การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมกับวิธีไดโครเมต และการประยุกต์ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ

An Analysis of Ethanol Concentration Using Organic Solvent Extraction with Dicromate Colorimetric Method and Its Application to Laboratory Scale

เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ [1] สุทธิเดช ปรีชารัมย์ [2] และรัชพล พะวงศ์รัตน์ [3]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจาก 4 ชนิดคือ Isobutyl acetate (ISA), Butyl acetate (BTA), Chrolofrom (CHF), Tributyl phosphate (TBP) และสารผสมของตัวทำละลายเหล่านี้ และหาสัดส่วนที่เหมาะสมในการสกัดเอทานอลร่วมกับวิธีไดโครเมต (dicromate colorimetric method) และความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ จากการทดลองพบว่า TBP:ISA (25:75 โดยปริมาตร) เป็นตัวทำ ละลายที่สามารถสกัดเอทานอลได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่นที่เหลือ ($p<0.05$) จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพการสกัดเอทานอลของตัวทำละลายในจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 2% และ 10% โดยน้ำหนักที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 5019 เปรียบเทียบกับ TBP พบว่าเมื่อตรวจสอบโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี่ (GC) ให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ และสามารถนำไปพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

คำสำคัญ : วิธีไดโครเมต เอทานอล การสกัด ตัวทำละลาย

ABSTRACT

The aim of this study was to select the proper organic solvents [isobutyl acetate (ISA), butyl acetate (BTA), chloroform (CHF), tributyl phosphate (TBP) and their mixtures] and to find the proper proportions for ethanol determination with the dicromate colorimetric method and practical application for laboratory scale. The results showed that TBP:ISA (25:75 by volume) was the best ratio of the solvent for ethanol extraction among different solvents and their mixtures ($p<0.05$). The ethanol extraction efficiency of selected solvents from fermented YPD medium at 2% and 10% (by weight) glucose using *Saccharomyces cerevisiae* 5019, compared with TBP, was investigated by gas chromatography (GC). The results showed that the selected

[1] นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

[2] อาจารย์ หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

[3] อาจารย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

solvent gave the high accuracy values, as well as that of GC ($p<0.05$). These results indicated that TBP:ISA (25:75 by volume) showed high feasibility for ethanol extraction at laboratory scale and could be developed for industrial scale in the future.

Keywords : dicromate colorimetric method, ethanol, extraction, solvent

บทนำ

จากสถานการณ์ในปัจจุบันกล่าวได้ว่าวิกฤติทางด้านพลังงานที่เกิดขึ้นทั่วโลกทำให้ส่งผลกระทบต่อภาคอุตสาหกรรมและภาคเกษตรกรรมอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ปัญหาการขาดแคลนพลังงาน เช่น น้ำมันซึ่งเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่สำคัญ การหาแหล่งพลังงานทดแทนจึงได้รับความสนใจโดยเฉพาะเอทานอล (Ethanol) ถูกนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนมากขึ้น (รัชพล, 2554) ซึ่งกระบวนการผลิตเอทานอลสามารถผลิตได้จากชีวมวล (biomass) โดยมีการศึกษาและทำการวิจัยกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวัสดุที่สามารถหาได้จากธรรมชาติ (วนิดา, 2553) โดยกระบวนการผลิตเอทานอลทำได้หลายกรรมวิธี โดยเฉพาะทางกรรมวิธีทางชีวภาพซึ่งมีขั้นตอนการผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีมลพิษต่ำ ต้นทุนไม่สูง (เวสารัชและรัชพล, 2557)

โดยขั้นที่สำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งหลังจากกระบวนการผลิตเอทานอลคือ การวิเคราะห์ผลผลิตเอทานอลที่เกิดขึ้นซึ่งวิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลในปัจจุบันสามารถทำได้หลากหลายวิธีการ เช่น การใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี่ (Gas chromatography) แต่เทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี่จะต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงและมีข้อจำกัด (Seo et al., 2009) จึงได้มีการดัดแปลงใช้วิธีการวิเคราะห์เอทานอลโดยใช้วิธีไดโครเมต (Dicromate colorimetric method) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็วเหมาะแก่การใช้ในห้องปฏิบัติการ (เวสารัชและรัชพล, 2557; Pilone, 1985; Seo et al., 2009) โดยหลักการของวิธีไดโครเมต คือ เอทานอล (C_2H_5OH) จะถูกออกซิไดซ์โดยไดโครเมตไอออน ($Cr_2O_7^{2-}$, Cr(VI)) จะได้กรดแอซีติก(CH_3COOH) ร่วมกับโครเมียมทรี (Cr^{3+}) ไอออน เดิมไดโครเมตมีสีส้มเหลือง ส่วนโครเมียมทรี (Cr^{3+}) ไอออน มีสีเขียวอมน้ำเงิน ดังนั้นเมื่อทำปฏิกิริยากับเอทานอลจะเปลี่ยนจากสีส้มเหลืองเป็นสีเขียวอมน้ำเงิน ดังสมการ

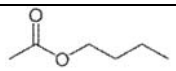
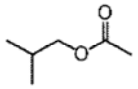
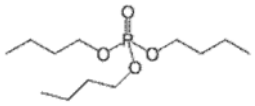
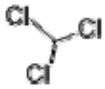
$$2\ Cr_2O_7^{2-} + 3\ C_2H_5OH + 16\ H^{+1} \xrightarrow{595\ nm} 4\ Cr^{3+} + 3\ CH_3COOH + 11\ H_2O$$

สีส้มเหลือง → สีเขียวอมน้ำเงิน

งานวิจัยของ Seo et al. (2009) พบว่าสารละลายไดโครเมตมีความไวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งผลพลอยได้จากการผลิตเอทานอล จึงได้มีการดัดแปลงโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สกัดเอาเอทานอลออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะใช้วิธีไดโครเมตเพื่อไม่ให้ค่าที่วิเคราะห์ได้เบี่ยงเบน และใกล้เคียงกับค่าจากตัวอย่างมากที่สุด หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดเอทานอลจากสารผสมน้ำและเอทานอลมีดังนี้ (1) สามารถดึงเอทานอลออกจากสารผสมน้ำและเอทานอลได้ดี (2) มีความจุเอทานอลที่สูงเพื่อลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (3) ละลายได้น้อยในน้ำเพื่อลดการสูญเสีย (4) มีความหนาแน่นที่แตกต่างกันระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำเพื่อเกิดการแยกชั้นที่รวดเร็ว (5) มีความเสถียรภาพทางเคมี (6) มีประสิทธิภาพในการได้คืนของเอทานอลและสามารถนำตัวทำละลายอินทรีย์กลับมาใช้ใหม่ได้ (Murphy et al., 1984) ซึ่งในงานวิจัยของ Seo et al. (2009) พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ Tributylphosphate (TBP) ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดเอทานอล แต่เนื่องจากว่าตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวมีราคาสูง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสกัดเอทานอลร่วมกับวิธีไดโครเมตในระดับห้องปฏิบัติการ โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในศึกษานี้ได้แก่ Isobutyl acetate (ISA), Butyl acetate (BTA), Chrolofrom (CHF) และ Tributylphosphate (TBP) (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังศึกษาผลของ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเอทานอลที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract peptone dextrose (YPD) ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน เพื่อสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 1 โครงสร้างเคมีและความหนาแน่นของตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์	โครงสร้างเคมี	ค่าความหนาแน่น (g/cm^3) (ที่อุณหภูมิ 20-25^{o}C)
Butyl acetate (BTA)		0.882
Isobutyl acetate (ISA)		0.875
Tributyl phosphate (TBP)		0.973
Chloroform (CHL)		1.489

ที่มา: Seo et al. (2009)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสกัดเอทานอลร่วมกับวิธีไดโครเมต

การคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสกัดเอทานอลร่วมกับวิธีไดโครเมต โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ BTA, ISA และCHL และสารผสมระหว่างตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดกับ TBP ในอัตราส่วน 75:25, 50:50 และ 25:75 โดยปริมาตร โดยให้ TBP เป็นชุดควบคุม ทำการเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน (ที่อุณหภูมิ 25^{o}C) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ1.0 โดยปริมาตร) เริ่มด้วยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์และสารละลายเอทานอลมาตรฐานอย่างละ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่า เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น บันทึกเวลาที่ใช้หลังจากเกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ จากนั้นดูดสารละลายชั้นบน (ยกเว้น CHL ใช้ชั้นล่าง) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่ได้ด้วยวิธีไดโครเมตดัดแปลงมาจากวิธีการของ Seo et al. (2009) โดยเติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ในสารสกัดเอทานอล ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายเอทานอลมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น แล้วหาค่าความชัน (Slope) และค่าความสัมพันธ์ร่วม (R^2) ของตัวทำละลายอินทรีย์เปรียบเทียบกับผลที่ได้ชุดควบคุม

2. การทดสอบประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

การทดสอบประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกในการสกัดเอทานอลจากการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 (จากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD เริ่มด้วยการเตรียมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของจิราพร (2552) โดยใช้อาหาร YPD ซึ่งประกอบไปด้วย Yeast extract ร้อยละ 1 กรัมต่อปริมาตร น้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 2 กรัมต่อปริมาตร และเปปโตนร้อยละ 2 กรัมต่อปริมาตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30^{o}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 2 x 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 1 กรัมต่อลิตร) ใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างกันคือ ร้อยละ 2 และ 10 โดยน้ำหนัก เติมกล้าเชื้อเริ่มต้น *S. cerevisiae* TISTR 5019 ในอาหาร YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30^{o}C ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ24 ทำการวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลที่เหลือในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกจากข้อ 1 ร่วมกับวิธีไดโครเมต นำมาเปรียบเทียบกับสารละลายเอทานอลมาตรฐาน และเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC)

3. การศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (K_{DE})

ทำการการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (K_{DE}) ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ถูกเลือก และTBP โดยเตรียมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ กัน (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1.0 โดยปริมาตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสามารถในการกระจายตัวของเอทานอลในแต่ละชั้นของสารสกัด โดยดูดสารละลายแต่ละชั้น ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่ได้ด้วยวิธีไดโครเมต เพื่อหาปริมาณเอทานอลที่ได้ แล้วคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient, P) โดย

$$\text{Log } P = \text{Log } C_1/C_2$$

เมื่อ P คือ สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในระหว่างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และชั้นตัวอย่าง

C_1 คือ ความเข้มข้นของสารในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) และ C_2 คือ ความเข้มข้นของสารในชั้นตัวอย่าง (ชั้นล่าง)

โดยถ้าค่า Log P < 1 แสดงว่าสารละลายในชั้นของตัวอย่างได้ดีกว่าชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าค่า Log P > 1 แสดงว่าสารชอบที่จะละลายในชั้นสารละลายอินทรีย์มากกว่า

4. วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic Colorimetric Method (DNS method) ตามวิธีของ James (1995) การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยวิธีไดโครเมตโดยดัดแปลงมาจากวิธีของเวสารัช และคณะ (2556) การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Offeman et al. (2005) โดยเครื่อง GC รุ่น Auto system (บริษัท Perkin Elmer, Germany) ใช้ Detector ชนิด Flame ionization (FID) ใช้แก๊สฮีเลียมเป็น Carrier gas ภายใต้สภาวะอุณหภูมิของ Oven เริ่มต้นที่ 40^{o}C คงที่เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50^{o}C ด้วยอัตราเร็ว 4^{o}C/นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 120^{o}C ด้วยอัตราเร็ว 10^{o}C/นาที เพื่อทำความสะอาดคอลัมน์ และอุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 200^{o}C

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ขั้นตอนในการทำศึกษาวิจัย และผลการทดลองทั้งหมดจากการศึกษาวิจัยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความ

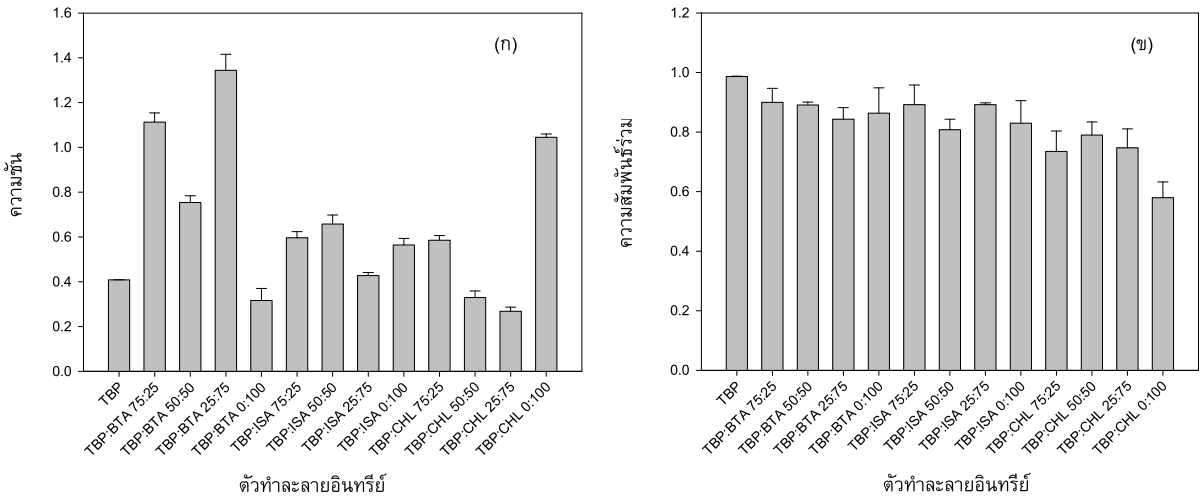
แตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0 ($p<0.05$)

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดเอทานอล

สารทั้ง 4 ชนิดที่เลือกมาได้แก่ Isobutyl acetate (ISA), Butyl acetate (BTA), Chrolofrom (CHF), Tributyl phosphate (TBP) มีคุณสมบัติละลายเข้ากันได้ดีกับเอทานอล แต่ละลายได้น้อยมากในน้ำ และมีความถ่วงจำเพาะที่แตกต่างกับน้ำ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการสกัดเอทานอลจากสารผสมน้ำและเอทานอล หมู่ฟังก์ชันของตัวทำละลายก็มีผลต่อการสกัดเอทานอลเช่นกัน โดยเรียงลำดับได้ดังนี้ carboxylic acids > alcohols > esters > amines > ketones > ethers > hydrocarbons โดยความสามารถในการจุเอทานอลของตัวทำละลายยังขึ้นอยู่กับมวลโมเลกุล โครงสร้างที่แตกต่างกันเช่น ตำแหน่งของกิ่งและขนาดของกิ่ง อีกด้วย (Roddy, 1981; Munson and King, 1984; Cabral, 1991)

โดยทั่วไปแล้วอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วยสารอาหารหลายประเภท เช่น โมโนแซคคาไรด์ เกลือไอออนโลหะ เป็นต้น และยังมีผลิตภัณฑ์พลอยได้เช่น กลีเซอรอล (Cot et al., 2007) ซึ่งล้วนแต่ทำปฏิกิริยากับไดโครเมท ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการสกัดเอทานอลออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะทำการวัดปริมาณเอทานอล เพื่อไม่ให้เกิดการรบกวนของสี จากผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เปรียบเทียบกับ TBP ร่วมกับวิธีไดโครเมต โดยพิจารณาผลของค่าความชันกราฟ (slope) ค่าความสัมพันธ์ของข้อมูล (R^2) (ภาพที่ 1 และตารางที่ 2) ซึ่งใช้เป็นค่าบ่งบอกถึงความแม่นยำของข้อมูล ความสัมพันธ์ของชุดข้อมูลที่อยู่บนเส้นตรงเดียวกัน (อัมรินทร์, 2552) และพิจารณาเวลาที่ใช้ในการแยกชั้น จากตารางที่ 2 พบว่า TBP มีค่า slope และ R^2 เท่ากับ 0.408±0.001 และ 0.986±0.002 ตามลำดับ ตัวทำละลายอินทรีย์และสารผสมของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ผลของค่า slope ไม่แตกต่างทางกับค่าของ TBP อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) คือ TBP:ISA 25:75 ส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ TBP:BTA 75:25, TBP:BTA 50:50, TBP:ISA 75:25 และ TBP:ISA 25:75 มีค่าความสัมพันธ์ร่วมที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) กับ TBP เพราะฉะนั้นแล้วตัวทำละลายอินทรีย์ TBP:ISA 25:75 ให้ค่าความชันและความสัมพันธ์ร่วมที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม อีกทั้งยังใช้เวลาในการแยกชั้นเพียง 35 นาที โดย TBP:ISA 25:75 ให้ผลที่ใกล้เคียงกับ TBP จึงถูกนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับ (ก) ความชัน (slope) และ (ข) กับความสัมพันธ์ร่วม (R^2)

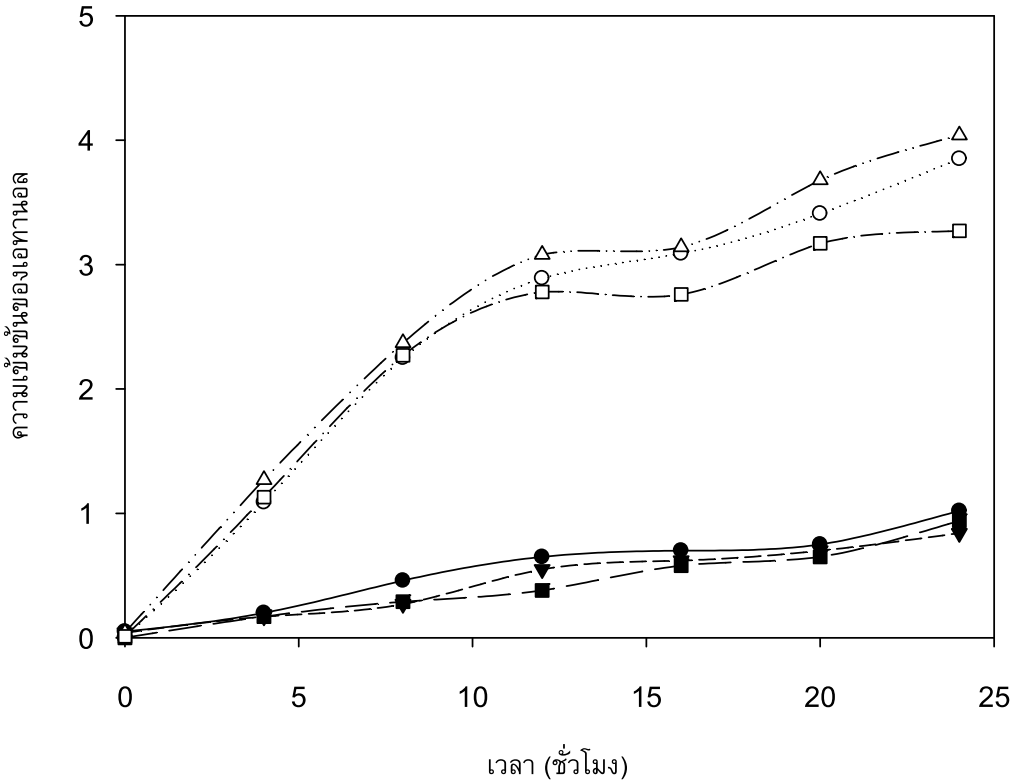
ตารางที่ 2 ค่าความชัน (Slope) ค่าความสัมพันธ์ร่วม (R^2) และเวลาในการแยกชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์

สัดส่วนของสารละลาย (โดยปริมาตร)	ความชัน (Slope)	ความสัมพันธ์ร่วม (R^2)	เวลาแยกชั้น(นาที)
TBP (ชุดควบคุม)	0.408±0.001^{g}	0.986±0.002^{a}	15
TBP:BTA 75:25	1.113±0.041^{b}	0.900±0.047^{ab}	20
TBP:BTA 50:50	0.754±0.031^{d}	0.891±0.010^{abc}	20
TBP:BTA 25:75	1.344±0.072^{a}	0.843±0.039^{bcd}	37
TBP:BTA 0:100	0.316±0.054h	0.864±0.085^{bc}	180
TBP:ISA 75:25	0.597±0.027^{f}	0.892±0.066^{abc}	25
TBP:ISA 50:50	0.658±0.040^{e}	0.808±0.035^{bcde}	30
TBP:ISA 25:75	0.428±0.014^{g}	0.892±0.006^{ab}	35
TBP:ISA 0:100	0.564±0.029^{f}	0.830±0.076^{bcde}	180
TBP:CHL 75:25	0.585±0.021^{f}	0.735±0.068^{e}	60
TBP:CHL 50:50	0.330±0.029h	0.790±0.044^{cde}	60
TBP:CHL 25:75	0.268±0.019h	0.747±0.064^{cde}	90
TBP:CHL 0:100	1.045±0.015^{c}	0.580±0.053^{f}	195

หมายเหตุ a,b,c…อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

การวัดเอทานอลด้วยวิธีไดโครเมตออกซิเดชั่นร่วมกับการใช้ตัวทำละลาย TBP:ISA (25:75) สกัดเอทานอลเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลาย TBP และการใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี่ (GC) โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *S.cerevisiae* TISTR 5019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่างกันคือ YPD น้ำตาลกลูโคส 2% และอาหาร YPD น้ำตาลกลูโคส 10% (ภาพที่ 2) นำมาทำการหมักเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากผลการสกัดเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD น้ำตาลกลูโคส 2% พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายTBP:ISA (25:75) สามารถสกัดเอทาอลและวัดด้วยวิธีไดโครเมตออกซิเดชันออกมาได้ในปริมาณความเข้มข้นที่มีค่าที่ใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้ตัวทำละลาย TBP สกัด และใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี่ในการวัดความเข้มข้นด้วย เนื่องจากค่าสัมประสิทธ์การกระจายตัวของสารในชั้นเอทานอลของ TBP 100 คือ 0.14 และของ ISA คือ 0.21 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน (Egan et al.,1988) เช่นเดียวกับการสกัดเอทานอลด้วยตัวทำละลาย TBP:ISA (25:75) ผลการวัดค่าความเข้มข้นของเอทานอลในอาหาร YPD ที่น้ำตาลกลูโคส 2% และ10%พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่วัดได้เนื่องจากค่าความเข้มข้นที่ใช้ตัวทำละลาย TBP:ISA (25:75) กับการใช้ตัวทำละลาย TBP มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้แก๊สโครมาโทกราฟฟี่ นอกจากนี้ที่น้ำตาล 10% ค่าความเข้มข้นของเอทานอลจะสูงกว่าเนื่องจากมีน้ำตาลสูงกว่าเชื้อจึงสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าอาหารที่มีน้ำตาลน้อยๆ (สุรารักษ์, 2550) การสกัดด้วยตัวทำละลาย TBP:ISA (25:75) และการสกัดเอทานอลด้วยตัวทำละลาย TBP สามารถใช้สกัดเอทานอลได้ดีเมื่อเทียบกับการใช้แก๊สโครมาโทกราฟฟี่



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของตัวทำละลาย TBP:ISA (25:75) (สัญลักษณ์สามเหลี่ยม) และตัวทำละลาย TBP (สัญลักษณ์วงกลม) โดยสกัด เอทานอลจากเชื้อ *S.cerevisiae* TISTR 5019 ในอาหาร YPD น้ำตาลกลูโคส 2% (สัญลักษณ์สีดำ)และในอาหาร YPD น้ำตาลกลูโคส 10% (สัญลักษณ์สีขาว) เปรียบเทียบกับการใช้แก๊สโครมาโทกราฟฟี่ (GC) (สัญลักษณ์สี่เหลี่ยม)

3. ผลการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (K_{DE}) ของตัวทำละลาย

สกัดเอทานอลด้วย TBP แล้ววัดความเข้มข้นเอทานอลด้วยวิธีไดโครเมตออกซิเดชัน ทั้งชั้นของตัวทำละลาย (ชั้นบน) และชั้นของตัวอย่าง (ชั้นล่าง) โดยนำค่าความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลาย (ชั้นบน) หารด้วยค่าความเข้มข้นเอทานอลของชั้นของตัวอย่าง(ชั้นล่าง) แล้วนำมาพลอตกราฟ เพื่อแสดงประสิทธิภาพการดึงเอทานอลของตัวทำละลาย หากค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวมีค่าเข้าใกล้หนึ่งมากๆ ยิ่งดี (Seo et al., 2009) จากผลการทดลองพบว่าค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (K_{DE}) (ตารางที่ 3) ของTBP มีค่าสูงสุดคือ 0.35 ที่ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน 1% โดยปริมาตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่า TBP:ISA (25:75) มีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายสูงสุดที่ 0.59 ที่ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน 0.4% โดยปริมาตร ดังนั้นตัวทำละลาย TBP:ISA (25:75) สามารถใช้สกัดเอทานอลได้มากกว่าการใช้ TBP ซึ่งค่าสัมประสิทธ์การกระจายตัวของตัวทำละลายแสดงถึงความสามารถในการสกัด (Offeman et al., 2005)

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้น และค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (K_{DE}) ของเอทานอลชั้นบนต่อชั้นล่างของตัวทำละลาย

ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (โดยปริมาตร)	ความเข้มข้นของเอทานอล (โดยปริมาตร)		ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (K_{DE})	
	ชั้นของTBP	ชั้นของTBP:ISA (25:75)	ชั้นของTBP	ชั้นของTBP:ISA (25:75)
0.20	0.05	0.07	0.27	0.35
0.40	0.11	0.24	0.28	0.59
0.60	0.13	0.25	0.22	0.42
0.80	0.26	0.30	0.32	0.37
1.00	0.35	0.30	0.35	0.30

สรุปและวิจารณ์ผล

ตัวทำละลายที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดสอบหาความเข้มข้นของเอทานอลด้วยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับวิธีไดโครเมตออกซิเดชั่นคือ TBP:ISA (25:75) เนื่องจากสามารถสกัดเอทานอลออกมาได้ค่าความเข้มข้นมากกว่าการใช้ตัวทำละลาย TBP และการใช้แก๊สโครมาโทกราฟฟี่ โดยมีค่าความสัมพันธ์ร่วม (R^2) เท่ากับ 0.892±0.006 ค่าความชันกราฟ (slope) คือ 0.428±0.014 และเวลาที่ใช้ในการแยกชั้นคือ 35 นาที

การสกัดเอทานอลด้วยตัวทำละลาย TBP:ISA (25:75) ร่วมกับวิธีวัดความเข้มข้นของเอทานอลด้วยการไดโครเมตมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้ในระดับห้องปฏิบัติการเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการใช้ตัวทำละลายTBP:ISA (25:75) สกัดเอทานอลและยังมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (K_{DE}) สูงกว่าของ TBP รวมทั้งให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าแก๊สโครมาโทกราฟฟี่ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนสนับสนุนทุนวิจัย ศูนย์ส่งเสริมการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี (ศสวท.) คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ประจำปีงบประมาณ 2556

เอกสารอ้างอิง

จิราพร ลิ้มประเสริฐ. 2552. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงและสภาวะความเป็นกรดสูงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2554. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทผักตบชวาโดยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล. Veridian E-Journal SU. 4(1): 891-901.

เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และ รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2557. สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำโดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบแพคเบค. วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์. 14(1): 243-255.

เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และ รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2556. การใช้ประโยชน์วัสดุพยุงจากขยะธรรมชาติสาหรับการตรึงเซลล์ และ ประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. วารสารวิชาการ Veridian E-Journal, Silpakorn University. 6(1): 795-807.

วนิดา ปานอุทัย. 2553. การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรารักษ์ อวนญวน. 2550. โครงการผลิตเอทานอลจากไซโลส. ทุนอุดหนุนการวิจัย จากกองทุนส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน ประจำปีงบประมาณ 2550. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

อัมรินทร์. 2552. Adjusted R square. ที่มา: http://supawong.blogspot.com/2009/09/square.html. 12 ตุลาคม 2556.

Cabral, J.M.S. 1991. Extractive removal of product by biocatalysis, in: B. Mattiasson, O. Holst (Eds.), Extractive Bioconversions, Marcell Dekker Inc., New York, pp. 207–235.

Cot, M., Loret, M-O., François, J,. Benbadis, L. 2007. Physiological behaviourof *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentationfor high level production of bioethanol. FEMS Yeast Res 7: 22–32. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00152.x.

Egan, B.Z., Douglas, D.L., and David, A.M. 1988. Solvent extraction and recovery of ethanol from aqueous solutions. Ind. Eng. Chem. Res. 27 (7): 1330–1332.

Jame, C.S. 1995. Analytical chemistry of foods. London: Blackie A and P.

Munson, C.L., King, C.J. 1984. Factors influencing solvent selection for extraction of ethanol from aqueous solutions, Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. 23, 109–115.

Murphy, T.K., Blanch, H.W., Wilke, C.R. 1984. Recovery of Fermentation Products From Dilute Aqueous Solutions; Report LBL-17979; Lawrence Berkeley Laboratory: Berkeley, CA.

Offeman, R.D., Stephenson, S.K., Robertson, G.H., and Orts, W.J. 2005. Solvent extraction of ethanol from aqueous solutions.II.Linear, Branched and ring Alcohol Solvent. Ind. Eng. Chem. Res., 2005, 44(17): 6797–6803.

Pilone, G.J. 1985. Determination of ethanol in wine by titrimetric and spectrophotometric dichromate methods: collaborative study [Online]. Available Source: http://europepmc.org/abstract/med/3988696

Roddy, J.W. 1981. Distribution of ethanol–water mixtures to organic liquids, Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. 20, 104–108.

Seo, H.B., Kim, H.J., Lee, O.K., Ha, J.H., Lee, H.Y., and Jung, K.H. 2009. Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 285-292.