รายงานการวิจัย

กระบวนการแยกและทำบริสุทธิ์เอทานอลจากน้ำหมักของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

(Separation and Purification Process of Ethanol from Fermentation Broth of Rice Noodle Wastewater)

ดร.ฌานิกา แซ่แง่ ชูกลิ่น

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมงและคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรังและวิทยาเขตนครศรีธรรมราช ที่จัดสรรเงินทุนและเครื่องมือในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้อง และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร ตลอดจนทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวมา ณ. ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเป็นกำลังใจในการทำวิจัยและให้คำแนะนำให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ดร.ฌานิกา แซ่แง่ ชูกลิ่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

กระบวนการแยกและทำบริสุทธิ์เอทานอลจากน้ำหมักของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนจะมีลักษณะสีขาวขุ่นและค่าซีโอดีของน้ำทิ้งเกินจากมาตรฐานน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด 20.56 กรัมต่อลิตร และสภาวะที่เหมาะสมในการหมักจะประกอบด้วย pH 5.0, อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 30°C ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จะมีผลได้ของเอทานอล ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.059, 0.066 และ 0.068 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

การทดลองขยายขนาดการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร ด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักขนาด 9 ลิตร อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลไปเกือบหมดตั้งแต่ 24 ชั่วโมงภายหลังการหมักและสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 0.12 (1.2 กรัมต่อลิตร)

การกลั่นที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง จะทำให้เอทานอลในน้ำหมักมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.092 เป็น 21.299 ด้วยการกลั่นซ้ำสองรอบ

คำสำคัญ: น้ำทิ้งโรงงานขนมจีน ไฮโดรไลซีส การหมัก เอทานอล การกลั่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

Separation and Purification Process of Ethanol from Fermentation Broth of Rice Noodle Wastewater

Abstract

Characteristic of rice noodle wastewater is white color and has sediments. It has COD value more than standard of industrial factory. Sulfuric acid concentration ranged from 0-1% (v/v) was tested. The optimum concentration was 0.75% (v/v). Under these conditions, the highest reducing sugar was obtained 20.56 g/L. Optimization of batch culture conditions showed the optimum conditions for ethanol production in 250 mL Erlenmeyer flask are as follows: initial pH, 5.0; agitation speed, 150 rpm and temperature, 30°C. The ethanol yield ($Y_{P/S}$) produced under these conditions was 0.059, 0.066 and 0.068 g/g, respectively.

Scale up of bioreactor (9 L) for hydrolyzed rice noodle wastewater by sulfuric acid 0.75% v/v with *Saccharomyces cerevisiae*, agitation speed at 250 rpm and room temperature found that yeast consumed the sugar until zero at 24 hr and it produced the maximum ethanol 0.12% (1.2 g/L).

The purification of fermentation broth by distillation at 120°C, distillation time 3 hr and 2 cycle of distillation resulted purity of ethanol up 0.092% to 21.299%.

Keywords: Rice noodle wastewater Hydrolysis Fermentation Ethanol Distillation

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ ..... (1)
บทคัดย่อ ..... (2)
สารบัญรูป ..... (5)
สารบัญตาราง ..... (6)
บทนำ 1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4
การตรวจเอกสาร 5
แป้ง 5
ยีสต์และกระบวนการหมักเอทานอล 12
การทำบริสุทธิ์เอทานอล 22
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24
วิธีการดำเนินการวิจัย 27
ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผล 32
สรุปผลการวิจัย 43
เอกสารอ้างอิง 44
ภาคผนวก 47
ก วิธีการวิเคราะห์ 47
ข การเผยแพร่ผลงานวิจัย 54

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบาญรูป

รูปที่ **หน้า**

1 การลงทุนด้านพลังงานของโลก..... 2
2 การเกิดเจลาติไนเซชันและรีโทรเกรเดชันของแป้ง..... 8
3 กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส..... 10
4 วิถีการสร้างเอทานอลโดยผ่าน Emden – Meyerhof – Panas pathway..... 16
5 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อแบบแบตซ์..... 20
6 การเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตซ์..... 21
7 ถังหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน..... 30
8 เครื่องกลั่นเอทานอลแบบเบดบรรจุ..... 31
9 น้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีน..... 32
10 ผลของความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สำหรับน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีส..... 34
11 กราฟแสดงการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จากการหมักน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่อุณหภูมิ 37°C อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที..... 36
12 ถังหมักชีวภาพ..... 40

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบาญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 สมบัติที่สำคัญของแอมิโลสและแอมิโลเพกทิน 5

2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล 14

3 ผลของเอทานอลต่อสับสเตรตและองค์ประกอบของสับสเตรตที่นำมาผลิต ..... เอทานอล 18

4 คุณสมบัติทางกายภาพของ Adsorbent ชนิดต่างๆ 23

5 คุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน 33

6 ผลของการกวนผสมหลังการไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนต่อปริมาณน้ำตาล. รีดิวซ์ 35

7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วย..... เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 37

8 ผลของอัตราการเขย่าต่อการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วย ..... เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 38

9 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วย..... เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 39

10 การหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักขนาด 9 ลิตร 41

11 ผลการกลั่นเอทานอลจากการหมักน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สภาวะการกลั่นที่ 120 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 42

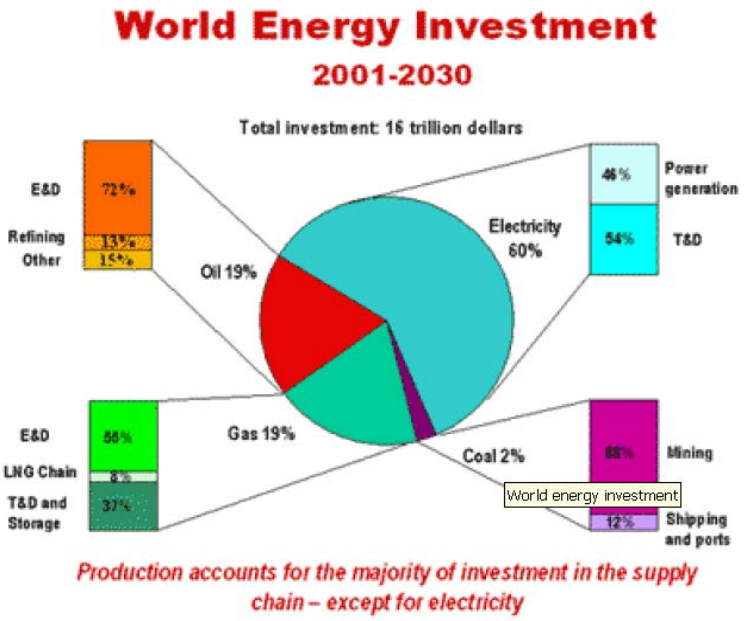
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สถานการณ์วิกฤตพลังงานเนื่องจากราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกที่ได้พุ่งสูงขึ้นในปัจจุบันได้ส่งผลกระทบต่อภาคเกษตรกรรม พาณิชยกรรมและอุตสาหกรรมไทยเป็นอย่างมาก จากราคาน้ำมันดิบที่สูงขึ้นจะทำให้ต้นทุนในการผลิตสินค้าและบริการเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากพลังงานเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นต่อกิจกรรมทุกๆ อย่างทั้งทางเศรษฐกิจ สังคม และการเมือง อย่างไรก็ตามการจัดหาให้ได้พลังงานมาและการนำพลังงานไปใช้ล้วนแต่ต้องอาศัยการลงทุนปริมาณมากด้วย ดังเช่น สำนักงานพลังงานสากลหรือ EIA (International Energy Agency) ได้ประมาณการไว้ว่าในช่วงปี 2544 – 2573 (ค.ศ 2001 – 2030) ดังแสดงในรูปที่ 1 โลกต้องลงทุนในกิจการพลังงานถึง 640 ล้านล้านบาท โดยร้อยละ 60 (384 ล้านล้านบาท) ของการลงทุนดังกล่าวจะเป็นการลงทุนในกิจการไฟฟ้า ทั้งในส่วนของการผลิตไฟฟ้า และการสร้างสายส่ง สายจำหน่ายไฟฟ้า ส่วนที่เหลือจะเป็นการลงทุนในระบบการผลิตพลังงานรูปแบบอื่นๆ ซึ่งรวมถึงการผลิตพลังงานที่ใช้ในระบบการขนส่ง สำหรับการผลิตพลังงานที่ใช้ในการขนส่งนั้นยังคงเน้นหนักไปในเรื่องของการหาพลังงานเพื่อมาทดแทนน้ำมัน ดังนั้นประเทศต่างๆ จึงทำการคิดค้นและวิจัยเพื่อนำน้ำมันที่สกัดได้จากพืชมาใช้เป็นพลังงานทดแทน

การที่จะขยายผลแผนยุทธศาสตร์พลังงานให้ประสบความสำเร็จตามเป้าประสงค์ที่กำหนดได้นั้น รัฐบาลอาจจำเป็นต้องปรับกลยุทธ์ด้านการใช้พลังงานน้ำมันเพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศโดยรวม ด้วยการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างมีประสิทธิภาพ ประกอบกับการนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่มีอยู่แล้วนำมาพัฒนาต่อยอดมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยยกระดับศักยภาพในการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ เพื่อสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนหรือเป็นพลังงานเสริมซึ่งเป็นพลังงานอีกทางเลือกหนึ่ง จะเป็นการช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายน้ำมันที่รัฐต้องนำเข้ามาใช้เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมของประเทศ



รูปที่ 1 การลงทุนด้านพลังงานของโลก (http:// www.dede.go.th)

เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่สำคัญ และนับวันจะยิ่งมีบทบาทและมีความสำคัญเพิ่มขึ้นตามลำดับ สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิดรวมถึงผลผลิตและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานที่มีองค์ประกอบของน้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส เช่น ชานอ้อย กากน้ำตาลและน้ำทิ้งขนมจีน เป็นต้น สารตั้งต้นที่ถูกนำมาใช้ในการหมักเอทานอลจึงควรเป็นสารตั้งต้นที่ราคาถูกโดยเฉพาะน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

โรงงานผลิตขนมจีนเป็นกิจการที่มีอยู่ทั่วประเทศทั้งในระดับอุตสาหกรรม ครัวเรือน ขนาดย่อม และขนาดใหญ่ กระบวนการผลิตขนมจีนก่อให้เกิดน้ำทิ้งที่มีสารอินทรีย์ปนเปื้อนปริมาณที่สูง (COD: 11,400-29,000; BOD: 9,462-23,200; pH: 3.5-4.0) หากโรงงานระบายน้ำทิ้งดังกล่าวลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะจะส่งผลต่อคุณภาพน้ำและระบบนิเวศวิทยาทางน้ำ รวมทั้งยังเกิดกลิ่นเหม็นรบกวนสร้างความเดือดร้อนให้ชาวบ้านใกล้เคียง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องบำบัดน้ำทิ้งดังกล่าวก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ปัจจุบันโรงงานผลิตขนมจีนขนาดใหญ่ส่วนมากได้ติดตั้งระบบบำบัดน้ำเสียและสามารถควบคุมคุณภาพน้ำทิ้งได้ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรม แต่การผลิตขนมจีนในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือนและขนาดย่อมยังทำ

ให้เกิดปัญหาต่อคุณภาพสิ่งแวดล้อมดังที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น เนื่องจากผู้ผลิตขนมจีนในระดับดังกล่าวขาดแคลนความรู้ เทคโนโลยี และเงินทุนสำหรับการบำบัดน้ำเสีย (Siripattanakul-Ratpukdi, 2012)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้ยีสต์เพื่อบำบัดสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนในการผลิตเอทานอล โดยมุ่งเน้นการพัฒนาระบบให้เหมาะสมต่อกิจการโรงงานขนมจีนในระดับครัวเรือน โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลแบบกะและการทำบริสุทธิ์เอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยการกลั่นเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากของเสียของโรงงานต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

วัตถุประสงของโครงการวิจัย

1. ศึกษาคุณสมบัติน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนสำหรับผลิตเอทานอล
2. ศึกษาการไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนสำหรับผลิตเอทานอล
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ต่อการผลิตเอทานอลแบบกะ
4. ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอทานอลจากน้ำหมักด้วยการกลั่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

การตรวจเอกสาร

1. แป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ ($C_6H_{10}O_5$) แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสซึ่งประกอบด้วย anhydroglucose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glucosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (Aldehyde group) เรียกว่า reducing end group แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (แอมิโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (แอมิโลเพกทิน) วางตัวในแนวรัศมี แป้งจากแหล่งที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนของแอมิโลสและแอมิโลเพกทินแตกต่างกันดังตารางที่ 1 ทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน (กล้าณรงค์และเกื้อกูล, 2543)

ตารางที่ 1 สมบัติที่สำคัญของแอมิโลสและแอมิโลเพกทิน

คุณสมบัติ	แอมิโลส	แอมิโลเพกทิน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นสายตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	α – 1,4	α – 1,4 และ α – 1,6
ขนาด	200 - 2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดีกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

ที่มา: Beynum และ Roels (1985) อ้างโดย กล้าณรงค์และเกื้อกูล (2543)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

1.1 องค์ประกอบของแป้ง

(1) แอมิโลส (Amylose)

แอมิโลสเป็นพอลิเมอร์สายตรงของ α-D-กลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α –1,4 กลูโคซิดิก สามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ α-อะไมเลส, β-อะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส ปัจจุบันพบว่าแอมิโลสไม่ใช่พอลิเมอร์สายตรง 100% แต่มีสายกิ่งที่ยาวจับกับสายโซ่หลักด้วยพันธะ α –1,6-กลูโคซิดิกแต่จะพบสายกิ่งไม่มาก มีรายงานว่าอยู่ในช่วง 9-20 กิ่งต่อโมเลกุลแต่ละกิ่งมีน้ำตาล D-กลูโคส 4 ถึงมากกว่า 100 AGU (หน่วยแอนไฮโดรกลูโคส) (Hizukuri และคณะ 1981 อ้างโดย วรรณา ตุลยธัญ, 2549) ขนาดโมเลกุลของแอมิโลสอาจจะมีจำนวนน้ำตาลกลูโคสหรือระดับการเกิดพอลิเมอร์ (DP: Degree of Polymerization) 1,000 ถึง 6,000 AGU ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งของแอมิโลส เช่น สตาร์ชข้าวสาลีจะมี DP ในช่วง 1,000 – 2,000 เป็นต้น

เนื่องจากแอมิโลสมีสายโมเลกุลที่ยาว ดังนั้น เมื่ออยู่ในสารละลายแอมิโลสจะอยู่ในรูปแบบเกลียว (ฮีลิกซ์) ที่สามารถจับกับไอโอดีน โดยไอโอดีนในรูปไอออนของโพลีไอโอไดด์ (I_3^- หรือ I_5^-) จะเข้าไปอยู่ภายในของเกลียวจึงทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของแอมิโลสกับไอโอดีนที่มีสีน้ำเงิน (ค่า λ_{max} ประมาณ 640 nm) นอกจากนี้เมื่อแอมิโลสอยู่ในสารละลายจะมีแนวโน้มที่โมเลกุลจะรวมกลุ่มระหว่างสายโซ่เกิดโมเลกุลเกลียวคู่ โมเลกุลเหล่านี้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นส่งผลให้แอมิโลสเกิดการรีโทรเกรด (retrograde) ได้เจลหรือตะกอนที่ไม่ละลายน้ำเกิดขึ้นได้ (ในกรณีหลังจะเกิดขึ้นเมื่อแอมิโลสมีระดับความเข้มข้นต่ำเช่นร้อยละ 1) (วรรณา ตุลยธัญ, 2549)

(2) แอมิโลเพกทิน (Amylopectin)

แอมิโลเพกทินเป็นโมเลกุลของสตาร์ชที่มีขนาดใหญ่กว่าแอมิโลสหลายเท่าและมีกิ่งมาก ประกอบด้วย α-D-กลูโคส ที่เชื่อมต่อกันเป็นสายตรงด้วยพันธะ α-1,4-กลูโคซิดิกและมีสายกิ่งมากมายที่จับกับน้ำตาลในสายตรงด้วยพันธะ α-1,6-กลูโคซิดิก ปริมาณสายกิ่งในแอมิโลเพกทินมีประมาณร้อยละ 4 - 5 ลักษณะรูปแบบโมเลกุลของแอมิโลเพกทินเป็นคลัสเตอร์ (Cluster) แต่ละคลัสเตอร์ประกอบด้วยสายหลักมีหนึ่งปลายรีดิวซิ่งอยู่ที่ไฮลัม มีโซ่-B เป็นสายกิ่งย่อยจับต่อออกไปจากโซ่หลักและมีโซ่-A จับต่อออกไปจากโซ่-B โดยโซ่-A เป็นกิ่งชั้นนอกสุดไม่มีกิ่งมาจับอีก สายกิ่งเหล่านี้ถ้ายาวเพียงพอจะสามารถอยู่แบบเกลียวคู่ได้ จึงทำให้มีการรวมตัวของสายกิ่งที่

ใกล้เคียงกันจับยึดด้วยพันธะไฮโดรเจน จึงเกิดลักษณะในแต่ละคลัสเตอร์ แอมิโลเพกทินจึงเป็นโมเลกุลสตาร์ชที่ไม่ละลายน้ำเย็นและทนต่อกรดได้ แอมิโลเพกทินมีระดับการเกิดพอลิเมอร์ (DP) 10^4 ถึง 10^5 ต่อโมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุล 10^7 ถึง 10^8 ดาลตัน ถึงแม้จะมีฮีลิกซ์ในสายกิ่ง แต่จะสั้นกว่าแอมิโลส ดังนั้นแอมิโลเพกทินเมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน (สารละลาย I_2/KI) จะให้สีม่วงแดง (ค่า λ_{max} ประมาณ 540 nm) เมื่อแอมิโลเพกทินอยู่ในสารละลายในสภาวะเป็นกลางจะไม่เกิดการรีโทรเกรด โมเลกุลจะเสถียรหรือคงตัว เพราะการมีกิ่งก้านมากทำให้ไม่สามารถรวมตัวกันได้ง่ายเหมือนแอมิโลส (วรรณา ตุลยธัญ, 2549)

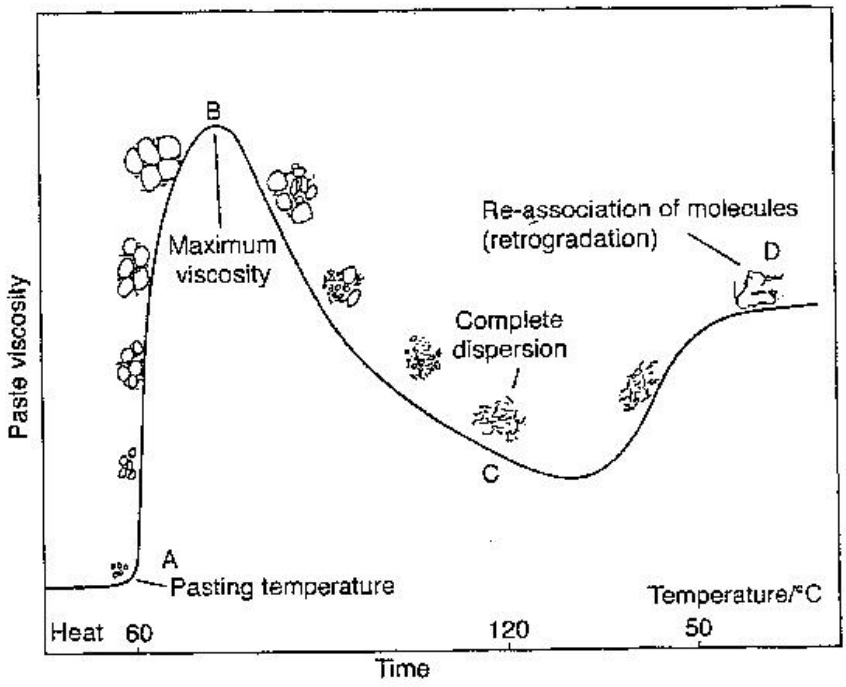
1.2 การเกิดเจลาติไนเซชัน (gelatinization)

โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) จำนวนมากยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจน มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) เนื่องจากเม็ดแป้งอยู่ในรูปของร่างแห micelles ดังนั้นการจัดเรียงตัวลักษณะนี้จะทำให้เม็ดแป้งละลายในน้ำเย็นได้ยาก ดังนั้นในขณะที่แป้งอยู่ในน้ำเย็นเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำและพองตัวได้เล็กน้อย (Leach และคณะ, 1959 อ้างโดยกล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยจอมขวัญ, 2543) แต่เมื่อให้ความร้อนกับสารละลายน้ำแป้งพันธะไฮโดรเจนจะคลายตัวลง เม็ดแป้งจะดูดน้ำแล้วพองตัว ดังแสดงในภาพที่ 2 ช่วง A-B ส่วนผสมของน้ำแป้งจะมีความหนืดมากขึ้นและใสขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของน้ำอิสระที่เหลืออยู่รอบ ๆ เม็ดแป้งเหลือน้อยลง เม็ดแป้งเคลื่อนไหวได้ยากขึ้นทำให้เกิดความหนืด ปรากฏการณ์นี้เรียกว่าการเกิดเจลาติไนเซชัน อุณหภูมิที่สารละลายเริ่มเกิดความหนืดเรียกว่า อุณหภูมิเริ่มเจลาติไนซ์ เมื่อตรวจวัดโดยเครื่องมือวัดความหนืดมักจะเรียกจุดนี้ว่าอุณหภูมิที่เริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืด (Pasting temperature) หรือเวลาที่เริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืด (Pasting time) ซึ่งจะแตกต่างกันในแป้งแต่ละชนิด แป้งจากพืชหัว เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่งจะมีอุณหภูมิเริ่มเจลาติไนซ์ต่ำกว่าอุณหภูมิจากแป้งธัญพืช

1.3 การเกิดรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation)

เมื่อแป้งได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่เกิดเจลาติไนเซชันแล้วให้ความร้อนต่อไป จะทำให้เม็ดแป้งพองตัวเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่พองตัวเต็มที่และแตกออก โมเลกุลของแอมิโลสขนาดเล็กจะกระจัดกระจายออกมาทำให้ความหนืดลดลง เมื่อปล่อยให้เย็นตัว โมเลกุลแอมิโลสที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล เกิดเป็นร่างแหสามมิติโครงสร้างใหม่ที่สามารถอุ้มน้ำและไม่มีการดูดน้ำเข้ามาอีก มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิด

ลักษณะเจลเหนียวคล้ายฟิล์มหรือผลึก ดังแสดงในภาพที่ 2 เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเกิดรีโทรเกรเดชัน หรือการคืนตัว หรือ setback (Smith, 1979 อ้างโดย กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยจอมขวัญ, 2543) เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงไปอีกลักษณะการเรียงตัวของโครงสร้างจะแน่นมากขึ้น โมเลกุลอิสระของน้ำที่อยู่ภายในจะถูกบีบออกมานอกเจล ซึ่งเรียกว่า syneresis ปรากฏการณ์ทั้งสองนี้จะทำให้เจลมีลักษณะขาวขุ่นและมีความหนืดเพิ่มขึ้น



รูปที่ 2 การเกิดเจลาติไนเซชันและรีโทรเกรเดชันของแป้ง

ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0350/gelatinization

การคืนตัวของแป้งเปียกและสารละลายแป้งทำให้สารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น มีลักษณะขุ่นและทึบแสง เกิดชิ้นส่วนที่ไม่ละลายในแป้งเปียกที่ร้อน เกิดการตกตะกอนของอนุภาคแป้งที่ไม่ละลาย ทำให้เกิดเจลและโมเลกุลน้ำถูกบีบออกมานอกเจล ในการคืนตัวของแป้งเมื่อเกิดขึ้นอย่างช้าๆ จะเกิดการตกตะกอนเมื่อเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจะทำให้เจลขุ่น

การคืนตัวของแป้งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของแป้ง ความเข้มข้นของแป้ง กระบวนการให้ความร้อน กระบวนการให้ความเย็น อุณหภูมิ ระยะเวลา ความเป็นกรด-เบสของสารละลายปริมาณและขนาดของแอมิโลส แอมิโลเพกทินและองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ในแป้ง ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำและความเข้มข้นของแป้งสูง แป้งสามารถคืนตัวได้ช้าลง ในการชะลอการ

คืนตัวของแป้งจะใช้เกลือของ monovalent anion และ cation, calcium nitrate และ urea (Swinkels, 1985b อ้างโดย กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยจอมขวัญ, 2543)

ปริมาณและขนาดของแอมิโลสมีความสำคัญต่อการคืนตัวของแป้ง แป้งที่มีปริมาณแอมิโลสสูงจะเกิดการคืนตัวได้มากและเร็วกว่าแป้งที่มีปริมาณแอมิโลเพกทินสูง อัตราในการคืนตัวจะสูงสุด (การละลายต่ำที่สุด) ที่ degree of polymerization ของแอมิโลสเท่ากับ 100 ถึง 200 อัตราการคือตัวจะลดลงเมื่อโมเลกุลของแอมิโลสยาวหรือสั้นกว่านี้ ในการทำให้แอมิโลสที่คืนตัวกลับมาละลายได้อีกครั้งหนึ่งต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 100 ถึง 160 แอมิโลเพกทินจะมีผลทำให้เกิดการคืนตัวน้อยมาก ดังนั้นแป้งแต่ละชนิดจะมีอัตราการคืนตัวที่แตกต่างกัน ในแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวจะมีอัตราการคืนตัวของแป้งต่ำที่สุด เนื่องจากไม่มีแอมิโลสในแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว สำหรับแป้งข้าวโพดและแป้งสาลีจะมีอัตราการคืนตัวสูงกว่าแป้งมันฝรั่งและแป้งมันสำปะหลังเนื่องจากในแป้งธัญพืชมีปริมาณแอมิโลสสูง (ประมาณร้อยละ 28) มีแอมิโลสโมเลกุลเล็กและมีไขมันในปริมาณสูง ทำให้เกิดการจับตัวเป็น amylose-lipid complex (Swinkels, 1985b อ้างโดย กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยจอมขวัญ, 2543)

1.4 การผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส

การผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสนั้นสามารถแบ่งเป็นขั้นตอนได้ดังรูปที่ 3 โดยมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้

1.4.1 การเตรียมน้ำแป้ง

การเตรียมน้ำแป้งเป็นตัวกำหนดผลิตภัณฑ์ที่ได้และกำลังการผลิต ถ้าเตรียมน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นของแป้งสูง จะได้ผลผลิตสูง ใช้พลังงานในการต้มระเหยน้ำน้อย การผสมแป้งกับน้ำมีข้อกำหนดเนื่องจากความยืดหยุ่นของแป้งเมื่อถูกความร้อนถึงอุณหภูมิของการสุก (Gelatinization) ฉะนั้นถ้าต้องการให้มีเนื้อแป้งในน้ำแป้งมากๆ ต้องทำการย่อยแป้งขณะที่แป้งกำลังจะสุก เพื่อที่จะได้น้ำแป้งที่มีความหนืดต่ำ โดยทั่วไปจะเตรียมน้ำแป้งประมาณร้อยละ 35 - 40 โดยน้ำหนัก ในกรณีที่ใช้น้ำแป้งโดยตรงหรือผสมแป้งโดยประมาณอาจใช้ Buame' Hydrometer วัดความเข้มข้นของน้ำแป้ง ซึ่งจะเทียบเท่ากับน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นประมาณ 17 - 19 Be'

รูปที่ 3 กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส

ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2543)

การปรับ pH ของน้ำแป้งให้ได้ช่วงที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ (ในกรณีที่ใช้กรดเป็นตัวย่อยครั้งแรกต้องปรับ pH เป็นกรณีพิเศษ โดยไม่ใช้เอนไซม์) ควรใช้กรดไฮโดรคลอริกและ Na_2CO_3 เป็นตัวปรับความเป็น กรด-ด่าง เพื่อช่วยในการย่อยคราวต่อไป ในกรณีที่ต้องใช้เอนไซม์ต้องให้น้ำแป้งมีแคลเซี่ยม (Ca) เนื่องจาก Ca^{++} เป็น Co-enzyme ที่ช่วยในการดำเนินกิจกรรมการย่อย ปริมาณของ Ca^{++} ประมาณ 100 – 300 ppm ซึ่งในบางครั้งน้ำที่ใช้ในโรงงานมีปริมาณ Ca^{++} (ในรูปของความเป็นด่างต่างๆ) มากเพียงพอ

1.4.2 การย่อยแป้งครั้งแรก (Liquefaction)

การย่อยครั้งแรกของน้ำแป้งเพื่อลดความหนืดของน้ำแป้งเริ่มต้น เมื่อใช้กรดในการย่อยครั้งแรกเรียกว่า “ thinning” หรือ “ dextrination ” การย่อยครั้งแรกเป็นการทำให้น้ำแป้งที่สุกแล้วมีความหนืดน้อยและแป้งบางส่วนถูกย่อยทำให้แป้งมีโมเลกุลเล็กลง ถ้าเป็นการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเอนไซม์ต้องเป็นกลุ่มพวก endo-enzyme เพื่อทำหน้าที่ตัดหรือย่อยพันธะน้ำตาลกลูโคสที่จับตัวกันเป็นแบบภายในจนได้แป้งที่มีโมเลกุลเล็กลง เป็นกลุ่มๆ ที่เท่าๆ กัน ถ้าวัดค่า DE จะได้ประมาณตั้งแต่ 5 - 20 ในทางปฏิบัติควรรักษาไว้ที่ 10 -15 เพื่อป้องกันการเกิดการรวมตัวกันหรือจับตัวกันใหม่ของแป้งที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ และเกิดตะกอนแขวนลอยที่กรองยาก ลักษณะการเกิดตะกอนเช่นนี้เรียกว่า การเกิดรีโทรเกรเดชั่น Degree Buame (Be’) = 145- (145/ความถ่วงจำเพาะของสารละลายที่ 20 ^{o} C)

(ก) การย่อยครั้งแรกด้วยกรด

แม้ว่าตอนเริ่มต้นการพัฒนาอุตสาหกรรมนั้น การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลน้ำเชื่อมกลูโคส ใช้กรดเป็นตัวย่อย ปัจจุบันนี้หลังจากวิวัฒนาการของเอนไซม์ได้เข้ามาสู่การผลิตมากขึ้น การใช้กรดก็ลดลงไปเนื่องจากการทำงานกับกรดต้องใช้ความระมัดระวังและใช้วัสดุอุปกรณ์เป็นพิเศษ แต่อย่างไรก็ตามยังมีโรงงานที่ผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสโดยการใช้กรดเป็นตัวย่อยล้วนๆ (Acid - process) หรือใช้กรดย่อยครั้งแรกและใช้เอนไซม์ย่อยครั้งสุดท้าย (Acid-enzyme process) สำหรับการใช้กรดเป็นตัวย่อยนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCL) มากกว่ากรดซัลฟิวริก ทั้งนี้เนื่องจากในกรณีที่น้ำที่ใช้ในการย่อยมี Ca^{++} อยู่ เกลือยิปซัม ($CaSO_4$) จะตกตะกอนและจะเป็นตะกอนไปจนถึงผลิตภัณฑ์ ค่า pH จะปรับไว้ประมาณ 1.8 จากนั้นก็จะให้ความร้อนสูงประมาณ 130 - 140° C จากการให้ไอน้ำโดยตรง (หรือทางอ้อม) ความดันจะอยู่ประมาณ 5 bar ปกติจะปฏิบัติในท่อปฏิกิริยา (Pipe-reaction หรือ jet cooker) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10 นาที ค่า DE จะได้ประมาณ 15 - 20 หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้ว น้ำแป้งที่ถูกย่อยจะปล่อยออกที่ถังความดันบรรยากาศ (Flash tank) แล้วจะถูกปรับ pH เป็น 4.5 – 5.0 โดย Na_2CO_3 เมื่อ pH ถูกปรับได้ในช่วงนี้ เกลือ Na_2CO_3 จะทำให้เกิด CO_2 ขึ้นบางส่วน บางส่วนตกตะกอนลงมาและทำให้โปรตีนและไขมันตกตะกอนลงมาด้วย สำหรับการย่อยครั้งแรกด้วยกรดต้องปรับเวลาให้เหมาะสม โดยให้ค่า DE ของน้ำแป้งหลังจากย่อยแล้วอยู่ไม่น้อยกว่า 18 เพื่อป้องกันการคืนตัว

(ข) การย่อยครั้งแรกด้วยเอนไซม์

การออกแบบการย่อยทำได้ทั้งแบบถังเดี่ยวหรือแบบต่อเนื่อง หลักเกณฑ์ในการย่อยโดยเอนไซม์เมื่อเตรียมน้ำแป้งได้ความเข้มข้นพอดี คำนวณเอนไซม์และเติมถูกต้อง เติม Ca^{++} (ในรูป $CaCl_2$) และปรับ pH ให้ถูกต้องแล้ว การให้ความร้อนส่วนใหญ่ใช้ในรูปของไอน้ำอัดเข้าไปในท่อส่งของน้ำแป้งโดยตรง อุณหภูมิประมาณ 100 - 105° C ช่วงนี้ถือว่าสำคัญมาก เพราะเป็นการทำลายหรือลดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่กับน้ำแป้ง เอนไซม์ที่ใช้ในช่วงนี้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงและทำการย่อยสลายแป้งในขณะที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นได้ หลังจากที่ลดความดันลงไปเท่ากับบรรยากาศ (Flash) น้ำแป้งจะถูกส่งลงไปในถังย่อย ซึ่งอาจเป็นแบบถังเดี่ยว (Batch) หรือต่อเนื่อง ในการให้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์หลังจากการย่อยครั้งแรกขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ เพราะในบางกรณีหลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้น ความสามารถของเอนไซม์ก็หมดลง (เช่น เอนไซม์ของ Bacillus subtilis) จึงไม่ต้องให้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมเอนไซม์อีก

น้ำแป้งที่ย่อยแล้วในช่วงนี้ ควรมีค่า DE อยู่ที่ 10 - 15 หรือต่ำกว่า 20 เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า “ MALTODEXTRIN ” ก็เพียงนำแป้งที่ย่อยระดับนี้แล้วไปผ่านการทำบริสุทธิ์

คือกรองด้วยผงถ่านจนใส และนำไประเหยน้ำด้วยเครื่องต้มระเหย ให้ได้ความเข้มข้นจากเดิมร้อยละ 35 - 40 เป็นประมาณร้อยละ 60 แล้วนำมาพ่นเป็นผงในเครื่องพ่นผง (Spray dryer) จะได้ผลิตภัณฑ์ MALTODEXTRIN (กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2543)

2. ยีสต์และกระบวนการหมักเอทานอล

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่โดยส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular form) มีรูปร่างหลายแบบ คือ กลม (Round) รี (Oval) สามเหลี่ยม (Triangular) รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง (Apiculate) ฟลาสก์ (Flask) ยาว (Elongated) และเป็นสาย (Filamentous) ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยแบบ pseudomycelium และ true mycelium สำหรับ pseudomycelium อาจเกิดเมื่อมีการเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อที่เกิดขึ้นไม่หลุดจากเซลล์แม่ ทำให้มีการเรียงต่อของเซลล์เป็นสาย บางครั้งมีการต่อกันเป็นสายสั้นๆ ซึ่งแต่ละเซลล์มีรูปร่างคล้ายกันจัดเป็น rudimentary pseudomycelium บางชนิดเซลล์ที่เป็นแกนกลางยาวกว่าเซลล์อื่น และระหว่างรอยต่อของเซลล์มีกลุ่มของหน่อแตกออกมา pseudomycelium ประเภทนี้จัดว่าเป็น well developed pseudomycelium (สาวิตรี, 2536)

การเจริญของยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาด เมื่อขนาดเพิ่มจนถึงจุดหนึ่ง เซลล์จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์นิวเคลียสจะมีการแบ่งแบบไมโตซีส (mitosis) และสังเคราะห์ไซโตพลาสซึมเกิดขึ้น สำหรับการแบ่งเซลล์ของยีสต์ที่เป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศนั้น พบว่าส่วนใหญ่เกิดจากการแตกหน่อ (budding) มีจำนวนน้อยที่เกิดโดยการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองโดยวิธี fission และมีบางพวกที่เพิ่มจำนวนโดยวิธีอื่นๆ เช่น การสร้าง conidiospore หรือ codinia ของยีสต์กลุ่มที่ไม่มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (สาวิตรี, 2536)

2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอทานอล ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา ดังตารางที่ 2 จุลินทรีย์ซึ่งเป็นที่สนใจสำหรับการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *S.uvarum* (carlsberggensis), *Schizosaccharomyces pombe* และ *kluyveromyces fragilis* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่เหมือนกัน แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้เชื้อ *S. cerevisiae* นอกจากนั้นปัจจุบันได้มีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียจีนัส *Zymomonas* คือ *Z. mobilis* และจีนัส

Clostridium คือ *Cl. Thermocellum* ซึ่งแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถหมักเซลลูโลสและเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 ° C แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งสองจีนัสดังกล่าวมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ ดังนั้นจึงไม่นิยมนำแบคทีเรียมาใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Waites et al., 2001)

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลมีดังนี้ (สาวิตรี, 2536)

1. ให้ผลผลิตสูง
2. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
3. มีความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance
4. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
5. ทน pH ต่ำ หรือทนกรด (acid tolerance)
6. มีความสามารถในการจับตัวเป็นก้อนตกลงก้นชนะ (flocculation)
7. มีลักษณะพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย
8. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

แบคทีเรีย	
Clostridium themohydrosulfuricum	Extreme thermophile
Clostridium thermocellum	Thermophilic, hydrolyses cellulose
Thermoanarebacter ethanolicus	Ferments xylose and starch
Zymomonas mobilis	The wild-type ferments only glucose, fructose and sucrose, but with high productivity
ยีสต์	
Candida pseudotropicalis, C. tropicalis	Ferments xylose
Candida species	Ferments xylose and cellobiose
Kluyveromyces lactis	Ferments lactose in dairy wastes
Kluyveromyces marxianus	Hydrolyses inulin (polyfructosan)
Pachysolen tannophilus	Ferments xylose
Pichia stipitis	Ferments xylose
Saccharomyces cerevisiae	Most strains ferment only glucose, sucrose, fructose, maltose and maltotriose
S. cerevisiae var. distaticus	Hydrolyses starch
Schwanniomyces alluvius	Hydrolyses starch
ราเส้นใย	
Monilia species	Hydrolyses cellulose and xylan
Mucor species	Ferment xylose and arabinose

ที่มา : Waites et al. (2001)

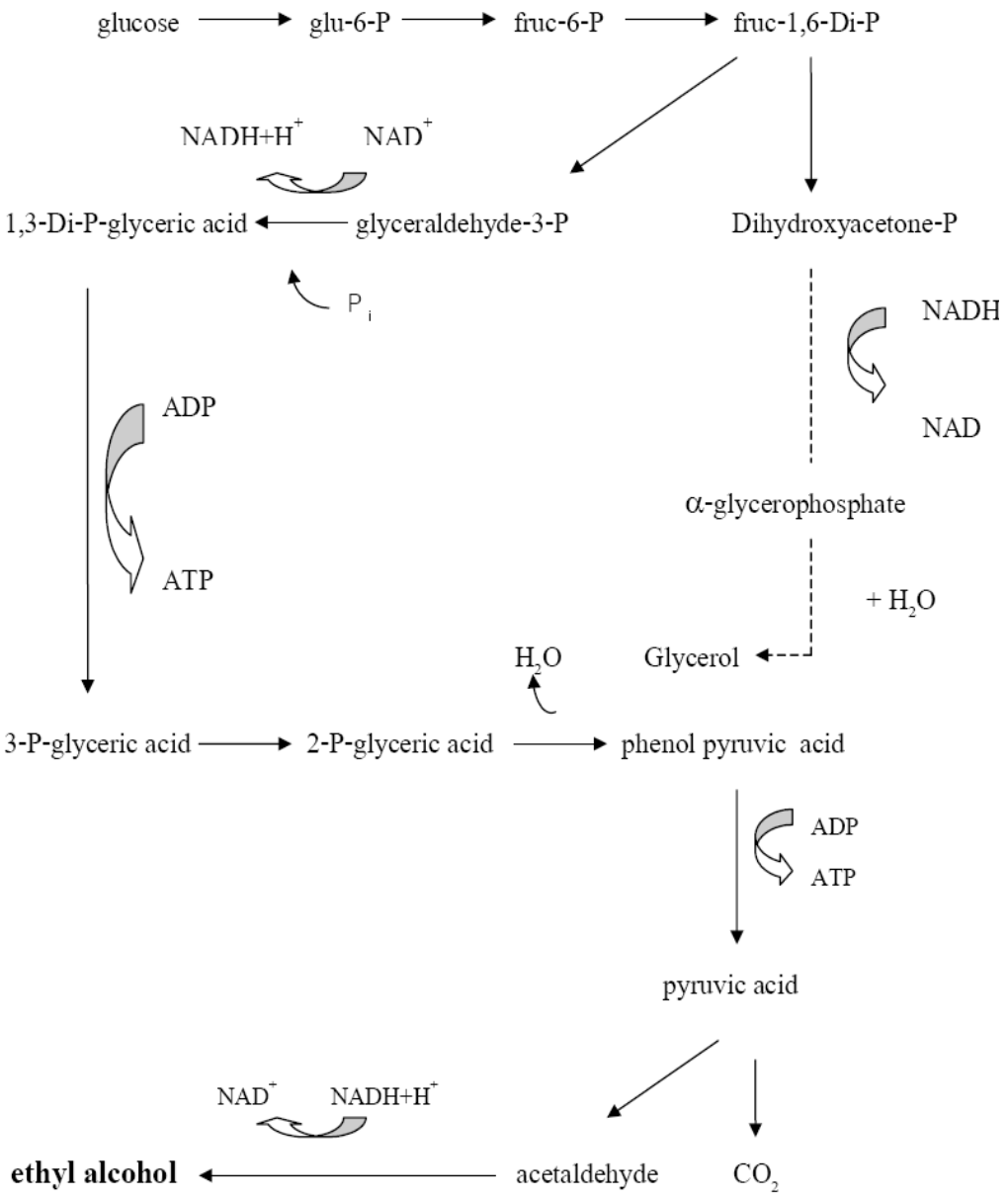
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

2.2 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักเอทานอลเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงสับสเตรต (Substrate) เช่น น้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (Fermentation) ให้เป็นเอทานอล ซึ่งจุลินทรีย์สามารถได้พลังงานจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ อย่างไรก็ตามพลังงานที่ได้จากกระบวนการหมักจะน้อยกว่าพลังงานที่ได้

จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic respiration) ประมาณ 25 เท่า จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอล ได้แก่ ยีสต์ ในจีนัส *Saccharomyces* และแบคทีเรียในจีนัส *Zymomonas* การหมักเอทานอลโดยยีสต์จากกลูโคสไปเป็นเอทานอล จะเป็นไปโดยผ่าน glycolysis หรือ Emden – Meyerhof – Panas pathway (Paturau, 1987) ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยการเปลี่ยน glucose – 6 – phosphate ไปเป็น pyruvate จากนั้น pyruvate จะถูกเมตาบอไลต์ต่อไปให้ผลผลิตสุดท้ายต่างๆ กัน ตามชนิดของยีสต์ และภาวะแวดล้อมระหว่างเมตาบอลิซึม ในกรณีที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือไม่มีออกซิเจน หรือทั้งสองอย่าง pyruvate จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล pyruvate ที่สร้างจากวิถีไกลโคไลซีส สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลในยีสต์บางชนิด โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* โดย pyruvate จะถูก decarboxylation โดยมีเอนไซม์ pyruvate decarboxylase ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น acetaldehyde ซึ่งถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอล โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ที่อาศัย $NADH_2$ ($NADH_2$ dependent alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Paturau, 1987)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย



รูปที่ 4 วิถีการสร้างเอทานอลโดยผ่าน Emden – Meyerhof – Panas pathway

ที่มา : Paturau (1969)

2.3 การบำบัดน้ำเสียและการผลิตเอธานอลด้วยยีสต์

การผลิตเอธานอลโดยใช้ยีสต์จากน้ำทิ้งอุตสหกรรมแป้ง แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1) ไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) กระบวนการนี้เป็นการเปลี่ยนโมเลกุลแป้งให้เป็นน้ำตาล ขั้นตอนสามารถทำได้ทั้ง 2 ลักษณะ คือ การไฮโดรไลซีสด้วยกรด (Acid hydrolysis) หรือ การไฮโดรไลซีสให้ได้ผลดีจำเป็นต้องมีขั้นตอนในการเตรียมการเบื้องต้น (Pretreatment) ด้วยความร้อนหรือสารเคมี จากการวิจัยดังกล่าวสามารถสรุปสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเบื้องต้นและการไฮโดรไลซีสได้ ดังนี้

• การเตรียมการเบื้องต้นด้วยความร้อน สภาวะที่ใช้ คือ การนึ่งที่อุณหภูม 121°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นสามารถไฮโดรไลซีสด้วยกรดหรือเอนไซม์

• การไฮโดรไลซีสด้วยกรด สภาวะที่ใช้ คือ กรดซัลฟูริค (ร้อยละ 0.75) ที่อุณหภูม 55°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

• การไฮโดรไลซีสด้วยเอ็นไซม์ สภาวะที่ใช้ คือ 5 U/g Substrate E ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง pH เท่ากับ 5

2) การหมัก (Fermentation) ขั้นตอนนี้เป็นการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอธานอล โดยยีสต์ที่นิยมใช้ในกระบวนการนี้ คือ *Candida tropicalis Saccharomyces cerevisiae* และ *Zymomonas mobilis* (Swain et al., 2007)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

2.4.1 ความเข้มข้นของเอทานอล

ความเข้มข้นของเอทานอลเป็นปัจจัยอันดับแรกที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยส่งผลต่อการเจริญของยีสต์และการหมักเอทานอล การยับยั้งเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นก็จะมีผลให้อัตราการเจริญเริ่มลดลง ส่วนความสามารถในการทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ของยีสต์เพียงบางจีนัส ได้แก่ *Sacchamyces* และ *Schizosaccharomyces* โดยพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่มีผลต่อการเจริญและการหมัก คือ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ผลของการยับยั้งที่เกิดจากเอทานอลสามารถยับยั้งอัตราการเจริญและการมีชีวิตของเซลล์ พบว่า หากมีการเติมเอทานอลในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะ log phase มีผลทำให้อัตราการเจริญและอัตราการสร้างเอทานอลลดลงอย่างรวดเร็ว แต่พบว่ามีผลต่อการเจริญมากกว่าการหมักเอทานอล (Brown et al., 1981)

2.4.2 ชนิดของสับสเตรต

สับสเตรตที่นำมาผลิตเอทานอลมีหลายชนิด ได้แก่ ประเภทน้ำตาล (กากน้ำตาล อ้อย และน้ำอ้อย) ประเภทแป้ง (แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง) เซลลูโลส (ฟางข้าว วัชพืช และเศษไม้เหลือทิ้ง) และของเสียจากโรงงานผลไม้กระป๋อง ชนิดของสับสเตรตเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล เพราะสับสเตรตแต่ละชนิดสามารถให้ผลของเอทานอลต่อสับสเตรต ($Y_{P/S}$) แตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสับสเตรตที่นำมาใช้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของเอทานอลต่อสับสเตรตและองค์ประกอบของสับสเตรตที่นำมาผลิตเอทานอล

Substrate	Dry matter (%)	Lignin (%)	Carbohydrates (%)	Ethanol yield (L kg^{-1} of dry biomass)
Barley	88.7	2.90	67.10	0.41
Barley straw	81.0	9.00	70.00	0.31
Corn	86.2	0.60	73.70	0.46
Corn stover	78.5	18.69	58.29	0.29
Oat	59.1	4.00	65.50	0.41
Oat straw	90.1	13.75	59.10	0.26
Rice	88.6		87.50	0.48
Rice straw	88.0	7.13	49.33	0.28
Sorghum	89.0	1.40	71.60	0.44
Sorghum straw	88.0	15.00	61.00	0.27
Wheat	89.1		35.85	0.40
Wheat straw	90.1	16.00	54.00	0.29
Sugarcane	26.0		67.00	0.50
Bagasse	71.0	14.50	67.15	0.28

ที่มา : Kim and Dale (2004)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

2.4.3 ความเข้มข้นของสับสเตรต

การใช้สับสเตรตความเข้มข้นสูงในการหมักเอทานอลเป็นการปริมาณน้ำที่ใช้สำหรับเจือจางสับสเตรตที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล แต่ในขณะที่มีการใช้สับสเตรตความเข้มข้นสูงซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลสูงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล การยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซีส ซึ่งเซลล์ของยีสต์จะเกิด plasmilysis เมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 14 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่สามารถยับยั้งการหมักนั้น แท้ที่จริงแล้วเกิดจากลักษณะของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งหากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่าร้อยละ 14 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะส่งผลให้อัตราการหมักเริ่มลดลง แต่ผลการยับยั้งที่เกิดจากน้ำตาลนี้น้อยกว่าผลของความเข้มข้นของเอทานอล หรืออาจเป็นผลยับยั้งร่วมกันระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลและความเข้มข้นของเอทานอล (Jones et al., 1981)

2.4.4 pH (ความเป็นกรด-ด่าง)

โดยทั่วไปยีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในช่วง pH 3.5 – 7.0 ค่า pH เริ่มต้นและ buffer capacity ของการหมักเอทานอลมักอยู่ในสภาพที่ยีสต์จะเกิดการหมักได้ตลอดกระบวนการหมัก เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักเอทนอลจะมีการสร้างกรดโดยยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย (Rose and Harrison, 1970) จึงต้องมีการปรับ pH เพื่อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมและเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย ดังนั้นจึงปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4.0 – 4.5 (Bazas et al., 1989) หรือ 4.0 – 5.0 หรือ 4.8 – 5.0 ด้วยกรดซัลฟิวริคเข้มข้น หรือ mineral acid อื่นๆ อย่างไรก็ตาม pH ที่ให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดย่อมขึ้นอยู่กับคุณภาพของกากน้ำตาลที่ใช้ และพบว่าการหมักน้ำตาลซูโครสจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลง pH มากกว่าการหมักน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ invertase จะเปลี่ยนแปลงที่ pH ต่ำกว่า (Jones et al., 1981)

2.4.5 อุณหภูมิ

ในระหว่างการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้น โดยกลูโคส 1 โมกุลจะให้ปริมาณความร้อน 26 แคลอรี่ดังสมการที่ (1)

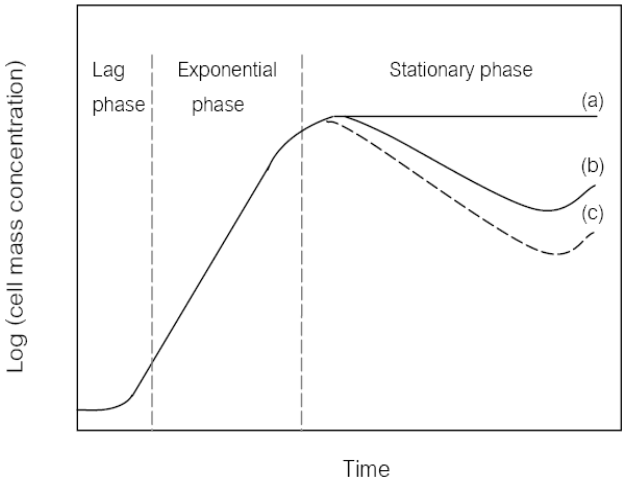
$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 26.0 \text{ แคลอรี่} \qquad (1)$$

ยีสต์ส่วนใหญ่จะเจริญได้รวดเร็วที่อุณหภูมิ 20 – 30 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ทั่วไปสามารถเจริญได้คือ 30 – 40 องศาเซลเซียส มียีสต์บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่านี้เล็กน้อย ไม่มีรายงานว่ามียีสต์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส

2.5 กระบวนการหมัก

2.5.1 การหมักแบบแบตช์ (Batch culture)

เป็นกระบวนการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายในระบบปิด การเลี้ยงนิยมทำในขวดเขย่าหรือในถังหมัก โดยใช้สารอาหารและภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมตอการเติบโต สารอาหารที่ใช้ในระบบมีปริมาณจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหาร ภาวะในระบบมีการเปลี่ยนแปลง สารอาหารถูกใช้หมดไป ความเป็นกรดด่างเปลี่ยนไป มีการสะสมสารพิษ เป็นต้น (Aiba et al., 1973) เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์จะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น โดยจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารที่มีอยู่จนหมด และมีการสร้างผลิตภัณฑ์และสารอื่นๆ ออกมา ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์ที่เปลี่ยนไปกับเวลาดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์

ที่มา : Wang et al. (1979)

(a) มวลเซลล์ไม่เกิดการสลาย

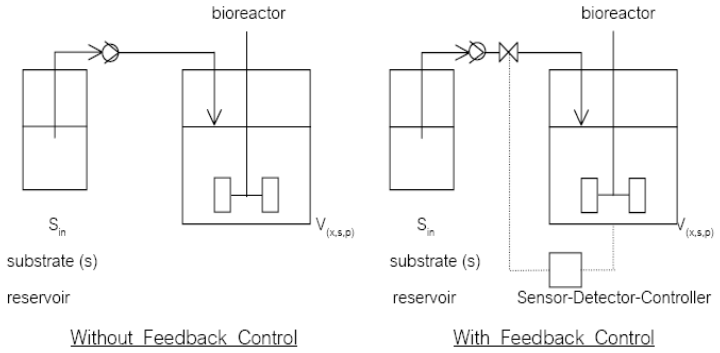
(b) มวลเซลล์เกิดการสลายตัวแล้วเกิดการเจริญแบบคริปติก (Cryptic growth)

(c) จำนวนเซลล์มีชีวิตเมื่อเกิดการสลายตัว

2.5.2 กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ (Fed-batch culture)

มีผู้ได้ให้คำจำกัดความของการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ ว่าเป็นกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหารที่จำเป็นอย่างต่อเนื่องแล้วหยุด หรือใส่เป็นครั้งคราว และไม่มีการดึงเอาสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบจนกว่าสิ้นสุดการหมัก วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ เริ่มต้นใช้ในการผลิตยีสต์ตั้งแต่ประมาณปี 1900 สำหรับควบคุมการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ในการเลี้ยงแบบแบตช์โดยใช้มอลท์เป็นแหล่งคาร์บอน การผลิตยีสต์นี้มีปัญหาอยู่สองประการ คือ ประการแรก ถ้าความเข้มข้นของมอลท์สูงเกินไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีเอทานอลเกดขึ้นแทนการผลิตเป็นชีวมวล ปะการที่สอง คือ ถ้าความเข้มข้นของมอลท์ถูกควบคุมให้น้อยที่สุด การเจริญของยีสต์ก็จะถูกจำกัด ปัญหานี้ได้ถูกแก้โดยการหาวิธีควบคุมการเติมอาหารให้พอเหมาะกับการเจริญ

วิธีการที่จะควบคุมการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ เพื่อให้ง่ายในการใช้งาน มีการแบ่งไว้เป็นสอกลุ่มหลัก คือ with feedback control และ without feedback control ดังแสดงในรูปที่ 6 การเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ จึงอาจมีการเรียกชื่อแตกต่างกัน บางครั้งเรียกว่า semi-batch



รูปที่ 6 การเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์

ที่มา : Asenjo and Merchuk (1995)

3. การทำบริสุทธิ์เอทานอล

การแยกน้ำออกจากเอทานอลจนได้เอทานอลที่ความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ นั้นปัจจุบันมีขบวนการแยก 3 วิธี คือ

3.1 การแยกน้ำโดยการกลั่นด้วยการเติมสารตัวที่ 3

วิธีนี้ใช้พลังงานมากและโดยต้องใช้สารเติมเพื่อแยกเอทานอลจากน้ำ โดยตามหลักทฤษฎีการกลั่นเอทานอลเพื่อให้มีความบริสุทธิ์สูงจะพบปัญหาของการแยกออกจากกันไม่ได้ของน้ำและเอทานอลจุดนี้ เรียกว่า จุดอะซีโอโทรป การกลั่นเอทานอลจึงจำเป็นต้องเติมสารประกอบที่ 3 เพื่อทำให้น้ำแยกออกจากเอทานอลได้ดียิ่งขึ้นสารประกอบนี้ เรียกว่า เอนเทนเนอร์ (Entrainer) ได้แก่ ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane), เบนซีน (Benzene), โทลูอีน (Toluene), อีเทอร์ (Ether) หรือคีโตน (Ketone) วิธีนี้เป็นวิธีที่คิดค้นกันมานานและเป็นที่นิยมใช้กันอย่างมาก ถึงแม้มีข้อเสียอยู่มากมาย ข้อเสียที่สำคัญมากที่สุดคือ ต้องใช้พลังงานมหาศาลในการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่บริสุทธ์มากๆ ข้อเสียถัดมาคือ สารที่ใช้เป็นเอนเทนเนอร์ เป็นสารมีพิษ บางตัวเป็นสารก่อโรคมะเร็ง และแม้ว่าต่อมาจะมีการเปลี่ยนไปใช้สารจำพวกไซโคลเฮกเซนแล้วจึงกลั่นแยกเอทานอลออกมาจากสารที่เติมเข้าไปแต่วิธีนี้ก็ยังมีปัญหาสำคัญที่ต้องต้นทุนสูงอีกด้วย

3.2 การใช้โมเลกูล่าซีฟ

เป็นสารประเภทซีโอไลต์ที่สังเคราะห์ขึ้นซึ่งมีสมบัติพิเศษคือสามารถดูดน้ำในสภาวะที่เย็นและคายน้ำออกเมื่อได้รับความร้อน หลักการของเทคโนโลยีชนิดนี้จะใช้สมบัติพิเศษนี้ในการกำจัดน้ำออกจากเอทานอล โดยยอมให้โมเลกุลน้ำผ่านเข้าไปในโมเลกุลขณะที่โมเลกุลของเอทานอลที่มีขนาดใหญ่กว่าจะผ่านไปไม่ได้ กระบวนการแยกน้ำนี้เริ่มจากการใช้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ในช่วงร้อยละ 92 – 96 ผ่านไปยังปฏิกรณ์ที่บรรจุโมเลกูล่าซีฟภายในเป็นชั้นๆ ประมาณ 2 - 3 ชั้นในแนวขนาน โมเลกุลน้ำจะถูกจับไว้ในขณะที่เอทานอลบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 99.8 - 99.9 จะผ่านลงมาและถูกนำไปยังถังเก็บ หลังจากเสร็จสิ้นจากกระบวนการแยกน้ำ ชั้นของโมเลกูล่าซีฟแต่ละชั้นจะชุ่มไปด้วยน้ำ ซึ่งสามารถทำให้แห้งได้โดยผ่านไอน้ำ (Steam) เพื่อไล่น้ำที่ถูกดูดซับ ข้อดีของเทคโนโลยีนี้ คือ เป็นเทคโนโลยีที่ง่าย ใช้ไอน้ำและพลังงานที่ต่ำ เมื่อเทียบกับวิธีการกลั่นอะซีโอโทรป นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้สารเคมีอื่นๆ มาช่วยในการแยกน้ำ การกำจัดของเสียจึงไม่จำเป็นต้องคำนึงถึง แต่เทคโนโลยีนี้มีข้อเสียตรงที่อัตราการสึกกร่อนหรือเกิดการเน่า (Fouling of media) ของ

โมเลกูล่าซีฟมีค่อนข้างสูง เมื่อมีการใช้งานมากกว่า 5 ปี จำเป็นต้องเปลี่ยนใหม่ ทำให้ค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตค่อนข้างสูง

กระบวนการดูดซับ (Adsorption Process)

เป็นเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้แยกองค์ประกอบที่ต้องการออกจากสารละลายของเหลวหรือแก๊สโดยให้สารละลายดังกล่าวสัมผัสกับสารดูดซับ (Adsorbent) ซึ่งอาจเป็นของเหลวหรือของแข็ง สารดูดซับชนิดหนึ่งๆ มีความสามารถในการดูดซับองค์ประกอบต่างๆ ในสารละลายได้แตกต่างกัน จึงสามารถแยกองค์ประกอบต่างๆ ออกจากกันได้ การจะแยกองค์ประกอบใดออกจากสารละลายนั้นต้องเลือกสารดูดซับให้เหมาะสม

วัสดุหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นสารดูดซับอย่างมีประสิทธิภาพโดยสารดูดซับที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมได้แก่ Activated Carbon, Sillica Gel, Activated Alumina (Alumina Oxide) และ Zeolite (Molecular seive) ซึ่งสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน ขนาดของพื้นที่ผิว ลักษณะการกระจายของ pore size และขนาดของอนุภาคที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ความมีขั้วของสารดูดซับแต่ละชนิดยังเป็นตัวกำหนดชนิดของสารที่จะถูกดูดซับ (Adsorbate) ด้วย โดย คุณสมบัติทางกายภาพของ Adsorbent ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางกายภาพของ Adsorbent ชนิดต่างๆ

Adsorbent	ความพรุน (%)	พื้นที่ผิว (m^2/g)	ปริมาตรช่องว่าง (g/cm^3)	ความหนาแน่นขณะแห้ง (g/cm^3)	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุน (nm)
Activated Carbon	55-75	600-1600	0.80-1.20	0.35-0.50	150-200
Activated Alumina	30-40	200-300	0.29-0.37	0.90-1.00	180-200
Molecular sieve	40-55	600-700	0.27-0.38	0.80	30-90
Silica Gel	70	750	0.40	0.70	220

ที่มา : จิระเดช (2546)

3.3 การแยกน้ำโดยการใช้ขบวนการเพอเวปพอเรชัน (Pervaporation process)

วิธีนี้มีความสะดวก ใช้พลังงานน้อย และได้สารที่บริสุทธิ์เช่นเดียวกับวิธีอื่น และมีส่วนช่วยทางด้านการประหยัดพลังงานและสิ่งแวดล้อม การแยกน้ำโดยกระบวนการเพอเวปพอเรชันอาศัยหลักการองค์ประกอบที่ต่างชนิดกันในสารละลายที่มีความสามารถในการละลาย/แพร่ผ่านเมมเบรน (Membrane) ไม่เท่ากัน หรือกล่าวว่ามีผลต่างของศักยภาพเคมีเป็น แรงขับ (Driving force) ทำให้ในการใช้งานเพอเวปพอเรชันจะใช้ได้ดีในกรณีที่การแยกสารโดยวิธีการกลั่นนั้นทำได้ยากและมีราคาสูงแต่กระบวนการเพอเวปพอเรชันจะไม่มีปัญหาในกรณีนี้ และลดความจำเป็นที่ต้องเติมสารอื่นหรือต้องกำจัดสารอื่น และยังลดการใช้พลังงานในขบวนการมากกว่าการกลั่น หลักการทำงานประสิทธิภาพในการแยกสารละลายผสมผ่านเยื่อแผ่นโดยใช้เทคนิคการซึมผ่าน (Permeation) ของน้ำผ่านแผ่นเยื่อบางในรูปของไอน้ำ ด้วยแรงดึงดูดจากภายนอกที่มีความดันต่ำกว่า (Evaporation) สารที่ผ่านเยื่อแผ่น เรียกว่า เพอมีเอท (Permeate) การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากองค์ประกอบของสารในสารผสมมีความเป็นขั้ว (Hydrophilicity) ต่างกัน ในกรณีของน้ำในเอทานอล น้ำมีความเป็นขั้วที่สูงกว่าเอทานอล ความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อแผ่นของน้ำจึงมีค่าสูงกว่า ขณะที่มีการซึมผ่านของน้ำ ความดันต่ำจากภายนอกจะช่วยดึงน้ำออกมาในรูปของไอน้ำ เมื่อทำการลดอุณหภูมิเพื่อให้ไอน้ำกลั่นตัวเป็นของเหลว

การศึกษากระบวนการแยกน้ำออกจากเอทานอลทั้งในด้านงานวิจัยตลอดจนการใช้งานในภาคอุตสาหกรรม ซึ่งการเลือกใช้กระบวนการทำบริสุทธิ์ใดๆ มักขึ้นอยู่กับค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ต้องการตลอดจนความยากง่ายของกระบวนการและความคุ้มค่าในการลงทุน และเนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการได้เทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการกลั่นเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นและสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงต่อไปจึงเลือกกระบวนการกลั่นแบบรีฟลักซ์ร่วมกับกระบวนการดูดซับเพื่อทำให้เอทานอลที่ได้จากการหมักมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในอนาคต

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Siripattanakul et al. (2010) ศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนโดยการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ที่ถูกตรึงรูปไว้กับเจลแคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate entrapped yeast) โดยการย่อยน้ำทิ้งซึ่งมีแป้งเป็นองค์ประกอบด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นในปริมาตรร้อยละ 0 – 1.0 ร่วมกับการนึ่งในหม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) ที่ 121° C เป็นเวลา 15 นาที ต่อด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 150 rpm ที่

37° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า ในสภาวะที่ใช้กรดร้อยละ 1.0 ในการย่อยแป้งจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดและมากกว่าในตัวอย่างน้ำทิ้งเริ่มต้น 5 เท่า

Lin Y et al. (2012) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 โดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต พบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญและหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45°C แต่จะลดลงเมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50°C และศึกษาค่า maximum sugar conversion ของเชื้อที่ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ 20 40 80 160 และ 300 kg/m^{-3} พบว่า ที่มีค่า maximum sugar conversion เป็นร้อยละ 48 59.9 28.3 13.7 และ 3.7 ตามลำดับ และพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรตไม่ได้ช่วยให้การผลิตเอทานอลเกิดได้ดีขึ้นถ้าไม่มีการควบคุม pH จากการศึกษา พบว่า ช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล คือ pH 4-5 โดยที่ pH 5 จะให้ค่า specific ethanol production rate สูงที่สุดในทุกการทดลองที่เป็นการหมักเอทานอลแบบกะ นอกจากนี้ยังพบว่าในระหว่างการหมักจะเกิดการผลิตกรดอะซิติก (Acetic acid) เมื่อ pH ต่ำกว่า 4.0 ในขณะที่กรดบิวทิริก (Butyric acid) จะเกิดการผลิตเมื่อ pH สูงกว่า 5.0 จากการศึกษาพบว่าในกรณีที่การหมักมีออกซิเจนอยู่ในระบบหรือเป็นระบบมีอากาศ (Aerobic condition) เชื้อยีสต์จะสามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้เมื่อสับสเตรตตัวอื่นหมดไปแต่จะไม่เกิดเหตุการณ์เช่นนี้ขึ้นกับระบบที่ไม่มีอากาศ (Anaerobic condition)

Agu et al. (1997) ศึกษาการย่อยองค์ประกอบในวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังซึ่งประกอบด้วย เซลลูโลส (Cellulose) ลิกนิน (Lignin) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) โดยการใช้กรดร่วมกับความร้อนที่ 120°C ความดัน 1 บรรยากาศเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนที่ได้จากการย่อยไปหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า ที่ความเข้มข้นของกรด 0.3 M สามารถย่อยองค์ประกอบในวัสดุเศษเหลือให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 11.5 g/l และเมื่อทำการหมักเอทานอลในระบบกะในฟราส์ขนาด 5 ลิตร (ปริมาตรที่ใช้หมัก 3 ลิตร) ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 °C พบว่า เชื้อยีสต์สามารถหมักเอทานอลได้ร้อยละ 3.5 โดยปริมาตร การใช้กรดความเข้มข้นสูง (1 - 5 M) จะทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่มากขึ้นแต่จะก่อให้เกิดสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการกำจัดน้ำ (Dehydrating) และการออกซิไดซ์ (Oxidizing) ของกรดซัลฟิวริกกับองค์ประกอบหลังการย่อย ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบจำพวก aldaric acid ซึ่งจัดเป็น sugar acid โดยเฉพาะเฟอฟูรอล (Furfural) ที่เกิดจากน้ำตาลไซโลส (Xylose) รวมไปถึงการเกิดกรดอะซิติก (Acetic acid) และอนุพันธ์จากการย่อยลิกนิน โดยมีรายงาย พบว่า

เฟอฟูรอลเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ dehydrogenese ในวิถีของการย่อยสารอาหาร (Glycolysis) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*.

Wiboon Riansa-ngawong (2011) ศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลและเฟอร์ฟูรอล (Furfural) จากเส้นใยปาล์ม (Palm pressed fiber) โดยการกำจัดลิกนินในเส้นใยปาล์มด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อด้วยการย่อยเฮมิเซลลูโลสในเส้นใยปาล์มด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ได้น้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก จากนั้นนำน้ำตาลที่ได้มาผลิตเฟอร์ฟูรอลด้วยกรดซัลฟิวริกพบว่าที่สภาวะของอัตราส่วนระหว่างสารละลายกรดซัลฟิวริกต่อเฮมิเซลลูโลสเป็น 8 มิลลิลิตรต่อกรัมเฮมิเซลลูโลส กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 150°C เป็นเวลา 90 นาที สามารถผลิตเฟอร์ฟูรอลได้ 0.86 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 3.44 โดยน้ำหนัก (กรัมเฟอร์ฟูรอลต่อกรัมเฮมิเซลลูโลส) เมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสไฮโดรไลเสตด้วยเชื้อยีสต์ *Candida Shehatae* TISTR5843 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5017 และเชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* TISTR405 พบว่า เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5017 สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด โดยในสภาวะพีเอช 5.40 การหมุนเหวี่ยงที่ 137 rpm และใช้เชื้อเริ่มต้น 0.56 g/l จะสามารถผลิตเอทานอลได้ 3.98 g/l และมีค่า ethanol yield เป็น 0.48 g ethanol/g sugar และค่า productivity 0.167 g/l/h

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาคุณสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนต่อการผลิตเอทานอล

ในการศึกษาจะใช้ตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนจากภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งถูกเก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส นำมาศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน ได้แก่ พีเอช (pH meter) บีโอดี (BOD) ค่าซีโอดี (COD) (APHA, AWWA และ WEF, 1998) ไนโตรเจนทั้งหมด (AOAC, 2000) ของแข็งทั้งหมด (Total solid) น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (Liu and Steinbuchel, 1997) และปริมาณแป้ง (Pintado et al, 1999)

2. การเตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น

ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จะถูกเก็บอยู่บน Yeast Malt Agar (YMA) ที่ 4 ^{o}C เพื่อรอการใช้งาน ในการเตรียมเชื้อก่อนการหมักเชื้อจะถูกกระตุ้นโดยการนำมาเลี้ยงใน Yeast Malt Broth (YM Broth) โดยมีการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 35 ^{o}C จนกระทั่งเชื้ออยู่ในช่วง exponential phase ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น ค่าความขุ่น = 0.5 เติมเชื้อเริ่มต้นจากอาหาร YM Broth ร้อยละ10 ลงในอาหารที่จะทำการทดลองต่อไป

3. การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

3.1 ผลของความเข้มข้นของกรดต่อการไฮโดรไลซีส

ไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนโดยเติมน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 98 ในปริมาณร้อยละ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 3 และ 5 โดยปริมาตร นำไปฆ่าเชื้อใน autoclaved ที่ 121^{o}C เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้มากวนผสมบนเครื่องเขย่าชนิด Orbital shaker incubator ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแป้งของตัวอย่างหลังการย่อย

3.2 การศึกษาผลของการกวนผสมน้ำทิ้งหลังการไฮโดรไลซีส

ทำการการไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนโดยเติมน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 98 ในปริมาณที่เหมาะสมตามขั้นตอนที่ 3.1 นำไปฆ่าเชื้อใน autoclaved ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้มากวนผสมด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแป้งของตัวอย่างหลังการย่อยเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้กวนผสมหลังการฆ่าเชื้อ

4. ผลของพีเอชต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

นำน้ำทิ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกในปริมาณที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3 มาปรับพีเอชเป็น 4 5 และ 6 ด้วย NaOH 1 N เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72 เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ด้วย drying method (Dermlim et al., 1999) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography Analysis) (Sura-apinan, 2010) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Clarus 600 Gas Chromatograph ใช้คอลัมน์ชนิด Wax สภาวะในการฉีดตัวอย่างในคอลัมน์คือที่อุณหภูมิ 40, 50, 70 องศาเซลเซียส นาน 3, 3 และ 1 นาที ตามลำดับ โดยใช้แก๊สฮีเลียม (He) เป็นแก๊สพา นำค่าที่ได้จากการทดลองมาใช้ในการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ของการหมัก

5. ผลของอัตราการเขย่าต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

นำน้ำทิ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกในปริมาณที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3 และปรับพีเอชเป็นค่าที่เหมาะสมตามขั้นตอนที่ 4 มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยศึกษาอัตราการเขย่าที่ 0 100 150 และ 250 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่และน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อใช้ในการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ของการหมัก

6. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

นำน้ำทิ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกในปริมาณที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3 และปรับพีเอชเป็นค่าที่เหมาะสมตามขั้นตอนที่ 4 อัตราการเขย่าที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 5 มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรในสภาวะอุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่และน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อใช้ในการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ของการหมัก

7. การหมักเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae*

7.1 1 การออกแบบถังหมัก

ออกแบบถังหมักโดยถังหมักปริมาตรรวม 9 ลิตร และมีปริมาตรใช้งาน 5 ลิตร ทำจากท่ออะคริลิกทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกขนาด 26 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร แผ่นกั้น (Baffle) จำนวน 4 ชิ้นติดอยู่ในถังหมัก ฝาปิดทำด้วยแผ่นอะคริลิก ขนาด 1.5 เซนติเมตร มีช่องสำหรับใส่สาร 1 ช่อง ให้อากาศ 1 ช่อง ช่องสำหรับพีเอชเซนเซอร์ 1 ช่อง ชุดปั่นกวนประกอบด้วยมอเตอร์แบบมีเฟืองทดที่สามารถปรับความเร็วรอบได้ ใบพัดสแตนเลสแบบ 4 – bladed disk turbine จำนวน 2 ใบพัด ติดตั้งแกนหมุนทำจากสแตนเลส มีการควบคุมความเร็วในการปั่นกวนโดยการปรับความต่างศักย์ของไฟฟ้าที่จ่ายเข้ามอเตอร์

7.1.2 ผลของการขยายขนาดถังหมักชีวภาพต่อผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae*

ศึกษาการขยายขนาดการหมักในถังหมักขนาด 9 ลิตร และกำหนดให้ปริมาตรของน้ำหมักรวมเป็น 5 ลิตร เตรียมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นโดยการนำ *Sacchromyces cerevisiae* ที่ขึ้นอยู่บนอาหารวุ้นเอียงซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มา 2 ลูบ (Loop) ถ่ายลงในอาหารเหลว YM broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (Orbital Mixer Incubator) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมถังหมักโดยการล้างและฆ่าเชื้อถังหมักด้วยการนึ่งในเครื่อง autocrave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เตรียมน้ำหมักจากการย่อยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นในปริมาตรที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3 จากนั้นนำมาปรับพีเอช ด้วยด่าง NaOH 5 N และ 20 N จนได้พีเอชที่เหมาะสมตามขั้นตอนที่ 4 โดยใช้น้ำแป้งเริ่มต้น 700 มิลลิลิตร ย่อยในฟราส์ขนาด 1 ลิตร (ทำ 5 ฟราส) เติมน้ำหมักลงถังหมักและ

ต่อด้วยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ตอนต้น เปิดใบพัดของถังหมักให้หมุนที่ 250 รอบต่อนาที ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีการควบคุมพีเอช ดังรูปที่ 7 เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 - 15 มิลลิลิตร ทุก 24 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และร้อยละของเอทานอลในน้ำหมัก

รูปที่ 7 ถังหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

8. การทำบริสุทธิ์เอทานอลด้วยการกลั่น

นำน้ำหมักที่ได้จากขั้นตอนที่ 7 มากลั่นด้วยเครื่องกลั่นแบบเบดบรรจุ (Packed Column Distillation) ยี่ห้อ WISDOM ASIA CO., LTD. รุ่น CT6S SOLID LIQUID EXTRACTION S/N: T50-10/2 ดังรูปที่ 8 โดยทำการกลั่นที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี โดยใช้สภาวะในการฉีดตัวอย่างในคอลัมน์คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 9 นาที และทำการกลั่นซ้ำเพื่อศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอทานอลต่อไป

รูปที่ 8 เครื่องกลั่นเอทานอลแบบเบดบรรจุ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผล

1. การศึกษาคุณสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนจะมีลักษณะสีขาวขุ่นดังรูปที่ 9(a) เนื่องจากเป็นน้ำแป้งที่ผ่านการต้มจนเกิดลักษณะที่เป็นเจล เมื่อลดอุณหภูมิลงและนำตัวอย่างไปเก็บไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียสทำให้แป้งเกิดการเรียงตัวใหม่หรือที่เรียกว่ารีโทรเกรเดชัน (กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยจอมขวัญ, 2543) จนเกิดเป็นเจลแขวนลอยอยู่ในน้ำดังรูปที่ 9(b) เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทิ้งจะได้ผลดังตารางที่ 5 โดยค่าซีโอดีของน้ำทิ้งมีค่า 1,135 mg/L ซึ่งเกินจากมาตรฐานน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม (120 mg/L) จึงจำเป็นต้องบำบัดน้ำทิ้งก่อนปล่อยออกสู่ชุมชน จากตารางที่ 5 พบว่า น้ำทิ้งมีสภาพเป็นกรด คือ มีพีเอช 3.76 และมีปริมาณแป้งเป็น 5.99 g/L ซึ่งสามารถใช้เป็นสับสเตรตในการหมักเอทานอลโดยผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลในขั้นตอนต่อไป

(a) (b)

รูปที่ 9 น้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีน

(a) ตัวอย่างแรกเริ่มที่เก็บมาจากโรงงาน (b) ตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส และทำละลายโดยการตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 5 คุณลักษณะของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

รายการวิเคราะห์	วิธีทดสอบ	หน่วย	ปริมาณ
BOD	5-Day BOD Test	mg/L	440
COD	Photometric Method	mg/L	1,135
TN	Photometric Method	mg/L	600
TS	Dried at 180°C	mg/L	1,581
pH	pH meter	-	3.76
Reducing sugar	Colorimetric method	g/L	0.60
Starch	Iodine method	g/L	5.99

2. การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

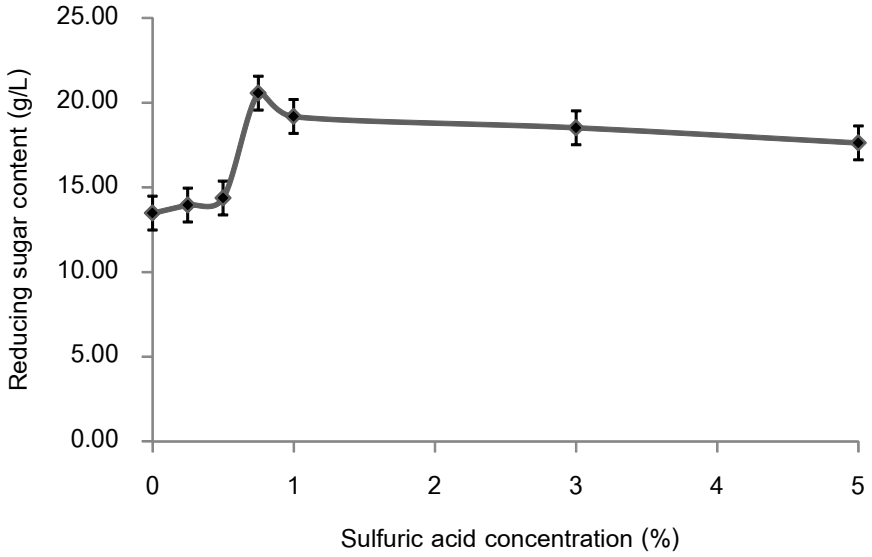
2.1 ผลของความเข้มข้นของกรดต่อการไฮโดรไลซีส

จากการศึกษาการย่อยแป้งในน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นในปริมาณร้อยละ 0 - 5 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของกรดสูงขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงขึ้นด้วย แต่เมื่อความเข้มข้นของกรดสูงกว่า 0.75 ปริมาณน้ำตาลที่ได้กลับลดลง (รูปที่ 10) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Siripattanakul et al. (2010) ที่ได้ศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนและศักยภาพของการตรึงเซลล์ยีสต์สำหรับการผลิตเอทานอล พบว่า ปริมาณกลูโคสที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกรดที่สูงขึ้นตั้งแต่ร้อยละ 0.25 จนถึงร้อยละ 1 และการไฮโดรไลซีสด้วยกรดที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 1 จะมีปริมาณกลูโคสลดลง เนื่องจากกลูโคสจะถูกทำลายด้วยกรด

จากการย่อยแป้งในตัวอย่างน้ำทิ้ง พบว่า หลังการย่อยยังมีส่วนของแป้งที่ยังไม่เป็นน้ำตาลปรากฏเป็นตะกอนอยู่บางส่วน เมื่อนำส่วนตะกอนมาทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนจะเกิดสีส้มอิฐหรือสีน้ำตาลแดงซึ่งน่าจะเป็นองค์ประกอบพวกเดกตรินหรือโมเลกุลที่เล็กกว่าแต่ยังไม่ใช่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่งจะไม่ให้สีเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน (คณาจารย์ภาควิชาเคมี, 2548)

สภาวะในการย่อยแป้งด้วยกรดให้เป็นน้ำตาลมีหลายปัจจัยเป็นตัวกำหนดไม่ว่าจะเป็น ปริมาณแป้งในสารละลาย ลักษณะของน้ำแป้งเริ่มต้น(เม็ดแป้งหรือเจลแป้ง) ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการย่อย อุณหภูมิ ความดันและเวลาในการย่อย ปัจจัยต่างๆ ล้วนมีผลต่อปริมาณน้ำตาล

ที่จะเกิดขึ้น ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างน้ำแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนมาก่อนจากกระบวนการลวกเส้นขนมจีน ดังนั้นแป้งที่อยู่ในสารละลายจึงมีลักษณะที่เป็นเจลเนื่องจากผ่านการนำมาเก็บรักษาไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการนำมาทดลองและมีแป้งบางส่วนที่เกาะตัวกันเป็นก้อนกระจายอยู่ในน้ำแป้งเริ่มต้น จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลหลังการย่อยมีค่าแตกต่างกันบ้าง ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ก็มีผลอย่างมากต่อการย่อย ซึ่งน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนเป็นแป้งที่มีองค์ประกอบของแอมิโลสและแอมิโลเพกทินจากข้าวเจ้า การย่อยของกรดจะเป็นการย่อยแบบสุ่มคือไม่จำเพาะเจาะจงว่าจะย่อยแป้งที่พันธะใดทำให้อนุพันธ์จากการย่อยมีความหลากหลายซึ่งต่างจากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ที่จะมีความจำเพาะต่อพันธะของแป้งที่จะย่อยมากกว่าทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง นอกจากนี้การย่อยด้วยกรดก็อาจก่อให้เกิดองค์ประกอบที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์เช่น อนุพันธ์เฟอฟูรอลเนื่องจากไดแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ที่ถูกไฮโดรไลส์ด้วยกรดได้เป็นมอนอแซคคาไรด์แล้วมอนอแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นนี้เกิดการทำปฏิกิริยากับกรดเข้มข้นจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชัน ซึ่งถ้าเป็นน้ำตาลเพนโทสจะเกิดเฟอฟูรอลส่วนน้ำตาลเฮกโซสจะเกิดอนุพันธ์เฟอร์ฟูรอลเช่น 5 - ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (5-hydroxymethylfurfural) (ศุภวรรณ ตันตยานนท์ และคณะ, 2547)



รูปที่ 10 ผลของความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สำหรับน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีส

จากผลการทดลองจึงเลือกใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้นในปริมาณร้อยละ 0.75 เพื่อใช้ในการย่อยตัวอย่างในขั้นตอนต่อไป

2.2 การศึกษาผลของการกวนผสมน้ำทิ้งหลังการไฮโดรไลซีส

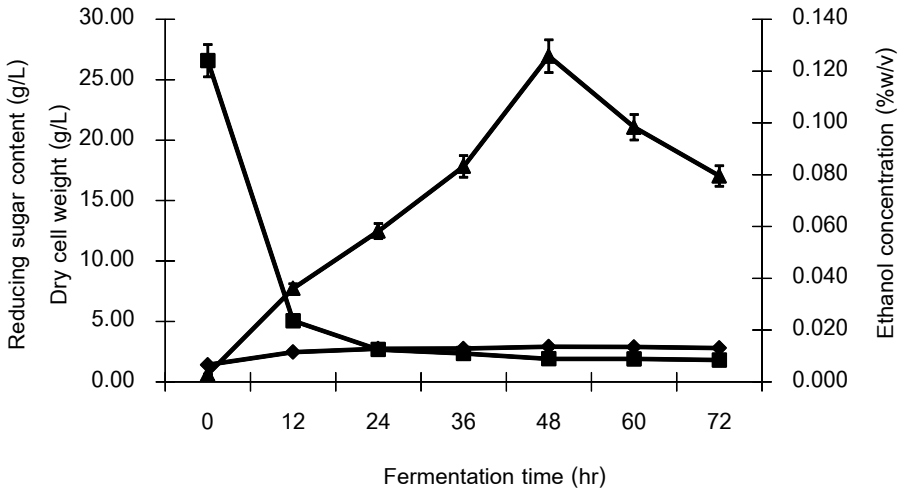
จากการทดลองเปรียบเทียบการย่อยน้ำแป้งด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ต่อด้วยการกวนผสมบนเครื่องเขย่าชนิด Orbital shaker incubator โดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้เขย่าหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ ได้ผลดังตารางที่ 6 พบว่า ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากวิธีทั้งสองไม่แตกต่างกันมากนัก จึงน่าจะลดขั้นตอนการกวนผสมนี้ออกไปเพื่อเป็นการประหยัดพลังงานและเวลาอีกทั้งเป็นการลดความเสี่ยงของการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นก่อนการหมักยีสต์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของการกวนผสมหลังการไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ตัวอย่าง	ปริมาณแป้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาลริดิวซ์ (g/l)
น้ำทิ้งเริ่มต้น	8.051	0.129
น้ำทิ้งหลังไฮโดรไลซีส	0.037	6.405
น้ำทิ้งหลังไฮโดรไลซีสและกวนผสม	0.035	7.625

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน



รูปที่ 11 กราฟแสดงการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จากการหมักน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่อุณหภูมิ 37°C อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที
■ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร); ◆ : น้ำหนักเซลล์แห้ง; ▲ : ร้อยละของเอทานอล

จากรูปที่ 11 จะเห็นได้ว่าในระยะเวลาการหมักช่วง 12 ชั่วโมงแรกเชื้อยีสต์จะเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ใหม่ดังจะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่หลังจากนั้นปริมาณเซลล์และน้ำตาลจะไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมานัก เนื่องจากสับสเตรต คือ น้ำตาลที่เชื้อต้องใช้ในการเจริญเติบโตเหลือน้อยจนเข้าสู่ภาวะคงที่เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมงและคงที่ไปตลอดจนถึง 72 ชั่วโมง ส่วนการผลิตเอทานอล พบว่า เชื้อจะผลิตเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 0.12 กรัมต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนและผลิตผลิตภัณฑ์ขึ้นมาจนมีค่าเอทานอลสูงสุดที่เวลาการหมักนาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเอทานอลที่ผลิตได้จะลดลง

4. ผลของพีเอชต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักซึ่งแสดงด้วยค่าพีเอช พบว่าที่พีเอช 5 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะสามารถหมักเอทานอลได้ดีที่สุดโดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 1.24 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยทั่วไปยีสต์จะโตได้ดีที่พีเอชในช่วง 4.5 – 6.5 แต่ก็สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 3 - 8 นอกจากนี้น้ำหมักที่มีกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติกหรือกรด

แลกติก จะก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้มากกว่าน้ำหมักที่มีกรดอนินทรีย์ เช่น กรดไฮโดรคลอริกหรือกรดฟอสฟอริก เนื่องจากกรดจะไปทำให้การส่งผ่านสารของเซลล์เมมเบรนของยีสต์มีความผิดปกติ (Walker, 1998) ปริมาณของไฮโดรเจนไอออนในการหมักจะส่งผลต่อปริมาณประจุที่เซลล์แมมเบรนของยีสต์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของวัสดุและไอออนที่เซลล์แมมเบรนของยีสต์

ตารางที่ 7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

Parameters	**pH**		
	4	**5**	**6**
Initial substrate concentration (g/L)	20.943	20.892	20.892
Fermentation time (h)	48	48	48
Substrate consumed (%)	96.91	97.07	97.05
Maximum ethanol concentration (g/L)	1.20	1.24	1.22
Maximum cell concentration (g/L)	3.450	3.650	3.630
Volumetric ethanol productivity (Q_P, g/L h)	0.025	0.026	0.025
Ethanol yield ($Y_{P/S}$, g/g)	0.057	0.059	0.058
Cell yield ($Y_{X/S}$, g/g)	0.164	0.175	0.174
Ethanol yield based on biomass ($Y_{P/X}$ in g P/g X)	0.348	0.340	0.336

จากผลการทดลองจึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำหมักที่พีเอช 5 เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

5. ผลของอัตราการเขย่าต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร ในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ พบว่า ที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที เชื้อจะสามารถหมักเอทานอลได้ดีที่สุดโดยสามารถหมักเอ

ทานอลได้สูงสุด 1.34 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 8) หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อสามารถใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตได้ดีเพราะการเขย่าเป็นการช่วยให้ออกซิเจนกระจายในน้ำหมักได้อย่างทั่วถึง

ตารางที่ 8 ผลของอัตราการเขย่าต่อการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

Parameters	Shaking rate (rpm)			
	0	**100**	**150**	**250**
Initial substrate concentration (g/L)	20.285	20.695	20.248	20.026
Fermentation time (h)	48	48	48	48
Substrate consumed (%)	93.30	93.64	96.95	96.94
Maximum ethanol concentration (g/L)	1.10	1.21	1.34	1.30
Maximum cell concentration (g/L)	2.450	2.840	3.680	3.410
Volumetric ethanol productivity (Q_P, g/L h)	0.023	0.025	0.028	0.027
Ethanol yield ($Y_{P/S}$, g/g)	0.054	0.058	0.066	0.065
Cell yield ($Y_{X/S}$, g/g)	0.121	0.137	0.182	0.170
Ethanol yield based on biomass ($Y_{P/X}$ in g P/g X)	0.449	0.426	0.364	0.381

6. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

ผลจากการศึกษา พบว่า อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ของการหมัก *S. cerevisiae* ในน้ำทิ้งขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.75 ปริมาตรต่อปริมาตรด้วยการหมักแบบฟลาสก์เขย่าจะสามารถหมักเอทานอลได้ดีที่สุดโดยมีค่า Q_P, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.030, 0.068, 0.177, 0.386 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) สอดคล้องกับการศึกษาของ Ratanapongleka et al. (2010) พบว่า ประสิทธิภาพของการหมักน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 58.4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตรเท่ากับ 0.259 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

โดยทั่วไปยีสต์ *S. cerevisiae* จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 35 - 43 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ก็อาจเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยภายนอกอื่นๆ เช่นแหล่งคาร์บอน ปริมาณออกซิเจน ปริมาณน้ำในน้ำหมัก (media water potential) ปริมาณเอทานอลในน้ำหมักและสารส่งเสริมการเจริญอื่นๆ (growth factor) (Walker, 1998)

ตารางที่ 9 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

Parameters	Temperature (°C)		
	30	**35**	**40**
Initial substrate concentration (g/L)	21.24	22.65	22.89
Fermentation time (h)	48	48	48
Substrate consumed (%)	96.65	95.10	94.30
Maximum ethanol concentration (g/L)	1.45	1.40	1.25
Maximum cell concentration (g/L)	3.76	3.44	3.60
Volumetric ethanol productivity (Q_P, g/L h)	0.030	0.029	0.026
Ethanol yield ($Y_{P/S}$, g/g)	0.068	0.062	0.054
Cell yield ($Y_{X/S}$, g/g)	0.177	0.152	0.157
Ethanol yield based on biomass ($Y_{P/X}$ in g P/g X)	0.386	0.401	0.347

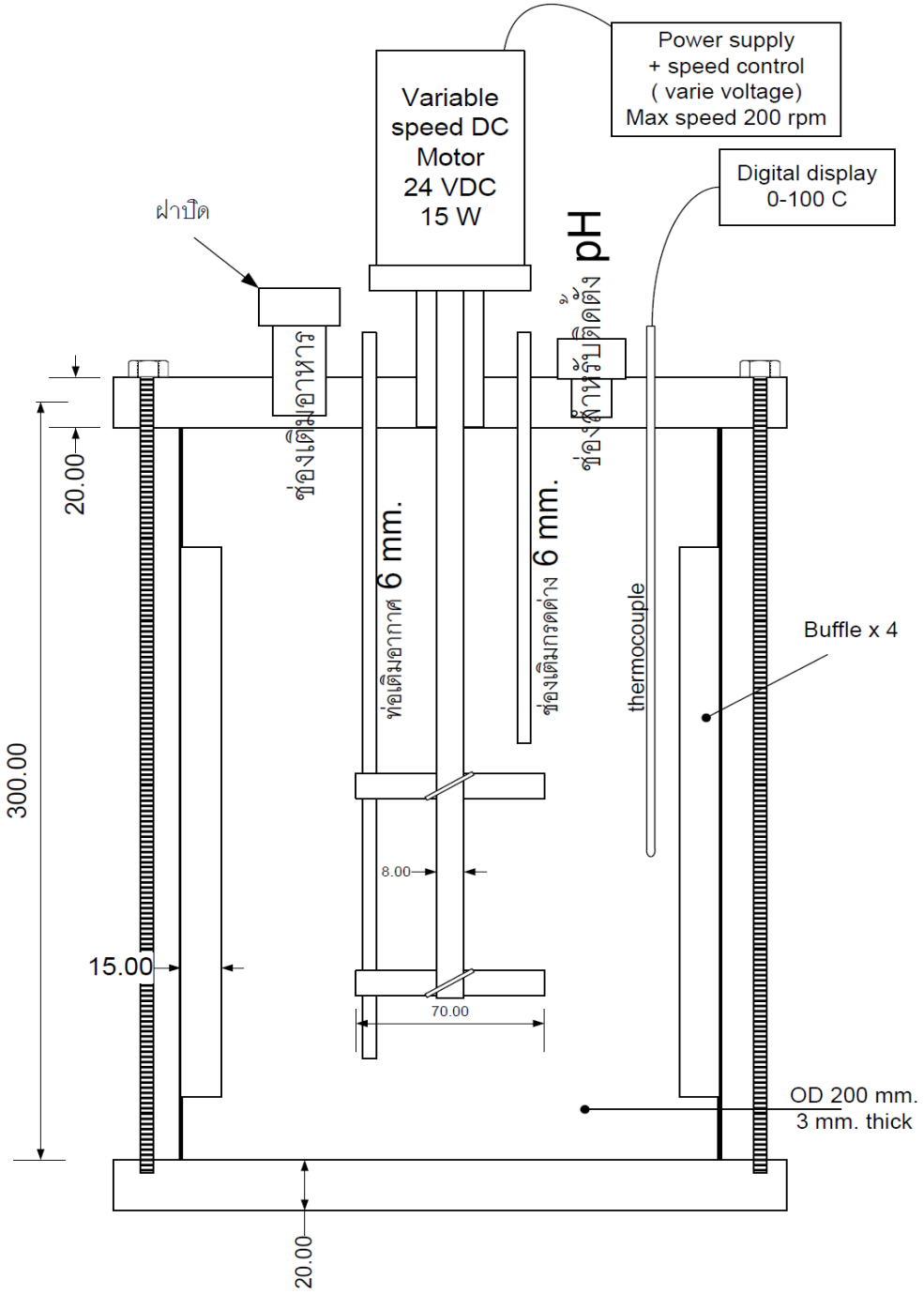
S, substrate (glucose); P, product (ethanol); X, cell mass.

7. การหมักเอทานอลในถังหมักชีวภาพ

7.1 การออกแบบถังหมักชีวภาพ

ออกแบบถังหมักโดยถังหมักปริมาตรรวม 9 ลิตร และมีปริมาตรใช้งาน ลิตร 5 ทำจากท่ออะคริลิกทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 cm เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 26 cm สูง 30 cm มีใบกวนเป็นสแตนเลส มีท่อเติมอากาศและเติมกรด-ด่าง มีแผ่นกั้น (baffle) จำนวน 4 ชิ้นติดอยู่ในถังหมัก ฝาปิดทำด้วยอะคริลิก หนา 2 cm มีช่องสำหรับเติมอาหาร 1 ช่อง ช่องสำหรับ

ติดตั้ง pH 1 ช่อง และช่องใส่ thermocouple 1 ช่องชุดปั่นกวนประกอบด้วยมอเตอร์ที่สามารถปรับความเร็วรอบได้ (max speed 200 rpm) ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 ถังหมักชีวภาพ

7.2 การหมักในถังหมัก

จากการทดลองขยายขนาดการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร ด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักขนาด 9 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลไปเกือบหมดตั้งแต่ 24 ชั่วโมงภายหลังการหมักและสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 0.12 (1.2 กรัมต่อลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 10 และจะหยุดการหมักทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสับสเตรต คือ น้ำตาลมีน้อยเกินไป (0.332 g/l) แม้จะทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปอีก 12 วัน ปริมาณเอทานอลและน้ำตาลก็ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง แสดงว่าเชื้อหยุดการเจริญเติบโตเนื่องจากน้ำหมักมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ กล่าวคือน้ำหมักมีลักษณะทางกายภาพหรือทางเคมีไม่ส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญเติบโตหรือเกิดการหมักเอทานอลได้ เช่น มีสารยับยังการเจริญที่เกิดจากการย่อยแป้งด้วยกรดเป็นต้น

ตารางที่ 10 การหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักขนาด 9 ลิตร

Sample	Ethanol (%)	Reducing sugar (g/l)
0 h	n.d.	4.592
24 h	0.120	0.332
48 h	0.092	0.305
12 days	0.092	0.303

n.d.; not detected

8. การทำบริสุทธิ์เอทานอลด้วยการกลั่น

จากการทดลองนำน้ำหมักของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้จากการหมักน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร ในถังหมักขนาด 9 ลิตร มาทำบริสุทธิ์โดยการกลั่นด้วยเครื่องกลั่นเอทานอลแบบเบดบรรจุได้ผลดังตารางที่ 11 โดยพบว่า การกลั่นที่สภาวะอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะทำให้เอทานอลใน

น้ำหมักมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.092 เป็น 8.214 ในการกลั่นรอบแรกและเมื่อนำมากลั่นซ้ำอีกครั้ง พบว่า ความบริสุทธิ์ของเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 21.299 ซึ่งความบริสุทธิ์ของเอทานอลที่ได้อาจไม่เพียงพอสำหรับจะนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์แต่อาจใช้เพื่อประโยชน์อย่างอื่น เช่น ใช้เป็นตัวทำละลาย ทั้งนี้การที่จะสามารถกลั่นน้ำหมักเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์สูงได้นั้นก็ต้องมาจากน้ำหมักเริ่มต้นที่มีร้อยละของเอทานอลที่ค่อนข้างสูงด้วย เพื่อเป็นการลดต้นทุนและเวลาในการทำบริสุทธิ์ในภายหลัง

ตารางที่ 11 ผลการกลั่นเอทานอลจากการหมักน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สภาวะการกลั่นที่ 120 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Sample	Ethanol (%)
Initial	0.092
First round	8.214
Second round	21.299

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สรุปผลการวิจัย

1.ทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนจะมีลักษณะสีขาวขุ่นและค่าซีโอดีของน้ำทิ้งมีค่า 1,135 mg/L ซึ่งเกินจากมาตรฐานน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม (120 mg/L) พีเอช 3.76 และปริมาณแป้งเป็น 5.99 g/L ซึ่งสามารถใช้เป็นสับสเตรตในการหมักเอทานอลโดยผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล

2.การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งขนมจีนด้วยกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นแตกต่างจะส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร และการหมักน้ำทิ้งขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสแล้วสำหรับผลิตเอทานอล พบว่า ปัจจัยที่ส่งผลต่อการหมัก คือ ค่า pH, อัตราเร็วในการกวนและอุณหภูมิการหมัก

3.การทดลองขยายขนาดการหมักเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร ด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักขนาด 9 ลิตร อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลไปเกือบหมดตั้งแต่ 24 ชั่วโมงภายหลังการหมักและสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 0.12 (1.2 กรัมต่อลิตร)

4.การกลั่นที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง จะทำให้เอทานอลในน้ำหมักมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.092 เป็น 8.214 ในการกลั่นรอบแรกและเมื่อนำมากลั่นซ้ำอีกครั้ง พบว่า ความบริสุทธิ์ของเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 21.299

ข้อเสนอแนะ

1.ควรจะหาวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของแป้งในน้ำทิ้งขนมจีนเพื่อให้การไฮโดรไลซีสได้ปริมาณน้ำตาลที่สูง

2.ควรจะหาวิธีการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกในน้ำทิ้งขนมจีนด้วยเทคนิคอื่นๆ แทนการใช้ autoclave เช่น microwave หรือ ultrasonic

3.ควรจะหาวิธีการกลั่นแบบอื่น เช่น tray distillation เพื่อทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยจอมขวัญ. 2543. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 292 หน้า.

คณาจารย์ภาควิชาเคมี. 2548. คู่มือปฏิบัติการเคมีอินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรมหาวิทยาลัย. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 260.

จิระเดช ฮายุกต์. 2546. การแยกสารผสมเอทานอลน้ำโดยกระบวนการดูดซับ. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ศุภวรรณ ตันตยานนท์ และคณะ. 2547. ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์บนพื้นฐานความปลอดภัยทางเคมีและการลดมลพิษ. บริษัท คิว พริ้นท์ แมเนจเม้นท์ จำกัด 120/347 ถ.นนทรี แขวงช่องนนทรี เขตยานนาวา กรุงเทพฯ.

วรรณา ตุลยธัญ. 2549. เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พิมพ์ครั้งที่ 1

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536. ยีสต์และชีวเคมีการหมักเอทิลแอลกอฮอล์. ในเทคนิคการหมักแบบ fed batch และการประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 1-6.

Agu, R. C., Amadife, A. E., Ude, C. M., Onyia, A., Ogu, E. O., Okafor, M. and Ezejiofor, E. 1997. Combined Heat Treatment and Acid Hydrolysis of Cassava Grate Waste (CGW) Biomass for Ethanol Production. Waste Management, 17: 91-96.

Aiba, S., Humphrey, A. and Millis, S. 1973. Biochemical engineering. Academic press.

A.O.A.C. 2000. Official methods of analysis. Association of official analytical chemist. 17th ed. Gaitherburg, Maryland, U.S.A.

Asenjo, J.A. and Merchuk, J. 1995. Bioreactor system design. Marcel Dekkar. Inc.

Bazas, Z.S., Dallmann, K. and Szajani, B. 1989. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Biotechnology and Bioengineering, 34: 882 – 884.

Brown, S.W., Oliver, S.G., Harriso, D.E.F. and Righelato, R.C. 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. Applied Microbiology and Biotechnology, 11: 151 – 155.

Dermlim, W., Prasetsan, P., Doelle, HW. 1999. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella sp*. Applied Microbial and Biotechnology, 52: 698-703.

Dubois, M., Gilles, KA., Hamilton, JK., Rebers, PA., Smith, F. 1956. Colormetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.

http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0350/gelatinization

http :// www.dede.go.th

Jones, R.P., Pamment, N. and Greenfield, P.F. 1981. Alcohol fermentation by yeasts the effect of environmental and other variables. Process Biochemistry, 16(3): 42 – 49.

Kim, S. and Dale, B.E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crop and crop residues. Biomass and Bioenergy, 26: 361 – 375.

Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S. and Kong, H. 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. Biomass and Bioenergy (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019.

Liu, S., Steinbuchel, A. 1997. Investigation of poly (β-L-malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans*. Applied Microbiology and Biotechnology, 46: 273-278.

Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid as reagent for determination of reducing sugar. Anal, Chem. 31: 426-428.

Paturau, J.M. 1987. By – products of cane sugar industry. Amsterdams: Elsevier.

Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1970. Yeast technology. The yeast vol. 3. London: Academic Press.

Siripattanakul-Ratpukdi, S. 2012. Ethanol production potential from fermented rice noodle wastewater treatment using entrapped yeast cell sequencing batch reactor. Applied Water Science, 2: 47-53.

Siripattanakul, S., Ratanapongleka, K., Sangthean, P., Yoottachana, K. and Pimwongnok, K. 2010. Fermented Rice Noodle Wastewater Treatment and Ethanol Production Potential Using Entrapped Yeast Cells. Water Practice & Technology, 5 no 3: 1-7.

Sura-apinan P, Development of chromatographic methods to investigation the purification process of lactic acid from lactic acid bacteria, MSc Thesis, Prince of Songkla University, Thailand (2010).

Swain, M.R., Kar, S., Sahoo, A.K. and Ray, R.C. 2007. Ethanol fermentation of mahula (Madhuca latifolia L.) flowers using free and immobilized yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiological Research, 162: 93-98.

Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. and Higton, G. 2001. Fuels and industrial chemicals. Industrial microbiology: an introduction. London: Blackwell science.

Walker, Graeme M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England.

Wiboon Riansa-ngawong. 2011. Bioethanol and Furfural Production from Palm Pressed Fiber. Thesis for the degree of docter of philosophy in Biotechnology Prince of Songkla University.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1. การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-ซัลเฟต (ดัดแปลงจาก Dubios, et al. 1956)

หลักการ

สารคาร์โบไฮเดรตซูโครส จะถูกย่อยสลายด้วยสารละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นให้เป็น Monosaccharide และเปลี่ยนเป็น Hydroxymethyl Sulfuraldehyde โดย Hydroxymethyl ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับฟีนอลเกิดสีที่สามารถวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง

1. อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร

2.สารเคมี

1) สารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังเพราะอาจจะทำให้เกิดมะเร็งได้ และควรเก็บสารเคมีดังกล่าวไว้ในที่เย็นเสมอ)

2) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

3) สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/ml เตรียมโดยชั่งกลูโคสที่อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

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

2) ใส่สารละลายตัวอย่างต่อแบลงค์ หรือสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วพร้อมกัน เขย่าให้เข้ากัน

5) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หรือจนเย็น

6) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร โดยเทียบจากแบลงค์ ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

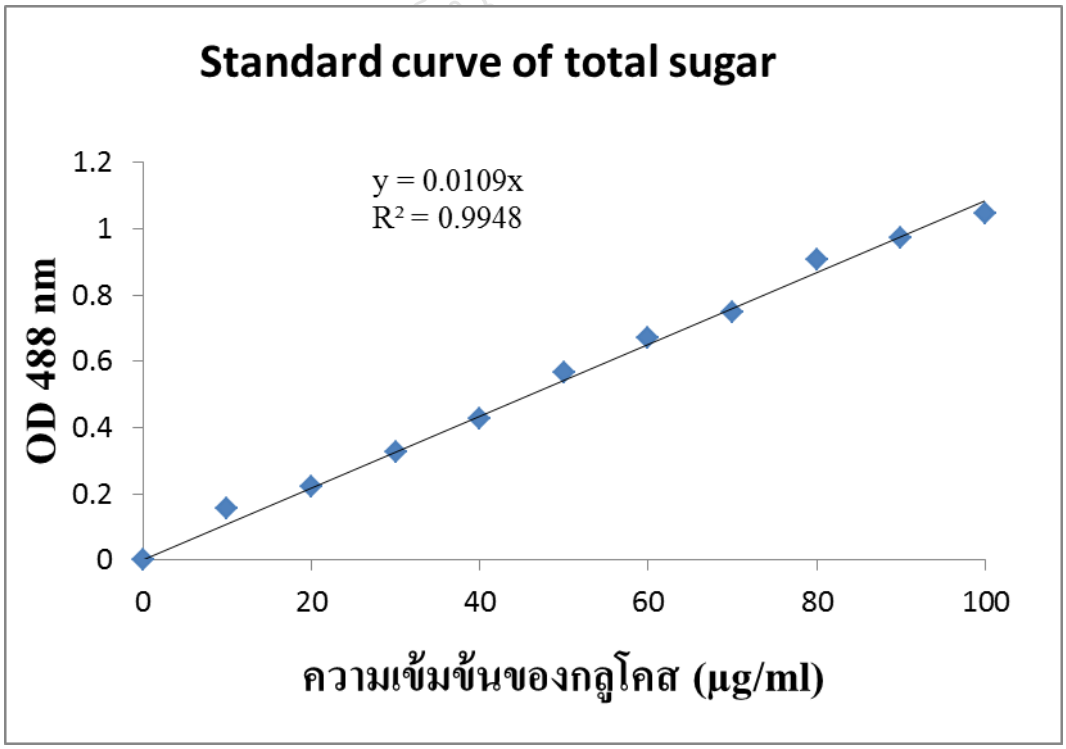
1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วพร้อมกัน เขย่าให้เข้ากัน (โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วกว่าการค่อย ๆ ปล่อยลงข้าง ๆ)

3) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หรือจนเย็น

4) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร

5) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน



2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Glucose analysis) โดยวิธีดีเอนเอส (Dinitrosalicylic colorimetric method) ตามวิธีการของ Miller (1959)

1. สารเคมี

1.1 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0 % เตรียมโดยชั่ง DNS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 ml เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 ml) คนให้ละลายเข้ากนจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม เติม sodium sulphite 0.5 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 ml เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมชั่งกลูโคสมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0 – 1.0 mg/ml ดังนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

หลอดที่	สารละลายกลูโคส(ml)	น้ำกลั่น(ml)	ความเข้มข้นของกลูโคส(mg/ml)
1	0	1.0	0
2	0.1	0.9	0.1
3	0.2	0.8	0.2
4	0.3	0.7	0.3
5	0.4	0.6	0.4
6	0.5	0.5	0.5
7	0.6	0.4	0.6
8	0.7	0.3	0.7
9	0.8	0.2	0.8
10	0.9	0.1	0.9
11	1.0	0	1.0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

2. วิธีการ

1) ดูดสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (0.0 – 1.0 mg/ml) ที่ต้องการวิเคราะห์ 1.0 ml ลงในหลอดทดลอง

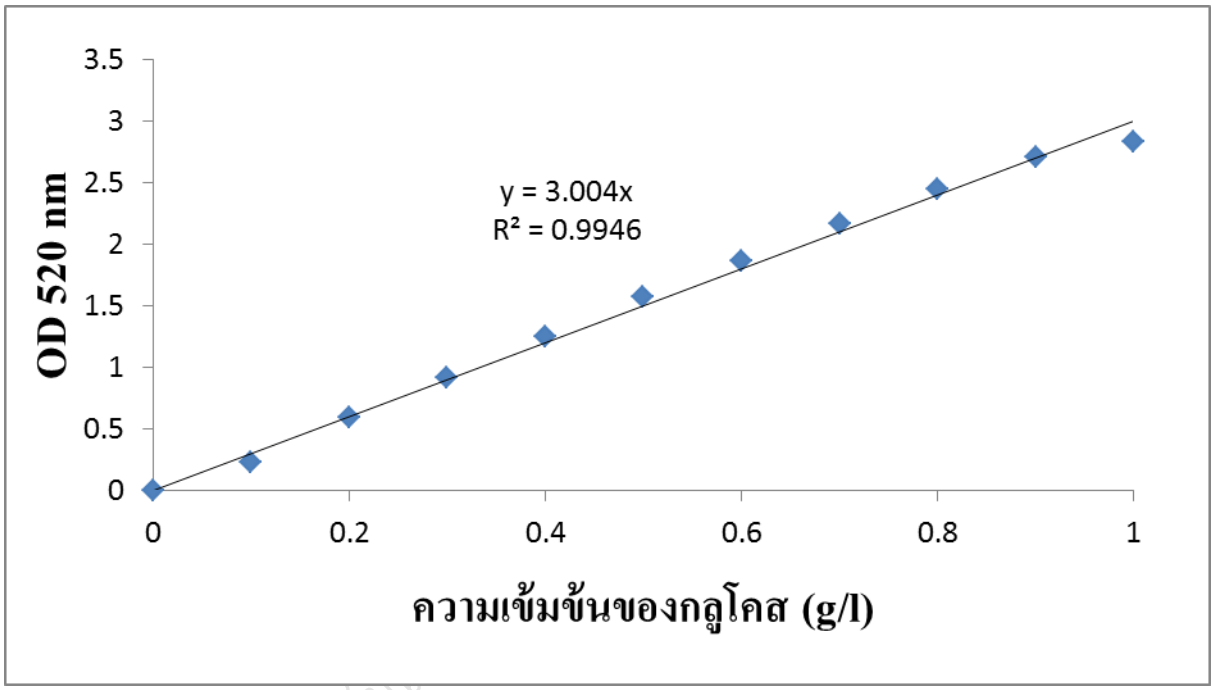
2) เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.0 ml

3) ปิดฝาหลอดโดยคลายเกลียวให้หลวมแล้วนำหลอดไป ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4) แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็นทันทีเป็นเวลา 5 นาที

5) เติมน้ำกลั่น 5 ml ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

6) นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง



มหาวิทยาลัย

3. การวิเคราะห์หาปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ตามวิธีของ Pintado et al. (1999)

1.สารเคมี

1) ไอโอดีน

2) โพแทสเซียมไอโอไดด์

2.วิธีการ

1) การเตรียมสารละลายไอโอดีน (Iodine Solution) ชั่งโพแทสเซียม 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 ml เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง นำไปเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 4:100 ก่อนใช้

3.วิธีการวิเคราะห์

1) วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของแป้ง

ก. เตรียมสารละลายแป้งให้มีความเข้มข้น 0, 01, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 mg/ml

ข. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสมปริมาตร 0.1 ml ลงในหลอดทดลอง (blank ใช้น้ำกลั่น 0.1 ml แทน)

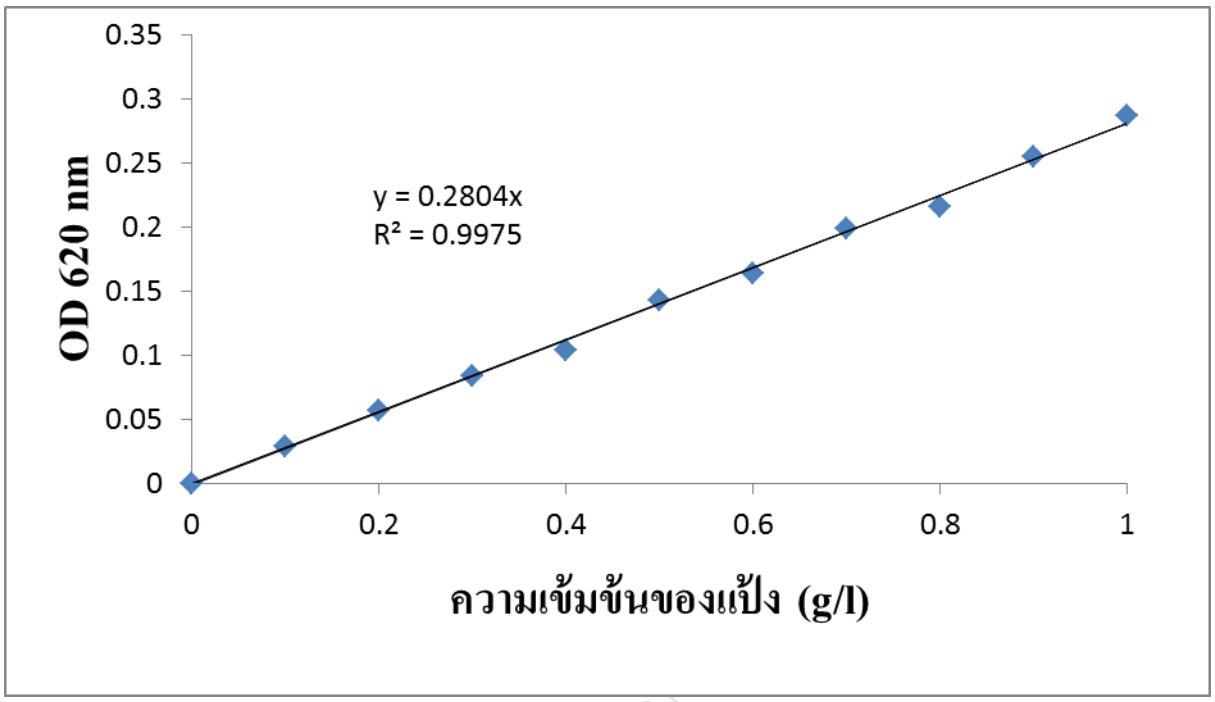
ค. เติมสารละลายไอโอดีนปริมาตร 2.4 ml เขย่าให้เข้ากัน

ง. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

จ.นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

2) วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสมปริมาตร 0.1 ml ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งเช่นเดียวกันกับข้อ 1)



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชม

ภาคผนวก ข
การเผยแพร่ผลงานวิจัย

ฌานิกา แซ่แง่ ชูกลิ่น และสุภาษิต ชูกลิ่น. 2558. การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งขนมจีนสำหรับการผลิตเอทานอล. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53, 3 – 6 กุมภาพันธ์ 2558, คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งขนมจีนสำหรับผลิตเอทานอล

Hydrolysis of Rice Noodle Wastewater for Ethanol Production

ฌานิกา แซ่แง่ ชูกลิ่น[1*] และ สุภาษิต ชูกลิ่น[2]

Chanika Saenge Chooklin[1*] and Supasit Chooklin[2]

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาศักยภาพของการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งขนมจีนด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ขั้นตอนแรกเป็นการไฮโดรไลซีสเพื่อย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลสำหรับหมักด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0-1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่า กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด 20.56 กรัมต่อลิตร ขั้นตอนต่อมาเป็นการผลิตเอทานอลแบบกะ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการหมักจะประกอบด้วย pH 5.0, อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 30°C ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จะมีผลได้ของเอทานอล ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.059, 0.066 และ 0.068 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

ABSTRACT

The potential of bioethanol production from fermented rice noodle effluent by *Saccharomyces cerevisiae* is presented in this study. The first step on production was hydrolysis with sulfuric acid to break down the starch to fermentable sugars. Sulfuric acid concentration ranged from 0-1% (v/v) was tested. The optimum concentration was 0.75% (v/v). Under these conditions, the highest reducing sugar was obtained 20.56 g/L. The next step was bioethanol fermentation in batch mode. Optimization of batch culture conditions showed the optimum conditions for ethanol production in 250 mL Erlenmeyer flask are as follows: initial pH, 5.0; agitation speed, 150 rpm and temperature, 30°C. The ethanol yield ($Y_{P/S}$) produced under these conditions was 0.059, 0.066 and 0.068 g/g, respectively.

Key words: hydrolysis, rice noodle fermented, wastewater, ethanol

*Corresponding author, e-mail address: **anne_1357@hotmail.com**

[1]สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

[2]สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

คำนำ

สถานการณ์วิกฤตพลังงานเนื่องจากราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกที่ได้พุ่งสูงขึ้นในปัจจุบันได้ส่งผลกระทบต่อภาคเกษตรกรรม พาณิชยกรรมและอุตสาหกรรมไทยเป็นอย่างมาก จากราคาน้ำมันดิบที่สูงขึ้นจะทำให้ต้นทุนในการผลิตสินค้าและบริการเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากพลังงานเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นต่อกิจกรรมทุกๆ อย่างทั้งทางเศรษฐกิจ สังคม และการเมือง อย่างไรก็ตามการจัดหาให้ได้พลังงานมาและการนำพลังงานไปใช้ล้วนแต่ต้องอาศัยการลงทุนปริมาณมากด้วย ดังเช่น สำนักงานพลังงานสากลหรือ EIA (International Energy Agency) ได้ประมาณการไว้ว่าในช่วงปี 2544 – 2573 (ค.ศ 2001 – 2030) โลกต้องลงทุนในกิจการพลังงานถึง 640 ล้านล้านบาท โดยร้อยละ 60 (384 ล้านล้านบาท) ของการลงทุนดังกล่าวจะเป็นการลงทุนในกิจการไฟฟ้า ทั้งในส่วนของการผลิตไฟฟ้า และการสร้างสายส่งสายจำหน่ายไฟฟ้า ส่วนที่เหลือจะเป็นการลงทุนในระบบการผลิตพลังงานรูปแบบอื่นๆ ซึ่งรวมถึงการผลิตพลังงานที่ใช้ในระบบการขนส่ง สำหรับการผลิตพลังงานที่ใช้ในการขนส่งนั้นยังคงเน้นหนักไปในเรื่องของการหาพลังงานเพื่อมาทดแทนน้ำมัน ดังนั้นประเทศต่างๆ จึงทำการคิดค้นและวิจัยเพื่อนำน้ำมันที่สกัดได้จากพืชมาใช้เป็นพลังงานทดแทน (http:// www.dede.go.th)

การที่จะขยายผลแผนยุทธศาสตร์พลังงานให้ประสบความสำเร็จตามเป้าประสงค์ที่กำหนดได้นั้น รัฐบาลอาจจำเป็นต้องปรับกลยุทธ์ด้านการใช้พลังงานน้ำมันเพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศโดยรวม ด้วยการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างมีประสิทธิภาพ ประกอบกับการนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่มีอยู่แล้วนำมาพัฒนาต่อยอดมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยยกระดับศักยภาพในการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ เพื่อสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนหรือเป็นพลังงานเสริมซึ่งเป็นพลังงานอีกทางเลือกหนึ่ง จะเป็นการช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายน้ำมันที่รัฐต้องนำเข้ามาใช้เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมของประเทศ

เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่สำคัญ และนับวันจะยิ่งมีบทบาทและมีความสำคัญเพิ่มขึ้นตามลำดับ สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิดรวมถึงผลผลิตและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานที่มีองค์ประกอบของน้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส เช่น ชานอ้อย กากน้ำตาลและน้ำทิ้งขนมจีน เป็นต้น สารตั้งต้นที่ถูกนำมาใช้ในการหมักเอทานอลจึงควรเป็นสารตั้งต้นที่ราคาถูกโดยเฉพาะน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

โรงงานผลิตขนมจีนเป็นกิจการที่มีอยู่ทั่วประเทศทั้งในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือน ขนาดย่อมและขนาดใหญ่ กระบวนการผลิตขนมจีนก่อให้เกิดน้ำทิ้งที่มีสารอินทรีย์ปนเปื้อนปริมาณที่สูง (COD:

11,400-29,000; BOD: 9,462-23,200; pH: 3.5-4.0) หากโรงงานระบายน้ำทิ้งดังกล่าวลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะจะส่งผลต่อคุณภาพน้ำและระบบนิเวศวิทยาทางน้ำ รวมทั้งยังเกิดกลิ่นเหม็นรบกวนสร้างความเดือดร้อนให้ชาวบ้านใกล้เคียง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องบำบัดน้ำทิ้งดังกล่าวก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ปัจจุบันโรงงานผลิตขนมจีนขนาดใหญ่ส่วนมากได้ติดตั้งระบบบำบัดน้ำเสียและสามารถควบคุมคุณภาพน้ำทิ้งได้ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของกรมโรงงานอุตสาหกรรม แต่การผลิตขนมจีนในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือนและขนาดย่อมยังทำให้เกิดปัญหาต่อคุณภาพสิ่งแวดล้อมดังที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น เนื่องจากผู้ผลิตขนมจีนในระดับดังกล่าวขาดแคลนความรู้ เทคโนโลยี และเงินทุนสำหรับการบำบัดน้ำเสีย (Siripattanakul-Ratpukdi, 2012)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนด้วยกรดซัลฟิวริกและผลของ pH อุณหภูมิการหมักและอัตราการกวนผสมของการหมักน้ำทิ้งขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสต่อการผลิตเอทานอล

อุปกรณ์และวิธีการ

น้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

น้ำทิ้งโรงงานขนมจีนได้จากโรงงานผลิตขนมจีนในจังหวัดนครศรีธรรมราช น้ำทิ้งโรงงานขนมจีนจะมีลักษณะดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Fermented rice noodle wastewater characteristics

รายการวิเคราะห์	วิธีทดสอบ	หน่วย	ปริมาณ
BOD	5-Day BOD Test	mg/L	440
COD	Photometric Method	mg/L	1,135
TN	Photometric Method	mg/L	600
TS	Dried at 180°C	mg/L	1,581
pH	pH meter	-	3.76
Reducing sugar	Colorimetric method	g/L	0.60
Starch	Iodine method	g/L	5.99

การเตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้จากสถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สายพันธุ์จะถูกเก็บอยู่บน Yeast Peptone Dextrose Agar (YPDA) ที่ 4 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

เซลล์จะถูกกระตุ้นและบ่มใน YPD medium โดยมีการกวน 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้ออยู่ในช่วง exponential phase ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 เติมเชื้อเริ่มต้นจากอาหาร YPD ร้อยละ10 ลงในอาหารที่จะทำการทดลองต่อไป

การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนโดยเติมน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตร นำไปฆ่าเชื้อใน autoclaved ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้มากวนผสมด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วย phenol sulphuric acid method (Dubois, 1956)

การผลิตเอทานอลด้วยการหมัก

เลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* ในแหล่งน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนแบบกะปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับระดับพีเอช 4, 5 และ 6 อุณหภูมิในการหมัก 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส และการกวนผสมด้วยความเร็ว 0, 100, 150 และ 250 รอบต่อนาที คำนวณค่าจลนพลศาสตร์ (cellular yield coefficient ($Y_{x/s}$), conversion yield of substrate to product ($Y_{p/s}$), และ maximum productivity (R_m)) ตามสมการ (1) – (3)

$$Y_{P/S} = \text{Ethanol}/\Delta S \qquad (1)$$

$$R_m = \text{Ethanol/time} \qquad (2)$$

$$Y_{X/S} = \Delta X/\Delta S \qquad (3)$$

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนสำหรับผลิตเอทานอล

โดยทั่วไปการไฮโดรไลซีสสามารถทำได้ 2 ลักษณะ คือ การใช้กรดหรือเอนไซม์ งานวิจัยนี้เลือกใช้กรดเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและสะดวกในการใช้งานจริง โดยการศึกษาขั้นตอนนี้เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนสำหรับเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล การพิจารณาความเหมาะสมมุ่งเน้นให้ได้ปริมาณกลูโคสสูงที่สุด จากผลการทดลองแสดง พบว่าการไฮโดรไลซีสที่ความเข้มข้นของกรดสูงขึ้นส่งผลให้ค่ากลูโคสสูงขึ้นจนถึงความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกร้อย

ละ 0.75 โดยปริมาตร เนื่องจากกรดทำลายพันธะของแป้งซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.75 ให้ปริมาณกลูโคสสูงที่สุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปเลือกใช้การไฮโดรไลซีสที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.75 โดยปริมาตร ผลการศึกษาการไฮโดรไลซีสที่พบในงานวิจัยนี้มีลักษณะแนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของ Siripattanakul et al. (2010) ศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนและศักยภาพของการตรึงเซลล์ยีสต์สำหรับการผลิตเอทานอล พบว่า ปริมาณกลูโคสที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกรดที่สูงขึ้นตั้งแต่ร้อยละ 0.25 จนถึงร้อยละ 1 การไฮโดรไลซีสด้วยกรดที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 1 จะมีปริมาณกลูโคสลดลง เนื่องจากกลูโคสจะถูกทำลายด้วยกรด

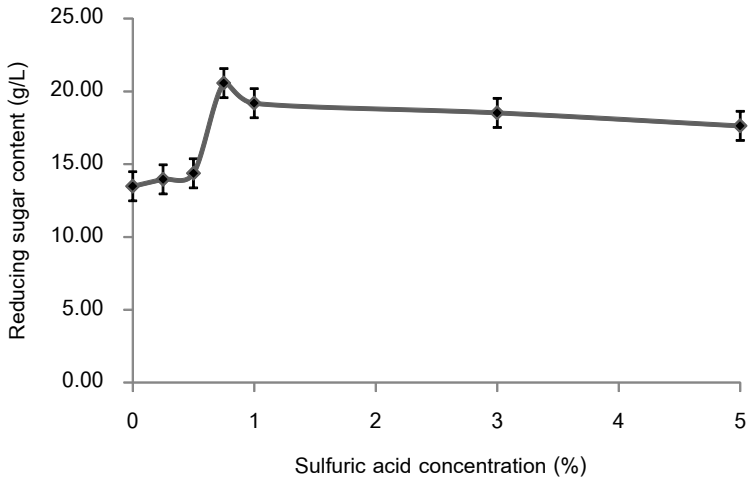


Figure 1 Effect of acid concentration on reducing sugar

ผลของระยะเวลาการหมักน้ำทิ้งขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีส (กรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.75 ปริมาตรต่อปริมาตร) ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ต่อน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของเอทานอล แสดงดังรูปที่ 2 พบว่า เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลง แต่น้ำหนักเซลล์แห้งและเอทานอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนและผลิตผลิตภัณฑ์ขึ้นมาจนมีค่าเอทานอลสูงสุดที่เวลาการหมักนาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเอทานอลที่ผลิตได้จะลดลง

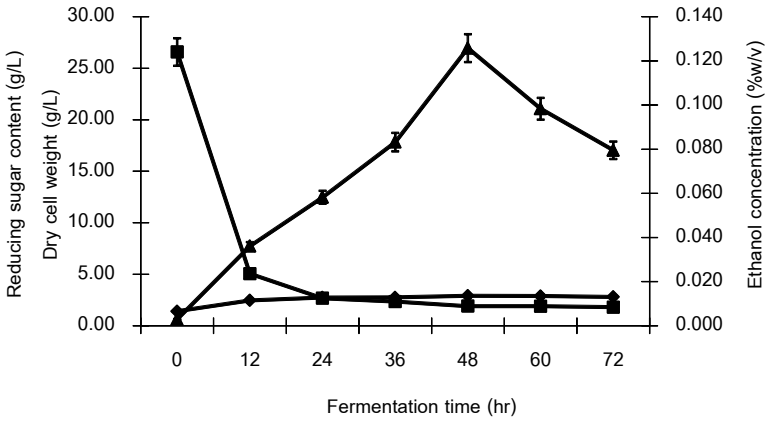


Figure 2 The tine course of cell growth and ethanol production from fermented rice noodle wastewater by *S. cerevisiae* at 37°C and 150 rpm.

■: Reducing sugar; ◆: dry cell; ▲: ethanol concentration

ผลของ pH

ผลจากการศึกษา พบว่า pH เท่ากับ 5 ของการหมัก *S. cerevisiae* ในน้ำทิ้งขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.75 ปริมาตรต่อปริมาตรด้วยการหมักแบบฟลาสก์เขย่าจะสามารถหมักเอทานอลได้ดีที่สุดโดยมีค่า Q_P, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S,}$ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.026, 0.059, 0.175, 0.340 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยทั่วไปปริมาณของไฮโดรเจนไอออนในการหมักจะส่งผลต่อปริมาณประจุที่เซลล์แมมเบรนของยีสต์มีผลทำให้ส่งผลต่อเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของวัสดุและไอออนที่เซลล์แมมเบรนของยีสต์ (Dodic et al., 2009)

Table 2 Effect of the initial pH on kinetic parameter of ethanol production

Parameters	pH		
	4	5	6
Initial substrate concentration (g/L)	20.943	20.892	20.892
Fermentation time (h)	48	48	48
Substrate consumed (%)	96.91	97.07	97.05
Maximum ethanol concentration (g/L)	1.20	1.24	1.22
Maximum cell concentration (g/L)	3.450	3.650	3.630
Volumetric ethanol productivity (Q_P, g/L h)	0.025	0.026	0.025
Ethanol yield ($Y_{P/S}$, g/g)	0.057	0.059	0.058
Cell yield ($Y_{X/S}$, g/g)	0.164	0.175	0.174
Ethanol yield based on biomass ($Y_{P/X}$ in g P/g X)	0.348	0.340	0.336

S, substrate (glucose); P, product (ethanol); X, cell mass.

ผลของอัตราการกวน

ผลจากการศึกษา พบว่า อัตราการกวนเท่ากับ 150 รอบต่อนาที ของการหมัก *S. cerevisiae* ในน้ำทิ้งขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.75 ปริมาตรต่อปริมาตรด้วยการหมักแบบฟลาสก์เขย่าจะสามารถหมักเอทานอลได้ดีที่สุดโดยมีค่า Q_P, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S,}$ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.028, 0.066, 0.182, 0.364 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

Table 3 Effect of the agitation rate on kinetic parameter of ethanol production

Parameters	Agitation rate (rpm)			
	0	100	150	250
Initial substrate concentration (g/L)	20.285	20.695	20.248	20.026
Fermentation time (h)	48	48	48	48
Substrate consumed (%)	93.30	93.64	96.95	96.94
Maximum ethanol concentration (g/L)	1.10	1.21	1.34	1.30
Maximum cell concentration (g/L)	2.450	2.840	3.680	3.410
Volumetric ethanol productivity (Q_P, g/L h)	0.023	0.025	0.028	0.027
Ethanol yield ($Y_{P/S}$, g/g)	0.054	0.058	0.066	0.065
Cell yield ($Y_{X/S}$, g/g)	0.121	0.137	0.182	0.170
Ethanol yield based on biomass ($Y_{P/X}$ in g P/g X)	0.449	0.426	0.364	0.381

S, substrate (glucose); P, product (ethanol); X, cell mass.

ผลของอุณหภูมิ

ผลจากการศึกษา พบว่า อุณหภูมิเท่ากับ 30°C ของการหมัก *S. cerevisiae* ในน้ำทิ้งขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.75 ปริมาตรต่อปริมาตรด้วยการหมักแบบฟลาสก์เขย่าจะสามารถหมักเอทานอลได้ดีที่สุดโดยมีค่า Q_P, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S,}$ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 0.030, 0.068, 0.177, 0.386 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการศึกษาของ Ratanapongleka et al. (2010) พบว่าประสิทธิภาพของการหมักน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 58.4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการผลิตเอทานอลเชิงปริมาตรเท่ากับ 0.259 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

Table 4 Effect of the temperature on kinetic parameter of ethanol production

Parameters	Temperature (°C)		
	30	35	40
Initial substrate concentration (g/L)	21.24	22.65	22.89
Fermentation time (h)	48	48	48
Substrate consumed (%)	96.65	95.10	94.30
Maximum ethanol concentration (g/L)	1.45	1.40	1.25
Maximum cell concentration (g/L)	3.76	3.44	3.60
Volumetric ethanol productivity (Q_p, g/L h)	0.030	0.029	0.026
Ethanol yield ($Y_{P/S}$, g/g)	0.068	0.062	0.054
Cell yield ($Y_{X/S}$, g/g)	0.177	0.152	0.157
Ethanol yield based on biomass ($Y_{P/X}$ in g P/g X)	0.386	0.401	0.347

S, substrate (glucose); P, product (ethanol); X, cell mass.

สรุป

การไฮโดรไลซีสน้ำทิ้งขนมจีนด้วยกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นแตกต่างจะส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ และการหมักน้ำทิ้งขนมจีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสแล้วสำหรับผลิตเอทานอล พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการหมัก คือ ค่า pH, อัตราเร็วในการกวนและอุณหภูมิการหมัก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมงและคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่สนับสนุนทุนและเครื่องมือในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Dodic, S., S. Popov, J. Dodic, Z. Rankovic, R. Zavargo and M. Jevtic. 2009. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. **Biomass and Bioenergy** 33: 822.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith, 1956. Colormetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28: 350-356.

http:// www.dede.go.th

Siripattanakul-Ratpukdi, S. 2012. Ethanol production potential from fermented rice noodle wastewater treatment using entrapped yeast cell sequencing batch reactor. **Applied Water Science** 2: 47-53.

Siripattanakul, S., K. Ratanapongleka, P. Sangthean, K. Yoottachana and K. Pimwongnok. 2010. Fermented rice noodle wastewater treatment and ethanol production potential using entrapped yeast cells. **Water Practice & Technology** 5: 1-8.

Ratanapongleka, K., Siripattanakul, S., Suvannapen, W. and Tummavong, J. 2010. Utilization of fermented rice noodle effluents for bioethanol production. **International Journal of Chemical and Environmental Engineering** 1: 13-17.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย