะเป็นแอ่งทรงกลม (Dish end) ซึ่งจะทำให้ของเหลวไหลออกได้ง่ายและไม่ตกค้าง



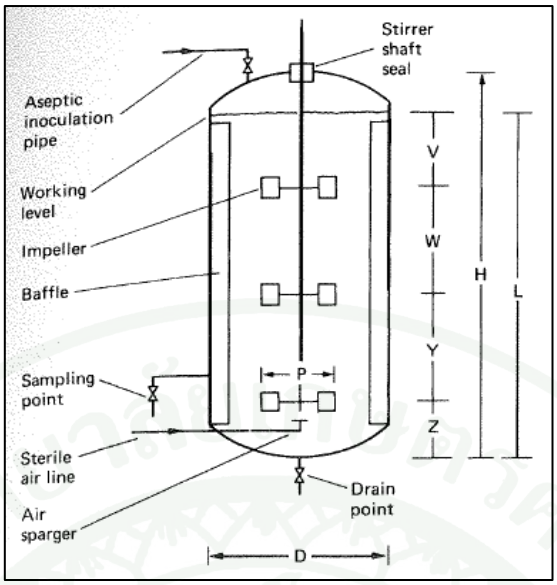
ภาพที่ 7 รูปแบบมาตรฐานของถังหมักทั่ว ๆ ไป

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

จากภาพที่ 7 คือ รูปแบบมาตรฐานของถังหมักทั่ว ๆ ไป แสดงอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ H/D = 1-3:1, d/D = 0.33-0.50:1, A/d = 0.5:1, B/d = 1:1, C/d = 0.5-1.0:1 โดยที่ d = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดกวน, D = เส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมัก, A = ระยะห่างจากก้นถังถึงใบพัดกวน, B = ระยะห่างระหว่างใบพัดกวนของแต่ละอัน, C = ระยะห่างระหว่างใบพัดกวนบนสุดกับของระดับของเหลว, H = ความสูงของถังหมักจนถึงระดับของเหลว

และจากภาพที่ 8 คือ รูปแบบของถังหมักที่ประกอบด้วย 3 ใบพัดกวนซึ่งแสดงอัตราส่วนต่าง ๆ ดังตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 รูปแบบของถังหมักที่ประกอบด้วย 3 ใบพัดกวน

ที่มา: Stanbury *et al.* (1999)

ตารางที่ 2 อัตราส่วนต่าง ๆ ของถังหมักที่ประกอบด้วย 3 ใบพัดกวน

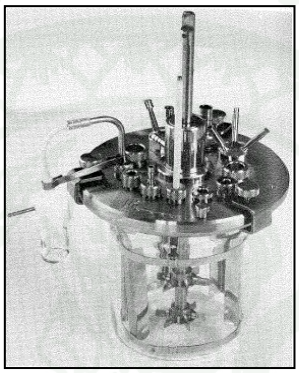
Dimension	Jackson (1958)	Aiba *rt al.* (1973)	Paca *et al.* (1976)
Operating volume	–	100,000 dm^3 (total)	170 dm^3
Liquid height (L)	–	–	150 cm
L / D (tank diameter)	–	–	1.7
Impeller diameter	0.34 – 0.5	0.4	0.33
Baffle width / D	0.08 – 0.1	0.095	0.098
Impeller height / D	0.5	0.24	0.37
P / V	0.5 – 1.0	–	0.74
P / W	0.5 – 1.0	0.85	0.77
P / Y	0.5 – 1.0	0.85	0.77
P / Z	–	2.1	0.91
H / D	1.0 – 1.6	2.2	2.95

ที่มา : Stanbury *et al.* (1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

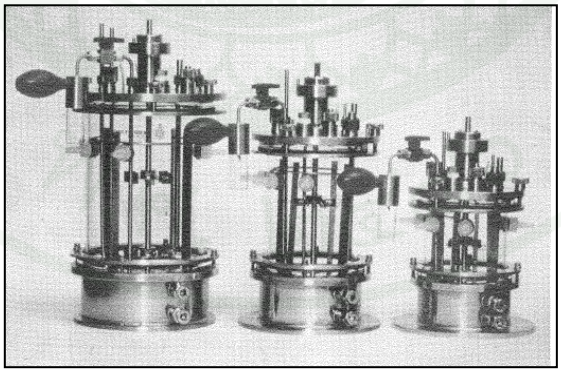
วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการใช้สร้างถังหมักต้องสามารถทนต่อความร้อน และความดันในการฆ่าเชื้อได้เป็นอย่างดี สำหรับถังหมักขนาดเล็ก วัสดุที่นิยมใช้ได้แก่ แก้ว และเหล็กกล้าไร้สนิม ตัวถังหมักมี 2 แบบ คือ

1) ตัวถังที่ทำจากแก้วและด้านล่างของถังเป็นแบบโค้ง (round bottom) หรือแบบแบน (flat bottom) ส่วนด้านบนเป็นแผ่น (top plate) ซึ่งทำจากเหล็กกล้าไร้สนิมยึดติดอยู่กับตัวถังแก้วด้วยน็อต ถังหมักแบบนี้มักมีเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่สุดไม่เกิน 60 เซนติเมตร (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ตัวอย่างของถังหมักขนาดเล็กทำด้วยแก้วและด้านบนเป็นเหล็กกล้าไร้สนิม

ที่มา: Stanbury *et al.* (1999)



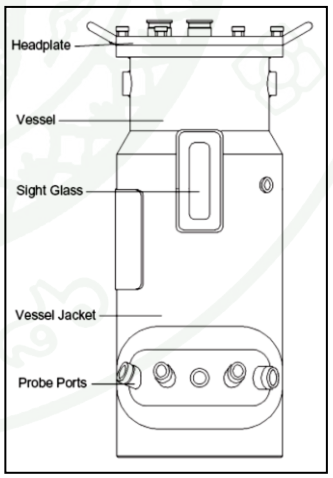
ภาพที่ 10 ตัวอย่างของถังหมักขนาดเล็กทำด้วยแก้ว ทั้งด้านบนและด้านล่างเป็นเหล็กกล้าไร้สนิม

ที่มา: Stanbury *et al.* (1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2) ตัวถังทำจากแก้วและทั้งด้านบนและด้านล่างของถังจะยึดติดกับแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม (Top and bottom plates) (ภาพที่ 10) ซึ่งอาจออกแบบให้สามารถฆ่าเชื้อในถังหมักโดยพ่นไอน้ำเข้าสู่ตัวถังหมักได้โดยตรง (In situ sterilisation) ขนาดของถังที่สามารถทนต่อแรงดันได้ดีมักมีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 30 เซนติเมตร และมีราคาสูงกว่าแบบ Top plates

สำหรับถังหมักขนาดใหญ่ที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Pilot and industrial scale) ตัวถังจะทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ที่มีส่วนผสมของโครเมียมอย่างน้อย 4 เปอร์เซ็นต์ การเคลือบผิววัสดุด้วยสารไฮดรัสออกไซด์ (Hydrous oxide) จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการกัดกร่อนได้ นอกจากนี้การผสมนิกเกล (Nickel) และโมลิบดินัม (Molybdenum) จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการกัดกร่อนของเกลือและกรดได้ดีขึ้น โดยเฉพาะในการหมักกรดซิตริกซึ่งมีค่า pH ต่ำมากคือประมาณ 1-2 จำเป็นต้องมีการเติมโมลิบดินัม 3-4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อการกัดกร่อน ตัวอย่างของวัสดุที่นิยมใช้ในการผลิตตัวถังหมักทั่วไปคือ เหล็กกล้าไร้สนิม AISI เกรด 316 ซึ่งมีส่วนประกอบของโครเมียม 18 เปอร์เซ็นต์ นิกเกล 10 เปอร์เซ็นต์ และโบลิบดินัม 2-2.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ความหนาของวัสดุที่ใช้ในการผลิตตัวถังควรจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของถังหมักด้วย การออกแบบให้ด้านบน (Top plate) และด้านล่าง (Bottom plate) ของถังหมักมีลักษณะโค้งมน (Hemispherical) สามารถช่วยเพิ่มความต้านทานต่อแรงดันภายในถังหมักได้ดีขึ้น



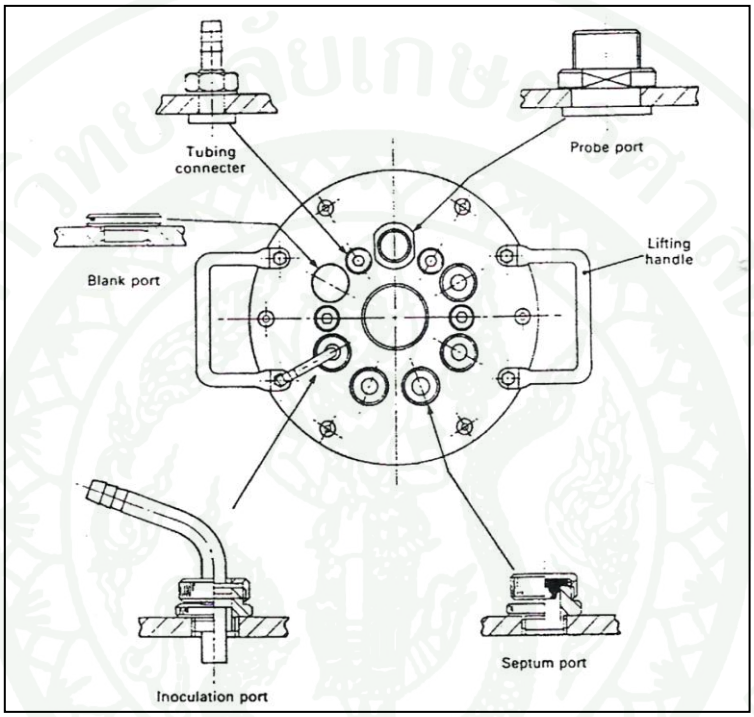
ภาพที่ 11 ตัวอย่างของถังหมักขนาดใหญ่ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

2.1.2 ฝาปิดด้านบนของถังหมัก (Head Plate Fittings)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฝาปิดด้านบนของถังหมัก ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมมีที่ยึดติดกับตัวถังหมัก มีช่องสำหรับติดตั้งตัวมอเตอร์ที่ใช้ในการขับเคลื่อนใบพัดกวน ช่องสำหรับท่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ กล้าเชื้อ และสารเคมีต่างๆ และช่องสำหรับติดตั้ง Probe ต่างๆ เช่น pH probe, D.O. probe, Temperature probe และORP probe เป็นต้น แสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ส่วนประกอบของฝาปิดด้านบนของถังหมัก

ที่มา: McNeil and Harvey (1990)

2.1.3 ท่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสารเคมีต่าง ๆ

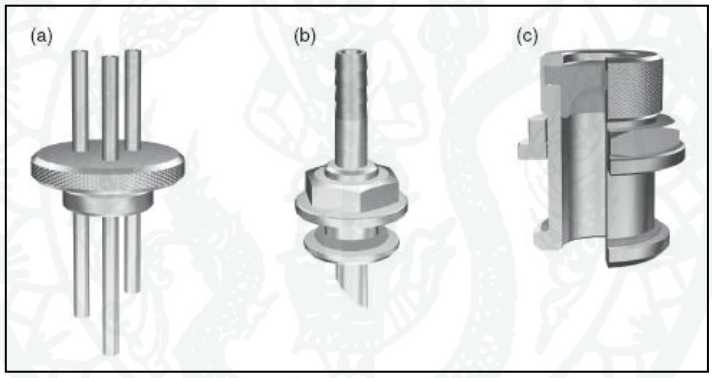
เป็นท่อที่ใช้สำหรับเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ กล้าเชื้อ หรือสารเคมีต่าง ๆ เช่น กรด ด่าง สารป้องกันการเกิดฟอง เป็นต้น ส่วนมากจะติดตั้งอยู่ด้านบนของถังหมัก แต่ก็อาจจะอยู่ทางด้านข้างก็ได้ขึ้นอยู่กับการออกแบบ ซึ่งให้เลือกใช้งานแตกต่างกันไป ดังนี้ (ภาพที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) Triple inlet มี 3 ท่อ เพื่อใช้ในการขนถ่ายของเหลวหลาย ๆ ชนิดแตกต่างกัน โดยที่มีปริมาตรน้อย ๆ และมีความหนืดต่ำ เนื่องจากขนาดของท่อเล็ก ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับของเหลวที่มีความหนืดสูง เพราะจะทำให้เสียเวลา และอาจเกิดการอุดตันได้

2) Single inlet มีเพียงท่อเดียว แต่จะมีขนาดที่ใหญ่กว่าของ Triple inlet เพื่อใช้ในการถ่ายเทของเหลวที่มีปริมาตรมาก ๆ และมีความหนืดสูง ซึ่งจะทำให้ไม่เสียเวลา

3) Septa ใช้ในกรณีเร่งด่วน หรือต้องการความรวดเร็ว เนื่องจากลักษณะของ Septa นั้นคล้ายกับปลั๊กที่ทำด้วยยางสามารถเปิด-ปิดได้สะดวก เมื่อต้องการใช้ เพียงแค่ใช้เข็มหรือหลอดฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเสียบลงไปใน Septa แล้วฉีดของเหลวที่ต้องการลงไปในถังหมักได้เลย



ภาพที่ 13 ท่อที่ใช้สำหรับเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสารเคมีต่าง ๆ ลงไปในถังหมัก; (a) Triple inlet, (b) Single inlet, (c) Septa

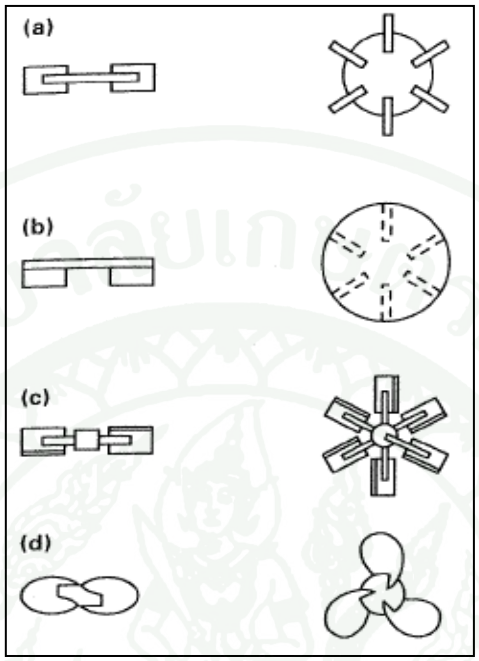
ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

2.1.4 ใบพัดกวน (Agitator / Impeller)

การกวนในถังหมักมีวัตถุประสงค์หลักคือ ทำให้ของเหลวในถังหมักซึ่งมีสารแขวนลอยของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถผสมกันได้อย่างทั่วถึง (Uniform suspension) เพื่อป้องกันการตกตะกอนของเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยให้เกิดการกระจายของฟองอากาศ ทำให้ฟองอากาศมีขนาดเล็กลงจึงช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนได้ อีกทั้งยังช่วยในแง่ของการถ่ายเทความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ร้อนออกจากถังหมักด้วย การกวนจะอาศัยพลังงานจากใบพัดกวนที่ติดตั้งอยู่ภายในถังหมัก ชนิดของใบพัดกวนที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 รูปแบบของใบพัดกวนที่นิยมใช้ ; a) Disc turbine, b) Vaned disc, c) Open turbine, d) Marine propeller.

ที่มา: Stanbury *et al. (*1999)

1) Disc turbine มีลักษณะเป็นแผ่นโลหะกลมและมีแผ่นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ เชื่อมติดอยู่รอบวงในแนวตั้งฉาก เป็นใบพัดที่นิยมใช้มากที่สุด เพราะสามารถตีฟองอากาศที่ถูกพ่นเข้ามาในถังหมักให้แตกกระจายออกได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่เกิด Air bubble flooding ที่บริเวณแกนใบพัด

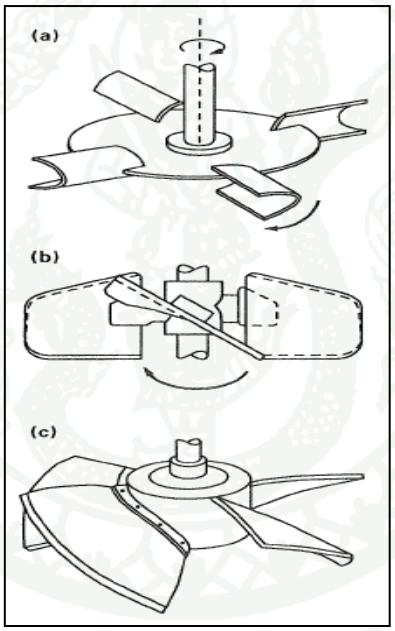
2) Vaned disc มีลักษณะคล้ายกับ Disc turbine แต่มีแผ่นโลหะสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ที่เชื่อมติดอยู่รอบวงเฉพาะด้านล่างของแผ่น Disc ในแนวตั้งฉาก ซึ่งช่วยตีฟองอากาศให้มีขนาดเล็กลง

3) Open turbine (Variable pitch) มีลักษณะคล้ายกับใบพายเล็ก ๆ มาเชื่อมต่อกันโดยให้ส่วนปลายของใบพายเชื่อมเข้าหากัน และหันด้านใบพายออกด้านนอกในแนวรอบวง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4) Marine propeller ลักษณะคล้ายใบพัดเรือ ประสิทธิภาพในการตีฟองอากาศให้กระจายออกได้น้อยกว่าแบบอื่น เนื่องจากแรงของใบพัดชนิดนี้ทำให้เกิดทิศทางการไหลของของเหลวในแนวดิ่ง (Axial flow) มากกว่าแนวรัศมี (Radial flow)

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาใบพัดกวนรูปแบบใหม่ ๆ ให้เหมาะสมตามกระบวนการหมัก ตัวอย่างเช่น Scaba agitator, Lightnin A315 agitator และ Prochem Maxflo T agitator เป็นต้น (ภาพที่ 15) ใบพัดกวนที่ได้รับการออกแบบเป็นพิเศษนี้ มักมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการกวนน้ำหมักที่มีความหนืดสูง ซึ่งทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกวนโดยไม่ต้องใช้ความเร็วรอบในการกวนสูงมาก จึงเป็นการประหยัดพลังงานและลดการเกิดแรงเฉือนที่อาจส่งผลให้เซลล์บาดเจ็บได้



ภาพที่ 15 รูปแบบการกวนของใบพัด ; a) Scaba agitator, b) Lightnin A315 agitator, c) Prochem Maxflo T agitator

ที่มา: Stanbury *et al.* (1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.5 ท่อพ่นอากาศ (Sparger)

การให้อากาศ (Aeration) ในถังหมัก จำเป็นสำหรับกระบวนการหมักเซลล์ที่มีความต้องการใช้ออกซิเจนในกิจกรรมเมตาบอลิซึม ดังนั้นการให้อากาศจึงต้องใช้ท่อพ่นอากาศ ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ส่งผ่านอากาศเข้าสู่ภายในถังหมัก (Stanbury *et al.*, 1999) มีหลายรูปแบบ ได้แก่

1) Porous sparger ทำจากแก้ว เซรามิก หรือโลหะ มักใช้ในถังหมักขนาดเล็กที่ไม่มีใบพัดกวน (Non-agitated vessels) ให้ขนาดของฟองอากาศค่อนข้างใหญ่ ปริมาณอากาศที่เข้าสู่ถังหมักค่อนข้างต่ำเนื่องจากเกิด Pressure drop สูงและยังอาจเกิดการอุดตันได้ง่ายเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่รูบน Sparger

2) Orifice sparger (Perforated pipe) มีลักษณะเป็นท่อวงกลมหรือกากบาท ที่มีขนาดประมาณ 3/4 ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดกวน ขนาดรูบน Sparger ควรจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 6 มิลลิเมตร เพื่อหลีกเลี่ยงการอุดตันและช่วยลดการเกิด Pressure drop ด้วย สามารถใช้ได้ทั้งถังหมักที่มีและไม่มีใบพัดกวน

ภาพที่ 16 หัวพ่นอากาศ Orifice sparger แบบท่อวงกลม (Ring sparger)

3) Nozzle sparger มีลักษณะเป็นท่อปลายเปิดหรือปิดบางส่วน สามารถเพิ่มให้ฟองอากาศผ่านออกมาได้มาก ทำให้เกิด Pressure loss ต่ำกว่าแบบอื่น และไม่เกิดการอุดตันได้ง่าย ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้มากทั้งในถังหมักขนาดเล็กและขนาดใหญ่ การติดตั้งหัวจ่ายอากาศแบบนี้ ควร

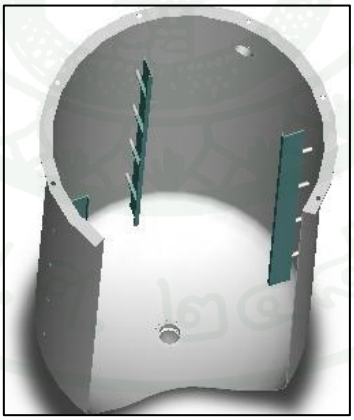
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ติดอยู่ตรงกลางถังหมักใต้ใบพัดกวน โดยมีระยะห่างจากใบพัดมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เพื่อป้องกันฟองอากาศท่วมใบพัดกวน

4) Combines sparger-agitator เป็นอุปกรณ์ที่รวมทั้งท่อพ่นอากาศ และใบพัดกวนไว้ด้วยกัน โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมักผ่านเข้ามาทางแกนของใบพัดกวนและอากาศจะถูกพ่นออกทางรูที่บริเวณฐานของใบพัด ส่งผลให้เกิดการกระจายของฟองอากาศได้ดีขึ้น

2.1.6 Baffle

Baffles มีหน้าที่ป้องกันการเกิด Vortex และ Swirl เมื่อใบกวนหมุนด้วยความเร็วสูง มีลักษณะเป็นแผ่นโลหะซึ่งมีความกว้างของ Baffles (W) เป็น 1/12 เท่าของเส้นผ่านศูนย์กลางของถังกวน ($W = D_t/12$) ความยาวของ Baffles คือระยะที่อยู่เหนือก้นถัง d/2 (d = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบกวน) จนถึงระดับของของเหลว และมักติดตั้งในแนวรัศมีถัดจากผนังของถังหมักเล็กน้อย ในกรณีที่มีอนุภาคของแข็ง หรือมีการถ่ายเทความร้อนผ่านผนังถังกวน Baffles จะอยู่ห่างจากผนังระยะ W/6 จำนวน Baffles มักมี 4 อันวางห่างเป็นระยะเท่า ๆ กัน (บางกรณีใช้ 6 อัน ซึ่งจะทำให้ได้ผลในการกวนดีกว่า) ในกรณีที่ใบกวนไม่ได้อยู่ตรงกึ่งกลางของถังกวน (มักอยู่ระหว่าง 1/2-1/4 ของรัศมีของถังกวน) ลักษณะของ Swirl จะลดลงจึงไม่จำเป็นต้องใช้ Baffles (วิทยา, 2538)



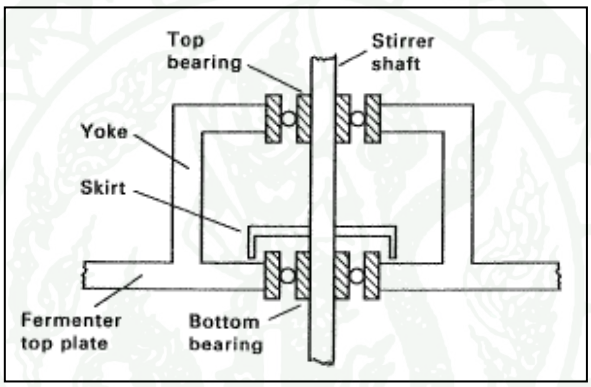
ภาพที่ 17 ตัวอย่างการติดตั้ง Baffle ภายในถังหมัก

ที่มา: Csiszar P. ; www.postmixing.com/mixing%20forum/baffles/baffles.htm#importance

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.7 อุปกรณ์สำหรับยึดแกนใบพัด (Stirrer glands and bearings)

การประกอบแกนหมุนเข้ากับถังหมักให้แน่นสนิท เพื่อให้ทำงานภายใต้สภาพปลอดเชื้อได้เป็นเวลานาน เป็นปัญหาที่ยากที่สุดในการสร้างถังหมัก แกนใบพัด (Stirrer shaft) สามารถถูกเจาะผ่านเข้าสู่ภายในถังหมักทางด้านบน หรือทางด้านล่างของถังหมัก (ภาพที่ 18 กรณีของ Top plate vessel) แต่ไม่นิยมติดตั้งทางด้านล่างเนื่องจากจะทำให้ส่วนที่ทำหน้าที่ยึดแกนหมุน (Stirrer bearings) จมอยู่ในน้ำหมัก การติดตั้งแกนใบพัดเข้ากับตัวถังหมัก มีความสำคัญมากในแง่ของการรักษาสภาวะปลอดเชื้อปนเปื้อนไว้ตลอดระยะเวลาการหมัก รูปแบบของอุปกรณ์สำหรบยึดแกนใบพัดมีหลายแบบ (Stanbury *et al.*, 1999) ได้แก่



ภาพที่ 18 แผนภาพแสดงวิธีการง่าย ๆ ในการประกอบแกนหมุนใบพัดเข้ากับถังหมัก

ที่มา: Stanbury *et al.* (1999)

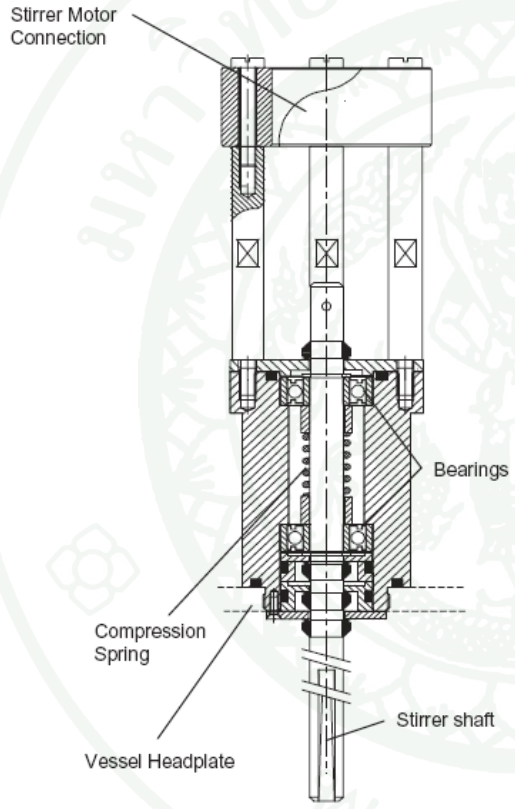
1) Stuffing box (packed-gland seal) ทำจาก Asbestos หรือเส้นใยฝ้ายที่มีลักษณะเป็นวงอยู่รวมกัน (Packing rings) หลาย ๆ ชั้น วัสดุชนิดนี้อาจเกิดการเสื่อมสภาพได้ง่ายที่ความเร็วรอบในการกวนสูง ๆ และอาจก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในระหว่างการหมักได้ง่าย โดยทั่วไป Stuffing box สามารถป้องกันการปนเปื้อนและการเล็ดลอดของจุลินทรีย์ภายในถังหมักได้เพียงระดับของ GILSP (Good Industril Large Scale Practice) กล่าวคือ สามารถใช้ได้กับกระบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เป็นอันตรายต่ำที่สุดเท่านั้น

2) Mechanical seal ประกอบด้วยส่วนที่ไม่เคลื่อนไหวอยู่ในโครงที่เป็นตัวยึด (Bearing housing) และส่วนที่หมุนได้อยู่บนแกนใบพัด ซึ่งทั้งสองส่วนนี้ยึดติดกันอยู่ด้วยสปริง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

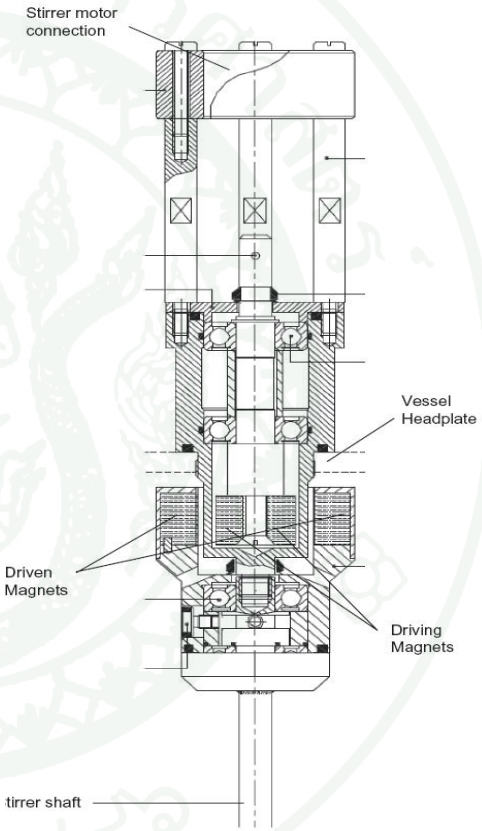
Mechanical seal มีราคาแพงกว่าแบบ Stuffing box แต่ทนทานกว่า และป้องกันการปนเปื้อนได้ดีกว่าจึงมักนิยมใช้ในถังหมักรุ่นใหม่ทั่วไป ทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่

3) Magnetic seal ใช้แรงดึงดูดของแม่เหล็กในการยึดแกนใบพัดเข้ากับส่วนของมอเตอร์โดยไม่ต้องเจาะผ่านด้านบนของถังหมัก จึงเสี่ยงต่อการปนเปื้อนน้อยมาก แต่มีราคาแพง มักนิยมใช้ในถังหมักที่ออกแบบสำหรับ Animal cell culture และไม่ต้องการความเร็วรอบสูงมาก



ภาพที่ 19 Mechanical seal

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)



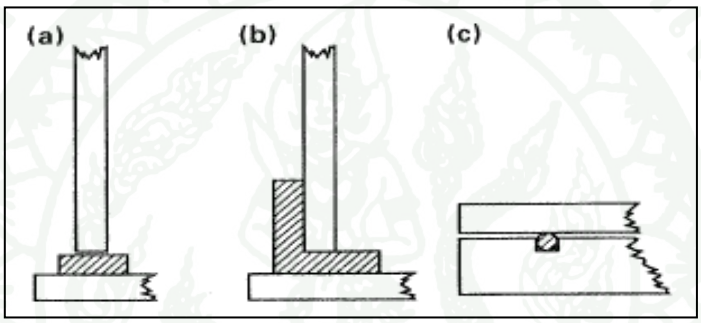
ภาพที่ 20 Magnetic seal

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.8 Aseptic joint seals

บริเวณรอยต่อทั้งด้านบนและด้านล่างของถังหมัก รวมถึงช่องสำหรับเสียบอุปกรณ์ควบคุมและติดตามผลการหมัก เช่น pH probe temperature probe และOxygen probe เป็นต้น จะต้องมีแผ่นยางหรือวงยาง (Aseptic joint seals) ปิดผนึกไว้เพื่อให้มั่นใจได้ว่าสามารถรักษาสภาพปลอดเชื้อปนเปื้อนภายในถังหมักได้ในระหว่างกระบวนการหมัก Aseptic joint seals ส่วนใหญ่ทำจากยาง (Nitryl or butyl rubbers) ใช้ในการผนึกรอยต่อระหว่างผิวหน้าของวัสดุ เพื่อป้องกันการรั่วไหลหรือเล็ดลอดของอากาศและของเหลวระหว่างภายในและภายนอกของถังหมัก รูปแบบที่นิยมใช้ คือ Compressible gasket, Lip seal และ '0' ring in groove (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 Aseptic joint seals for glass-glass, glass-metal and metal-metal ; (a) gasket, (b) lip seal, (c) '0' ring in groove.

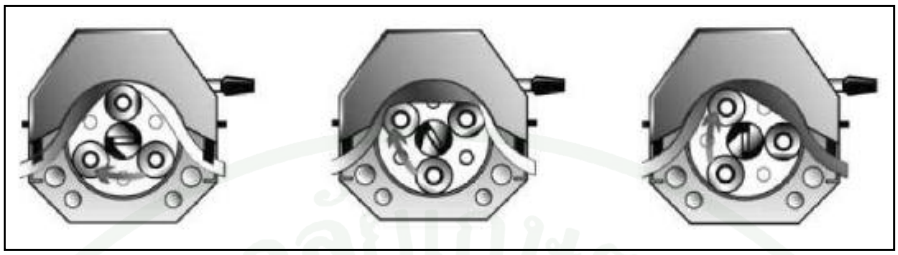
ที่มา: Stanbury *et al.* (1999)

2.1.9 Pump

Pump ใช้ในการขนถ่ายของเหลว เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ กล้าเชื้อ หรือสารเคมีต่างๆ เข้าสู่ถังหมัก จากภาพที่ 22 และภาพที่ 23 เรียกว่า Peristaltic pump จะขนถ่ายของเหลวผ่านสายยางที่มีขนาดพอดีกับตัว Pump จากด้านหนึ่งของตัว Pump ไปยังอีกด้านหนึ่ง โดยการหมุนของลูกกลิ้งด้านในของตัว Pump บีบสายยางและไล่ไปเรื่อยๆ ทำให้ของเหลวไหลจากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งได้ โดยที่ Peristaltic pump สามารถปรับความเร็วรอบได้ และอัตราการไหลจะคงที่ เนื่องจากลูกกลิ้งหมุนด้วยความเร็วรอบคงที่ ดังนั้นสามารถปรับอัตราการไหลได้ตามที่เราต้องการได้ จึงเหมาะสำหรับกำหนดอัตราการไหล Peristaltic pump จึงเหมาะสมสำหรับการทดลองในการ

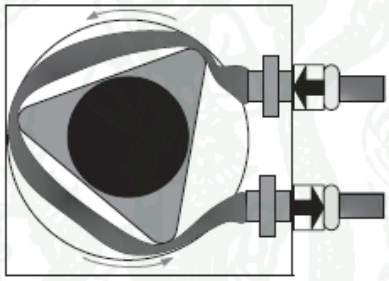
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมักแบบที่ต้องเติมอาหารเลี้ยงเข้าไปให้ถังหมักเรื่อย ๆ หรือจะใช้ในการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อกระบวนการหมักเข้าสู่ถังหมักได้อย่างปราศจากเชื้อปนเปื้อน



ภาพที่ 22 ทิศทางการหมุนของ Peristaltic pump

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)



ภาพที่ 23 การใช้งานโดยขนถ่ายของเหลวผ่านสายยางของ Peristaltic pump

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

2.2 ระบบควบคุมของถังหมัก

2.2.1 การให้อากาศ

การให้อากาศ จะต้องมีอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่นำอากาศเข้าสู่ของเหลวภายในถังหมัก ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ เครื่องสูบอากาศ เครื่องกรองอากาศ และหัวจ่ายอากาศ (Air sparger) การออกแบบหัวจ่ายอากาศเพื่อให้ได้ฟองอากาศที่มีขนาดเริ่มต้นจามต้องการ จำเป็นต้องทราบว่าจะให้ระบบให้อากาศเพียงอย่างเดียวหรือใช้กับเครื่องกวน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 24 Condenser

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

การให้อากาศนั้นจะผ่านตัวกรองที่เป็นเยื่อหรือกระดาษกรอง (Membrane) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทำให้ได้อากาศที่ปลอดเชื้อผ่านเข้าสู่ตัวถังหมักทางท่อด้านล่างที่เรียกว่า Sparger และถูกตีเป็นฟองอากาศขนาดเล็กโดยใบพัดกวน และอากาศก่อนที่จะผ่านออกไปจากถังหมัก อาจจะมีกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง และผ่านระบบควบแน่น (Condenser) ที่มีน้ำเย็นไหลอยู่ตลอดเวลา (สาโรจน์ และคณะ, 2544)

เมื่ออากาศผ่านเครื่องกรองอากาศแล้วจะถูกพ่นสู่ถังหมักที่ก้นถัง ฟองอากาศที่ออกมาจะต้องมีขนาดเล็กพอสมควร เพื่อให้ออกซิเจนในอากาศซึมผ่านเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ท่อพ่นอากาศอาจมีหัวเดียวหรือหลายหัว หรือมีลักษณะวงแหวนมีรูพรุน ฟองอากาศที่มีขาดเล็กมากเกินไปจะเป็นสาเหตุให้เกิดฟองเหนือผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าฟองอากาศใหญ่เกินไป การซึมผ่านของออกซิเจนจากอากาศสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ไม่ดีเท่าที่ควร ท่อพ่นที่นิยมใช้มี 3 แบบ คือ 1) Single jet nozzle ใช้กับถังหมักขนาดเล็ก ใช้ห้องปฏิบัติการ 2) Sintered diffuser และ 3) Sparger ใช้กับการหมักแบคทีเรีย และยีสต์ ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อท่อพ่นอากาศ (Sparger)

การให้อากาศเข้าไปในระหว่างการหมัก ต้องควบคุมปริมาณให้คงที่และพอเหมาะต่อการใช้ของจุลินทรีย์ ถ้ามากเกินไปอาจก่อปัญหาตามมาในระหว่างการหมัก เช่น การเกิดฟอง ดังนั้นจึงต้องใช้เครื่องควบคุมอัตราการให้อากาศ ซึ่งเรียกว่า Flow meter ควบคุมการให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อากาศเข้าสู่ถังหมักและกรองอากาศก่อนเข้าสู่ถังหมัก โดยมากนิยมใช้ใยแก้ว (Glasswool) แต่ก็ยังมีพวก Membrane asbertos mats ซึ่งอายุการใช้งานของ Asbestos ยาวนานกว่าเมมเบรน (วราวุฒิ, 2529)

2.2.2 การกวนและการผสม

เป็นการทำให้อาหาร จุลินทรีย์และอากาศคลุกเคล้าเข้ากันได้อย่างทั่วถึง ระบบการกวนที่มีประสิทธิภาพจะทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงและสม่ำเสมอเท่ากันทุกจุดภายในถัง

ใบพัดที่ใช้ในถังหมักเรียกว่า Impeller ซึ่งจะช่วยในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้ามาจากก้นถังให้เป็นฟองขนาดเล็ก และแตกกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของน้ำหมัก ใบพัดติดตั้งอยู่ตรงกลางของถังหมัก สามารถปรับตำแหน่งให้สูงจากฐานของถังหมักได้ในตำแหน่งที่เหมาะสม ที่ทำให้ใบพัดหมุนได้ในอัตราเร็วสูง การหมุนของใบพัดใช้กำลังไฟฟ้า สำหรับถังหมักขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ในห้องปฏิบัติการจะใช้กำลังไฟฟ้าประมาณ 6-8 วัตต์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ถังหมักขนาดใหญ่ระดับการผลิตขั้นอุตสาหกรรมใช้กำลังไฟฟ้าประมาณ 2 วัตต์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร กำลังไฟฟ้าที่ใช้นี้ยังขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของอาหาร เช่น อัตราการละลายของออกซิเจน ความหนืดของอาหาร และขนาดความสูงของถังหมัก ใบพัดที่นิยมใช้อยู่มี 4 ชนิดด้วยกัน คือ (a) Disc turbine; (b) Vaned disc; (c) Open turbine; (d) Marine propeller. ดังที่อธิบายไว้ในหัวข้อใบพัดกวน (Agitator / Impeller) (วราวุฒิ, 2529)

2.2.3 การควบคุมอุณหภูมิ

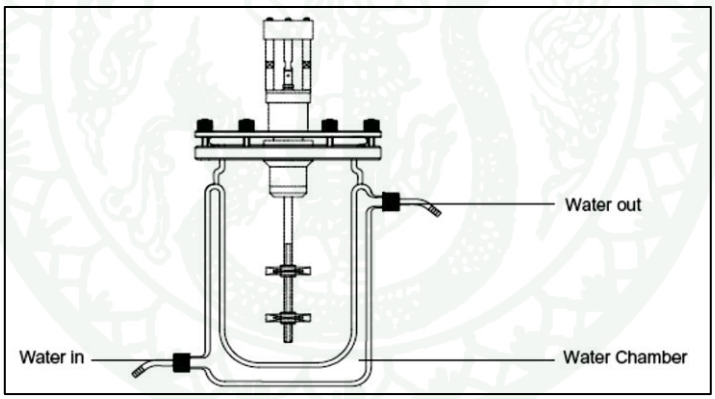
เนื่องจากในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ในขณะหมัก จะเกิดพลังงานความร้อนขึ้น อันเป็นผลมาจากปฏิกิริยาชีวเคมีในการออกซิไดซ์สารอาหารของจุลินทรีย์ และจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimal temperature) สำหรับการเจริญและสร้างผลผลิตที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมักให้ดี

ในการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักในถังหมักโดยทั่วไปประกอบด้วย ระบบหล่อเย็นกับตัวทำความร้อน โดยอาศัยการทำงานจาก Temperature probe sensing ที่อยู่ในถังหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นสัญญาณจาก Probe จะถูกส่งเข้าสู่เครื่องควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณมาตรฐานที่ตั้งไว้ตามอุณหภูมิที่ต้องการ ถ้าสัญญาณสูงกว่ามาตรฐานที่ตั้งไว้ ก็จะไปกระตุ้น (tricker) ให้ Solenoid valve เปิด และส่งน้ำเย็นเข้ามาหล่อเย็นถังหมัก ในขณะที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่กำหนดไว้ ก็จะส่งสัญญาณไปกระตุ้นให้เครื่องทำความร้อน (Heater) ทำงาน จะมีขั้ววัดอุณหภูมิ (Sensing device) สอดเข้าไปสัมผัสกับน้ำหมักโดยตรง เช่น Thermocouple, Thermister, Bimetallic strip หรือ Mercury-filled column เป็นต้น จากนั้นอ่านอุณหภูมิจากเครื่องบันทึกหรือ สเกลจากภายนอกถังหมัก

ในระดับอุตสาหกรรมซึ่งใช้ถังหมักขนาดใหญ่ ความร้อนที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักจะมีปริมาณสูง การระบายความร้อนนิยมใช้ Jacket หรือขดลวดหล่อเย็นภายในถังหมัก (Internal cooling coils) ซึ่งมีน้ำเย็นไหลหมุนเวียนเข้าไปเพื่อควบคุมอุณหภูมิได้ตามต้องการ ปกตินิยมใช้ Jacket ระบายความร้อยในถังหมักที่มีขนาดความจุไม่เกิน 500 ลิตร ถ้าถังหมักมีขนาดใหญ่กว่านี้จะนิยมใช้ขดลวดหล่อเย็นภายใน



ภาพที่ 25 ระบบหล่อเย็นแบบ Jacket ใช้กับถังหมักขนาดเล็ก หรือถังหมักความจุไม่เกิน 500 ลิตร

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

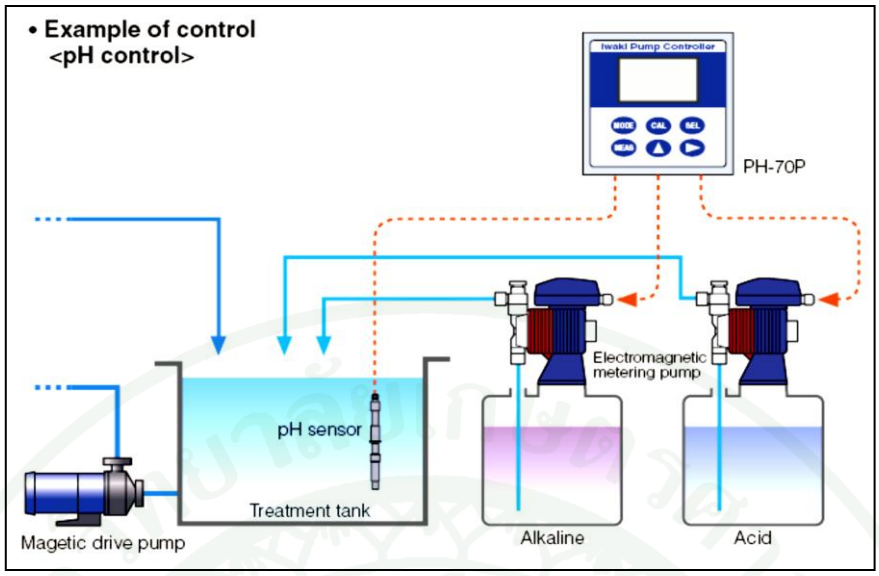
ภาพที่ 26 ระบบหล่อเย็นแบบ Internal cooling coils ใช้กับถังหมักขนาดใหญ่

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

2.2.4 การควบคุม pH

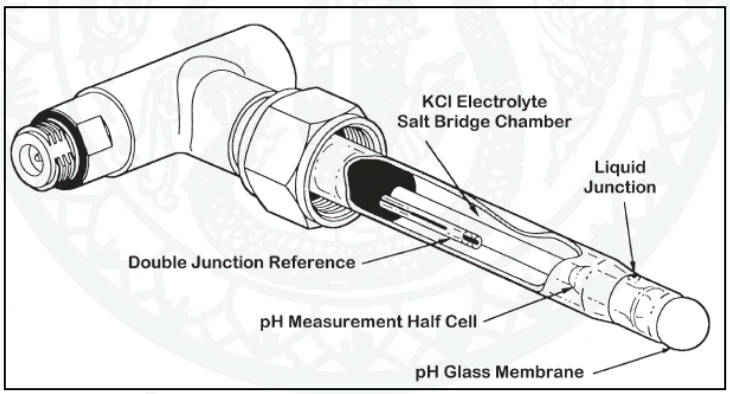
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมักมักมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์อยู่แล้ว แต่ในระหว่างการหมักหลายชนิด pH อาจเปลี่ยนเร็วมาก และในช่วงกว้างมากจนกระทั่งไม่สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วงที่พอเหมาะ โดยอาศัยเครื่องมือวัดและควบคุมซึ่งประกอบด้วย เครื่องควบคุมซึ่งมีหน้าปัดสำหรับอ่านค่า pH, pH probe และปั๊ม (Pump) สำหรับเติมกรดและด่างเข้าถังหมัก เมื่อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปจากช่วงที่กำหนด เครื่องควบคุมจะส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยัง Solenoid valve ทำให้กรดหรือด่างถูกปั๊มเข้าสู่ถังหมัก จนกระทั่งค่า pH ปรับมาอยู่ในระดับที่กำหนด เครื่องควบคุมจะส่งสัญญาณไฟฟ้าทำให้วาล์วควบคุมปิดโดยอัตโนมัติ การทำงานของเครื่องควบคุมและอุปกรณ์แสดงในภาพที่ 27

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 27 ตัวอย่างการควบคุม pH ในถังหมัก

ที่มา: IWAKI CO.,LTD.



ภาพที่ 28 pH probe ที่ประกอบด้วย Glass measuring electrode และ Reference electrode

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

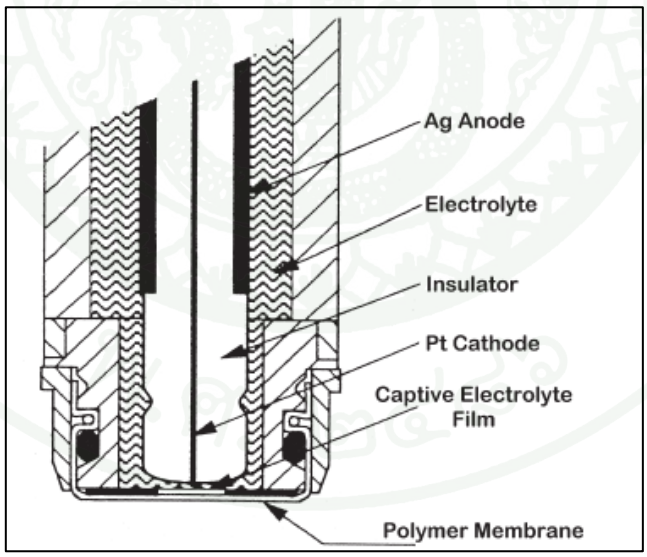
โดยทั่วไปการวัด pH จะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Glass measuring electrode และ Reference electrode ซึ่งจะอยู่กันคนละ Probe แต่ในปัจจุบันได้นำเอามารวมไว้ใน Probe เดียวกันเพื่อสะดวกในการใช้งาน แสดงดังภาพที่ 28

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

pH sensing electrode ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ควรทนอุณหภูมิในระหว่างการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และควรมีอายุการใช้งานเป็นเวลานานติดต่อกันไม่ต่ำกว่า 200 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ที่ขั้วของ pH probe (วราวุฒิ, 2529)

2.2.5 การควบคุมออกซิเจน

การควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (Dissolve oxygen; D.O.) ในน้ำหมักมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ (วราวุฒิ, 2529) การวัดปริมาณออกซิเจนทำได้โดยวิธีการไทเทรท (Winkler method) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่สะดวก และอาจเกิดความผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้น การประดิษฐ์ D.O. probe จึงให้ความเข้าใจกระบวนการในถังหมัก D.O. probe ประกอบด้วยหลอดแก้วหรือเหล็กไร้สนิมบรรจุด้วยขั้วไฟฟ้า (Electrode) 2 อัน และอิเล็กโทรไลท์ที่เหมาะสม Probe ถูกหุ้มด้วยเมมเบรนเพื่อที่จะแยกขั้วไฟฟ้าทั้งสองและอิเล็กโทรไลท์จากน้ำหมัก ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักสามารถแพร่ผ่านเมมเบรน และถูกรีดิวซ์ที่ขั้วบวก (Cathode) กระแสที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย มี 2 ชนิด (เพ็ญแข, 2541) คือ



ภาพที่ 29 องค์ประกอบหลักของ D.O. probe

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) Polarographic D.O. probe โดยที่ Probe ชนิดนี้มีแหล่งพลังงานจากข้างนอก 0.6-0.8 โวลต์ ที่ทำให้เกิดขั้วขึ้นที่อิเล็กโทรดทั้งสอง โดยทั่วไปขั้วบวกจะเป็นทองคำขาว (Platinum) ซึ่งมี Ag/AgCl เป็น Reference anode ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ

Cathod :	$O_2 + 2H_2O + 2e^-$	$\longrightarrow$	$H_2O_2 + 2OH^-$
	$H_2O_2 + 2e^-$	$\longrightarrow$	$2OH^-$
Anode :	$Ag + Cl^-$	$\longrightarrow$	$AgCl + e^-$
Overall :	$4Ag + O_2 + 2H_2O + 4Cl^-$	$\longrightarrow$	$4\,AgCl + 4OH^-$

ในกรณีนี้จะเห็นว่าอิเล็กโทรไลท์ คือ โปตัสเซียทคลอไรด์ (KCl) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของปฏิกิริยา

2) Galvanic D.O. probe Probe ชนิดนี้ไม่ต้องใช้พลังงานจากภายนอก แต่จะอาศัยการเกิดกระแสไฟฟ้าตามธรรมชาติระหว่างขั้วไฟฟ้าบวกและลบ วัสดุที่ใช้ คือ เงิน และตะกั่ว ในกรณีนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ

Cathod :	$O_2 + 2H_2O + 4e^-$	$\longrightarrow$	$4OH^-$
Anode :	Pb	$\longrightarrow$	$Pb^{2+} + 2e^-$
Overall :	$O_2 + 2Pb + 2H_2O$	$\longrightarrow$	$2Pb(OH)_2$

ใน Galvanic probe ขั้วลบจะถูกออกซิไดซ์ (Oxidized) และการทำงานขึ้นกับพื้นที่ผิวของขั้วลบ ดังนั้นจึงทำให้มีลักษณะเป็นเกลียวเพื่อให้มีพื้นที่ผิวมาก

ข้อแตกต่างระหว่าง Polarographic probe และ Galvanic probe คือ ราคา Polarographic probe จะแพงกว่ามาก เนื่องจาก Polarographic probe มีความเร็วมากกว่า และอายุการใช้งานที่นานกว่า Galvanic probe ส่วนสารอิเล็กโทรไลท์ที่นิยใช้กับ Polarographic probe คือ KCl และใช้ Lead acetate ใน Galvanic probe

D.O. probe ไม่ได้ใช้สำหรับวัดค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย (D.O. concentration) แต่เป็นการวัดกิจกรรมหรือความดันย่อยของออกซิเจนในน้ำหมัก ดังนั้นควรที่จะมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเทียบมาตรฐาน (Calibration) D.O. probe บ่อย ๆ เพื่ออ่านเปอร์เซ็นต์ที่อิ่มตัว (Ppercent saturation) ซึ่งใช้อากาศและก๊าซไนโตรเจนเป็นจุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าปริมาณจริงของออกซิเจนที่ละลายในของเหลวสามารถหาได้โดยวิธีการทางเคมี หรือใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความดันย่อยของออกซิเจนกับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย โดยใช้กฎของก๊าซ (Henry's law) (เพ็ญแข, 2541)

การควบคุมปริมาณของออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่ต้องการ มี 2 วิธีการ (วราวุฒิ, 2529) คือ

1) การควบคุมด้วยปริมาณก๊าซ การที่ D.O. ลดลงต่ำกว่าที่กำหนดไว้ Oxygen probe จะส่งสัญญาณไฟฟ้ามายังเครื่องควบคุม แล้วเครื่องควบคุมจะส่งสัญญาณต่อไปยังที่ Solenoid valve ให้ก๊าซออกซิเจนเข้าถังหมักได้มากขึ้นจนระดับ D.O. เพิ่มขึ้นจนถึงกำหนด สัญญาณจาก Control จะหยุดทำให้ Solenoid valve ลดการเปิดเหลือเท่าเดิม

2) การควบคุมด้วยอัตราเร็วของการกวน สัญญาณจาก Oxygen probe จะเข้า Control แล้วส่งสัญญาณต่อไปยัง Motor ทำให้ใบพัดหมุนเร็วขึ้น การละลายของออกซิเจนจะเพิ่มมากขึ้นจนถึงระยะที่กำหนด ความเร็วของ Motor จะลดลงเท่าเดิม

2.2.6 การควบคุมการเกิดฟอง

การป้องกันการเกิดฟองในระหว่างการหมัก โดยอากาศที่พ่นเข้าไปในถังและถูกใบพัดกวนตีจนเป็นฟองอากาศเล็ก ๆ มากมาย ทำให้เกิดฟองขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปในขณะที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องมาจากสารประกอบพวกโปรตีนและเปปไทด์ถูกขับถ่ายออกมา ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ฟองที่เกิดนี้ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายเทอากาศระหว่างอาหารเหลวกับบรรยากาศลดต่ำลง ซึ่งเกิดจากการระเหยของน้ำและสารที่ระเหยได้ง่าย ถ้ามีฟองมากจนล้นออกนอกถังหมัก จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เพราะฟองอากาศที่แตกสลายจะกลับลงไปในถังหมัก และอาจทำให้ตัวกรองอากาศอุดตัน

วิธีที่ง่ายที่สุด คือ การทำให้โฟมแตกโดยวิธีกล ด้วยการติดตั้งใบพัดเหนือระดับของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ซึ่งให้การควบคุมโฟมดีแต่ใช้กำลังงานสูงและเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่าย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากการใช้วิธีกลแล้วยังสามารถทำได้โดยวิธีทางเคมี ด้วยการเติมสารป้องกันการเกิดฟอง ระบบการเติมสารป้องกันการเกิดฟองแบบอัตโนมัตินี้ ต้องมี Probe ซึ่งติดตั้งที่ส่วนบนของถังหมัก วัสดุที่ใช้เป็น Probe อาจเป็นเหล็กไร้สนิทหุ้มด้วย Teflon เมื่อฟองสัมผัสที่ปลายเปิดของ Probe จะกระตุ้นโดยส่งสัญญาณไปยังเครื่องควบคุม นำไปสู่การเติมสารป้องกันการเกิดฟองโดยเครื่องปั๊ม เมื่อสารป้องกันการเกิดฟองเข้าสู่ถังหมักจะทำให้ฟองแตก ทำให้วงจรถูกตัด สารป้องกันการเกิดฟองที่ใช้กันมาก ได้แก่ พวก Siliconeoil, Octadecanol และสารไฮโดรคาร์บอนที่มี Chain สายยาว

ปริมาณของสารป้องกันการเกิดฟองที่เติมลงไปในถังหมักนั้น เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ ในการใส่สารป้องกันการเกิดฟองมากเกินไป อาจจะมีผลยับยั้งต่อกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ได้ และทำให้เกิดการลดระยะเวลาที่ก๊าซอยู่ในของเหลว (Gas hold-up) ซึ่งเป็นผลต่ออัตราการถ่ายเทออกซิเจน และเป็นปัญหาในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ระบบการควบคุมฟองมักต้องใช้เวลาระยะหนึ่ง (Lag time) ระหว่างช่วงกระตุ้นและการแตกของฟอง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเติมสารป้องกันการเกิดฟองมากเกินความจำเป็น เพื่อป้องกันการเติมสารป้องกันการเกิดฟองมากเกินไปควรปรับ Lag time ในวงจร และเลือกใช้ Probe ที่มีความไวเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัส (Splashes) จากน้ำหมัก (วราวุฒิ, 2529; เพ็ญแข, 2541)

2.2.7 การควบคุม ORP

ในระหว่างการหมักเอทานอล ค่า ORP ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่คงที่ เพราะมีการเกิดกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ค่า ORP เปลี่ยนแปลง ในสภาวะนี้มีความสำคัญมากในการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า ORP อย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นการควบคุมค่า ORP ที่ระดับต่าง ๆ ให้คงที่ตลอดกระบวนการหมัก จะทำให้ได้ผลผลิตสูง โดย Yang *et al*. (2007) ได้ศึกษาผลของการควบคุมค่า ORP ต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้ *S. cerevisiae* ซึ่งควบคุมค่า ORP ให้คงที่และสม่ำเสมอ โดยการปรับความเร็วในการกวนและการให้อากาศอย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอล ดังแสดงในตารางที่ 3 และระยะเวลาที่ทำให้ค่า ORP คงที่ ดังแสดงในภาพที่ 30

การควบคุมค่า ORP ให้คงที่และสม่ำเสมอมีประโยชน์ในกระบวนการหมัก (Yang *et al*., 2007) ดังนี้

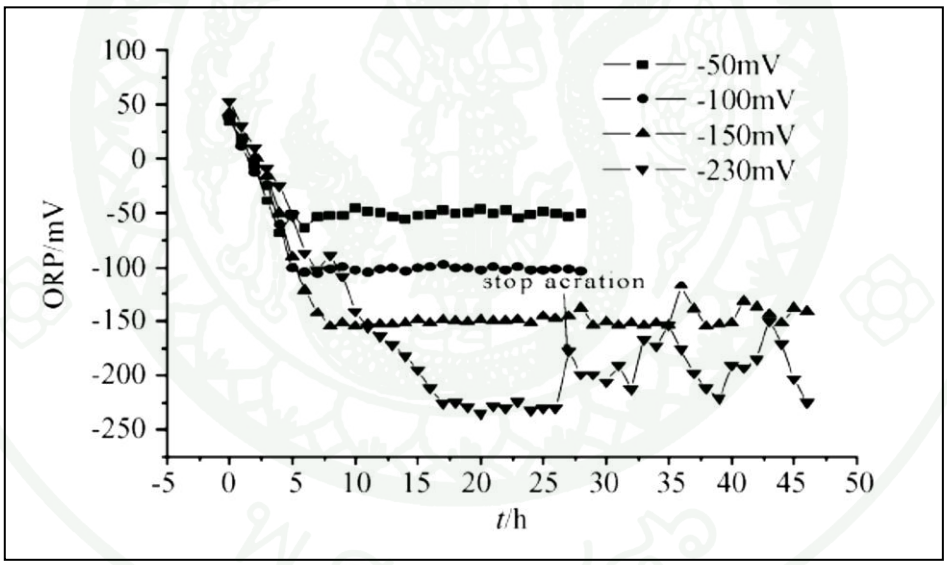
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) ค่า ORP จะแสดงถึงข้อมูลที่จำเป็นให้เห็น ถ้าจุลินทรีย์เจริญด้วยค่า ORP เหมาะสม

2) ค่า ORP สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามค่า DO ในระดับที่ต่ำกว่า 1 ppm ได้ โดยที่เครื่องมือวัดค่า OD แบบปกติไม่สามารถตรวจจับได้ ดังนั้นค่า ORP จึงมีประโยชน์มากในการหมักแบบไม่ใช้อากาศ

3) ค่า ORP จะทำให้เกิดการสร้าง Disulfide bond ได้ดีขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการทำให้เซลล์ยีสต์จับตัวกันเพื่อตกลงสู่ก้นถังหลังจากการหมักเสร็จสิ้นลง

4) ค่า ORP มีความสัมพันธ์กับการเกิดกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในระหว่างการหมักแบบไม่ใช้อากาศ



ภาพที่ 30 กราฟแสดงการควบคุมค่า ORP ในถังหมัก

ที่มา: Yang *et al*., 2007

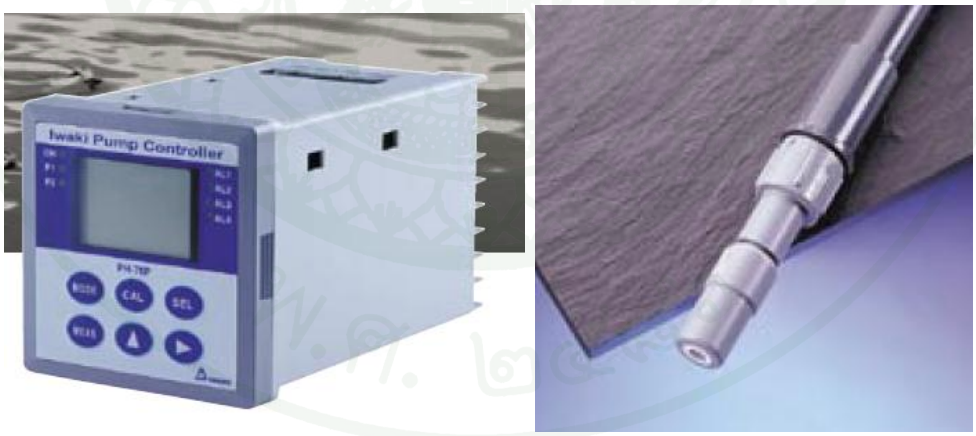
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ใช้ในการควบคุมค่า ORP ในถังหมัก

Control ORP Level/mV	Agitation speed (r/min)	Aeration rate (L/min)	Time to set ORP/h
-50	189-232	5-6	5
-100	150-178	1.5-5	5
-150	150	0-1.6	9
-230	150	0-0.75	16

ที่มา: Yang *et al*. (2007)

Redox electrode เป็นเครื่องมือวัดการทำปฏิกิริยาของ Redox electronic pairs ดังนั้นมันสามารถใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Dissolved chemical species ในสารละลาย เพราะ Oxidability ของ O_2/H_2O ดีกว่า Redox electronic pairs อื่นๆ เช่น O_2/Air หรือ O_2/medium หลักการในการวัดค่า ORP ของ Redox electrode คือ บนพื้นฐานของสมดุล Electron จะเกิดการแลกเปลี่ยน Electron ระหว่าง Medium และ Redox electrode



(a) (b)

ภาพที่ 31 เครื่องควบคุมค่า ORP ; (a) เครื่องควบคุม, (b) ORP probe

ที่มา: IWAKI CO.,LTD.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ORP คือ ค่า E จะถูกกำหนดโดย DO, pH และอุณหภูมิ ตามสมการที่ (1) และ (2) ดังนี้

$$E = E_0 + \left(\frac{RT}{nF}\right)\ln\left(\frac{\alpha_o}{\alpha_R}\right) \quad (1)$$

$$E = \left(\frac{RT}{nF}\right)\ln(pO_2) + \left(\frac{RT}{F}\right)\ln[H^+] \quad (2)$$

เมื่อ E_0 = standard redox potential

α_o = oxidative activity

α_R = reductive activity

pO_2 = the partial pressure of oxygen corresponding to dissolved oxygen level

R = gas constant

T = thermodynamic temperature

F = Faraday constant

จากสูตร สามารถสรุปได้ว่าค่าของ ORP มีความสัมพันธ์กับ DO เท่านั้น เมื่ออุณหภูมิ และ pH ถูกควบคุมให้คงที่

เครื่องควบคุมค่า ORP ของบริษัท IWAKA รุ่น PH/OR-70P สามารถนำมาประยุกต์ใช้โดยการควบคุมความเร็วของใบพัดกวนและอัตราการพ่นอากาศ โดยจะมีหัววัดค่า ORP (ORP probe) ภายในถังหมัก และเครื่องควบคุม ซึ่งแสดงดังภาพที่ 31

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของเครื่องควบคุมค่า ORP

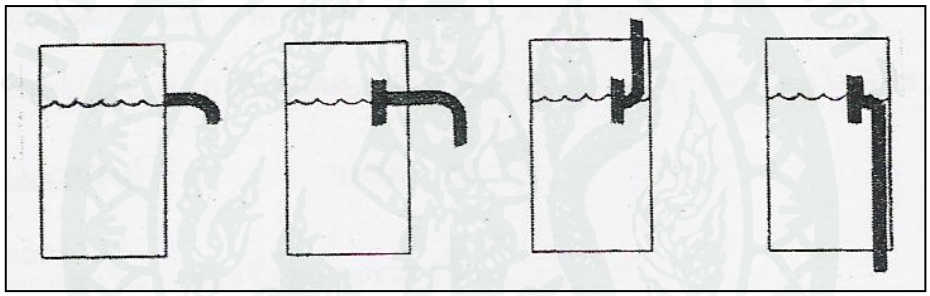
Measuring ranger		-2000 ~ 2000 mV
Indication precision		± 1 mV
Reproducibility		± 5 mV
Control function	Setting	Control mode Calibration mode Pump max. spm setting mode User setting mode Parameter setting mode
	Control method	Pulse proportional control ON/OFF control (upper limit operation, lower limit operation)
	Setting method	Six operation keys MODE, MEAS, CAL, SEL, UP and SHIFT
Display	Display	LCD (OR figure, set figure)
	Pump operation	Green LED 2 pcs (ON/OFF control : LED lights, Pulse proportional control : LED blinks synchronous with stroke.)
	Alarm operation	Red LED 4 pcs (AL1, AL2, AL3, AL4)
	Power LED	Green LED 1pc
Input	Sensor input	OR input -2000 ~ 2000 mV
	Pump stop input	Pump stops when potential free contact signal comes in.
Output	Pump output	ON/OFF control(upper limit operation, lower limit operation): -2000 ~ 2000 mV (Hysteresis width: 0 ~ 999 mV) Pulse proportional control : It can be set optionally at 0 – 360 spm for -2000 ~ 2000 mV. (P1 and P2 can be set independently. Potential free contact 1a×2AC240V 0.1A)
	Alarm output	Upper limit alarm, lower limit alarm, reaching SET1, reaching SET2 (-2000 to 2000 mV can be set for each item.) Optional setting is possible to AL1 to AL4. (Potential free contact 1a x 4 AC250V 10A) Hysteresis width : 0 to 999 mV Delay time : 0 to 99 sec.
	Transmission output	DC 0 to 20 mA, load resistance 500 ohm or below, insulation type (It can be set optionally for –2000 to 2000 mV.) You can be select the transmission output of continuous or hold (just before, optional) when is at other mode than control mode.
Power voltage		AC90V ~ AC240V 50/60Hz Power consumption : 10VA

ที่มา: IWAKI CO.,LTD.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.8 การควบคุมระดับน้ำในถังหมัก

ในการหมักจำเป็นจะต้องควบคุมปริมาณของน้ำหมักให้อยู่ในช่วงที่กำหนด เพื่อให้เกิดการหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะถ้าเติมน้ำหมักลงในถังมากเกินไป อาจทำให้เกิดปัญหาฟองล้นสู่ภายนอกถังหมักได้ง่าย ซึ่งทำให้เสียปริมาตรของน้ำหมักที่ควรจะได้และอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ต้องการจากภายนอกได้ นอกจากนี้จะทำให้อากาศที่มีอยู่ตรงช่องว่างเหนือน้ำหมักในถังหมักมีน้อยลง จะส่งผลให้ DO ในน้ำหมักลดลงไปด้วย ลักษณะการควบคุมระดับน้ำหมักจะอาศัยเครื่องมือควบคุมระดับ มีทั้งที่สามารถปรับระดับอยู่ภายในโดยการควบคุมระดับของ Rubber bellows นิยมใช้ Autoclavable fermenter และชนิดที่สามารถปรับระดับภายนอกซึ่งอาศัยการยกท่อขึ้นหรือลงเพื่อปรับระดับที่ต้องการ (วราวุฒิ, 2529)



ภาพที่ 32 เครื่องมือที่ใช้ควบคุมระดับน้ำในถังหมัก

ที่มา: วราวุฒิ (2529)

2.3 การดำเนินงานในสภาพปลอดจากเชื้อ (Aseptic technique)

2.3.1 การฆ่าเชื้อภายในถังหมัก

การฆ่าเชื้อในระบบการหมัก โดยส่วนมากนิยมพ่นไอน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20-30 นาทีเป็นอย่างน้อย เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้ทำตัวถังและขนาดของภาชนะ ตัวอย่างเช่น เวลาที่ใช้ในการทำให้อลูมิเนียมปลอดจากเชื้อเร็วกว่าเวลาที่ทำให้แก้วปลอดจากเชื้อ และตัวถังขนาดใหญ่ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อนานกว่าตัวถังขนาดเล็ก ในทาง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรงกันข้ามระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้ตัวถังเย็นตัวลงหลังจากการฆ่าเชื้อ ก็จะใช้เวลาแตกต่างกันตามขนาดของตัวถังเช่นเดียวกัน (วราวุฒิ, 2529)

ในการฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมการหมัก นิยมใช้เครื่อง Continuous sterilizers ซึ่งมีอยู่ 2 แบบด้วยกัน (วราวุฒิ, 2529) คือ

1) Continuous steam injection type เป็นการใช้ไอน้ำร้อนโดยตรงที่อุณหภูมิประมาณ 140 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที แต่จะใช้เวลาในการทำให้ตัวถังเย็นลงช้า (อุณหภูมิจะลดต่ำลงถึงประมาณ 80 องศาเซลเซียสเร็วมาก แต่หลังจากนั้นต้องใช้เวลานานจนกว่าจะถึงอุณหภูมิห้อง)

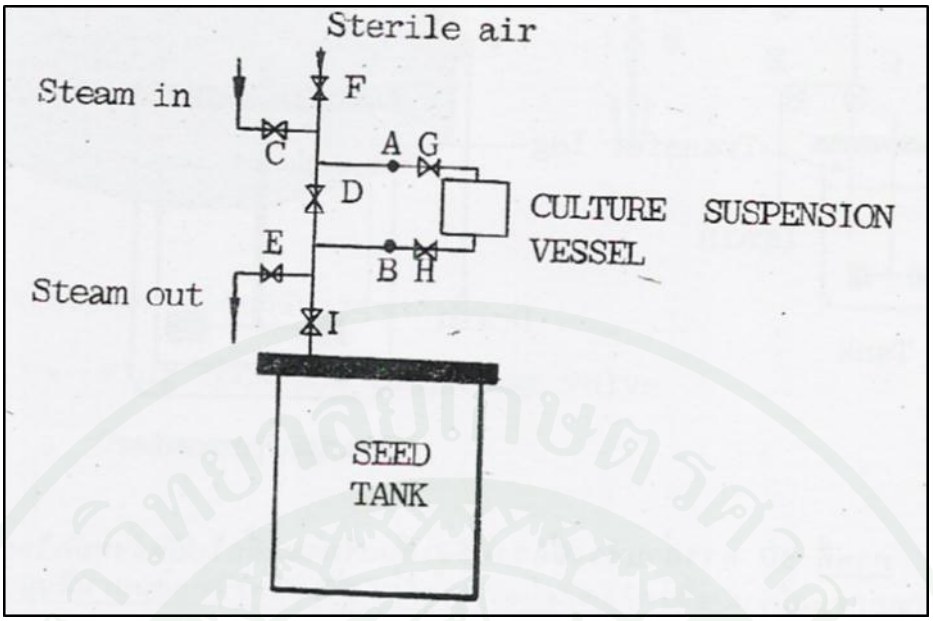
2) Continuous plate exchanger type เป็นการทำให้ Plate ร้อนขึ้นที่อุณหภูมิประมาณ 144 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที แต่จะใช้เวลาในการทำให้เย็นในระยะเวลาสั้นมากเพียง 20 วินาที ซึ่งเร็วกว่า Continuous steam injection type มาก

สภาพปลอดจากเชื้อมีความสำคัญมากในการหมัก อาจเกิดจากปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ในช่วงการเตรียมหัวเชื้อก่อนถ่ายลงสู่ถังหมัก ควรเก็บตัวอย่างของน้ำหมักมาวิเคราะห์ตลอดช่วงการหมัก รวมถึงการปิดแกนหมุนที่ฝาบนของถังหมัก สำหรับวิธีในการทำสภาพปลอดเชื้อนิยมทำกันโดยการวางท่อและวาล์วต่อกันอย่างเหมาะสม และใช้ไอน้ำอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20-30 นาที ช่วยในการฆ่าเชื้อก่อนและหลังการปฏิบัติ

3.3.2 การถ่ายเชื้อลงสู่ถังหมัก (Aseptic inoculation)

วิธีในการปฏิบัติแสดงในภาพที่ 33 จะต้องทำการฆ่าเชื้อในท่อที่ติดต่อไปยังถังหมักเก็บเชื้อเริ่มต้น (Inoculum vessel) ตลอดจนท่อที่ใช้ในการถ่ายเชื้อเสียก่อน ก่อนอื่นต้องคลายข้อต่อ A และB ให้หลวมเล็กน้อยเพื่อให้ไอน้ำออกมาได้บ้าง จากนั้นปล่อยไอน้ำผ่านวาล์ว C, D และE ในขณะที่ปิดวาล์ว F, G, H และI ทำการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20 นาที แล้วจึงปิดวาล์ว C และE จากนั้นยึดข้อต่อ A และB ให้แน่น เปิดวาล์ว G, H และI อากาศที่ปลอดจากเชื้อจะก่อให้เกิดความดันสูง ซึ่งมีผลให้หัวเชื้อไหลลงสู่ถังหมักจนหมด ปิดวาล์ว F, I, G และH แล้วจึงปลดข้อต่อ A และB ออก การถ่ายเชื้อเสร็จสมบูรณ์ (วราวุฒิ, 2529)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

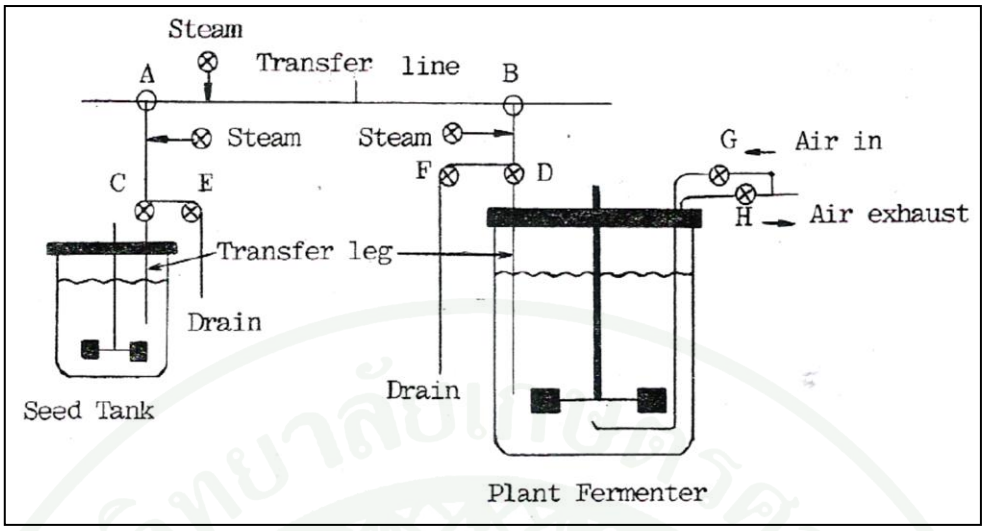


ภาพที่ 33 การถ่ายเชื้อลงสู่ถังเตรียมกล้าเชื้อในสภาพปลอดจากเชื้อ

ที่มา: วราวุฒิ (2529)

ในกรณีการถ่ายหัวเชื้อจากถังเตรียมกล้าเชื้อไปยังถังหมัก แสดงในภาพที่ 34 จะเห็นว่าวาล์ว A และB เป็นจุดติดต่อระหว่างถังหมักทั้งสอง และท่อตามแนว CABD เป็นแนวทางของการถ่ายหัวเชื้อจากถังเตรียมกล้าเชื้อไปยังถังหมัก เริ่มต้นจะต้องฆ่าเชื้อในท่อก่อนโดยการปิดวาล์ว C และ D แล้วเปิดไอน้ำอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยขณะเดียวกันเปิดวาล์ว E และF เพียงเล็กน้อยเพื่อให้ไอน้ำเล็ดลอดออกไปได้บ้าง ต่อมาทำให้ความดันในถังหมักใหญ่เพิ่มขึ้นโดยการปิดวาล์ว H และF หลังจากนั้นปิดไอน้ำ แล้วจึงเปิดวาล์ว D ซึ่งจะทำให้น้ำหมักปลอดจากเชื้อไหลผ่านวาล์ว D ขึ้นไปตลอดตามแนวท่อที่ใช้ในการถ่ายเทและทำให้อุณหภูมิภายในท่อลดลงตามที่ต้องการ ต่อมาปิดวาล์ว E และในขณะเดียวกันลดความดันในถังหมักใหญ่ลงด้วยการเปิดวาล์ว H และG ควบคุมวาล์ว G ให้เหมาะสม รวมถึงทำให้ความดันในถังเตรียมกล้าเชื้อสูงขึ้นโดยการปิดวาล์วระบายอากาศของถัง แล้วจึงเปิดวาล์ว C ทำให้หัวเชื้อในถังเตรียมหัวเชื้อไหลไปตามท่อ CABD ลงสู่ถังหมัก หลังจากนั้นจึงทำการปิดวาล์ว D และทำการฆ่าเชื้อในท่อด้วยไอน้ำร้อนอีกครั้ง เพื่อพร้อมที่จะใช้ในการถ่ายเทครั้งต่อไป (วราวุฒิ, 2529)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 34 การถ่ายหัวเชื้อจากถังเตรียมกล้าเชื้อไปยังถังหมัก

ที่มา: วราวุฒิ (2529)

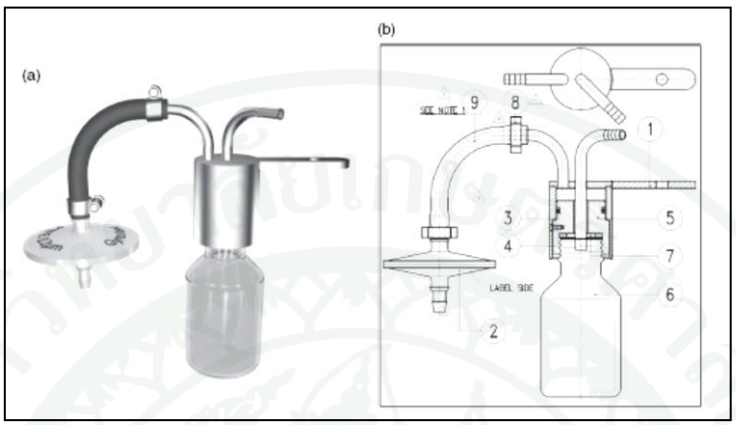
3.3.3 การเก็บตัวอย่างด้วยเทคนิคปลอดจากเชื้อ

ในระหว่างกระบวนการหมัก จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์เพื่อควบคุมกระบวนการหมัก ซึ่งต้องมีการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำก่อนและหลังการเก็บตัวอย่าง ท่อสำหรับเก็บตัวอย่างอาจอยู่ด้านข้างหรือด้านบน โดยปกติปริมาตรตัวอย่างที่เก็บทั้งหมดนั้นไม่ควรเกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลวเริ่มต้น เนื่องจากจะมีผลต่อสภาวะแวดล้อมทางกายภาพ เช่น อัตราการถ่ายโอนออกซิเจน เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องคำนวณปริมาตรใช้งาน ส่วนที่ว่างด้านบนสำหรับกักอากาศและฟองที่เกิดขึ้น และปริมาตรตัวอย่างที่ทั้งหมดที่ต้องเก็บ เพื่อที่จะได้ไม่ทำให้เกิดผลต่อสภาวะแวดล้อมทางกายภาพ

ระบบการเก็บตัวอย่างของถังหมักขนาดเล็กจะมีชุดตัวอย่างที่ทำขึ้นเป็นพิเศษแสดงดังภาพที่ 35 ส่วนระบบการเก็บตัวอย่างของถังหมักขนาดใหญ่มักจะมีระบบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำดังภาพที่ 36 ในขั้นแรกเอาภาชนะที่บรรจุน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น Formalin ออกจากปลายท่อเก็บตัวอย่าง จากนั้นเปิดไอน้ำร้อนอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ผ่านวาล์ว C และเปิดวาล์ว B เล็กน้อย เป็นเวลา 20 นาที เปิดวาล์ว A น้ำหมักไหลออกมาตามท่อ AB ซึ่งจะทำให้ท่อเย็นลง และผ่านออกทางวาล์ว B ปล่อยตัวอย่างทิ้งประมาณ 200-300 ลูกบาศก์เซนติเมตร (เนื่องจากตัวอย่างจะมีการปะปนกับไอน้ำ

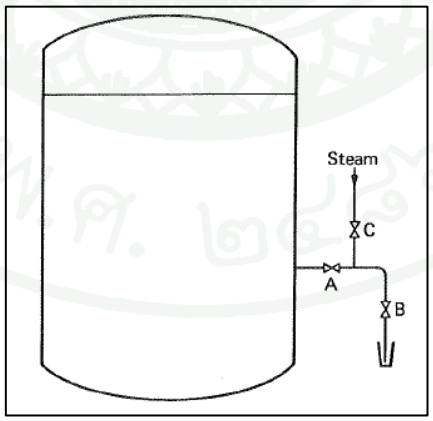
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ร้อน และเซลล์อาจมีการตายเกิดขึ้น ทำให้การตรวจวัดตัวอย่างเกิดการผิดพลาดขึ้น) จากนั้นจึงปิดวาล์ว C แล้วจึงเก็บตัวอย่างลงในขวดปลอดเชื้อที่เตรียมไว้หลังจากนั้นปิดวาล์ว A และทำการฆ่าเชื้ออีกครั้ง (วราวุฒิ, 2529)



ภาพที่ 35 ระบบการเก็บตัวอย่างของถังหมักขนาดเล็ก; (a) Sample system for an autoclavable bioreactor. (b) Sample system for an autoclavable bioreactor. 1) Connector, 2) 0.22 μm fi lter, 3) O-ring, 4) grub screw, 5) sampling system insert, 6) bottle, 7) sample pipe lid, 8) clamp, 9) tubing

ที่มา: McNeil and Harvey (2008)



ภาพที่ 36 วิธีการเก็บตัวอย่างโดยวิธีปลอดจากเชื้อ

ที่มา: วราวุฒิ (2529)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.4 การปิดแกนหมุนที่ฝาบนของถังหมักเพื่อให้ได้สภาพปลอดจากเชื้อปนเปื้อนจากภายนอก (Aseptic agitator shaft seals)

วัตถุประสงค์ในการปิดแกนหมุนที่ฝาบนของถังหมัก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอกเข้าสู่ถังหมัก และช่วยจัดแกนหมุนให้สามารถทำงานได้ตลอดเวลาไม่มีการสึกหรอหรือไหม้ การปิดแกนหมุนนี้มีหลายแบบขึ้นกับขนาดของถังหมัก ซึ่งได้อธิบายไว้ในหัวข้ออุปกรณ์สำหรับยึดแกนใบพัด (Stirrer glands and bearings)ในถังหมักขนาดใหญ่ นิยมใช้แบบ Mechanical seal เป็นส่วนใหญ่ (วราวุฒิ, 2529)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล

1.1 ถังหมักขนาด 60 ลิตร (แสดงในหัวข้อวิธีการออกแบบและสร้างถังหมัก)

1.2 หม้อกำเนิดไอน้ำ (Steam boiler) (Geyser, Model Geysermod, U.S.A.)

1.3 เครื่องควบคุมค่า pH (pH controller) (Hanna instruments, Model BL931700-1, U.S.A.)

1.4 หัววัดค่า pH (pH sensor) (Hanna instruments, Model HI1090B/5, U.S.A.)

1.5 เครื่องควบคุมค่า ORP (ORP controller) (Hanna instruments, Model BL932700-1, U.S.A.)

1.6 หัววัดค่า ORP (ORP sensor) (Hanna instruments, Model HI3090B/5, U.S.A.)

1.7 น้ำยาปรับตั้งค่า pH 4.01 และ pH 7.01 (pH buffer solution) (Hanna instruments, U.S.A.)

1.8 น้ำยาปรับตั้งค่า ORP 240 mV (ORP buffer solution) (Hanna instruments, U.S.A.)

1.9 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller) (Toho, Model TTM-J4)

1.10 หัววัดอุณหภูมิ ชนิด K (Temperature sensor)

1.11 ปั๊มลม (Air compressor) (Puma industrial)

1.12 Regulator (SKP, Model SAL2000-2 และ SAW2000, Korea)

1.13 Air flow meter ขนาด 25 ลิตรต่อนาที ที่ 20 องศาเซลเซียส 0.15 เมกะปาสคาล (MPa) (Okura)

1.14 Solenoid valve (Parker Hannifin, Model VE146V)

1.15 Syringe filter nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (National scientific, Model SY2525NN)

1.16 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 3200 กรัม ความละเอียด 0.01 กรัม (Sartorius, Model BSA3202S-CW, Germany)

1.17 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 220 กรัม ความละเอียด 0.0001 กรัม (Sartorius, Model BSA224S-CW, Germany)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.18 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 20 กิโลกรัม ความละเอียด 2 กรัม (Sartorius, Model QS 32A-V2, Germany)

1.19 นาฬิกาจับเวลา (CITIZEN Model QT 9017A, Japan)

1.20 เครื่องวัดความเร็วรอบแกนเพลา (Promax, Dual Digital Tachometer Model MR-275, France)

1.21 อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ ที่ใช้ในห้องทดลอง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำหมัก

2.1 เครื่องเหวี่ยงแยก (Labquip, Centurion Model 1000 series, UK)

2.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Schott gerate, Model CG818, Germany)

2.3 หลอดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 ml (Centrifuge Tubes)

2.4 อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ ที่ใช้ในห้องทดลอง

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำหมัก

3.1 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเอทานอลโดยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC)

3.1.1 Gas Chromatography (Hewlett packard, Model HP6890, U.S.A.)

3.1.2 Headspace (Hewlett packard, Model HP 7694E, U.S.A.)

3.1.3 Flame Ionization Detector (FID)

3.1.4 คอลัมน์ Capillary Column HP-1 (Methyl Siloxane) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 320 นาโนเมตร ความหนาของสารเคลือบภายในคอลัมน์ 0.25 นาโนเมตร (Hewlett packard, U.S.A.)

3.1.5 Flat bottom headspace vials ขนาด 20 ml (Agilent technologies, U.S.A.)

3.1.6 Septa, tan PTFE/silicone ขนาด 20 mm (Agilent technologies, U.S.A.)

3.1.7 aluminum crimp cap ขนาด 20 mm (Agilent technologies, U.S.A.)

3.1.8 Crimper, 20 mm (Agilent technologies, U.S.A.)

3.1.9 Decapper, 20 mm (Agilent technologies, U.S.A.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.10 Auto pipette (Capp, Denmark)

3.1.11 อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ ที่ใช้ในห้องทดลอง

3.2 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Lane and Eynon's volumetric method (ตาม มอก. 268-2521)

3.2.1 Hot plate Stirrer (V.go, Model V.mag HS 7)

3.2.2 Burette ขนาด 50 ml

3.2.3 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 220 กรัม ความละเอียด 0.0001 กรัม (Sartorius, Model BSA224S-CW, Germany)

3.2.4 อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ ที่ใช้ในห้องทดลอง

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในน้ำแป้งมันสำปะหลังโดยใช้แฮนด์รีแฟรคโตมิเตอร์ (Hand Refractometer)

3.3.1 Hand Refractometer 0-32 oBrix (Atago, Model ATC-1, Japan)

3.3.2 ผ้าขาวบาง

3.3.3 อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ ที่ใช้ในห้องทดลอง

3.4 การหาความชื้นมันเส้นบด (AOAC, 2000)

3.4.1 ตู้อบลมร้อน (Binder, Model RF 115)

3.4.2 ถ้วยอะลูมิเนียม

3.4.3 โถดูดความชื้น (Desiccator)

3.4.4 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 220 กรัม ความละเอียด 0.0001 กรัม (Sartorius, Model BSA224S-CW, Germany)

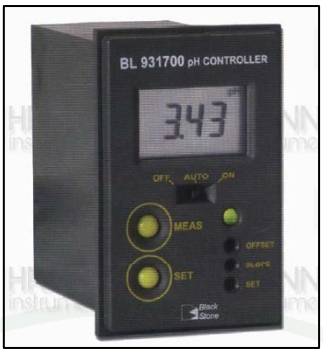
3.4.5 อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ ที่ใช้ในห้องทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

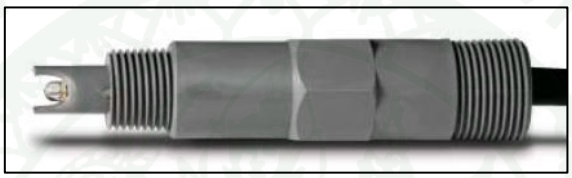
ภาพที่ 37 ถังหมักขนาด 60 ลิตร ที่ใช้ในการย่อยและหมักเอทานอลจากมันเส้นบด

ภาพที่ 38 หม้อกำเนิดไอน้ำ (Steam boiler)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 39 เครื่องควบคุมค่า pH (pH controller)



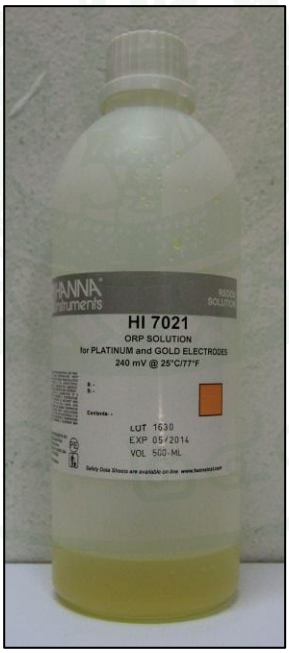
ภาพที่ 40 หัววัดค่า pH (pH sensor)

ภาพที่ 41 เครื่องควบคุมค่า ORP (ORP controller)

ภาพที่ 42 หัววัดค่า ORP (ORP sensor)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

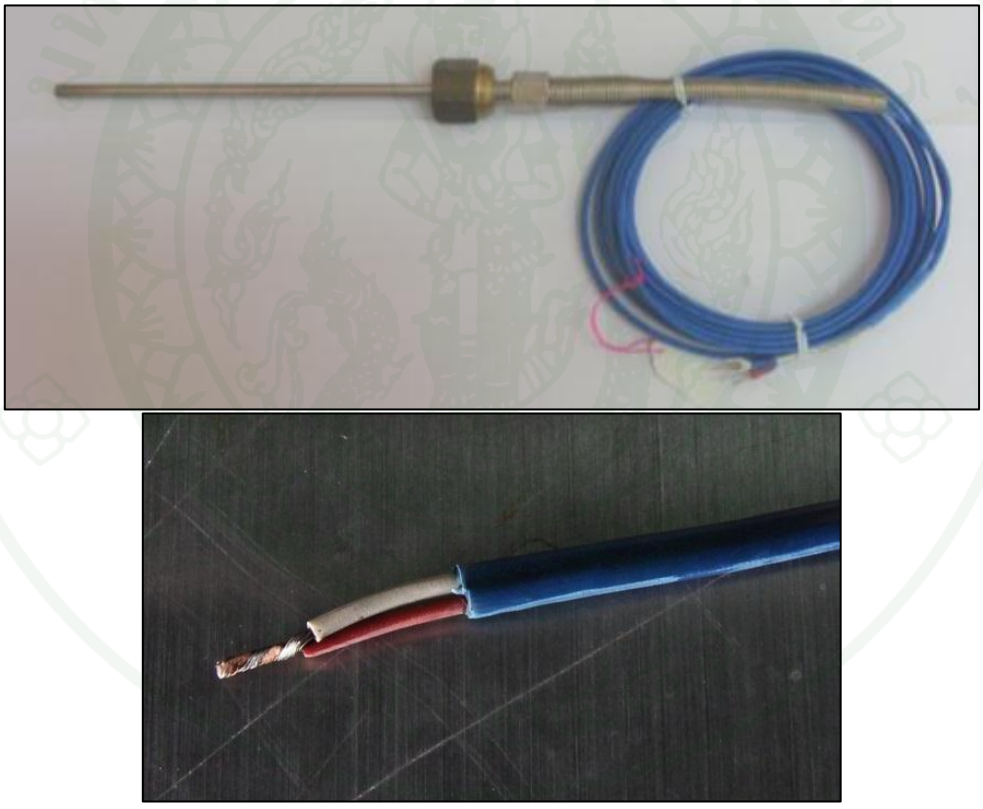
ภาพที่ 43 น้ำยาปรับตั้งค่า pH 4.01 (ซ้าย) และ pH 7.01 (ขวา)



ภาพที่ 44 น้ำยาปรับตั้งค่า ORP 240 mV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 45 เครื่องวัดอุณหภูมิ (Temperature controller



ภาพที่ 46 หัววัดอุณหภูมิ (Temperature sensor)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 47 ปั๊มลม (Air compressor)

ภาพที่ 48 Regulator

ภาพที่ 49 Air flow meter

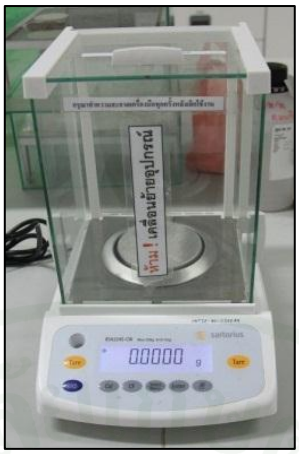
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 50 Solenoid Valve

ภาพที่ 51 Syringe filter nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ภาพที่ 52 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 3200 กรัม ความละเอียด 0.01 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 53 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 220 กรัม ความละเอียด 0.0001 กรัม

ภาพที่ 54 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ขนาด 20 กิโลกรัม ความละเอียด 2 กรัม

ภาพที่ 55 นาฬิกาจับเวลา

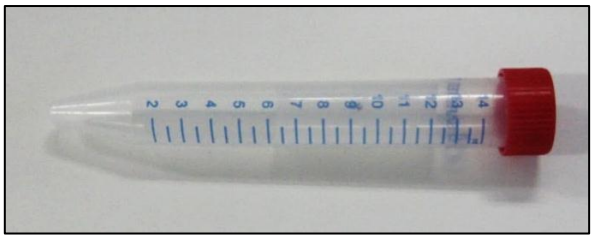
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 56 เครื่องวัดความเร็วรอบแกนเพลา

ภาพที่ 57 เครื่องเหวี่ยงแยก

ภาพที่ 58 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 59 หลอดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 ml

ภาพที่ 60 Gas Chromatography ต่อพ่วงกับ Headspace

ภาพที่ 61 Flat bottom headspace vials ขนาด 20 ml

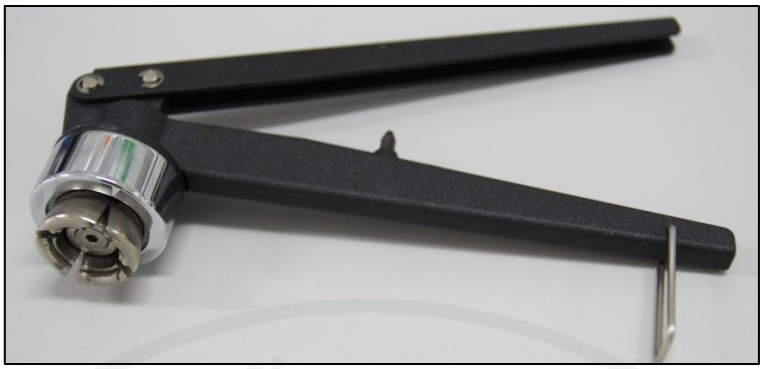
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 62 Septa, tan PTFE/silicone ขนาด 20 mm

ภาพที่ 63 Aluminum crimp cap ขนาด 20 mm

ภาพที่ 64 Crimper, 20 mm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 65 Decapper, 20 mm

ภาพที่ 66 Hot plate Stirrer

ภาพที่ 67 Burette ขนาด 50 ml

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 68 Hand Refractometer 0-32 ^{o}Brix

ภาพที่ 69 ตู้อบลมร้อน

ภาพที่ 70 โถดูดความชื้น (Desiccator)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. สารเคมี

4.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax, Australia)

4.2 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.H_2O$) (Ajax, Australia)

4.3 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (96 % of H_2SO_4) (Ajax, Australia)

4.4 กลูโคสบริสุทธิ์ (D-Glucose, $C_6H_{12}O_6$) (Ajax, Australia)

4.5 เอทานอล (ethanol 99.9%) (Merck, Germany)

4.6 ไอโซโพรพานอล (propan-2-ol) (Ajax, Australia)

4.7 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Ajax, Australia)

4.8 โปตัสเซียมโซเดียมตาร์เตรตเตตระไฮเดรต ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) (Ajax, Australia)

4.9 เมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ (Methylene blue indicatior) (Ajax, Australia)

4.10 น้ำกลั่น

5. วัตถุดิบ

มันเส้นบด

ภาพที่ 71 มันเส้นบด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. จุลินทรีย์

ยีสต์แห้ง *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green (AB Mauri, China) อัตราการส่วนในการใช้เท่ากับ ยีสต์แห้ง 0.6-1.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม

ภาพที่ 72 ยีสต์แห้ง *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green

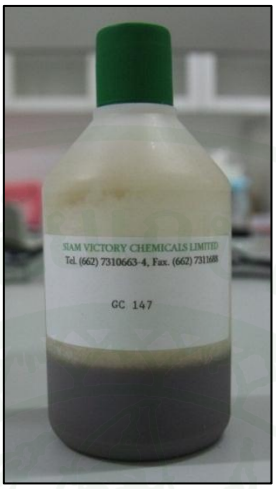
7. เอนไซม์

7.1 เอนไซม์ α-amylase ชื่อทางการค้า GC358 (Genencor International Wisconsin Inc., U.S.A.) ใช้ในอัตราส่วน 0.20-0.24 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม

ภาพที่ 73 เอนไซม์ α-amylase ชื่อทางการค้า GC358

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.2 เอนไซม์ glucoamylase ชื่อทางการค้า GC147 (Genencor International Wisconsin Inc., U.S.A.) ใช้ในอัตราส่วน 0.50-0.75 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม



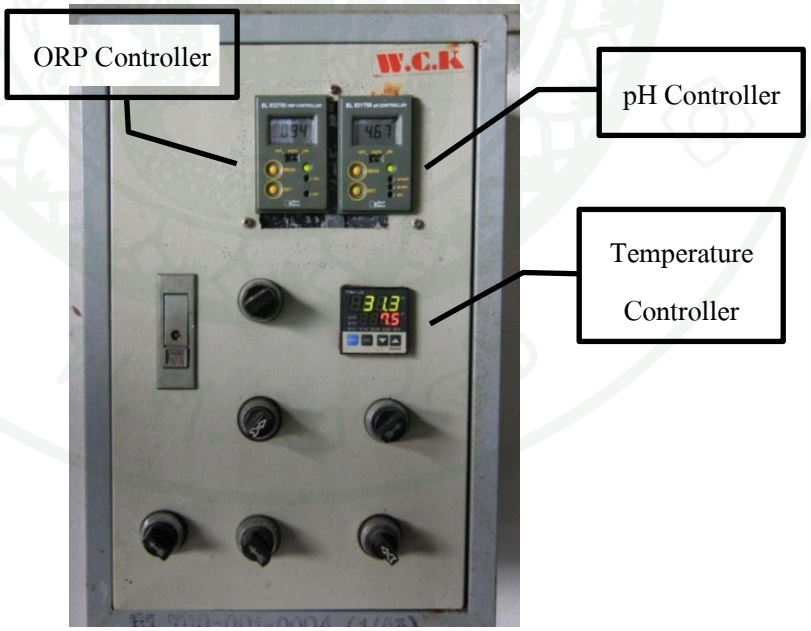
ภาพที่ 74 เอนไซม์ Glucoamylase ชื่อทางการค้า GC147

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

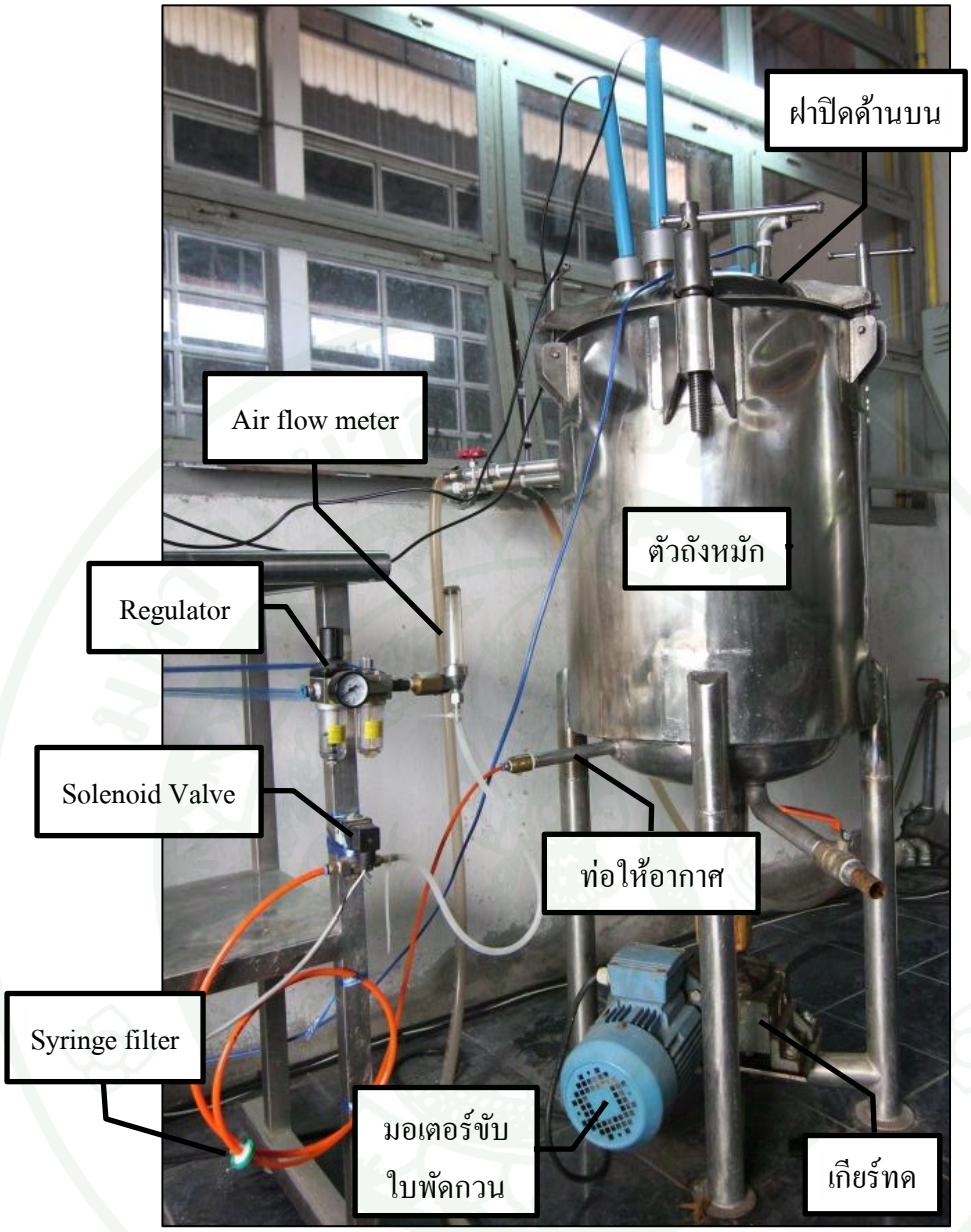
1. การออกแบบ และสร้างถังหมัก

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก และควบคุมค่า Oxidation-reduction potential (ORP) โดยการออกแบบ และสร้างถังหมัก จะต้องทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้สำหรับการเจริญของยีสต์ เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการ ซึ่งการออกแบบถังหมักที่ใช้กับงานวิจัยนี้ จะต้องมีระบบควบคุมการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก โดยใช้เครื่องควบคุมค่า ORP เป็นตัวควบคุมการปล่อยอากาศเข้าภายในถัง ดังนั้นการออกแบบถังหมักในงานวิจัยนี้จะออกแบบให้มีปริมาตรใช้งาน 60 ลิตร ในภาพที่ 75, 76 และ 77 แสดงลักษณะตู้ควบคุมถังหมัก และส่วนประกอบของถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ที่ประกอบเสร็จเรียบร้อยตามลำดับ



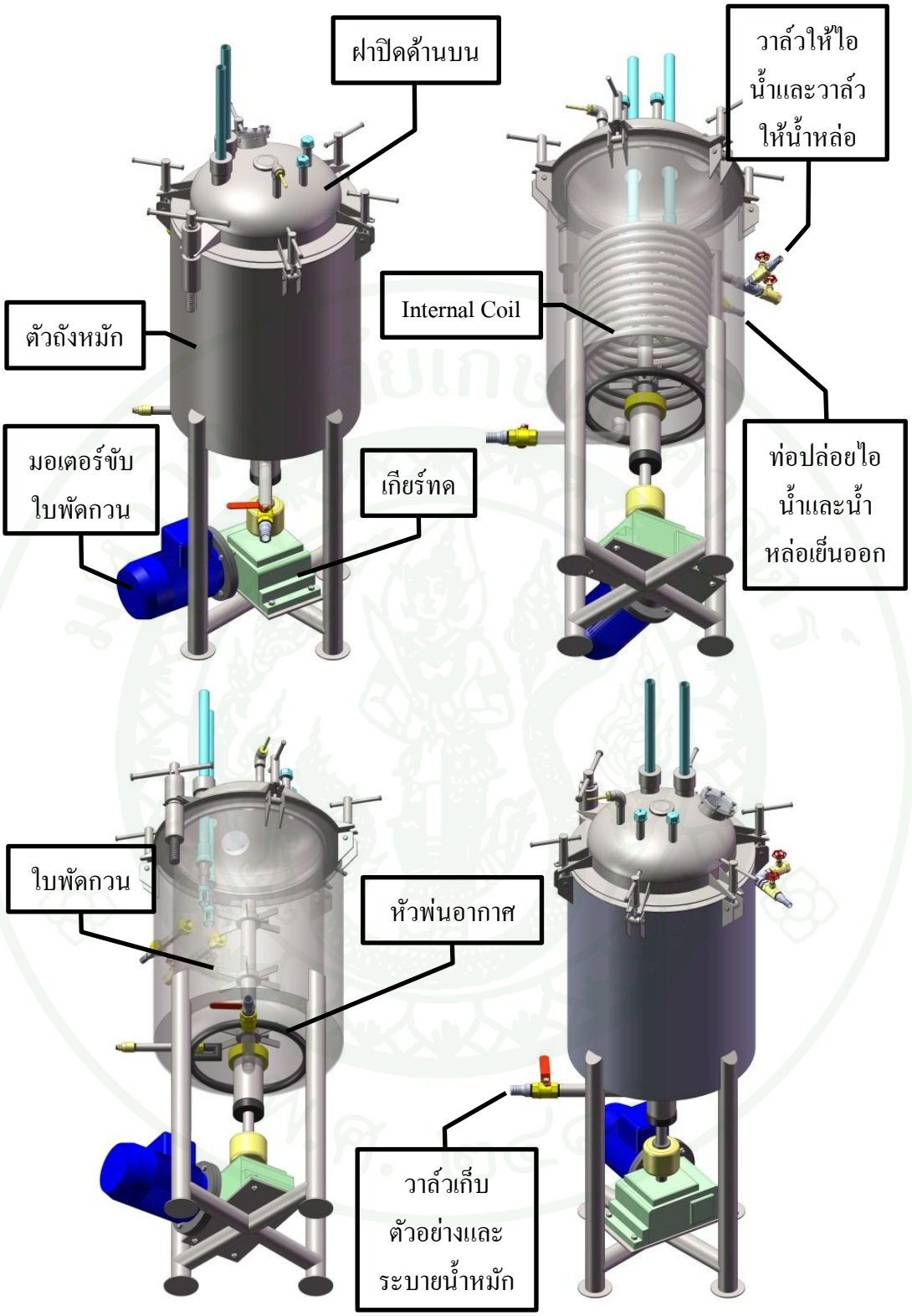
ภาพที่ 75 ตู้ควบคุมถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 76 ถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ที่ประกอบเสร็จเรียบร้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

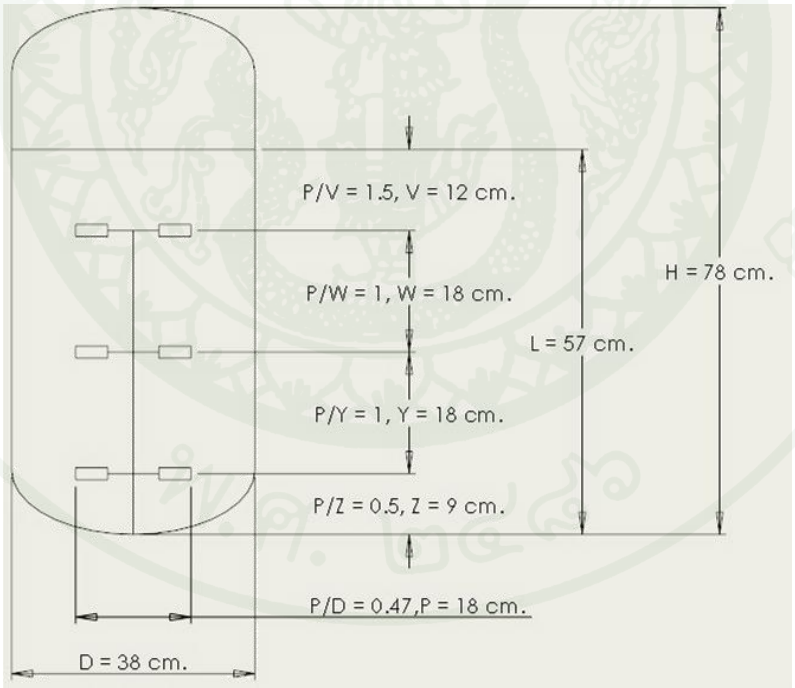


ภาพที่ 77 ส่วนประกอบของถังหมักสำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 ตัวถังหมัก (Fermentation vessels)

ตัวถังเป็นรูปทรงกระบอกทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) เกรด 304 หนา 3.0 มิลลิเมตรที่สามารถทนการกัดกร่อนจากกรดและเบสได้ ก้นถังจะเป็นแบบฝาครึ่งทรงรี ที่สามารถปล่อยของเหลวไหลออกได้ง่าย ไม่ตกค้าง และสามารถช่วยเพิ่มความต้านทานต่อแรงดันภายในถังหมักได้ดีขึ้น โดยหลักการการออกแบบขนาดของตัวถังหมักได้อ้างอิงจาก McNeil and Harvey (2008) , Stanbury *et al.* (1999) และวิทยา (2538) โดยการคำนวณอัตราส่วนต่าง ๆ ในการออกแบบถังหมักเริ่มต้นโดยการกำหนดเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมัก (D) = 38 เซนติเมตร และจากนั้นใช้ค่า D หาขนาดต่าง ๆ ดังนี้ ความสูงของถังหมัก (H) เท่ากับ H/D = 2.05 เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดกวน (P) เท่ากับ P/D = 0.47 ระยะห่างระหว่างใบพัดกวนกับก้นถัง (Z) เท่ากับ P/Z = 0.5 ระยะห่างใบพัดกวน (W และ Y) เท่ากับ P/W = P/Y = 1 และระยะห่างระหว่างใบพัดกวนกับระดับของของเหลว (V) เท่ากับ P/V = 1.5 โดยการคำนวณขนาดของถังหมักที่ประกอบด้วย 3 ใบพัดกวนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ขนาดต่าง ๆ ของถังหมัก แสดงดังภาพที่ 78



ภาพที่ 78 ขนาดของถังหมักที่ประกอบด้วย 3 ใบพัดกวน ที่ได้จากการคำนวณ โดยอ้างอิงจาก McNeil and Harvey (2008) , Stanbury *et al.* (1999) และวิทยา (2538)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมัก (D)	=	38	เซนติเมตร
ความสูงของถังหมัก (H ; H/D = 2.05)	=	78	เซนติเมตร
ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ (L)	=	57	เซนติเมตร
เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดกวน (P ; P/D = 0.47)	=	18	เซนติเมตร
ระยะห่างระหว่างใบพัดกวนกับระดับของของเหลว (V ; P/V = 1.5)	=	12	เซนติเมตร
ระยะห่างใบพัดกวน (W และY ; P/W = 1, P/Y = 1)	=	18	เซนติเมตร
ระยะห่างระหว่างใบพัดกวนกับก้นถัง (Z ; P/Z = 0.5)	=	9	เซนติเมตร

รอบตัวถังหมักมีการบุฉนวนใยแก้ว หนา 5 เซนติเมตร ซึ่งเป็นฉนวนกันความร้อน เพื่อป้องกันความร้อนออกสู่ภายนอก เนื่องจากในขั้นตอนการย่อยมันเส้นบดให้เป็นน้ำตาลใช้อุณหภูมิสูงถึง 85 องศาเซลเซียส มีชุดล็อคฝาถังเข้ากับตัวถังจำนวน 5 ชุด ซึ่งเป็นแบบเกลียวหมุนบีบฝาถังเข้ากับตัวถัง มีการให้ความร้อนด้วยไอน้ำและควบคุมอุณหภูมิที่ 85 และ 65 องศาเซลเซียส ในระหว่างการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล จะทำให้ถังหมักเก็บความร้อนได้นานขึ้น ซึ่งจะใช้ปริมาณไอน้ำน้อยลง ตัวถังหมักมีการเจาะรูเป็นช่องต่าง ๆ ดังนี้ และแสดงดังภาพที่ 79

ภาพที่ 79 ลักษณะตัวถังหมัก

1.1.1 ช่องสำหรับท่อขนาด 0.5 นิ้ว 4 ท่อ คือ ท่อไอน้ำ ท่อน้ำหล่อเย็นเข้า ท่อไอน้ำหรือน้ำหล่อเย็นออก และท่อปล่อยอากาศเข้าสู่ถังหมัก

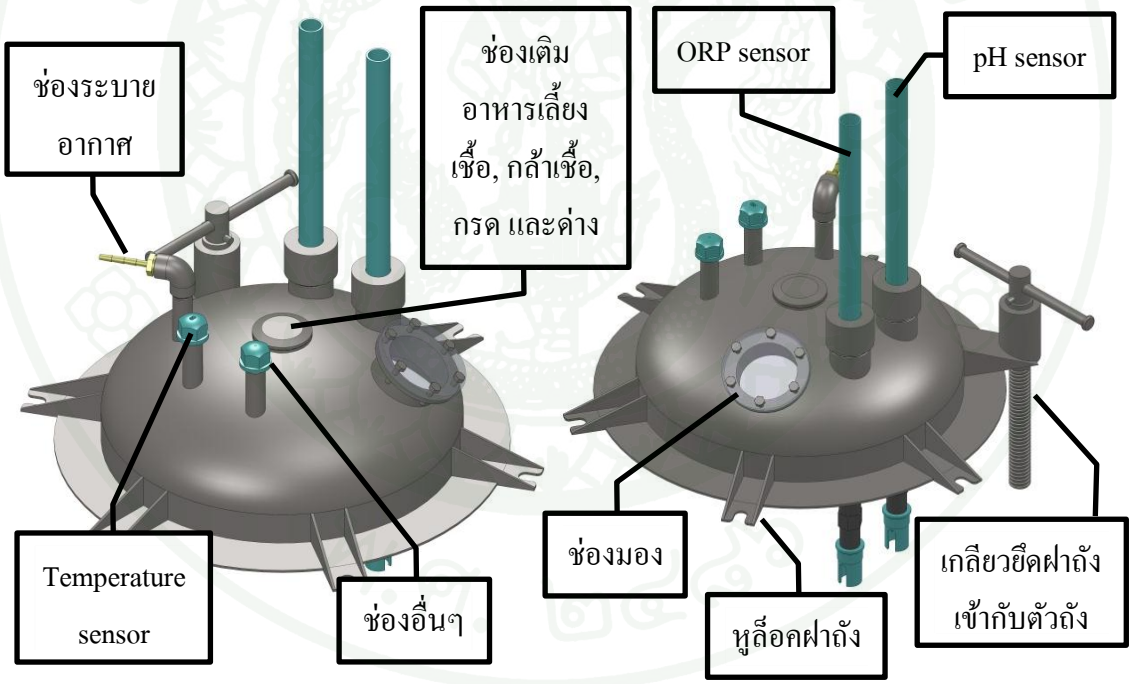
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1.2 ช่องสำหรับท่อขนาด 1 นิ้ว ที่ด้านล่างของถังหมัก เพื่อเก็บตัวอย่าง และระบายน้ำหมักออกจากถังหมัก

1.1.3 ช่องสำหรับติดตั้งตัวมอเตอร์ขนาด 3 นิ้ว เพื่อใช้ในการขับเคลื่อนใบพัดกวน ทางด้านล่างของถังหมัก

1.2 ฝาปิดด้านบนของถังหมัก (Head Plate Fittings)

ฝาปิดด้านบนของถังหมัก ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด 304 ใช้สำหรับเปิด-ปิดถังหมักจากทางด้านบนของตัวถังหมัก โดยมีหูล็อคฝาถังจำนวน 5 หู เพื่อบีบฝาถังเข้ากับตัวถัง ทำให้ฝาถังปิดเข้ากับถังหมักได้สนิท ไม่ให้อากาศ หรือสิ่งปนเปื้อนจากภายนอกเข้าสู่ถังหมัก และมีเกลียวยึดฝาถังเข้ากับตัวถัง ซึ่งจะเป็นเกลียวหมุน ทำให้ฝาถังเลื่อนขึ้น-ลง และหมุนไปทางซ้าย-ขวาได้อย่างอิสระ ฝาปิดด้านบนของถังหมักมีการเจาะรูเป็นช่องต่าง ๆ ดังนี้ และแสดงดังภาพที่ 80



ภาพที่ 80 ลักษณะฝาปิดด้านบนของถังหมัก

1.2.1 ช่องสำหรับติดตั้ง pH sensor ขนาด 1.5 นิ้ว เกลียวท่อ NPT

1.2.2 ช่องสำหรับติดตั้ง ORP sensor ขนาด 1.5 นิ้ว เกลียวท่อ NPT

1.2.3 ช่องสำหรับติดตั้ง Temperature sensor ขนาด 0.5 นิ้ว เกลียวท่อ NPT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2.4 ช่องมอง ขนาด 3 นิ้ว

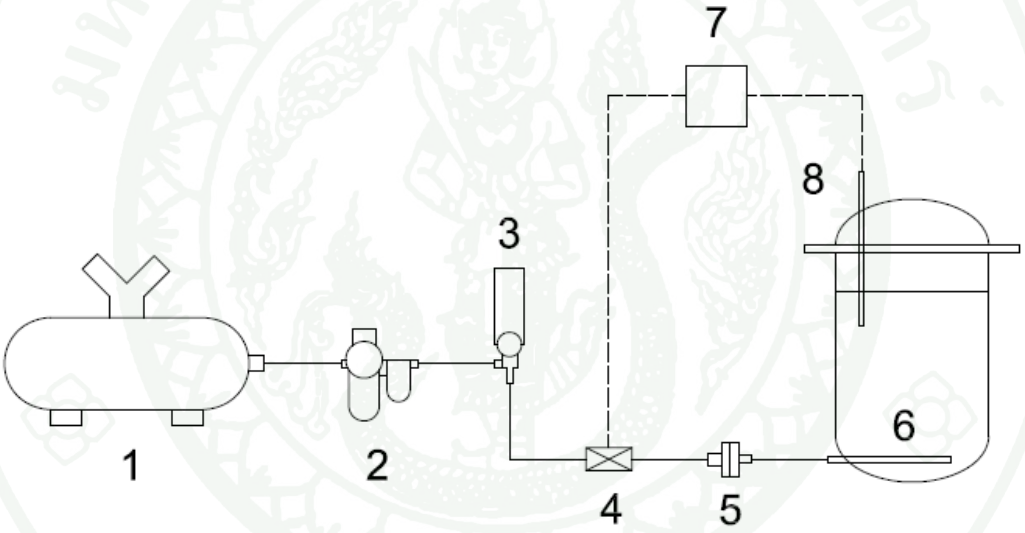
1.2.5 ช่องสำหรับเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ กล้าเชื้อ กรด และด่าง ใช้ Ferrule ขนาด 2 นิ้ว

1.2.6 ช่องสำหรับอากาศที่จะผ่านออกไปจากถังหมัก ขนาด 0.5 นิ้ว เกลียวท่อ NPT

1.2.7 ช่องอื่น ๆ 1 ช่อง ขนาด 0.5 นิ้ว เกลียวท่อ NPT

1.3 ระบบควบคุมค่า ORP

ระบบควบคุมค่า ORP ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 8 ส่วน คือ ORP controller, ORP sensor, ปั๊มลม, Regulator, Air flow meter, Solenoid valve, Syringe filter และ Sparger ประกอบเข้าด้วยกันดังภาพที่ 81



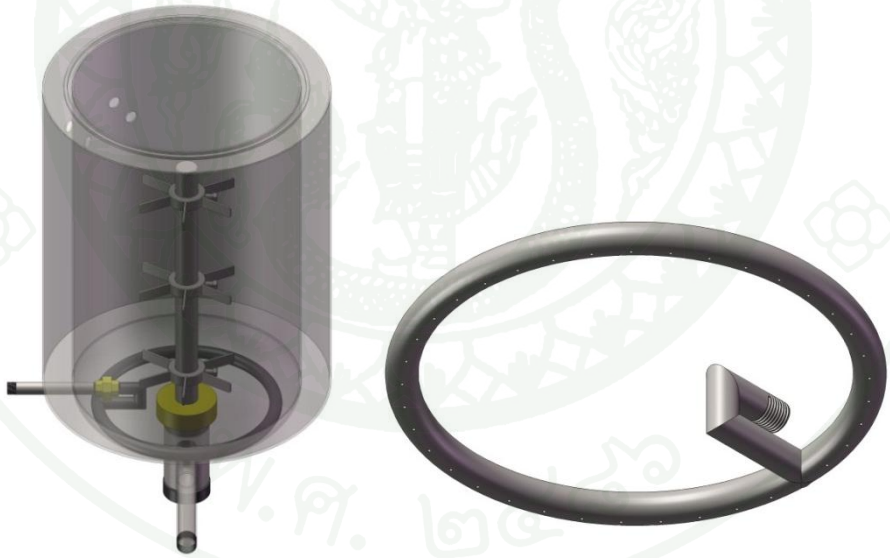
1. ปั๊มลม
2. Regulator
3. Air flow meter
4. Solenoid valve
5. Syringe filter
6. Sparger
7. ORP controller
8. ORP sensor

ภาพที่ 81 ระบบควบคุมค่า ORP ของถังหมักเอทานอล

การควบคุมค่า ORP ด้วยเครื่องควบคุมค่า ORP (ORP controller) และหัววัดค่า ORP (ORP sensor) ซึ่ง ORP controller จะทำงานโดยการตั้งค่าไว้ตามที่กำหนด เมื่อค่า ORP ต่ำกว่าค่าที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กำหนดไว้ ORP controller จะส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยัง solenoid valve ให้เปิดวาล์วปล่อยอากาศเข้ามาในถังหมักจนกระทั่งค่า ORP ปรับมาอยู่ในระดับที่ต้องการ ORP controller จะส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยัง solenoid valve ให้วาล์วปิดโดยอัตโนมัติ โดยอากาศที่เข้าไปในถังหมักจะเริ่มจากปั๊มลม ซึ่งจะมีแรงดันมาก จึงต้องลดแรงดันลมและควบคุมให้คงที่ด้วย Regulator และผ่านต่อไปยัง Air flow meter โดยตั้งอัตราการไหลที่ 5 ลิตรต่อนาที และอากาศจะถูกกรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ทำให้ได้อากาศที่ปลอดเชื้อผ่านเข้าสู่ตัวถังหมักทางท่อด้านล่างที่เรียกว่าท่อพ่นอากาศ (sparger) และถูกตีให้ฟองมีขนาดเล็กโดยใบพัดกวน เพื่อป้องกันการปัญหาอุดตัน จึงเลือกใช้หัวพ่นอากาศแบบ Ring Sparger ที่ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดท่อ 0.5 นิ้ว และมีรูพ่นอากาศขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร รอบวงแหวนพ่นอากาศ ดังภาพที่ 82 ซึ่งหัวพ่นอากาศแบบ Ring Sparger สามารถครอบคลุมการให้อากาศได้อย่างทั่วถึง ทำให้มีการกระจายตัวของอากาศที่ดีและยังเพิ่มความสามารถในการตีฟองอากาศจากใบพัดกวนแบบ Open Turbine แบบใบพัดตั้งตรง ได้ดียิ่งขึ้น การติดตั้งจะคว่ำ Ring sparger ด้านที่มีรูลงด้านล่าง เพื่อป้องกันการอุดตันของน้ำหมัก และทำให้อากาศสัมผัสกับน้ำหมักได้มาก และนานยิ่งขึ้น



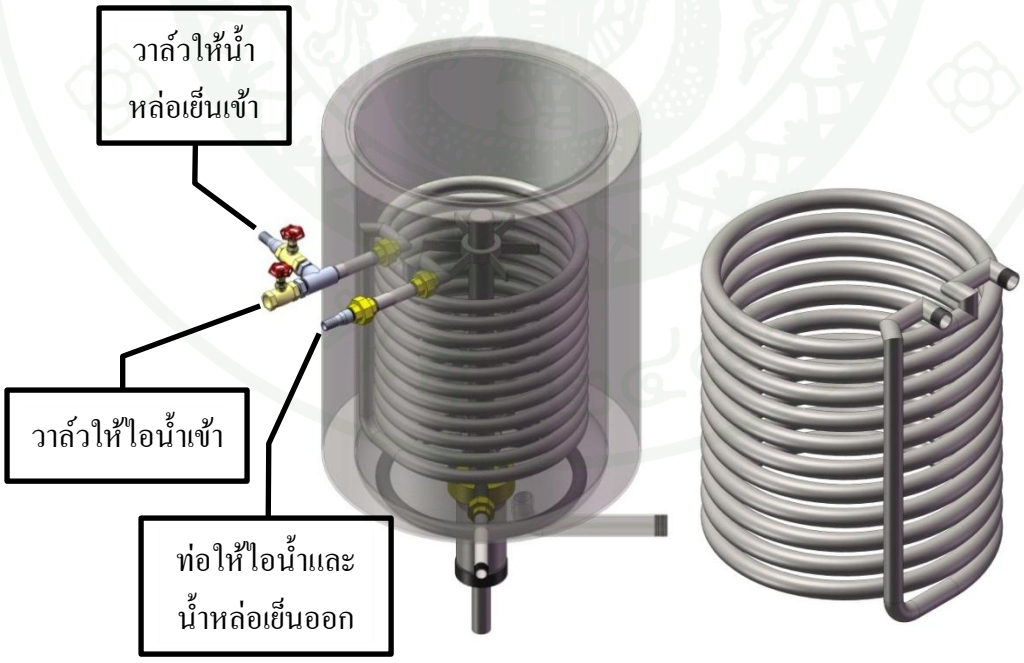
ภาพที่ 82 หัวพ่นอากาศแบบ Ring sparger

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 ระบบควบคุมอุณหภูมิ

การควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักในถังหมักจะประกอบด้วย การเพิ่มอุณหภูมิด้วยการให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำ และการลดอุณหภูมิด้วยน้ำหล่อเย็นที่อุณหภูมิปกติ (อุณหภูมิห้อง ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) โดยอาศัยการทำงานจาก Temperature sensor ที่อยู่ในถังหมัก ซึ่งจะแสดงอุณหภูมิในถังหมักที่หน้าจอของเครื่องวัดอุณหภูมิ (Temperature indicator) เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าที่ต้องการจึงเปิดวาล์วเพื่อส่งไอน้ำ หรือน้ำหล่อเย็นเข้ามาในถังหมัก โดยผ่าน Internal coil ที่อยู่ในถังหมัก ซึ่ง Internal coil มีลักษณะเป็นท่อขดเป็นวงกลมเรียงกันเป็นชั้น ๆ อยู่ภายในถังหมัก ดังภาพที่ 83 โดยน้ำหล่อเย็นหรือไอน้ำจะไหลผ่าน Internal coil เพื่อควบคุมอุณหภูมิภายในถังหมัก ซึ่งจะสามารถเพิ่มและลดอุณหภูมิภายในถังหมักได้อย่างรวดเร็ว

การเพิ่มอุณหภูมิจะทำได้โดยการปล่อยไอน้ำจากเครื่องกำเนิดไอน้ำ โดยปิดวาล์วของท่อน้ำหล่อเย็นและเปิดวาล์วของท่อไอน้ำ แล้วไอน้ำจะเข้าสู่ Internal coil และจากนั้นไอน้ำที่ผ่านการแลกเปลี่ยนความร้อนจะกลายเป็นน้ำแล้วจึงไหลออกจาก coil ส่วนการลดอุณหภูมิ จะปิดวาล์วของท่อไอน้ำและเปิดวาล์วของท่อน้ำหล่อเย็น ให้น้ำหล่อเย็นเข้าสู่ coil และจากนั้นจึงออกจาก coil โดย Coil ที่อยู่ภายในถังจะถ่ายเทความร้อนให้แก่น้ำแป้งในระหว่างการหมักทำให้อุณหภูมิลดลง



ภาพที่ 83 ลักษณะของ Internal coil ที่ติดตั้งในถังหมัก

1.5 ระบบการกวนผสม

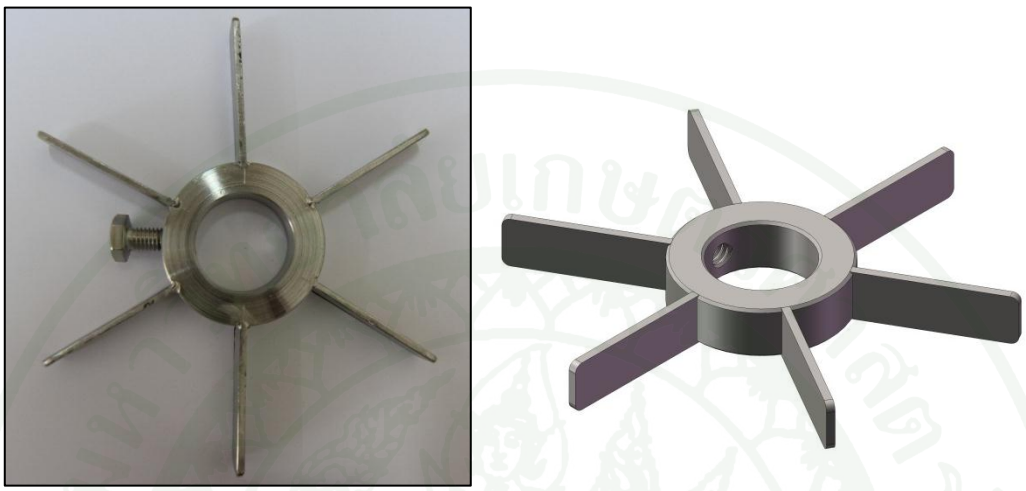
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบการกวนผสมมีประโยชน์สำหรับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก และควบคุมค่า ORP คือ กวนผสมน้ำหมักให้เข้ากัน ไม่ทำให้น้ำหมักตกตะกอน ช่วยให้การกระจายความร้อนในถังหมักสม่ำเสมอ และทำให้การกระจายตัวของอากาศในถังหมักสม่ำเสมอ ดังนั้น ระบบการกวนผสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ระบบการกวนผสมประกอบด้วย ใบพัดกวน และมอเตอร์ ใบพัดกวนที่เลือกใช้ในการหมักเอทานอล คือ Open Turbine แบบใบพัดตั้งตรง เนื่องจากสามารถตีฟองอากาศที่ถูกพ่นเข้ามาในถังหมักให้แตกกระจายออกได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่เกิด Air bubble flooding ที่บริเวณแกนใบพัด ทำให้อากาศภายในถังหมักมีความเข้มข้นที่สม่ำเสมอกันทั่วทั้งถังหมัก รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อ กล้าเชื้อ กรด และด่าง ที่ถูกเติมลงไปในถังหมัก และทำให้น้ำหมักไม่ตกตะกอน โดยใบพัดกวนที่ใช้ในถังหมักจะมีทั้งหมด 3 ใบพัดกวน วางที่ระดับความสูงที่แตกต่างกัน ซึ่งได้จากการคำนวณในการออกแบบขนาดตัวถังหมักในหัวข้อที่ 1.1 โดยมีระยะห่างระหว่างใบพัดกวนกับก้นถัง (Z) 100 เซนติเมตร และระยะห่างใบพัดกวน (W และ Y) 200 เซนติเมตร ดังภาพที่ 76 ส่วนมอเตอร์ใช้ขนาด 1 hp (0.75 kW) ต่อกับเกียร์ทดในอัตรา 1:20 และต่อเข้ากับเพลาของใบพัดกวน ดังภาพที่ 84

ภาพที่ 84 ลักษณะของใบพัดกวนที่ติดตั้งในถังหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใบพัดกวนที่ใช้ในการหมักเอทานอล เป็นชนิด Open Turbine แบบใบพัดตั้งตรง ออกแบบโดยใช้หลักการของ Stanbury *et al.* (1999) จะได้ เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดกวน 18 เซนติเมตร และความกว้างของใบพัดกวน 18 มิลลิเมตร ซึ่งใบพัดจะมีทั้งหมด 6 แฉก ดังภาพที่ 85



ภาพที่ 85 ใบพัดกวนของถังหมัก

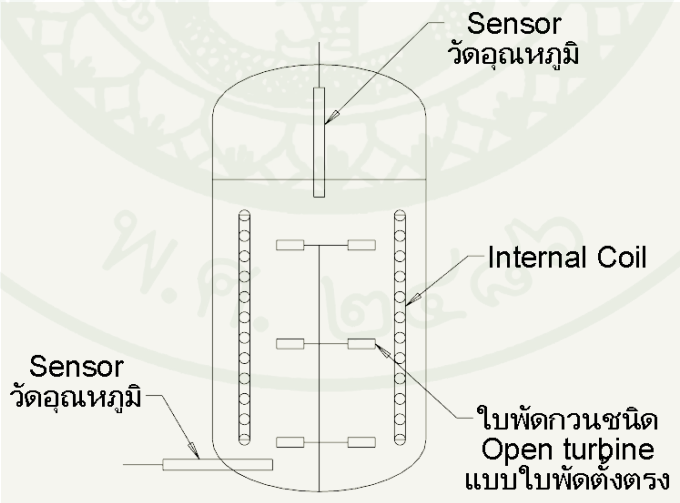
1.6 เครื่องวัดค่า pH

ในการทดลองนี้จะทำการหมักแบบ Batch จึงไม่จำเป็นต้องควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก pH ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะถูกปรับให้เหมาะสมก่อนการหมักจะเริ่มขึ้น ดังนั้นจึงใช้ pH controller และ pH sensor ในการวัดค่า pH ของน้ำหมัก โดย pH sensor จะถูกติดตั้งอยู่กับฝาปิดด้านบนของถังหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมัก เนื่องจากการกวนด้วยใบกวน

การทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมัก เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดว่าระบบการเพิ่มและลดอุณหภูมิโดยใช้ Internal coil และระบบการกวนจากใบพัดกวน ชนิด Open Turbine แบบใบพัดตั้งตรง สามารถทำให้อุณหภูมิภายในถังหมักเกิดการจายอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งถ้าภายในถังมีการกระจายอุณหภูมิที่สม่ำเสมอ ก็สามารถบอกได้ว่าการกระจายของวัตถุดิบที่อยู่ภายในถังหมักในระหว่างการหมัก ก็จะมีการกระจายตัวสม่ำเสมอโดยถ้ามีการกระจายที่ดีจะมีผลทำให้ป้องกันการตกตะกอนของเซลล์ และสารแขวนลอยต่าง ๆ นอกจากนี้ยังช่วยให้เกิดการกระจายของฟองอากาศทำให้ฟองอากาศมีขนาดเล็กลงจึงช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนได้ และยังเป็นตัวชี้วัดได้ว่าน้ำหมักมีการผสมและกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอเช่นเดียวกัน โดยจะทำการวัดอุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านบนและด้านล่างของถังหมัก โดยใช้ Sensor วัดอุณหภูมิ 2 ตัว ดังแสดงในภาพที่ 86 เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิโดยใช้ไอน้ำ และลดอุณหภูมิโดยใช้น้ำหล่อเย็นผ่าน Internal coil ซึ่งมีการกวนน้ำภายในถังหมักจากใบพัดกวนอย่างต่อเนื่องที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที โดยจะทำการบันทึกค่าอุณหภูมิทุกๆ 2 นาที จนกระทั่งอุณหภูมิสูงจนถึงค่า 90 องศาเซลเซียส เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิโดยใช้ไอน้ำผ่านเข้าไปใน Internal coil และบันทึกค่าอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีจนกระทั่งอุณหภูมิลดลงจนถึงค่า 35 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการลดอุณหภูมิโดยใช้น้ำไหลผ่านเข้าไปใน Internal coil



ภาพที่ 86 ตำแหน่งในการติดตั้ง Sensor วัดอุณหภูมิ ที่ใช้ในการทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การเตรียมวัตถุดิบ เอนไซม์ และกล้าเชื้อยีสต์

3.1 การเตรียมมันเส้นบด

โม่มันเส้นให้ละเอียดด้วยเครื่องโม่ จากนั้นสุ่มตัวอย่างมาวัด %แป้ง และความชื้นของมันเส้น แล้วนำมันเส้นที่บดแล้วใส่ถุงพลาสติกเพื่อป้องกันความชื้น และเก็บรักษาไว้ในที่แห้ง

3.2 การเตรียมเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง คือ เอนไซม์ α-amylase ชื่อทางการค้า GC358 ใช้ในอัตราส่วน 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม และเอนไซม์ Glucoamylase ชื่อทางการค้า GC147 ใช้ในอัตราส่วน 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ซึ่งการเตรียมเอนไซม์ก่อนการย่อยจะต้องรู้ปริมาณแป้งที่อยู่ในตัวอย่างมันเส้นก่อน จากนั้นคำนวณปริมาณเอนไซม์ที่จะใช้จากปริมาณแป้งในตัวอย่างมันเส้นดังที่กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นเขย่าขวดเอนไซม์ เนื่องจากอาจมีการตกตะกอนอยู่ และชั่งน้ำหนักเอนไซม์ที่จะใช้ใส่ลงไปในถังย่อย ก่อนใส่เอนไซม์ลงไปในถังย่อยจะต้องปรับ pH และอุณหภูมิให้เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด การเตรียมเอนไซม์นี้จะเตรียมให้พอใช้ในแต่ละครั้ง

3.3 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

กล้าเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลองจะเป็นยีสต์แห้ง Fali Green ซึ่งมีอัตราการส่วนในการใช้คือ ยีสต์แห้ง Fali Green 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม โดยการเตรียมจะต้องทำการรีไฮเดรต (Rehydrated) ยีสต์แห้ง ซึ่งเป็นการทำให้ยีสต์คืนตัวก่อนเติมลงในถังหมัก เพื่อให้ยีสต์ปรับตัว และพร้อมสำหรับกิจกรรมในกระบวนการหมัก โดยการทำรีไฮเดรตยีสต์ เริ่มต้นด้วยการผสมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 35±5 องศาเซลเซียส 80 มิลลิลิตร กับ Glucose 2 กรัม และเทผสมกับยีสต์แห้ง ทิ้งไว้ 15-30 นาที ไม่ต้องกวนผสมกัน เพราะจะทำให้เซลล์ของยีสต์แตก การเตรียมกล้ายีสต์นี้จะเตรียมให้พอใช้ในแต่ละครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของมันเส้นบด

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมันเส้นบดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล คือ ความชื้น วิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) และปริมาณแป้ง วิเคราะห์ตามวิธีโพลาริเมตริก (Polarimetric method)

5. การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลจากมันเส้นบด

การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลจากมันเส้นบด เพื่อนำเด็กซ์ทริน (Dextrin) หรือน้ำตาลกลูโคส ไปใช้ในการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 เริ่มต้นโดยนำมันเส้นบดที่ถูกเตรียมไว้มาผ่านขั้นตอนการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 จะได้มอลโทเด็กซ์ทริน (Maltodextrin) หรือน้ำแป้งเหลว จากนั้นนำน้ำแป้งเหลวที่ได้มาผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 จะได้น้ำตาลกลูโคส จากกระบวนการดังกล่าวได้ทำการศึกษา 1) หาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358 และ 2) หาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

ในการศึกษาครั้งนี้จะไม่ทำการศึกษาความเข้มข้นของของมันเส้น ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC358 ที่ใช้ในการย่อยมันเส้นครั้งแรก ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC147 ที่ใช้ในการทำ Pre-Saccharification และปริมาณยีสต์ที่ใช้ในการหมัก ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นของมันเส้นที่ได้จากการศึกษาของธันยาภรณ์ (2548) คือ 25% ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC358 ที่ใช้คือ 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม และความเข้มข้นของเอนไซม์ GC147 ที่ใช้คือ 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ซึ่งได้จากข้อมูลผลิตภัณฑ์ของบริษัท Genencor International Wisconsin Inc. และปริมาณของยีสต์แห้ง Fali Green ที่ใช้คือ 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ซึ่งได้จากข้อมูลผลิตภัณฑ์ของบริษัท สยามวิคตอรี่ เคมิคอล จำกัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358

การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC 358 โดยใช้ความเข้มข้นของมันเส้น 25% ซึ่งได้จากการศึกษาของธันยาภรณ์ (2548) และความเข้มข้นของเอนไซม์ GC358 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม, pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.7-5.8 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 83-85 องศาเซลเซียส จากข้อมูลผลิตภัณฑ์ของบริษัท Genencor International Wisconsin Inc. ซึ่งจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ดังนั้นจากการทดลองนี้จะใช้ความชันของเส้นกราฟของค่า DE (Dextrose Equivalent) ต่อเวลา หรือผลต่างของค่า DE ต่อผลต่างของเวลา เป็นดัชนีชี้วัดสำหรับการตัดสินใจเลือกเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358

วิธีการย่อยมันเส้นครั้งแรก อ้างอิงจาก เจริญศักดิ์ และคณะ (2546) และสมชาย (2537) โดย ธันยาภรณ์ (2548) ได้นำมาดัดแปลงและทำการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยเอนไซม์ Termamyl120L โดยมีวิธีการในการย่อยมันเส้นดังนี้

เตรียมน้ำแป้งโดยใช้มันเส้นจากหัวข้อ 3.1 เท่ากับ 15 กิโลกรัมผสมกับน้ำ 45 กิโลกรัม (ความเข้มข้นของมันเส้น 25%) เติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.H_2O$) เท่ากับ 2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม หลังจากนั้นปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7-5.8 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 20% แล้วจึงเติมเอนไซม์ GC358 เท่ากับ 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม นำไปให้ความร้อน และควบคุมอุณหภูมิที่ 83-85 องศาเซลเซียส โดยกวนด้วยความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที บันทึกค่า pH และเก็บตัวอย่างที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 นาที นำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (Dextrose Equivalent, DE) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้วิธี Lane and Eynon's volumetric method ต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS) ที่วิเคราะห์โดยใช้ Hand Refractometer โดยมีแผนผังการทดลองดังแสดงในภาพที่ 87

ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358 จะใช้ 2 วิธีในการตัดสินใจเลือกเวลาที่เหมาะ คือ 1) การสร้างกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า DE กับเวลา เลือกเวลาที่เหมาะสมโดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า DE จะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเริ่มคงที่ และ 2) การใช้ความชันของค่า DE หรือผลต่างของค่า DE ต่อเวลา ซึ่งความชันของค่า DE มีค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูง แสดงว่าอัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูง ซึ่งในทางตรงกันข้ามความชันของค่า DE มีค่าต่ำ แสดงว่าอัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำ หรือผลิตได้ช้าและไม่คุ้มค่ากับเวลาที่เสียไป ดังนั้นจาก 2 วิธีนี้จะสามารถเลือกเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358 ได้

5.2 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

ทำการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC147 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม, pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0-4.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 63-65 องศาเซลเซียส จากข้อมูลผลิตภัณฑ์ของบริษัท Genencor International Wisconsin Inc. ซึ่งจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ดังนั้นจากการทดลองนี้จะใช้ % น้ำตาลรีดิวซ์เป็นดัชนีชี้วัดสำหรับการตัดสินใจเลือกเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

วิธีการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 อ้างอิงจาก ธันยาภรณ์ (2548) ที่ได้ทำการทดลองการพัฒนาการผลิตเอทานอลจากมันเส้นด้วยกระบวน SSF ด้วยเอนไซม์ AMG300L ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharifiactoin โดยมีวิธีการในการทำ Pre-Saccharification ดังนี้

นำแป้งเหลวที่ได้จากการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358 ในหัวข้อ 5.1 มาเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของการหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการลดอุณหภูมิลงจาก 83-85 องศาเซลเซียส เป็น 63-65 องศาเซลเซียส และควบคุมอุณหภูมินี้ไว้ จากนั้นปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 4.4-4.6 โดยใช้กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 20% แล้วจึงเติมเอนไซม์ GC147 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม โดยกวนด้วยความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที บันทึกค่า pH และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้วิธี Lane and Eynon's volumetric method และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS) ที่วิเคราะห์โดยใช้ Hand Refractometer โดยมีแผนผังการทดลองดังแสดงในภาพที่ 88

ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 จะเลือกใช้เวลาที่เหมาะสมจากการทดลองของ Panchal (1990) ที่ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* คือ ความเข้มข้นของน้ำตาล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลูโคสที่ 100 กรัมต่อลิตร หรือ 10% ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด นั่นคือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ดังนั้นในการทดลองนี้จะวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ นั่นก็คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคส, ฟรุกโทส และกาแล็กโทส) ซึ่งในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ α-amylase และเอนไซม์ glucoamylase ทั้ง 2 ตัวนี้ร่วมกันจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (เจริญศักดิ์ และคณะ,2546) ดังนั้นในการทดลองนี้จะถือว่าน้ำตาลรีดิวซ์คือ น้ำตาลกลูโคส

เตรียมน้ำแป้งโดยใช้มันเส้นจากหัวข้อ 3.1 เท่ากับ 15 กิโลกรัมผสมกับน้ำ 45 กิโลกรัม
(ความเข้มข้นของมันเส้น 25%)

↓

เติม $CaCl_2.H_2O$ 2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม

↓

ปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7-5.8 โดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 20%

↓

เติมเอนไซม์ GC358 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม

↓

ให้ความร้อน และควบคุมอุณหภูมิที่ 83-85 องศาเซลเซียส
โดยกวนด้วยความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที

↓

บันทึกค่า pH และเก็บตัวอย่างที่ 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ240 นาที

↓

วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า DE

ภาพที่ 87 แผนผังการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC 358

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แป้งเหลวที่ได้จากการทดลองหาเวลาที่เหมาะสม
ในการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358

↓

ลดอุณหภูมิ และควบคุมอุณหภูมิที่ 63-65 องศาเซลเซียส
โดยกวนด้วยความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที

↓

ปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 4.4-4.6 โดยใช้ H_2SO_4 ความเข้มข้น 20%

↓

เติมเอนไซม์ GC147 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม

↓

บันทึกค่า pH และเก็บตัวอย่างที่ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง

↓

วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ภาพที่ 88 แผนผังการย่อยครั้งที่ 2 หรือการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า Oxidation Reduction Potential (ORP), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ

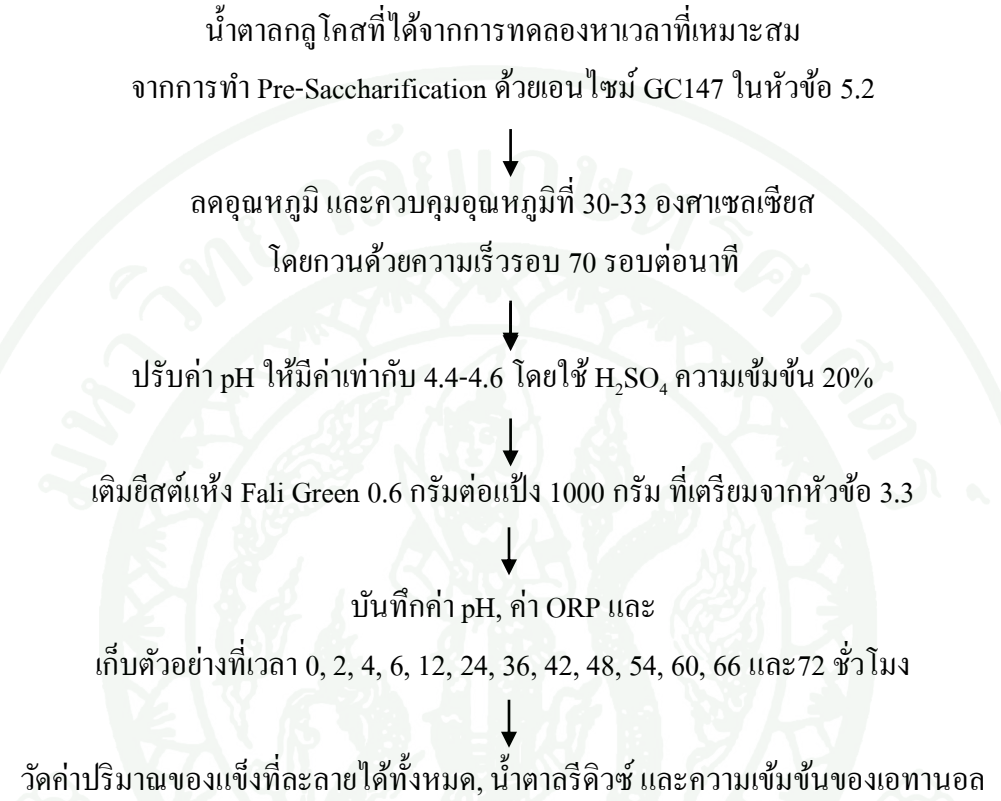
การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 (กระบวนการหมักแบบปกติ) จะเป็นการหมักแบบทั่วไปที่ใช้ในการผลิตเอทานอล เริ่มต้นโดยการนำมันเส้นบดมาผ่านขั้นตอนการย่อยครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358 (ข้อ 5.1) จะได้แป้งเหลว จากนั้นนำแป้งเหลวที่ได้มาผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 (ข้อ 5.2) ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักด้วยยีสต์แห้ง Fali Green เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอล เพื่อ 1) ศึกษาความสัมพันธ์ของค่า ORP, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล และ 2) ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล จากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ

ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ จากกระบวนการผลิตเอทานอลตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) ร่วมกับการวิเคราะห์อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์และอัตราการผลิตเอทานอลของเซลล์ยีสต์เริ่มลดลงและคงที่ (Kukec *et.al.*, 2001)

น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมจากการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ในหัวข้อ 5.2 ถูดนำมาเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของการศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า ORP, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้มาจากกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยทำการลดอุณหภูมิลงจาก 63-65 องศาเซลเซียส เป็น 30-33 องศาเซลเซียส และควบคุมอุณหภูมินี้ไว้ จากนั้นปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 4.4-4.6 โดยใช้กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 20% แล้วจึงเติมยีสต์แห้ง Fali Green 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ที่เตรียมจากหัวข้อ 3.3 โดยกวนด้วยความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที บันทึกค่า pH, ค่า ORP และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 42, 48, 54, 60, 66 และ72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยวิธี Lane and Eynon's volumetric method, ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS) โดย Hand Refractometer และความเข้มข้นของเอทานอลโดย GC (Gas Chromatography) โดยมีแผนผังการทดลองดังแสดงในภาพที่ 89



ภาพที่ 89 แผนผังการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก เพื่อศึกษาการเจริญของเซลล์ยีสต์ การผลิตเอทานอล และเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักเมื่อมีการให้อากาศ ซึ่งหน้าที่หลักของอากาศหรือออกซิเจนในการหมักเอทานอล คือ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในลูกโซ่การหายใจ นอกจากนั้นออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ ทำให้ออกซิเจนมีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในขั้นตอนของการเตรียมกล้าเชื้อ การเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีออกซิเจน และกึ่งมีออกซิเจน ยีสต์จะให้เซลล์ปริมาณสูง ดังนั้น เมื่อเติมอากาศจะทำให้ชีวมวลหรือเซลล์ยีสต์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากยีสต์จะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ในขณะที่การผลิตเอทานอลลดลง ดังนั้น การให้อากาศในช่วงแรก และตลอดกระบวนการหมัก จะเป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ให้กับกระบวนการหมัก เพื่อลดระยะเวลาในการผลิตเอทานอล แต่ยังให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับกระบวนการหมักแบบปกติ ซึ่งมีวิธีการทดลอง และวิธีการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 6 เพียงแต่ในขณะการหมักจะเติมอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยการปล่อยให้อากาศผ่านการกรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอากาศ โดยทำการ 1) ศึกษาความสัมพันธ์ของค่า ORP, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล 2) ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยในระหว่างการหมักมีการให้อากาศ และ 3) เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ (หัวข้อที่ 6) การทดลองนี้จะแบ่งเป็น 2 การทดลอง (ภาพที่ 90) คือ

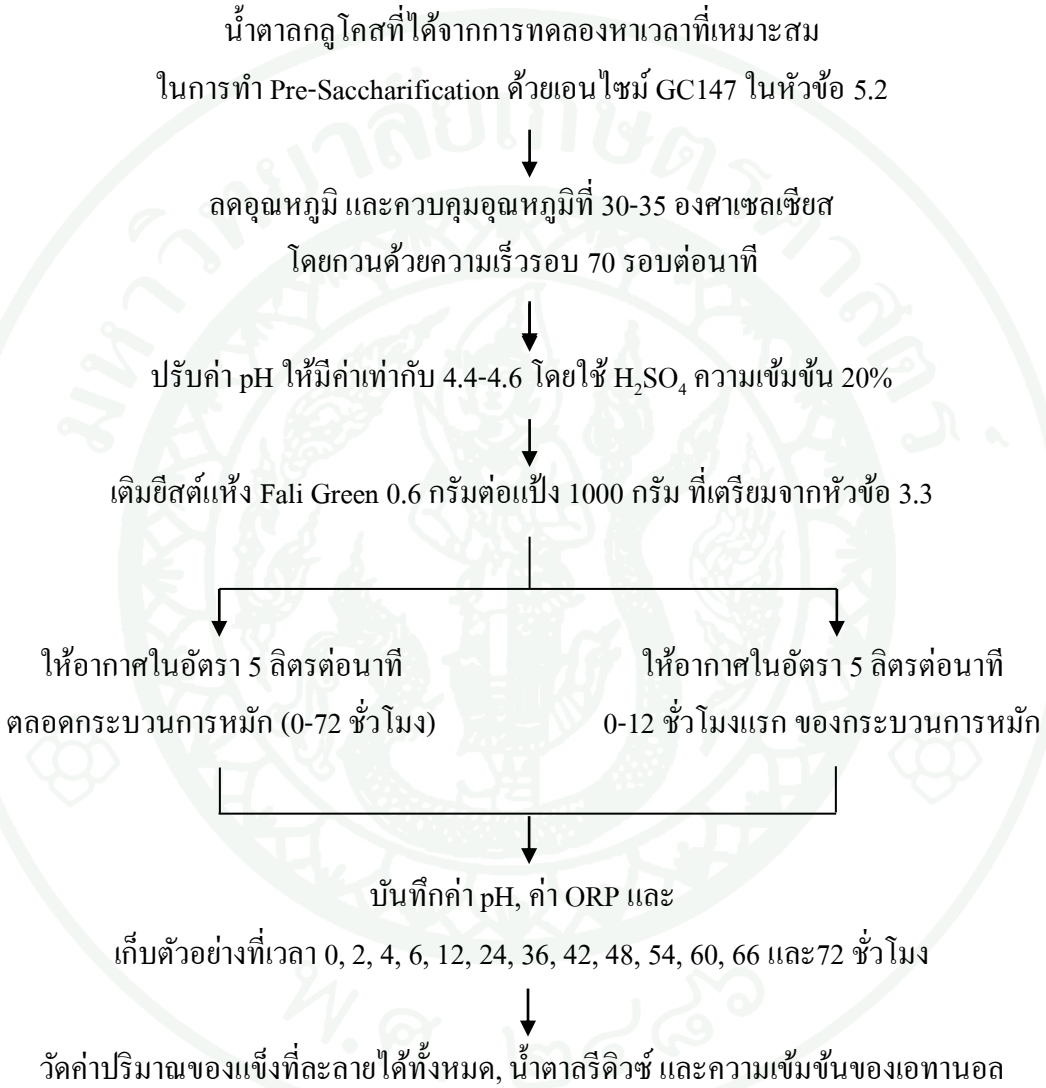
7.1 ให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)

7.2 ให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ของกระบวนการหมัก

ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ จากกระบวนการผลิตเอทานอล ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) ร่วมกับการวิเคราะห์อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์และอัตราการผลิตเอทานอลของเซลล์ยีสต์เริ่มลดลงและคงที่ (Kukec *et.al*., 2001)



ภาพที่ 90 แผนผังการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) และ 0-12 ชั่วโมงของกระบวนการหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งค่า ORP มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอล ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลืออยู่ และเวลาในการหมัก เมื่อมีการให้อากาศ จะทำให้อัตราการตายของเซลล์ลดลง ดังนั้นที่ค่า ORP ค่าหนึ่งจะลดอัตราการตายลง และทำให้เซลล์ยีสต์ใช้กลูโคสได้มากขึ้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงขึ้น

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งมีวิธีการทดลองและวิธีการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 6 ยกเว้นในขณะทำการหมักมีการควบคุมค่า ORP ด้วยเครื่องควบคุมค่า ORP (ORP Controller) ซึ่งเครื่องควบคุมค่า ORP จะทำงานโดยการตั้งค่าไว้ตามที่กำหนด เมื่อค่า ORP ลดลงถึงค่าที่กำหนดไว้ เครื่องจะประมวลผลและส่งสัญญาณเพื่อเปิดวาล์วให้อากาศเข้ามาในถังหมัก และเครื่องควบคุมค่า ORP จะสั่งปิดวาล์วให้อากาศเมื่อค่า ORP ถึงค่าที่ตั้งไว้ โดยอากาศที่เข้าไปในถังหมักจะตั้งอัตราการไหล 5 ลิตรต่อนาที และอากาศจะถูกกรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนเข้าสู่ถังหมัก เพื่อกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอากาศ โดยทำการ 1) ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก และ 2) เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการวิธีควบคุมค่า ORP กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ (หัวข้อที่ 6) ซึ่งช่วงของการควบคุมค่า ORP ที่ใช้ในการทดลองนี้ แบ่งเป็น 3 ช่วง (ภาพที่ 91) คือ

8.1 ช่วง 20 ± 5 mV ซึ่งการควบคุมจะตั้งค่า ORP ที่เครื่องควบคุมค่า ORP ที่ 20 mV
8.2 ช่วง -5 ± 5 mV ซึ่งการควบคุมจะตั้งค่า ORP ที่เครื่องควบคุมค่า ORP ที่ -5 mV
8.3 ช่วง -30 ± 5 mV ซึ่งการควบคุมจะตั้งค่า ORP ที่เครื่องควบคุมค่า ORP ที่ -30 mV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการวิธีควบคุมค่า ORP โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ จากกระบวนการผลิตเอทานอล ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) ร่วมกับการวิเคราะห์อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์และอัตราการผลิตเอทานอลของเซลล์ยีสต์เริ่มลดลงและคงที่ (Kukec *et.al*., 2001)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 91 แผนผังการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก ที่ 20 ± 5 mV, -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างในงานวิจัยนี้เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และความเข้มข้นของเอทานอล มีวิธีการเก็บตัวอย่างดังนี้ คือ หลังจากที่นำน้ำย่อยหรือน้ำหมักออกมาจากถังหมักให้รีบทำการหยุดปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์ และการหมักของยีสต์ โดยการปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 20% และทำการกรองแบบหยาบด้วยผ้าขาวบางพับ 2 ชั้น หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จ นำส่วนใสที่ได้ไปเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และความเข้มข้นของเอทานอล ต่อไป

ตัวอย่างที่เก็บมาจากถังหมัก

↓

หยุดปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์และการหมักของยีสต์
โดยปรับ pH = 10 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 20%

↓

กรองหยาบด้วยผ้าขาวบางพับ 2 ชั้น

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

↓

นำส่วนใสที่ได้เก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

↓

วัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด, น้ำตาลรีดิวซ์ และความเข้มข้นของเอทานอล

ภาพที่ 92 แผนผังการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และความเข้มข้นของเอทานอล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง

10.1 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Lane and Eynon's volumetric method (ดัดแปลงจาก มอก. 268-2521)

10.1.1 สารลายที่ใช้และวิธีเตรียม

1) สารละลายเฟห์ลิง (Fehling's solution)

สารละลาย ก. ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) 34.64 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

สารละลาย ข. ละลายโปตัสเซียมโซเดียมตาร์เตรตเตตระไฮเดรต ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) 173 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 50 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

ก่อนใช้ ผสมสารละลาย ก. และ ข. เข้าด้วยกัน

2) เมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ (Methylene blue indication)

ละลายเมทิลีนบลู (Methylene blue) 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

10.1.2 การหาค่ามาตรฐานของสารละลายเฟห์ลิง (Standardization of Fehling's solution)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเดกโตรส โดยนำเดกโตรสบริสุทธิ์ (D-Glucose) อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชั่งเดกโตรสมา 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วถ่ายใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

การหาค่ามาตรฐานของสารละลายเฟห์ลิง โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายเฟห์ลิง 25 มิลลิลิตรใส่ในขวดแก้วชนิดทนความร้อน ต้มให้เดือดแล้วนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำตาลเดกโตรส ตามวิธีการไทเทรตแบบมาตรฐานซึ่งจะกล่าวต่อไป จดปริมาตรสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเดกโตรส (A)

10.1.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1) กรองน้ำแป้งเหลวที่ได้จากการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใสที่ได้คือตัวอย่างที่จะนำไปวิเคราะห์ค่า DE (Dextrose Equivalent)

2) ชั่งตัวอย่างน้ำแป้งในบีกเกอร์ที่แห้งสนิทให้ได้น้ำหนักแน่นอน (m_0) แล้วถ่ายใส่ขวดตวงมาตรฐานขนาด 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำร้อนเป็นตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

10.1.4 วิธีการไทเทรต

1) วิธีไทเทรตแบบอินครีเมนตัล (Incremental method of titration) ใช้ปิเปตดูดสารละลายเฟห์ลิง 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้ว บรรจุสารละลายตัวอย่างในบุเร็ตที่มีก้านยื่นต่อออกมาเพื่อความสะดวกในการไทเทรต ใช้สารละลายตัวอย่างประมาณ 15 มิลลิลิตร จากบุเร็ตลงในขวดซึ่งมีสารละลายเฟห์ลิงอยู่ เขย่าให้เข้ากัน และต้มเดือดโดยใช้ตะเกียงบุนเสน เมื่อเดือดได้ 10-15 วินาที ถ้าหากสารละลายเฟห์ลิงยังมีสีน้ำเงินอยู่ให้ใช้สารละลายตัวอย่างอีกครั้งละ 5-10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วต้มให้เดือดต่อ 2-3 วินาที ทำเช่นนี้จนสีน้ำเงินของสารละลายเฟห์ลิงจางลง จึงเติมเมทิลีนบลู 3-4 หยด ไทเทรตต่อไปแต่ใช้ตัวอย่างครั้งละไม่เกิน 1 มิลลิลิตร จนสีของเมทิลีนบลูหายไป จดปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ในการไทเทรต

2) วิธีไทเทรตแบบมาตรฐาน (Standard method of titration) ไขสารตัวอย่างลงในขวดแก้วซึ่งมีสารละลายเฟห์ลิง 25 มิลลิลิตรอยู่ ซึ่งไขให้มีปริมาตรน้อยกว่าค่าที่ทราบตามวิธีอินครีเมนตัลประมาณ 0.5-1.0 มิลลิลิตร และหลังจากต้มให้เดือด 2 นาที เติมเมทิลีนบลู 3-4 หยด แล้วไทเทรตต่อโดยใช้สารละลายตัวอย่างครั้งละ 2-3 หยด จนสีของเมทิลีนบลูหายไป การไทเทรตนี้ต้องเสร็จภายใน 1 นาที นับตั้งแต่เติมเมทิลีนบลู จดปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ทั้งหมด (S)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.1.5 วิธีการคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังสมการที่ (3)

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (\%)} = \frac{100 \times A}{S \times m_0} \qquad (3)$$

เมื่อ A = ปริมาตรสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเดกโทรสที่ใช้ในการไทเทรตตามวิธีการหาค่ามาตรฐานของสารละลายเฟห์ลิง (มิลลิลิตร)

S = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไทเทรตตามวิธีไทเทรตแบบมาตรฐาน (มิลลิลิตร)

m_0 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

10.2 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS) โดยใช้ Hand Refractometer

10.2.1 นำน้ำกลั่นมาหยดที่ปริซึมของ Hand Refractometer

10.2.2 ปิดฝาครอบ จากนั้นส่องดูกับแสง และปรับให้ขีดบอกจำนวน °Brix มาอยู่ที่จุดเริ่มต้นคือ 0 °Brix แล้วเช็ดให้แห้ง

10.2.3 นำตัวอย่างหยดลงที่ปริซึมของ Hand Refractometer ปิดฝาครอบ ส่องดูกับแสง และอ่านค่าที่ได้

10.3 การคำนวณหาสมมูลเดกซ์โทรส (Dextrose Equivalent, DE) ดังสมการที่ (4)

$$\text{สมมูลเดกซ์โทรส} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นร้อยละ} \times 100}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็นร้อยละ}} \qquad (4)$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.4 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเอทานอลโดยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC)

การวิเคราะหาความเข้มข้นของเอทานอลในงานวิจัยนี้ ใช้เครื่อง Gas Chromatography รุ่น HP6890 ของบริษัท Hewlett Packard ต่อพ่วงกับเครื่อง Headspace รุ่น HP 7694E ของบริษัท Hewlett Packard ชนิดของดีเทคเตอร์ คือ Flame Ionization Detector (FID) โดยใช้คอลัมน์ Capillary Column HP-1 (Methyl Siloxane) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 320 นาโนเมตร ความหนาของสารเคลือบภายในคอลัมน์ 0.25 นาโนเมตร

10.4.1 สภาวะของเครื่อง Gas Chromatography ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากน้ำหมัก

10.4.1.1 Inlet

1) Inlet mode : Split
2) Inlet temperature : 150 องศาเซลเซียส
3) Pressure : 5.10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
4) Split ratio : 100 : 1
5) Split flow : 99.9 มิลลิลิตรต่อนาที
6) Total flow : 103.6 มิลลิลิตรต่อนาที
7) Carrier gas : Helium gas

10.4.1.2 Column

1) Oven temperature : คงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 1 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 45 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 80 องศาเซลเซียส จากนั้นคงอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2) Column mode : Constant flow

3) Initial flow : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

4) Nominal initial pressure : 5.10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

10.4.1.3 Detector

1) Detector temperature : 300 องศาเซลเซียส

2) Hydrogen flow : 30.0 มิลลิลิตรต่อนาที

3) Air flow : 350.0 มิลลิลิตรต่อนาที

4) Make up gas : Nitrogen gas

5) Make up flow : 35.0 มิลลิลิตรต่อนาที

10.4.2 สภาวะของเครื่อง Headspace ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากน้ำหมัก

10.4.2.1 Zone temperature

1) Vial temperature : 60 องศาเซลเซียส

2) Loop temperature : 80 องศาเซลเซียส

3) Transfer line temperature : 90 องศาเซลเซียส

10.4.2.2 Event times

1) GC cycle time : 10 นาที

2) Vial equilibration time : 10 นาที

3) Pressurization time : 0.13 นาที

4) Loop fill time : 0.15 นาที

5) Loop equilibration time : 0.01 นาที

6) Inject time : 0.20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.4.2.3 Vial parameter

1) Shake : High

2) Shake high : 3 นาที

10.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากน้ำหมักโดยใช้สารมาตรฐานภายใน (Internal Standard Method)

1) การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากน้ำหมัก

ใช้สารละลายเอทานอล (ethanol 99.9%) เป็นสารละลายมาตรฐานเอทานอล ซึ่งเตรียมให้มีความเข้มข้น 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร และใช้สารละลายไอโซโพรพานอล (propan-2-ol) เป็นสารละลายมาตรฐานภายใน ซึ่งเตรียมให้มีความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานภายใน 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่เตรียมไว้ตามความเข้มข้นต่าง ๆ 2.5 มิลลิลิตร ในขวด vial ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Headspace และ Gas Chromatography ตามสภาวะจากข้อที่ 10.4.2 และ 10.4.1 เพื่อหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐานจากสมการที่ (5)

$$\text{อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐาน} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐานเอทานอล}}{\text{พื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐานภายใน}} \quad (5)$$

นำอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลไปเขียนกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ซึ่งได้ค่าดังตารางที่ 5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเอทานอลกับสารละลายมาตรฐานภายในดังภาพที่ 93 และได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากน้ำหมักดังภาพที่ 94

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2) การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากตัวอย่างน้ำหมัก

นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บได้กรองด้วยผ้าขาวบาง และหมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ยีสต์ออกแล้ว 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานภายใน (propan-2-ol) ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร 2.5 มิลลิลิตร ในขวด vial ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Headspace และ Gas Chromatography ตามสภาวะจากข้อที่ 10.4.2 และ 10.4.1 ตามลำดับ เพื่อหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของน้ำหมักจากสมการที่ (6)

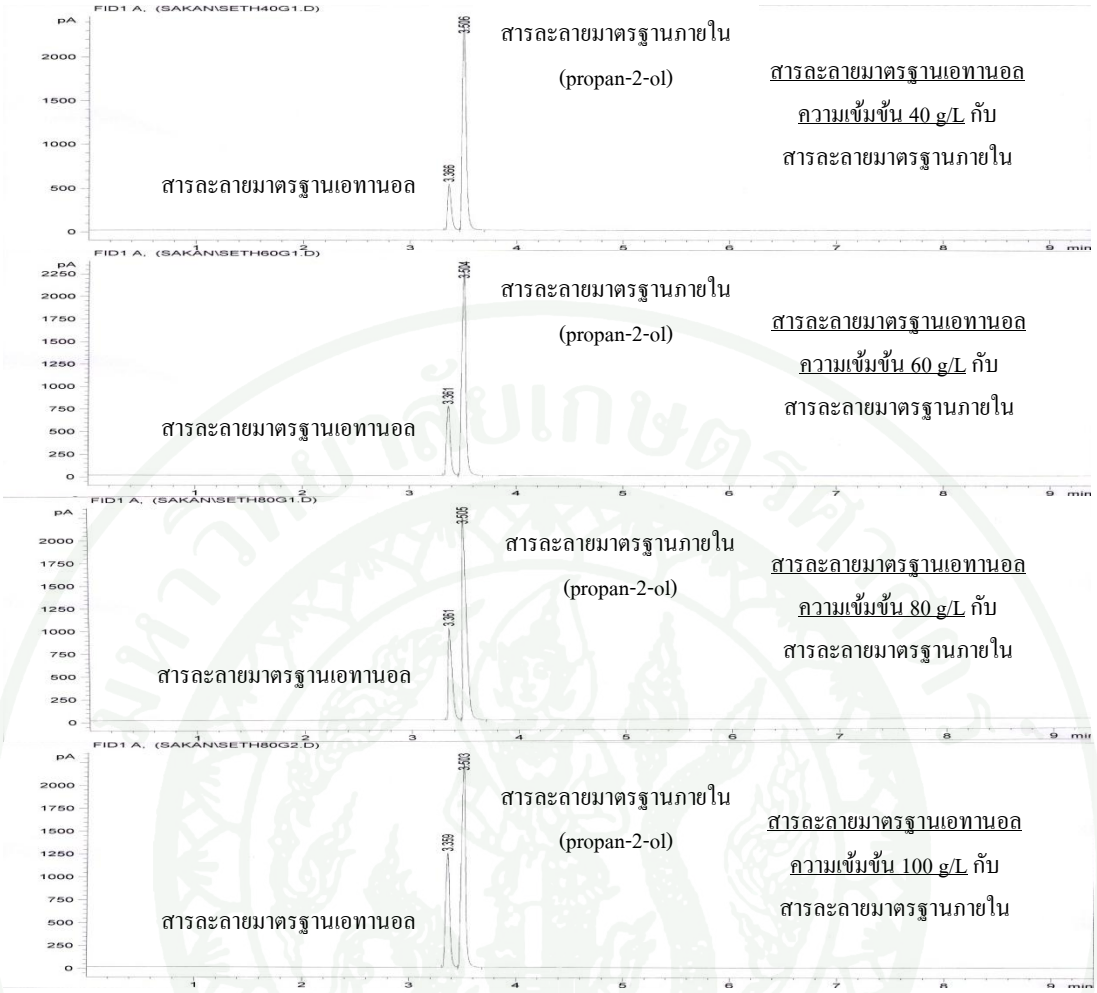
$$\text{อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของน้ำหมัก} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีกของสารละลายเอทานอลในน้ำหมัก}}{\text{พื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐานภายใน}} \qquad (6)$$

นำอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของน้ำหมักที่คำนวณได้ ไปแทนในสมการในกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากน้ำหมัก (ภาพที่ 92) ที่สร้างไว้ เพื่อหาปริมาณเอทานอล จากตารางที่ 6 และภาพที่ 95 คือ ตัวอย่างการคำนวณอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของน้ำหมัก และตัวอย่างโครมาโทแกรมของน้ำหมักกับสารละลายมาตรฐานภายใน ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่า Retention time พื้นที่ใต้พีก และอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐานเอทานอลกับสารละลายมาตรฐานภายใน

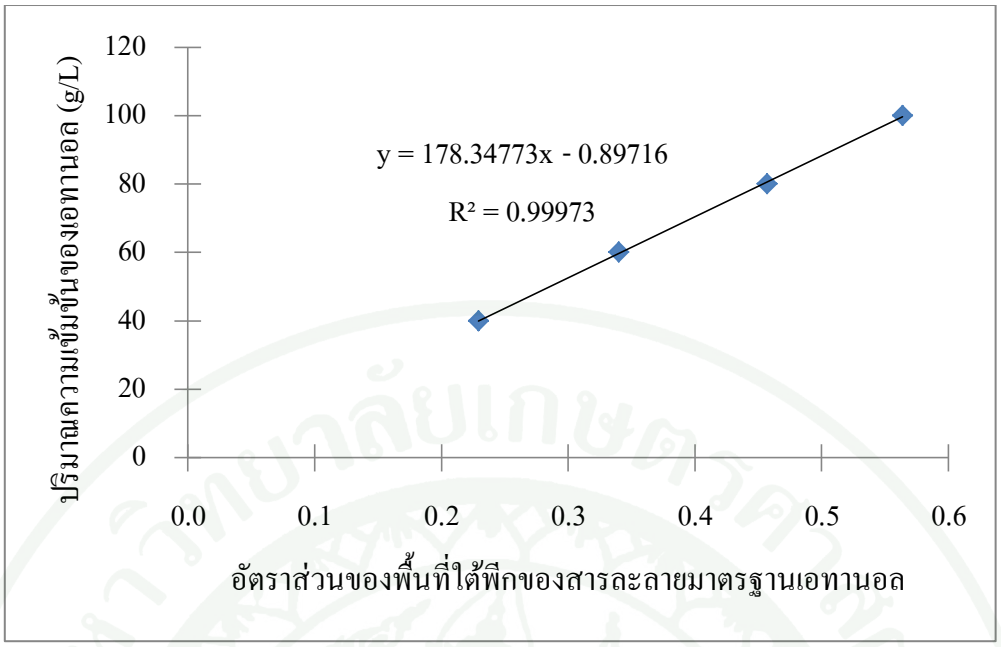
ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	ค่า Retention Time (นาที)		พื้นที่ใต้พีก (pA*s)		อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐาน
	สารละลายมาตรฐานเอทานอล	สารละลายมาตรฐานภายใน (Propan-2-ol)	สารละลายมาตรฐานเอทานอล	สารละลายมาตรฐานภายใน (Propan-2-ol)	
40	3.366	3.506	1390.65710	6065.24268	0.22928
60	3.361	3.504	2053.23535	6040.97559	0.33988
80	3.361	3.505	2685.00635	5875.76270	0.45696
100	3.359	3.503	3355.29614	5949.55371	0.56396

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 93 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเอทานอลกับสารละลายมาตรฐานภายในจากการวิเคราะห์ปริมาณ เอทานอลในน้ำหมักด้วยเทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้สารมาตรฐานภายใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

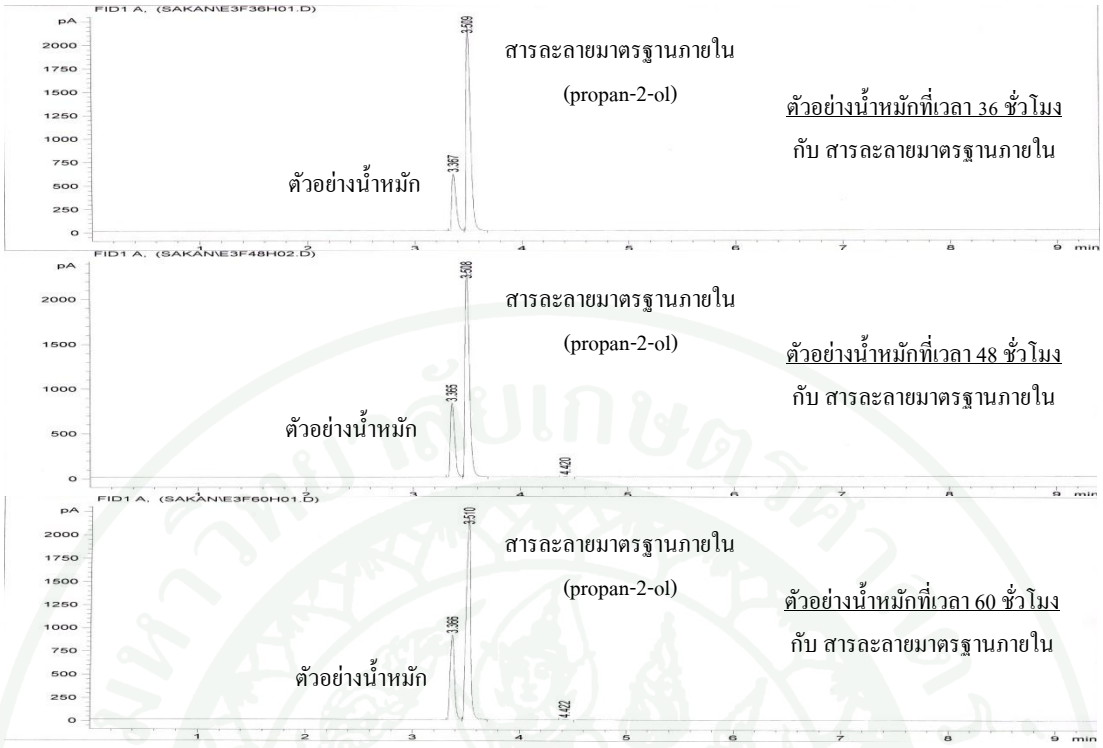


ภาพที่ 94 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในน้ำหมักด้วยเทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้สารมาตรฐานภายใน

ตารางที่ 6 ค่า Retention time, พื้นที่ใต้พีก และอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของเอทานอลในตัวอย่างน้ำหมักกับสารละลายมาตรฐานภายใน

ตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา (ชั่วโมง)	ค่า Retention Time (นาที)		พื้นที่ใต้พีก (pA*s)		อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของเอทานอลในตัวอย่าง	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
	สารละลายเอทานอล	สารละลายมาตรฐานภายใน (Propan-2-ol)	สารละลายเอทานอล	สารละลายมาตรฐานภายใน (Propan-2-ol)		
36	3.367	3.509	1679.47559	6126.24951	0.27414	47.95083
48	3.365	3.508	2334.51807	6597.75342	0.35384	62.15603
60	3.366	3.510	2575.69141	6226.74561	0.41365	72.81813

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 95 โครมาโทแกรมของน้ำหมักกับสารละลายมาตรฐานภายในจากการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในน้ำหมักด้วยเทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้สารมาตรฐานภายใน

10.5 การหาความชื้นในมันเส้นบด (AOAC, 2000)

ตัวอย่างที่ชั่งน้ำหนักที่ทราบแน่นอน จะถูกให้ความร้อนเพื่อทำให้น้ำในตัวอย่างระเหยออกมา โดยการอบให้ความร้อนจนกระทั่งได้น้ำหนักตัวอย่างคงที่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างที่หายไป คือ ปริมาณความชื้นที่มีอยู่ในตัวอย่าง

10.5.1 วิธีวิเคราะห์

1) นำถ้วยอะลูมิเนียมไปอบที่ 105-107 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์และปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งละเอียด (A)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2) ชั่งตัวอย่างในถ้วยให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2-5 กรัม บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง (B)

3) นำไปอบที่ตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105-107 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นนำออกไปชั่งใส่เดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่ง จดน้ำหนัก

4) อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาทีจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว (C)

10.5.2 วิธีคำนวณปริมาณความชื้น ดังสมการที่ (7)

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{(A+B)-C}{B} \times 100 \qquad (7)$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียม (กรัม)
B คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)
C คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียและน้ำหนักตัวอย่างหลังอบแห้ง (กรัม)

10.6 การหาปริมาณแป้งในมันเส้นบด

หาปริมาณแป้งในมันเส้นบดด้วยวิธีโพลาริเมตริก (Polarimetric method) ค่าวิเคราะห์อยู่ในรูปของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด (as feed basis) โดย ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ (Animal nutrition laboratory) ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Department of animal science kamphaengsaen, Kasetsart university)

แป้งในตัวอย่างจะถูกทำให้กระจายตัวในตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ววัดปริมาณแป้งจากส่วนของเหลวใส โดยใช้ค่ามุมของการเบี่ยงเบนแสงโพลาไรซ์ระนาบ (angle of rotation of the plane polarised light) ปริมาณแป้งที่หาได้จากค่าความแตกต่างระหว่างค่า optical rotation ของตัวอย่างและ blank คูณด้วยแฟคเตอร์ที่ทราบค่า $[\alpha]_D^E$ ซึ่งค่านี้แตกต่างกันไปตามชนิดของแป้ง หรับแป้งมันสำปะหลังค่า $[\alpha]_D^E$ เท่ากับ 184

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.6.1 เครื่องมือ

1) เครื่องชั่งวิเคราะห์อย่างละเอียด (analytical balance) ชั่งได้ละเอียด 0.01 มิลลิกรัม

2) ขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 200 และ 250 มิลลิลิตร

3) เครื่องโพลาริมิเตอร์

4) กรวยแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 65-70 มิลลิเมตร

5) อ่างน้ำเดือด (boiling water bath)

6) กระดาษกรอง (คุณภาพเทียบเท่า Whatman No.1)

7) กระดาษกรอง (คุณภาพเทียบเท่า Whatman No.42)

8) ปิเปตขนาด 50 มิลลิลิตร

10.6.2 สารเคมี

1) กรดไฮโดรคลอริกเจือจางร้อยละ 1.128 ของน้ำหนักมาตรฐาน หรือ 0.3094 นอร์แมล ตรวจสอบมาตรฐานโดยการไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ใช้เมทิลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ (ร้อยละ 1 ของเมทิลเรดในแอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95) จะต้องใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30.94 มิลลิลิตร ต่อกรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร

2) กรดไฮโดรคลอริกเจือจางร้อยละ 25 ของน้ำหนักที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.126

3) สารละลายโซเดียมฟอสโฟทังสเตตหรือกรดโดเดคาฟอสโฟทังสติก (Sodium phosphotungstate or dodecaphosphotungstic) ร้อยละ 4 ของน้ำหนัก

10.6.3 วิธีวิเคราะห์

ก) การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่จะทดสอบจะต้องผ่านตะแกรง (sieve) ขนาด 200 mesh ถ้าผ่านไม่ได้ต้องนำตัวอย่างมาบดก่อนจะนำไปวิเคราะห์

ข) วิเคราะห์หาโททัลโรทาทอรีเพาเวอร์ (total rotatory power, P)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. ชั่งตัวอย่าง 5.0000 กรัม ในขวดแก้วปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยผ่านกรวยแก้วที่วางบนปากขวดแก้ว

2. เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3094 นอร์มอล 50 มิลลิลิตร เขย่าขวดให้เข้ากันเติมอีก 50 มิลลิลิตร แล้วจุ่มในอ่างน้ำเดือด เขย่าขวดแก้วอย่างสม่ำเสมอนาน 3 นาที

3. แช่ขวดแก้วในอ่างน้ำเดือดรวม 15 นาที ยกขวดแก้วออกจากอ่างแล้วเติมน้ำเย็น 60 มิลลิลิตร ทำให้เย็นทันทีที่ 20 องศาเซลเซียส

4. เติมสารละลายโซเดียมฟอสโฟทังสเตตหรือกรดโดเดคาฟอสโฟทังสติก 20 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าแรง ๆ

5. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร ในอุณหภูมิ 20องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน

6. กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 ทิ้งสารละลายที่กรองได้ครั้งแรก25 มิลลิลิตร สารละลายที่กรองได้ที่เหลือ นำไปใส่ในหลอดแก้วยาว 10 เซนติเมตร ของเครื่องโพลาริมิเตอร์

7. อ่านค่า total rotatory power (P)

10.6.4 การวิเคราะห์หา rotary power ของสารละลายในน้ำ (active water-solublesubstance, P')

1. ชั่งตัวอย่าง 12.5000 กรัม ในขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างชุ่ม ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง พร้อมเขย่าเป็นระยะ ๆ ประมาณ 6 ครั้ง ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร

3. ทิ้งไว้ให้แป้งตกตะกอน กรองให้ได้สารละลายใสผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 (ทดสอบสารละลายที่กรองว่าไม่มีแป้งปนมาด้วยไอโอดีน)

4. ปิเปตสารละลาย 100 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร 200 มิลลิลิตรเติมกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 25 ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ แล้วจุ่มลงในอ่างน้ำเดือดเช่นเดียวกับวิธีการหา total rotary power นาน 15 นาที

5. เติมน้ำเย็น 60 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็นทันทีที่ 20 องศาเซลเซียส

6. เติมสารละลายโซเดียมฟอสโฟทังสเตตหรือกรดโดเดคาฟอสโฟทังสติก 20 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าแรงๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร ในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน

8. กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ทิ้งสารละลายที่กรองได้ 25 มิลลิลิตร แรก สารละลายที่กรองได้ที่เหลือ นำไปใส่หลอดแก้วยาว 10 เซนติเมตร

10.6.5 วิธีคำนวณปริมาณแป้งจากสมการที่ (8)

$$A = \frac{2000\times(P\times P')\times 100\times 2}{[\alpha]_D^E\times(100-M)} \qquad (8)$$

เมื่อ A = ปริมาณแป้ง (ร้อยละของน้ำหนักเมื่ออบแห้ง)

P = Total rotatory power, angular degree

P' = Rotarory power ของสารละลายในน้ำ

$[\alpha]_D^E$ = ค่าเฉพาะของแป้ง (angular degree สำหรับแป้งมันสำปะหลังมีค่า 184)

M = ร้อยละของความชื้น

10.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละเวลาที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science)

10.8 การคำนวณผลได้และประสิทธิภาพการหมัก

ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้ง จะประกอบด้วยขั้นตอนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลรีดิวซ์) โดยใช้เอนไซม์ α-amylase และ Glucoamylase และขั้นตอนการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีสมการการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และสมการการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมการการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์ (Ingledew, 1999)

$$C_6H_{10}O_5 + H_2O \xrightarrow{\text{เอนไซม์}} C_6H_{12}O_6$$

แป้ง 1 โมเลกุล (162 กรัม) + น้ำ 1 โมเลกุล (18 กรัม) → กลูโคส 1 โมเลกุล (180 กรัม)

สมการการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลด้วยยีสต์ (Ingledew, 1999)

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$

กลูโคส 1 โมเลกุล (180 กรัม) → เอทานอล 2 โมเลกุล (2 x 46 = 92 กรัม) + คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล (2 x 44 = 88 กรัม)

จากสมการดังกล่าวสามารถคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้ทางทฤษฎีจากสมการที่ (9) และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในทางทฤษฎีจากสมการที่ (10)

$$\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้ทางทฤษฎี} = \frac{\text{ปริมาณแป้งที่วัดได้จากมันเส้นบด} \times 180}{162} \quad (9)$$

$$\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในทางทฤษฎี} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้ทางทฤษฎี} \times 92}{180} \quad (10)$$

การคำนวณประสิทธิภาพการหมัก จากสมการที่ (11)

$$\text{ประสิทธิภาพการหมัก} = \frac{\text{เอทานอลที่ผลิตได้จากการทดลอง}}{\text{เอทานอลที่ผลิตได้ในทางทฤษฎี}} \times 100 \quad (11)$$

การคำนวณผลได้ (yield) ของเอทานอลเทียบกับมันเส้น (กรัมเอทานอล/กรัมมันเส้นบด, dry basis) จากสมการที่ (12) และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง (กรัมเอทานอล/กรัมแป้งในมันเส้น, dry basis) จากสมการที่ (13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\text{ผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้น} = \frac{\text{น้ำหนักของเอทานอลที่ได้จากการทดลอง}}{\text{น้ำหนักของมันเส้นบดที่ใช้ในการทดลอง}} \quad (12)$$

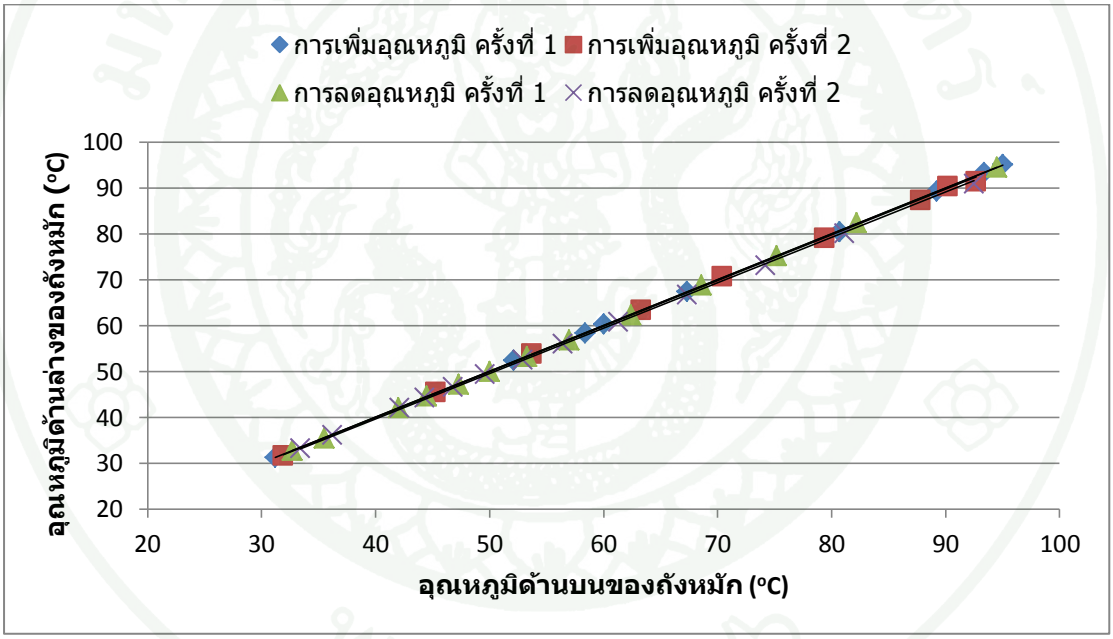
$$\text{ผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง} = \frac{\text{น้ำหนักของเอทานอลที่ได้จากการทดลอง}}{\text{น้ำหนักของแป้งที่มีอยู่ในมันเส้นบดที่ใช้ในการทดลอง}} \quad (13)$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมักเนื่องจากการกวนด้วยใบกวน

ในการทดลองวัดอุณหภูมิที่ตำแหน่งด้านบนและด้านล่างของน้ำภายในถังหมัก เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิโดยใช้ไอน้ำ และลดอุณหภูมิโดยใช้น้ำประปา ไหลผ่าน Internal coil ซึ่งมีการกวนเพื่อให้เกิดการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมักจากใบพัดกวนอย่างต่อเนื่องที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อนำอุณหภูมิด้านบนของถังหมัก (แกน x) และ อุณหภูมิด้านล่างของถังหมัก (แกน y) ของการเพิ่มอุณหภูมิครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 และการลดอุณหภูมิครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มาสร้างกราฟจะได้กราฟเส้นตรงดังแสดงในภาพที่ 96 และได้สมการเส้นตรง และค่า R^2 ดังตารางที่ 7



ภาพที่ 96 การกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมัก เมื่อเพิ่มอุณหภูมิครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 และการลดอุณหภูมิครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 สมการเส้นตรง และค่าสหสัมพันธ์ (R^2) ของการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมัก

วิธีการทดลอง	ครั้งที่	สมการเส้นตรง	ค่าสหสัมพันธ์ (R^2)
การเพิ่มอุณหภูมิ	1	y = 1.001x	0.9999
	2	y = 1.001x	1.0000
การลดอุณหภูมิ	1	y = 0.997x	0.9995
	2	y = 0.9908x	0.9997

จากสมการ และค่า R^2 บ่งบอกถึงการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมักดีมาก เนื่องจากค่า R^2 หรือค่าสหสัมพันธ์ของการเพิ่มอุณหภูมิครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 และการลดอุณหภูมิครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ทั้งหมดมีค่าใกล้เคียง 1 และถ้าแทนค่า x ด้วยค่า ๆ หนึ่งในทุกสมการ จะพบว่าได้ค่า y ใกล้เคียงกับค่า x เช่น ถ้าแทนค่า x = 1 จะได้ค่า y ใกล้เคียง 1 เช่นเดียวกัน นั่นแสดงว่า อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านบนและล่างของถังหมัก มีอุณหภูมิใกล้เคียงกัน

ดังนั้นในการออกแบบระบบการเพิ่ม และลดอุณหภูมิโดยใช้ Internal coil ซึ่งมีความสามารถในการถ่ายเทความร้อนและกระจายความร้อนได้ดี และระบบการกวนจากใบพัดกวนชนิด Open Turbine แบบใบพัดตั้งตรง สามารถทำให้อุณหภูมิภายในถังหมักเกิดการกระจายอย่างสม่ำเสมอ ป้องกันการตกตะกอนของเซลล์ และสารแขวนลอยต่าง ๆ ในระหว่างการหมักได้ดี นอกจากนี้ยังเป็นตัวชี้วัดได้ว่าน้ำหมักมีการผสมและกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

ในการออกแบบระบบการให้และลดอุณหภูมิ และระบบการกวนโดยใช้ใบพัดกวนในงานวิจัยนี้มีขนาดถังหมักเพียง 60 ลิตร ถ้าถังหมักมีขนาดใหญ่ขึ้น จะต้องมีการออกแบบและทดลองการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมักให้เหมาะสมกับขนาดของถังหมัก เช่น ถังหมักขนาดใหญ่ 1 ล้านลิตร การใช้ใบพัดกวนในการกวนผสมอาจจะไม่เหมาะสม เนื่องจากขนาดมอเตอร์ที่ต้องใช้ในการขับมอเตอร์จะมีกำลังสูงมาก เป็นการสิ้นเปลืองพลังงานอย่างมาก ส่วนการให้หรือลดอุณหภูมิโดยการใช้ Internal coil ยิ่งเป็นไปไม่ได้ เนื่องจะต้องทำการใช้ท่อขดที่ยาวมากเพื่อให้ความร้อนกระจายอย่างทั่วถึง และเป็นการยากที่จะทำความสะอาด Internal coil ที่อยู่ภายในถังหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาองค์ประกอบของมันเส้นบด

มันเส้นบดที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้ มีตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1 ได้มาจาก ศูนย์ค้นคว้าและพัฒนาวิชาการอาหารสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม และตัวอย่างที่ 2 ได้มาจากร้าน เพื่อนโคบาล อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ที่ผ่านการบดมาเรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำตัวอย่างมันเส้นบดมาวัดเปอร์เซ็นต์ความชื้นด้วยการอบแห้งตามวิธีของ AOAC (2000) เพื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความชื้นในมันเส้นบดสำหรับการเก็บรักษา และวัดปริมาณแป้งด้วยการตรวจด้วยวิธีโพลาริเมตริก โดยฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อนำปริมาณแป้งที่มีอยู่ในมันเส้นบดไปคำนวณหา 1) ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Co-Enzyme) และปริมาณเอนไซม์ CG358 ที่ใช้ในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรกในแต่ละครั้ง 2) ปริมาณเอนไซม์ CG147 ที่ใช้ในการทำ Pre-Saccharification ในแต่ละครั้ง 3) ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green ที่ต้องใช้เพื่อเติมเข้าไปเป็นส่วนผสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดในแต่ละครั้ง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของมันเส้นบดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล แบ่งเป็น 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 มันเส้นบด 300 กิโลกรัม (ศูนย์อาหารสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม) และครั้งที่ 2 มันเส้นบด 100 กิโลกรัม (เพื่อนโคบาล อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม) พบว่าครั้งที่ 1 มันเส้นบด 300 กิโลกรัม มีปริมาณแป้งประมาณ 64.94% และมีความชื้น 10.34 %(มาตรฐานเปียก) และครั้งที่ 2 มันเส้นบด 100 กิโลกรัม มีปริมาณแป้งประมาณ 62.28% และมีความชื้น 9.60 %(มาตรฐานเปียก) ดังแสดงผลในภาคผนวกที่ ก1, ก2 และ ก3

ความชื้นของมันเส้นบดทั้ง 2 ครั้ง ต่ำกว่า 14% ซึ่งเป็นระดับที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (เจริญศักดิ์ และคณะ, 2546) ทำให้สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน เมื่อเก็บใส่ถุงพลาสติก และเก็บไว้ในที่แห้ง ส่วนปริมาณแป้งที่ตรวจวัดได้ทั้ง 2 ครั้ง ทำให้สามารถคำนวณหา

1) ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ (2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม) และปริมาณเอนไซม์ CG358 (0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม) ที่ใช้ในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรกได้ดังนี้ คือ มันเส้นบดครั้งที่ 1 จะใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ 19.48 กรัม และปริมาณเอนไซม์ GC358 1.95 กรัม และมันเส้นบดครั้งที่ 2 จะใช้ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ 18.68 กรัม และปริมาณเอนไซม์ GC358 1.87 กรัม

2) ปริมาณเอนไซม์ CG147 (0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม) ที่ใช้ในการทำ Pre-Saccharification ดังนี้ คือ มันเส้นบดครั้งที่ 1 เท่ากับ 5.84 กรัม และมันเส้นบดครั้งที่ 2 เท่ากับ 5.60 กรัม

3) ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green (0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม) ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบด ดังนี้ คือ มันเส้นบดครั้งที่ 1 เท่ากับ 5.84 กรัม และมันเส้นบดครั้งที่ 2 เท่ากับ 5.60 กรัม

ลักษณะภายนอกของมันเส้นบดทั้ง 2 ครั้งที่ใช้มีสีขาวนวลดังภาพที่ 97 เมื่อนำมันเส้นบดผสมกับน้ำเพื่อเตรียมย่อยได้ดังภาพที่ 98 และเมื่อนำไปย่อยแล้วจะได้ดังภาพที่ 99

ภาพที่ 97 ลักษณะของมันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ภาพที่ 98 มันเส้นบดผสมกับน้ำก่อนการย่อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 99 มันเส้นบดผสมกับน้ำหลังจากการย่อย

3. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

กล้าเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง คือ ยีสต์แห้ง (active dried yeast) *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green เป็นยีสต์ที่ผ่านการทำแห้งมาให้อยู่ในรูปเม็ดทรงกระบอกเล็ก สีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 100) และถูกพัฒนาขึ้นมาใช้สำหรับการหมักเอทานอลโดยเฉพาะ จุดเด่นของยีสต์แห้ง Fali Green ของยีสต์ที่ใช้สำหรับหมักเอทานอล คือ ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น ผลิตเอทานอลได้รวดเร็ว แต่ได้ปริมาณเอทานอลไม่สูงเท่ากับยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ และใช้อุณหภูมิในการหมักที่ 30-35 องศาเซลเซียส และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งโดยปกติยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์จะใช้ระยะเวลาในการหมักนานประมาณ 21-28 วัน ให้ปริมาณเอทานอลสูง อุณหภูมิที่ใช้อยู่ประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส และไม่ทนอุณหภูมิสูง

ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล โดยมันเส้นบดครั้งที่ 1 เท่ากับ 5.84 กรัม และมันเส้นบดครั้งที่ 2 เท่ากับ 5.60 กรัม ซึ่งได้จากการตรวจวัดปริมาณแป้งที่มีอยู่ในมันเส้นบด และนำมาคำนวณปริมาณยีสต์แห้งที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหัวข้อที่ 1

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์แห้ง Fali Green เริ่มโดยการทำรีไฮเดรต (Rehydrated) ยีสต์แห้ง โดยผสมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 35±5 องศาเซลเซียส 80 มิลลิลิตร กับ glucose 2 กรัม และเทผสมกับยีสต์แห้ง ทิ้งไว้ 15-30 นาที กล้าเชื้อยีสต์ที่พร้อมที่จะใส่ลงไปในถังหมักจะมีลักษณะ คือ มีฟองขึ้นเป็นจำนวนมาก มีสีน้ำตาลอ่อน และมีกลิ่นจากการที่ยีสต์เกิดกิจกรรมต่าง ๆ ดังภาพที่ 101 ซึ่งการรีไฮเดรต (Rehydrated) ยีสต์แห้งเป็นการทำให้ยีสต์คืนตัวก่อนเติมลงในถังหมัก เพื่อให้ยีสต์ปรับตัว และพร้อมสำหรับกิจกรรมในกระบวนการหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 100 ลักษณะของยีสต์แห้ง (active dried yeast) *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green

ภาพที่ 101 ลักษณะของกล้าเชื้อยีสต์แห้ง (active dried yeast) *Saccharomyces cerevisiae* ชื่อทางการค้า Fali Green ที่ผ่านการรีไฮเดรต (Rehydrated) ซึ่งพร้อมที่จะใส่ลงไปในถังหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลจากมันเส้นบด

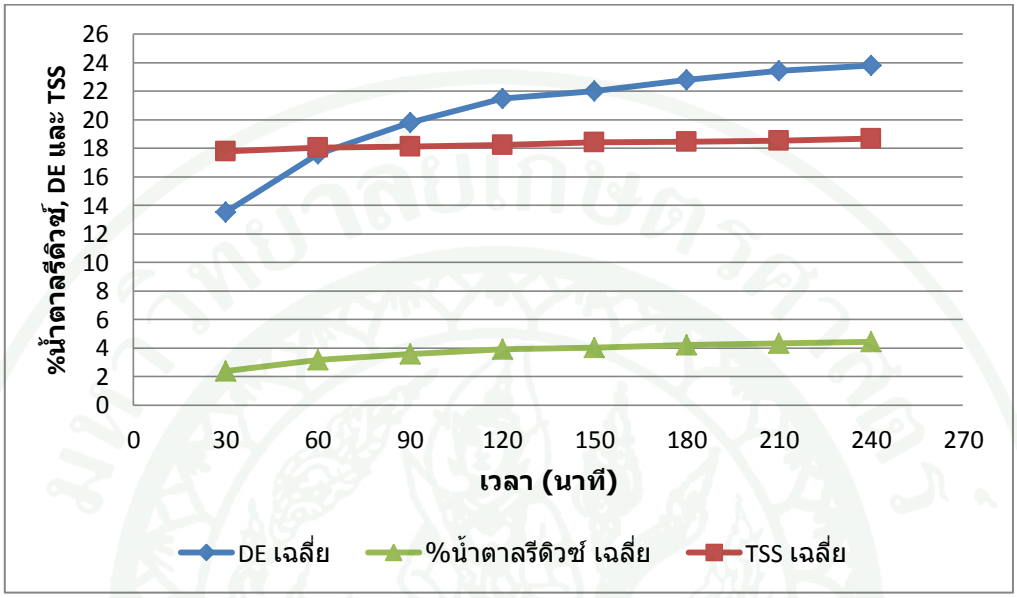
4.1 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358

ในขั้นตอนการทำ Liquefaction เป็นการทำให้แป้งมีขนาดโมเลกุลเล็กลง น้ำแป้งที่ย่อยแล้วในช่วงนี้จะเรียกว่า มอลโทเด็กซ์ทริน (Maltodextrin) โดยเริ่มจากการให้ความร้อนแก่น้ำแป้งมันเส้นบด เพื่อให้แป้งสุกพร้อมที่จะถูกย่อยเกิดการเจลาติไนซ์ (Gelatinization) กล่าวคือ เม็ดแป้งจะเกิดการพองตัวและสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีขึ้น โครงสร้างของแป้งจะมีความแข็งแรงน้อยลง ทำให้น้ำแป้งมีความหนืดสูงขึ้น จากนั้นโมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ GC358 (α-amylase) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการย่อยพันธะ α-1,4 ภายในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม (Endo-enzyme) ทำให้โมเลกุลของแป้งสั้นลง ส่งผลให้ความหนืดของน้ำแป้งลดลงอย่างรวดเร็ว Maltodextrin ที่ได้จากการย่อยนี้สามารถบอกถึงค่าร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Dextrose Equivalent, DE หรือเรียกว่า สมมูลเดกซ์โทรส) ถ้าค่า DE เพิ่มขึ้น แสดงว่าแป้งถูกย่อยได้มากขึ้น (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2543 ตรวจเอกสารโดยธันยาภรณ์, 2548)

ในการศึกษาทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Liquefaction ด้วยเอนไซม์ GC358 โดยทำการย่อยในถังหมักขนาด 60 ลิตร ซึ่งใช้ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25% โดยน้ำหนัก คือ น้ำหนักมันเส้นบด 15 กิโลกรัม ผสมกับน้ำ 45 กิโลกรัม และใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC358 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ค่า pH 5.7-5.8 ที่อุณหภูมิ 83-85 องศาเซลเซียส โดยในขั้นตอนแรก ผสมมันเส้นบดกับน้ำ และใช้ใบพัดกวนผสมเพื่อให้มันเส้นบดกับน้ำผสมเข้ากัน จากนั้นเติม Co-enzyme ที่ช่วยในการดำเนินกิจกรรมการย่อย คือ $CaCl_2.H_2O$ เท่ากับ 2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม และวัด pH ของน้ำแป้ง และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.7-5.8 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 20% ขั้นตอนต่อไป คือ ให้ความร้อนกับน้ำแป้งโดยปล่อยไอน้ำเข้าไปใน Internal coil ภายในถังหมัก ซึ่งระบบ Internal coil สามารถทำให้น้ำแป้งมีอุณหภูมิสูงขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลาประมาณ 15-20 นาที เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึง 60 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์ GC358 ลงไปในถังหมัก เพราะจากการทดลองถ้าใส่เอนไซม์หลังจากน้ำแป้งมีอุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส จะทำให้น้ำแป้งข้นหนืดมาก และทำให้ใบพัดกวนกวนน้ำแป้งไม่ได้ ส่งผลให้แป้งที่ติดตรงบริเวณ Internal coil ไหม้ และติดกับ Coil ทำให้เกิดการถ่ายเทความร้อนไม่ดี เนื่องจากน้ำแป้งมันสำปะหลังจะเกิดการเจลาทิไนเซชันของแป้งมันปะหลังที่อุณหภูมิ 58-70 องศาเซลเซียส (กล้าณรงค์ และ เกื้อกูล, 2543) เมื่อเติมเอนไซม์ลงไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แล้วให้ความร้อนต่อไปจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 83-85 องศาเซลเซียส และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ระดับนี้เพื่อย่อยแป้งนาน 4 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุกๆ 30 นาที เพื่อนำไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า DE



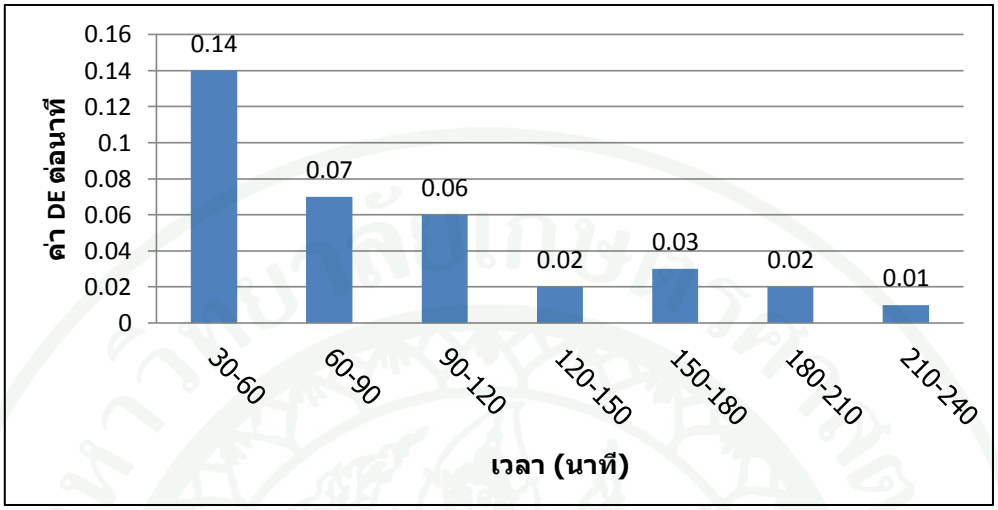
ภาพที่ 102 ผลของเวลากับค่า DE และค่า TSS ต่อการทำ Liquefaction ด้วยเอนไซม์ GC358 เฉลี่ย

จากการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Liquefaction ด้วยเอนไซม์ GC358 พบว่าเมื่อเวลาในการย่อยนานขึ้น จะทำให้ค่า DE เพิ่มขึ้น โดยมีค่า DE ประมาณ 23 ที่เวลา 210-240 นาที ซึ่งที่เวลา 30 นาที มีค่า DE 13.52 ± 0.56 ย่อยต่อจนถึงเวลาที่ 120 นาที มีค่า DE 21.46 ± 0.37 และเวลาที่ 240 นาที มีค่า DE 23.78 ± 0.37 ซึ่งเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเวลาที่ 120 นาที เนื่องจากเอนไซม์ α-amylase ทำหน้าที่ในการย่อยแป้งในลักษณะสุ่มตัดภายใน ดังแสดงในภาพที่ 4 และความหนืดของแป้งลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก

จากภาพที่ 102 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่า DE แปรผันตรงกัน คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น ค่า DE ก็มากขึ้น เนื่องจากค่า DE หาจากร้อยละของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยปริมาณของแข็งมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาในการทำ Liquefaction เพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 30 นาที มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 17.80 ± 0.80 ^{o}Brix เพิ่มขึ้นเป็น 18.67 ± 0.50 ^{o}Brix ที่เวลา 240 นาที ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่า DE เพิ่มขึ้นอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รวดเร็วในช่วงเวลา 30-120 นาที แต่หลังจากนั้นในช่วงเวลา 150-240 นาที ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่า DE เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 103 การเปรียบเทียบผลต่างของค่า DE ต่อ ผลต่างของเวลาในการทำ Liquefation ด้วยเอนไซม์ GC358 เฉลี่ย

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่า DE จากภาพที่ 102 ยังไม่เพียงพอที่จะสรุปได้ว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำ Liquefaction เนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่า DE ยังเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นการหาผลต่างของค่า DE ต่อผลต่างของเวลา (ค่า DE ต่อนาที) ในภาพที่ 103 ออกมาทำให้เห็นได้ชัดว่าเวลาที่เหมาะสมในการทำ Liquefaction คือ 120 นาที โดยสังเกตได้จากค่า DE ต่อนาทีของเวลา 30-60 นาที 60-90 นาที และ 90-120 นาที คือ 0.14 ,0.07 และ0.06 (ค่า DE ต่อนาที) ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าค่า DE ต่อนาทีในช่วงของเวลา 120-150 นาที 150-180 นาที 180-210 นาที และ 210-240 นาที คือ 0.02, 0.03, 0.02 และ 0.01 (ค่า DE ต่อนาที) ตามลำดับ ที่ช่วงเวลา 90-120 นาที มีค่า DE ต่อนาทีมากกว่าช่วงเวลาที่ 120-150 นาที ถึง 3 เท่า

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของธันยาภรณ์ (2548) ซึ่งทำการทดลองการผลิตเอทานอลจากมันเส้นโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน รายงานว่าเวลาที่เหมาะสมในการทำ Liquefaction โดยใช้เอนไซม์ Termamyl120L ที่ความเข้มข้นของมันเส้น 25% คือ 120 นาที เพราะฉะนั้น การใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กัน จะให้เวลาที่เหมาะสมในการทำ Liquefaction เหมือนกัน และค่า DE ที่ได้จะไม่สูงมากนักเมื่อทำการย่อยเป็นเวลาเวลานานขึ้น ซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการผลิตมากยิ่งขึ้นเพราะจะสูญเสียปริมาณไอน้ำมากขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นในขั้นตอนการทำ Liquefaction ด้วยเอนไซม์ GC358 ที่ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25% ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC358 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ค่า pH 5.7-5.8 ที่อุณหภูมิ 83-85 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการทำ Liquefaction ด้วยเอนไซม์ GC358 คือ 120 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.91 ± 0.08% และค่า DE เท่ากับ 21.46 ± 0.37 ซึ่งจะนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป คือ การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

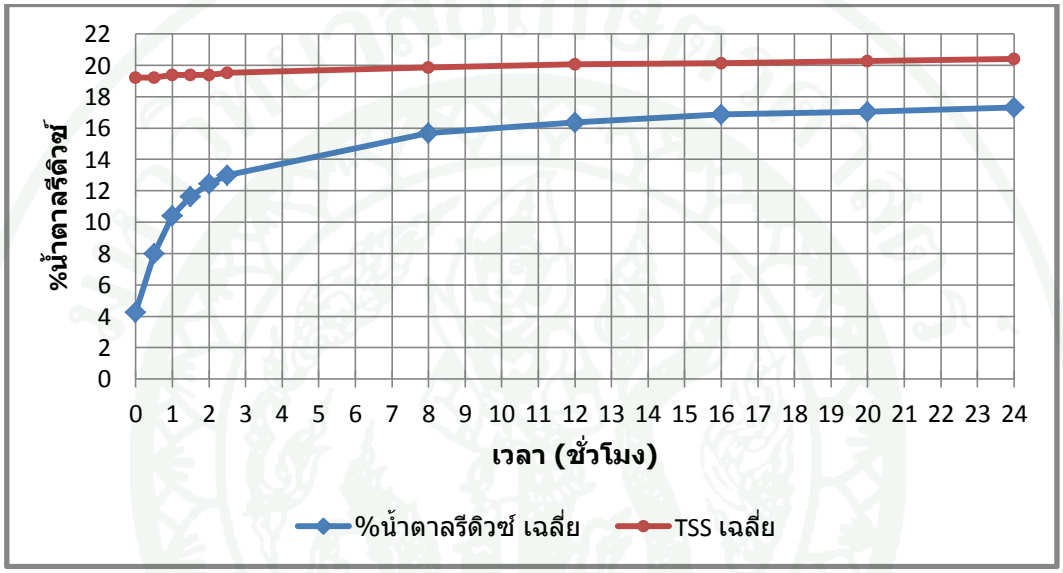
4.2 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

การทำ Pre-Saccharification เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาล Maltodextrin ที่ได้จากการทำ Liquefaction เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะใช้เวลาในการย่อยไม่นาน เพื่อไม่ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีมากเกินไป เพราะถ้าปริมาณน้ำตาลมากเกินไป เซลล์ยีสต์จะมีความสามารถในการหายใจเสียไป หรือถูกยับยั้งอย่างรุนแรง เรียกว่า Crabtree effect มีผลทำให้อัตราการเจริญและการผลิตเอทานอลลดลง ในขั้นตอนการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่เติมเข้าไป ดังนั้นการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 เริ่มโดยการลดอุณหภูมิจาก 85 องศาเซลเซียส เหลือ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งในขั้นตอนนี้จะอาศัยเอนไซม์ GC147 (Glucoamylase) เป็นเอนไซม์ประเภท Exo-enzyme ที่ย่อยพันธะจากภายนอกเข้ามา โดยจะย่อยแป้งที่พันธะ α-1,4 และพันธะกิ่ง α-1,6 จากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ (non-reducung end) เข้าไปทีละโมเลกุล ดังแสดงในภาพที่ 5 ผลจากการย่อยจะได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะพบว่าในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ Glucoamylase จะทำให้น้ำแป้งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า DE เพิ่มขึ้นอย่างมาก (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2543)

ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยทำการย่อยในถังหมักขนาด 60 ลิตร ซึ่งใช้ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%โดยน้ำหนัก คือ น้ำหนักมันเส้นบด 15 กิโลกรัม ผสมกับน้ำ 45 กิโลกรัม และทำการย่อยมันเส้นครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358 ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC358 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ค่า pH 5.7-5.8 ที่อุณหภูมิ 83-85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 3.9% และค่า DE ประมาณ 21 จากนั้นลดอุณหภูมิของน้ำตาล Maltodextrin จากอุณหภูมิ 83-85 องศาเซลเซียส เหลือ 63-65 องศาเซลเซียส และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ระดับนี้ย่อยแป้งนาน 24 ชั่วโมง โดยปล่อยน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่มีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เข้าไปใน Internal coil ภายในถังหมัก เมื่อน้ำตาล Maltodextrin มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส วัดค่า pH และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 4.0-4.5 ด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 20% ขั้นตอนต่อไป คือ เติมเอนไซม์ GC147 ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC147 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ทำ Pre-Saccharification นาน 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพที่ 104 ผลของเวลาและ %น้ำตาลรีดิวซ์ ต่อการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 เฉลี่ย

จากภาพที่ 104 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1 ชั่วโมงแรก โดยเพิ่มจาก 4.25 ± 0.12% เป็น 10.40 ± 0.22% และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งที่ 12-24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นน้อยมากจาก 16.36 ± 0.53% เป็น 17.31 ± 0.82% ในขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาในการทำ Pre-Saccharification เพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 0 ชั่วโมง มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 19.20 ± 0.00 °Brix เพิ่มขึ้นเป็น 20.40 ± 0.20 °Brix ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าประมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในขั้นตอนการทำ Pre-Saccharification มีค่ามากกว่าในขั้นตอน Liquefaction มาก เนื่องจากเอนไซม์ GC147 หรือเอนไซม์ glucoamylase มีการย่อยพันธะจากภายนอกเข้ามา โดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จะย่อยแป้งที่พันธะ α-1,4 และพันธะกิ่ง α-1,6 จากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ (non-reducung end) เข้าไปทีละโมเลกุล จึงทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงขึ้นมาก

จากข้อมูลผลการทดลองพบว่าที่เวลา 1 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 10.40 ± 0.22% ซึ่งเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สอดคล้องกับการทดลองของ Panchal (1990) ที่ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 100 กรัมต่อลิตร หรือ 10% ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด นั่นคือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ดังนั้นในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นโดยกระบวนการหมักแบบปกตินั้นสภาวะเริ่มต้นของการหมักด้วยยีสต์จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง เมื่อยีสต์เจริญในที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูง หน้าที่ของไมโทคอนเดรียจะถูกกดดันเรียกว่า อิทธิพลแคร็บทรี (Crabtree effect) หรืออิทธิพลกลูโคส (Glucose effect) หรือการกดดันแคแทบอไลต์ (Catabolite repression) ทำให้ยีสต์มีการหายใจลดลง และอีกสาเหตุหนึ่งของการมีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูงในสภาวะเริ่มต้นของการหมักก็คือ แรงดันออสโมซิส เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ เพราะความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงจะทำให้มีการเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลและสะสมอยู่ภายในเซลล์ยีสต์มากขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดผลเสียต่อองค์ประกอบต่างๆของเซลล์ยีสต์และทำให้เซลล์ยีสต์ตายในที่สุด (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ดังนั้นการทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์เป็นสิ่งที่สำคัญต่อการผลิตเอทานอล

ดังนั้นในขั้นตอนการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ที่ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25% ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC147 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ค่า pH 4.0-4.5 ที่อุณหภูมิ 63-65 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 คือ 1 ชั่วโมง จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 10.40 ± 0.22% เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอลจากเชื้อ *S. cerevisiae* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Panchal (1990) โดยจะนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป คือ การศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า ORP ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเทอานอล ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

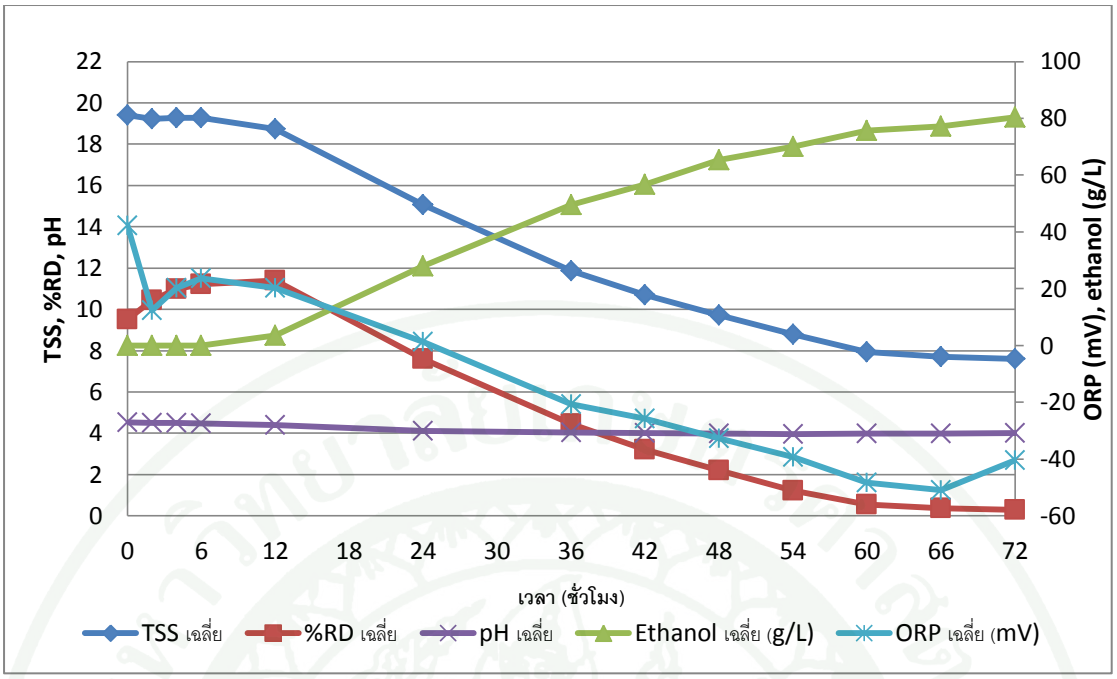
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า Oxidation Reduction Potential (ORP) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 เป็นการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยการย่อยมันเส้นบดครั้งแรกด้วยเอนไซม์ GC358 นาน 2 ชั่วโมงและผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลด้วยยีสต์แห้ง *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีชื่อทางการค้าว่า Fali Green นาน 72 ชั่วโมง ซึ่งในระหว่างการทดลองได้วัดค่า ORP ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของค่า ORP, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147

จากภาพที่ 105 พบว่าในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 9.52% เป็น 11.20% ส่วนปริมาณเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และค่า ORP ในช่วง 0-2 ชั่วโมงแรกลดลงจาก 42.3 mV เป็น 12.3 mV และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 2-6 จาก 12.3 mV เป็น 23.7 mV ส่วนค่า pH และ TSS ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยค่า pH ลดลงจาก 4.52 เป็น 4.49 และค่า TSS ลดลงจาก 19.40 เป็น 19.27 จากผลดังกล่าวแสดงว่า เซลล์ยีสต์อยู่ในช่วงปรับตัวก่อนการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน (lag phase) จึงยังไม่มีการผลิตเอทานอลเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kukec *et al.* (2001) คือ ในช่วงแรกกระบวนการหมักเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วงปรับตัว จะยังไม่มีการผลิตเอทานอลเกิดขึ้น โดยสังเกตได้จากน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ GC147 ที่ย่อยแป้งยังคงทำงานเพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล นั่นแสดงว่ายีสต์ยังไม่มีการใช้น้ำตาลเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล แต่ยีสต์อยู่ในช่วงการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมจึงทำให้ยีสต์ไม่เกิดการแบ่งเซลล์และผลิตเอทานอลออกมา และค่า pH และ TSS ลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากอยู่ในระยะปรับตัว เซลล์ยีสต์จึงไม่ใช้น้ำตาลในการเจริญและผลิตเอทานอล ส่วนค่า ORP จะลดลงในช่วง 2 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงค่า ORP ในช่วงการปรับตัวของเซลล์ยีสต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 105 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%RD) ค่า pH ปริมาณเอทานอล และค่า ORP ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ

ในช่วง 6-12 ชั่วโมง พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย หรืออาจเรียกได้ว่าคงที่ จาก 11.20% เป็น 11.39% ส่วนปริมาณเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3.58 กรัมต่อลิตร และค่า ORP มีค่าลดลงจาก 23.7 mV เป็น 20.3 mV ส่วนค่า pH และ TSS ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยค่า pH ลดลงจาก 4.49 เป็น 4.40 และค่า TSS ลดลงจาก 19.27 เป็น 18.72 จากผลดังกล่าวแสดงว่า เซลล์ยีสต์เริ่มมีการผลิตเอทานอล แต่เนื่องจากยังผลิตได้ไม่มากนัก จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่ เพราะยีสต์มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งในการเจริญเติบโต แบ่งเซลล์ และผลิตเอทานอลในปริมาณใกล้เคียงกับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ GC147 ทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) และค่า pH ลดลงเล็กน้อย เนื่องจากกระบวนการหมักผลิตเอทานอลได้ไม่มากนัก ส่วนค่า ORP มีค่าลดลงเล็กน้อย ซึ่งทำให้สังเกตได้ว่าเมื่อเซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลในการแบ่งเซลล์ และผลิตเอทานอล จะทำให้ค่า ORP ลดลง เนื่องจากค่า ORP มีความสัมพันธ์กับออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก เมื่อเซลล์ยีสต์มีการใช้ออกซิเจนสำหรับการเจริญ แบ่งเซลล์ และผลิตเอทานอล จะทำให้ออกซิเจนในน้ำหมักลดลง จึงทำให้ค่า ORP ลดลงเช่นเดียวกัน ดังนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 6-12 จัดได้ว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อยู่ในช่วงปลายของ log phase และช่วงต้นของ lag phase ซึ่งเซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และเริ่มมีการผลิตเอทานอลออกมา (วราวุฒิ, 2529 และสาวิตรี, 2549)

ต่อมาในช่วง 12-60 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดจาก 11.39% เป็น 0.56% ส่วนปริมาณเอทานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 3.58 กรัมต่อลิตร เป็น 75.73 กรัมต่อลิตร และค่า ORP ก็มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน คือ ค่า ORP ลดลงอย่างมากจาก 20.3 mV เป็น -48.3 mV ส่วนค่า pH ลดลงจาก 4.40 เป็น 3.97 ในชั่วโมงที่ 12-54 และค่า pH เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย หรืออาจเรียกได้ว่าคงที่ในชั่วโมงที่ 60 คือ 3.98 และค่า TSS ลดลงอย่างมากจาก 18.72 เป็น 7.93 จากผลดังกล่าวแสดงว่า ยีสต์มีการใช้น้ำตาลกลูโคสจำนวนมากในการผลิตเอทานอล ทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น และมีผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง ส่วนค่าอื่น ๆ เช่น ปริมาณของแข็งที่ละลายได้, pH และค่า ORP มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 12-60 จึงจัดได้ว่าอยู่ในช่วง lag phase และ stationary phase ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด และอัตราการผลิตเอทานอลสูงที่สุด (Kukec *et.al*., 2001) ส่วนค่า ORP มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ก็มีลักษณะเช่นเดียวกับในช่วงชั่วโมงที่ 6-12 คือ เมื่อน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปในการผลิตเอทานอล และแบ่งเซลล์โดยยีสต์ จะทำให้ค่า ORP ลดลง นั่นแสดงว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักลดลงด้วยเช่นเดียวกัน

ในช่วง 60-72 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อย และเข้าใกล้ศูนย์ จาก 0.56% เป็น 0.29% ส่วนปริมาณเอทานอลก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จาก 75.73 กรัมต่อลิตร เป็น 80.44 กรัมต่อลิตร และค่า ORP ในช่วง 60-66 ชั่วโมงลดลงเพียงเล็กน้อยจาก -48.3 mV เป็น -51.0 mV และเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในชั่วโมงที่ 66-72 จาก -51.0 mV เป็น -40.3 mV ส่วนค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 3.97 เป็น 4.01 และค่า TSS ลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 7.93 เป็น 7.60 จากผลดังกล่าวแสดงว่า เมื่อน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้หมดลง เซลล์ยีสต์จะเข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเจริญ ซึ่งเรียกว่า Death phase คือ ปริมาณเซลล์ยีสต์ลดลง และตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากขาดแคลนสารอาหาร นั่นคือ อาหารของยีสต์ใกล้หมดลง และปริมาณของเสียที่ยีสต์สร้างเพิ่มมากขึ้นจนเซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ จึงทำให้ยีสต์ตายลง และเกิดการย่อยสลายตัวเอง ส่งผลให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มคงที่ ซึ่งต่างกับค่า ORP และค่า pH ที่มีค่าเพิ่มขึ้น ดังนั้น เมื่อเซลล์ยีสต์เข้าสู่ death phase ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หมดลง เซลล์ยีสต์จะเริ่มหยุดผลิตเอทานอล จะทำให้ค่า ORP และค่า pH เพิ่มขึ้น (Kukec *et.al*., 2001) จะสังเกตได้ว่าเมื่อกิจกรรมของยีสต์เกิดขึ้นน้อยลง ซึ่งหมายความว่าเซลล์ยีสต์เริ่มหยุดการเจริญเติบโต อัตราการผลิตเอทานอลก็เริ่มหยุดลงเช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้หมด ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักลดต่ำลง ซึ่งเป็นสภาวะที่เซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทั้งหมดนี้บ่งบอกว่ากระบวนการหมักใกล้สิ้นสุดลง ซึ่งจะทำให้ค่า ORP เพิ่มสูงขึ้น

จากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้สรุปได้ว่า การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ มี Growth curve ดังนี้

0-6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก การเจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในระยะปรับตัว หรือ Lag phase ส่งผลให้ค่า ORP ลดลงใน 2 ชั่วโมงแรก และเพิ่มขึ้นใน 2-6 ชั่วโมง หรือเรียกได้ว่าค่า ORP มีแนวโน้มลดลง เนื่องจาก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น และในกระบวนการหมักยังไม่มีการผลิตเอทานอล

6-12 ชั่วโมง การเจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วงปลายของ log phase และช่วงต้นของ lag phase ส่งผลให้ค่า ORP ลดลงเล็กน้อย เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลในการแบ่งเซลล์ และเริ่มผลิตเอทานอล แต่ยังผลิตเอทานอลได้ไม่มากนัก

12-60 ชั่วโมง การเจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วง lag phase และ stationary phase ส่งผลให้ค่า ORP ลดลงอย่างมาก เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณมากในการผลิตเอทานอล ซึ่งมีอัตราการผลิตเอทานอลสูงที่สุด

60-72 ชั่วโมง การเจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในระยะตาย Death phase ส่งผลให้ค่า ORP เพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์ยีสต์เริ่มหยุดการเจริญเติบโต อัตราการผลิตเอทานอลก็เริ่มหยุดลงเช่นเดียวกัน เนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้หมด ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักลดต่ำลง ซึ่งเป็นสภาวะที่เซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้

จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าค่า ORP แปรผกผันกับปริมาณเอทานอล และค่า ORP แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งทำให้สามารถบ่งบอกถึงช่วงการเจริญของเซลล์ยีสต์ หรือ Growth curve ได้ ดังนั้น ค่า ORP จึงมีประโยชน์สำหรับใช้ในการติดตามกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักเอทานอลจากมันเส้นบดแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และยังติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ว่า ณ ตอนนี้มีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงใดของ Growth curve

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ที่ 72 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 80.44 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ 0.29% แต่การหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ทำโดยการนำปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ได้ผลดังตารางผนวกที่ ค1 และ ค2 ตามลำดับ จากตารางผนวกที่ ค 1 และ ค2 ได้ค่านัยสำคัญ (Sig.) เท่ากับ 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่า ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล มีอย่างน้อย 1 ข้อมูล แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หมายความว่า มีปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อย่างน้อย 1 ข้อมูลแตกต่างกัน ดังนั้น จึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 8

จากตารางที่ 8 พบว่าชั่วโมงที่ 60 มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 54, 66 และ 72 แต่ชั่วโมงที่ 54 มีปริมาณเอทานอลแตกต่างกับชั่วโมงที่ 66 และ 72 ดังนั้นจึงเลือกชั่วโมงที่ 60 คือ ใช้เวลาในการหมักน้อยที่สุด ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 66 และ 72 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักของชั่วโมงที่ 60 ไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 66 และ 72 ดังนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักชั่วโมงที่ 60 ไม่เพียงพอสำหรับยีสต์ที่จะเจริญและผลิตเอทานอลให้เพิ่มมากขึ้น แสดงว่า เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติที่วิเคราะห์ได้ในทางสถิติ คือ 60 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.73 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.56% ซึ่งสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ได้จากการเปรียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเซลล์ยีสต์ที่เวลา 60-66 ชั่วโมง และ 66-72 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่าที่เวลา 54-60 ชั่วโมง ดังภาพที่ 106 นั่นแสดงว่า เวลาที่ 60 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสม เนื่องจาก การเจริญของเซลล์ยีสต์เข้าสู่ระยะสุดท้ายของกระบวนการหมัก หรือ Death phase ซึ่งระยะนี้จะสังเกตจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นอาหารของยีสต์ใกล้หมดลง จึงทำให้การผลิตเอทานอลลดลง หรือปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จากภาพที่ 105 จะเห็นว่าชั่วโมงที่ 60 เริ่มเข้าสู่ระยะสุดท้ายของกระบวนการหมัก หรือ Death phase เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.56% และผลิตเอทานอลได้ 75.73 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 66 มีปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

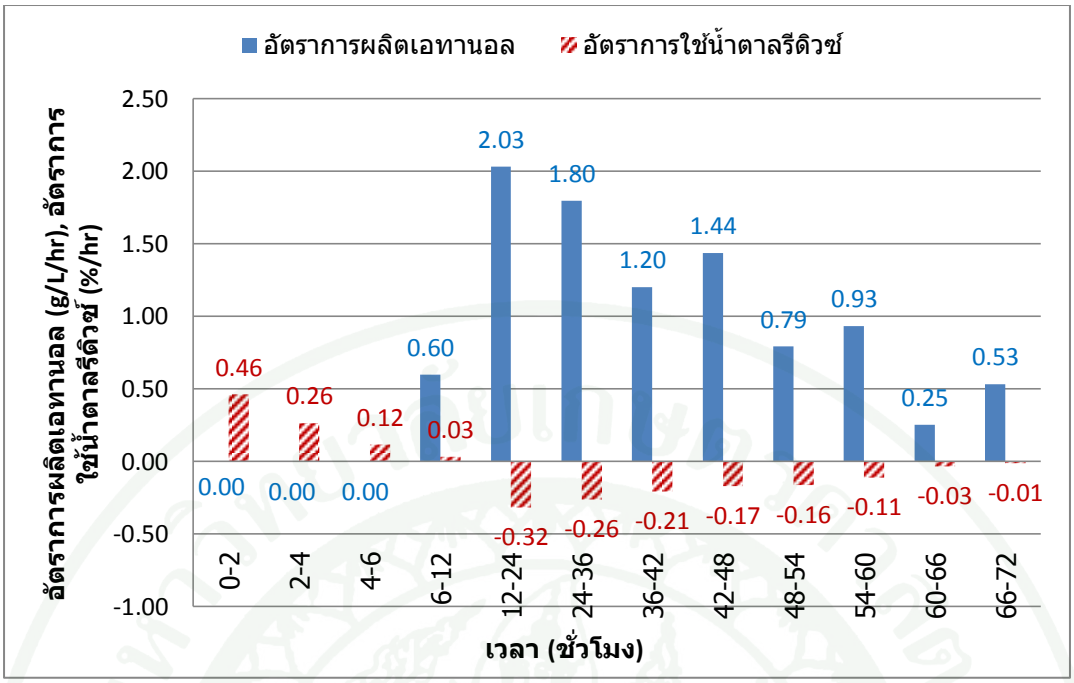
น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.36% และผลิตเอทานอลได้ 77.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงน้อยมาก และผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นไม่สูงเมื่อเทียบกับระยะเวลาที่เท่ากัน

ตารางที่ 8 ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%)
0	0.00 ± 0.00^{a}	9.52 ± 0.36^{a}
2	0.00 ± 0.00^{a}	10.44 ± 0.46^{b}
4	0.00 ± 0.00^{a}	10.97 ± 0.35^{bc}
6	0.00 ± 0.00^{a}	11.20 ± 0.29^{c}
12	3.58 ± 1.39^{a}	11.39 ± 0.72^{c}
24	27.97 ± 1.79^{b}	7.59 ± 0.30^{d}
36	49.53 ± 3.63^{c}	4.45 ± 0.43^{e}
42	56.75 ± 4.00^{d}	3.20 ± 0.40^{f}
48	65.37 ± 5.15^{e}	2.19 ± 0.33^{g}
54	70.13 ± 4.55^{ef}	1.22 ± 0.25^{h}
60	75.73 ± 5.40^{fg}	0.56 ± 0.07^{i}
66	77.25 ± 5.69^{g}	0.36 ± 0.04^{i}
72	80.44 ± 4.99^{g}	0.29 ± 0.01^{i}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 106 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ (อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ เป็นบวก แสดงว่า น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่ม เป็นลบ แสดงว่า น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

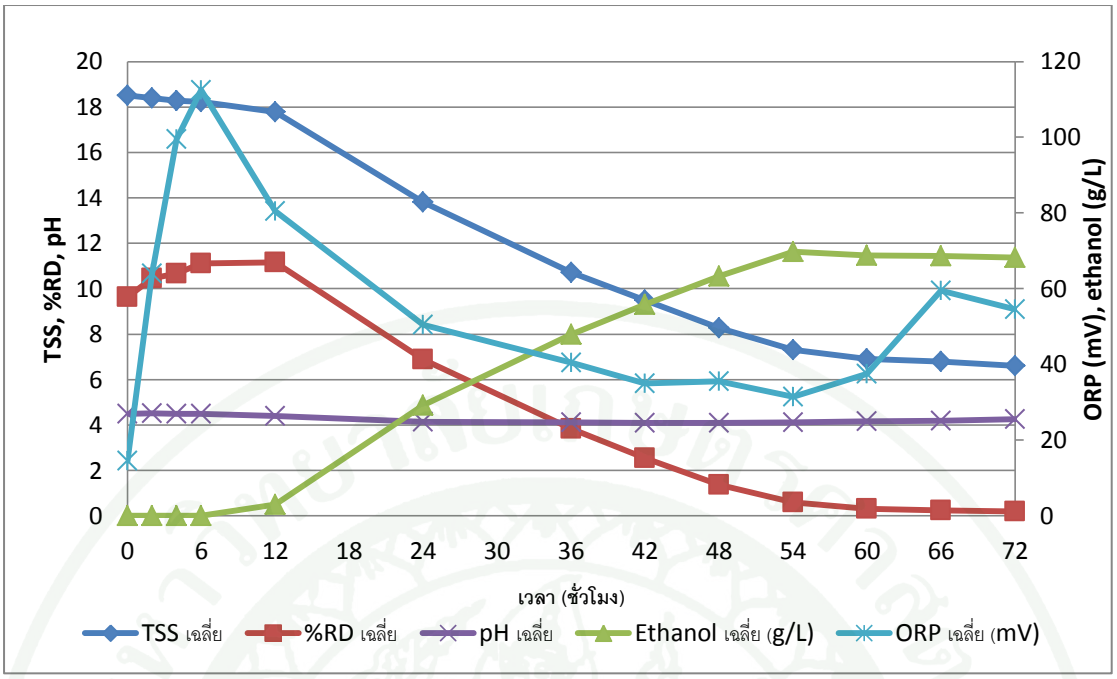
6. การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก

6.1 การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)

การทดลองนี้เป็นการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ซึ่งมีการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการทดลองในหัวข้อที่ 5 โดยแตกต่างกันที่การทดลองนี้จะมีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก อากาศจะถูกกรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนเข้าสู่ถังหมัก เพื่อกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอากาศ และในระหว่างการทดลองได้วัดค่า ORP ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของค่า ORP ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก

จากภาพที่ 107 พบว่าในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 9.6357% เป็น 11.1147% ไม่พบปริมาณเอทานอลในช่วงแรก และค่า ORP เพิ่มขึ้นจาก 14.5 mV เป็น 112.5 mV ซึ่งแตกต่างจากค่า ORP ของการหมักแบบปกติ ส่วนค่า pH และ TSS ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยค่า pH ลดลงจาก 4.50 เป็น 4.49 และค่า TSS ลดลงจาก 18.50 เป็น 18.24 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า เซลล์ยีสต์อยู่ในช่วงระยะปรับตัวก่อนการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน หรือ lag phase เซลล์ยีสต์ไม่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตเอทานอล (Kukec *et.al*., 2001) จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่ลดลงและเพิ่มขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ยังคงทำงานผลิตน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ ส่วนค่า pH และ TSS ลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการหมักแบบปกติ แต่ค่า ORP มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจาก มีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก ซึ่งการให้อากาศมีผลต่อค่า ORP โดยตรง ทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น จึงทำให้ค่า ORP เพิ่มสูงขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 107 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%RD) ค่า pH ปริมาณเอทานอล และค่า ORP ที่ได้มาจากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)

ต่อมาในช่วง 6-54 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงอย่างมากจาก 11.11% เป็น 0.58% ส่วนปริมาณเอทานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 0 กรัมต่อลิตร เป็น 69.78 กรัมต่อลิตร และค่า ORP ก็มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน คือ ค่า ORP ลดลงอย่างมากจาก 112.5 mV เป็น 31.5 mV ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการหมักแบบปกติ คือ มีค่า ORP ลดลง แต่มีค่า ORP ที่สูงกว่า เพราะ การให้อากาศเข้าไปในถังหมัก ทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักยังมีมากกว่าการหมักแบบไม่เติมอากาศ ส่งผลให้ยีสต์มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เร็วขึ้น เพื่อการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงทำให้เซลล์ยีสต์ผลิตเอทานอลเร็วขึ้น หรือเซลล์ยีสต์มีกิจกรรมต่าง ๆ เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนค่า pH ลดลงจาก 4.49 เป็น 4.11 และค่า TSS ลดลงอย่างมากจาก 18.24 เป็น 7.30 จากผลดังกล่าวแสดงว่าเซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลกลูโคสในการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน และการผลิตเอทานอล ทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ปริมาณของแข็งที่ละลายได้, pH และค่า ORP มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 6-54 จึงจัดได้ว่าอยู่ในช่วง log phase และ stationary phase ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด และผลิตเอทานอลได้มากที่สุด (วราวุฒิ, 2529 และสาวิตรี, 2549) ส่วนการให้อากาศเข้าไปในถังหมักในช่วงเวลา 6-54 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่งผลให้ค่า ORP ลดลง เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีการใช้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเพื่อการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน และผลิตเอทานอล แต่เซลล์ยีสต์มีอัตราการใช้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมากกว่าการเพิ่มออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจากการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก จึงทำให้ค่า ORP ในกระบวนการหมักลดลง

ในช่วง 54-72 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย จาก 0.58% เป็น 0.20% ปริมาณเอทานอลมีปริมาณลดลงจาก 69.78 กรัมต่อลิตร เป็น 68.29 กรัมต่อลิตร และค่า ORP เพิ่มสูงขึ้นจาก 31.5 mV เป็น 54.5 mV ส่วนค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 4.11 เป็น 4.26 และค่า TSS ลดลงจาก 7.30 เป็น 6.60 จากผลการทดลองแสดงว่า เซลล์ยีสต์จะเข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเจริญ (Death phase) เนื่องจากเซลล์ยีสต์ขาดแคลนสารอาหาร และปริมาณเอทานอลที่สูง ประกอบกับปริมาณของเสียที่เซลล์ยีสต์สร้างเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้เซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ และเกิดการย่อยสลายตัวเอง ส่งผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มคงที่ ซึ่งต่างกับค่า ORP และค่า pH ที่มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อค่า ORP เพิ่มขึ้น แสดงว่าเซลล์ยีสต์เข้าสู่ death phase ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หมดลง เซลล์ยีสต์จะเริ่มหยุดผลิตเอทานอล (Kukec *et.al*., 2001) และจากปริมาณเอทานอลที่ลดลงในช่วง 54-72 ชั่วโมง เนื่องจากมีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก โดยอากาศจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอทานอล และจะพาเอทานอลออกไปจากน้ำหมัก ทำให้เอทานอลในน้ำหมักมีปริมาณลดลงต่ำกว่าการหมักโดยไม่เติมอากาศ

จากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้สรุปได้ว่า การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) มีค่า ORP ที่สัมพันธ์กับ Growth curve ดังนี้

0-6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก การจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในระยะปรับตัว หรือ Lag phase ส่งผลให้ค่า ORP เพิ่มขึ้นมาก เนื่องจากมีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก ซึ่งทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น

6-54 ชั่วโมง การจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในระยะเพิ่มจำนวน หรือ Log phase และระยะคงเดิม Stationary phase ส่งผลให้ค่า ORP ลดลง เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีการใช้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และผลิตเอทานอล แต่เซลล์ยีสต์มีอัตราการใช้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมากกว่าการเพิ่มออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจากการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก จึงทำให้ค่า ORP ในกระบวนการหมักลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

54-72 ชั่วโมง การจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในระยะตาย Death phase ส่งผลให้ค่า ORP เพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้หมด ปริมาณเอทานอลที่สูงมาก และปริมาณของเสียที่เซลล์ยีสต์สร้างเพิ่มมากขึ้น จนทำให้เซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ และเกิดการย่อยสลายตัวเอง ส่งผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง

จากผลการทดลองดังกล่าวเมื่อมีการให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก พบว่าค่า ORP แปรผกผันกับปริมาณเอทานอล และค่า ORP แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการหมักแบบปกติ ทำให้สามารถบ่งบอกถึงช่วงการเจริญของเซลล์ยีสต์ หรือ Growth curve ของกระบวนการหมักเอทานอลจากมันเส้นบดแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ที่ 72 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 68.29 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ 0.20% แต่การหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ทำโดยการนำปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ได้ผลดังตารางผนวกที่ ค5 และ ค6 ตามลำดับ จากตารางผนวกที่ ค5 และ ค6 ได้ค่านัยสำคัญ (Sig.) เท่ากับ 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล มีอย่างน้อย 1 ข้อมูล แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หมายความว่า มีปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อย่างน้อย 1 ข้อมูลแตกต่างกัน ดังนั้น จึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 9

จากตารางที่ 9 พบว่าชั่วโมงที่ 54 มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 60, 66 และ 72 ดังนั้นจึงเลือกชั่วโมงที่ 54 คือ ใช้เวลาในการหมักน้อยที่สุด ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 60, 66 และ 72 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักของชั่วโมงที่ 54 ไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 48, 60, 66 และ 72 แต่ชั่วโมงที่ 48 แตกต่างกับชั่วโมงที่ 60, 66 และ 72 จากตารางที่ 8 พบว่าชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณเอทานอลน้อยกว่าชั่วโมงที่ 54 ดังนั้น เวลาที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ที่วิเคราะห์ได้ทางสถิติ คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 69.78 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.58% ซึ่งสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ได้จากการเปรียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเซลล์ยีสต์ที่เวลา 54-60 ชั่วโมง, 60-66 ชั่วโมง และ 66-72 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่าที่เวลา 48-54 ชั่วโมง ดังภาพที่ 108 นั่นแสดงว่า เวลาที่ 54 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสม เนื่องจาก การเจริญของเซลล์ยีสต์เข้าสู่ระยะสุดท้ายของกระบวนการหมัก หรือ Death phase และในช่วง 60-72 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอลลดลงต่ำกว่าชั่วโมงที่ 54 เนื่องจากมีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก โดยอากาศจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอทานอล และจะพาเอทานอลออกไปจากน้ำหมัก ทำให้เอทานอลในน้ำหมักมีปริมาณลดลง ดังนั้น การให้อากาศในช่วง Death phase ทำให้ปริมาณเอทานอลลดลง

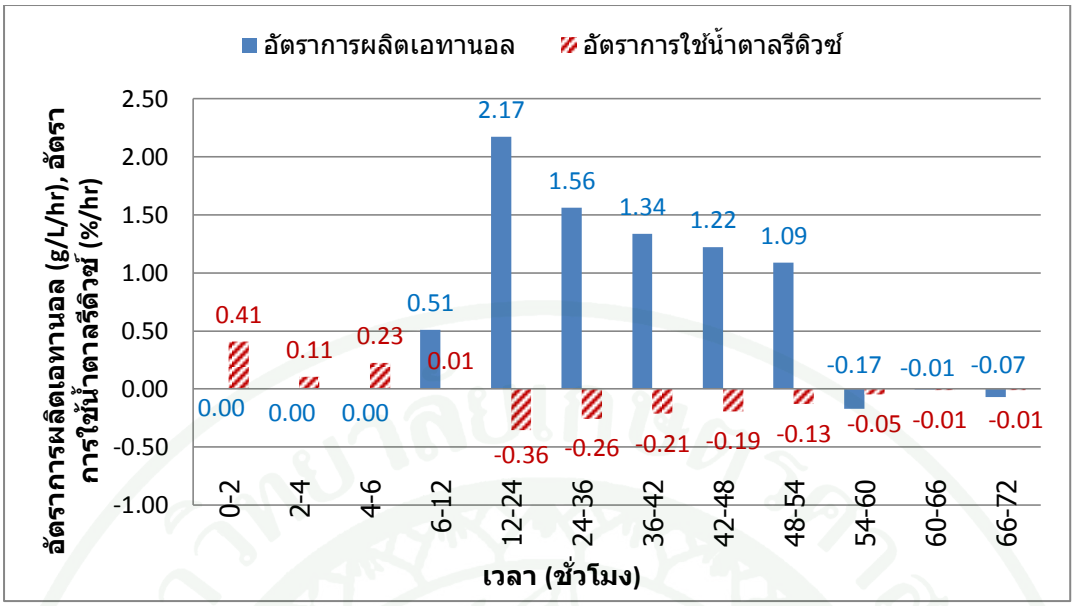
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%)
0	0.00 ± 0.00^{a}	9.63 ± 0.28^{a}
2	0.00 ± 0.00^{a}	10.45 ± 0.63^{ab}
4	0.00 ± 0.00^{a}	10.66 ± 0.35^{b}
6	0.00 ± 0.00^{a}	11.11 ± 0.45^{b}
12	3.06 ± 0.11^{b}	11.16 ± 0.56^{b}
24	29.14 ± 2.04^{c}	6.89 ± 0.66^{c}
36	47.88 ± 0.34^{d}	3.82 ± 0.40^{d}
42	55.90 ± 1.19^{e}	2.54 ± 0.26^{e}
48	63.25 ± 1.33^{f}	1.37 ± 0.21^{f}
54	69.78 ± 1.06^{g}	0.58 ± 0.12^{fg}
60	68.76 ± 1.03^{g}	0.30 ± 0.04^{g}
66	68.72 ± 2.31^{g}	0.25 ± 0.02^{g}
72	68.29 ± 2.39^{g}	0.20 ± 0.00^{g}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 108 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) (อัตราการใช้น้ำตารีดิวซ์ เป็นบวก แสดงว่า น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่ม เป็นลบ แสดงว่าน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

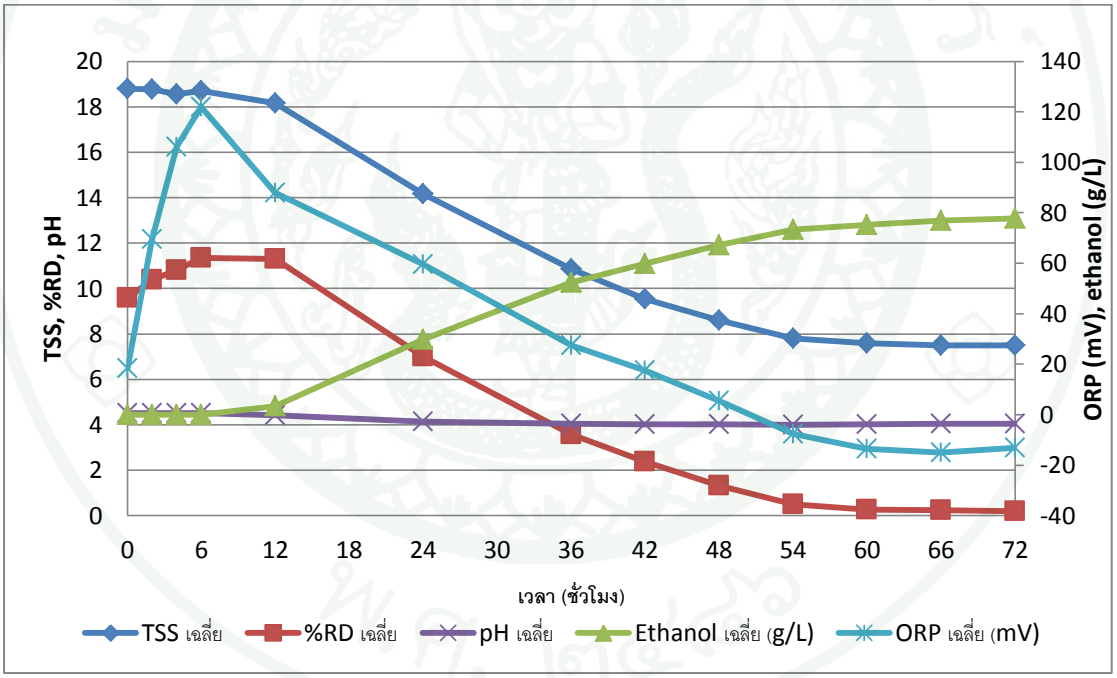
6.2 การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง เป็นการทดลองให้อากาศในช่วงแรก ซึ่งจะเป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ให้กับกระบวนการหมัก และหยุดการให้อากาศในช่วงการหมักเพราะอากาศมีส่วนในการทำให้ปริมาณเอทานอลสดลง เพื่อลดระยะเวลาในการผลิตเอทานอล แต่ยังให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับกระบวนการหมักแบบปกติหรือมากกว่า ซึ่งมีวิธีการทดลองเช่นเดียวกับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) โดยแตกต่างกันที่การทดลองนี้จะมีการให้อากาศเข้าไปในช่วงแรกของกระบวนการหมักที่เวลา 0-12 ชั่วโมง อากาศจะถูกกรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนเข้าสู่ถังหมัก เพื่อกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอากาศ และในระหว่างการทดลองได้วัดค่า ORP ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของค่า ORP ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง

จากภาพที่ 109 พบว่าในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง หรือผลการทดลองในหัวข้อ 5.1 เนื่องจากมีการให้อากาศเข้าไปในช่วงแรกของกระบวนการหมัก คือ น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 9.57% เป็น 11.34% ส่วนปริมาณเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และค่า ORP เพิ่มขึ้นจาก 18.5 mV เป็น 122.0 mV ส่วนค่า pH และ TSS ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยค่า pH ลดลงจาก 4.52 เป็น 4.51 และค่า TSS ลดลงจาก 18.80 เป็น 18.70 ดังนั้น ในช่วงนี้เซลล์ยีสต์จะอยู่ในระยะปรับตัว หรือ lag phase เซลล์ยีสต์ไม่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตเอทานอล (Kukec *et.al.,* 2001) ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ยังคงทำงานผลิตน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ ส่วนค่า ORP เพิ่มขึ้นทันทีเมื่อเริ่มปล่อยอากาศเข้าไปในถังหมัก ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับผลการทดลองในหัวข้อ 5.1 นั่นคือ เมื่อให้อากาศเข้าไปในถังหมัก จะทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น จึงส่งผลให้ค่า ORP เพิ่มสูงขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อมาในช่วง 6-54 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงอย่างมากจาก 11.34% เป็น 0.49% ส่วนปริมาณเอทานอลมีปริมาณพิ่มขึ้นจาก 0 กรัมต่อลิตร เป็น 73.37 กรัมต่อลิตร และค่า ORP ก็มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน คือ ค่า ORP ลดลงอย่างมากจาก 122.0 เป็น -7.5 mV ส่วนค่า pH ลดลงจาก 4.51 เป็น 4.01 และค่า TSS ลดลงอย่างมากจาก 18.70 เป็น 7.80 จากผลการทดลองดังกล่าวมีแนวโน้มเช่นเดียวกับการหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง แต่ปริมาณเอทานอลของการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง สูงกว่า และค่า ORP ลดลงต่ำกว่า เนื่องจากการให้อากาศในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก ทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ยีสต์มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เร็วขึ้น เพื่อการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงทำให้เซลล์ยีสต์ผลิตเอทานอลเร็วขึ้น ทำให้กิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ยีสต์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในช่วง 6-54 ชั่วโมง จึงจัดได้ว่าอยู่ในช่วง lag phase และ stationary pahse ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด และผลิตเอทานอลได้มากที่สุด (วราวุฒิ, 2529 และสาวิตรี, 2549)



ภาพที่ 109 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%RD) ค่า pH ปริมาณเอทานอล และค่า ORP ที่ได้มาจากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในช่วง 54-72 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อย และเข้าใกล้ศูนย์ จาก 0.49% เป็น 0.20% ส่วนปริมาณเอทานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 73.37 กรัมต่อลิตร เป็น 77.81 กรัมต่อลิตร โดยที่ค่า ORP ในช่วง 54-66 ชั่วโมง ลดลงจาก -7.5 mV เป็น -15.0 mV และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 72 เป็น -13 mV ส่วนค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 4.01 เป็น 4.06 และค่า TSS ลดลงเพียงเล็กน้อย จาก 7.80 เป็น 7.50 จากผลดังกล่าวแสดงว่า เซลล์ยีสต์จะเข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเจริญ หรือ death phase ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หมดลง เซลล์ยีสต์จะเริ่มหยุดผลิตเอทานอล จะทำให้ค่า ORP และค่า pH เพิ่มขึ้น (Kukec *et.al.*, 2001)

จากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้สรุปได้ว่า การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง มีค่า ORP ที่สัมพันธ์กับ Growth curve เช่นเดียวกับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ในหัวข้อ 5.1 ดังนี้

0-6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก การจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในระยะปรับตัว หรือ Lag phase ส่งผลให้ค่า ORP เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก ซึ่งทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น

6-54 ชั่วโมง การจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในระยะเพิ่มจำนวน หรือ Log phase และระยะคงเดิม Stationary phase ส่งผลให้ค่า ORP ลดลง เนื่องจากเซลล์ยีสต์เกิดกิจกรรมต่าง ๆ ทำให้มีการใช้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน และผลิตเอทานอล แต่เซลล์ยีสต์มีอัตราการใช้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมากกว่าการเพิ่มออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจากการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก จึงทำให้ค่า ORP ในกระบวนการหมักลดลง

54-72 ชั่วโมง การจริญเซลล์ยีสต์อยู่ในระยะตาย Death phase ส่งผลให้ค่า ORP เพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้หมด ปริมาณเอทานอลที่สูงมาก และปริมาณของเสียที่เซลล์ยีสต์สร้างเพิ่มมากขึ้น จนทำให้เซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ และเกิดการย่อยสลายตัวเอง ส่งผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง

จากผลการทดลองของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก 0-72 ชั่วโมง และ 0-12 ชั่วโมง พบว่าค่า ORP แปรผกผันกับปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอทานอล และค่า ORP แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่นเดียวกับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ แต่ค่า ORP ตลอดกระบวนการหมักจะสูงกว่ากระบวนการหมักแบบปกติ เพราะ การให้อากาศเข้าไปในถังหมัก ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้นและมากกว่าการหมักแบบปกติ และจากการที่ค่า ORP มีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จึงทำให้ค่า ORP มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ยีสต์ หรือ Growth cure ดังนั้น ค่า ORP สามารถใช้ในการติดตามกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักเอทานอลจากมันเส้นบดแบบ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ทั้งแบบปกติ และให้อากาศได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ที่ 72 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 77.81 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ 0.20% แต่การหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ทำโดยการนำปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ได้ผลดังตารางผนวกที่ ค9 และ ค10 ตามลำดับ จากตารางผนวกที่ ค9 และ ค10 ได้ค่านัยสำคัญ (Sig.) เท่ากับ 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล มีอย่างน้อย 1 ข้อมูล แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หมายความว่า มีปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อย่างน้อย 1 ข้อมูลแตกต่างกัน ดังนั้น จึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 10

จากตารางที่ 10 พบว่าชั่วโมงที่ 66 มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 72 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักของชั่วโมงที่ 54 ไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 60, 66 และ 72 ดังนั้น เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ที่วิเคราะห์ได้ทางสถิติ คือ 66 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 76.84 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.23% แต่ผลที่วิเคราะห์ได้จากการเปรียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเซลล์ยีสต์ที่เวลา 54-60 ชั่วโมง, 60-66 ชั่วโมง และ 66-72 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่าที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เวลา 48-54 ชั่วโมง ดังภาพที่ 110 นั่นแสดงว่า เวลาที่ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 73.37 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.49% คือ เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง เนื่องจาก ที่เวลา 66 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้มากกว่าที่เวลา 60 ชั่วโมง 1.66 กรัมต่อลิตร และ ที่เวลา 60 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้มากกว่าที่เวลา 54 ชั่วโมง 1.80 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่ต่างกันมาก แต่ที่เวลา 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้มากกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง อย่างเห็นได้ชัด คือ 6.26 กรัมต่อลิตร จากการเปรียบเทียบจะเห็นได้ชัดว่าเวลาที่ 60 และ 66 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตเอทานอลต่ำ เมื่อเทียบกับเวลาที่ 54 ชั่วโมง ซึ่งเวลาที่ 54 ชั่วโมงจะลดระยะเวลาในการหมักได้อีกด้วย

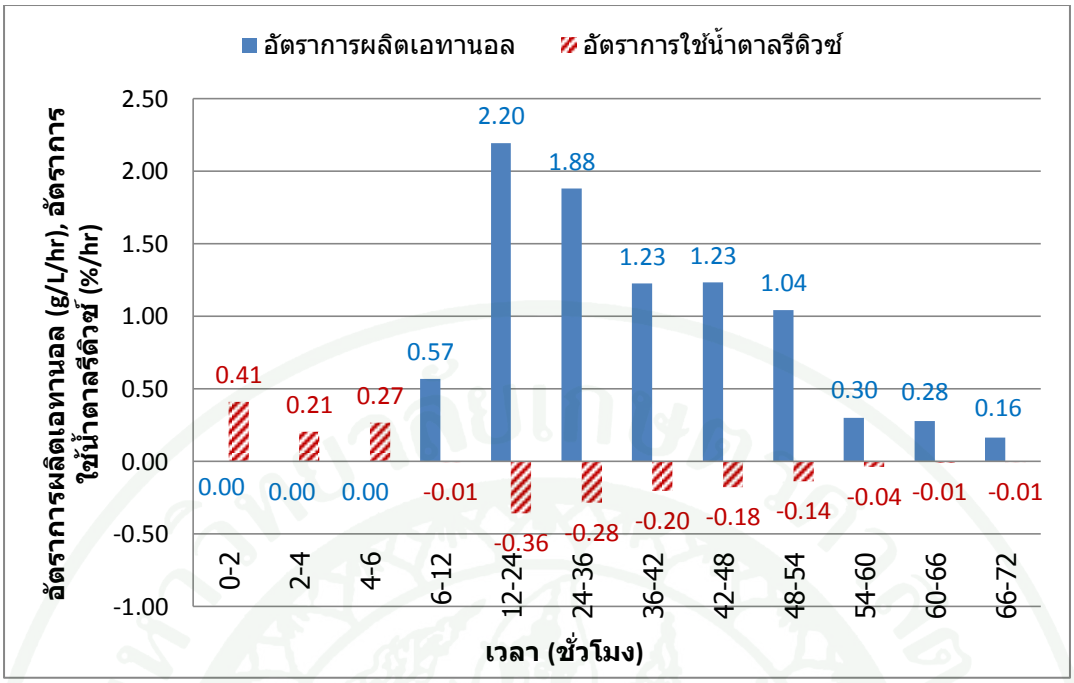
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%)
0	0.00 ± 0.00^{a}	9.57 ± 0.07^{a}
2	0.00 ± 0.00^{a}	10.39 ± 0.00^{b}
4	0.00 ± 0.00^{a}	10.80 ± 0.04^{c}
6	0.00 ± 0.00^{a}	11.34 ± 0.24^{d}
12	3.41 ± 0.02^{b}	11.31 ± 0.26^{d}
24	29.76 ± 0.24^{c}	7.00 ± 0.02^{e}
36	52.34 ± 1.00^{d}	3.58 ± 0.24^{f}
42	59.71 ± 0.30^{e}	2.37 ± 0.20^{g}
48	67.11 ± 1.53^{f}	1.31 ± 0.15^{h}
54	73.37 ± 0.87^{g}	0.49 ± 0.07^{i}
60	75.17 ± 1.08^{h}	0.27 ± 0.00^{i}
66	76.84 ± 0.14^{i}	0.23 ± 0.00^{i}
72	77.81 ± 0.11^{i}	0.20 ± 0.00^{i}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

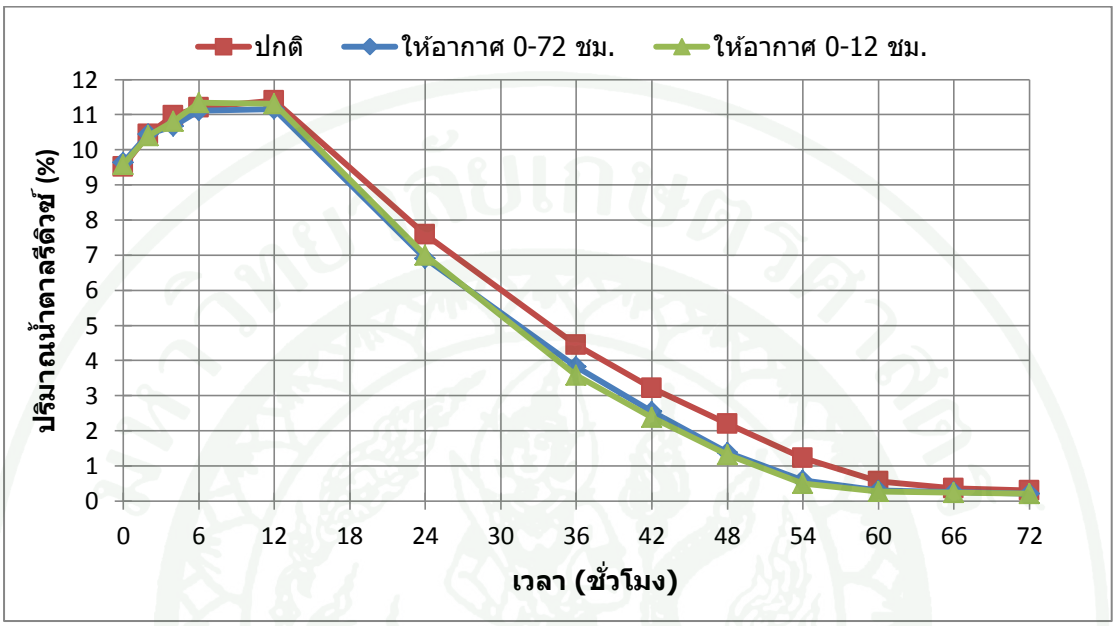
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 110 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง (อัตราการใช้น้ำตารีดิวซ์เป็นบวก แสดงว่า น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่ม เป็นลบ แสดงว่า น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

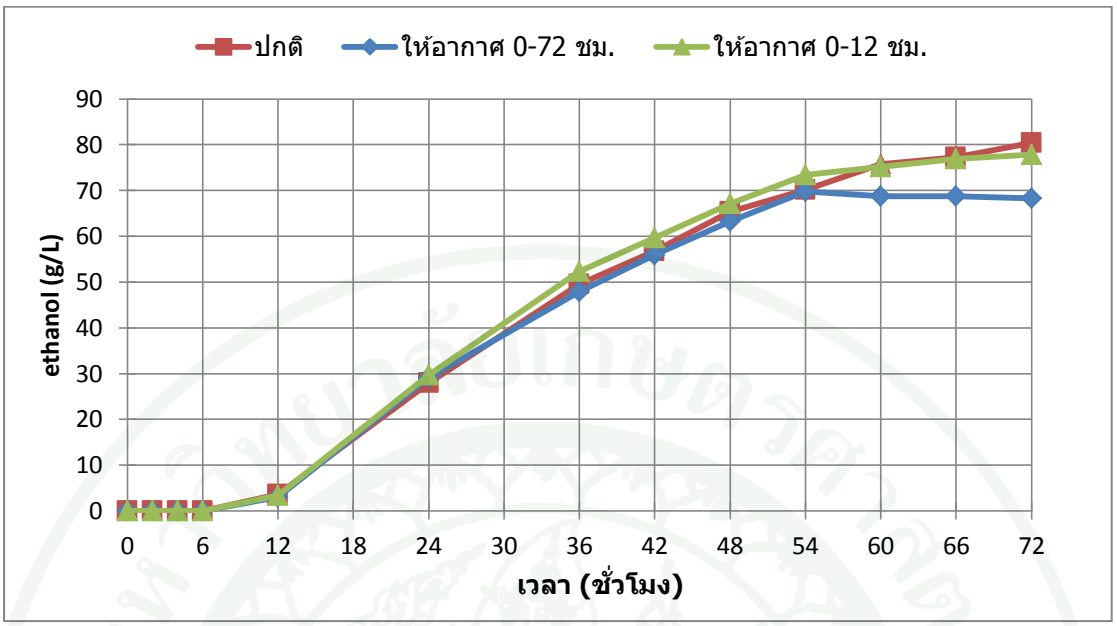
เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ปริมาณเอทานอล และค่า ORP ที่ได้มาจากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดทั้ง 3 แบบ คือ การหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลดังภาพที่ 111, 112 และ 113



ภาพที่ 111 การเปรียบเทียบการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง

จากภาพที่ 111 การเปรียบเทียบการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบไม่เติมอากาศ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง พบว่า การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของทั้ง 3 แบบมีแนวโน้มที่เหมือนกัน แต่การหมักแบบปกติ มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ช้ากว่า การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และ 0-12 ชั่วโมง คือในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมักมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเนื่องจากเซลล์ยีสต์อยู่ในขั้นตอนการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ของอาหารเลี้ยง และเอนไซม์ GC147 ยังคงทำงานเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังบดให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อมาในช่วง 12-60 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างมากจนน้ำตาลในกระบวนการหมักใกล้หมด เนื่องจากเซลล์ยีสต์ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในกิจกรรมต่าง ๆ ทั้งในการเจริญ แบ่งเซลล์ และผลิตเอทานอล หลังจากช่วง 60-72 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้จนใกล้หมดจึงทำให้เซลล์ยีสต์เริ่มหยุดกิจกรรมต่าง ๆ ในกระบวนการหมัก และตายลงในที่สุด

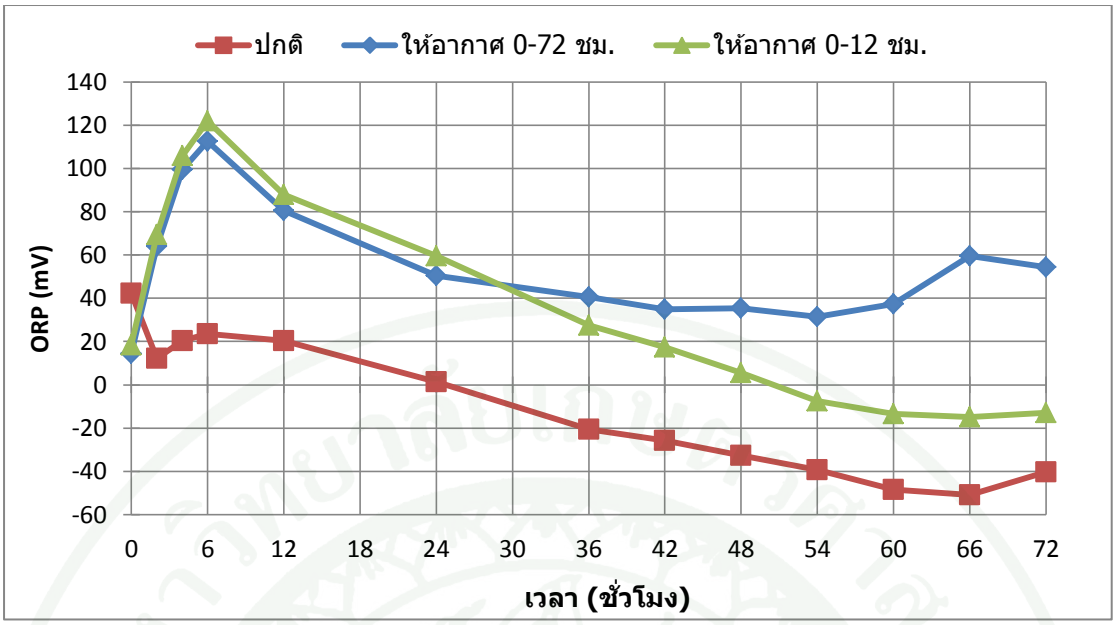
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 112 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง

จากภาพที่ 112 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง พบว่า การผลิตเอทานอลของทั้ง 3 แบบมีแนวโน้มที่เหมือนกัน แต่การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้น้อยกว่าการหมักแบบปกติ และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง โดยในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก เซลล์ยีสต์ยังไม่มีการผลิตเอทานอลเกิดขึ้น และหลังจากนั้นเซลล์ยีสต์ผลิตเอทานอลออกมาเรื่อย ๆ จนกระทั่งช่วงเวลาที่ 54-72 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้หมด และปริมาณเอทานอลที่มีอยู่ในน้ำหมักมากเกินไป ส่งผลให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 113 การเปรียบเทียบค่า ORP ที่ได้มาจากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง

จากภาพที่ 113 การเปรียบเทียบค่า ORP ที่ได้มาจากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง พบว่า ค่า ORP ในช่วงเวลาที่ 0-12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก ค่า ORP ของการหมักแบบปกติแตกต่างกับการหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และ 0-12 ชั่วโมง คือ การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และ 0-12 ชั่วโมง มีค่า ORP เพิ่มทันทีที่มีการให้อากาศ แต่การหมักแบบปกติมีค่าลดลงใน 2 ชั่วโมงแรก และเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่ 2-6 ชั่วโมง ต่อมาค่า ORP ทั้ง 3 การทดลองมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก เพื่อการเจริญ แบ่งเซลล์ และผลิตเอทานอล โดยการหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง เริ่มมีค่า ORP คงที่และเพิ่มสูงขึ้นเร็วกว่าการหมักแบบปกติ และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อค่า ORP เริ่มคงที่และเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้เซลล์ยีสต์เริ่มหยุดการผลิตเอทานอล ดังนั้นจากภาพที่ 113 แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบปกติจะใช้เวลาในการหมักนานกว่าการหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง และ 0-12 ชั่วโมง จากภาพที่ 113 สังเกตได้ว่าเมื่อมีการให้อากาศกับกระบวนการหมักจะทำให้ออกซิเจนละลายในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ค่า ORP เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งแตกต่างกับการหมักแบบปกติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดทั้ง 3 แบบ เซลล์ยีสต์มีการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในการผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกัน จึงทำให้ปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกัน แต่การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเอทานอลที่น้อยกว่าเนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักมีการให้อากาศที่มากเกินความจำเป็น จึงทำให้เซลล์ยีสต์ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปแบ่งเซลล์เป็นจำนวนมาก แต่ใช้ในการผลิตเอทานอลลดลง ส่งผลให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ให้ปริมาณเอทานอลต่ำ และในช่วง 54-72 ชั่วโมงของกระบวนการหมัก มีปริมาณเอทานอลลดลง เนื่องจากมีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก โดยอากาศจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอทานอล และพาเอทานอลออกไปจากน้ำหมัก ทำให้เอทานอลในน้ำหมักมีปริมาณลดลง ส่วนการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมงแรกของการหมัก พบว่ามีปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกับการหมักแบบปกติ แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักสั้นกว่า เนื่องจากการให้อากาศที่เวลา 0-12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงแรกของกระบวนการหมัก นั่นก็คือระยะการปรับตัว (Lag phase) และระยะการเพิ่มจำนวน (Log phase) ทำให้เซลล์ยีสต์แบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมัก และหลังจากนั้นหยุดให้อากาศ ทำให้กิจกรรมของเซลล์ยีสต์กลับมาผลิตเอทานอล ซึ่งมีเซลล์ยีสต์ในจำนวนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกับการหมักแบบปกติ แต่ใช้ระยะเวลาน้อยกว่า ส่วนค่า ORP ในภาพที่ 113 พบว่าในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมักแบบปกติแตกต่างกับการหมักแบบให้อากาศ เนื่องจากการหมักแบบให้อากาศ จะส่งผลให้ค่า ORP เพิ่มขึ้นทันที แต่เมื่อเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วงปลายของ Log phase หรือช่วงต้นของ Stationary phase จะมีการผลิตเอทานอลเกิดขึ้น จึงทำให้ค่า ORP ลดลงอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้หมดลง จะทำให้เซลล์ยีสต์มีอัตราการผลิตเอทานอลลดลง และจากการที่ปริมาณเอทานอลสูงขึ้น ประกอบกับของเสียที่เซลล์ยีสต์สร้างขึ้นมาในระหว่างกระบวนการหมักมากขึ้น จะทำให้เซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งเรียกระยะนี้ว่าระยะตาย หรือ Death phase เมื่อการเจริญของเซลล์ยีสต์เริ่มเข้าสู่ Death phase จะทำให้ค่า ORP เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสัญญาว่ากระบวนการหมักได้เสร็จสิ้นแล้ว

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สรุปเวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศและการหมักแบบปกติ ดังนี้

การหมักแบบปกติ ใช้เวลาในการผลิตเอทานอล 60 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.73 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 0.56%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง ใช้เวลาในการผลิตเอทานอล 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 69.78 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 0.58%

การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง ใช้เวลาในการผลิตเอทานอล 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 73.37 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 0.49%

จากตารางที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศ กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ พบว่าที่เวลา 48-54 ชั่วโมง การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด รองลงมา คือ การหมักแบบปกติ และการหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง ตามลำดับ และที่เวลา 60-72 การหมักแบบปกติ มีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด รองลงมา คือ การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง และการหมักแบบให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง ตามลำดับ

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ ให้อากาศตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) และให้อากาศ 0-12 ชั่วโมงของกระบวนการหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบปกติ พบว่า การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากใช้เวลาที่น้อยกว่าการหมักแบบปกติถึง 6 ชั่วโมง และให้ปริมาณเอทานอลที่ใกล้เคียงกันมาก ส่วนการหมักแบบให้อากาศตลอดกระบวนการหมักผลิตเอทานอลได้เร็วเท่ากับการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง แต่กลับให้ปริมาณเอทานอลที่ต่ำกว่าการหมักแบบปกติ และการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง ดังนั้น การให้อากาศในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้ลดระยะเวลาในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดลงได้ และให้ปริมาณเอทานอลที่ใกล้เคียงกับการหมักแบบปกติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศ กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		
	ปกติ	ให้อากาศ 0-72 ชั่วโมง	ให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง
48	65.37 ± 5.15	63.25 ± 1.33	67.11 ± 1.53
54	70.13 ± 4.55	69.78 ± 1.06	73.37 ± 0.87
60	75.73 ± 5.40	68.76 ± 1.03	75.17 ± 1.08
66	77.25 ± 5.69	68.72 ± 2.31	76.84 ± 0.14
72	80.44 ± 4.99	68.29 ± 2.39	77.81 ± 0.11

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP

จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 6 หรือ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศ พบว่า เมื่อให้อากาศเข้าไปในถังหมักในปริมาณ และช่วงเวลาที่เหมาะสม จะทำให้ระยะเวลาในการหมักลดลง และผลิตเอทานอลในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการหมักแบบปกติ ดังนั้น จึงได้คิดทำการศึกษากระบวนการหมักโดยใช้ค่า ORP ควบคุมการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก

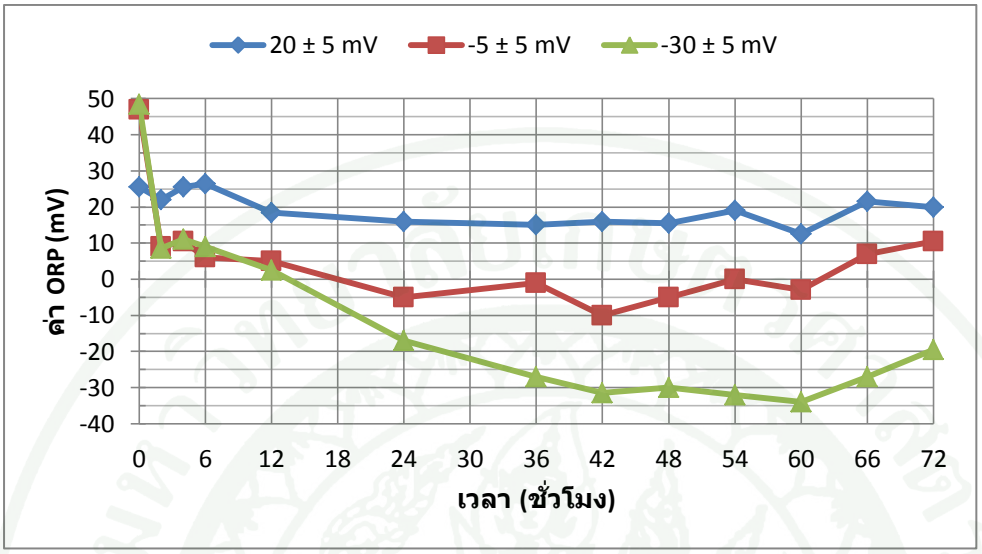
การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งมีวิธีการทดลองและวิธีการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับวิธีการทดลองในหัวข้อที่ 5 ยกเว้นในขณะทำการหมักมีการควบคุมค่า ORP ด้วยเครื่องควบคุมค่า ORP (ORP controller) โดยตั้งค่า ORP ไว้ตามที่กำหนด เมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้นค่า ORP จะลดลง และเมื่อค่า ORP ถึงค่าที่กำหนดไว้ เครื่องควบคุมค่า ORP จะส่งสัญญาณเพื่อเปิดวาล์วให้อากาศเข้าสู่ถังหมัก ทำให้ค่า ORP เพิ่มขึ้น และจากนั้นเครื่องควบคุมค่า ORP จะสั่งปิดวาล์วให้อากาศเมื่อค่า ORP เพิ่มขึ้นจนถึงค่าที่ตั้งไว้ โดยอากาศที่เข้าไปในถังหมักมีอัตราการไหล 5 ลิตรต่อนาที และอากาศจะถูกกรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนเข้าสู่ถังหมัก เพื่อกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอากาศ การควบคุมค่า ORP ที่ใช้ในการทดลองนี้ แบ่งเป็น 3 ช่วง คือ

1) ช่วง 20 ± 5 mV ซึ่งการควบคุมจะตั้งค่า ORP ที่เครื่องควบคุมค่า ORP ที่ 20 mV
2) ช่วง -5 ± 5 mV ซึ่งการควบคุมจะตั้งค่า ORP ที่เครื่องควบคุมค่า ORP ที่ -5 mV
3) ช่วง -30 ± 5 mV ซึ่งการควบคุมจะตั้งค่า ORP ที่เครื่องควบคุมค่า ORP ที่ -30 mV

การใช้ค่า ORP ควบคุมการให้อากาศภายในถังหมัก เพื่อต้องการให้เซลล์ยีสต์ผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณใกล้เคียงกับการหมักเอทานอลแบบปกติ โดยใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยกว่าการหมักเอทานอลแบบปกติ ดังนั้น ในการทดลองนี้จะทำการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการวิธีควบคุมค่า ORP กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ



ภาพที่ 114 การเปลี่ยนแปลงของค่า ORP ในระหว่างการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV

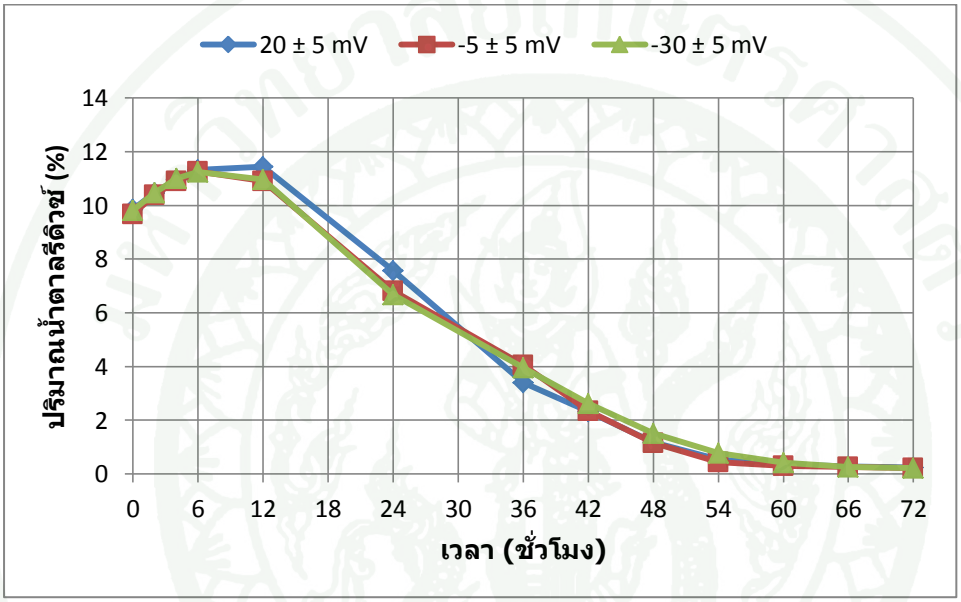
จากภาพที่ 114 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า ORP ในระหว่างการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ทั้ง 3 ช่วง พบว่าเมื่อเริ่มกระบวนการหมัก ค่า ORP ยังลดลงไม่ถึงค่าที่ตั้งไว้ (20 mV, -5 mV และ -30 mV) จึงยังไม่มีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก จนกระทั่งมีการปล่อยอากาศเข้าไปในกระบวนการหมักของการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV, -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV ที่ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 36 ตามลำดับ เมื่อค่า ORP ลดลงต่ำกว่าค่าที่ตั้งไว้ จะทำให้มีการปล่อยอากาศเข้าไปในถังหมัก และเมื่อค่า ORP เพิ่มขึ้นจนถึงค่าที่ตั้งไว้จึงหยุดให้อากาศ แต่เนื่องจากค่า ORP มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง จึงมีการให้อากาศแล้วหยุดสลับไปมา จนเข้าสู่ชั่วโมงที่ 66 การหมักโดยการควบคุมค่า ORP ทั้ง 3 ช่วง มีค่า ORP เพิ่มขึ้นสูงกว่าค่าที่ตั้งไว้จึงไม่มีการให้อากาศเข้าสู่ถังหมักอีกจนครบ 72 ชั่วโมง ดังนั้น จากภาพที่ 114 สรุปได้ว่า

การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV เริ่มทำการควบคุมค่า ORP ที่เวลา 12-66 ชั่วโมง
การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV เริ่มทำการควบคุมค่า ORP ที่เวลา 24-66 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV เริ่มทำการควบคุมค่า ORP ที่เวลา 36-66 ชั่วโมง

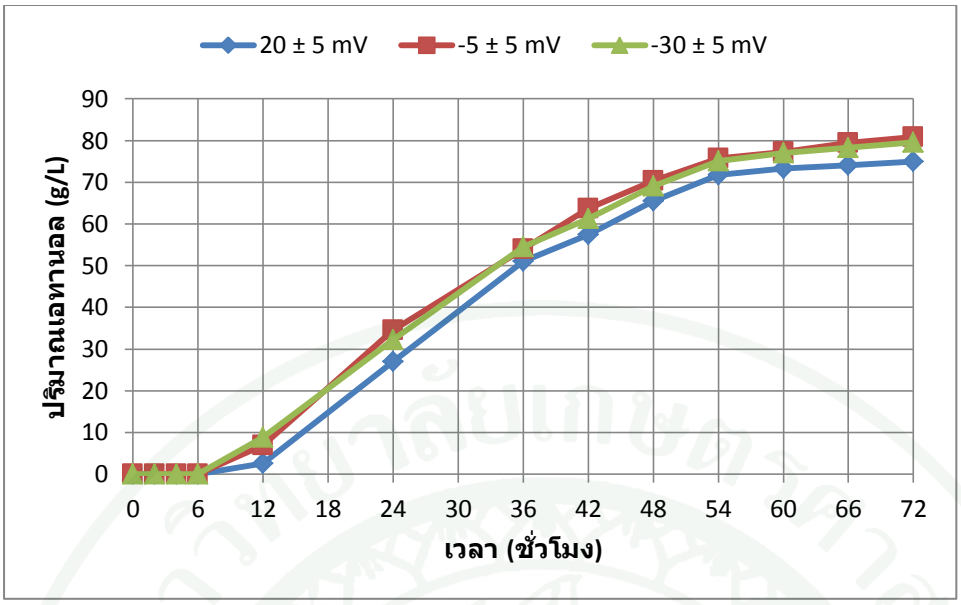
ในการทดลองการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ทั้ง 3 ช่วง มีการควบคุมค่า ORP ให้อยู่ในช่วงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงในภาพที่ 114



ภาพที่ 115 การเปรียบเทียบการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV, -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV

จากภาพที่ 115 การเปรียบเทียบการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ทั้ง 3 ช่วง พบว่า การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของทั้ง 3 ช่วง มีแนวโน้มที่เหมือนกัน คือ ในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมักมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ต่อมาในช่วง 12-60 ชั่วโมง มีอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนน้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการหมักใกล้หมดลง และหลังจากนั้นในช่วง 60-72 ชั่วโมง มีอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างมาก และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 116 การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV, -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV

จากภาพที่ 116 การเปรียบเทียบการใช้ปริมาณเอทานอลจากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ทั้ง 3 ช่วง พบว่า การผลิตเอทานอลของทั้ง 3 แบบมีแนวโน้มที่เหมือนกัน แต่การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV มีการผลิตเอทานอลได้น้อยกว่าการหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV ซึ่งการหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV มีการผลิตเอทานอลได้มากกว่าการหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV เล็กน้อย โดยที่เวลา 0-6 ชั่วโมงช่วงแรกของกระบวนการหมักทั้ง 3 ช่วง ยังไม่มีการผลิตเอทานอล ต่อมาในช่วง 6-12 ชั่วโมง เริ่มมีการผลิตเอทานอลออกมา และในชั่วโมงที่ 12-72 มีการผลิตเอทานอลออกมาอย่างต่อเนื่อง แต่ในช่วงเวลา 54-72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้าลง

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นแสดงว่าเมื่อเซลล์ยีสต์ยังไม่มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการผลิตเอทานอล จะทำให้ค่า ORP จะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 0-6 และเมื่อเวลาที่ 6-66 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญ แบ่งเซลล์ และผลิตเอทานอล จะทำให้ค่า ORP ลดลง แต่เนื่องจาก ในการทดลองนี้ มีการควบคุมค่า ORP ที่ช่วงต่าง ๆ คือ 20 ± 5 mV, -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV โดยการให้อากาศเข้าสู่ถังหมัก ทำให้ค่า ORP อยู่ในช่วงที่ตั้งไว้ จนกระทั่งเวลาที่ 66-72

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนน้อยมาก ส่งผลให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลงอย่างมาก และเซลล์ยีสต์เข้าสู่ช่วง Death phase จึงทำให้ค่า ORP มีค่าเพิ่มขึ้น (Kukec *et.al*., 2001)

ในการทดลองนี้จะทำการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ ดังนั้นทำการเลือกเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการวิธีควบคุมค่า ORP ของแต่ละช่วงดังนี้

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV, -5 ± 5 mV และ -30 ± 5 mV ที่เวลา 72 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 74.99 กรัมต่อลิตร, 80.82 กรัมต่อลิตร และ 79.51 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ 0.24%, 0.22% และ 0.23% ตามลำดับ แต่การหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ทำโดยการนำปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้ผลดังตารางผนวกที่ ค13 และ ค14 (การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV), ค17 และ ค18 (การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV) และ ค21 และ ค22 (การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -35 --25 mV) ซึ่งทั้งหมดได้ค่านัยสำคัญ (Sig.) เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล มีอย่างน้อย 1 ข้อมูล แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หมายความว่า มีปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อย่างน้อย 1 ข้อมูลแตกต่างกัน ดังนั้น จึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 12 (การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV), ตารางที่ 13 (การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV) และตารางที่ 14 (การหมักโดยควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV)

จากตารางที่ 12 พบว่าชั่วโมงที่ 54 มีปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 48, 60, 66 และ 72 แต่ชั่วโมงที่ 48 แตกต่างกับชั่วโมงที่ 60, 66 และ 72 ดังนั้น เวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

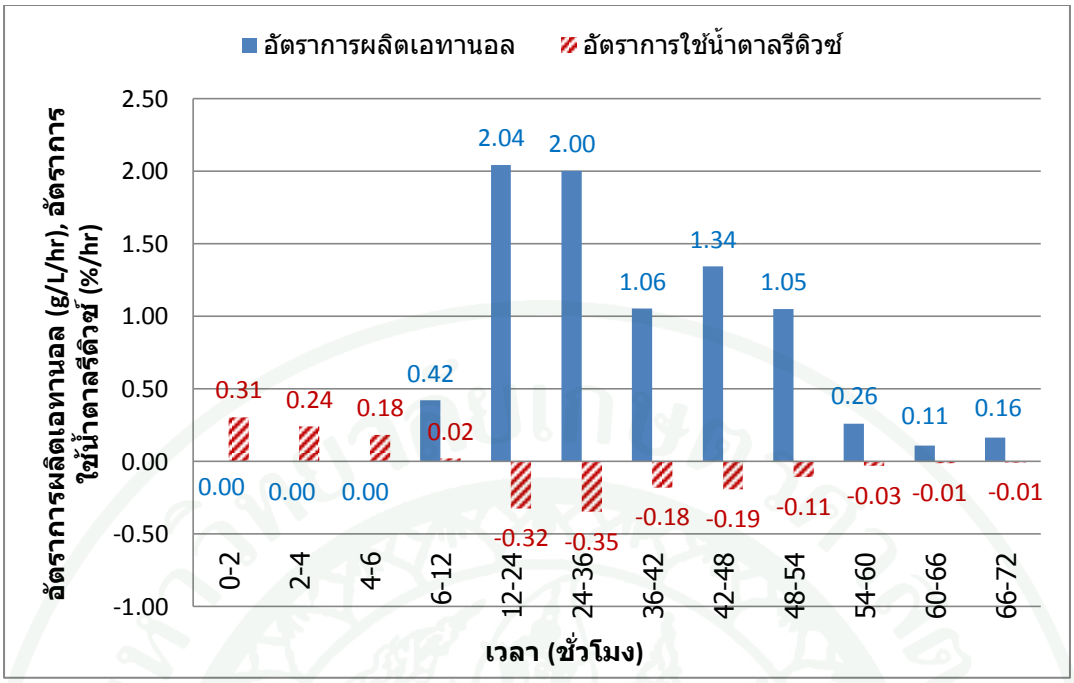
วิเคราะห์ได้ทางสถิติ คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 71.80 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.52% ซึ่งสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ได้จากการเปรียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเซลล์ยีสต์ที่เวลา 54-60 ชั่วโมง, 60-66 ชั่วโมง และ 66-72 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่าที่เวลา 48-54 ชั่วโมง ดังภาพที่ 117 นั่นแสดงว่า เวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV คือ 54 ชั่วโมง

ตารางที่ 12 ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%)
0	0.00 ± 0.00^{a}	9.86 ± 0.34^{a}
2	0.00 ± 0.00^{a}	10.47 ± 0.01^{ab}
4	0.00 ± 0.00^{a}	10.96 ± 0.07^{bc}
6	0.00 ± 0.00^{a}	11.32 ± 0.03^{c}
12	2.52 ± 0.28^{a}	11.45 ± 0.35^{c}
24	27.05 ± 3.02^{b}	7.57 ± 0.14^{d}
36	51.10 ± 5.98^{c}	3.40 ± 0.73^{e}
42	57.43 ± 4.35^{c}	2.32 ± 0.58^{f}
48	65.50 ± 4.53^{d}	1.18 ± 0.39^{g}
54	71.80 ± 2.76^{de}	0.52 ± 0.00^{gh}
60	73.35 ± 3.58^{e}	0.35 ± 0.05^{h}
66	74.01 ± 3.90^{e}	0.28 ± 0.03^{h}
72	74.99 ± 4.36^{e}	0.24 ± 0.00^{h}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 117 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV

จากตารางที่ 13 พบว่าชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 42, 54, 60, 66 และ 72 แต่ชั่วโมงที่ 42 แตกต่างกับชั่วโมงที่ 54, 60, 66 และ 72 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักของชั่วโมงที่ 48 ไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 54, 60, 66 และ 72 ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ที่วิเคราะห์ได้ทางสถิติคือ 48 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 70.40 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 1.16% แต่ผลที่วิเคราะห์ได้จากการเปรียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเซลล์ยีสต์ที่เวลา 54-60 ชั่วโมง, 60-66 ชั่วโมง และ 66-72 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่าที่เวลา 48-54 ชั่วโมง ดังภาพที่ 118 นั่นแสดงว่า เวลาที่ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.7675 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.44% คือ เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV เนื่องจากที่เวลา 54 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอลมากกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง ถึง 5.35 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาเพิ่มขึ้น 6 ชั่วโมง และที่เวลา 48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

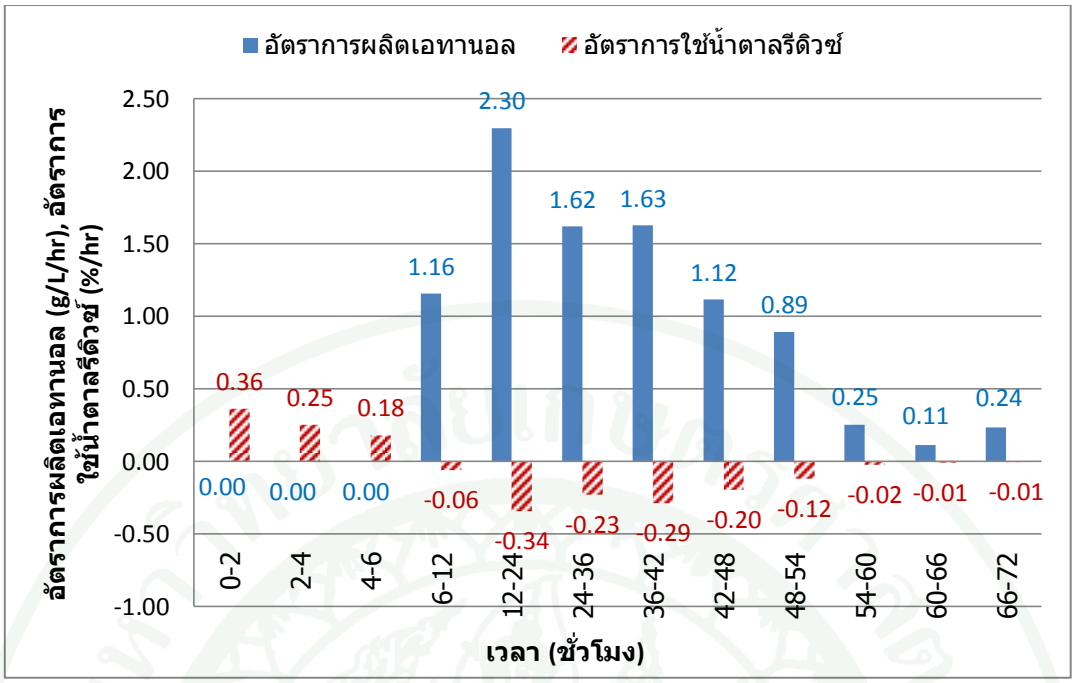
ชั่วโมง ยังมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักถึง 1.16% ซึ่งเซลล์ยีสต์ยังสามารถนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่นี้เปลี่ยนให้เป็นเอทานอลได้ในปริมาณที่น่าพอใจ

ตารางที่ 13 ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%)
0	0.00 ± 0.00 [a]	9.67 ± 0.09 [a]
2	0.00 ± 0.00 [a]	10.39 ± 0.07 [ab]
4	0.00 ± 0.00 [a]	10.90 ± 0.14 [b]
6	0.00 ± 0.00 [a]	11.26 ± 0.10 [b]
12	6.95 ± 5.90 [a]	10.91 ± 0.70 [b]
24	34.51 ± 10.12 [b]	6.81 ± 1.41 [c]
36	53.94 ± 8.54 [c]	4.06 ± 0.35 [d]
42	63.71 ± 8.57 [cd]	2.34 ± 0.76 [e]
48	70.40 ± 4.51 [de]	1.16 ± 0.49 [f]
54	75.76 ± 1.51 [e]	0.44 ± 0.04 [f]
60	77.28 ± 1.62 [e]	0.30 ± 0.03 [f]
66	79.41 ± 4.35 [e]	0.25 ± 0.02 [f]
72	80.82 ± 3.66 [e]	0.22 ± 0.01 [f]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 118 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV

จากตารางที่ 14 พบว่าชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 36, 42, 54, 60, 66 และ 72 แต่ชั่วโมงที่ 36 แตกต่างกับชั่วโมงที่ 54, 60, 66 และ 72 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักของชั่วโมงที่ 48 ไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 42, 54, 60, 66 และ 72 แต่ชั่วโมงที่ 42 แตกต่างกับชั่วโมงที่ 54, 60, 66 และ 72 ดังนั้น เวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ที่วิเคราะห์ได้ทางสถิติ คือ 48 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 69.13 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 1.50% แต่ผลที่วิเคราะห์ได้จากการเปรียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเซลล์ยีสต์ที่เวลา 54-60 ชั่วโมง, 60-66 ชั่วโมง และ 66-72 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่าที่เวลา 48-54 ชั่วโมง ดังภาพที่ 119 นั่นแสดงว่า เวลาที่ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.0289 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.7729% คือ เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV เนื่องจากที่เวลา 54 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอลมากกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง ถึง 5.89 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาเพิ่มขึ้น 6 ชั่วโมง และที่เวลา 48 ชั่วโมง ยังมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

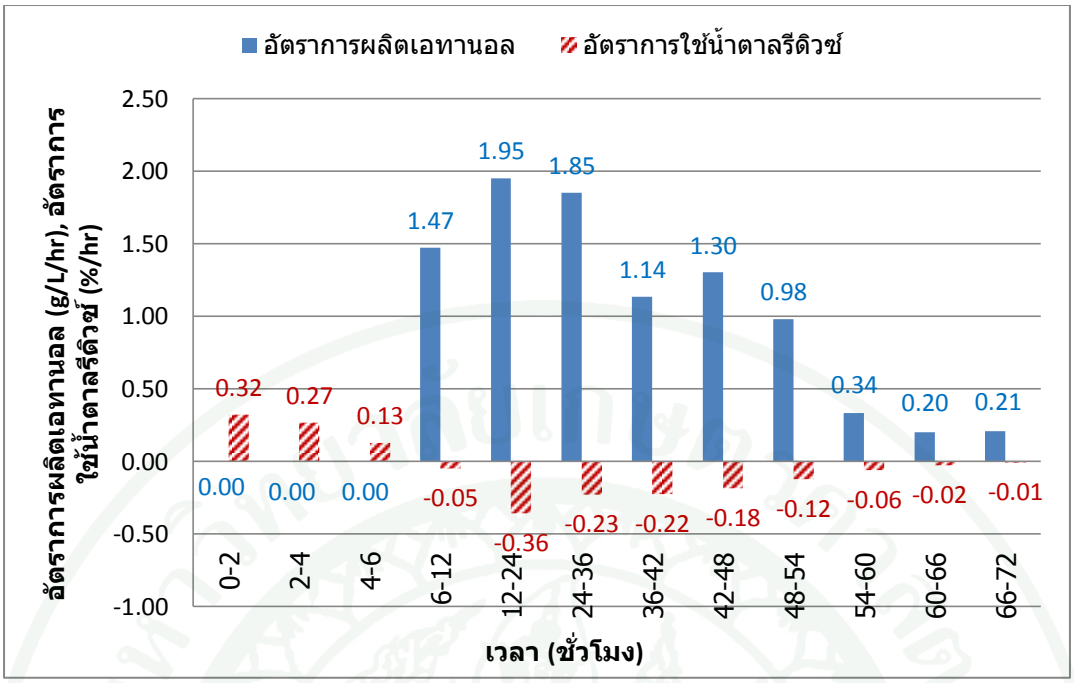
เหลืออยู่ในกระบวนการหมักถึง 1.50% ซึ่งเซลล์ยีสต์ยังสามารถนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่นี้เปลี่ยนให้เป็นเอทานอลได้ในปริมาณที่น่าพอใจ

ตารางที่ 14 ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%)
0	0.00 ± 0.00^{a}	9.81 ± 0.00^{a}
2	0.00 ± 0.00^{a}	10.46 ± 0.05^{a}
4	0.00 ± 0.00^{a}	11.00 ± 0.06^{a}
6	0.00 ± 0.00^{a}	11.25 ± 0.02^{a}
12	8.83 ± 8.36^{a}	10.97 ± 0.60^{a}
24	32.25 ± 10.36^{b}	6.67 ± 1.91^{b}
36	54.50 ± 11.58^{c}	3.95 ± 1.03^{c}
42	61.31 ± 9.41^{cd}	2.61 ± 1.19^{cd}
48	69.13 ± 9.68^{cde}	1.50 ± 0.96^{de}
54	75.02 ± 7.55^{de}	0.77 ± 0.50^{e}
60	77.04 ± 6.92^{de}	0.41 ± 0.11^{e}
66	78.26 ± 6.53^{de}	0.26 ± 0.00^{e}
72	79.51 ± 6.16^{e}	0.23 ± 0.00^{e}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 119 การเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอล และอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สรุปเวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ดังนี้

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 71.80 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.52%

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.76 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.44%

การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.02 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.77%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการวิธีควบคุมค่า ORP กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
	ปกติ	ควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV	ควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV	ควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV
48	65.37 ± 5.15	65.50 ± 4.53	70.40 ± 4.51	69.13 ± 9.68
54	70.13 ± 4.55	71.80 ± 2.76	75.76 ± 1.51	75.02 ± 7.55
60	75.73 ± 5.40	73.35 ± 3.58	77.28 ± 1.62	77.04 ± 6.92
66	77.25 ± 5.69	74.01 ± 3.90	79.41 ± 4.35	78.26 ± 6.53
72	80.44 ± 4.99	74.99 ± 4.36	80.82 ± 3.66	79.51 ± 6.16

การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าที่เวลา 48-72 ชั่วโมง การหมักโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV มีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าการหมักแบบปกติ ดังนั้น การหมักโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV จึงเป็นวิธีการหมักที่เหมาะสมที่สุด และมีการผลิตเอทานอลมากที่สุด และเวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV คือ 54 ชั่วโมง

และจากการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักครั้งนี้ ยังมีการหมักโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV พบว่าที่เวลา 48-66 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักแบบปกติ และการหมักโดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV แต่ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการหมักแบบปกติสูงกว่าการหมักโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV เล็กน้อย ดังนั้น การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV เป็นวิธีการหมักที่เหมาะสมรองจากการหมักโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากมันเส้นบด

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพการหมัก ผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้นบด และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง จากการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการต่าง ๆ

	การหมักแบบปกติ	การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง	การหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV
มันเส้นบด			
มันเส้นที่ใช้ (กิโลกรัม)	15	15	15
ปริมาณแป้ง(กิโลกรัม dry basis)	9.741	9.741	9.741
ประสิทธิภาพการหมัก			
เอทานอลที่ผลิตได้ในการทดลอง (กรัมต่อลิตร)	75.73	73.37	75.77
เอทานอลที่ผลิตได้ในทางทฤษฎี (กรัมต่อลิตร)	92.20	92.20	92.20
ประสิทธิภาพการหมัก (%)	82.14	79.58	82.18
ผลได้			
กรัมเอทานอล/กรัมมันเส้นบด, dry basis	0.30	0.29	0.30
กรัมเอทานอล/กรัมแป้งในมันเส้น, dry basis	0.47	0.45	0.47

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคำนวณประสิทธิภาพการหมัก, ผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้นบด และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดแบบปกติ, แบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง และแบบควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV เท่านั้น เนื่องจากการหมักแบบปกติเป็นสภาวะที่ต้นแบบเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบสภาวะอื่นๆ ส่วนการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง และการหมักแบบควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV เป็นสภาวะที่ทำการวิเคราะห์แล้วว่ามีปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอทานอลและเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมมากที่สุดในแต่ละการทดลอง ดังนั้นจึงเลือกมาทำการคำนวณและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากมันเส้นบด

เมื่อทำการคำนวณประสิทธิภาพการหมัก ผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้นบด และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง จากการหมักแบบปกติ การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง และการหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV ที่เวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่าการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการหมักค่าต่ำที่สุดคิดเป็น 79.58% ส่วนการหมักแบบปกติ และการหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV มีค่าใกล้เคียงกันมาก โดยมีประสิทธิภาพการหมักคิดเป็น 82.14% และ 82.18% ตามลำดับ โดยคิดจากมันเส้นบดที่ใช้ 15 กิโลกรัม ซึ่งมีแป้งอยู่ทั้งหมด 9.741 กิโลกรัม และเมื่อคำนวณผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้นบด และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง พบว่า การหมักแบบปกติ และการหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV มีค่าเท่ากัน คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้น คือ 0.30 กรัมเอทานอล/กรัมมันเส้นบด และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง คือ 0.47 กรัมเอทานอล/กรัมแป้ง ส่วนการหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง มีผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้นบด และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้งค่าต่ำที่สุด คือ 0.29 กรัมเอทานอล/กรัมมันเส้นบด และ 0.45 กรัมเอทานอล/กรัมแป้ง ตามลำดับ

จากการคำนวณประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากมันเส้นบดจะเห็นได้ว่าการหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV สามารถนำมาใช้แทนการหมักแบบปกติได้ และช่วยลดระยะเวลาในการหมักลงได้ 6 ชั่วโมง

จากการตรวจเอกสารของ ธันยาภรณ์ (2548) พบว่า ผลได้ของเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบ CF กระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเอนไซม์ Rhizozyme™ และกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเอนไซม์ AMG300L เท่ากับ 0.521, 0.523 และ 0.488 กรัมเอทานอลต่อกรัมแป้ง ตามลำดับ และร้อยละประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 84, 84 และ 78 ตามลำดับเมื่อเทียบกับผลได้ทางทฤษฎี อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากมันเส้นแบบ SSF ด้วยเอนไซม์ AMG300L นั้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการทำ Pre-saccharification นาน 2 ชั่วโมง พบว่า ผลได้ของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นด้วยกระบวนการหมักแบบ CF และ SSF ที่ผ่านการ Pre-saccharification มีค่าเท่ากับ 0.565 และ 0.557 กรัมเอทานอลต่อกรัมแป้ง และประสิทธิภาพเท่ากับ 91 และ 90 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลได้ทางทฤษฎี ดังนั้น กระบวนการหมักแบบ SSF สามารถผลิตโดยให้ผลได้และประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใกล้เคียงกับกระบวนการหมักแบบปกติ และจากงานวิจัยของ ธันยาภรณ์ (2548) มาเปรียบเทียบผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง และประสิทธิภาพการหมักของการหมักแบบควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV พบว่า งานวิจัยของ ธันยาภรณ์ (2548) มีผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง และประสิทธิภาพการหมักที่สูงกว่า เนื่องจากงานวิจัยของ ธันยาภรณ์ (2548) เก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งต่างจากงานวิจัยนี้ที่หาเวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล โดยการหมักแบบควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ได้เวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล คือ 54 ชั่วโมง แต่มีเหตุผลหนึ่งที่เหมือนกันก็คือ กระบวนการหมักแบบควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV สามารถผลิตเอทานอล โดยให้ผลได้และประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการหมักแบบปกติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การออกแบบถังที่ใช้ในการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง โดยการควบคุมค่า ORP สามารถออกแบบ สร้าง และใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ได้ตามวัตถุประสงค์

2. การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลจากมันเส้นบด แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

2.1 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 ที่ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25% ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC358 0.2 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ค่า pH 5.7-5.8 ที่อุณหภูมิ 83-85 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการทำ Liquefaction ด้วยเอนไซม์ GC358 คือ 120 นาที มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.91 ± 0.08% และค่า DE เท่ากับ 21.46 ± 0.37

2.2 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ที่ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25% ความเข้มข้นของเอนไซม์ GC147 0.6 กรัมต่อแป้ง 1000 กรัม ค่า pH 4.0-4.5 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 คือ 1 ชั่วโมง จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 10.40 ± 0.22%

3. การศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า Oxidation Reduction Potential (ORP), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ พบว่า ค่า ORP แปรผกผันกับปริมาณเอทานอล และ แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งทำให้สามารถบ่งบอกถึงช่วงการเจริญของเซลล์ยีสต์ หรือ Growth curve ได้ และได้เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คือ 60 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.73 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.56% และมีประสิทธิภาพในการหมัก 82.14%

4. การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมัก แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

4.1 การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) พบว่า ค่า ORP แปรผกผันกับปริมาณเอทานอล และค่า ORP แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการหมักแบบปกติ แต่ค่า ORP ที่อ่านได้จะมีค่าสูงกว่า เนื่องจากการเติมอากาศในระหว่างการหมัก และได้เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 69.78 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.58%

4.2 การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง พบว่า ค่า ORP แปรผกผันกับปริมาณเอทานอล และค่า ORP แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการหมักแบบปกติ และได้เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 73.37 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.49%

เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศ กับการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ พบว่า การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากใช้เวลาที่น้อยกว่าการหมักแบบปกติถึง 6 ชั่วโมง และให้ปริมาณเอทานอลที่ใกล้เคียงกับการหมักแบบปกติ

5. การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1 ควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV พบว่า เวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 71.80 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.52%

5.2 ควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV พบว่า เวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.76 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.44%

5.3 ควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV พบว่า เวลาที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.02 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ 0.77%

เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP กับ การผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ พบว่า การหมักโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV เป็นวิธีการหมักที่เหมาะสมที่สุด และมีการผลิตเอทานอลมากที่สุด รองลงมา คือ การหมักโดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่าการหมักแบบปกติ 6 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. เวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 คือ 1 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 10.40 ± 0.22% คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (Panchal, 1990) แต่ในความเป็นจริง เมื่อใส่ยีสต์ลงไปในน้ำหมัก ยีสต์จะเกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งทำให้เอนไซม์ GC147 ยังคงทำงานผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไปจนทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น ซึ่งอาจเกิดการยับยั้งของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้น (Crabtree effect) จะส่งผลทำให้อัตราการเจริญ และการผลิตเอทานอลลดลง ดังนั้น เวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification จึงอาจใช้ระยะเวลาที่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง เพื่อไม่ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการหมักสูงกว่า 10%

2. การนำค่า ORP มาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล จะสามารถติดตามกระบวนการหมักว่าเกิดอะไรขึ้น กระบวนการหมักอยู่ในขั้นตอนไหน และการควบคุมค่า ORP ที่เหมาะสม จะสามารถเพิ่มผลผลิตของเอทานอลให้สูงขึ้นอีกด้วย ไม่เพียงแต่การผลิตเอทานอลเท่านั้น กระบวนการหมักอื่น ๆ ที่ไม่ใช้อากาศ ก็สามารถนำค่า ORP ไปใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

3. ค่า ORP สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามค่า DO ในระดับที่ต่ำกว่า 1 ppm ได้ โดยที่เครื่องมือวัดค่า DO แบบปกติไม่สามารถตรวจจับได้ ดังนั้นค่า ORP จึงมีประโยชน์มากในการหมักแบบไม่ใช้อากาศ

4. การทดลองนี้เป็นการศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เพื่อช่วยให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น โดยใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยลง ซึ่งจะทำให้ต้นทุนในกระบวนการผลิตลดลง และสามารถนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรมได้แต่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2555. **ปริมาณการผลิตเอทานอล ปี 50-54**. ที่มา : http://www.dede.go.th/dede/images/stories/bioethanol/12-1.ethanol_product_graph.pdf, 28 เมษายน 2555.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. **เทคโนโลยีแป้ง**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ ม. เกษตร, กรุงเทพฯ.

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ ,กล้าณรงค์ ศรีรอต, เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, สุวิทย์ เตีย, สุทธิพันธ์ แก้วสมพงษ์ และ มนเทียร นิติวรรัตน์. 2546. **ร่างรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์การศึกษาต้นแบบโรงงานเอทานอลโดยการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตจากมันเส้น**. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ชลดา ซื่อสัตย์. 2546. **การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

ธันยาภรณ์ เวทย์ไทยสงค์. 2548. **การผลิตเอทานอลจากมันเส้นโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปนิดา กิตติรัตน์หมาย. 2546. **การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตกตะกอนและเทคนิครีพีทเฟดแบทช์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, มาลัย บุญรัตนกรกิจ, พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์, ปทุมพร ฉิมเอนก และประดิษฐ์ คุรุวัณณา. 2536. การศึกษาขบวนการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อย กากน้ำตาล มันสำปะหลัง และวัสดุการเกษตรอื่น ๆ, น. 34-35. **รวมงานวิจัยการผลิตแอลกอฮอล์ที่ทำในประเทศไทย. 2526-2534**. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. **การปรับปรุงเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. 2541. **เทคโนโลยีชีวภาพ**. บรรณกิจการพิมพ์ลำปาง, ลำปาง.

มาโนช โพธิ์สูง. 2546. **การผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และ มั่นรักษ์ ตัณฑุลเวศม์. 2545. **เคมีวิทยาของน้ำและน้ำเสีย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. **เทคโนโลยีชีวภาพ**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

วิทยา เทพไพฑูรย์. 2538. Bioreactor Design & Application, น. ว1. **ในรายงานประชุมวิชาการของภาควิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ และ ศูนย์การศึกษาต่อเนื่อง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ร่วมกับ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

ศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์, จิตตรา กลิ่นสมร, ไพพรรณ บุตกะ และพันธุ์ทวี ภักดีดินแดน. 2536. เปรียบเทียบวิธีการเตรียมน้ำอ้อยก่อนการหมักแอลกอฮอล์, น. 41. **รวมงานวิจัย การผลิตแอลกอฮอล์ที่ทำในประเทศไทย. 2526-2534.** นักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา. 2546. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ และกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. **รายงานสรุปการนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า**.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมชาย ดอนคงดี . 2537. **การหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง โดยใช้ระบบต่อเนื่องในถังหมักทรงสูง พร้อมระบบหมุนเวียนเซลล์กลับ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์ ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. **วิศวกรรมเคมีพื้นฐาน 2.** สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2551. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลูโคสซีรัป** มอก.268-2521.

อนันต์ อนุขจรจิตติ. 2545. **การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดยระบบการหมักแบบกึ่งกะ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC 2000). **Officail Method of Analysis.** 16th ed. Washington,D.C.: The Association of Official Agricultural Chemists; 2000.

Berry, D.R. and C. Briwn. 1987**. Growth of Yeast**. Pp. 157-199. In D.R. Berry, I. Russel and G.G. Stewart (eds). Yeast Biotechnology. Alen and Unwin, London.

Brown, S.W., S.G. Oliver, D.E.F. Harrison and R.C. Righelato. 1981 Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11: 1213-1216.

Copper, T.G. 1982. **Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae***. Pp. 39-99. In J.N. Strathern, E.W. Johnes and J.R. Broach (eds). The molecular Biology of The Yeast Saccharomyces. Cold Spring Harbor Monograph Series. Cold spring Harbor Laboratories, Cold spring.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Csiszar, P. 2012. **Baffle schematics courtesy**. Available Source: www.postmixing.com/mixing%20forum/baffles/baffles.htm#importance, April 28, 2012

Halasz, A. and R. Laztity. 1991. **Use of Yeast Biomass in Food Production**, CRC Oress, Boca Raton.

Ingledew, W.M. 1999. **Alcohol production by Saccharomyces cerevisiae: a yeast primer**. The Alcohol textbook 3rd Edition. Nottingham University Press. Nothingham. Pp. 49-87.

Isaac, S. and D. Jenning. 1995. **Microbial Culture**. Bios Scientific Publishers, Oxford.

Kosaric, N., A. Wieczorek, G.P. Cosentino and R.J. Magee. 1983. **Ethanol Fermentation**. Pp. 119-124. In H. Dellweg (ed). Biotechnology. Vol. 3. Verlag Chemie, Weinheim.

Kukec A., M. Berovic, S. Celan and M. Wondra. 2001. **The Role of On-line Redox Potentail Measurement in *Sauvignon blance* Fermentation.** Food Technol. Biotechnol. Vol. 40(1). 49-55.

Limtong, S. 1987. **Ethanol fermentation by flocculant yeast**. Ph.D. Thesis, Osaka University, Japan.

Lin Y., S.J. Hwang, J.T. Gong, J. Wu and K. Chen. 2005. **Using redox potential to detect microbial activities during clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*.** Biotechnology Letters. Vol. 27. 1791-1795.

McNeil, B. and L.M. Harvey. 1990. **Fermentation : A Practical Approach**. IRL Press, Oxford, pp. 17-38.

McNeil, B. and L.M. Harvey. 2008. **Practical Fermentation Technology.** John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

National Research Council. 1983. **Alcohol Fuels: Options for Developing Countries**. Report of an Ad Hoc Panel of the Advisory Committee on Technology Innovation Board on Science and Technology for International Development, Office of International Affairs. National Academic Press, USA.

Panchal, C.J. and F.C.A. Tavares. 1990. **Yeast strain selection for ethanol product**. Pp. 225-243. In C.J. Panchal (ed). Yeast strain selection. Marcel Dekker, New York.

Paturau, J.M. 1969. **By-products of cane sugar industry**. Elsevier Publishing, Amsterdams.

Reed, G. 1983. **Microbial Biomass, single cell protein and other microbial products**. Pp. 541-592. In G. Reed (ed). Prescott and Dunn's Industrial Microbiology. 4th edition. AVI Publishing, Wistport.

Rose, A.H. 1993. **Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance**. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 74: 110S-118S.

Seki T., S. Myoga, S. Limting, S. Yedono, J. Kummnuata and H. Taguchi. 1983. **Genetic construction of yeast strains for high ethanol production**. Biotechnology Letters. Vol. 5: 351-356

Singh, D., I.M. Banat, P. Nigam and R. Merchant. 1998. **Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery**. Biotechnology Letters. Vol. 20: 753-755.

Sree, N.K., M. Sridhar, L.V. Rao and A. Pandey. 1999. **Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast**. Proc. Biochem. 34: 115-119.

Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. 1999. **Principles of Fermentation Technology, 2nd edition.** Butter Worth, Heinemann Bodmin.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tao, F., Miao, J.Y., Shi, G.Y. and Zhang, K.C. **Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition.** Process Biochemistry., Vol. 40, no. 1 (2005) : 183 – 187.

Walker, G.M 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley and Sons, Chichester.

Yang Y., W. Yong-Hong, C. Ju, Z. Ying-Ping and Z. Si-Liang. 2007. **The Influence of Controlling Redox Potential on Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae***. Chinese Journal of Biotechnology. Vol. 23(5). 878-884.

Zaldivear, J., J. Nielsen and L. Olsson. 2001. **Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration**. Appl. Microbiol. 56: 17-34.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก1 อุณหภูมิของน้ำเมื่อเพิ่มอุณหภูมิโดยใช้ไอน้ำร้อนผ่าน Internal Coil ที่ใช้ในการทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมักเนื่องจากการกวนด้วยใบกวน ครั้งที่ 1

เวลา (นาที)	อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านล่างของถังหมัก (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านบนของถังหมัก (องศาเซลเซียส)
0	31.2	31.3
2	52.1	52.4
4	58.4	58.4
6	60.0	60.3
8	67.3	67.4
10	80.7	80.5
12	89.2	89.3
14	93.4	93.4
16	95.0	95.1

ตารางผนวกที่ ก2 อุณหภูมิของน้ำเมื่อเพิ่มอุณหภูมิโดยใช้ไอน้ำร้อนผ่าน Internal Coil ที่ใช้ในการทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมักเนื่องจากการกวนด้วยใบกวน ครั้งที่ 2

เวลา (นาที)	อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านล่างของถังหมัก (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านบนของถังหมัก (องศาเซลเซียส)
0	31.9	31.6
2	45.3	45.5
4	53.7	53.8
6	63.3	63.4
8	70.4	70.7
10	79.4	79.1
12	87.8	87.3
14	90.2	90.4
16	92.7	91.4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 อุณหภูมิของน้ำเมื่อลดอุณหภูมิโดยใช้น้ำประปาผ่าน Internal Coil ที่ใช้ในการทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมักเนื่องจากการกวนด้วยใบกวน ครั้งที่ 1

เวลา (นาที)	อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านล่างของถังหมัก (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านบนของถังหมัก (องศาเซลเซียส)
0	94.5	94.6
2	82.2	82.5
4	75.2	75.3
6	68.6	68.8
8	62.4	62.3
10	57.0	56.9
12	53.3	53.3
14	50.0	50.0
16	47.3	47.2
18	44.5	44.6
20	42.0	42.1
30	35.5	35.4
40	32.7	32.8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก4 อุณหภูมิของน้ำเมื่อลดอุณหภูมิโดยใช้น้ำประปาผ่าน Internal Coil ที่ใช้ในการทดสอบการกระจายอุณหภูมิของน้ำภายในถังหมักเนื่องจากการกวนด้วยใบกวน ครั้งที่ 2

เวลา (นาที)	อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านล่างของถังหมัก (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิของน้ำที่ตำแหน่งด้านบนของถังหมัก (องศาเซลเซียส)
0	92.5	91.0
2	81.1	80.1
4	74.2	73.2
6	67.3	66.8
8	61.3	60.8
10	56.4	56.1
12	52.9	52.6
14	49.6	49.4
16	46.8	46.6
18	44.3	44.3
20	42.1	42.1
30	36.2	36.1
40	33.4	33.2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก5 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการหาปริมาณความชื้นของมันเส้นบด 300 กิโลกรัม

ตัวอย่างที่	ซ้ำที่	น้ำหนักถาด (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง + น้ำหนักถาดหลังอบ (กรัม)	% ความชื้น	% ความชื้นเฉลี่ยของตัวอย่าง	% ความชื้นเฉลี่ยรวม
1	1	23.3700	3.1283	26.1700	10.4945	10.3906	10.3411
	2	23.2738	3.0369	26.0006	10.2111		
	3	23.5147	3.8285	26.9425	10.4662		
2	1	23.3970	3.6149	26.6360	10.3986	10.2915	
	2	23.5009	3.1068	26.2905	10.2099		
	3	23.3905	3.0557	26.1325	10.2661		

ตารางผนวกที่ ก6 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการหาปริมาณความชื้นของมันเส้นบด 100 กิโลกรัม

ตัวอย่างที่	ซ้ำที่	น้ำหนักถาด (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง + น้ำหนักถาดหลังอบ (กรัม)	% ความชื้น	% ความชื้นเฉลี่ยของตัวอย่าง	% ความชื้นเฉลี่ยรวม
1	1	23.2925	3.0968	26.0961	9.4678	9.7627	9.6015
	2	23.6728	3.0377	26.4142	9.7541		
	3	22.9854	3.0399	25.7193	10.0661		
2	1	23.3421	3.0507	26.1038	9.4732	9.6035	
	2	23.3871	3.0253	26.1212	9.6255		
	3	23.5310	3.0159	26.2540	9.7119		
1	1	23.3589	3.0397	26.1120	9.4286	9.4382	
	2	23.3758	3.0028	26.0949	9.4478		
	3	9.5205	1.5080	10.9018	8.4019		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก7 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการหาปริมาณแป้งของมันเส้นบด 300 และ 100 กิโลกรัม

ตัวอย่างมันเส้น	ปริมาณแป้ง (%as feed basis)
มันเส้นบด 300 กิโลกรัม	64.94
มันเส้นบด 100 กิโลกรัม	62.28

หมายเหตุ วิเคราะห์ปริมาณแป้งด้วยวิธีโพลาริเมตริก โดยฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก8 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 ครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.4875 กรัม, เอนไซม์ GC358 1.9120 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยย่อยครั้งแรก 5.77)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
30	85.4	5.45	17.0 17.0 17.0	17.00	20.3309	25.5 24.5 24.5	24.5	2.4091	14.1713
60	83.8	5.41	17.4 17.6 17.6	17.53	20.6995	18.9 18.8 18.8	18.8	3.0836	17.5873
90	84.6	5.38	17.8 17.8 17.8	17.80	21.2685	16.4 16.2 16.2	16.2	3.4828	19.5663
120	84.9	5.36	17.8 18.0 18.0	17.93	20.3026	15.5 15.5 15.5	15.5	3.8133	21.2636

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก8 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°C)	pH	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
150	85.0	5.35	18.0 18.0 18.0	18.00	20.4983	14.7 14.8 14.8	14.8	3.9555	21.9750
180	84.9	5.33	18.0 18.0 18.0	18.00	20.6420	14.3 14.3 14.3	14.3	4.0653	22.5850
210	84.8	5.36	18.0 18.0 18.0	18.00	20.5552	14.2 14.0 14.0	14.0	4.1700	23.1664
240	84.7	5.31	18.2 18.2 18.2	18.20	20.4436	13.7 13.8 13.8	13.8	4.2535	23.3708

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m_0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก9 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.4884 กรัม, เอนไซม์ GC358 1.9250 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยย่อยครั้งแรก 5.81)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
30	84.7	5.55	17.8 17.8 17.8	17.80	20.6356	25.5 24.9 24.9	24.9	2.3354	13.1203
60	85.0	5.54	18.0 18.0 18.0	18.00	20.6542	18.6 18.5 18.5	18.5	3.1405	17.4473
90	84.9	5.54	18.0 18.0 18.0	18.00	20.6864	16.2 16.2 16.2	16.2	3.5808	19.8934
120	85.6	5.52	18.2 18.2 18.2	18.20	20.6222	14.5 14.6 14.6	14.6	3.9856	21.8989

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก9 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°C)	pH	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
150	84.8	5.51	18.2 18.2 18.2	18.20	20.7559	14.4 14.4 14.4	14.4	4.0149	22.0600
180	85.0	5.49	18.4 18.4 18.4	18.40	20.5936	14.0 13.7 13.7	13.7	4.2533	23.1159
210	84.7	5.50	18.6 18.6 18.6	18.60	20.5695	13.4 13.4 13.4	13.4	4.3536	23.4067
240	84.8	5.45	18.6 18.6 18.6	18.60	20.6147	13.2 13.1 13.1	13.1	4.4436	23.8902

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก10 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยมันเส้นบดครั้งแรก (Liquefaction) ด้วยเอนไซม์ GC358 ครั้งที่ 3 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 20.0032 กรัม, เอนไซม์ GC358 2.0227 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยย่อยครั้งแรก 5.79)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
30	84.6	5.59	18.6 18.6 18.6	18.60	20.4768	23.8 23.7 23.7	23.7	2.4727	13.2941
60	84.2	5.59	18.6 18.6 18.6	18.60	20.5798	17.7 17.7 17.7	17.7	3.2943	17.7114
90	84.5	5.58	18.6 18.6 18.6	18.60	20.5366	15.8 15.8 15.8	15.8	3.6982	19.8830
120	84.7	5.87	18.6 18.6 18.6	18.60	20.5200	14.8 14.8 14.8	14.8	3.9513	21.2437

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก10 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
150	84.2	5.58	19.0 19.0 19.0	19.00	20.6354	14.3 13.9 13.9	13.9	4.1836	22.0191
180	85.6	5.56	19.0 19.0 19.0	19.00	20.6227	13.6 13.5 13.5	13.5	4.3102	22.6855
210	84.7	5.54	19.0 19.0 19.0	19.00	20.6260	13.0 12.9 12.9	12.9	4.5100	23.7368
240	84.9	5.50	19.2 19.2 19.2	19.20	20.4293	12.7 12.7 12.7	12.7	4.6251	24.0892

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก11 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5006 กรัม, เอนไซม์ GC358 1.9656 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.8325 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.79)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
0	60.3	4.54	19.2 19.2 19.2	19.20	20.6761	14.2 14.1 14.1	14.1	4.1162	21.4384
0.5	64.8	4.52	19.2 19.2 19.2	19.20	12.5013	13.6 12.8 12.4	12.4	7.7411	40.3184
1	65.1	4.58	19.4 19.4 19.4	19.40	10.5825	11.3 11.2 11.2	11.2	10.1245	52.1883
1.5	64.6	4.65	19.4 19.4 19.4	19.40	10.5436	9.9 9.9 9.9	9.9	11.4963	59.2591

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก11 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
2	64.9	4.66	19.4 19.4 19.4	19.40	10.2236	9.6 9.6 9.6	9.6	12.2266	63.0238
2.5	65.0	4.65	19.6 19.6 19.6	19.60	10.2101	9.3 9.1 9.1	9.1	12.9155	65.8952
8	65.2	4.66	19.8 19.8 19.8	19.80	5.2758	15.2 15.1 15.1	15.1	15.0632	76.0765
12	64.7	4.68	20.0 20.0 20.0	20.00	5.2432	14.6 14.6 14.6	14.6	15.6759	78.3794

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก11 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
16	65.7	4.73	20.0 20.0 20.0	20.00	5.9515	12.4 12.4 12.4	12.4	16.2605	81.3024
20	62.8	4.69	20.2 20.2 20.2	20.20	5.6704	13.0 13.0 13.0	13.0	16.2789	80.5885
24	65.2	4.54	20.2 20.2 20.2	20.20	5.5530	13.3 13.3 13.3	13.3	16.2481	80.4360

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก12 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5864 กรัม, เอนไซม์ GC358 1.9652 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.9082 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.72)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
0	63.5	4.51	19.2 19.2 19.2	19.20	20.6742	13.2 13.2 13.2	13.2	4.3972	22.9022
0.5	64.4	4.53	19.2 19.2 19.2	19.20	10.4633	14.2 14.2 14.2	14.2	8.0765	42.0652
1	64.2	4.51	19.4 19.4 19.4	19.40	10.6981	11.5 10.6 10.6	10.6	10.5820	54.5465
1.5	64.4	4.54	19.4 19.4 19.4	19.40	10.7395	9.8 9.7 9.7	9.7	11.5193	59.3777

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก12 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
2	64.8	4.60	19.4 19.4 19.4	19.40	10.7844	9.0 8.9 8.9	8.9	12.5025	64.4456
2.5	64.6	4.59	19.4 19.4 19.4	19.40	10.5949	8.8 8.8 8.8	8.8	12.8707	66.3437
8	64.3	4.57	19.8 19.8 19.8	19.80	5.6811	13.9 13.2 13.2	13.2	16.0020	80.8183
12	64.0	4.58	20.0 20.0 20.0	20.00	5.6318	12.8 12.8 12.8	12.8	16.6465	83.2327

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก12 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
16	64.2	4.56	20.2 20.2 20.2	20.20	5.4858	12.7 12.7 12.7	12.7	17.2241	85.2680
20	64.6	4.58	20.2 20.2 20.2	20.20	5.6434	12.2 12.2 12.2	12.2	17.4293	86.2838
24	64.0	4.56	20.4 20.4 20.4	20.40	5.6717	11.8 11.8 11.8	11.8	17.9302	87.8933

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก13 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 ครั้งที่ 3 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5203 กรัม, เอนไซม์ GC358 1.9536 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.9264 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.78)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
0	63.4	4.49	19.2 19.2 19.2	19.20	20.5410	13.7 13.7 13.7	13.7	4.2642	22.2095
0.5	64.4	4.55	19.2 19.2 19.2	19.20	10.6060	13.8 13.8 13.8	13.8	8.1988	42.7021
1	64.6	4.58	19.4 19.4 19.4	19.40	10.3764	11.0 11.0 11.0	11.0	10.5134	54.1926
1.5	64.3	4.59	19.4 19.4 19.4	19.40	10.5955	9.6 9.5 9.5	9.5	11.9216	61.4518

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก13 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
2	64.8	4.59	19.4 19.4 19.4	19.40	10.5705	9.1 9.0 9.0	9.0	12.6137	65.0192
2.5	64.7	4.60	19.6 19.6 19.6	19.60	10.4641	8.7 8.7 8.7	8.7	13.1814	67.2518
8	64.7	4.61	20.0 20.0 20.0	20.00	5.4870	13.8 13.7 13.7	13.7	15.9634	79.8171
12	63.2	4.60	20.2 20.2 20.2	20.20	5.3819	13.3 13.3 13.3	13.3	16.7646	82.9932

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก13 (ต่อ)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	DE
16	63.2	4.60	20.2 20.2 20.2	20.20	5.5552	12.6 12.6 12.6	12.6	17.1440	84.8711
20	63.6	4.55	20.4 20.4 20.4	20.40	5.7078	12.3 12.1 12.1	12.1	17.3751	85.1720
24	64.2	4.54	20.6 20.6 20.6	20.60	5.6788	11.9 11.9 11.9	11.9	17.7573	86.2006

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก14 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า Oxidation Reduction Potential (ORP), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ ครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.6028 กรัม, เอนไซม์ GC358 1.9102 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.9974 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8555, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.72)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	32.1	4.50	48	19.2 19.2 19.2	19.20	10.6381	11.6 11.6 11.6	11.6	9.7243	0.0000
2	31.1	4.50	5	19.0 19.1 19.2	19.10	10.1373	11.0 11.0 11.0	11.0	10.7613	0.0000
4	31.0	4.49	15	19.2 19.2 19.2	19.20	10.1596	10.7 10.6 10.6	10.6	11.1429	0.0000
6	31.0	4.47	19	19.2 19.2 19.2	19.20	10.3079	10.3 10.3 10.3	10.3	11.3025	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก14 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	30.1	4.41	19	18.6 18.7 19.0	18.77	10.2914	10.0 10.4 10.4	10.4	11.2118	3.0851
24	31.6	4.11	-6	15.0 15.0 15.0	15.00	13.0521	12.1 11.9 11.9	11.9	7.7260	28.1367
36	30.4	4.06	-22	12.0 12.0 12.0	12.00	15.1040	16.2 16.2 16.2	16.2	4.9043	48.1001
42	32.2	4.02	-30	10.8 10.8 10.8	10.80	25.4188	13.1 13.0 13.0	13.0	3.6315	54.0839
48	31.6	4.00	-35	9.8 9.8 9.8	9.80	30.7016	15.4 15.4 15.4	15.4	2.5380	63.0283

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก14 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	31.4	3.99	-42	9.0 9.0 9.0	9.00	30.3373	29.0 27.5	27.5	1.4384	67.3997
60	31.6	3.98	-54	8.0 8.0 8.0	8.00	51.1348	38.4	38.4	0.6111	71.8311
66	32.7	4.00	-58	7.8 7.6 7.6	7.67	66.0213	46.0	46.0	0.3951	74.9503
72	31.3	4.02	-35	7.6 7.6 7.6	7.60	69.7307	61.0	61.0	0.2821	77.4767

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก15 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า Oxidation Reduction Potential (ORP), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5112 กรัม, เอนไซม์ GC358 1.9334 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.9804 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8998 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.72)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	32.5	4.55	32	19.0 19.0 19.0	19.00	10.5426	12.6 12.5 12.5	12.5	9.1059	0.0000
2	31.3	4.55	15	18.8 18.8 18.8	18.80	10.6196	11.7 11.4 11.4	11.4	9.9122	0.0000
4	31.2	4.55	27	18.8 18.8 18.8	18.80	10.5088	11.0 10.8 10.8	10.8	10.5731	0.0000
6	31.1	4.53	30	18.8 18.8 18.8	18.80	10.2159	10.9 10.8 10.8	10.8	10.8763	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก15 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
				18.0			10.5			
12	31.0	4.41	31	18.0	18.00	10.3999	10.7	10.7	10.7837	5.1583
				18.0			10.7			
				14.6			15.9			
24	30.6	4.21	5	14.6	14.60	10.5451	15.7	15.7	7.2482	26.1116
				14.6			15.7			
				11.4			19.0			
36	30.9	4.12	-20	11.4	11.40	15.3630	19.3	19.3	4.0471	46.8450
				11.4			19.3			
				10.2			16.9			
42	31.5	4.10	-26	10.4	10.27	25.1828	16.9	16.9	2.8196	54.8133
				10.2			16.9			
				9.2			20.8			
48	30.9	4.09	-29	9.4	9.33	31.5722	20.3	20.3	1.8723	61.8128
				9.4			20.3			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก15 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	30.5	4.09	-35	8.4 8.4 8.4	8.40	40.2390	31.1 31.5 31.5	31.5	0.9467	67.6127
60	29.7	4.11	-45	7.6 7.6 7.6	7.60	55.3082	45.3	45.3	0.4790	73.4640
66	30.3	4.11	-43	7.4 7.6 7.4	7.47	71.7930	55.0	55.0	0.3039	73.0686
72	31.5	4.11	-41	7.4 7.4 7.4	7.40	75.2562	54.0	54.0	0.2953	77.6458

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก16 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของค่า Oxidation Reduction Potential (ORP), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือกระบวนการหมักแบบปกติ ครั้งที่ 3 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 18.9973 กรัม, เอนไซม์ GC358 1.9691 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.8175 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8048 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.80)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	31.6	4.50	47	20.0 20.0 20.0	20.00	10.2684	12.0 12.0 12.0	12.0	9.7386	0.0000
2	30.9	4.49	17	19.8 19.8 19.8	19.80	10.6076	10.6 10.6 10.6	10.6	10.6723	0.0000
4	30.5	4.48	19	19.8 19.8 19.8	19.80	10.3862	10.3 10.3 10.3	10.3	11.2173	0.0000
6	30.1	4.47	22	19.8 19.8 19.8	19.80	10.4803	10.0 10.0 10.0	10.0	11.4501	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก16 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	31.0	4.39	11	19.4 19.4 19.4	19.40	10.6993	9.2 9.2 9.2	9.2	12.1910	2.5062
24	31.7	4.02	5	15.6 15.6 15.6	15.60	15.2064	10.1 10.1 10.1	10.1	7.8133	29.6871
36	31.6	3.90	-20	12.2 12.2 12.2	12.20	15.2850	17.9 17.8 17.8	17.8	4.4106	53.6704
42	31.4	3.89	-21	11.0 11.0 11.0	11.00	25.3532	15.0 14.9 14.9	14.9	3.1766	61.3599
48	31.4	3.85	-34	10.0 10.0 10.0	10.00	40.5597	13.7 13.6 13.6	13.6	2.1754	71.2833

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก16 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	31.4	3.84	-41	9.0 9.0 9.0	9.00	40.5506	23.1 23.0 23.0	23.0	1.2866	75.3895
60	30.6	3.85	-46	8.2 8.2 8.2	8.20	60.6602	33.9 33.5	33.5	0.5905	81.9034
66	31.2	3.86	-52	8.0 8.0 8.0	8.00	90.1783	37.7 34.6	34.6	0.3846	83.7316
72	30.5	3.89	-45	7.8 7.8 7.8	7.80	95.1033	39.4	39.4	0.3203	86.2163

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก17 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5682 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 9310 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.9743 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8372 กรัม , pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.76)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	31.5	4.50	7	19.0 19.0 19.0	19.00	10.3415	11.8 11.8 11.8	11.8	9.8337	0.0000
2	30.6	4.51	53	19.0 19.0 19.0	19.00	10.1940	11.7 10.8 10.8	10.8	10.8997	0.0000
4	30.3	4.51	82	18.8 18.8 18.8	18.80	10.5703	10.5 10.4 10.4	10.4	10.9159	0.0000
6	30.1	4.49	92	18.8 19.0 18.8	18.87	10.2872	10.2 10.2 10.2	10.2	11.4363	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก17 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	30.1	4.41	71	18.4 18.6 18.4	18.47	10.3769	10.2 10.0 10.0	10.0	11.5641	2.9846
24	30.8	4.16	51	14.6 14.7 14.6	14.63	15.2143	10.7 10.7 10.7	10.7	7.3713	27.6955
36	31.8	4.12	37	11.2 11.2 11.2	11.20	15.5296	18.8 18.8 18.8	18.8	4.1102	48.1323
42	31.7	4.10	33	10.0 10.0 10.0	10.00	25.2302	17.4 17.4 17.4	17.4	2.7335	56.7507
48	30.8	4.10	36	8.6 8.6 8.6	8.60	40.4192	19.3 19.4 19.4	19.4	1.5304	64.1936

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก17 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	30.3	4.11	31	7.6 7.6 7.6	7.60	80.6079	22.1 22.1	22.1	0.6736	70.5372
60	30.0	4.16	38	7.2 7.2 7.2	7.20	93.3706	38.2	38.2	0.3364	69.4923
66	31.7	4.17	66	7.0 7.0 7.0	7.00	95.6628	45.6	45.6	0.2751	70.3651
72	30.7	4.23	56	6.8 6.8 6.8	6.80	95.3624	59.4	59.4	0.2118	69.9897

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก18 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5667 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 9448 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.9405 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8598 กรัม , pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.74)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	31.2	4.50	22	18.0 18.0 18.0	18.00	10.2540	12.4 12.4 12.4	12.4	9.4377	0.0000
2	30.5	4.51	75	17.8 17.8 17.8	17.80	10.7122	11.2 11.2 11.2	11.2	10.0019	0.0000
4	30.2	4.50	117	17.6 17.8 17.8	17.73	10.5724	11.0 10.9 10.9	10.9	10.4131	0.0000
6	30.1	4.49	133	17.6 17.6 17.6	17.60	10.4888	10.6 10.6 10.6	10.6	10.7932	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก18 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	30.4	4.40	90	17.0 17.2 17.0	17.07	10.7177	10.4 10.4 10.4	10.4	10.7658	3.1484
24	33.0	4.10	50	13.0 13.0 13.0	13.00	15.3014	13.0 12.2 12.2	12.2	6.4282	30.5927
36	28.1	4.13	44	10.2 10.3 10.2	10.23	15.7596	21.4 21.5 21.5	21.5	3.5416	47.6427
42	31.9	4.09	37	9.0 9.0 9.0	9.00	25.5100	20.0 20.0 20.0	20.0	2.3520	55.0636
48	30.9	4.09	35	8.0 7.8 8.0	7.93	45.7518	21.4 21.5 21.5	21.5	1.2199	62.3073

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก18 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	30.7	4.11	32	7.0 7.0 7.0	7.00	80.1774	26.8 29.9	29.9	0.5006	69.0366
60	30.1	4.16	37	6.6 6.6 6.6	6.60	90.4408	47.5	47.5	0.2793	68.0290
66	30.3	4.20	53	6.6 6.6 6.6	6.60	95.5613	53.6	53.6	0.2343	67.0863
72	29.8	4.29	53	6.4 6.4 6.4	6.40	96.1354	60.9	60.9	0.2050	66.6063

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก19 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ของกระบวนการหมัก ครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5669 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 9627 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.9872 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8594 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.78)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	31.3	4.51	22	18.6 18.6 18.6	18.60	10.2147	12.2 12.2 12.2	12.2	9.6293	0.0000
2	29.9	4.52	65	18.4 18.6 18.6	18.53	10.4929	11.4 11.0 11.0	11.0	10.3966	0.0000
4	29.9	4.52	105	18.2 18.4 18.4	18.33	10.2464	10.8 10.8 10.8	10.8	10.8439	0.0000
6	29.9	4.51	127	18.6 18.6 18.6	18.60	10.7462	10.0 10.0 10.0	10.0	11.1667	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก19 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
				18.0			10.2			
12	30.3	4.41	83	18.0	18.00	10.6833	10.1	10.1	11.1213	3.4314
				18.0			10.1			
				14.0			11.2			
24	31.3	4.13	54	14.0	14.00	15.3413	11.2	11.2	6.9839	29.5866
				14.0			11.2			
				10.6			22.8			
36	33.5	4.03	20	10.6	10.60	15.3966	22.8	22.8	3.4184	53.0569
				10.6			22.8			
				9.4			21.3			
42	31.0	4.02	9	9.4	9.40	25.2391	21.3	21.3	2.2322	59.9281
				9.4			21.3			
				8.4			22.8			
48	30.5	4.01	-1	8.4	8.40	45.4877	21.8	21.8	1.2101	66.0271
				8.4			21.8			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก19 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	31.1	4.01	-16	7.6 7.6 7.6	7.60	80.5206	33.5 33.5	33.5	0.4449	72.7526
60	30.9	4.03	-21	7.4 7.4 7.4	7.40	90.5170	49.0	49.0	0.2706	74.4104
66	32.4	4.04	-23	7.4 7.4 7.4	7.40	95.3174	52.4	52.4	0.2403	76.7360
72	31.5	4.05	-22	7.4 7.4 7.4	7.40	95.7424	62.2	62.2	0.2015	77.9012

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก20 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการให้อากาศในอัตรา 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ของกระบวนการหมัก ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5616 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 9562 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.9139 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8705 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.78)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	31.3	4.52	15	19.0 19.0 19.0	19.00	10.4123	12.1 12.1 12.1	12.1	9.5247	0.0000
2	30.3	4.53	74	19.0 19.0 19.0	19.00	10.5888	11.0 10.9 10.9	10.9	10.3970	0.0000
4	30.7	4.52	107	18.8 18.8 18.8	18.80	10.5078	10.6 10.6 10.6	10.6	10.7737	0.0000
6	30.7	4.51	117	18.8 18.8 18.8	18.80	10.3160	10.2 10.1 10.1	10.1	11.5172	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก20 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	31.0	4.42	93	18.2 18.4 18.4	18.33	10.4349	10.3 10.0 10.0	10.0	11.4999	3.3995
24	30.8	4.15	65	14.2 14.4 14.4	14.33	15.3867	11.1 11.1 11.1	11.1	7.0261	29.9394
36	33.2	4.05	35	11.0 11.2 11.2	11.13	15.5009	21.8 20.6 20.6	20.6	3.7580	51.6288
42	31.8	4.04	26	9.8 9.7 9.6	9.70	25.3027	20.2 18.8 18.8	18.8	2.5226	59.4977
48	30.9	4.02	12	8.8 8.8 8.8	8.80	45.5589	18.5 18.5 18.5	18.5	1.4238	68.1982

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก20 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	31.7	4.01	1	8.0 8.0 8.0	8.00	80.5426	29.8 27.3	27.3	0.5457	73.9961
60	31.7	4.04	-6	7.8 7.8 7.8	7.80	90.5562	48.4	48.4	0.2738	75.9461
66	31.5	4.06	-7	7.6 7.6 7.6	7.60	95.2297	54.8	54.8	0.2299	76.9452
72	31.5	4.06	-4	7.6 7.6 7.6 7.6	7.60	97.0480	60.5	60.5	0.2044	77.7364

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก21 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5061 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 9548 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.8917 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8536 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.81)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	32.0	4.49	16	18.6 18.4 18.4	18.47	10.3219	11.5 11.5 11.5	11.5	10.1094	0.0000
2	32.5	4.49	21	18.4 18.4 18.4	18.40	10.6933	10.7 10.7 10.7	10.7	10.4878	0.0000
4	30.6	4.50	23	18.2 18.2 18.2	18.20	10.4759	10.4 10.4 10.4	10.4	11.0143	0.0000
6	30.7	4.49	25	18.0 18.2 18.2	18.13	10.6183	10.0 10.0 10.0	10.0	11.3012	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก21 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	30.6	4.42	23	17.8 17.8 17.8	17.80	10.6079	10.2 10.1 10.1	10.1	11.2003	2.7278
24	31.8	4.15	16	14.2 14.2 14.2	14.20	15.3258	10.3 10.2 10.2	10.2	7.6764	24.9102
36	31.6	4.09	-1	11.0 11.0 11.0	11.00	15.5972	19.7 19.6 19.6	19.6	3.9254	46.8654
42	31.3	4.09	16	9.4 9.6 9.6	9.53	25.3108	17.3 17.3 17.3	17.3	2.7405	54.3540
48	31.2	4.08	14	8.4 8.4 8.4	8.40	40.3398	24.0 20.4 20.4	20.4	1.4582	62.2970

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก21 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	31.0	4.08	20	7.4 7.4 7.4	7.40	80.5010	28.2 28.0	28.0	0.5324	69.8467
60	30.5	4.09	11	7.2 7.0 7.0	7.07	90.7565	42.3	42.3	0.3126	70.8246
66	30.2	4.12	24	6.8 6.8 6.8	6.80	95.4473	48.0	48.0	0.2619	71.2571
72	31.1	4.14	19	6.8 6.8 6.8	6.80	95.3324	57.6	57.6	0.2185	71.9116

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก22 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5995 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 9822 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.8271 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8497 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.81)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	30.9	4.49	35	20.0 20.0 20.0	20.00	10.6579	11.7 11.7 11.7	11.7	9.6233	0.0000
2	30.5	4.49	23	19.6 19.6 19.6	19.60	10.5149	11.1 10.9 10.9	10.9	10.4701	0.0000
4	29.9	4.47	28	19.6 19.6 19.6	19.60	10.8945	10.0 10.1 10.1	10.1	10.9057	0.0000
6	29.3	4.44	28	19.6 19.6 19.6	19.60	10.9036	9.7 9.7 9.7	9.7	11.3459	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก22 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
				19.2			9.9			
12	30.1	4.38	14	19.2	19.20	10.3570	9.9	9.9	11.7034	2.3257
				19.2			9.9			
				15.2			11.6			
24	32.7	3.95	16	15.2	15.20	15.1651	10.6	10.6	7.4650	29.1907
				15.2			10.6			
				11.0			27.8			
36	30.1	3.79	31	11.0	11.00	15.2242	27.3	27.3	2.8872	55.3351
				11.0			27.3			
				10.0			25.7			
42	30.7	3.76	16	10.0	10.00	25.8205	24.3	24.3	1.9125	60.5191
				10.0			24.3			
				9.0			22.2			
48	32.0	3.73	17	9.0	9.00	60.7395	21.9	21.9	0.9021	68.7046
				9.0			21.9			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก22 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	30.8	3.76	18	8.4 8.4 8.4	8.40	80.2229	29.0 28.4	28.4	0.5267	73.7580
60	29.9	3.78	14	8.0 8.0 8.0	8.00	90.2315	39.9 34.1	34.1	0.3900	75.8890
66	29.5	3.80	19	7.8 7.8 7.8	7.80	90.6570	42.5	42.5	0.3115	76.7742
72	31.3	3.81	21	7.6 7.6 7.6	7.60	90.2256	50.6	50.6	0.2628	78.0881

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก23 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 64.94% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.5613 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 9504 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.8730 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8643 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.78)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^oC)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	31.3	4.52	41	19.0 19.0 19.0	19.00	10.5349	11.7 11.7 11.7	11.7	9.7357	0.0000
2	31.2	4.54	3	18.8 19.0 19.0	18.93	10.6369	10.8 10.8 10.8	10.8	10.4458	0.0000
4	31.9	4.52	7	18.8 18.8 18.8	18.80	10.4859	10.4 10.4 10.4	10.4	11.0038	0.0000
6	31.6	4.51	9	18.7 18.8 18.8	18.77	10.4795	10.1 10.1 10.1	10.1	11.3376	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก23 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	30.7	4.45	13	18.2 18.2 18.2	18.20	10.6220	9.9 9.9 9.9	9.9	11.4114	2.7767
24	30.9	4.19	-2	14.8 14.8 14.8	14.80	15.3560	10.0 10.0 10.0	10.0	7.8145	27.3511
36	31.0	4.11	-2	11.4 11.4 11.4	11.40	15.2351	18.4 18.3 18.3	18.3	4.3041	47.9017
42	32.4	4.10	-6	10.0 10.0 10.0	10.00	25.3558	16.5 16.4 16.4	16.4	2.8858	57.6481
48	30.6	4.08	-1	8.8 9.0 9.0	8.93	45.5888	17.6 17.4 17.4	17.4	1.5128	67.2184

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก23 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	31.0	4.07	-1	8.0 8.0 8.0	8.00	80.5383	31.8 31.2	31.2	0.4776	74.6952
60	30.5	4.09	-6	7.6 7.6 7.6	7.60	90.6357	47.5	47.5	0.2787	76.1416
66	30.5	4.11	4	7.4 7.4 7.4	7.40	95.6460	52.7	52.7	0.2381	76.3294
72	31.0	4.13	7	7.4 7.4 7.4	7.40	95.9780	58.6	58.6	0.2134	78.2373

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก24 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 62.28% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 18.6895 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 8777 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.6085 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.6102 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.79)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	30.7	4.52	53	20.0 20.0 20.0	20.00	10.6751	11.7 11.7 11.7	11.7	9.6078	0.0000
2	30.9	4.51	15	19.6 19.6 19.6	19.60	10.5453	11.0 11.0 11.0	11.0	10.3450	0.0000
4	31.1	4.49	14	19.6 19.6 19.6	19.60	10.4817	10.6 10.6 10.6	10.6	10.8005	0.0000
6	31.2	4.46	3	19.6 19.6 19.6	19.60	10.4109	10.3 10.3 10.3	10.3	11.1907	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก24 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	32.9	4.08	-3	17.2 17.2 17.2	17.20	10.6711	12.8 12.8 12.8	12.8	8.7854	16.3256
24	30.0	3.87	-8	12.4 12.4 12.4	12.40	20.4272	19.1 18.9 18.9	18.9	3.1082	50.1753
36	31.7	3.85	0	10.0 10.0 10.0	10.00	40.2019	24.8 24.7 24.7	24.7	1.2085	65.8204
42	31.9	3.84	-14	9.2 9.2 9.2	9.20	65.2835	22.2 22.2 22.2	22.2	0.8280	69.7731
48	31.8	3.84	-9	8.8 8.8 8.8	8.80	80.3931	25.8 25.7	25.7	0.5808	73.5987

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก24 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	31.9	3.85	1	8.2 8.2 8.2	8.20	90.5234	32.0 31.9	31.9	0.4156	76.8398
60	31.1	3.87	0	8.0 7.8 7.8	7.87	90.3413	39.7 39.7	39.7	0.3346	81.3415
66	31.3	3.89	10	7.8 7.6 7.6	7.67	95.6677	46.0	46.0	0.2727	82.4939
72	31.6	3.91	14	7.6 7.6 7.6 7.6	7.60	95.4722	54.6	54.6	0.2302	83.4197

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก25 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 62.28% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 19.4890 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 9575 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.8410 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.8610 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.79)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	31.3	4.50	33	18.6 18.6 18.6	18.60	10.5374	11.6 11.6 11.6	11.6	9.8172	0.0000
2	29.9	4.51	-7	18.6 18.6 18.6	18.60	10.4828	10.9 10.9 10.9	10.9	10.5021	0.0000
4	29.9	4.51	0	18.4 18.6 18.6	18.53	10.4421	10.4 10.4 10.4	10.4	11.0499	0.0000
6	29.9	4.50	1	18.6 18.6 18.6	18.60	10.5408	10.1 10.1 10.1	10.1	11.2716	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก25 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	30.3	4.43	-1	18.0 18.2 18.2	18.13	10.5228	10.0 10.0 10.0	10.0	11.4038	2.9209
24	30.6	4.20	-10	14.8 14.8 14.8	14.80	15.5670	9.6 9.6 9.6	9.6	8.0298	24.9278
36	31.2	4.12	-27	11.6 11.6 11.6	11.60	15.5971	17.0 16.4 16.4	16.4	4.6913	46.3074
42	31.4	4.10	-30	10.4 10.4 10.4	10.40	25.4868	13.6 13.6 13.6	13.6	3.4620	54.6552
48	30.6	4.08	-25	9.2 9.2 9.2	9.20	45.6054	14.7 12.9 12.0	12.0	2.1927	62.2825

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก25 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	31.7	4.06	-29	8.2 8.2 8.2	8.20	80.5477	13.8 13.2 13.2	13.2	1.1286	69.6843
60	31.3	4.07	-39	7.6 7.6 7.6	7.60	90.2972	24.9 26.6	26.6	0.4996	72.1405
66	32.0	4.09	-27	7.4 7.4 7.4	7.40	95.6889	46.2	46.2	0.2714	73.6411
72	31.6	4.10	-20	7.2 7.2 7.2	7.20	95.5027	54.5	54.5	0.2306	75.1587

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก26 ข้อมูลดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยวิธีการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นของมันเส้นบด 25%, ปริมาณแป้ง 62.28% as feed basis, $CaCl_2.2H_2O$ 18.6902 กรัม, เอนไซม์ GC358 1. 8803 กรัม, เอนไซม์ GC147 5.6096 กรัม, ยีสต์แห้ง Fali Green 5.6107 กรัม, pH เริ่มต้นย่อยครั้งแรก 5.80)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ORP (mV)	°Brix	°Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	31.2	4.51	64	19.8 19.8 19.8	19.80	10.3542	11.8 11.8 11.8	11.8	9.8216	0.0000
2	31.5	4.49	24	19.6 19.6 19.6	19.60	10.6551	10.8 10.8 10.8	10.8	10.4280	0.0000
4	31.6	4.47	22	19.6 19.6 19.6	19.60	10.4344	10.6 10.5 10.5	10.5	10.9528	0.0000
6	31.9	4.43	17	19.4 19.4 19.4	19.40	10.6760	10.0 10.0 10.0	10.0	11.2402	0.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก26 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
12	34.5	4.04	6	16.6 16.6 16.6	16.60	10.8370	14.0 13.5 13.5	13.5	8.2024	20.1486
24	31.4	3.87	-24	12.2 12.4 12.4	12.33	15.5364	23.1 23.0 23.0	23.0	3.3582	51.3061
36	29.8	3.85	-27	9.8 10.0 10.0	9.93	25.6963	38.2 38.0	38.0	1.2289	68.3540
42	30.7	3.85	-33	9.2 9.2 9.2	9.20	60.4903	25.5 25.2 25.2	25.2	0.7872	70.9613
48	31.9	3.84	-35	8.8 8.8 8.8	8.80	80.5915	27.7 26.1 26.1	26.1	0.5705	75.9795

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก26 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ORP (mV)	^{o}Brix	^{o}Brix เฉลี่ย	น.น. Ex (g) (m_0)	S (ml)	S ที่ใช้ในการคำนวณ (ml)	% น้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณเอทานอล (g/L)
54	30.8	3.86	-35	8.2 8.2 8.2	8.20	90.4334	32.0 31.8	31.8	0.4173	80.3735
60	30.1	3.87	-29	8.0 8.0 8.0	8.00	90.4059	40.2 39.9	39.9	0.3327	81.9403
66	30.3	3.89	-27	7.8 7.8 7.8	7.80	95.2147	47.5	47.5	0.2653	84.0341
72	31.4	3.90	-19	7.8 7.7 7.7	7.73	95.3842	54.4	54.4	0.2313	85.0453

หมายเหตุ %น้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากค่า S, m0 และค่า A = 12.0 ml โดยใช้สูตรคำนวณในหัวข้อที่ 10 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง ในหัวข้อวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณปริมาณแคลเซียมคลอไรด์, ปริมาณเอนไซม์ GC358, ปริมาณเอนไซม์ GC147 และปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. วิธีการคำนวณปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบด

ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง คำนวณจากปริมาณแป้งที่ตรวจวัดได้ โดยปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้แคลเซียมคลอไรด์ 2 กรัม ซึ่งมันเส้นบดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 มันเส้นบด 300 กิโลกรัม (ศูนย์อาหารสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม) และครั้งที่ 2 มันเส้นบด 100 กิโลกรัม (เพื่อนโคบาล อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม) ดังนั้น

ปริมาณแป้งของมันเส้นบด 300 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้ง 64.94% (as feed basis) หรือ มันเส้นบด 100 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 64.94 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง $\frac{64.94\times15000}{100}$ = 9741 กรัม

ปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้แคลเซียมคลอไรด์ 2 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดบนที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากการหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 9741 กรัม จะใช้แคลเซียมคลอไรด์ $\frac{2\times9741}{1000}$ = 19.482 กรัม

ปริมาณแป้งของมันเส้นบด 100 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้ง 62.28% (as feed basis) หรือ มันเส้นบด 100 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 62.28 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง $\frac{62.28\times15000}{100}$ = 9342 กรัม

ปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้แคลเซียมคลอไรด์ 2 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 9342 กรัม จะใช้แคลเซียมคลอไรด์ $\frac{2\times9342}{1000}$ = 18.684 กรัม

2. วิธีการคำนวณปริมาณเอนไซม์ GC358 ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบด

ปริมาณเอนไซม์ GC358 ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง คำนวณจากปริมาณแป้งที่ตรวจวัดได้ โดยปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC358 0.2 กรัม ซึ่งมันเส้นบดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 มันเส้นบด 300 กิโลกรัม และครั้งที่ 2 มันเส้นบด 100 กิโลกรัม ดังนั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณแป้งของมันเส้นบด 300 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้ง 64.94% (as feed basis) หรือ มันเส้นบด 100 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 64.94 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง $\frac{64.94\times15000}{100}$ = 9741 กรัม

ปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC358 0.2 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดบนที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 9741 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC358 $\frac{0.2\times9741}{1000}$ = 1.9482 กรัม

ปริมาณแป้งของมันเส้นบด 100 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้ง 62.28% (as feed basis) หรือ มันเส้นบด 100 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 62.28 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง $\frac{62.28\times15000}{100}$ = 9342 กรัม

ปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC358 0.2 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 9342 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC358 $\frac{0.2\times9342}{1000}$ = 1.8684 กรัม

3. วิธีการคำนวณปริมาณเอนไซม์ GC147 ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบด

ปริมาณเอนไซม์ GC358 ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง คำนวณจากปริมาณแป้งที่ตรวจวัดได้ โดยปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC147 0.6 กรัม ซึ่งมันเส้นบดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 มันเส้นบด 300 กิโลกรัม และครั้งที่ 2 มันเส้นบด 100 กิโลกรัม ดังนั้น

ปริมาณแป้งของมันเส้นบด 300 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้ง 64.94% (as feed basis) หรือ มันเส้นบด 100 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 64.94 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง $\frac{64.94\times15000}{100}$ = 9741 กรัม

ปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC147 0.6 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดบนที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 9741 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC147 $\frac{0.6\times9741}{1000}$ = 5.8446 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณแป้งของมันเส้นบด 100 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้ง 62.28% (as feed basis) หรือ

มันเส้นบด 100 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 62.28 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง $\frac{62.28\times15000}{100}$ = 9342 กรัม

ปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC147 0.6 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 9342 กรัม จะใช้ปริมาณเอนไซม์ GC147 $\frac{0.6\times9342}{1000}$ = 5.6052 กรัม

4. วิธีการคำนวณปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบด

ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง คำนวณจากปริมาณแป้งที่ตรวจวัดได้ โดยปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green 0.6 กรัม ซึ่งมันเส้นบดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 มันเส้นบด 300 กิโลกรัม และครั้งที่ 2 มันเส้นบด 100 กิโลกรัม ดังนั้น

ปริมาณแป้งของมันเส้นบด 300 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้ง 64.94% (as feed basis) หรือ

มันเส้นบด 100 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 64.94 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง$\frac{64.94\times15000}{100}$ = 9741 กรัม

ปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green 0.6 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดบนที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 9741 กรัม จะใช้ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green $\frac{0.6\times9741}{1000}$ = 5.8446 กรัม

ปริมาณแป้งของมันเส้นบด 100 กิโลกรัม จะมีปริมาณแป้ง 62.28% (as feed basis) หรือ

มันเส้นบด 100 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 62.28 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง $\frac{62.28\times15000}{100}$ = 9342 กรัม

ปริมาณแป้ง 1000 กรัม จะใช้ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green 0.6 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบดที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจากหมักเส้นบดในแต่ละครั้ง 15000 กรัม จะมีปริมาณแป้ง 9342 กรัม จะใช้ปริมาณยีสต์แห้ง Fali Green $\frac{0.6\times9342}{1000}$ = 5.6052 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณเอทานอล	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42243.451	12	3520.288	271.943	0.000
Within Groups	336.568	26	12.945		
Total	42580.019	38			

ตารางผนวกที่ ค2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	766.619	12	63.885	486.439	0.000
Within Groups	3.415	26	0.131		
Total	770.033	38			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0	3	0.0000						
2	3	0.0000						
4	3	0.0000						
6	3	0.0000						
12	3	3.5832						
24	3		27.9784					
36	3			49.5385				
42	3				56.7523			
48	3					65.3748		
54	3					70.1339	70.1339	
60	3						75.7328	75.7328
66	3							77.2501
72	3							80.4462
Sig.		0.286	1.000	1.000	1.000	0.117	0.068	0.141

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 หรือการหมักแบบปกติ ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
72	3	0.2992								
66	3	0.3612								
60	3	0.5602								
54	3		1.2239							
48	3			2.1952						
42	3				3.2092					
36	3					4.4540				
24	3						7.5958			
0	3							9.5229		
2	3								10.4486	
4	3								10.9777	10.9777
6	3									11.2096
12	3									11.3955
Sig.		0.414	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.085	0.194

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณเอทานอล	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23842.350	12	1986.862	1240.128	0.000
Within Groups	20.828	13	1.602		
Total	23863.178	25			

ตารางผนวกที่ ค6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณน้ำตารีดิวซ์	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	537.132	12	44.761	309.837	0.000
Within Groups	1.878	13	0.144		
Total	539.010	25			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค7 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0	2	.0000						
2	2	.0000						
4	2	.0000						
6	2	.0000						
12	2		3.0665					
24	2			29.1441				
36	2				47.8875			
42	2					55.9071		
48	2						63.2504	
72	2							68.2980
66	2							68.7257
60	2							68.7606
54	2							69.7869
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.296

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค8 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ตลอดกระบวนการหมัก (0-72 ชั่วโมง) ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
72	2	0.2084						
66	2	0.2547						
60	2	0.3078						
54	2	0.5871	0.5871					
48	2		1.3751					
42	2			2.5427				
36	2				3.8259			
24	2					6.8997		
0	2						9.6357	
2	2						10.4508	10.4508
4	2							10.6645
6	2							11.1147
12	2							11.1649
Sig.		0.373	0.059	1.000	1.000	1.000	0.051	0.105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณเอทานอล	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28513.193	12	2376.099	5596.158	0.000
Within Groups	5.520	13	0.425		
Total	28518.712	25			

ตารางผนวกที่ ค10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	554.980	12	46.248	2229.026	0.000
Within Groups	0.270	13	0.021		
Total	555.250	25			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค11 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	2	0.0000								
2	2	0.0000								
4	2	0.0000								
6	2	0.0000								
12	2		3.4154							
24	2			29.7630						
36	2				52.3428					
42	2					59.7129				
48	2						67.1126			
54	2							73.3743		
600	2								75.1782	
66	2									76.8406
72	2									77.8188
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.157

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค12 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที 0-12 ชั่วโมง ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
72	2	0.2029								
66	2	0.2351								
60	2	0.2722								
54	2	0.4953								
48	2		1.3169							
42	2			2.3774						
36	2				3.5882					
24	2					7.0050				
0	2						9.5770			
2	2							10.3968		
4	2								10.8088	
12	2									11.3106
6	2									11.3419
Sig.		.082	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.831

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณเอทานอล	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27035.295	12	2252.941	210.087	0.000
Within Groups	139.410	13	10.724		
Total	27174.705	25			

ตารางผนวกที่ ค14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณน้ำตารีดิวซ์	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	572.565	12	47.714	471.456	0.000
Within Groups	1.316	13	0.101		
Total	573.881	25			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค15 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	2	0.0000				
2	2	0.0000				
4	2	0.0000				
6	2	0.0000				
12	2	2.5267				
24	2		27.0504			
36	2			51.1002		
42	2			57.4365		
48	2				65.5008	
54	2				71.8023	71.8023
60	2					73.3568
66	2					74.0156
72	2					74.9998
Sig.		0.494	1.000	0.075	0.076	0.383

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค16 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ 20 ± 5 mV ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
72	2	0.2406							
66	2	0.2867							
60	2	0.3513							
54	2	0.5295	0.5295						
48	2		1.1801						
42	2			2.3265					
36	2				3.4063				
24	2					7.5707			
0	2						9.8663		
2	2						10.4789	10.4789	
4	2							10.9600	10.9600
6	2								11.3235
12	2								11.4518
Sig.		0.416	0.062	1.000	1.000	1.000	0.076	0.154	0.165

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณเอทานอล	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30317.607	12	2526.467	93.147	0.000
Within Groups	352.604	13	27.123		
Total	30670.211	25			

ตารางผนวกที่ ค18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณน้ำตารีดิวซ์	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	545.858	12	45.488	169.369	0.000
Within Groups	3.491	13	0.269		
Total	549.349	25			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค19 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	2	0.0000				
2	2	0.0000				
4	2	0.0000				
6	2	0.0000				
12	2	6.9511				
24	2		34.5131			
36	2			53.9453		
42	2			63.7106	63.7106	
48	2				70.4085	70.4085
54	2					75.7675
60	2					78.7415
66	2					79.4116
72	2					80.8285
Sig.		0.246	1.000	0.083	0.221	0.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค20 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -5 ± 5 mV ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
72	2	.2218					
66	2	.2554					
60	2	.3066					
54	2	.4466					
48	2	1.1620					
42	2		2.3439				
36	2			4.0654			
24	2				6.8154		
0	2					9.6717	
2	2					10.3954	10.3954
4	2						10.9021
12	2						10.9118
6	2						11.2641
Sig.		0.122	1.000	1.000	1.000	0.186	0.144

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณเอทานอล	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29508.887	12	2459.074	47.184	0.000
Within Groups	677.517	13	52.117		
Total	30186.404	25			

ตารางผนวกที่ ค22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณน้ำตารีดิวซ์	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	535.648	12	44.637	74.951	0.000
Within Groups	7.742	13	0.596		
Total	543.391	25			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค23 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	2	0.0000				
2	2	0.0000				
4	2	0.0000				
6	2	0.0000				
12	2	8.8371				
24	2		32.2596			
36	2			54.5005		
42	2			61.3112	61.3112	
48	2			69.1310	69.1310	69.1310
54	2				74.3367	74.3367
60	2				77.7746	77.7746
66	2					79.8379
72	2					80.5436
Sig.		0.285	1.000	0.075	0.054	0.173

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค24 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในกระบวนการหมักที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นบดโดยกระบวนการ SSF ที่ผ่านการทำ Pre-Saccharification ด้วยเอนไซม์ GC147 โดยการควบคุมค่า ORP ที่ -30 ± 5 mV ตามวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
72	2	0.2309				
66	2	0.2683				
60	2	0.4161				
54	2	0.7729				
48	2	1.5076	1.5076			
42	2		2.6166	2.6166		
36	2			3.9559		
24	2				6.6783	
0	2					9.8194
2	2					10.4650
12	2					10.9729
4	2					11.0013
6	2					11.2559
Sig.		0.156	0.174	0.106	1.000	0.114

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

วิธีการคำนวณผลได้และประสิทธิภาพการหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการคำนวณผลได้และประสิทธิภาพการหมัก

ในการทดลองแต่ละครั้ง ใช้มันเส้นบด 15 กิโลกรัม หรือ 15,000 กรัม ซึ่งมีปริมาณแป้ง 64.94%(as feed basis)

นั่นคือ มันเส้นบด 100 กรัม จะมีแป้งอยู่ 64.94 กรัม

ถ้า มันเส้นบด 15,000 กรัม จะมีแป้งอยู่ $\frac{64.94\times15,000}{100}$ = 9,741 กรัม

ดังนั้น มันเส้นบด 15 กิโลกรัม หรือ 15,000 กรัม มีแป้งอยู่ 9,741 กรัม

จากสมการการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้ในทางทฤษฎีจากสมการที่ (9) ดังนี้

นั่นคือ แป้ง 162 กรัม จะผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ 180 กรัม

ถ้าแป้งในมันเส้นบด 9,741 กรัม จะผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ $\frac{9,741\times180}{162}$ = 10,823.33 กรัม

ดังนั้น แป้ง 9,741 กรัม จะผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงสุด 10,823.33 กรัม

จากสมการการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอล สามารถคำนวณหาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในทางทฤษฎีจากสมการที่ (10) ดังนี้

นั่นคือ น้ำตาลกลูโคส 180 กรัม จะผลิตเอทานอลได้ 92 กรัม

ถ้าน้ำตาลกลูโคส 10,823.33 กรัม จะผลิตเอทานอลได้ $\frac{10,823.33\times92}{180}$ = 5,531.92 กรัม

ดังนั้น น้ำตาลกลูโคส 10,823.33 กรัม จะผลิตเอทานอลได้สูงสุด 5,531.92 กรัม

ในการผลิตเอทานอล จะใช้มันเส้นบด 15 กิโลกรัม ผสมกับ น้ำ 45 กิโลกรัม รวมเป็น 60 กิโลกรัม หรือ 60 ลิตร ดังนั้น ถ้าในน้ำหมัก 1 ลิตร จะผลิตเอทานอลได้สูงสุด $\frac{5,531.92}{60}$ = 92.19 กรัม นั่นแสดงว่า เอทานอลที่ผลิตได้ในทางทฤษฎี เท่ากับ 92.19 กรัมเอทานอล/น้ำหมัก 1 ลิตร (92.19 กรัม/ลิตร)

จากการทดลองจะทำการคำนวณผลได้ (yield) และประสิทธิภาพการหมักของการหมักแบบปกติ, การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง และการหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV ที่เวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหมักแบบปกติ เวลาที่เหมาะสม คือ 60 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.73 กรัมต่อลิตร

การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง เวลาที่เหมาะสม คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 73.37 กรัมต่อลิตร

การหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV เวลาที่เหมาะสม คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.76 กรัมต่อลิตร

จากสมการที่ (11) สามารถคำนวณประสิทธิภาพการหมักของกระบวนการหมักแบบต่าง ๆ ได้ดังนี้

ดังนั้น การหมักแบบปกติ เวลาที่เหมาะสม คือ 60 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการหมัก

$$\frac{75.73}{92.19} \times 100 = 82.14\ \%$$

การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง เวลาที่เหมาะสม คือ 54 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการหมัก

$$\frac{73.37}{92.19} \times 100 = 79.58\ \%$$

การหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV เวลาที่เหมาะสม คือ 54 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการหมัก

$$\frac{75.76}{92.19} \times 100 = 82.17\ \%$$

การคำนวณผลได้ (yield) ของเอทานอลเทียบกับมันเส้น (กรัมเอทานอล/กรัมมันเส้นบด, dry basis) และผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง (กรัมเอทานอล/กรัมแป้งในมันเส้น, dry basis) ของกระบวนการหมักแบบต่าง ๆ จากสมการที่ (12) และ (13) ตามลำดับ ได้ดังนี้

การหมักแบบปกติ เวลาที่เหมาะสม คือ 60 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.7328 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองใช้มันเส้นบด 15 กิโลกรัม ผสมกับ น้ำ 45 กิโลกรัม รวมเป็น 60 กิโลกรัม หรือ 60 ลิตร ดังนั้น ถ้าในน้ำหมัก 60 ลิตร จะผลิตเอทานอลได้ 75.7328 x 60 = 4,543.968 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้น ผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้น $= \frac{4,543.968}{15,000} = 0.3029$

และ ผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง $= \frac{4,543.968}{9741} = 0.4665$

การหมักแบบให้อากาศ 0-12 ชั่วโมง เวลาที่เหมาะสม คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 73.3743 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองใช้มันเส้นบด 15 กิโลกรัม ผสมกับ น้ำ 45 กิโลกรัม รวมเป็น 60 กิโลกรัม หรือ 60 ลิตร ดังนั้น ถ้าในน้ำหมัก 60 ลิตร จะผลิตเอทานอลได้ 73.3743 x 60 = 4,402.458 กรัม

ดังนั้น ผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้น $= \frac{4,402.458}{15,000} = 0.2935$

และ ผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง $= \frac{4,402.458}{9741} = 0.4519$

การหมักแบบควบคุม ORP ที่ -5 ± 5 mV เวลาที่เหมาะสม คือ 54 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้ 75.7675 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองใช้มันเส้นบด 15 กิโลกรัม ผสมกับ น้ำ 45 กิโลกรัม รวมเป็น 60 กิโลกรัม หรือ 60 ลิตร ดังนั้น ถ้าในน้ำหมัก 60 ลิตร จะผลิตเอทานอลได้ 75.7675 x 60 = 4,546.05 กรัม

ดังนั้น ผลได้ของเอทานอลเทียบกับมันเส้น $= \frac{4,546.05}{15,000} = 0.3031$

และ ผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง $= \frac{4,546.05}{9741} = 0.4667$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ - นามสกุล	นายสกานต์ เหลืองเกรียงไกร
เกิดวันที่	31 ธันวาคม 2558
สถานที่เกิด	จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีการหมัก) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน ประจำปีงบประมาณ 2552 และ ทุนคณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์