การเพิ่มศักยภาพของเศษของเสียจากผลไม้เป็นสับสเตรตคุณภาพสูง สำหรับใช้ประโยชน์ในกระบวนการทางชีววิทยาเพื่อผลิตเอทานอล

Upgrade Fruit Waste as High Value Substrate by Utilization in Biological Process for Bio-ethanol Production

นุชนาถ แช่มช้อย

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2558

ชื่อเรื่อง การเพิ่มศักยภาพของเศษของเสียจากผลไม้เป็นสับสเตรตคุณภาพสูงสำหรับใช้ประโยชน์ในกระบวนการทางชีววิทยาเพื่อผลิตเอทานอล
ผู้วิจัย นุชนาถ แช่มช้อย
สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์ 2561
สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้างานวิจัย 76 หน้า
คำสำคัญ การหมักแบบต่อเนื่อง เอทานอล ผลผลิตของเอทานอล
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่องโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ TISTR 3063 และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 ชนิดละ 5% และ 10% รวมทั้งศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อปริมาณผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักดังกล่าว โดยเศษของเสียฯ ที่ใช้ในการทดลองหมัก คือ เปลือกส้มโอและเปลือกกล้วย ซึ่งผ่านการเตรียมโดยการหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร และปิดปากขวดด้วยสำลี ในแต่ละชุดทดลองใช้เศษของเสียฯ ปริมาณ 10 กรัม ใช้กลูโคสและเซลลูโลสเป็นชุดควบคุม ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของเศษของเสียฯ ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหย เถ้า ความชื้น ซีโอดี ทีเคเอ็น และปริมาณน้ำตาล และเก็บข้อมูลปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30 และ 40 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลอง พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเมื่อทำการหมักภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40 องศาเซลเซียส โดยเมื่อทำการหมักโดยใช้เปลือกส้มโอ เป็นระยะเวลา 1 วัน ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 2.43 และ 2.72 กรัมต่อลิตร (เพิ่มขึ้นเป็น 2.79 กรัมต่อลิตร หลังจากหมักนาน 2 วัน) สำหรับชุดทดลองที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) และได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 1.18 และ 1.49 กรัมต่อลิตร สำหรับการหมักโดยใช้เปลือกกล้วยและใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่า อุณหภูมิการหมักมีผล

ต่อปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้ โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการหมักจาก 30 เป็น 40 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอล มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 75.70% เป็น 81.17% และจาก 73.86% เป็น 90.71% สำหรับการหมักเปลือกส้มโอ และมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 32.88% เป็น 45.29% และจาก 83.43% เป็น 104.90% สำหรับการหมักเปลือกกล้วย โดยจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ สรุปได้ว่า อุณหภูมิการหมัก มีผลต่อปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้ โดยปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้ ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30 องศาเซลเซียส มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากการหมักภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ได้แนวทางในการเพิ่มศักยภาพของเศษของเสียจากผลไม้ (เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย) ให้เป็นสับสเตรตคุณภาพสูงสำหรับผลิตเอทานอล โดยพบว่า เปลือกส้มโอ มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้หมักเอทานอล ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40^{o}C ระยะเวลาการหมัก 1 วัน และใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ ชนิดละ 10% (w/w) นอกจากนี้ ผลการศึกษายังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการผลิตเอทานอล เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในภาคอุตสาหกรรมอย่างเป็นรูปธรรมต่อไป

Research Title Upgrade fruit waste as high value substrate by utilization in biological process for bio-ethanol production

Researchers Nutchanat Chamchoi

Institution Huachiew Chalermprakiet University

Year of Publication 2018

Publisher Huachiew Chalermprakiet University

Sources Huachiew Chalermprakiet University

No. of Pages 76 pages

Keywords Simultaneous Fermentation, Ethanol, Ethanol Yield

Copyright Huachiew Chalermprakiet University

ABSTRACT

The purpose of this research was to study the amount of ethanol from simultaneous fermentation of fruit waste with co-microorganisms *of Aspergillus niger* TISTR 3063 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5606 in 5% and 10% each. Moreover, the effect of fermented temperature to the amount of obtained ethanol from the fermentation process was also observed. The fruit wastes used for experimental fermentation were pomelo and banana peels, which were prepared by chopping in a small piece, rectangular shaped. The fermentation was carried out in an Erlenmeyer flask with the total volume of 250 mL and the cotton was plug-in on top. The amount of fruit waste of 10 g in each experimental set was designed. The glucose and the cellulose were used as a control. The analysis of fruit wastes composition was considered such as the pH, the amount of total solids, volatile solid, ash, moisture, COD, TKN, and the amount of sugar. Nevertheless, the amount of fermented ethanol data under the fermented temperature of 30 and 40^{o}C was recorded.

From the results, it was found that the maximum amount of ethanol was achieved under the fermented temperature of 40°C. The maximum amount of ethanol of 2.43 and 2.72 g/L were achieved from the pomelo peels fermentation within 1 day (increase to 2.79 g/L after 2 days fermentation), with 5% and 10% (w/w) of fungi and yeast. The maximum amount of ethanol of 1.18 and 1.49 g/L were also observed from the fermentation using banana peels with 5% and 10% (w/w) of fungi and yeast, respectively. Moreover, it was found that the fermented temperature was effect to the maximum amount of the obtained ethanol yield. When the fermented temperature was increased from 30°C to 40°C, the maximum amount of ethanol yield was increased from 75.70% to 81.17% and from 73.86% to 92.91% for the pomelo peels fermentation and increased from 32.88% to 45.29% and from 83.43% to 104.90% for the banana peels fermentation. From the result of statistical analysis, it can be concluded that the fermented temperature effect to the maximum amount of ethanol yield. The maximum amount of ethanol yield achieved from 30°C fermented temperatures was lower than the values obtained from 40°C with the significant difference level of 0.05. From this study, the option for upgrade fruit wastes (pomelo and banana peels) as high value substrate using for producing of ethanol was achieved, which the pomelo peel showed high potential for using as ethanol fermentation under fermented temperature of 40°C, fermented time of 1 day, and function by 10% (w/w) of each fungi and yeast. Nevertheless, the results of study can be used further as a database for ethanol production and practical using in the industrial sector.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ สำเร็จลงได้โดยได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยนักวิจัย (นางสาวศศิธร นนทา) และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์และสิ่งแวดล้อม (นางฐิติภรณ์ บ้างบุญเรือง) ที่ช่วยสนับสนุนให้การดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ อาจารย์อาภาภรณ์ บุลสถาพร ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขอขอบคุณ Mr. Hector Garcia ที่ให้คำแนะนำในการดำเนินการทดลอง และเป็นที่ปรึกษาให้กับโครงการวิจัยนี้

ท้ายที่สุด ขอขอบคุณ บิดา มารดา และผู้ใหญ่ทุกท่านที่ผู้วิจัยเคารพนับถือ ที่เป็นกำลังใจสำคัญ ทำให้งานทุกอย่างของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดีเสมอมา

ผศ.ดร. นุชนาถ แช่มช้อย

พฤษภาคม 2561

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
นิยามตัวแปร	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
กรอบแนวคิดในการวิจัย	20
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	21
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	21
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	21
การเก็บรวบรวมข้อมูล	23
การวิเคราะห์ข้อมูล	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	27
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	51
สรุปผลการวิจัย	51
อภิปรายผล	53
ข้อเสนอแนะ	57
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก	63
ประวัติย่อผู้วิจัย	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี	10
2	พารามิเตอร์และวิธีวิเคราะห์	25
3	ส่วนประกอบของสับสเตรตที่ใช้ในการทดลอง	28
4	สมดุลมวลจากกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C	44
5	สมดุลมวลจากกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C	45
6	ความแตกต่างของปริมาณผลผลิตของเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอและเปลือกกล้วยแบบต่อเนื่องฯ ภายใต้อุณหภูมิการหมักที่แตกต่างกัน	50

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องระหว่างขั้นตอนการย่อยและการหมัก	7
2	การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก	8
3	ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก	22
4	อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC	22
5	ลักษณะทางกายภาพของสับสเตรตก่อนการเตรียมและหลังการเตรียมโดยการหั่น	24
6	ชุดทดลองกระบวนการหมักเอทานอล (ก) เปลือกส้มโอ และ (ข) เปลือกกล้วย	25
7	ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C	29
8	ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C	29
9	ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C	30
10	ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C	31
11	ปริมาณเอทานอลจากการหมักในชุดควบคุม (กลูโคส) โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C	32

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ปริมาณเอทานอลจากการหมักในชุดควบคุม (Avicel) โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C	32
13	ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C	33
14	ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C	34
15	ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C	35
16	ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับ เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C	35
17	ปริมาณเอทานอลจากการหมักในชุดควบคุม (กลูโคส) โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C	36
18	ปริมาณเอทานอลจากการหมักในชุดควบคุม (Avicel) โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C	37
19	ปริมาณผลผลิตของเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C	38
20	ปริมาณผลผลิตของเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C	38

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (อุณหภูมิการหมัก = 30°C)	39
22	ค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (อุณหภูมิการหมัก = 40°C)	40
23	ปริมาณกรดไขมันระเหยตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (อุณหภูมิการหมัก = 30°C)	41
24	ปริมาณกรดไขมันระเหยตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (อุณหภูมิการหมัก = 40°C)	41
25	สมดุลมวลและประสิทธิภาพของกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในชุดควบคุม (กลูโคส)	46
26	สมดุลมวลและประสิทธิภาพของกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เปลือกส้มโอ ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C และ 40°C	47
27	สมดุลมวลและประสิทธิภาพของกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เปลือกกล้วย ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C และ 40°C	48
28	ผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตของเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์	49
29	ผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตของเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยแบบต่อเนื่องโดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์	50

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงพลังงานทดแทนที่สำคัญของโลกและของประเทศไทย เนื่องจากสามารถผลิตได้จากชีวมวล (Biomass) จากพืชหลายชนิด โดยใช้กระบวนการหมักเพื่อเปลี่ยนแป้งจากชีวมวลดังกล่าวเป็นน้ำตาล แล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเมื่อทำให้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95% จะเรียกว่า เอทานอล (Ethanol) ในต่างประเทศ มีการนำเอทานอลมาผสมในน้ำมันเบนซินในสัดส่วนต่างๆ เช่น 10% (E10; เอทานอล10% เบนซิน 90) ซึ่งเป็นการลดมลพิษทางอากาศจากการเผาไหม้น้ำมันของเครื่องยนต์ได้ด้วย (U.S. Department of Energy. 2016) สำหรับประเทศไทย มีการนำเอทานอล้มาผสมกับน้ำมันเบนซินเช่นกัน และเรียกว่า น้ำมันก๊าซโซฮอล์ โดยจากแผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี (พ.ศ. 2551-2565) มีการกำหนดเป้าหมายส่งเสริมการใช้เอทานอลปริมาณ 9 ล้านลิตรต่อวัน ซึ่งภาครัฐมีนโยบายและมาตรการส่งเสริมสนับสนุนที่ชัดเจน ในการส่งเสริมอุตสาหกรรมเอทานอลแบบครบวงจรและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงการพัฒนาระบบโลจิสติกส์เพื่อลดต้นทุนการวิจัย และพัฒนาพืชพลังงานชนิดใหม่ๆ เพื่อลดการพึ่งพาน้ำมันและสร้างความมั่นคงด้านพลังงานภายในประเทศ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2560)

การหมักเศษของเสียจากพืชประเภทต่างๆ เพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอล จัดเป็นการใช้ประโยชน์จากของเสียที่ดีทางเลือกหนึ่ง โดยจากการศึกษาศักยภาพของเศษของเสียประเภทต่างๆ เพื่อการผลิต เอทานอล พบว่า เศษของเสียที่มีการนำมาทดลองใช้หมักเอทานอล ได้แก่ เศษของเสียจากผลปาล์ม (Jung, Y.H. et.al. 2013; Jung, Y.H. et.al. 2011; Piarpuzan, D., Quintero, J.A. and Cardona, C.A. 2011) เศษของเสียจากผลไม้ประเภทต่างๆ (Bello, R.H. et.al. 2014; Choonut, A., Saejong, M. and Sangkharak, K. 2014; Garcia, A. et.al. 2014; Santi, G. et.al. 2014; Oberoi, H.S. et.al. 2011; Wilkins, M.R., Widmer, W.W. and Grohmann, K. 2007) เศษอาหารและของเสียจากครัวเรือน (Kim, J.H., Lee, J.C. and Pak, D. 2011; Tang, Y-Q. et.al. 2008) เป็นต้น และเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้สำหรับการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอล ได้แก่ เชื้อยีสต์ โดยเฉพาะเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ให้ผลผลิตเอทานอลจากการหมักในปริมาณต่างๆ ขึ้นอยู่กับสับสเตรตที่ใช้ในการหมัก เช่น 24.51 และ 42 g/L เมื่อใช้ฝักของผลคารอบและเศษของเสียจากส้มจีนเป็นสับสเตรตในการหมัก (Germec, M. et.al. 2015; Oberoi, H.S. et.al. 2011) เป็นต้น

ซึ่งปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมัก ได้แก่ การปรับสภาพสับสเตรตก่อนใช้ในการหมัก โดยเฉพาะสับสเตรตประเภทที่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูง ซึ่งวิธีในการปรับสภาพสับสเตรตมีหลายวิธี ได้แก่ การย่อยโดยใช้สารเคมีประเภทกรดหรือด่าง เช่น กรดเกลือ และ aqueous ammonia (รัชดาภรณ์ เบญจวัฒนานนท์. 2552; Jung, Y.H. et.al. 2011) การปรับสภาพด้วยกรดและด่างภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น การนึ่งฆ่าเชื้อ การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ และการใช้คลื่น อัลตราโซนิค (Gabhane, J. et.al. 2014) การปรับสภาพด้วยเอนไซม์ carbohydrase, glucoamylase, cellulase และ protease (Kim, J.H., Lee, J.C. and Pak, D. 2011) นอกจากนี้ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก ก็มีผลต่อปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมัก โดยอุณหภูมิที่มีรายงานว่าเหมาะสมสำหรับใช้ในการหมัก ได้แก่ 30°C (Abd-Alla, M.H. and El-Enany, A.E. 2012) 35°C (Garcia, A. et.al. 2014; Piarpuzan, D., Quintero, J.A. and Cardona, C.A. 2011) 37°C (Oberoi, H.S. et.al. 2011; Wilkins, M.R., Widmer, W.W. and Grohmann, K. 2007) และ 38°C (Jung, Y.H. et.al. 2011) อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลผลิตเอทานอลจากเศษของเสียชนิดอื่นๆ และการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการหมัก ก็ยังเป็นที่ต้องการ เพื่อเพิ่มศักยภาพของเศษของเสียเหล่านั้น และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาต่อยอดเพื่อประโยชน์ในเชิงการค้าต่อไป

ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นในการศึกษาเพื่อเพิ่มศักยภาพของเศษของเสียจากผลไม้ ให้เป็นสับสเตรตคุณภาพสูงสำหรับใช้ประโยชน์ในกระบวนการทางชีววิทยาเพื่อการผลิตเอทานอล โดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่องโดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์
2. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้โดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์

สมมติฐานการวิจัย

อุณหภูมิการหมัก มีผลต่อปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมัก

ขอบเขตของการวิจัย

1. สถานที่ทำการศึกษา ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ วิทยาเขตบางพลี

2. ระยะเวลาที่ทำการศึกษา 12 เดือน

3. การทดลอง เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ TISTR 3063 และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในการหมักเศษของเสียจากผลไม้ ได้แก่ เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย โดยการทดลอง แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยเชื้อรา *Aspergillus Niger* สายพันธุ์ TISTR 3063 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606

ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยเชื้อรา *Aspergillus Niger* สายพันธุ์ TISTR 3063 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606

นิยามตัวแปร

1. กระบวนการหมัก หมายถึง กระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

2. เอทานอล หมายถึง ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

3. เชื้อรา *Aspergillus niger* หมายถึง เชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ TISTR 3063

4. เชื้อยีสต์ หมายถึง เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606

5. สับสเตรต หมายถึง เศษของเสียจากผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง

6. เศษของเสียจากผลไม้ หมายถึง เศษของเสียจากส้มโอและกล้วย ได้แก่ ส่วนเปลือกของส้มโอและส่วนเปลือกของกล้วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แนวทางในการเพิ่มศักยภาพของเศษของเสียจากผลไม้เป็นสับสเตรตคุณภาพสูงสำหรับผลิตเอทานอล

2. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการผลิตเอทานอลในเชิงอุตสาหกรรม เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรมต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการทดลองผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยา สามารถใช้สับสเตรตได้หลายประเภท ซึ่งผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้สับสเตรตแต่ละประเภทก็จะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาวะในการหมักและส่วนประกอบของสับสเตรตแต่ละชนิดดังกล่าว โดยเฉพาะส่วนประกอบในรูปของของแข็งทั้งหมด (Total Solids) และปริมาณน้ำตาล (กลูโคส) เป็นต้น โดยทฤษฎีการหมัก และปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักทางชีววิทยา มีดังนี้

เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethylalcohol) มีสูตรทางเคมี คือ C_2H_5OH เป็นของเหลว ไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยง่าย สามารถลอยได้ในน้ำและสารละลายอินทรีย์อื่นๆ ซึ่งในปัจจุบัน เชื้อเพลิงเอทานอล จัดเป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญ และถูกผลิตขึ้นมาจากการเก็บเกี่ยวพลังงานแสงอาทิตย์ที่เก็บสะสมในพืช โดยพืชที่สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอล ได้แก่ อ้อย มันสำปะหลัง และข้าวโพด เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีการค้นคว้าและวิจัย เพื่อการนำชีวมวลและเศษของเสียจากพืชประเภทต่างๆ มาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอลอีกด้วย

การหมักเอทานอล

ในระหว่างกระบวนการหมัก จะได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการที่ 1 และเกิดผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้ เช่น กรดอะซิติก และไกลคอล เป็นต้น ซึ่งจำเป็นต้องมีกระบวนการกำจัดออกก่อนนำไปใช้งาน

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + \text{ความร้อน} \qquad (1)$$

วัตถุดิบ/สับสเตรต ที่ใช้ในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอล มี 3 ประเภท ได้แก่ วัตถุดิบ/สับสเตรตประเภทแป้ง เส้นใย (เซลลูโลส) และน้ำตาล โดยการหมักวัตถุดิบ/สับสเตรต ประเภทเส้นใยจำเป็นต้องมีการปรับสภาพก่อน เช่น การหั่น สับ บด การระเบิดด้วยไอน้ำ/แอมโมเนีย การปรับสภาพด้วยโอโซน/กรด/ด่าง เป็นต้น (สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557) เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลชนิดอื่น แล้วใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอลต่อไป ซึ่งในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตหลักเป็นเอทานอล ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การย่อย (Hydrolysis)

การย่อย เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (น้ำตาลกลูโคส) เพื่อให้มีสภาพเหมาะกับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ในขั้นตอนต่อไป โดยอาจใช้กรดหรือเอนไซม์ในการย่อย (Acid Hydrolysis or Enzymatic Hydrolysis) ซึ่งหากวัตถุดิบ/สับสเตรตที่ใช้ในการหมักเป็นประเภท เส้นใย มักใช้สารเคมี (กรดหรือด่าง) ในการย่อย แต่หากเป็นประเภทแป้ง จะนิยมใช้เอนไซน์ในการย่อย เนื่องจากสะดวกและประหยัดต้นทุน โดยในการย่อย ประกอบด้วย

1) การย่อยแป้งเพื่อทำให้แป้งมีโมเลกุลเล็ก หรือทำให้เหลว (Liquefaction)

2) การย่อยแป้งเพื่อทำให้ได้กลูโคส หรือย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification)

ขั้นตอนที่ 2 การหมัก (Fermentation)

ในขั้นตอนนี้เป็นการนำวัตถุดิบ/สับสเตรตที่ผ่านการย่อยในขั้นตอนแรกมาแล้ว มาทำการหมักด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculums) ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เชื้อยีสต์ *Saccaromyces cerevisiae* ในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอล โดยอาจทำการควบคุมสภาวะของการหมัก เช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน ค่าพีเอช และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก เป็นต้น

ทั้งนี้ ในการทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์และสามารถนำไปใช้งานได้ สามารถใช้วิธีการกลั่น (Distillation) และการแยกน้ำ (Dehydration) แต่หากต้องการนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง (ก๊าซโซฮอล์) จำเป็นต้องทำให้เอทานอลมีความบริสุทธ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร ซึ่งมีวิธีที่นิยมใช้อยู่ 3 วิธี คือ

1) กระบวนการดูดซับด้วย Molecular sieve

2) การกลั่นอะซีโอโทรป (Azeotropic distillation)

3) การใช้เทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง (Membrane technology)

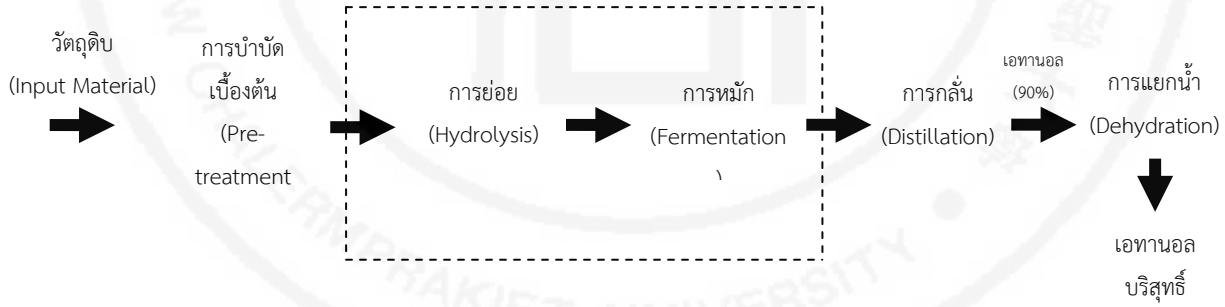
รูปแบบของการหมักเอทานอล

การหมักเอทานอล มี 3 รูปแบบ ได้แก่

1) การหมักเอทานอลแบบแยกกระบวนการผลิต (Separate Hydrolysis and Fermentation; SHF) เป็นรูปแบบการหมักที่มีการแยกขั้นตอนการย่อยและขั้นตอนการหมัก ซึ่งจากการศึกษาของ Dahnum, D. et.al. (2015) พบว่า การหมักแบบแยกกระบวนการผลิต ได้ปริมาณเอทานอลต่ำกว่าการหมักแบบต่อเนื่อง

2) การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องระหว่างขั้นตอนการย่อยและการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation; SSF) (ภาพที่ 1) เป็นรูปแบบของการหมักเอทานอลที่ออกแบบขึ้นมาเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตของเอทานอล และลดค่าใช้จ่ายในการหมัก โดยหากใช้การหมักแบบต่อเนื่องในการหมักวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโซส ควรควบคุมสภาวะระหว่างการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งในการหมักแบบนี้อาจมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันในกระบวนการหมักก็ได้ เช่น จากการศึกษาของ Izmirlioglu, G., Demirci, A. (2017) มีการใช้เชื้อ *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมักเอทานอลจากเศษมันฝรั่ง เป็นต้น

3) การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องระหว่างขั้นตอนการย่อยและการหมักร่วม (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation; SSCF) เป็นการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น ในงานวิจัยของ Wei-Chuan, C. et.al. (2017) มีการทดลองหมักเอทานอลโดยใช้การหมักร่วมระหว่าง *Trichoderma reesei, Aspergillus niger,* และ *Zymomonas mobilis*

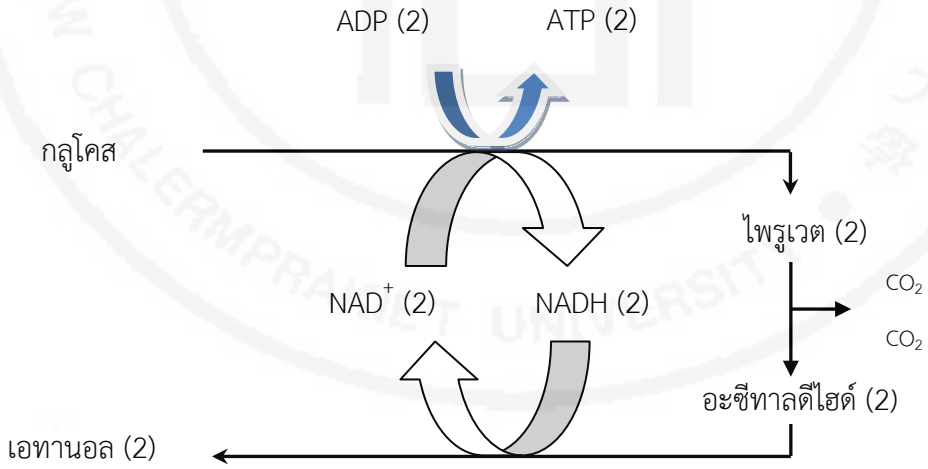


ภาพที่ 1 การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องระหว่างขั้นตอนการย่อยและการหมัก
(Achinas, S. and Euverink, G.J.W. 2016)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมักเอทานอล โดยเฉพาะ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากให้ผลผลิตของเอทานอลในปริมาณสูง สามารถใช้สำหรับการหมักที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในปริมาณสูงได้ (Azhar, S.H.M. et.al. 2017) โดยปกติแล้วยีสต์ต้องการพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยการสลายชีวมวลต่างๆ ระหว่างขบวนการหายใจ โดยในสภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์จะใช้ออกซิเจนในการหายใจและสลายโมเลกุลของน้ำตาล เกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตของยีสต์ อย่างไรก็ตาม ในสภาวะไร้ออกซิเจน ยีสต์ก็สามารถใช้ pathway แบบไร้ออกซิเจน ผ่านกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งจะมีการสลายน้ำตาล ได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_5OH)

ในระหว่างกระบวนการหมัก เกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน และการใช้ NAD^+ โดยโมเลกุลของกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) จะถูกทำลาย และได้ผลผลิตเป็นไพรูเวต ($C_3H_4O_3$) 2 โมเลกุล และ ATP 2 โมเลกุล และมีการใช้ NAD^+ 2 โมเลกุล เพื่อให้เกิดเป็น NADH (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

การทดลองหมักเอทานอลในระดับห้องปฏิบัติการ มีปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อปริมาณผลผลิตเอทานอล ประกอบด้วย อุณหภูมิการหมัก ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลาการหมัก และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ดังต่อไปนี้

1) อุณหภูมิการหมัก โดยทั่วไป อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มอุณหภูมิมากไป ก็จะทำให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์จุลินทรีย์ได้เช่นกัน (Azhar, S.H.M. et.al. 2017)

2) ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น จัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อปริมาณผลผลิตเอทานอลจากการหมัก เมื่อปริมาณน้ำตาลตั้งต้นสูงขึ้น อัตราการสลายน้ำตาลเพื่อให้ได้ผลผลิตจากการหมัก ก็จะเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่ออัตราการย่อยสลายสูงขึ้นเรื่อยๆ ก็จะเริ่มคงที่ เนื่องจากเกินขีดความสามารถในการย่อยสลายของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น ซึ่งโดยทั่วไป อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด จะเกิดขึ้นเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น 150 g/L (สำหรับการหมักในห้องปฏิบัติการ) (Azhar, S.H.M. et.al. 2017)

3) ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก โดยความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 2.75-4.25 ส่งผลต่อการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของยีสต์ ในขณะเดียวกันความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 4.0-5.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* (Azhar, S.H.M. et.al. 2017) ซึ่งจากการศึกษาของ Wu, Y. et.al. (2017) พบว่า การหมักที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0 ให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลสูง นอกจากนี้ ความเป็นกรด-ด่าง ที่ไม่เหมาะสม ยังส่งผลให้เกิดผลผลิตอื่นที่ไม่เป็นที่ต้องการอีกด้วย

4) ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก หากสั้นเกินไป การหมักจะมีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากจุลินทรีย์ยังใช้สารอาหารในการสร้างเซลล์ได้ไม่เพียงพอ และหากระยะเวลาที่ใช้ในการหมักนานเกินไป อาจส่งผลกระทบ (เกิดความเป็นพิษ) ต่อการทำงานของจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะการทดลองแบบแบตช์ (Batch Mode) เนื่องจากการสะสมของปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (Azhar, S.H.M. et.al. 2017)

5) ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลกระทบต่ออัตราการสลายน้ำตาลของจุลินทรีย์ (Consumption Rate of Sugar) และปริมาณผลผลิตเอทานอลที่เกิดขึ้น (Ethanol Productivity) (Azhar, S.H.M. et.al. 2017)

จากการรวบรวมข้อมูลรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี สรุปสาระสำคัญได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae	หยวกกล้วย	676.76 มิลลิลิตร/น้ำหมัก 10 ลิตร (80.66%)	1) ปรับสภาพสับสเตรต (Pretreatment substrate) โดยใช้กรดเกลือย่อยเซลลูโลสเป็นเวลา 15-30 นาที ปรับความเป็นกรด-ด่าง ที่ระดับ 4.5-5 2) ใช้ระยะเวลาหมัก 5-7 วัน	รัชดาภรณ์ เบญจวัฒนานนท์ (2552)
1) *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (anaerobic bacteria) 2) *Bacillus subtilis* DSM 4451. *B. subitlis* (consume O_2)	Spoilage date palm fruits	21.56 g L^{-1} was achieved at 75 g L^{-1} spoilage date palm fruits	1) ไม่มีการเติมสาร reducing agent และไม่มีการไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน 2) อุณหภูมิการหมัก 30°C	Abd-Alla, M.H. and El-Enany, A.E. (2012)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
-ไม่ระบุ-	Oil palm empty fruit bunches	18.6 g/L	1) ปรับสภาพสับสเตรตด้วย aqueous ammonia 21% (w/w) ภายใต้อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง 2) อุณหภูมิการหมัก 38°C 3) ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง โดยใช้ 5% (w/v) glucan และ 60 FPU of cellulase และ 30 CBU of b-glucosidase per gram glucan	Jung, Y.H. et.al. (2011)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae	Oil palm empty fruit bunches	Ethanol Yield; 66.50 dm^3 of ethanol per each t of สับสเตรต	1) ปรับสภาพสับสเตรตด้วยด่าง 2) Enzymatic hydrolysis for sugars release 3) อุณหภูมิการหมัก 35°C 4) มีการเติมสารอาหาร (For each 10 g of reducing sugars was added 500 mg yeast, 50 mg $(NH_4)2HPO_4$, 5 mg $MgSO_4.7H_2O$, 230 mg NaH_2PO_4, 10.5 mg $CO(NH_2)_2$ and 5 mg $FeCl_3$	Piarpuzan, D., Quintero, J.A. and Cardona, C.A. (2011)
Saccharomyces cerevisiae	เศษของเสียจากกล้วย	-ไม่ระบุ-	1) สับสเตรตต่อเชื้อ; 500 g L^{-1} wet mass และ 20% (v/v) of inoculums 2) ระยะเวลาการหมัก 10 ชั่วโมง	Bello, R.H. et.al. (2014)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
-ไม่ระบุ-	เศษของเสียจากกล้วย	-ไม่ระบุ-	ปรับสภาพด้วยกรดและด่างภายใต้การนึ่งฆ่าเชื้อ การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ และการใช้คลื่นอัลตรา โซนิค ดังนี้ - สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้ acid pretretment เมื่อใช้ใบกล้วยเป็นสับสเตรต คือ ระยะเวลา 25 นาที และอุณหภูมิ 180°C โดยใช้ไมโครเวฟ - สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้ alkali pretretment เมื่อใช้ pith เป็นสับสเตรต คือ ระยะเวลา 51 นาที และอุณหภูมิ 50°C โดยใช้ เครื่องอัลตราโซนิค	Gabhane, J. et.al (2014)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
S. cerevisiae	เศษของเสียจาก Kinnow mandarin (Citrus reticulata) ส่วนเปลือกและส่วนเนื้อ	42 g L^{-1} (3.50 g $L^{-1}h^{-1}$)	1) อุณหภูมิการหมัก 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	Oberoi, H.S. et.al. (2011)
Saccharomyces cerevisiae	Jatropha curcas fruit shells	-ไม่ระบุ-	1) อุณหภูมิการหมัก 35°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 2) ปรับสภาพสับสเตรต โดยการให้ความร้อนร่วมกับกรดซัลฟุริค (อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 136°C ร่วมกับกรดซัลฟุริคเข้มข้น 1.5% เป็นเวลา 30 นาที)	Garcia, A. et.al. (2014)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae KF-7	ของเสียจากครัวเรือน (Kitchen waste)	24.0 g l^{-1} h^{-1} (at dilution rate of 0.8 h^{-1})	1) เตรียม Saccharified liquid (pH 3.85; glucose 64.0 g l^{-1}; lactic acid 8000 mgl^{-1}; acetic acid 1200 mg l^{-1} โดยใช้ชุดอุปกรณ์ประกอบด้วย compact chopper, saccharification reactor และ filter press. 2) หมักแบบต่อเนื่อง เป็นระยะเวลา 1 เดือน ในถังปฏิกรณ์แบบ CSTR	Tang, Y-Q. et.al. (2008)
Saccharomyces cerevisiae	เศษอาหาร (Food waste)	0.43 g ethanol/g total solids (For separated hydrolysis and fermentation) 0.31 g ethanol/g total solids (For simultaneous saccharification and fermentation)	1) ปรับสภาพสับสเตรตในขั้นตอน Hydrolysis ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการหมักเอทานอล ด้วยเอนไซม์ carbohydrase, glucoamylase, cellulase และ protease	Kim, J.H., Lee, J.C. and Pak, D. (2011)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae	Citrus processing waste	76% to 94% Ethanol yields	1) ปรับสภาพสับสเตรต ด้วยไอน้ำ (steam purging) ที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 8 นาที ภายใต้ pH ระหว่าง 2.2–8.2 2) หมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แบบ simultaneous saccharification and fermentation	Widmer, W., Zhou, W. and Grohmann, K. (2010)
Saccharomyces cerevisiae	Carob pod extract	Ethanol production = 24.51 g/L Ethanol yield = 48.59% Ethanol production rate = 2.14 g/L/h (ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม)	1) ทำการหมักในถังปฏิกรณ์แบบ biofilm โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ - ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (Initial sugar content) เท่ากับ 7.71°Bx - pH เท่ากับ 5.18 - Agitation ที่ความเร็วรอบ เท่ากับ 120 rpm	Germec, M. et.al. (2015)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae F15	เปลือกส้ม (Orange peel waste)	Maximum ethanol yield coefficient ≈0.495 g g^{-1} และ Ethanol productivity เท่ากับ 4.85 g L^{-1} h^{-1})	1) ปรับสภาพสับสเตรต ที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 150 วินาที 2) ทำการหมักใน Shaken-flasks	Santi, G. et.al. (2014)
1) *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 2) *Enterobacter aerogenes* TISTR 1468	เปลือกสับปะรด (Pineapple peel)	1) Maximum yield of ethanol = 9.69 g/L (โดย *S. cerevisiae*; ไม่มีผลผลิตไฮโดรเจน) ใช้ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง 2) Maximum ethanol และ hydrogen (โดย*E. Aerogenes*) = 1.38 g/L และ 1,416 mL/L ระยะเวลาหมัก 72 และ 12 ชั่วโมง	1) ปรับสภาพสับสเตรตด้วยน้ำ และความร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 2) ใช้แบคทีเรีย *Aspergillus niger* ในขั้นตอน hydrolysis	Choonut, A., Saejong, M. and Sangkharak, K. (2014)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

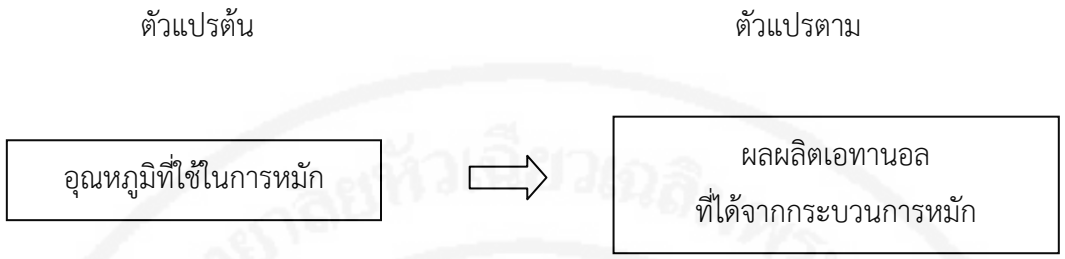
ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae	Oil palm empty fruit bunches (EFB)	1) Pretreatment สับสเตรตด้วยกรด Sulfuric ได้ 52.5% of theoretical ethanol yield based on total glucan in the untreated initial EFB โดยใช้ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง 2) Pretreatment EFB slurry ด้วยถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) ก่อนทำการหมัก ได้ 87.5% ethanol yield based on the initial glucan content in untreated EFB ใช้ระยะเวลาหมัก 48 ชั่วโมง	1) ปรับสภาพสับสเตรต ด้วย 1% (w/v) sulfuric acid เป็นเวลา 3 นาที ในไมโครเวฟ 190°C 2) ปรับสภาพ EFB slurry ด้วยถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) ก่อนทำการหมัก	Jung, Y.H. et.al. (2013)

ตารางที่ 1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สับสเตรตที่ใช้	ปริมาณเอทานอลที่ได้	สภาวะที่ใช้ในการผลิต	อ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae	เปลือกมะนาว/มะกรูด (Citrus peel)	-ไม่ระบุ-	1) อุณหภูมิการหมัก 37°C 2) ก่อนทำการหมัก ทำการกำจัด D-limonene ในสับสเตรต เนื่องจากเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ ด้วยกระบวนการ Steam explosion (กำจัดได้มากกว่า 90%) 3) pH เริ่มต้นของสับสเตรตที่ดีที่สุดในงานวิจัย คือ 6.0	Wilkins, M.R., Widmer, W.W. and Grohmann, K. (2007)
Saccharomyces cerevisiae	Mango stem bark residues	ผลผลิตสูงสุดของเอทานอลจากการหมัก; แบบ SHF = 58.8% แบบ SSF = 81.6% แบบ PSSF = 84.5%	1) ใช้การหมัก 3 รูปแบบ ได้แก่ แบบ SHF, SSF, PSSF 2) อุณหภูมิการหมัก (SSF) 32, 35, 38°C	Carrillo-Nieves, D. et.al. (2017)
1) *Pseudomonas sp.* 2) *Saccharomyces cerevisiae*	Pteris (fern)	1) Sugar = 1.7625 mg/L 2) Ethanol Yield = 0.333 mg/L	1) Hydrolysis; pH = 7, อุณหภูมิ = 35°C 2) การหมัก; pH = 7, อุณหภูมิ = 25°C	Saha, P. et.al. (2014)

กรอบแนวคิดในการวิจัย

กรอบแนวคิดในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่



บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ เป็นการวิจัยเชิงทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาการเพิ่มศักยภาพของเศษของเสียจากผลไม้ ให้เป็นสับสเตรตคุณภาพสูงสำหรับใช้ประโยชน์ในกระบวนการทางชีววิทยาเพื่อการผลิตเอทานอล โดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* รายละเอียดวิธีการดำเนินการวิจัย มีดังนี้

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ใช้เศษของเสียจากผลไม้ ได้แก่ เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังต่อไปนี้

1) ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียม/ถ่ายเชื้อราและเชื้อยีสต์ ได้แก่ ห่วงถ่ายเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานเพาะเชื้อ ขวดดูแรน และหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

2) ชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสับสเตรตเพื่อใช้ในการหมัก ได้แก่ มีด และเขียง

3) ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก (ภาพที่ 3) ประกอบด้วย ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 mL และสำลีปิดปากขวด

4) ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บและเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ได้แก่ ไมโครปิเปตและปิเปตทิป ขวดเก็บตัวอย่าง หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (ปริมาตร 2.0 mL) เครื่องปั่นเหวี่ยง และขวดซีรั่มขนาดเล็กสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (ภาพที่ 4)

5) ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ เครื่องวัดพีเอช ตู้อบ เตาเผา ชุดย่อยและกลั่นแอมโมเนีย และเครื่อง GC (FID)

ขวดรูปชมพู่

สำลีปิดปากขวดรูปชมพู่

ภาพที่ 3 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก

ไมโครปิเปต และปิเปตทิป

ขวดเก็บตัวอย่าง

(ก) อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง

หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (2.0 mL)

ไมโครปิเปต และปิเปตทิป

เครื่องปั่นเหวี่ยง

GC vial

(ข) อุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

ภาพที่ 4 อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ส่วนประกอบของเศษของเสียจากผลไม้ (เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย) ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหย เถ้า ความชื้น ซีโอดี ทีเคเอ็น และปริมาณน้ำตาลในเศษของเสียฯ ดังกล่าว

ส่วนที่ 2 ปริมาณเอทานอลจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ส่วนที่ 3 ผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (อุณหภูมิการหมัก 30 ºC และ 40ºC)

การเตรียมสับสเตรตและเชื้อจุลินทรีย์

1) เตรียมสับสเตรต (เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย) เพื่อใช้ในการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องด้วยเชื้อจุลินทรีย์ร่วม (เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*) โดยทำการหั่นสับสเตรตเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก เพื่อให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของสับสเตรต (ภาพที่ 5) โดยสับสเตรตส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับออกแบบชุดทดลอง (ตารางที่ 2) สับสเตรตอีกส่วนหนึ่งนำไปชั่งในปริมาณตามที่ได้ออกแบบชุดทดลองไว้สำหรับใช้ในการจำลองกระบวนการหมัก

2) เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ (เชื้อรา) โดยทำการเพาะเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ TISTR 3063 (จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) จากหลอดเชื้อแห้งแข็ง (freeze-dried cultures) ตามวิธีของ สถาบันฯ เริ่มต้นจากการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 2 วัน และถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 2 วัน

3) เตรียมเชื้อยีสต์ โดยทำการเพาะเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 (จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) จากหลอดเชื้อแห้งแข็ง (freeze-dried cultures) ตามวิธีของ สถาบันฯ เริ่มต้นจากการเพาะเชื้อใน Yeast Mold Agar (YMA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 2 วัน และถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเหลว Yeast Mold Broth (YM B) โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 2 วัน

(ก) เปลือกส้มโอ (ข) เปลือกกล้วย

ภาพที่ 5 ลักษณะทางกายภาพของสับสเตรตก่อนการเตรียมและหลังการเตรียมโดยการหั่น

การจำลองกระบวนการหมักเอทานอล

จำลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์ ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 mL โดยแบ่งชุดทดลองเป็น 2 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ในแต่ละชุดทดลองใช้สับสเตรต 10 g (w/w) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปิดปากขวดด้วยสำลี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที (ภาพที่ 6) หลังจากนั้นทำการถ่ายเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5606 ปริมาณ 5% และ 10% (w/w) ลงบนสับสเตรตดังกล่าว แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ โดยมีชุดควบคุม (กลูโคส และเซลลูโซส) ปริมาณ 5 g/L ที่มีการเติมสารอาหาร (Yeast Extract 0.1 g (w/w)) อย่างละ 1 ชุด

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์และวิธีวิเคราะห์ (APHA, 1998)

พารามิเตอร์	ส่วนประกอบของสับสเตรต	ผลผลิตจากกระบวนการหมัก	วิธีวิเคราะห์/เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์
ความเป็นกรดด่าง (pH)	√	√	Electrometric method (APHA 4500-H^+)
ของแข็งทั้งหมด (Total solids)	√		อบที่ 103-105°C
ของแข็งระเหย (Volatile solid)	√		เผาที่ 550 °C
เถ้า (Ash)	√		เผาที่ 550 °C
ความชื้น (Moisture)	√		อบที่ 135 °C
ซีโอดี (COD)	√		Closed reflux method (APHA 5220)
ทีเคเอ็น (TKN)	√		Kjeldahl method (APHA 4500-N_{org})
น้ำตาล (Sugar)	√	√	วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (UV/VIS detector)
เอทานอล (Ethanol)		√	วิเคราะห์โดยเครื่อง GC (FID detector)

(ก) (ข)

ภาพที่ 6 ชุดทดลองกระบวนการหมักเอทานอล (ก) เปลือกส้มโอ และ (ข) เปลือกกล้วย

การเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์

เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องที่ทำการควบคุมอุณหภูมิในแต่ละวัน ในปริมาณ 5-10 mL วัดค่าพีเอชของตัวอย่าง และเติมกรดฟอสฟอริค 34% (w/w) เก็บรักษาตัวอย่างโดยการแช่แข็ง

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล โดยทำการปั่นแยกตัวอย่างด้วยเครื่องเหวี่ยง (Eppendorf) ที่ความเร็วรอบ 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นอนุภาคออกจากส่วนของเหลว ถ่ายส่วนของเหลวลงในขวดซีรั่มขนาดเล็ก แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC (UV/VIS detector) และ GC (GC: FID) ตามลำดับ

พารามิเตอร์และวิธีวิเคราะห์ แสดงดังตารางที่ 2

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลส่วนประกอบของสับสเตรตที่ใช้ในการหมัก และปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละ

วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อทดสอบสมมติฐานของการวิจัย โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการวิจัย แบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ผลการศึกษาส่วนประกอบของสับสเตรต (เศษของเสียจากผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง) ผลการศึกษาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่องโดยเชื้อรา *Aspergillus Niger* สายพันธุ์ TISTR 3063 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 และผลการศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยเชื้อจุลินทรีย์ร่วมดังกล่าว รายละเอียดของผลการวิจัยทั้ง 3 ส่วน มีดังนี้

ผลการศึกษาส่วนประกอบของสับสเตรตที่ใช้ในการทดลอง

สับสเตรตที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย โดยเมื่อทำการเตรียมโดยการหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก และนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบ ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหย เถ้า ความชื้น ซีโอดี ทีเคเอ็น และปริมาณน้ำตาล (กลูโคส) พบว่า เปลือกส้มโอ มีค่าพีเอชต่ำกว่าเปลือกกล้วย (4.28, SD = 0.06 และ 6.08 SD = 0.00) แต่มีปริมาณของแข็งในรูปของของแข็งทั้งหมด (237.07 g/kg, SD = 1.28 และ 120.53 g/kg, SD = 2.79) และของแข็งระเหยสูงกว่า (225.82 g/kg, SD = 1.15 และ 100.71 g/kg, SD = 2.45) สำหรับปริมาณเถ้าและความชื้น มีค่าต่ำกว่า โดยปริมาณเถ้า มีค่าเท่ากับ 11.25 g/kg, SD = 0.36 และ 19.81 g/kg, SD = 0.55 ปริมาณความชื้น มีค่าเท่ากับ 76.29%, SD = 0.13 และ 87.95%, SD = 0.28 นอกจากนี้ ยังพบว่าเปลือกส้มโอ มีปริมาณซีโอดี เป็นส่วนประกอบอยู่สูงกว่าเปลือกกล้วย โดยมีค่าเท่ากับ 301.70 g/L, SD = 8.53 และ 62.64 g/L, SD = 8.19 รวมทั้งมีปริมาณกลูโคสสูงกว่าในเปลือกกล้วยเช่นกัน (5.62 g/L, SD = 0.29 และ 2.09 g/L, SD = 0.79) ในขณะที่ ปริมาณทีเคเอ็นมีค่าต่ำกว่าเปลือกกล้วย (12.45 g/L, SD = 0.40 และ 16.32, SD = 0.13) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสับสเตรตที่ใช้ในการทดลอง

พารามิเตอร์	เปลือกส้มโอ		เปลือกกล้วย	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
พีเอช (pH)*	4.28	0.06	6.08	0.00
ของแข็งทั้งหมด (Total solids, g/kg)*	237.07	1.28	120.53	2.79
ของแข็งระเหย (Volatile solid, g/kg)*	225.82	1.15	100.71	2.45
เถ้า (Ash, g/kg)*	11.25	0.36	19.81	0.55
ความชื้น (Moisture, %)*	76.29	0.13	87.95	0.28
ซีโอดี (COD, g/L)*	301.70	8.53	62.64	8.19
ทีเคเอ็น (TKN, g/L)*	12.45	0.40	16.32	0.13
น้ำตาลกลูโคส (Glucose, g/L)**	5.62	0.29	2.09	0.79

* วิธีวิเคราะห์ตาม APHA. (1998)

** วิเคราะห์ด้วย HPLC (UV/VIS detection)

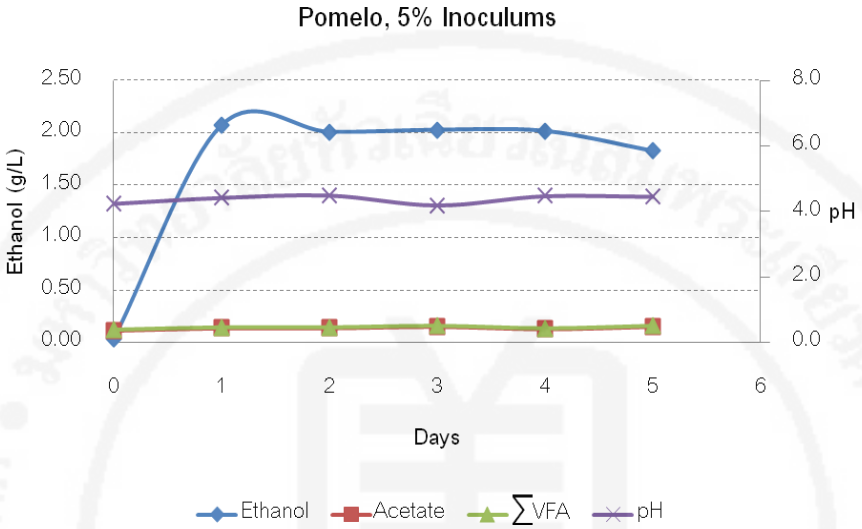
ผลการศึกษาปริมาณเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

จากผลการทดลองหมักเศษของเสียจากผลไม้ 2 ชนิด (เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย) แบบต่อเนื่อง โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า

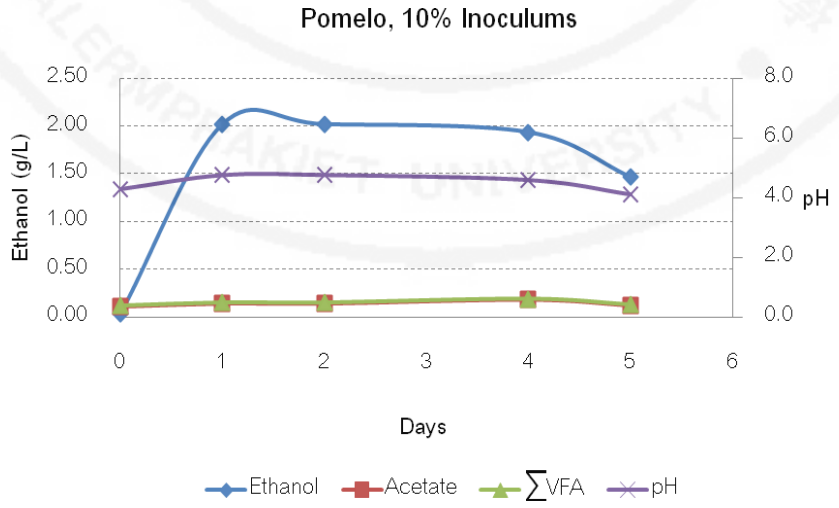
1. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิการหมัก 30°C

จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อทำการหมักเปลือกส้มโอแบบต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30° เป็นระยะเวลาทั้งหมด 5 วัน ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 4.19-4.50 (ภาพที่ 7) สำหรับผลการหมักเปลือกส้มโอที่อุณหภูมิการหมักดังกล่าว โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นชนิดละ 10% (w/w) พบว่า ได้ปริมาณ

เอทานอลสูงสุด เท่ากับ 2.02 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 4.11-4.78 (ภาพที่ 8)



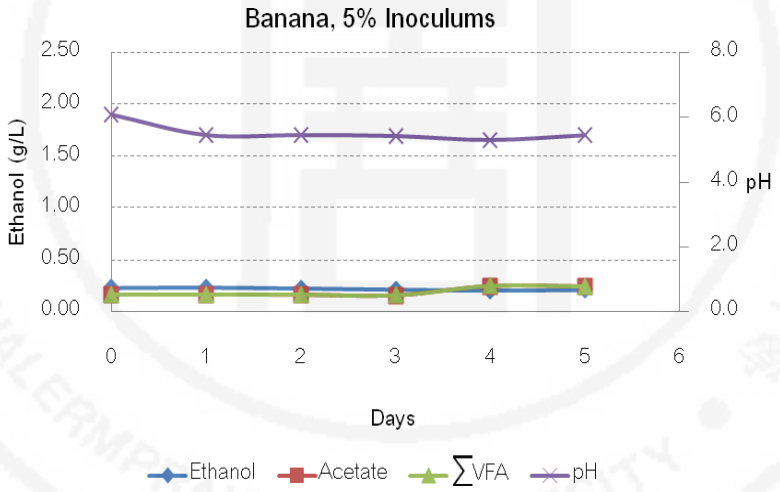
ภาพที่ 7 ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C



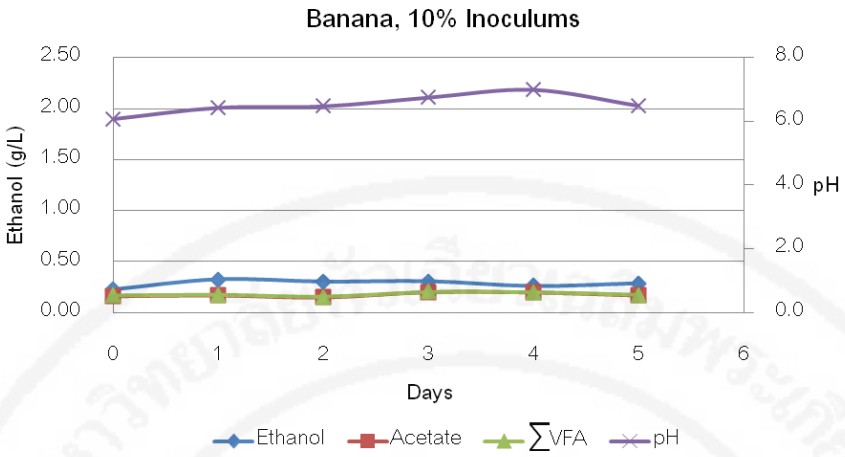
ภาพที่ 8 ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C

สำหรับการทดลองหมักเปลือกกล้วยแบบต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30° เป็นระยะเวลาทั้งหมด 5 วัน พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลต่ำกว่าการหมักเปลือกส้มโอที่สภาวะเดียวกัน โดยมีปริมาณเอทานอลสูงสุดเพียง 0.23 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน และมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 5.30-6.08 (ภาพที่ 9)

ผลการหมักเปลือกกล้วยที่อุณหภูมิการหมักเดียวกัน โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 0.32 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมักระหว่าง 6.08-7.00 (ภาพที่ 10)

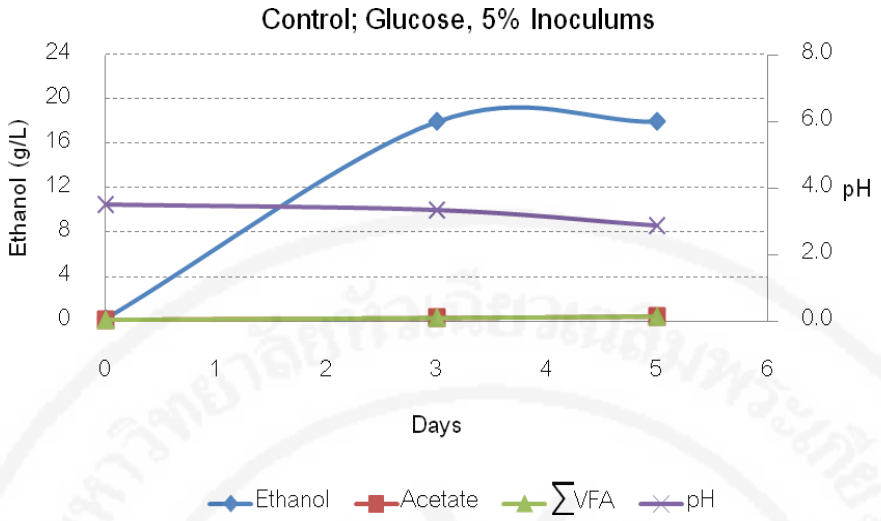


ภาพที่ 9 ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C

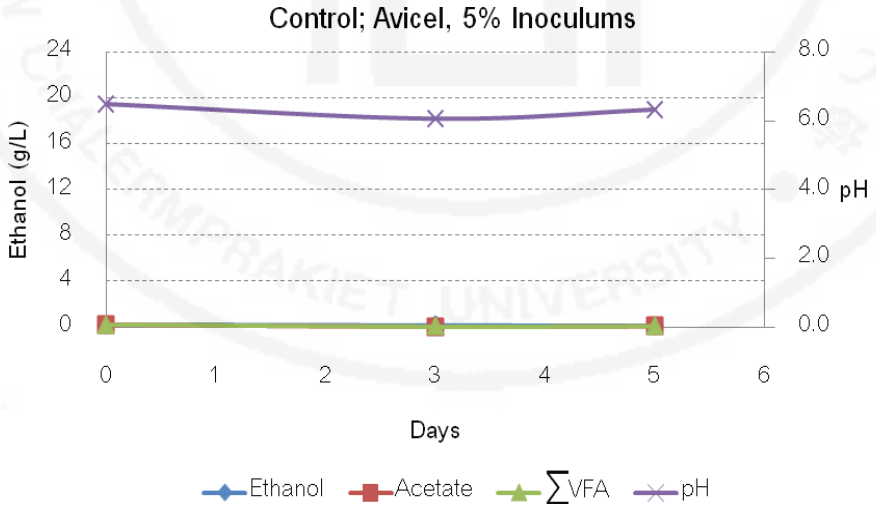


ภาพที่ 10 ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C

นอกจากนี้ ในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสและเซลลูโลส (Avicel) ในการหมัก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม 2 ชนิดเหมือนกับในชุดทดลองหมักเปลือกส้มโอและเปลือกกล้วย ในปริมาณชนิดละ 5% (w/w) ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30° พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 18.0 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 2.89-3.50 (ภาพที่ 11) และในชุดควบคุมที่ใช้เซลลูโลส พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 6.07-6.50 (ภาพที่ 12)



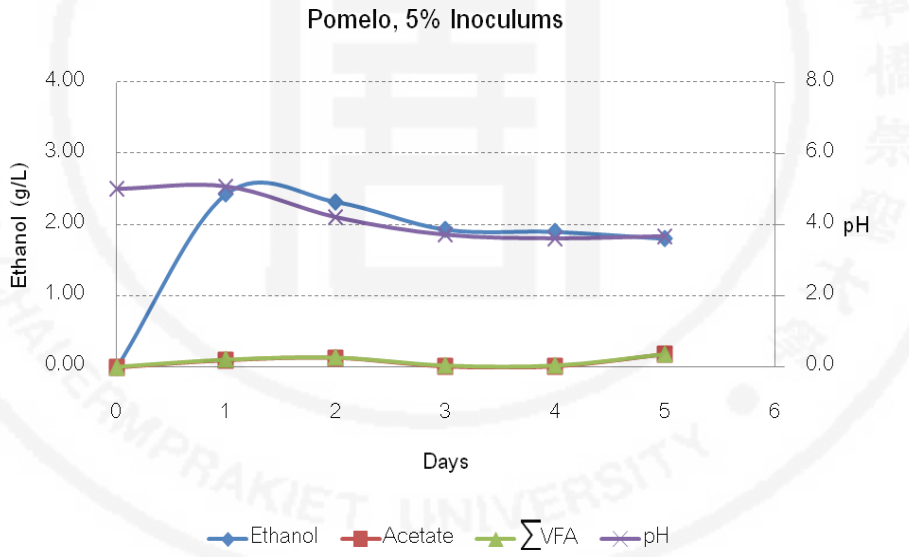
ภาพที่ 11 ปริมาณเอทานอลจากการหมักในชุดควบคุม (กลูโคส) โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C



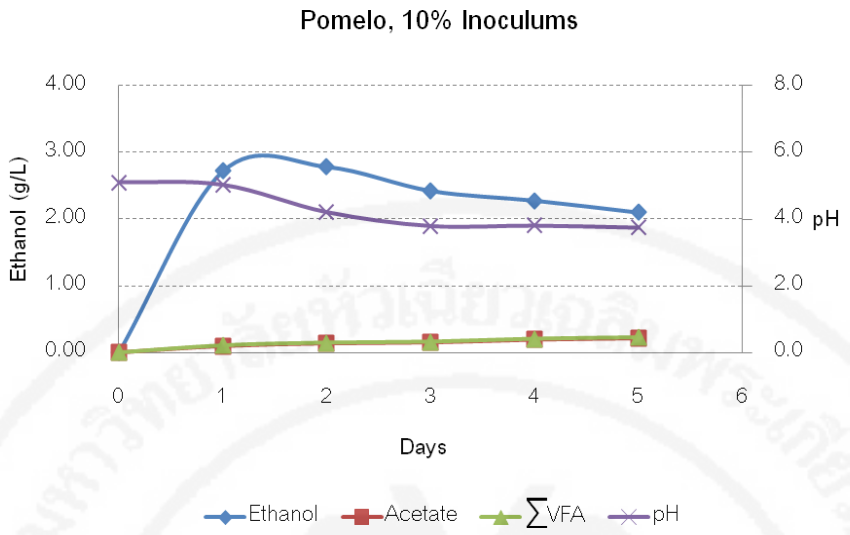
ภาพที่ 12 ปริมาณเอทานอลจากการหมักในชุดควบคุม (Avicel) โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30°C

2. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิการหมัก 40°C

จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อทำการหมักเปลือกส้มโอแบบต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40° เป็นระยะเวลาทั้งหมด 5 วัน ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 3.62-5.07 (ภาพที่ 13) สำหรับผลการหมักเปลือกส้มโอที่อุณหภูมิการหมักดังกล่าว โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นชนิดละ 10% (w/w) พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 2.72 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 2.79 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักต่ออีก 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 3.75-5.10 (ภาพที่ 14)



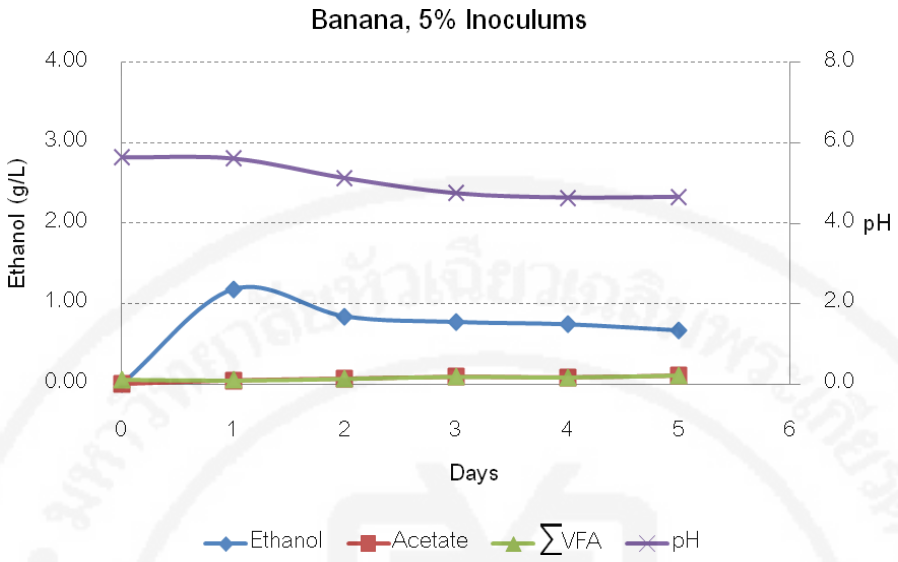
ภาพที่ 13 ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C



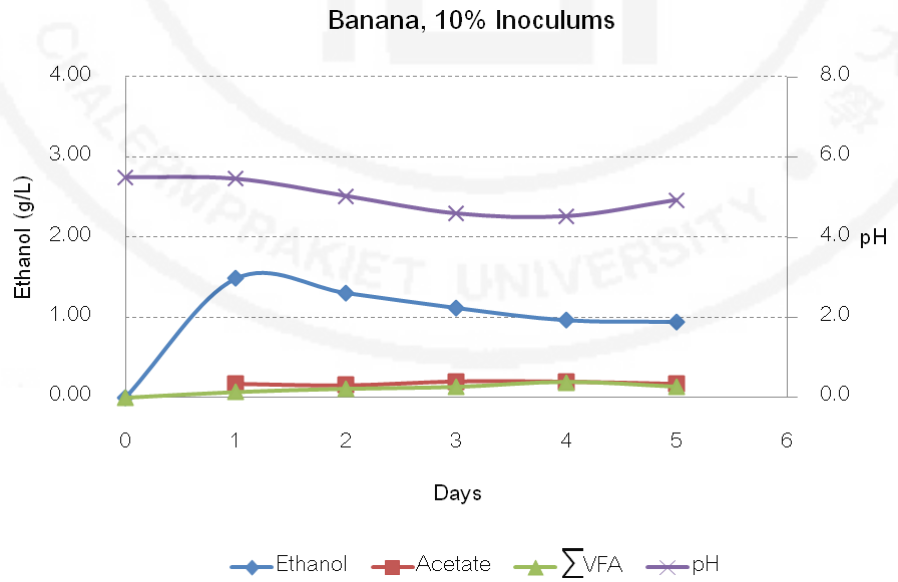
ภาพที่ 14 ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C

สำหรับการทดลองหมักเปลือกกล้วยแบบต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40° เป็นระยะเวลาทั้งหมด 5 วัน พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลต่ำกว่าการหมักเปลือกส้มโอที่สภาวะเดียวกัน โดยมีปริมาณเอทานอลสูงสุดเพียง 1.18 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน และมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 4.64-5.65 (ภาพที่ 15)

ผลการหมักเปลือกกล้วยที่อุณหภูมิการหมักเดียวกัน โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 1.49 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 4.52-5.50 (ภาพที่ 16)

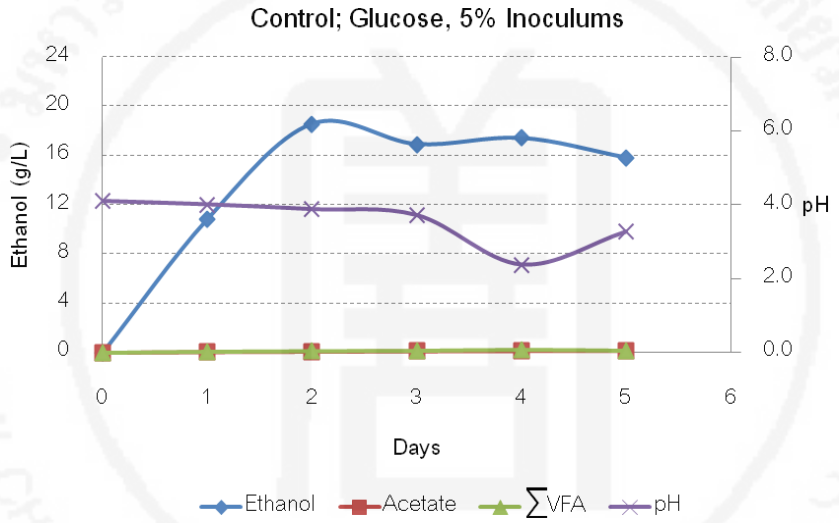


ภาพที่ 15 ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C

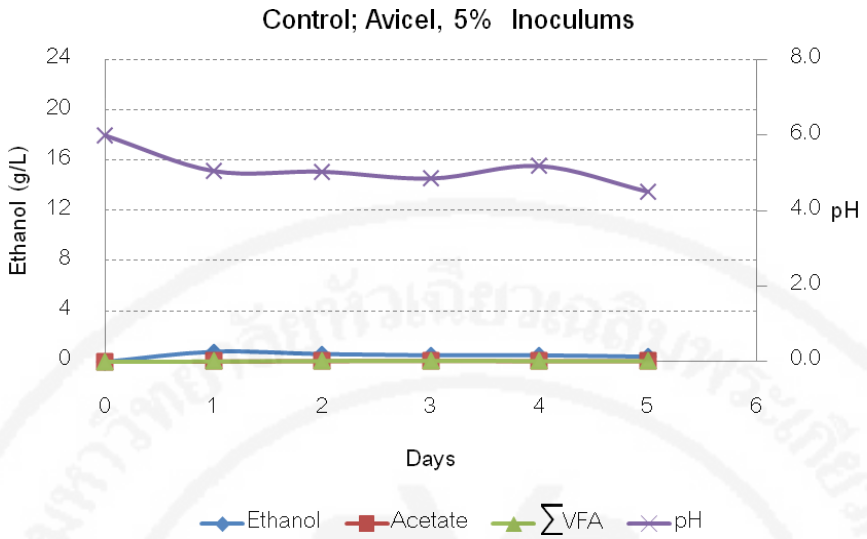


ภาพที่ 16 ปริมาณเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C

สำหรับชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสและเซลลูโลส (Avicel) ในการหมัก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม 2 ชนิดเหมือนกับในชุดทดลองหมักเปลือกส้มโอและเปลือกกล้วย ในปริมาณชนิดละ 5% (w/w) ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40° พบว่า ชุดควบคุมที่ใช้กลูโคส ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 18.58 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 2.38-4.10 (ภาพที่ 17) และในชุดควบคุมที่ใช้เซลลูโลส พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักได้ 1 วัน โดยมีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก ระหว่าง 4.51-6.00 (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 ปริมาณเอทานอลจากการหมักในชุดควบคุม (กลูโคส) โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C

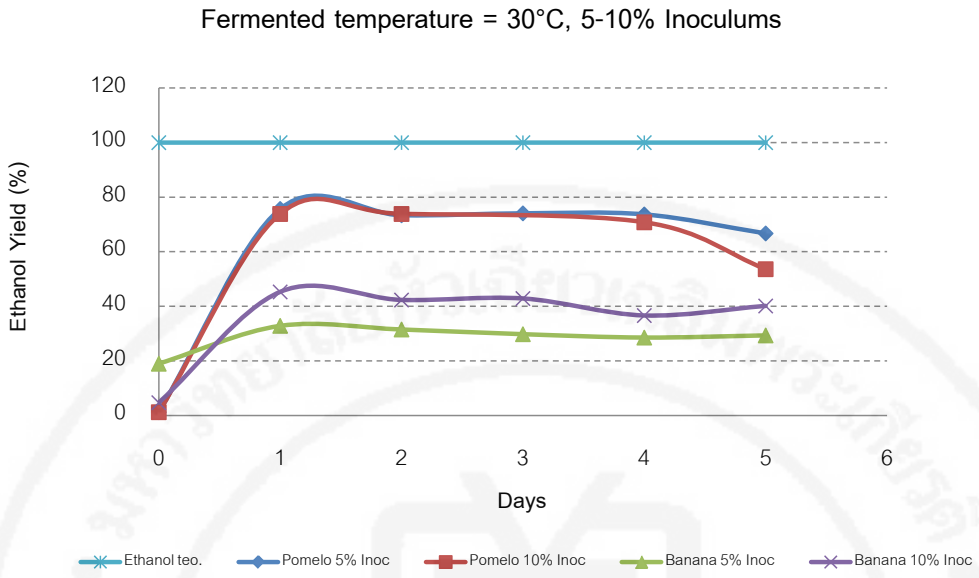


ภาพที่ 18 ปริมาณเอทานอลจากการหมักในชุดควบคุม (Avicel) โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 40°C

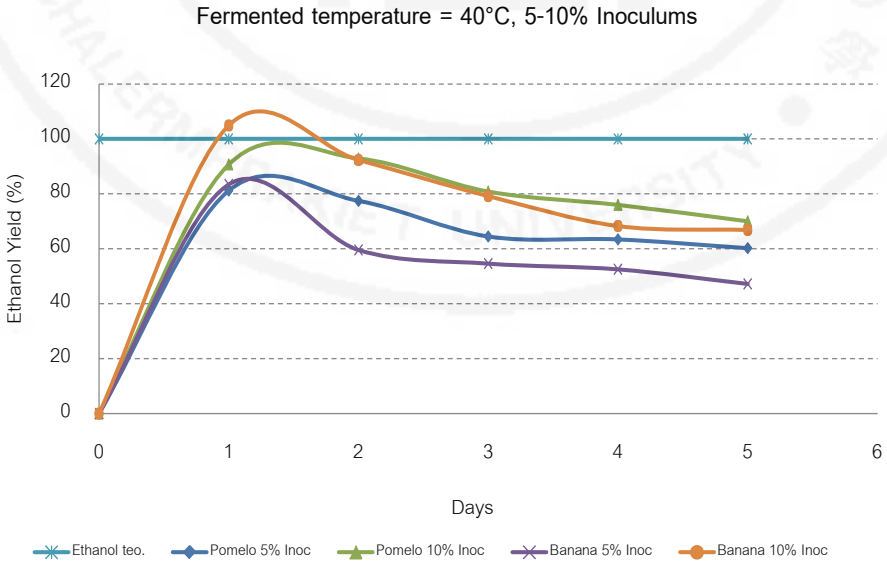
3. ปริมาณผลผลิตของเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

จากการคำนวณ พบว่า การหมักเปลือกส้มโอแบบต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30° เป็นระยะเวลา 1 วัน ได้ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 75.70% และ 73.86% และเมื่อทำการหมักภายใต้อุณหภูมิการหมักที่สูงขึ้น เป็น 40° พบว่า ได้ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 81.17% และ 90.71% (เพิ่มเป็น 92.91% หลังจากหมักต่ออีก 1 วัน) ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

สำหรับการหมักเปลือกกล้วยแบบต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อราร่วมทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิการหมัก 30° เป็นระยะเวลา 1 วัน พบว่า ได้ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการหมักเปลือกส้มโอ โดยมีค่าเพียง 32.88% และ 45.29% อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการหมักภายใต้อุณหภูมิการหมักที่สูงขึ้น เป็น 40° พบว่า ได้ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 83.43% และ 104.90% ตามลำดับ (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 19 ปริมาณผลผลิตของเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C

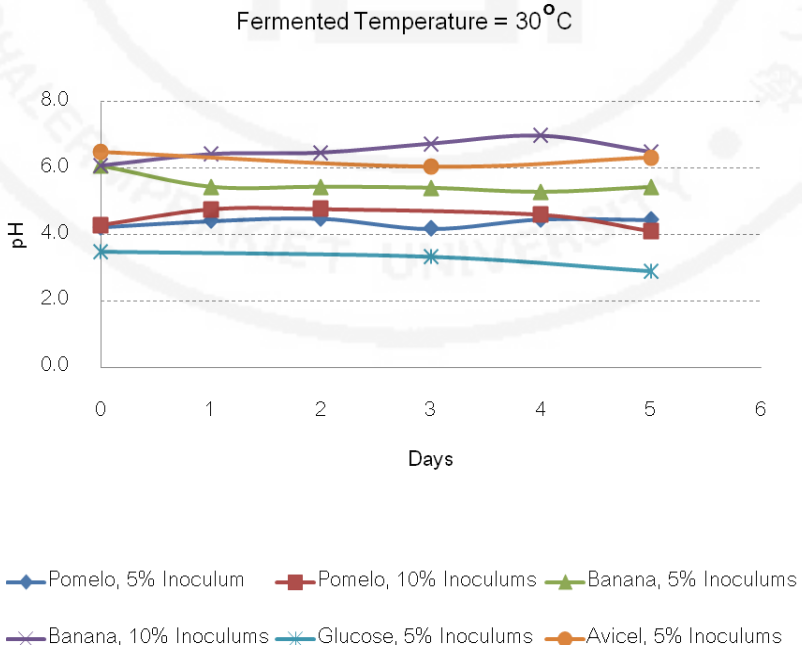


ภาพที่ 20 ปริมาณผลผลิตของเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C

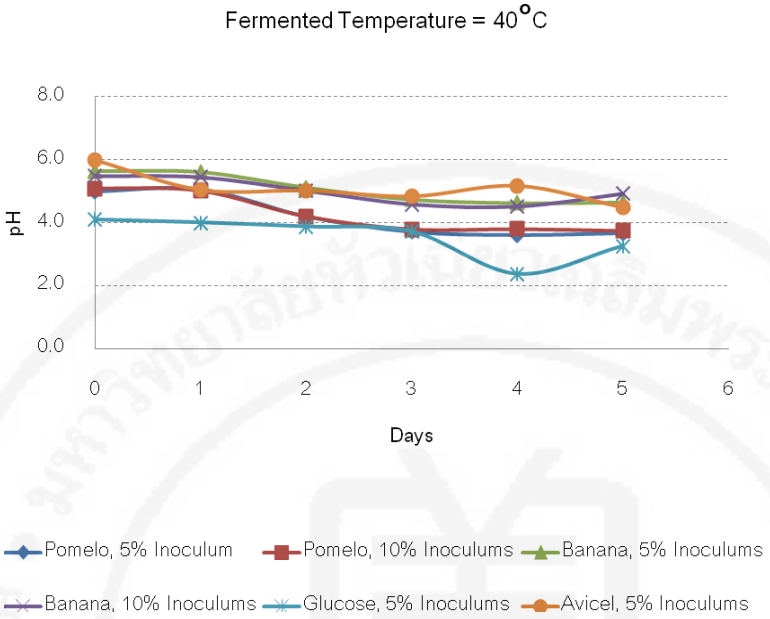
4.2.4 ค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก

ในการหมักเปลือกส้มโอที่อุณหภูมิการหมัก 30°C โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม 2 ขนิดๆ ละ 5% (w/w) และ 10% (w/w) พบว่า ค่าพีเอชในชุดทดลองที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมในปริมาณที่น้อยกว่า 5% (w/w) มีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมักต่ำกว่า โดยค่าพีเอชในระหว่างการหมักเปลือกส้มโอ มีค่าต่ำกว่าในระหว่างการหมักเปลือกกล้วย นอกจากนี้ ยังพบว่าค่าพีเอชระหว่างการหมักในชุดควบคุมที่ใช้กลูโคส มีค่าต่ำที่สุด (2.89-3.50) ส่วนในชุดควบคุมที่ใช้เซลลูโลส มีค่าพีเอชสูงกว่า โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.07-6.50 (ภาพที่ 21)

อย่างไรก็ตาม ในการหมักเปลือกส้มโอที่อุณหภูมิการหมัก 40°C โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม 2 ชนิดในปริมาณที่ต่างกัน พบว่า ค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมัก มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งในชุดทดลองหมักเปลือกกล้วยก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน โดยชุดทดลองหมักเปลือกกล้วย มีค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมักสูงกว่าชุดทดลองหมักเปลือกส้มโอ สำหรับค่าพีเอชระหว่างการหมักในชุดควบคุมที่ใช้กลูโคส มีค่าต่ำที่สุดเช่นเดียวกับในการทดลองหมักที่อุณหภูมิ 30°C โดยมีค่าระหว่าง 2.38-4.10 ส่วนในชุดควบคุมที่ใช้เซลลูโลส มีค่าพีเอชสูงกว่าเช่นกัน โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 4.51-6.00 (ภาพที่ 22)



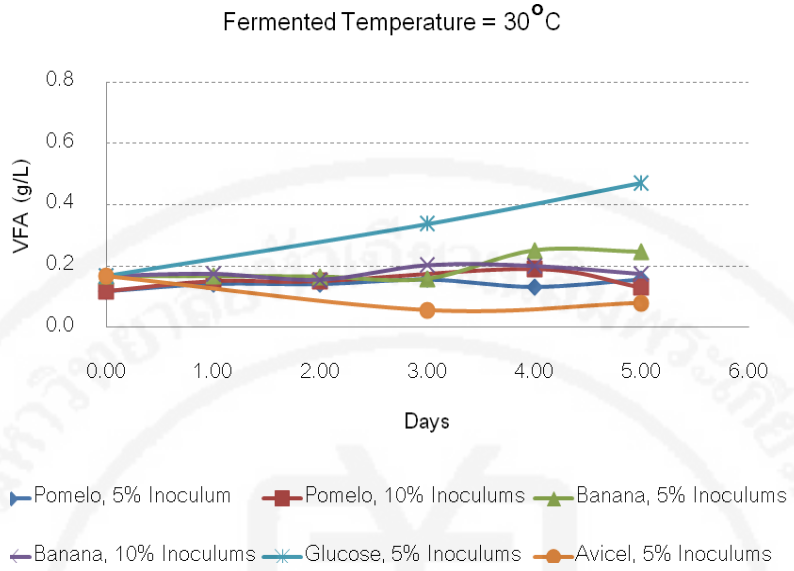
ภาพที่ 21 ค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (อุณหภูมิการหมัก = 30°C)



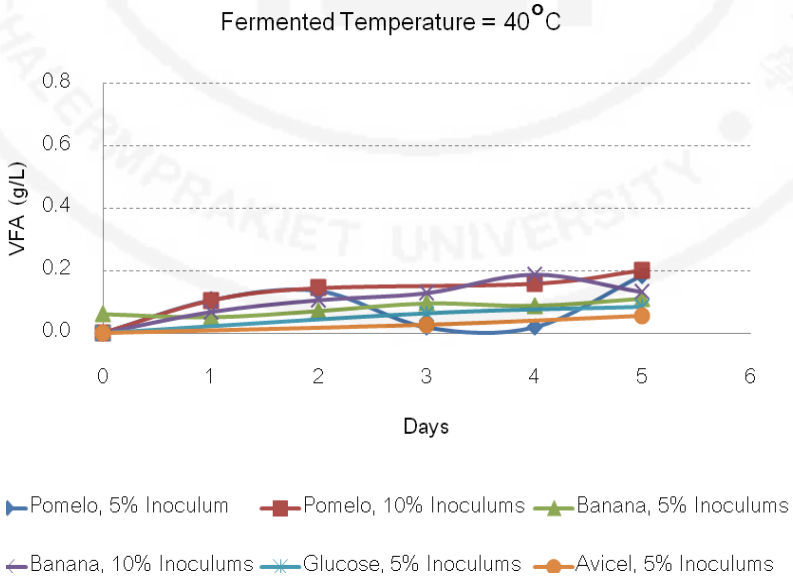
ภาพที่ 22 ค่าพีเอชตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (อุณหภูมิการหมัก = 40°C)

5. ปริมาณกรดไขมันระเหยตลอดระยะเวลาการหมัก

ในระหว่างการหมักภายใต้อุณหภูมิ 30°C และ 40°C มีปริมาณกรดไขมันระเหยเกิดขึ้นระหว่าง 0.12-0.25 และ 0.00-0.22 กรัมต่อลิตร โดยพบว่า เปลือกส้มโอและเปลือกกล้วยที่ใช้สำหรับชุดทดลองภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C มีปริมาณกรดไขมันระเหยเริ่มต้นอยู่แล้วส่วนหนึ่ง ส่วนในชุดทดลองภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C มีเพียงเปลือกกล้วยที่ตรวจพบกรดไขมันระเหยเริ่มต้นในปริมาณ 0.06 กรัมต่อลิตร และในชุดควบคุม (กลูโคสและเซลลูโลส) มีปริมาณกรดไขมันระเหยเกิดขึ้นระหว่าง 0.17-0.47, 0.06-0.17 กรัมต่อลิตร และ 0.00-0.14, 0.00-0.07 กรัมต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C และ 40°C ตามลำดับ (ภาพที่ 23 และ 24)



ภาพที่ 23 ปริมาณกรดไขมันระเหยตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (อุณหภูมิการหมัก = 30°C)



ภาพที่ 24 ปริมาณกรดไขมันระเหยตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (อุณหภูมิการหมัก = 40°C)

6. สมดุลมวลจากกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง

จากการคำนวณสมดุลมวลจากกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง โดยใช้สมการการหมักเอทานอล (สมการที่ 2) พบว่า ปริมาณผลผลิตของเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอและเปลือกกล้วย ควรมีค่าเท่ากับ 6.15 g/L และ 2.82 g/L ในขณะที่ปริมาณผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากการทดลองภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C มีค่าเท่ากับ 2.07 g/L และ 2.02 g/L สำหรับชุดทดลองหมักเอทานอลจากเปลือกส้มโอที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% และมีค่าเท่ากับ 0.23 g/L และ 0.32 g/L สำหรับชุดทดลองหมักเอทานอลจากเปลือกกล้วยที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% ตามลำดับ โดยในระหว่างการหมัก เชื้อราและเชื้อยีสต์มีการใช้สารอาหาร (กลูโคส) เพื่อการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์ (Internal utilization) ในปริมาณ 0.3, 0.3 และ 0.27 g/g substrate สำหรับชุดควบคุม (กลูโคส) และชุดทดลองหมักเปลือกส้มโอและเปลือกกล้วย ตามลำดับ โดยผลผลิตที่ได้จากการหมักเอทานอลที่คำนวณได้ (Production yield without internal utilization) จากเปลือกส้มโอ มีค่าสูงกว่าเปลือกกล้วย (33.65% และ 32.84% สำหรับชุดทดลองหมักที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10%) ในขณะที่ผลผลิตที่ได้จากการหมักเปลือกกล้วย มีค่าต่ำเพียง 8.15% และ 11.34% สำหรับชุดทดลองหมักที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% (ตารางที่ 4)

ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้จากการทดลอง มีค่าเท่ากับ 2.43 g/L และ 2.79 g/L สำหรับชุดทดลองหมักเอทานอลจากเปลือกส้มโอที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% และมีค่าเท่ากับ 1.18 g/L และ 1.49 g/L สำหรับชุดทดลองหมักเอทานอลจากเปลือกกล้วยที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% ตามลำดับ โดยเชื้อราและเชื้อยีสต์มีการใช้สารอาหาร (กลูโคส) เพื่อการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์ (Internal utilization) ในปริมาณ 0.27 g/g substrate ในทุกชุดการทดลอง ซึ่งผลผลิตที่ได้จากการหมักเอทานอลที่คำนวณได้ (Production yield without internal utilization) จากเปลือกส้มโอ มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการหมักเปลือกกล้วย โดยมีค่าเท่ากับ 39.50% และ 45.35% สำหรับชุดทดลองหมักที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% และผลผลิตที่ได้จากการหมักเปลือกกล้วย มีค่าเท่ากับ 41.81% และ 52.79% สำหรับชุดทดลองหมักที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% (5% Inoc. และ 10% Inoc.) (ตารางที่ 5)

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2 \qquad (2)$$

นอกจากนี้ ยังพบว่า ประสิทธิภาพของกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องของทุกชุดทดลอง มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิการหมักสูงขึ้นเป็น 40°C โดยมีค่าเท่ากับ 92.35%, 70.83 และ 78.62% สำหรับชุดควบคุม ชุดทดลองหมักโดยใช้เปลือกส้มโอ และชุดทดลองหมักโดยใช้เปลือกกล้วย ตามลำดับ (ภาพที่ 25 ถึง ภาพที่ 27)

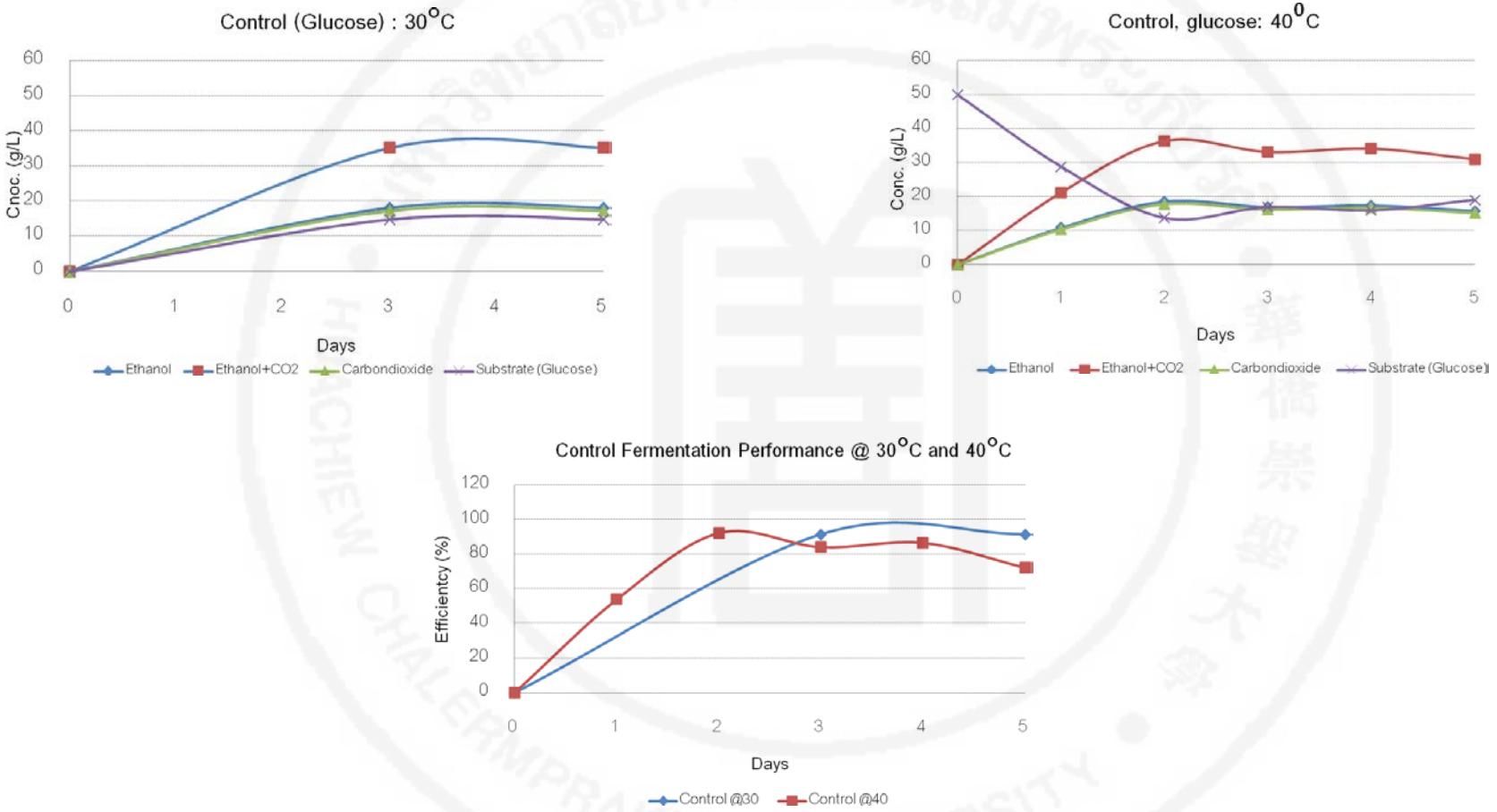
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ตารางที่ 4 สมดุลมวลจากกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C

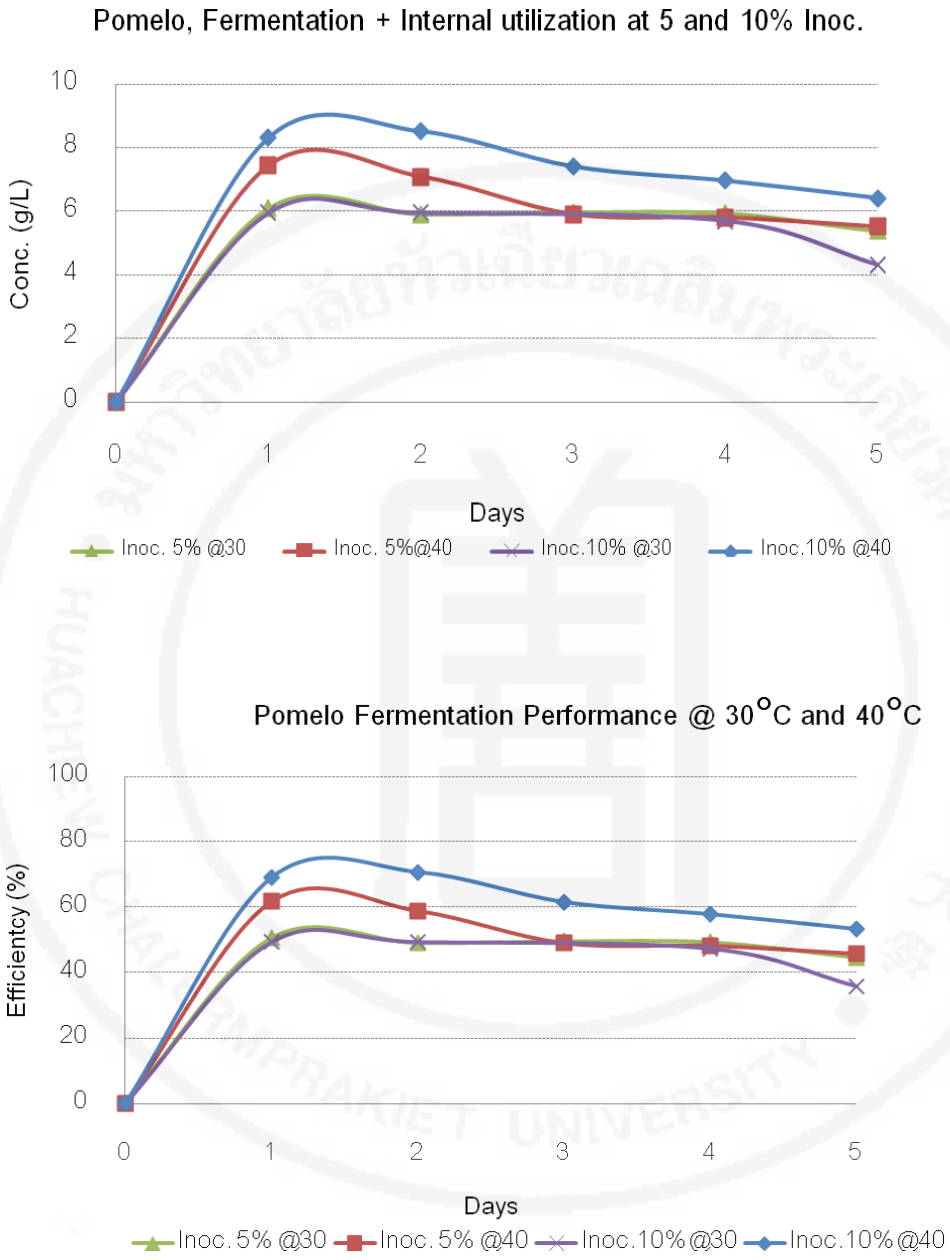
พารามิเตอร์	ชุดควบคุม (กลูโคส)	เปลือกกล้วย		เปลือกส้มโอ	
		5% Inoc.	10% Inoc.	5% Inoc.	10% Inoc.
Substrate load (g/L)	50.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Volatile Solid (%)	100.00	10.07	10.07	22.58	22.58
Specific org. load (g/L)	50.00	10.07	10.07	22.58	22.58
Fermentable sugar (%)	100.00	54.80	54.80	53.27	53.27
Specific fermentable sugar (g/L)	50.00	5.52	5.52	12.03	12.03
Theoretical ethanol yield (g/L)	25.57	2.82	2.82	6.15	6.15
Internal uptake by control factor	14.79	2.72	2.72	6.77	6.77
Control corrected substrate	35.21	7.35	7.35	15.81	15.81
Specific fermentable sugar (g/L)	35.21	2.80	2.80	5.25	5.25
Control corrected ethanol yield g/L	18.01	1.43	1.43	2.69	2.69
Practical Experimental Ethanol yield (g/L)	18.00	0.23	0.32	2.07	2.02
Practical carbon dioxide yield (g/L).	17.21	0.22	0.31	1.98	1.93
Lost in internal utilization (g/50g @ control)	14.79	5.07	4.89	7.98	8.08
Internal utilization (g/g substrate)	0.30	0.27	0.27	0.30	0.30
Production efficiency (%)	99.96	16.06	22.35	77.03	75.17
Production yield without internal utilization (%)	70.39	8.15	11.34	33.65	32.84

ตารางที่ 5 สมดุลมวลจากกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C

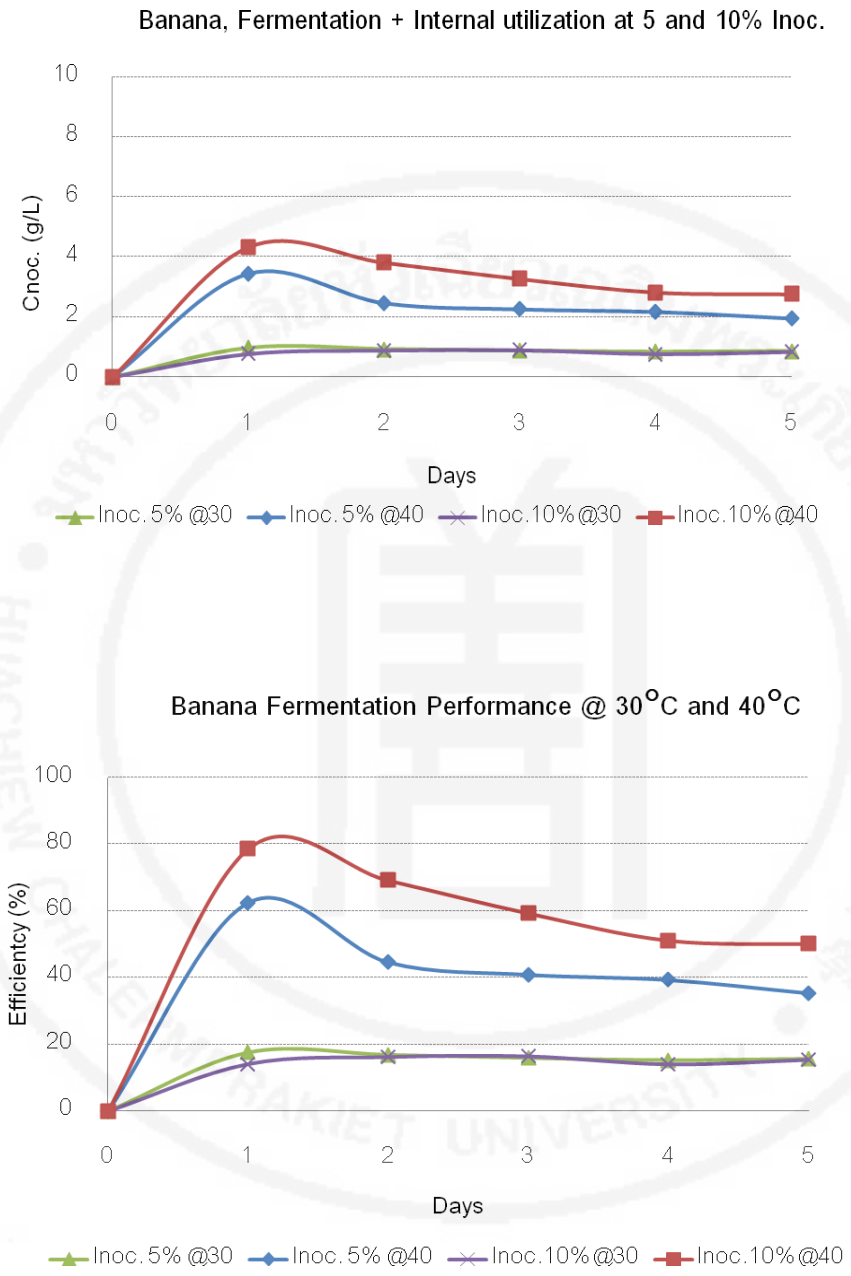
พารามิเตอร์	ชุดควบคุม (กลูโคส)	เปลือกกล้วย		เปลือกส้มโอ	
		5% Inoc.	10% Inoc.	5% Inoc.	10% Inoc.
Substrate load (g/L)	50.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Volatile Solid (%)	100.00	10.07	10.07	22.58	22.58
Specific org. load (g/L)	50.00	10.07	10.07	22.58	22.58
Fermentable sugar (%)	100.00	54.80	54.80	53.27	53.27
Specific fermentable sugar (g/L)	50.00	5.52	5.52	12.03	12.03
Theoretical ethanol yield (g/L)	25.57	2.82	2.82	6.15	6.15
Internal uptake by control factor	13.66	2.72	2.72	6.10	6.10
Control corrected substrate	36.34	7.35	7.35	16.48	16.48
Specific fermentable sugar (g/L)	36.34	2.80	2.80	5.93	5.93
Control corrected ethanol yield g/L	18.59	1.43	1.43	3.03	3.03
Practical Experimental Ethanol yield (g/L)	18.58	1.18	1.49	2.43	2.79
Practical carbon dioxide yield (g/L).	17.76	1.13	1.42	2.32	2.67
Lost in internal utilization (g/50g @ control)	13.66	3.21	2.60	7.28	6.57
Internal utilization (g/g substrate)	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
Production efficiency (%)	99.96	82.42	104.07	80.10	91.97
Production yield without internal utilization (%)	72.66	41.81	52.79	39.50	45.35



ภาพที่ 25 สมดุลมวลและประสิทธิภาพของกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในชุดควบคุม (กลูโคส)



ภาพที่ 26 สมดุลมวลและประสิทธิภาพของกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง โดยใช้เปลือกส้มโอ ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C และ 40°C

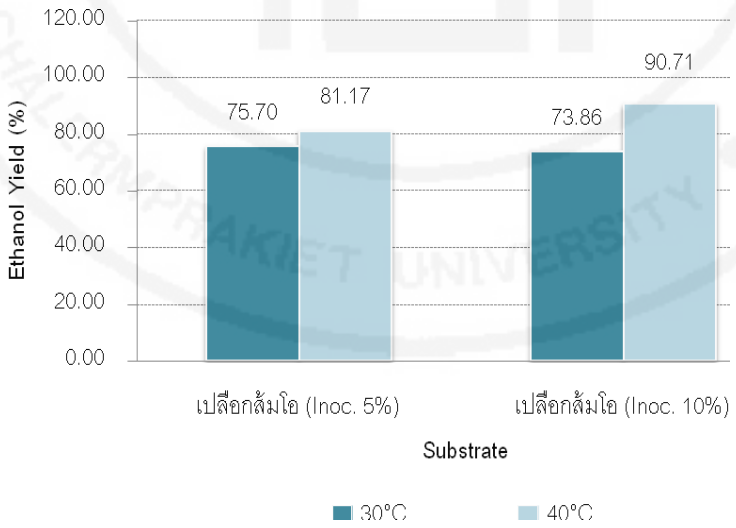


ภาพที่ 27 สมดุลมวลและประสิทธิภาพของกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง โดยใช้เปลือกกล้วย ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C และ 40°C

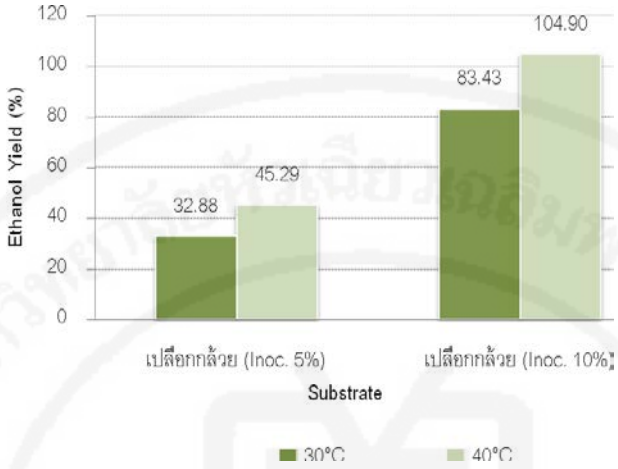
ผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตของเอทานอลจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่องโดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์

จากการทดลองหมักเอทานอลจากเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์ ชนิดละ 5% และ 10% ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C และ 40°C พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการหมัก ปริมาณผลผลิตของเอทานอล มีค่าสูงขึ้น โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 75.70% เป็น 81.17% และจาก 73.86% เป็น 90.71% สำหรับการหมักเปลือกส้มโอเป็นระยะเวลา 1 วัน (ภาพที่ 28) และมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 32.88% เป็น 45.29% และจาก 83.43% เป็น 104.90% สำหรับการหมักเปลือกกล้วยในระยะเวลาการหมักเดียวกัน (ภาพที่ 29)

นอกจากนี้ จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Paired Samples Test) พบว่า อุณหภูมิการหมัก มีผลต่อปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์ ชนิดละ 5% และ 10% โดยพบว่า ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้จากการหมักเปลือกส้มโอและเปลือกกล้วย ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากการหมักภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p=0.034) (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 28 ผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตของเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอแบบต่อเนื่องโดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์



ภาพที่ 29 ผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตของเอทานอลจากการหมักเปลือกกล้วยแบบต่อเนื่องโดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์

ตารางที่ 6 ความแตกต่างของปริมาณผลผลิตของเอทานอลจากการหมักเปลือกส้มโอและเปลือกกล้วยแบบต่อเนื่องฯ ภายใต้อุณหภูมิการหมักที่แตกต่างกัน

สับสเตรต	อุณหภูมิการหมัก		Paired Samples Correlations	
	30°C	40°C	Correlation	Sig.
เปลือกส้มโอ (Inoc. 5%)	75.70	81.17	0.966	0.034
เปลือกส้มโอ (Inoc. 10%)	73.86	90.71		
เปลือกกล้วย (Inoc. 5%)	32.88	45.29		
เปลือกกล้วย (Inoc. 10%)	83.43	104.90		

หมายเหตุ : ระยะเวลาการหมัก 1 วัน

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาเพื่อเพิ่มศักยภาพของเศษของเสียจากผลไม้ ให้เป็นสับสเตรตคุณภาพสูง สำหรับใช้ประโยชน์ในกระบวนการทางชีววิทยาเพื่อการผลิตเอทานอล โดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สรุปได้ดังนี้

สรุปผลการวิจัย

1. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1 เพื่อศึกษาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่องโดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์

1.2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้โดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง ใช้เศษของเสียจากผลไม้ ได้แก่ เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ ครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียม/ถ่ายเชื้อราและเชื้อยีสต์ ชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสับสเตรตเพื่อใช้ในการหมัก ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บและเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และชุดเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสับสเตรตและปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมัก

2.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล เก็บข้อมูลจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ 3 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 ข้อมูลส่วนประกอบของเศษของเสียจากผลไม้ (เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย)

ส่วนที่ 2 ข้อมูลปริมาณเอทานอลจากกระบวนการหมักฯ

ส่วนที่ 3 ข้อมูลผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักฯ ที่อุณหภูมิการหมัก 30 ºC และ 40ºC

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าร้อยละ และทดสอบสมมติฐานของการวิจัยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

3. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้แบบต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) มีค่าดังนี้

1) หมักโดยใช้เปลือกส้มโอ ที่อุณหภูมิการหมัก 30° ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 2.07 และ 2.02 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาการหมัก 1 วัน สำหรับชุดทดลองที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) ตามลำดับ

2) หมักโดยใช้เปลือกส้มโอ ที่อุณหภูมิการหมัก 40° ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 2.43 และ 2.72 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาการหมัก 1 วัน (เพิ่มเป็น 2.79 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักต่ออีก 1 วัน) สำหรับชุดทดลองที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) ตามลำดับ

3) หมักโดยใช้เปลือกกล้วย ที่อุณหภูมิการหมัก 30° ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 0.23 และ 0.32 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาการหมัก 1 วัน สำหรับชุดทดลองที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) ตามลำดับ

4) หมักโดยใช้เปลือกกล้วย ที่อุณหภูมิการหมัก 40° ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 1.18 และ 1.49 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาการหมัก 1 วัน สำหรับชุดทดลองที่ใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ชนิดละ 5% และ 10% (w/w) ตามลำดับ

3.2 อุณหภูมิการหมักมีต่อผลผลิตสูงสุดของเอทานอลจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้โดยเชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์ ดังนี้

1) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการหมักจาก 30° เป็น 40°C โดยมีระยะเวลาการหมัก 1 วัน พบว่า ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอล มีค่าสูงขึ้น โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 75.70% เป็น 81.17% และจาก 73.86% เป็น 90.71% สำหรับการหมักเปลือกส้มโอ และมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 32.88% เป็น 45.29% และจาก 83.43% เป็น 104.90% สำหรับการหมักเปลือกกล้วย

2) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ สรุปได้ว่า อุณหภูมิการหมัก มีผลต่อปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักฯ โดยพบว่า ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้จากการหมักเปลือกส้มโอและเปลือกกล้วย เป็นระยะเวลา 1 วัน ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากการหมักภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

อภิปรายผล

1. ส่วนประกอบของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักเอทานอล

จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักเอทานอล พบว่า เปลือกส้มโอมีค่าพีเอช ปริมาณเถ้าและความชื้น ต่ำกว่าเปลือกกล้วย แต่มีปริมาณของแข็งในรูปของของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยสูงกว่า รวมทั้ง มีปริมาณซีโอดี และน้ำตาล เป็นส่วนประกอบในปริมาณที่สูงกว่าเปลือกกล้วย ในขณะที่พบว่า ปริมาณทีเคเอ็นมีค่าต่ำกว่า ซึ่งส่วนประกอบของสับสเตรตเหล่านี้ โดยเฉพาะปริมาณน้ำตาล เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์สายพันธ์ต่างๆ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งนิยมใช้ในการหมักเอทานอลเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม (Phukoetphim, N. et.al. 2017) ซึ่งในทางทฤษฎี น้ำตาลกลูโคส 1 โมล จะถูกเปลี่ยนเป็นผลผลิตเอทานอล 2 โมล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมล ดังนั้น เปลือกส้มโอที่มีปริมาณน้ำตาลเป็นส่วนประกอบสูงกว่า จึงสามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้สูงกว่าเปลือกกล้วย

นอกจากนี้ การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสับสเตรตในรูปของปริมาณของแข็งทั้งหมด ยังสามารถใช้ในการประเมินปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล ที่จะได้จากขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) และขั้นตอนการหมัก (Fermentation) ได้ในเบื้องต้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว ปริมาณของแข็งที่เป็นส่วนประกอบของสับสเตรตที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล ก่อนที่จะเข้าสู่ขั้นตอนการหมัก อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 10-20 (w/w) และอาจเพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 40 ภายใต้สภาวะการหมักที่แตกต่างกัน โดยจากผลการศึกษาของ Kadhum, H.J. et.al. (2017) พบว่า ปริมาณของแข็งร้อยละ 45 ถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสและเอทานอล ในปริมาณ 205$\pm$25.8 g/L และ 115.9$\pm$6.37 g/L หลังจากผ่านขั้นตอนการย่อยและการหมัก เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เปลือกส้มโอ มีปริมาณของแข็งในรูปของของแข็งทั้งหมดสูงกว่าเปลือกกล้วย (237.07 หรือร้อยละ 23.7 และ 120.53 หรือร้อยละ12.05) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองหมักเปลือกส้มโอ ที่มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการหมักเปลือกกล้วยเช่นกัน

ทั้งนี้ ในการทดลองครั้งนี้ ใช้การเตรียม/ปรับสภาพสับสเตรตทางกายภาพ โดยการหั่นเพียงอย่างเดียว เพื่อทำให้ส่วนประกอบของสับสเตรตมีความเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของสับเสตรตที่ใช้ในการหมัก โดยการเตรียม/ปรับสภาพทางกายภาพ เป็นขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก ไม่มีค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับสารเคมี และเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในระดับสเกลที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

2. ปริมาณผลผลิตของเอทานอล (Ethanol Yield, %) จากกระบวนการหมักฯ

ปริมาณผลผลิตสูงสุดของเอทานอลที่ได้จากการหมักฯ ในครั้งนี้ (อุณหภูมิการหมัก 40°C; เชื้อราและเชื้อยีสต์ ชนิดละ 10% ระยะเวลาการหมัก 1 วัน เท่ากับ 90.71% และ 104.90%) มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Widmer, W. et.al. (2010) (76-94%) แต่มีค่าสูงกว่าปริมาณผลผลิตที่ได้จากการศึกษาของ Jung, Y.H. et.al. (2013) (87.5%) โดยสับสเตรตที่ใช้ในการหมักครั้งนี้ ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพเช่นเดียวกับในงานวิจัยทั้ง 2 เรื่องดังกล่าว แต่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม 2 ชนิด คือ เชื้อรา *Aspergillus niger* และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในขณะที่งานวิจัยดังกล่าวใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* เพียงชนิดเดียว ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การใช้เชื้อราร่วมกับเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมัก มีส่วนช่วยในการปลดปล่อยน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลในครั้งนี้ โดยเชื้อราจะทำปฏิกิริยากับสับสเตรตที่ใช้หมัก ทำให้ได้น้ำตาล จากนั้นเชื้อยีสต์จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลที่ได้ และเกิดปฏิกิริยาได้เป็นผลผลิตของเอทานอล ซึ่งจากผลการวิจัยของ Izmirlioglu, G. and Demirci, A. (2016) มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมเช่นเดียวกับในงานวิจัยครั้งนี้ (*Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae*) ในการผลิตเอทานอลจากเศษมันฝรั่งภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C และมีการเติมแร่ธาตุสำหรับช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว โดยพบว่า เมื่อทำการหมัก 120 ชั่วโมง ได้ปริมาณผลผลิตของเอทานอล เท่ากับ 0.38 g ethanol/g starch และเมื่อทำการหมักในถังปฏิกรณ์แบบฟิล์มตรึง (Biofilm) โดยใช้อุณหภูมิการหมักที่สูงขึ้น (35°C) พบว่า ได้ผลผลิตของเอทานอลสูงขึ้นเป็น 0.41 g ethanol/g starch ใช้ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง (Izmirlioglu, G. and Demirci, A. 2017)

จากการคำนวณสมดุลมวลที่เกิดขึ้นในการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง โดยใช้สมการการหมักเอทานอล (สมการที่ 3) พบว่า ในชุดควบคุม (กลูโคส) ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C ให้ผลการทดลองที่ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก ที่สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wang, D. et.al. (2004) ซึ่งมีการเสนอแบบจำลองสำหรับคาดการณ์ปริมาณการใช้น้ำตาลประเภทต่างๆ (กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส) เพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอทานอลจากการหมัก โดยพบว่าภายใต้ระยะเวลาการหมัก 50 ชั่วโมง จะมีการเจริญเติบโตของมวลจุลินทรีย์ 7 g/L เกิดผลผลิตเอทานอล 38 g/L (จากกลูโคส 215 g/L) คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 18% เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้ พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเมื่อทำการหมักได้ 48 ชั่วโมง มีการใช้กลูโคสเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ 10 g/L และเกิดผลผลิตเอทานอล 18.58 g/L (จากกลูโคส 50 g/L) คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 72.66%

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + \text{ความร้อน} \quad (3)$$

จากข้อมูลการคำนวณสมดุลมวลจากกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยเฉพาะภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C พบว่า ในชุดควบคุม (กลูโคส) จะมีการใช้กลูโคสเพื่อการสร้างและเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์และเชื้อรา ในปริมาณ 9.85 g/L โดยในการคำนวณพิจารณาจากปริมาณผลผลิตเอทานอลที่หายไปจากสมดุลมวล และปริมาณกลูโคสทั้งหมดที่ถูกใช้และเปลี่ยนเป็นเอทานอล มีค่าเท่ากับ 46.18 g/L คิดเป็น 92.36% ให้ผลผลิตเอทานอล 18.6 g/L ซึ่งเทียบได้กับปริมาณกลูโคส 36.4 g โดยปริมาณกลูโคสที่หายไป มีค่าเท่ากับ 13.6 g (ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น เท่ากับ 50 g/L) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวนี้ ชี้ให้เห็นว่า สำหรับการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องตามรูปแบบและสภาวะการหมักเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ จะมีปริมาณกลูโคสที่ถูกใช้ไป 13.6 g นอกจากนี้ ยังพบว่า ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C ปริมาณกลูโคสที่ถูกใช้ไป มีค่าสูงกว่าที่ถูกใช้ไปในระหว่างการหมักภายใต้อุณหภูมิ 40°C ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพของการหมักภายใต้อุณหภูมิ 40°C มีค่าสูงกว่า

ในการเริ่มต้นทดลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง ภายใต้อุณหภูมิการหมัก 30°C โดยใช้เปลือกกล้วย พบว่า ให้ผลผลิตเอทานอล (Practical Experimental Ethanol yield) ในปริมาณที่ต่ำกว่าค่าที่ควรผลิตได้ตามทฤษฎีการหมัก (ตารางที่ 4) สันนิษฐานเป็น 2 กรณี คือ 1) อาจมีการใช้สารกันรา และสารกันราที่ติดค้างบนเปลือกกล้วยส่งผลยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ในชุดทดลองหมัก หรือ 2) อุณหภูมิในการหมักไม่เหมาะสมสำหรับการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตเอทานอลต่ำ โดยในการทดลองภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C มีการล้างทำความสะอาดเปลือกกล้วยก่อนการเตรียมสำหรับใช้ในชุดทดลอง เพื่อสังเกตประสิทธิภาพของการหมัก และพบว่า ได้ค่าผลผลิตเอทานอลในปริมาณใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎีมากขึ้น ดังนั้นนอกจากอุณหภูมิการหมักที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ร่วม ที่ใช้ในกระบวนการหมักแล้ว การล้างทำความสะอาดสับสเตรตก่อนการเตรียมในขั้นตอนต่อไป ก็เป็นขั้นตอนที่แนะนำเช่นกัน

3. ผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตของเอทานอลจากกระบวนการหมักฯ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักที่มีต่อผลผลิตของเอทานอลจากกระบวนการหมักฯ ชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักมีผลต่ออัตราการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (Azhar, S.H.M. et.al. 2017) รวมทั้งปริมาณผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Souza, C.J.A. et.al. (2012) ที่พบว่า ผลผลิตของเอทานอล มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อใช้อุณหภูมิการหมักที่สูงขึ้น (50°C) โดยอุณหภูมิการหมักสูง มีผลต่อขั้นตอนการย่อยเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิการหมักที่สูงเกินไป จะส่งผลยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักได้เช่นกัน (Azhar, S.H.M. et.al. 2017; Wilkins, M.R. et.al. 2007) นอกจากนี้ สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก จะต้องเป็นสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงดังกล่าวนี้ได้ สำหรับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ (เชื้อยีสต์) ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ (*Saccharomyces cerevisiae*) เหมาะสำหรับการหมักที่อุณหภูมิระหว่าง 30-32°C และสามารถเพิ่มอุณหภูมิการหมักได้สูงขึ้นถึง 45°C (Azhar, S.H.M. et.al. 2017) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ผลผลิตของเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นภายใต้อุณหภูมิการหมัก 40°C และจากผลการศึกษาของ Izmirlioglu, G. and Demirci, A. (2017) ซึ่งใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม (*Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae*) ในการหมักเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ และใช้การหมักแบบต่อเนื่อง (SSF) แต่เป็นการหมักในถังหมัก (Biofilm Reactor) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล มีค่า 35°C ให้ผลผลิตสูงสุดของเอทานอล เท่ากับ 0.41 g Ethanol/g Starch Yield เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาการหมักที่นานกว่าระยะเวลาการหมักที่แนะนำจากการศึกษาในครั้งนี้ (24 ชั่วโมง) ซึ่งโดยทั่วไป ระยะเวลาการหมักที่สั้นเกินไป จะทำให้ได้ผลผลิตจากการหมักไม่เต็มประสิทธิภาพ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเติบโตได้ไม่เต็มที่ ส่วนระยะเวลาการหมักที่นานเกินไป ก็อาจส่งผลยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch Mode) เนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลในน้ำหมักที่มีค่าสูง ดังนั้น หากใช้อุณหภูมิการหมักต่ำก็จำเป็นต้องหมักในระยะเวลานานกว่าการหมักที่ใช้อุณหภูมิการหมักที่สูงกว่า และยังทำให้ได้ปริมาณผลผลิตของเอทานอล (Ethanol Yield) ต่ำกว่าอีกด้วย (Azhar, S.H.M. et.al. 2017)

นอกจากนี้ ในการพิจารณาเชิงเศรษฐศาสตร์ต่อภาพรวมของค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม พบว่า การหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ภายใต้อุณหภูมิการหมักที่สูงขึ้น เป็นทางเลือกที่มีประโยชน์ เนื่องจากสามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนของการหล่อเย็น (Cooling) และประหยัดน้ำที่ใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในภาพรวมของการผลิตเอทานอลลดลง (Murata, M. et.al. 2015) ทั้งนี้ เนื่องจากกระบวนการหมัก เป็นกระบวนการที่อาศัย

ปฏิกิริยาคายความร้อน และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์จะถูกยับยั้งจากความร้อนที่เพิ่มขึ้น ทำให้ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิการหมักตลอดระยะเวลาของการหมัก ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการหมักนั้นๆ ซึ่งค่าใช้จ่ายของการหล่อเย็น (ระบบหล่อเย็น) ในระดับอุตสาหกรรม จัดเป็นต้นทุนการผลิตที่สำคัญ ดังนั้น การใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโต และสามารถผลิตเอทานอลได้ดีภายใต้อุณหภูมิการหมักที่สูงขึ้น (≥35°C) เช่น เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5606 ที่ทดลองใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถเจริญได้ดีภายใต้อุณหภูมิการหมักที่สูงถึง 40°C และให้ผลผลิตเอทานอลในปริมาณสูง เมื่อใช้หมักร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ TISTR 3063 จึงเป็นการช่วยลดต้นทุนของการผลิตในส่วนของพลังงานและน้ำลงได้ดังกล่าวข้างต้น

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะจากผลการวิจัยที่พบและการนำผลการวิจัยไปใช้

สภาวะสำหรับการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยการหมักร่วมของเชื้อรา *Aspergillus niger* และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในครั้งนี้ ได้แก่ อุณหภูมิการหมัก 40°C ระยะเวลาการหมัก 1 วัน โดยใช้เชื้อราและเชื้อยีสต์ ชนิดละ 10% (w/w) สับสเตรตที่นำมาทดลองหมัก แล้วได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า คือ เปลือกส้มโอ

2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

2.1 ควรทดลองทำการปรับสภาพสับสเตรตแบบอื่นๆ ร่วมกับการปรับสภาพทางกายภาพว่าสามารถช่วยให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักสูงขึ้นหรือไม่

2.2 ควรทำการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับการทำให้เอทานอลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่อง มีความบริสุทธิ์และสามารถนำไปใช้งานได้ เพื่อให้เกิดประโยชน์ทั้งในด้านการลดปริมาณกากของเสียและการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บรรณานุกรม

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2559). *คู่มือพัฒนาและการลงทุนผลิตพลังงานทดแทน ชุดที่ 7 เชื้อเพลิงเอทานอล*, เข้าถึงจาก http://webkc.dede.go.th.

รัชดาภรณ์ เบญจวัฒนานนท์. (2552). การศึกษาการผลิตเอทานอลจากหยวกกล้วยโดยยีสต์ด้วยวิธีการหมักแบบกะ. รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย.

สุภาวดี ผลประเสริฐ. (2557). การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22,* 641-649.

Abd-Alla, M.H. and El-Enany, A.E. (2012). Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm (Phoenix dactylifera L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. *Biomass and Bioenergy, 42,* 172-178.

Achinas, S. and Euverink, G.J.W. (2016). Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology, 23,* 44-53.

APHA. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (20 th.ed.). Bultimore: United Book Press.

Azhar, S.H.M., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Faik, A.A.M. and Rodrigues, K.F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports, 10,* 52-61.

Bello, R.H., Linzmeyer, P., Franco, C.M.B., Souza, O., Sellin, N., Medeiros, S.H.W. and Marangoni, C. (2014). Pervaporation of ethanol produced from banana waste. *Waste Management, 34,* 1501-1509.

Carrillo-Nieves, D., Ruiz, H. A., Aguilar, C.N., Ilyina, A., Parra-Saldivar, R., Torres, J. A. and Hernández, J.L.M. (2017). Process alternatives for bioethanol production from mango stem bark residues. *Bioresource Technology, 239*, 430-436.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Choonut, A., Saejong, M. and Sangkharak, K. (2014). The production of ethanol and hydrogen from pineapple peel by *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterobacter aerogenes*. *Energy Procedia, 52,* 242-249.

Dahnum, D., Tasum, S.O., Triwahyuni, E., Nurdin, M. and Abimanyu, H. (2015). Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. *Energy Procedia, 68,* 107-116.

Gabhane, J., Prince William, S.P.M., Gadhe, A., Rath, R., Vaidya, A.N. and Wate, S. (2014). Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. *Waste Management, 34,* 498-503.

Garcia, A., Cara, C., Moya, M., Rapado, J., Puls, J., Castro, E. and Martin, C. (2014). Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* fruit shells for ethanol production. *Industrial Crops and Products, 53,* 148-153.

Germec, M., Turhan, I., Karhan, M. and Demirci, A. (2015). Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *Fuel, 161,* 304-311.

Izmirlioglu, G. and Demirci, A. (2016). Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization. *Fuel, 185,* 684-691.

Izmirlioglu, G. and Demirci, A. (2017). Simultaneous saccharification and fermentation of ethanol from potato waste by co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *Fuel, 202,* 260-270.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Jung, Y.H., Kim, I.J., Kim, H.K. and Kim, K.H. (2013). Dilute acid pretreatment of lignocelluloses for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresource Technology, 132,* 109-114.

Jung, Y.H., Kim, I.J., Han, J-I., Choi, I-G. and Kim, K.H. (2011). Aqueous ammonia pretreatment of oil palm empty fruit bunches for ethanol production. *Bioresource Technology, 102,* 9806-9809.

Kadhum, H.J., Rajendran, K. and Murthy, G.S. (2017). Effect of solids loading on ethanol production: Experimental, economic and environmental analysis. *Bioresource Technology, 244,* 108-116.

Kim, J.H., Lee, J.C. and Pak, D. (2011). Feasibility of producing ethanol from food waste. *Waste Management, 31,* 2121-2125.

Murata, M., Nitiyon, S., Lertwattanasakul, N., Sootsuwan, K., Kosaka, T., Thanonkeo, P., Limtong, S. and Yamada, M. (2015). High-temperature fermentation technology for low-cost bioethanol. *Journal of the Japan Institute of Energy, 94,* 1154-1162.

Oberoi, H.S., Vadlani, P.V., Nanjundaswamy, A., Bansal, S., Singh, S., Kaur, S. and Babbar, N. (2011). Enhanced ethanol production from Kinnow mandarin (Citrus reticulata) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. *Bioresource Technology, 102,* 1593-1601.

Piarpuzan, D., Quintero, J.A. and Cardona, C.A. (2011). Empty fruit bunches from oil palm as a potential raw material for fuel ethanol production. *Biomass and Bioenergy, 35,* 1130-1137.

Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P. and Laopaiboon, L. (2017). Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes. *Biotechnology, 26,* 84-92.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Saha, P., Baishnab, A.C., Alam, F., Khan, M.R. and Islam, A. (2014). Production of bio-fuel (bio-ethanol) from biomass (pteris) by fermentation process with yeast. *Procedia Engineering, 90,* 504-509.

Santi, G., Crognale, S., Annibale, A.D., Petruccioli, M., Ruzzi, M. and Valentini, R. (2014). Orange peel pretreatment in a novel lab-scale direct steam-injection apparatus for ethanol production. *Biomass and Bioenergy, 61,* 146-156.

Souza, C.J.A., Costa, D.A., Rodrigues, M.Q.R.B., Santos, A. F., Lopes, M.R., Abrantes, A. B.P., Costa, P.S, Silveira, W. B., Passos, F.M.L. and Fietto, L.G. (2012). The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology, 109,* 63-69.

Tang, Y-Q., Koike, Y., Liu, K., An, M-Z., Morimura, S., Wu, X-L. and Kida, K. (2008). Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Biomass and Bioenergy, 32,* 1037-1045.

U.S. Department of Energy. (2016). *Alternative Fuels Data Center,* 31 May 2016, http://www.afdc.energy.gov/fuels/ethanol_fuel_basics.html.

Wang, D., Xu, Y., Hu, J. and Zhao, G. (2004). Fermentation Kinetics of Different Sugars by Apple Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae. Journal of the institute of brewing, 110,* 340-346.

Wei-Chuan, C., Yin-Chen, L., Ya-Lian, C., I-Ming, C., Shen-Long, T., Chi-Wei, L.J., Yu-Kaung, C. and Yu-Hong, W. (2017). Producing bioethanol from pretreated-wood dust by simultaneous saccharification and co- fermentation process. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 79,* 43-48.

Widmer, W., Zhou, W. and Grohmann, K. (2010). Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology, 101,* 5242-5249.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Wilkins, M.R., Widmer, W.W. and Grohmann, K. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry, 42,* 1614-1619.

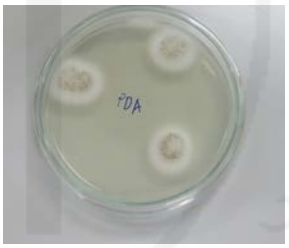
Wu, Y., Wang, C., Zheng, M., Zuo, J., Wu, J., Wang, K. and Yang, B. (2017). Effect of pH on ethanol-type acidogenic fermentation of fruit and vegetable waste. *Bioresource Technology, 101,* 5242-5249.

ภาคผนวก

การทดลองหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วม

การเตรียมเชื้อราและเชื้อยีสต์ เพื่อใช้ในการหมักเอทานอล

โคโลนีของเชื้อยีสต์



โคโลนีของเชื้อรา

ชุดทดลองหมักเอทานอล (เปลือกส้มโอ และเปลือกกล้วย)