สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ โดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบแพคเบด

(The Optimal Conditions of Ethanol Production from Aquatic Plants by Using Packed-bed Bioreactor)

เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์* รัชพล พะวงศ์รัตน์*

*คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
1 หมู่ 6 ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ ได้แก่ ผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการหมักแบบกะซ้ำในถังหมักชีวภาพแบบแพคเบดโดยใช้ยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปบนอัลจิเนต และชานอ้อย ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการไหล (1, 1.5, 2 มิลลิลิตรต่อนาที) และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (200, 220, 240 กรัมต่อลิตร) ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล จากการศึกษาที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด ($p<0.05$) โดยได้จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 21.90±0.12, 18.31±0.22 และ 20.42±0.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นจะทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลง โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด ($p<0.05$) โดยได้จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 94.79±0.46, 78.09±0.48 และ 85.46±0.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้จากศึกษาการหมักแบบกะซ้ำในถังหมักชีวภาพแบบแพคเบดด้วยยีสต์ตรึงรูปทั้ง 2 แบบ พบว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จะให้ผลที่ใกล้เคียงกันใน 2 รอบแรก ส่วนในรอบที่ 3 ผลผลิตเอทานอลจะลดลงมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับรอบแรก ($p<0.05$) ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าวัชพืชน้ำเป็นวัตถุดิบมีศักยภาพในการผลิตเอทานอล และยังมีประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้ร่วมกับถังหมักชีวภาพแบบแพคเบดซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: การผลิตเอทานอล/ วัชพืชน้ำ/ เซลล์ยีสต์ตรึงรูป/ ถังหมักชีวภาพแบบแพคเบด

Abstract

This study aimed to investigate the ethanol production from aquatic plants such as water hyacinth, water lettuce and cattail by using *Candida shehatae* TISTR 5843 which immobilized with calcium alginate and bagasse in packed-bed bioreactor. The results revealed that when using the flow rate of 1 ml/min with initial sugar concentration of 50 g/L, the highest ethanol concentration of water hyacinth, water lettuce and cattail were 20.42±0.64, 21.90±0.12 and 18.31±0.22 g/L, respectively. The effect of initial sugar concentration (200, 220, 240 g/L) on ethanol concentration was investigated. The increase of initial sugar concentration decreased the ethanol concentration. Maximum ethanol concentration of water hyacinth, water lettuce and cattail were 94.79±0.46, 78.09±0.48 and 85.46±0.62 g/L, respectively, were obtained when the initial sugar concentration of 220 g/L was used with immobilizing yeast cells in calcium alginate. The immobilized yeast cells with calcium alginate and bagasse in the repeated batch were reusable in 2 batches of fermentation. In the 3rd batch, the ethanol concentration decrease lower than 50% that of the 1st batch ($p<0.05$). Therefore, these results demonstrate the efficiency of ethanol production from aquatic plant hydrolysates applying with packed-bed reactor and it could be useful in the future.

Keywords: Ethanol production/ Water hyacinth/ Immobilized yeast cell/ Packed-bed bioreactor

บทนำ

ในปัจจุบันนานาประเทศทั่วโลกมีอัตราการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (International Energy Agency, 2009) โดยมีอัตราการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงที่ไม่เพียงพอกับอัตราการใช้งาน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2555) จึงเป็นสาเหตุให้เกิดวิกฤตการณ์ทางด้านราคาน้ำมันที่มีราคาสูงขึ้น ดังนั้นการที่จะลดปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องแสวงหาพลังงานทดแทนหรือพลังงานทางเลือกจากแหล่งอื่นๆ เช่น พลังงานทดแทนจากธรรมชาติ พลังงานไฟฟ้า พลังงานนิวเคลียร์ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันมีหลายประเทศให้ความสนใจเกี่ยวกับงานวิจัยในด้านการผลิตเอทานอลเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนภายในประเทศ ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่ให้ความสำคัญกับพลังงานทดแทนจากเอทานอล เพราะพลังงานเอทานอลนับว่ามีบทบาทสำคัญกับสภาวะแวดล้อมโลกในปัจจุบัน พลังงานเอทานอลจัดว่าเป็นพลังงานสะอาดไม่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านมลพิษในสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงจากซากฟอสซิลอันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดสภาวะโลกร้อนได้ (อรพิมพ์ มงคลเคหา, 2549; ธนรัตน์ ครุวรรณเจริญ, 2550) โดยประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งเป็นสารประกอบประเภทลิก

โนเซลลูโลส อยู่มากมาย (คณะกรรมาธิการการพลังงาน, 2545) เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด หญ้าแฝก และพืชเส้นใยชนิดอื่นๆ เป็นการประยุกต์ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์มากขึ้น เพื่อเพิ่มมูลค่าจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแล้วยังลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและมีส่วนสนับสนุนการเกษตรกรรมให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้แล้วในประเทศไทยยังมีวัชพืชน้ำหลายชนิดที่มีแนวโน้ม สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ (Mishima *et al*., 2008) เช่น ผักตบชวา ธูปฤาษี จอกน้ำ แพงพวยน้ำ ตับเต่าเป็นต้น ข้อดีของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำคือ ช่วยลดต้นทุนการผลิตอย่างมาก ควบคุมสภาพแวดล้อมไม่ให้เกิดสิ่งกีดขวางการคมนาคมทางน้ำ และลดภาระการกำจัดของเสียนี้ด้วย

วัชพืชน้ำเป็นพืชเส้นใยที่ควรให้ความสนใจ เพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ซึ่งจากการศึกษาในขั้นต้นพบว่าโครงสร้างเส้นใยของผักตบชวาประกอบไปด้วย ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน คือร้อยละ 18.20, 48.70 และ3.50 ของน้ำหนักเปียกตามลำดับ (Nigam, 2002) โดยลำต้นของพืชน้ำจะมีเส้นใยที่อ่อนทำให้ง่ายต่อการทำปฏิกิริยาทางเคมีในกระบวนการย่อยสลายของกรด ด่าง และเอนไซม์ นอกจากนี้พืชน้ำเป็นพืชที่ปลูกครั้งเดียวสามารถเก็บผลผลิตได้หลายปีเป็นพืชโตเร็ว ทนต่อสภาวะแห้งแล้ง มีการแพร่กระจายตามแหล่งน้ำทั่วไป สำหรับการผลิตเอทานอลจากพืชน้ำให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดนั้นจำเป็นต้องมีสายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส เนื่องจากยีสต์ส่วนใหญ่ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในปัจจุบันเป็นยีสต์ที่ผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้ดี *Candida shehatae* TISTR 5843 เป็นยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลจากไซโลสได้ดี มีหลายงานวิจัยที่ใช้เชื้อยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ดีในการผลิตเอทานอล (เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และคณะ, 2556; สุรารักษ์ อวนญวน, 2550; Wiboon *et al*., 2012) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำที่ผ่านขบวนการปรับสภาพ (pretreatment) และไฮโดรไลซิสแล้ว ด้วยการหมักแบบกะซ้ำในถังหมักชีวภาพแบบแพคเบดโดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปบนอัลจิเนตและชานอ้อย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์องค์ประกอบของเส้นใยของพืชน้ำ

เก็บตัวอย่างพืชน้ำ ได้แก่ผักตบชวา ธูปฤาษี จอกน้ำ จากแหล่งน้ำ นำส่วนใบและลำต้นไปล้างให้สะอาด ผึ่งลม ตากแดดให้แห้ง และนำตัวอย่างไปบดเป็นชิ้นเล็กๆ ร่อนแผ่นตะแกรงขนาด 0.8 มิลลิเมตร อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักที่ได้ แล้วเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิท จากนั้นศึกษาองค์ประกอบของเส้นใย (AOAC, 1990)

2. การปรับสภาพวัชพืชน้ำด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับทางเคมี

นำตัวอย่างที่ผ่านการลดขนาดมาปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH 1% (w/v) ร่วมกับ

หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง โดยดัดแปลงจากวิธีการของ รัชพล พะวงศ์รัตน์ (2554) ใส่ตัวอย่างครั้งละ 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นกรองแล้วนำเอาส่วนของแข็งไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง นำของแข็งส่วนที่ได้ไปย่อยด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (TOMY ES-315, Tokyo, Japan) โดยใส่ของแข็งลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนคงที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. การย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพนำมาบดให้ละเอียดใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำทั้ง 3 วิธีการปรับสภาพมาปรับให้ได้ Ph 5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอลิก (0.1 M HCl) นำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนส ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 200 และ200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (บริษัท genencor, USA) จำนวน 20 ยูนิตต่อกรัมตัวอย่าง และ10 ยูนิตต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 50องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างเฉพาะส่วนใสเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และองค์ประกอบของน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมกล้าเชื้อ

4.1 สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเหลว YM (YM broth) ใช้เป็น stock culture medium และใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น อาหารเหลว YM 1 ลิตร ประกอบด้วย Yeast extract 1.0 กรัม Malt extract 2.0 กรัม Peptone 3.0 กรัม D-xylose 10 กรัม ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในหลอดอาหารแข็งพื้นลาดเอียง (Slant agar) หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจาน (plate agar) จะเติม agar จำนวน 20 กรัม หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.2 สูตรอาหารสำหรับหมักเอทานอล

สูตรอาหารดัดแปลงจากสูตรอาหาร (Mishima และคณะ, 2008) อาหาร 1ลิตร ประกอบด้วย Yeast extract 1.0กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 กรัม KH_2PO_4 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 1.0 กรัม ปรับค่า pH เป็น 4.5- 5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดร-คลอลิก (0.1 M HCl) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

4.3 การตรียมกล้าเชื้อ

เขี่ยเชื้อยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จำนวน 1-2 ลูปมาตรฐาน ลงสู่อาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ใน ฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นบ่มบน

เครื่องเขย่าแบบที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker) ความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักต่อไป

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลพร้อมการหมัก (SSF) ในถังชีวภาพแบบแพคเบด (Packed-bed reactor)

นำวัชพืชน้ำที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการที่เหมาะสม เติมเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนส พร้อมเชื้อที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นและเพิ่มอาหาร (Mishima และคณะ, 2008) ใส่ลงไป นำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ความเร็วในการกวนเท่ากับ 120 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในถังชีวภาพแบบแพคเบดเก็บตัวอย่างตลอดการหมัก โดยเก็บทุก 4 ชั่วโมง ทำการหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมงและวิเคราะห์ความเข้มข้นเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาเพื่อใช้กับการหมักครั้งต่อไป โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เหลือด้วยวิธี 3,5-dinitro salicylic acid (DNS method) (Miller, 1959) และปริมาณเอทานอลถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Shimadzu (Class LC10 ประเทศญี่ปุ่น) คอลัมน์ SugarPax(Bio-Rad) ที่สภาวะ Mobile phase : Deionized water อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส Detector : Reflextive Index (RI)

6. การใช้สถิติในการวิเคราะห์ผลข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของสองชุดข้อมูลโดยวิธี t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95.0 % ($p<0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS (Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลของอัตราการไหลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อการผลิตเอทานอลในถังหมักแบบแพคเบด

อาหารวัชพืชน้ำมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ถูกส่งผ่านคอลัมน์แพคเบดในอัตราการไหลที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1.0 -2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ยีสต์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปในอัลจิเนตซึ่งเป็นตัวควบคุมสำหรับการตรึงเซลล์ (ภาพที่ 1ก-1ค) พบว่าที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดที่ได้จากผักตบชวาจอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 21.90±0.12, 18.31±0.22 และ20.42±0.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1-3) คิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเท่ากับ 83.49±0.22, 75.80±0.11 และ 80.08±0.09 ตามลำดับ ส่วนที่อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดรองลงมาซึ่งได้จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 18.93±0.42, 17.27±0.35 และ18.09±0.55 กรัมต่อลิตร และที่อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ให้

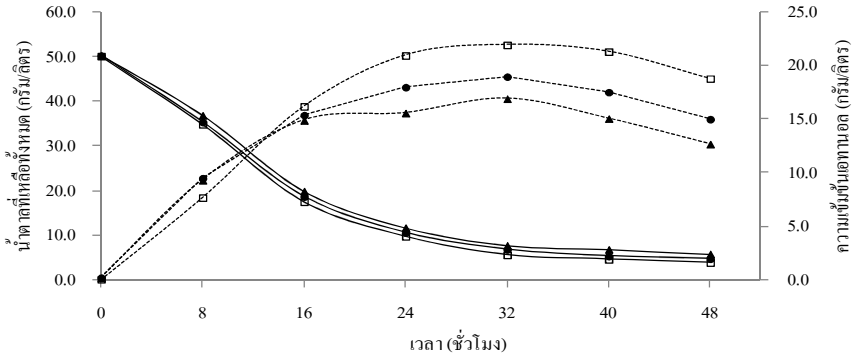
ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการไหลอื่นซึ่งได้ความเข้มข้นเอทานอลจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 16.89±0.60, 14.12±0.55 และ 15.53±0.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอัตราไหลจะทำให้เกิดการผลิตเอทานอลลดลง ดังนั้นจึงเลือกอัตราไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อทำการทดลองต่อไป ด้วยการหมักเอทานอลในแพคเบดจากอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำที่แตกต่างกันตั้งแต่ 200-240 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยีสต์ที่ตรึงรูปในอัลจิเนต เปรียบเทียบกับชานอ้อยซึ่งเป็นวัสดุตรึงจากธรรมชาติที่สามารถให้ผลผลิตเอทานอลดีกว่าวัสดุตรึงธรรมชาติชนิดอื่นๆในการทดลองที่ผ่านมาเพื่อศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมในการหมักแบบต่อเนื่องโดยหมักในถังหมักแบบแพคเบด

2. ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นของอาหารวัชพืชน้ำต่อการผลิตเอทานอลในถังหมักแบบแพคเบด

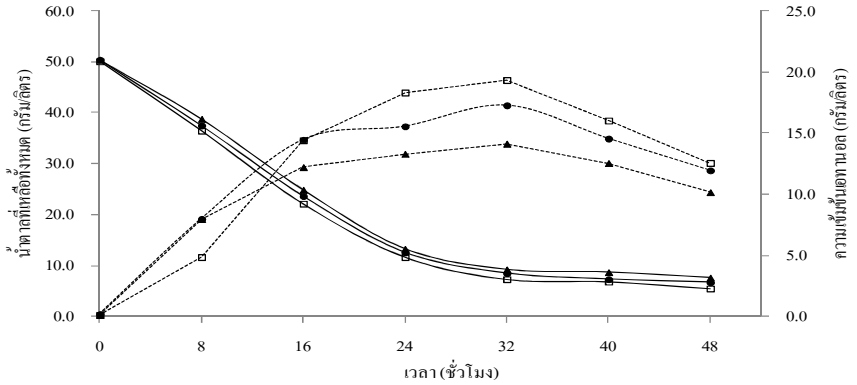
อาหารหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำที่แตกต่างกันตั้งแต่ 200-240 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที (จากภาพที่ 2ก-2ฉ) พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในอาหาร 220 กรัมต่อลิตร หมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ได้รับจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 94.79±0.46, 78.09±0.48 และ85.46±0.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยคิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเท่ากับ 84.48±0.02, 69.60±0.13 และ76.17±0.24 ตามลำดับ แต่เมื่อหมักในอาหารหมักจากวัชพืชน้ำ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 240 กรัมต่อลิตร จะทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ลดลง ซึ่งได้รับจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 68.39±0.28, 64.97±0.38 และ67.30±0.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร้อยละประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเท่ากับ 55.88±0.15, 53.08±0.52 และ 54.98±0.41 ตามลำดับ ซึ่งค่าผลผลิตเอทานอล (Q_p) จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารวัชพืชน้ำได้เพิ่มขึ้น และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงมาก ดังนั้นความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากวัชพืชน้ำที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากวัชพืชน้ำด้วยถังหมักแบบแพคเบดคือ 220 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการหมักแบบกะซ้ำในระบบการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด พบว่าการใช้เซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนต และชานอ้อยให้ความเข้มข้นเอทานอลที่ใกล้เคียงกัน สามารถหมักเอทานอลให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดติดต่อกัน 2 รอบ เมื่อทำการหมักแบบกะซ้ำในรอบที่ 3 พบว่าความเข้มข้นเอทานอลลดลง ซึ่งต่ำกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในแบทช์แรก จึงหยุดหมักในรอบที่ 3 ของการหมัก โดยเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงรูปด้วยชายอ้อย หมักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตรให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 90.36±3.87, 78.39±0.47 และ 83.13±0.34 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 7-9) ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดในรอบแรกของการหมัก ที่ได้รับจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 0.43±0.18, 0.35±0.34 และ 0.39±0.45 สำหรับเซลล์

ยีสต์ที่ตรึงรูปในอัลจิเนต และ0.41±0.12, 0.36±0.52 และ0.38±0.14 สำหรับเซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปชานอ้อย จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ (อนุชิต รัตนพันธุ์, 2551) ซึ่งทำการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์แพคเบด (packed-bed) ขนาด 1 ลิตร โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ตรึงรูปบนวัสดุเปลือกรังไหมบาง ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นตัวพยุงเซลล์ได้เป็นอย่างดีทั้งในกระบวนการผลิตแบบกะ แบบกะแบบทำซ้ำ และแบบต่อเนื่อง โดยคุณสมบัติที่เป็นที่พึงพอใจคือการที่เข้าได้เป็นอย่างดีกับเซลล์ยีสต์และคุณสมบัติที่ดีเชิงกลส่งผลทำให้ได้ อัตราการผลิตเอทานอลที่สูง อัตราการตรึงเซลล์ที่สูง ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูง และระบบมีความเสถียรสำหรับการใช้งานเป็นเวลานาน ซึ่งเมื่อป้อนสารตั้งต้นน้ำตาลที่ 220 กรัมต่อลิตร ที่ อัตราเจือจาง 0.36 ต่อชั่วโมง สามารถทำให้ได้อัตราผลผลิตสูงสุดถึง 19.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเอทานอล 52.83 กรัมต่อลิตร ในขณะที่จะได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ 80.72 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.034 ต่อชั่วโมง โดยเมื่อพิจารณากระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแพคเบด ซึ่งใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงรูปบนวัสดุการตรึงเซลล์จะให้ผลดีในหลายๆด้าน เช่น ให้ผลได้ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น ง่ายต่อกระบวนการแยกสารผลิตภัณฑ์ สามารถนำตัวเร่งปฏิกิริยา (เซลล์ยีสต์) กลับมาใช้ใหม่ และให้อัตราการผลิตเอทานอลที่สูงกว่าการหมักเอทานอลแบบกะ ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองในระดับหน่วยปฏิบัติการ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงแนวทางและความเป็นไปได้ในการใช้วัชพืชน้ำสำหรับการผลิตเอทานอล โดยงานวิจัยครั้งต่อไปจะทำการเพิ่มขนาดของการผลิตเอทานอลที่ใหญ่ขึ้น เพื่อศึกษาต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุน

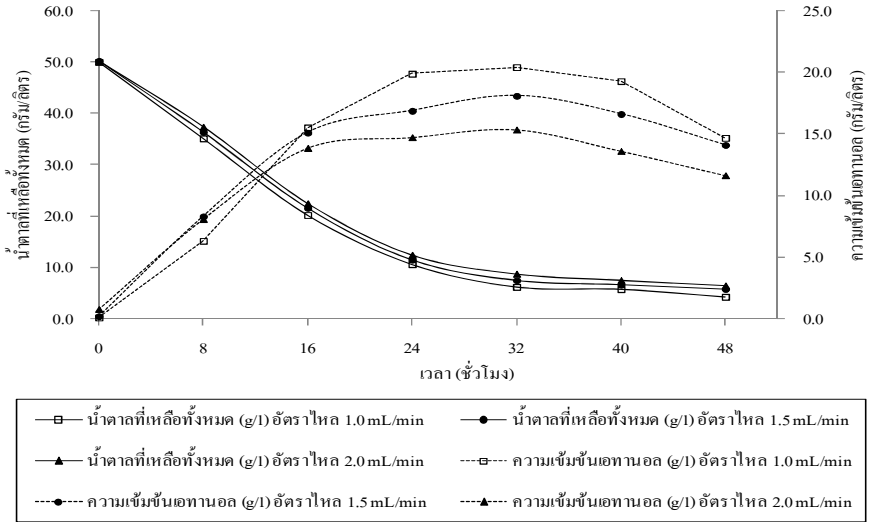
จากผลการศึกษาของภูวิศ บางรักษ์ (2550) พบว่าการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในอัลจิเนตเสริมใยบวบหมักในถังหมักแบบแพคเบดที่มีการบรรจุวัสดุตรึงไว้ภายในคอลัมน์ และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 32±1 องศาเซลเซียส โดยศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 202, 222 และ 248 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางในถังหมักที่ 0.11, 0.16, 0.20 และ 0.30 ต่อชั่วโมง โดยพบว่าได้อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด เมื่อดำเนินการที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 222 กรัมต่อลิตร ได้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ 81.29 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจางในถังหมัก 0.11 ต่อชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัลจิเนตเสริมใยบวบเป็นวัสดุตรึงที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการนำมาใช้ตรึงเซลล์ยีสต์ในถังหมักแบบแพคเบดสำหรับการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง เนื่องด้วยวัสดุตรึงเซลล์ที่ได้พัฒนาขึ้นมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดีและมีโครงสร้างที่มีรูพรุนสูง ทำให้สามารถนำมาใช้กับกระบวน การผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องอย่างน้อย 30 วันที่ให้อัตราการผลิต เอทานอลสูงโดยไม่ทำให้เสถียรภาพของระบบเปลี่ยนแปลง ข้อมูลดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



(ก)

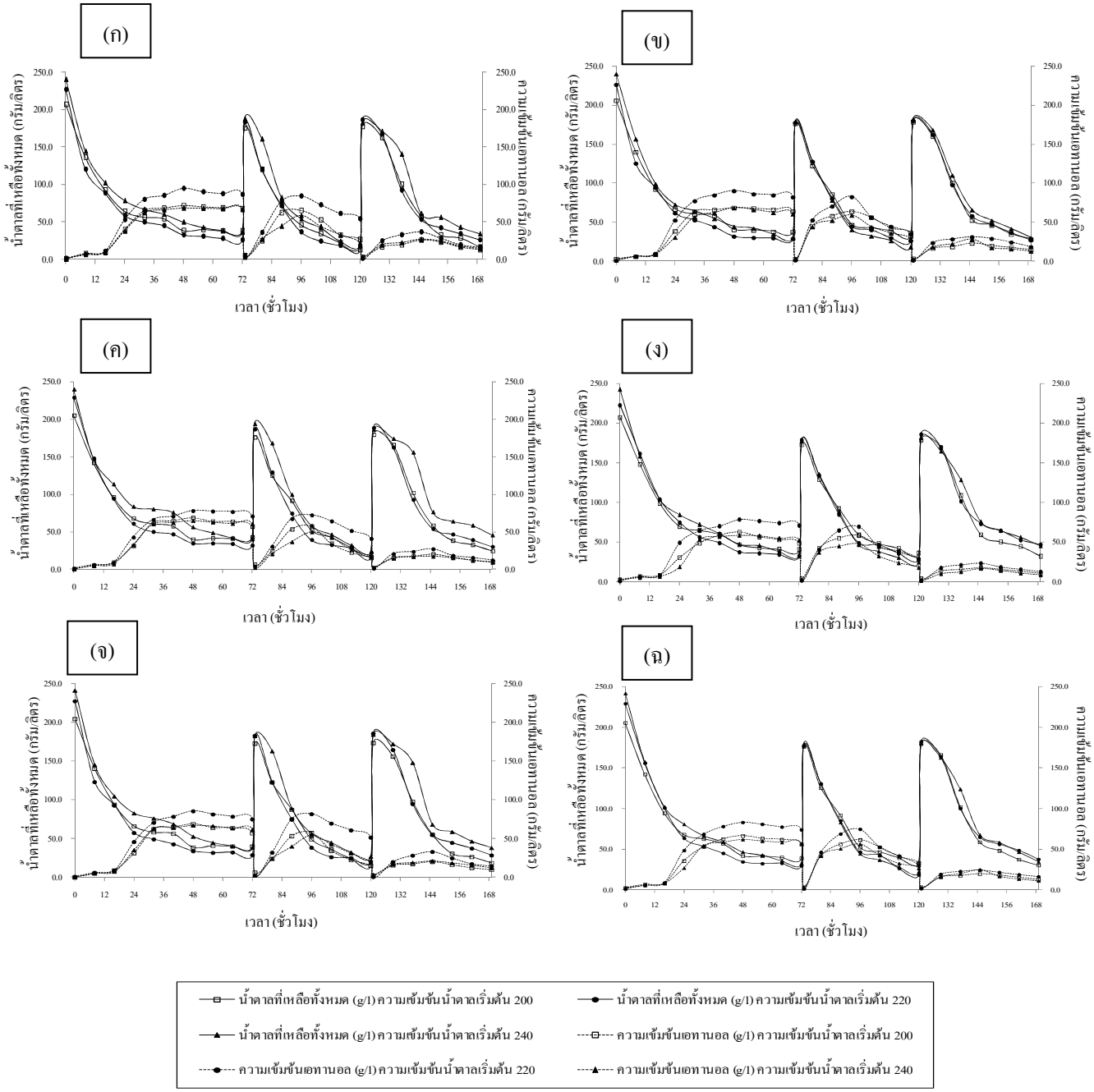


(ข)



(ค)

ภาพที่ 1 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจาก (ก) ผักตบชวา (ข) จอกน้ำ (ค) ธูปฤาษี ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนตในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพที่ 2 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลจากผักตบชวา (ก, ข); จอกน้ำ (ค, ง); ธูปฤาษี (จ, ฉ) ของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต (ก, ข, ค) และตรึงรูปด้วยชานอ้อย (ง, จ, ฉ) ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200-240 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 1 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	0.05±0.06^{f}	0.13±0.04^{g}	0.09±0.03^{f}	50.04±0.02^{a}	50.06±0.03^{a}	50.03±0.04^{a}
8	7.67±0.18^{e}	4.86±0.11^{f}	6.31±0.21^{e}	34.81±0.24^{b}	36.45±0.12^{b}	35.13±0.28^{b}
16	16.16±0.37^{d}	14.40±0.25^{d}	15.52±0.14^{c}	17.45±0.16^{c}	22.14±0.43^{c}	20.19±0.14^{c}
24	20.92±0.25^{b}	18.31±0.22^{b}	19.89±0.28^{b}	9.71±0.32^{d}	11.68±0.56^{d}	10.60±0.35^{d}
32	21.90±0.12^{a}	19.33±0.41^{a}	20.42±0.64^{a}	5.58±0.46^{e}	7.31±0.16^{e}	6.19±0.28^{e}
40	21.27±0.46^{a}	16.02±0.13^{c}	19.29±0.16^{b}	4.62±0.17^{f}	6.85±0.67^{f}	5.74±0.57^{e}
48	18.75±0.32^{c}	12.55±0.07^{e}	14.68±0.35^{d}	3.88±0.31^{g}	5.49±0.27^{g}	4.24±0.17^{g}

หมายเหตุ: $^{a,b,c,d,\cdots}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	0.21±0.02^{f}	0.20±0.02^{f}	0.19±0.04^{f}	50.12±0.06^{a}	50.38±0.02^{a}	50.24±0.03^{a}
8	9.48±0.11^{e}	7.97±0.15^{e}	8.30±0.23^{e}	35.28±0.21^{b}	37.48±0.34^{b}	36.28±0.42^{b}
16	15.35±0.30^{c}	14.45±0.24^{c}	15.10±0.43^{c}	18.62±0.45^{c}	23.62±0.25^{c}	21.56±0.19^{c}
24	17.95±0.26^{b}	15.54±0.48^{b}	16.88±0.27^{b}	10.57±0.62^{d}	12.57±0.37^{d}	11.45±0.45^{d}
32	18.93±0.42^{a}	17.27±0.35^{a}	18.09±0.52^{a}	6.78±0.16^{e}	8.48±0.34^{e}	7.41±0.24^{e}
40	17.49±0.48^{bc}	14.55±0.18^{c}	16.62±0.71^{b}	5.32±0.28^{f}	7.32±0.41^{f}	6.62±0.57^{f}
48	14.97±0.29^{d}	11.94±0.52^{d}	14.10±0.36^{d}	4.70±0.36^{g}	6.70±0.09^{g}	5.76±0.32^{g}

หมายเหตุ: $^{a,b,c,d,\cdots}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 การหมักเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเซลล์ *C. shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยคอลัมน์แพคเบด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เวลา	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลที่เหลือทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
(ชั่วโมง)	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี	ผักตบชวา	จอกน้ำ	ธูปฤาษี
0	0.18±0.04^{f}	0.12±0.03^{f}	0.77±0.06^{f}	50.18±0.04^{a}	50.36±0.02^{a}	50.16±0.03^{a}
8	9.29±0.23^{e}	7.97±0.32^{e}	8.09±0.18^{e}	36.78±0.32^{b}	38.76±0.26^{b}	37.38±0.13^{b}
16	14.86±0.34^{c}	12.21±0.18^{c}	13.86±0.27^{c}	19.85±0.15^{c}	24.86±0.17^{c}	22.47±0.41^{c}
24	15.54±0.16^{b}	13.30±0.48^{b}	14.73±0.54^{b}	11.66±0.27^{d}	13.28±0.41^{d}	12.42±0.36^{d}
32	16.89±0.65^{a}	14.12±0.35^{a}	15.35±0.28^{a}	7.73±0.19^{e}	9.22±0.22^{e}	8.74±0.28^{e}
40	15.02±0.53^{bc}	12.54±0.26^{c}	13.62±0.34^{c}	6.82±0.48^{ef}	8.69±0.18^{f}	7.52±0.54^{f}
48	12.64±0.42^{d}	10.16±0.54^{d}	11.64±0.68^{d}	5.78±0.52^{f}	7.61±0.69^{g}	6.48±0.23^{g}

หมายเหตุ: $^{a,b,c,d,\cdots}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการผลิตเอทานอลจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี ที่ผ่านการปรับสภาพในถังหมักแบบแพคเบดโดยใช้เชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและชานอ้อย พบว่า ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาทีให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดที่ได้จากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 21.90±0.12, 18.31±0.22 และ20.42±0.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในอาหาร 220 กรัมต่อลิตร หมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ได้รับจากผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี เท่ากับ 94.79±0.46, 78.09±0.48 และ 85.46±0.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตและชานอ้อยสามารถใช้หมักเอทานอลได้ถึง 2 รอบ ซึ่งให้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ใกล้เคียงกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้ ผักตบชวา จอกน้ำ และธูปฤาษี จัดว่าเป็นวัสดุชีวภาพอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล เป็นวัตถุดิบที่มีอยู่มากในประเทศไทย มีต้นทุนการผลิตที่มีราคาถูก เหมาะแก่การส่งเสริมให้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการผลิตพลังงานทดแทน นอกจากนี้ควรมีการ

ศึกษาวิจัยที่มุ่งเน้นการศึกษาเพื่อต่อยอดขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยสายวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2557 และหน่วยวิจัยจุลินทรีย์เพื่อการเกษตร คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2555). **รายงานพลังงานประเทศไทย ปี 2555**. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน.

คณะกรรมาธิการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร. (2545). **พลังงานทดแทนเอทานอลและไบโอดีเซล**. กรุงเทพฯ: แปลน พริ้นติ้ง.

ธนรัตน์ ครุวรรณเจริญ. (2550). เทคโนโลยีพลังงานในพระราชดำริ. **วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์**, 7(1): 39-52.

ภูวิศ บางรักษ์. (2550). **การผลิตเอธานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในตัวพยุงแอลจีเนทเสริมใยบวบ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2554).การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทผักตบชวาโดยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล. **Veridian E-Journal SU**, 4(1): (May – August).

รัชพล พะวงศ์รัตน์, มาลินี อันภักดี และสุทธิเดช ปรีชารัมย์. (2556). การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน. **Veridian E-Journal SU**, 4(1): 1025-36.

สุรารักษ์ อวนญวน. (2550). **โครงการการผลิตเอทานอลจากไซโลสโดยใช้เซลล์ตรึงของ *Candida shehatae***. ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน ประจำปีงบประมาณ 2550, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อนุชิต รัตนพันธุ์. (2551). **การตรึงยีสต์โดยใช้เปลือกรังไหมบางสำหรับการผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่อง**. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อรพิมพ์ มงคลเคหา. (2549). พลังงานทดแทน… (ตอนที่ 1). **วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์**, 6(1): 18-30.

AOAC. (1990). **Standard method for examination of water and waste**

water. American Public Health Assosiation,Washington, DC.

Miller, G., (1959). Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, 31: 426-429.

Mishima D, Kuniki M, Sei K, Soda S, Ike M, Fujita M. (2008). Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes L.*). **Bioresource Technology**, 99: 2495-2500.

Nigam JN. (2002). Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose–fermenting yeast. **Research Journal of Biotechnology**, 97: 107–116.

Wiboon R, Maneewan S, Poonsuk P. (2012). Application of palm pressed fiber as a carrier for ethanol production by *Candida shehatae* TISTR5843. **Electronic Journal of Biotechnology**, 15(6): (November 15).